

**TESI DOCTORAL**

**Núria Saperas Plana**

**Distribució i caracterització  
de les proteïnes espermàtiques bàsiques  
en peixos, agnats i procordats**

**Desembre, 1992**



Distribució i caracterització  
de les proteïnes espermàtiques bàsiques  
a peixos, agnats i procordats

Memòria presentada per NÚRIA SAPERAS PLANA per accedir al grau de Doctor en Ciències del Mar. El treball ha estat realitzat sota la direcció dels doctors Domènec LLORIS SAMO i Manel CHIVA ROYO a l'Institut de Ciències del Mar (CSIC), al Departament d'Enginyeria Química de l'ETSEIB (UPC) i, en part, al Department of Biochemistry and Microbiology, University of Victoria (Canadà).

L'autor:

Núria Saperas Plana

Vist-i-plau:

Domènec Lloris Samo  
(Director i tutor)

Manel Chiva Royo  
(Director)



*Al Manel*  
*i als meus pares*



*Vull dedicar aquestes línies a totes aquelles persones que d'una manera o altra han contribuït o han "patit" el desenvolupament d'aquest treball.*

*En primer lloc vull expressar el més sincer agraïment als directors d'aquesta tesi, els doctors Manel Chiva i Domènec Lloris. L'experiència i coneixements en els seus respectius camps, així com el suport que m'han brindat, han estat un ajut inestimable. Els vull agrair, a més, la valentia i l'esforç que suposa el treballar per aproximar dues línies de treball massa sovint molt allunyades.*

*Vull agrair també al Dr. J.A. Subirana l'haver-me acollit al seu laboratori com un més del seu equip així com l'haver accedit a ser el president d'aquest tribunal.*

*Igualment mereix el meu profund agraïment el Dr. Joan Ausió al laboratori del qual s'ha desenvolupat una part important del present estudi. Des d'aquí vull agrair-li la seva entrega i entusiasme i la magnífica acollida que tant ell com la Neus em van brindar. També he d'agrair-li l'haver accedit a formar part d'aquest tribunal.*

*Als diferents centres on he tingut la sort de treballar sempre hi he trobat companys magnífics que han col·laborat en fer d'aquest temps una estada no només profitosa sinó també molt agradable. Haig de mencionar molt especialment les que han estat durant tant de temps les meves companyes de laboratori, la Montse Daban i la Carme Cáceres, així com als meus "companys dels divendres" Constantí Stefanescu, Lluís del Cerro i Cesca Calderón. També vull agrair l'ajut desinteressat que em va brindar el Jerónimo Bravo durant els últims moments de la realització d'aquest treball.*

*Igualment vull manifestar el meu agraïment envers el doctor H.E. Kasinsky pel seu constant interès en el desenvolupament del present treball així com per la informació bibliogràfica i les mostres biològiques que ens ha enviat tantes vegades. Aquestes línies s'han de fer extensives també a la Dra. Ellen Rosenberg i al David Kulak.*

*Els consells i el temps que em va dedicar Jaume Rucabado són també dignes del meu reconeixement.*





*Gràcies també a la competència i completa disposició que sempre han mostrat la Jenny Colom i el Josep Maria Ripol, i també al Joaquim Subirats pel treball realitzat en la part gràfica d'aquesta tesi.*

*Al Dr. J. Nadal li dec l'haver-me posat en contacte amb el grup de treball al que després m'incorporaria, igualment l'haver acceptat ser membre d'aquest tribunal.*

*Ha estat també un plaer el tenir l'oportunitat de treballar conjuntament amb el Dr. Enric Ribes a qui també haig d'agrair el que acceptés formar part d'aquest tribunal.*

*Així mateix vull expressar la meva gratitud al Dr. R. Oliva per haver accedit a pertànyer al tribunal que ha de jutjar aquest treball.*

*Vull agrair també els esforços realitzats per part dels responsables i personal dels diferents serveis científics per aconseguir els resultats més acurats. En especial vull agrair el treball i l'amabilitat de l'Isidre Casals, Maria Reixach i Pilar Fernández (Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona), Carlos Buesa (Servei de Seqüenciació de Proteïnes de la Universitat de Barcelona), i Sandy Kielland (Protein Microchemistry Center, University of Victoria). Gràcies també a l'Armando Jardim (Department of Biochemistry and Microbiology, Universitat de Victoria) pel seu ajut i la seva paciència.*

*Hi ha hagut moltes persones que al llarg d'aquest temps han col·laborat en l'obtenció de part del material biològic. Vull agrair en particular l'esforç realitzat pel Roger Villanueva, Lluís Mercader, Balbina Moli, P. Alvarez, A. Sitjà, Francesc Piferrer, Elba Morriconi, Javier Feliu i el doctor Francesc Castelló, així com la bona disposició en tot moment del personal del buc oceanogràfic García del Cid. Mereix una distinció molt especial el Dr. Cisco Sardà que molt amablement sempre em va deixar participar en les seves campanyes.*

*Finalment però no menys important, vull agrair de tot cor l'ajuda i el suport que en tot moment he trobat en la meva família i el Javi. Malgrat que molt sovint els ha tocat suportar els meus nervis quan les coses anaven maldades sé que ara estan tan satisfets com jo mateixa per haver arribat a aquest punt.*



## ***Abreviatures***

aa	Aminoàcid
AA	Àcid acètic
ACN	Acetonitril
Bisacrilamida	N,N'-metilen bisacrilamida
BPTI	Inhibidor de la tripsina de pàncreas boví
CM	Carboximetil
DO	Densitat òptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Àcid etilendiamintetraacètic
GPAU	Gel de poliacrilamida/acètic/urea
GPTU	Gel de poliacrilamida/tritó/urea
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
OPA	Ortoftaldehid
pb	Parells de bases
PCA	Àcid perclòric
PEB	Proteïna espermàtica bàsica, proteïnes espermàtiques bàsiques
PITC	Fenilisotiocianat
PSA	Persulfat amònic
PTC	Feniltiocarbamil
PTH	Feniltiohidantoïna
rpm	Revolucions per minut
SDS	Dodecil sulfat sòdic
Sed.	Sediment
Sobn.	Sobrenadant
TCA	Àcid tricloracètic
TEA	Trietilamina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TFA	Àcid trifluoroacètic
TLCK	N $\alpha$ -p-tosil-L-lisina-cloro-metil-cetona (hidrocarbur)
UV	Llum ultraviolat
v.	Veure



# *Índex de continguts*

RESUM .....	1
I. INTRODUCCIÓ .....	3
1. Estructura i composició de la cromatina somàtica enfront de la cromatina de l'espermatozoide .....	5
1.1. La cromatina de les cèl.lules somàtiques.....	5
2.2. La cromatina dels espermatozoides.....	10
1.2.1. Nuclihistona i nucliprotamina.....	12
1.2.2. La fibra de 30 nm i altres estructures d'ordre superior al nucli d'espermatozoides .....	17
2. Les proteïnes espermàtiques bàsiques en els deuteròstoms .....	20
2.1. Equinoderms.....	20
2.1.1. Consideracions generals .....	20
2.1.2. Variabilitat dins dels equinoderms .....	21
2.1.3. Estructura i interacció amb el DNA de les histones H1 i H2B espermàtiques dels equinoderms.....	24
2.2. Peixos ossis .....	31
2.2.1. Espècies posseïdores de protamines. Característiques generals d'aquestes protamines i els seus gens.....	32
2.2.2. Espècies posseïdores d'histones .....	38
2.2.3. Casos especials .....	40
2.2.4. Problemàtica evolutiva.....	42
2.3. Peixos cartilaginosis .....	46
2.4. Tetràpodes .....	51
2.4.1. Amfibis .....	51
2.4.1.1. Anurs .....	51

2.4.1.2. Urodels .....	57
2.4.2. Rèptils .....	58
2.4.3. Aus .....	61
2.4.4. Mamífers .....	64
3. Plantejament i objectius del present treball.....	71
II. MATERIALS I MÈTODES .....	73
1. Material biològic .....	75
2. Mètodes preparatius .....	81
2.1. Obtenció i conservació d'esperma i gònades .....	81
2.2. Obtenció dels nuclis espermàtics .....	81
Variants sobre el mètode d'obtenció de nuclis .....	84
2.3. Extracció de les proteïnes nuclears bàsiques .....	85
2.3.1. Extracció d'histones.....	85
Extracció de la histona H1 .....	85
2.3.2. Extracció de protamines .....	87
2.3.2.1. Solubilització en àcids .....	87
2.3.2.2. Insolubilització en solucions contenint SDS..	87
2.3.3. Extracció de proteïnes espermàtiques bàsiques de naturalesa desconeguda.....	89
2.4. Precipitació de proteïnes .....	91
2.4.1. Precipitació amb acetona .....	91
2.4.2. Precipitació amb àcid tricloracètic (TCA) .....	92
2.5. Assecat de proteïnes .....	92
2.6. Reducció dels ponts disulfur formats entre cisteïnes .....	93
2.6.1. Reducció sense modificació química .....	93
2.6.2. Reducció i modificació química .....	94
2.6.2.1. Reducció i alquilació amb iodoacetamida.....	94
2.6.2.2. Reducció i alquilació amb 4-vinilpiridina .....	95

2.7. Purificació de proteïnes .....	96
2.7.1. Mètodes cromatogràfics .....	96
2.7.1.1. Cromatografia de bescanvi iònic .....	96
2.7.1.2. Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) en fase reversa .....	98
2.7.2. Electroelució .....	99
2.8. Concentració de proteïnes en dissolució .....	102
3. Mètodes analítics .....	105
3.1. Mètodes electroforètics .....	105
3.1.1. Anàlisi de proteïnes bàsiques en gels de poliacrilamida /acètic/urea (GPAU) .....	105
3.1.1.1. GPAU segons la metodologia de Panyim i Chalkley .....	106
3.1.1.2. GPAU segons el sistema discontinu de Reisfeld.....	108
3.1.2. Anàlisi de proteïnes bàsiques en gels de poliacrilamida /tritó/urea (GPTU).....	110
GPTU amb tritó X-100 6 mM i urea 6 M.....	111
3.1.3. Anàlisi de proteïnes bàsiques en gels bidimensionals amb la segona dimensió en gel discontinu amb SDS.....	113
3.1.4. Detecció de les bandes.....	118
3.1.4.1. Tinció amb Coomassie blue .....	118
3.1.4.2. Tinció amb Amido black amb sensibilitat incrementada.....	119
3.1.5. Conservació dels gels.....	120
3.2. Quantificació de la intensitat de les bandes .....	121
3.3. Determinació de la quantitat de proteïna en mostres en dissolució .....	121
3.4. Determinació del número d'aminoàcids d'una proteïna .....	122
3.5. Determinació de la composició en aminoàcids d'una proteïna..	123
3.6. Determinació per electroforesi del número de cisteïnes d'una	

proteïna.....	127
3.7. Trencament de proteïnes i pèptids .....	131
3.7.1. Tripsina de pàncreas boví.....	131
3.7.2. Elastasa.....	132
3.7.3. Bromur de cianògen .....	133
3.8. Determinació de la seqüència d'aminoàcids d'una proteïna.....	134
3.8.1. Procediment general.....	134
3.8.2. Degradació recurrent d'Edman .....	134
3.8.2.1. Acoblament .....	135
3.8.2.2. Trencament .....	136
3.8.2.3. Conversió .....	136
III. RESULTATS .....	139
1. Proteïnes espermàtiques bàsiques als tunicats .....	145
1.1. Justificació .....	145
1.2. Estudi de les PEB d' <i>Styela montereyensis</i> .....	146
1.2.1. Contingut protèic .....	148
1.2.2. Fraccionament cromatogràfic i anàlisi aminoacídica.....	152
1.3. Estudi de les PEB d' <i>Styela plicata</i> .....	156
1.3.1. Contingut protèic .....	156
1.3.2. Fraccionament cromatogràfic.....	159
1.3.3. Composició aminoacídica .....	164
1.3.4. Comportament de la P1 enfront de la tripsinització i anàlisi aminoacídica del pèptid resistent.....	165
1.3.5. Estructura primària de la P1.....	169
1.3.6. Possible relació entre les proteïnes P1 i P2 d' <i>Styela plicata</i> .....	172
1.4. Estudi de les PEB d'altres tunicats de la classe Ascidiacea .....	174
1.4.1. Patró general de les PEB de la classe Ascidiacea.....	175
1.4.2. Variabilitat de les PEB dins de les diferents famílies	



d'ascidiacis.....	177
1.4.2.1. Família Ascidiidae (subordre Phlebobranchiata, ordre Enterogona) .....	178
1.4.2.2. Família Pyuridae (subordre Stolidobranchiata, ordre Pleurogona).....	179
1.4.2.3. Família Styelidae (subordre Stolidobranchiata, ordre Pleurogona).....	181
1.5. Estudi de les PEB de la classe Thaliacea (salpes) .....	183
2. Proteïnes espermàtiques bàsiques als cefalocordats	
2.1. Introducció .....	185
2.2. Caracterització de les PEB.....	186
3. Proteïnes espermàtiques bàsiques als agnats .....	192
4. Proteïnes espermàtiques bàsiques als holocèfals (condrictis).....	199
4.1. Justificació .....	199
4.2. Proteïnes nuclears espermàtiques i testiculars.....	200
4.3. Purificació i anàlisi composicionals de les PEB extraïbles sense reducció prèvia (R3 i m0).....	205
4.4. Seqüenciació de l'extrem N-terminal de la protamina R3.....	208
4.5. Purificació i anàlisi composicional de les PEB extraïbles només amb reducció prèvia (R1, R2, m1, m2 i m3).....	210
5. Proteïnes espermàtiques bàsiques als teleostis (osteïctis).....	216
5.1. Ordre Notacanthiformes .....	218
5.2. Ordre Clupeiformes .....	220
5.3. Ordre Salmoniformes .....	222
5.4. Ordre Myctophiformes .....	223
5.5. Ordre Gadiformes .....	228
5.6. Ordre Ophidiiformes .....	233
5.7. Ordre Lophiiformes .....	235
5.8. Ordre Scorpaeniformes.....	236
5.8.1. Família Scorpaenidae.....	236

5.8.2. Família Triglidae .....	238
5.9. Ordre Perciformes.....	238
5.9.1. Família Percichthyidae.....	240
5.9.2. Família Sparidae.....	243
5.9.3. Família Mullidae.....	247
5.9.4. Família Labridae .....	256
5.9.5. Famílies Nototheniidae, Harpagiferidae i Channichthyidae .....	257
5.9.6. Famílies Trachinidae i Uranoscopidae.....	258
5.9.7. Família Blenniidae.....	261
5.9.8. Família Trichiuridae .....	262
5.9.9. Família Gempylidae .....	263
5.9.10. Família Scombridae .....	263
5.10. Resum dels tipus de PEB presents als teleostis .....	268
5.11. Determinació de l'estructura primària de les PEB de dos teleostis.....	271
5.11.1. Seqüenciació de la protamina de <i>Dicentrarchus         labrax</i> (Percichthyidae) .....	271
5.11.2. Seqüència parcial de la PEB de major mobilitat de <i>Mullus surmuletus</i> (Mullidae). Estructura primària, estructura secundària i hidrofilitat .....	275
 IV. DISCUSSIÓ .....	 283
1. Definició del model de PEB característic de cada un dels grups estudiats .....	285
1.1. Tunicats .....	285
1.2. Cefalocordats.....	290
1.3. Agnats .....	293
1.4. Peixos cartilaginosa .....	296
1.4.1. Model de proteïnes espermàtiques bàsiques .....	296

1.4.2. Característiques de les molècules .....	298
1.5. Peixos ossis .....	300
2. Problemes d'interès especial .....	315
2.1. Tipus de molècules específiques del nucli espermàtic i les seves possibles relacions evolutives .....	315
2.2. El problema de l'esporadicitat de les protamines o histones als peixos ossis .....	321
2.3. ¿Es pot definir una línia evolutiva ininterrompuda en les PEB dels deuteròstoms? .....	331
V. CONCLUSIONS .....	333
VI. ANNEXOS.....	337
Annex 1. Aminoàcids: Nomenclatura i característiques dels seus radicals .....	339
Annex 2. Recull de la informació disponible sobre el tipus de PEB dels peixos ossis.....	341
VII. BIBLIOGRAFIA.....	349



## *Índex de figures*

Figura I-1	.....	6
Figura I-2	.....	9
Figura I-3	.....	16
Figura I-4	.....	22
Figura I-5	.....	25
Figura I-6	.....	30
Figura I-7	.....	33
Figura I-8	.....	36
Figura I-9	.....	44
Figura I-10	.....	48
Figura I-11	.....	55
Figura I-12	.....	56
Figura I-13	.....	65
Figura I-14	.....	67
Figura II-1	.....	76
Figura II-2	.....	83
Figura II-3	.....	86
Figura II-4	.....	88
Figura II-5	.....	90
Figura II-6	.....	100
Figura II-7	.....	107
Figura II-8	.....	123
Figura III-1	.....	143
Figura III-2	.....	146
Figura III-3	.....	147
Figura III-4	.....	151
Figura III-5	.....	152
Figura III-6	.....	154
Figura III-7	.....	157
Figura III-8	.....	158
Figura III-9	.....	160

Figura III-10	.....	161
Figura III-11	.....	162
Figura III-12	.....	163
Figura III-13	.....	166
Figura III-14	.....	168
Figura III-15	.....	169
Figura III-16	.....	170
Figura III-17	.....	176
Figura III-18	.....	179
Figura III-19	.....	180
Figura III-20	.....	182
Figura III-21	.....	183
Figura III-22	.....	185
Figura III-23	.....	187
Figura III-24	.....	188
Figura III-25	.....	191
Figura III-26	.....	193
Figura III-27	.....	194
Figura III-28	.....	196
Figura III-29	.....	197
Figura III-30	.....	201
Figura III-31	.....	203
Figura III-32	.....	204
Figura III-33	.....	206
Figura III-34	.....	209
Figura III-35	.....	211
Figura III-36	.....	214
Figura III-37	.....	217
Figura III-38	.....	219
Figura III-39	.....	221
Figura III-40	.....	222
Figura III-41	.....	224
Figura III-42	.....	225
Figura III-43	.....	227
Figura III-44	.....	229
Figura III-45	.....	230
Figura III-46	.....	232
Figura III-47	.....	234

Figura III-48	.....	235
Figura III-49	.....	237
Figura III-50	.....	240
Figura III-51	.....	242
Figura III-52	.....	245
Figura III-53	.....	246
Figura III-54	.....	247
Figura III-55	.....	249
Figura III-56	.....	251
Figura III-57	.....	253
Figura III-58	.....	255
Figura III-59	.....	256
Figura III-60	.....	258
Figura III-61	.....	259
Figura III-62	.....	261
Figura III-63	.....	262
Figura III-64	.....	264
Figura III-65	.....	270
Figura III-66	.....	274
Figura III-67	.....	276
Figura III-68	.....	277
Figura III-69	.....	278
Figura III-70	.....	279
Figura III-71	.....	280
Figura IV-1	.....	288
Figura IV-2	.....	289
Figura IV-3	.....	293
Figura IV-4	.....	297
Figura IV-5	.....	302
Figura IV-6	.....	306
Figura IV-7	.....	311
Figura IV-8	.....	312
Figura IV-9	.....	318
Figura IV-10	.....	319
Figura IV-11	.....	320
Figura IV-12	.....	327
Figura IV-13	.....	328





## *Índex de taules*

Taula I-1	53
Taula I-2	59
Taula II-1	77
Taula II-2	80
Taula II-3	107
Taula II-4	111
Taula II-5	115
Taula II-6	115
Taula II-7	129
Taula III-1	148
Taula III-2	153
Taula III-3	155
Taula III-4	164
Taula III-5	167
Taula III-6	172
Taula III-7	189
Taula III-8	198
Taula III-9	207
Taula III-10	212
Taula III-11	215
Taula III-12	252
Taula III-13	265
Taula III-14	266
Taula III-15	267
Taula III-16	269
Taula III-17	272
Taula III-18	273
Taula IV-1	323



## RESUM

En aquest treball es caracteritzen les proteïnes espermàtiques bàsiques (PEB) que condensen el DNA de l'espermatozoide de diferents grups de deuteròstoms, tant procordats (tunicats o urocordats i cefalocordats) com vertebrats (agnats, peixos cartilaginosos i peixos ossis), fent especial èmfasi en el cas dels peixos ossis. L'objecte d'aquesta anàlisi ha estat l'intent d'obtenir més informació sobre l'evolució molecular de les PEB en els deuteròstoms, ja que no hi havia informació fins al moment referent als urocordats, cefalocordats i agnats.

Concretament, dins dels tunicats s'han estudiat extensivament dues espècies del gènere *Styela* (classe Ascidiacea) així com 7 espècies més pertanyents també a aquesta classe i una pertanyent a la classe Thaliacea. Els resultats mostren que la PEB característica dels ascidiacis és la proteïna que hem anomenat P1, apareixent en el gènere *Styela* una proteïna específica addicional P2. Aquestes proteïnes (P1, P2), malgrat ser totes dues altament bàsiques (50-70%), presenten característiques diferents tant en la mida, mobilitat electroforètica, composició i estructura. L'estudi de la P1 d'*Styela plicata* mostra que es tracta d'una proteïna relacionada amb la histona H1 o proteïnes afins; així presenta un nucli resistent a la tripsina la composició aminoacídica del qual és molt similar al d'aquesta família de proteïnes. Igualment, l'estudi de la seqüència parcial d'aquesta proteïna (extrem N-terminal, zona globular central i part de l'extrem C-terminal) mostra una estreta relació entre ambdós tipus de proteïnes. Una peculiaritat de la P1 és el presentar un braç N-terminal extraordinàriament reduït, consistent només en dues arginines. Per la seva banda, la P2 es mostra com una molècula més especialitzada, de mida menor, menor diversitat aminoacídica i major basicitat (per un major acúmul d'Arg). La composició de la P2 recorda molt la de la P1, fet que fa pensar en un possible origen d'aquesta proteïna a partir de la P1.

L'única espècie estudiada d'entre els cefalocordats, *Branchiostoma floridae*, mostra al nucli del seu espermatozoide una proteïna molt especialitzada que substitueix pràcticament la totalitat de les histones al llarg de l'espermiogènesi. Aquesta proteïna consta només de 6 tipus diferents d'aminoàcids destacant-ne els aminoàcids bàsics (24.7% de Lys, 25.3% d'Arg). Hem estudiat la seqüència aminoacídica parcial de l'extrem N-terminal d'aquesta proteïna descobrint la presència del motiu alternant Arg-Ser (que es troba també en altres PEB de grups no relacionats).

Durant l'espermiogènesi de *Petromyzon marinus* (agnat cefalaspido-morf) les histones no es veuen substituïdes per cap altra proteïna específica de l'espermatozoide sinó que es mantenen com a úniques proteïnes responsables de la condensació de la cromatina del nucli espermàtic.

Dins dels peixos cartilaginosos, hem estudiat les PEB d'*Hydrolagus colliei* (condricti de la línia dels holocèfals) i hem vist que malgrat el "model" de contingut de proteïnes espermàtiques bàsiques és el mateix (una proteïna

no queratinosa més dues de queratinoses), les característiques de les molècules en sí difereixen substancialment. Així, l'estudi de la seqüència parcial de la proteïna no queratinosa R3 d'aquesta espècie mostra diferències importants respecte a la corresponent proteïna trobada als elasmobranquis i amb la protamina típica dels peixos ossis, amb qui sovint se l'ha relacionada.

Entre els osteïctis hem estudiat les PEB de 32 espècies representants de 24 famílies corresponents a 9 ordres diferents de teleostis. Es disposa de la caracterització electroforètica de totes, l'anàlisi composicional de 16, i s'han estudiat les estructures primàries de dues espècies més. En aquest grup hem trobat una gran varietat de continguts de proteïnes espermàtiques bàsiques: a) protamines típiques; b) histones sense cap altra proteïna addicional; c) histones somàtiques amb un increment de l'H1; d) histones amb proteïnes específiques addicionals; e) proteïnes específiques diferents de les protamines típiques (però que també substitueixen les histones). La distribució d'aquests diferents tipus de continguts no mostra una relació amb la classificació filogenètica de les espècies implicades (no obstant, el model de PEB presentat és consistent dins de cada família). Tenint en compte aquesta distribució, així com consideracions de tipus funcional, es discuteixen les possibles explicacions d'aquesta "esporadicitat" observada.

Hem seqüenciat les PEB de dos peixos representants dels dos casos generals de substitució de les histones al nucli espermàtic que hem trobat. Així, hem seqüenciat completament la PEB de *Dicentrarchus labrax* (protamina típica) i parcialment la de *Mullus surmuletus* (proteïna específica de l'espermatozoide diferent de les protamines típiques). Aquesta última proteïna es mostra relacionada amb la família de les histones H1 o afins. Així, consta d'uns extrems N i C-terminals enriquits en aminoàcids bàsics i una zona central resistent a la tripsina on s'acumulen els residus hidrofòbics. Tant l'anàlisi de la seva estructura primària parcial (extrem N-terminal, zona globular i part de l'extrem C-terminal) com de l'estructura secundària predida mostren una gran similitud amb les corresponents de les histones H1, especialment en la zona globular central, que és el domini més conservat en les H1s.

Hem classificat les diferents PEB trobades als grups estudiats en dos tipus generals de molècules: a) proteïnes relacionades amb histones (generalment l'H1); i b) proteïnes especialitzades. Les primeres correspondrien a molècules grans amb una zona més hidrofòbica resistent a la tripsinització, i un o dos extrems molt bàsics i no resistents (ex. P1 dels ascidiàcis, PEB del *Mullus* i altres proteïnes específiques addicionals trobades en peixos ossis). Les molècules que anomenem especialitzades correspondrien a proteïnes menors i amb baixa proporció o sense aminoàcids hidrofòbics, sent l'Arg i la Lys els aminoàcids que constitueixen la major part de la molècula (ex. P2 d'*Styela*, P de l'amfiox, R3 d'*H. collicii*, protamines típiques dels peixos ossis).

No sembla existir una relació d'homologia entre les proteïnes bàsiques del nucli de l'espermatozoide trobades en cada un dels grups de deuteròstoms estudiats sinó que més aviat es tracta de solucions a un mateix problema adoptades amb independència (encara que per camins similars en alguns casos).

# ***I. Introducció***



En aquesta introducció es volen exposar els antecedents necessaris per comprendre la gran variabilitat evolutiva en les proteïnes bàsiques específiques del nucli de l'espermatozoide en el món animal i, concretament, en el grup zoològic dels deuteròstoms. Ja que la funció general que caracteritza a totes aquestes proteïnes és la condensació del nucli de l'espermatozoide, dediquem una primera part a exposar l'estructura general de la cromatina en cèl·lules somàtiques i espermatozoides (nuclihistona, nucliprotamina). Posteriorment es fa una petita revisió de les proteïnes específiques espermàtiques i l'estructura cromatínica conegudes en els deuteròstoms.

## 1. Estructura i composició de la cromatina somàtica enfront de la cromatina de l'espermatozoide

### 1.1. La cromatina de les cèl·lules somàtiques

En una cèl·lula eucariòtica promig podem trobar, aproximadament, un metre de DNA; aquest DNA es troba complexat amb una massa igual d'unes proteïnes bàsiques relativament ben conservades durant l'evolució, les *histones*. El DNA associat a les histones es sol designar sota el terme de *cromatina*. Addicionalment i depenent del tipus de cèl·lules, s'hi pot trobar una massa igual de proteïnes cromosòmiques no histones així com diferents tipus de RNA. Tota aquesta barreja s'inclou normalment en el concepte de cromatina (McGhee, 1986).

L'any 1974 Kornberg va proposar que l'estructura de la cromatina estava basada en una subunitat repetitiva consistent en un petit complex DNA-histones. El terme *nucleosoma* va ser adoptat més tard per designar aquesta partícula (Oudet et al., 1975). La presència dels nucleosomes és el que confereix a la cromatina l'estructura en "collaret de perles" que s'observa en les micrografies electròniques.

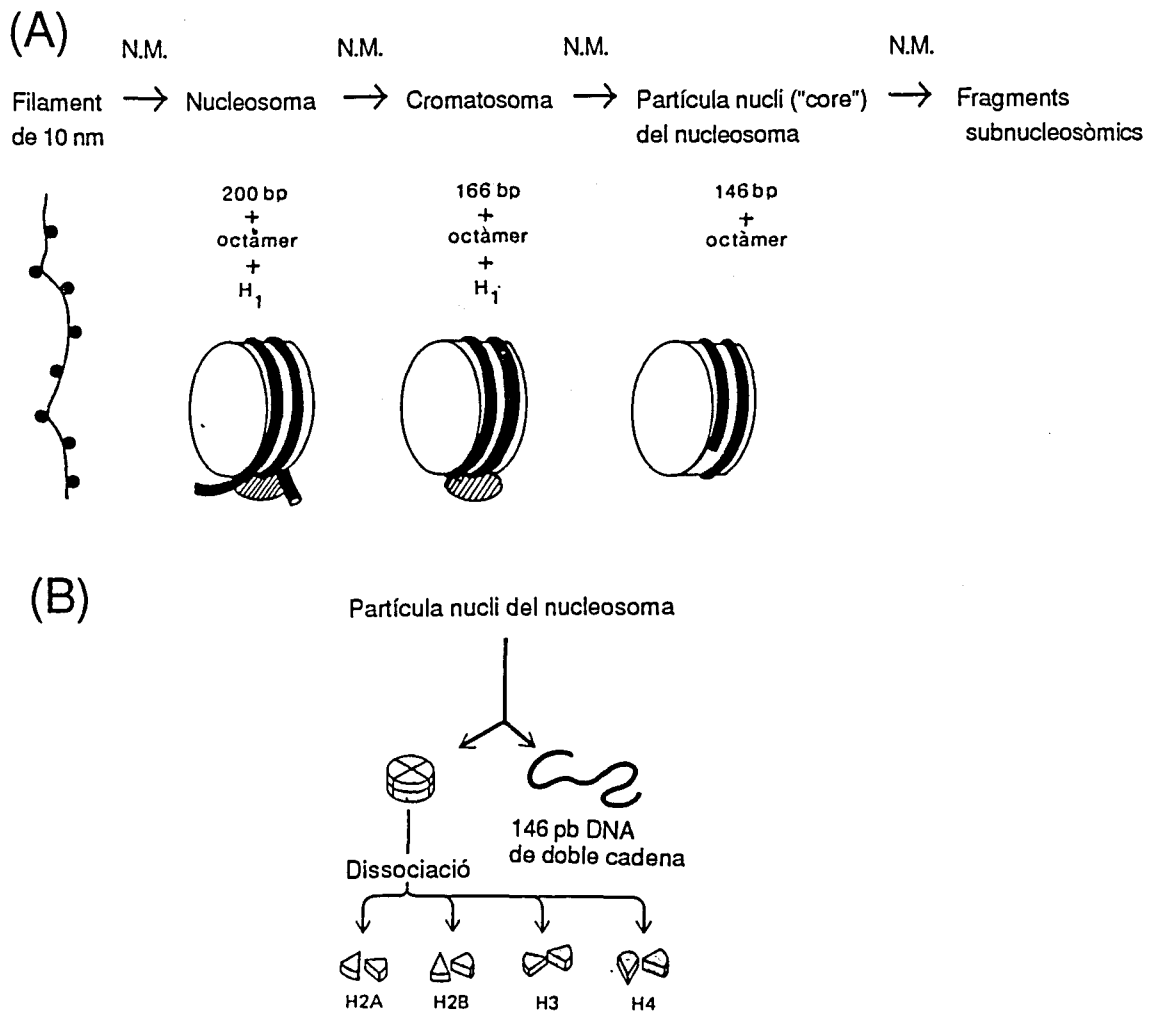


Figura I-1. Estructura del nucleosoma. Diagrama esquemàtic que il·lustra la relació entre el nucleosoma, el cromatosoma i la partícula nucli generats per digestió amb nucleasa micrococcal (A) i la composició de la partícula nucli del nucleosoma (B). Els esquemes s'han modificat a partir dels originals que apareixen a Babu i Verma (1987) i Alberts (1983), respectivament. N.M. = Digestió amb nucleasa micrococcal.

Com s'aprecia a la figura I-1(A), la dissecció dels nivells més baixos de l'estructura de la cromatina s'ha basat en bona part en la utilització de la nucleasa micrococcal, la qual tendeix a tallar entre les partícules nucleoprotèiques en l'anomenat DNA "linker" o espaciador. Aquests talls alliberen el nucleosoma, la unitat repetitiva bàsica de la cromatina. El nucleosoma està format per l'associació d'uns 200 parells de bases (varia segons l'origen de la



cromatina) amb una única molècula d'histona H1 i amb un octàmer protèic constituït per dues molècules de cada una de les histones H2A, H2B, H3 i H4 (McGhee, 1986; Pederson et al., 1986) (v. figura I-1, A i B). La forma global adoptada per aquest octàmer es la d'un disc o cilindre d'uns 11 nm de diàmetre i 5.5 nm d'alçada (revisat per McGhee, 1986).

En un nucleosoma es pot distingir la part anomenada *cromatosoma*, que conté totes les histones més 166 parells de bases (pb) de DNA, i el DNA "linker" o espaciador d'aproximadament 35-40 pb (Simpson, 1978). El DNA espaciador d'un nucleosoma aïllat pot ser degradat per la nucleasa micrococal fins a rendir el cromatosoma; digestions més intenses causen la pèrdua de la histona H1 mentre que l'octàmer d'histones protegeix encara a uns 146 pb de DNA que donen 1.75 voltes en sentit levògir al voltant d'aquest conjunt protèic (Richmond et al., 1984; Burlingame et al., 1985). A aquesta estructura se l'anomena partícula nucli ("core") del nucleosoma (v. figura I-1). La massa molecular de la partícula nucli s'ha estimat en uns 206.000 daltons, distribuïts per igual, *grosso modo*, entre el DNA i la proteïna.

El fragment de 166 pb trobat al cromatosoma sembla provenir dels 146 pb del DNA de la partícula nucli per addició de 10 pb en cada extrem. Aquesta protecció addicional vindria donada per l'H1. La histona H1 és una molècula d'estructura tripartita consistent en una regió globular central i dues "cues", les regions N i C-terminals. La part globular ha estat altament conservada durant l'evolució, a diferència de les menys estructurades i altament bàsiques regions terminals. Segons el model proposat per Allan et al. (1980), la unió de l'H1 s'efectuaria per la part globular, prop dels punts d'entrada i sortida del DNA del cromatosoma.

Pel que fa al DNA "linker", s'ha apuntat anteriorment una longitud promig d'uns 35-40 pb, no obstant aquest valor pot variar des de 0, en cromatines com les dels llevats (Lohr et al., 1977), fins a 80-90 pb en l'esperma d'erions de mar (Kornberg, 1977; McGhee et al., 1983a); també s'han trobat variacions en la longitud del "linker" inclús dins d'un mateix tipus cel·lular (Prunell i Kornberg, 1982). Malgrat el significat funcional precís d'aquestes variacions en els DNAs espaciadors encara no està ben comprès, sembla ser

---

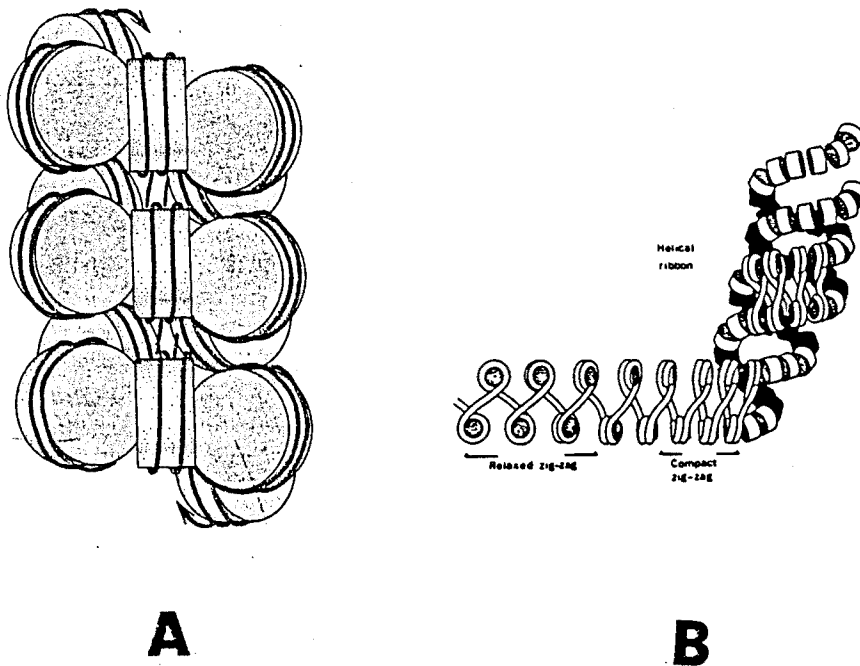
que aquestes diferències poden repercutir en les variacions en l'empaquetament dels nucleosomes en estructures d'ordre superior (v. més endavant).

D'altra banda, tampoc el conjunt d'histones constituents del nucleosoma és tan uniforme com sembla a primera vista. De fet, la composició dels nucleosomes pot ser diversa degut a les variants trobades dins dels tipus principals d'histones: Amb l'excepció de la histona H4, cada un dels altres tipus d'histones consisteix en dues o més variants de seqüència; la presència concreta de cada un d'aquests subtipus (o variants) en una cromatina varia filogenèticament (Zweidler, 1980, 1984) i durant el desenvolupament i diferenciació dins d'una mateixa espècie (Poccia, 1986). Conseqüentment, tot i tractar-se de proteïnes altament conservades, les histones no han de considerar-se com a proteïnes estrictament invariables. Recentment s'han revisat les variants d'histones en l'espècie humana (Gabrielli, 1989) i en tot el món viu (Klyszejko-Stefanowicz et al., 1989). En aquesta revisió es mostra que la presència d'histones és pràcticament universal en els diferents regnes dels eucariotes, fet pel qual hem de pensar que histones/nucleosomes són molècules/estructures relacionades amb la consecució de la qualitat de "eucariota".

Se sap des de fa temps que a la cèl·lula la cromatina no es troba generalment en la forma de filament de 10 nm o configuració en "collaret de perles" sinó que més aviat es troba en forma d'una fibra més gruixuda, d'uns 30 nm de diàmetre per terme mig (v. per exemple Davies et al., 1974; Ris i Korenberg, 1979). Encara no està clar com s'organitza el DNA en aquesta fibra de 30 nm, però els diversos models proposats poden resumir-se en dos grans grups. El primer és el model del solenoide i les seves variants (figura I-2). Segons aquest model, proposat primerament per Finch i Klug (1976), el filament de 10 nm es disposaria en forma d'hèlix amb les successives voltes en estret contacte entre elles compactant el DNA genòmic entre 5 i 10 vegades (figura I-2, A). Aquest model bàsic ha estat extès per altres autors com Worcel i Benyajati (1977), Worcel (1977), Thoma et al. (1979) i Woodcock et al. (1984) (v. figura I-2, B). Aquests models es basen en la premisa que el filament de 10 nm pot adoptar una configuració en ziga-zaga en la que els nucleosomes quedarien enfrontats i disposats en dues fileres paral·leles. El número de

nucleosomes per volta varia segons el model que es consideri, però en general es parla de 6-8 nucleosomes per volta d'hèlix.

Figura I-2. La fibra de cromatina de 30 nm. Representació del model bàsic del solenoide (A) i de la variant d'aquest model proposada per Woodcock et al. l'any 1984 (B).



La segona classe de models proposats per descriure l'estructura de la fibra de 30 nm seria la que defensa l'organització en "superbeads"; és a dir, els seguidors d'aquest model proposen que aquesta fibra consisteix en una ordenació linear d'agrupacions granulars consistents en conjunts de 10-50 nucleosomes. Aquest model ha estat defensat per un bon nombre d'investigadors, principalment microscopistes (Hozier et al., 1977; Jorcano et al., 1980; Zentgraf

et al., 1980b; Zentgraf i Franke, 1984; etc.), i es coneix també com a model "discontinu" (en contraposició al model "continu" o de tipus solenoide).

En tot cas, sembla que la histona H1 és necessària per la formació de la fibra de 30 nm. Així, s'ha vist que polinucleosomes dels quals s'ha eliminat l'H1 no formen estructures regulars d'ordre superior encara que poden condensar de forma irregular (Thoma et al., 1979). A més, s'ha vist que aquesta estructura d'ordre superior en forma de fibra pot ser reconstituïda per nova addició d'H1 als polinucleosomes (Thoma i Koller, 1981; Allan et al., 1981).

En els cromosomes mitòtics es creu que la fibra de 30 nm es replega en nombroses zones en forma de llaços de longitud variable entre 30.000 i 100.000 pb (Cook i Brazell, 1976; Benyajati i Worcel, 1976; Paulson i Laemmli, 1977; Marsden i Laemmli, 1979). Possiblement aquests llaços o "loops" estiguin separats per proteïnes no histones unides a la base de cada un d'ells i podrien correspondre a unitats funcionals diferents.

L'estructura interfàsica de la cromatina nuclear formada per l'organització dels nucleosomes es pot considerar com una disposició relativament relaxada que permet la regulació de l'activitat del genoma. Ara bé, hi ha tres casos principals en els quals el material nuclear sofreix un procés de compactació generalitzada: la formació dels cromosomes metafàsics, la condensació del nucli de l'eritròcit i la condensació del nucli de l'espermatozoide. En aquest treball només ens referirem a aquest últim.

## 1.2. La cromatina dels espermatozoides

En el decurs del procés de l'espermatogènesi, la composició en histones de la cromatina de la cèl·lula germinal o espermatogònia (i amb la composició també l'estructura nucleosòmica) és sovint alterada pel desplaçament total o parcial de les histones somàtiques per alguns dels següents tipus de proteïnes: a) histones específiques de l'espermatozoide; b) proteïnes bàsiques especials no protamines; c) protamines (v. per exemple les revisions de Bloch, 1969;

Subirana, 1983; Poccia, 1986; Kasinsky, 1989; Oliva i Dixon, 1991). Creiem convenient ja en aquest punt mencionar que hi ha encara un alt grau de confusió pel que fa a la terminologia d'aquestes proteïnes. Bloch (1969) va escollir el terme "histones espermàtiques" per classificar tot aquest conjunt de molècules; altres propostes inclouen el terme "speins" (de "sperm proteïns") (Subirana et al., 1973). Nosaltres en aquest treball ens referirem en general al conjunt de proteïnes bàsiques presents al nucli de l'espermatozoide com a "proteïnes espermàtiques bàsiques" (PEB). D'altra banda, la descripció del que s'entén generalment per "protamina" o per "protamina verdadera" o "protamina típica" s'especifica a l'apartat 2.2.1. d'aquest capítol.

Com mostren els treballs de revisió recentment esmentats, les PEB mostren una variabilitat incomparablement més acusada que la limitada variabilitat de les histones. Així, tot i els treballs efectuats al respecte, s'ha de dir que precisament aquesta extraordinària variabilitat i la limitada informació de què es disposa sobre la composició, estructura i presència d'aquestes proteïnes específiques, no ha permès que fins el moment s'hagi clarificat la filogènia de tals PEB.

Possiblement, la classificació (o el concepte) més utilitzat implícitament en els diversos treballs sobre el tema és la recollida en Poccia (1986) i inspirada parcialment en els primers treballs citoquímics de Bloch (1969, 1976). En aquesta revisió es discuteixen quatre diferents tipus de proteïnes, o més aviat quatre diferents tipus de composició proteínica dels nuclis d'espermatozoides: 1) Nuclis sense proteïnes bàsiques, presents en els espermatozoides de crustacis (Bloch, 1976; Vaughn i Hinsch, 1972); 2) Protamines, presents en teleostis, centpeus, aranyes, cargols de terra, llargandaixos, serps, marsupials, etc. (Bloch, 1976; Poccia, 1986); 3) Protamines de mamífers (amb cisteïna), també descrites com a presents en alguns insectes, mol·luscs i elasmobranquis; 4) Histones somàtiques i proteïnes de tipus intermig descrites en una gran quantitat d'animals.

Altres intents d'ordenació de les PEB inclouen la classificació proposada per Subirana l'any 1983. Aquesta classificació es basa en criteris bioquímics i estableix dos grans categories: protamines i histones. Molt esquematment, al primer grup pertanyrien aquelles proteïnes amb un contingut de

Lys+Arg entre 45 i 80% i Ser+Thr entre 10 i 25%. En aquest grup s'inclourien, per tant, tant les protamines típiques, com les intermèdies (amb contingut important d'Arg i Lys), com les protamines queratinoses (amb Cys). Subirana considera que el contingut proteïc del nucli d'un espermatozoide pot ser classificat dins del grup de les histones quan la digestió de la seva cromatina amb nucleasa revela l'existència de nucleosomes. Dins d'aquesta categoria reconeix una sèrie de casos: a) absència de canvis en les proteïnes de la família de la histona H1 o bé canvis molt lleugers; b) presència addicional de proteïnes bàsiques específiques del nucli de l'espermatozoide; c) canvis considerables en les histones H1 i H2B.

### 1.2.1. Nuclihistona i nucliprotamina

Independentment del significat d'aquestes classificacions, la substitució de les histones somàtiques per aquests altres tipus de proteïnes, provoca des de petites modificacions a grans canvis en l'estructura de la cromatina. Conseqüentment la diversitat en les proteïnes espermàtiques està correlacionada amb la diversitat de l'estructura de la cromatina espermàtica.

A nivell de l'organització nucleosòmica de la cromatina espermàtica, diversos estudis evidencien que aquestes unitats estructurals estan presents en els espermatozoides que contenen el complement complet d'histones (Poccia, 1986; Subirana, 1983). Així, les digestions enzimàtiques amb nucleasa micrococcal han revelat mides nucleosòmiques típiques per a cada una de les cromatines espermàtiques d'erions de mar (Spadafora et al., 1976; Keichline i Wasserman, 1979; Arceci i Gross, 1980), estrelles de mar (Zalenskaya et al., 1981), bivalves (Zalensky i Avramova, 1984; Ausió i van Holde, 1987), holotúria (Cornudella i Rocha, 1979) i peixos (Muñoz-Guerra et al., 1982; Kennedy i Davies, 1982; Kadura et al., 1983). En canvi, no s'han detectat nucleosomes en la cromatina espermàtica d'aquelles espècies que contenen protamines, com poden ser la truita (Honda et al., 1974), el conill i gall (Young i Sweeney, 1979) i el moltó (Loir et al., 1985). El cas de l'anur *Xenopus laevis* és

especialment interessant ja que l'espermatozoide conté en el seu nucli histones H3 i H4 (però no les histones H2A i H2B de l'octàmer) i "protamines" (Risley i Eckhardt, 1981). En aquests nuclis, el tractament per diverses nucleases no rendeix experimentalment evidències de nucleosomes (Young i Sweeney, 1979). En canvi, en nuclis on s'ha trobat que a més de proteïnes amb característiques assimilables a la protamina es troba el complement complet d'histones, s'observa una estructura dual de la cromatina, amb regions organitzades en nucleosomes disperses entre complexos protamina-DNA.

Els estudis per microscopia electrònica de la cromatina espermàtica explotada (o inflada) experimentalment també han contribuït al coneixement de la subestructura de la cromatina. En gall, ratolí i moltó (Kierszenbaum i Tres, 1978; McMaster-Kaye i Kaye, 1980; Risley et al., 1986; Loir et al., 1985), s'ha mostrat que l'estructura nucleosòmica es perd a mesura que avança la diferenciació espermiogènica. Aquests estudis han mostrat la transformació de les fibres típiques en "collaret de perles" de la cromatina somàtica en fibres llises de cromatina en els últims estadis espermiogènics. També les anàlisis de la topologia del DNA en *Rana catesbiana*, *Xenopus laevis* i *Bufo fowleri* suggereixen que els nucleosomes es perden quan les histones són reemplaçades: Risley et al. (1986) observen que en nuclis on s'han eliminat les histones i protamines (nucleoids), el DNA presenta superhelicitat negativa en espècies posseïdores del complement total d'histones al nucli (per exemple *Rana*) però no en els nucleoids de l'esperma de *Xenopus* i *Bufo*, on les histones són reemplaçades per "protamines". El reemplaçament de les histones en aquestes espècies, per tant, es veu acompanyat per un desplegament del DNA nucleosomal i per una eliminació activa de la superhelicitat negativa. Concretament en *Xenopus*, la transició del DNA amb superhelicitat negativa a l'estat relaxat es produeix durant els estadis finals de l'espermiogènesi.

Altres estudis estructurals efectuats pel mètode de difracció de raigs X han permès deduir que en les espècies on les histones somàtiques són reemplaçades per "protamines" els nucleosomes no es troben al nucli espermiogènic.

---

Una última prova que recolza l'absència de nucleosomes en els nuclis espermàtics que contenen protamines es basa en consideracions estèriques (Balhorn, 1982) aplicades a l'espermatozoide dels mamífers. Les determinacions de la quantitat de DNA i protamina que es troba al nucli espermàtic del ratolí (Pogani et al., 1981) i el volum del nucli en el qual ha de ser empaquetat aquest material (Wyrobek et al., 1976) mostren clarament que el DNA d'aquests nuclis no pot ser empaquetat en nucleosomes. L'empaquetament de 3.3 pg de DNA en nucleosomes requeriria més del doble del volum del nucli espermàtic. En realitat, el volum d'aquest nucli pràcticament correspon ja al volum del DNA; conseqüentment, els 3 pg de protamina units al DNA de la cromatina espermàtica han d'ubicar-se en bona part als solcs del DNA de manera que ocupin molt poc volum addicional.

Arribats a aquest punt hem de dir que al referir-se a l'estructura de la cromatina espermàtica, els diferents autors acostumen a parlar de nuclihistona (considerant aquest terme com la cromatina d'aquells espermatozoides que conserven les histones somàtiques i/o variants d'aquestes) i nucliprotamina (en aquells en els quals les histones han estat reemplaçades per un o diversos tipus de molècules especials no histones anomenades sovint protamines). Com veurem, si bé la nuclihistona representa un "tipus" d'estructura del nucli de l'espermatozoide, la nucliprotamina més aviat representa un "calaix de sastre" on s'hi ubiquen totes aquelles estructures no prou conegudes que no són nuclihistona. Aquest fet és previsible si considerem els molts i molt diferents tipus de molècules de PEB que substitueixen les histones en els nuclis espermàtics de les diverses espècies animals.

En efecte, com s'ha dit fins ara, els espermatozoides que només contenen histones (o variants) en el nucli, posseeixen la major part del seu DNA organitzat en nucleosomes. Tot i així, la nuclihistona no és una estructura invariable ja que la mida del nucleosoma en els espermatozoides sembla tenir un valor particular de cada espècie i en general podria estar correlacionat amb la presència d'histones H1 específiques. Per exemple, els nuclis espermàtics del peix *Carassius auratus* (Muñoz-Guerra et al., 1982), que semblen només contenir histones típiques, posseeixen mides nucleo-



---

sòmiques (205 parells de bases) molt similars a les somàtiques; l'estrella de mar *Aphelasterias japonica* (Zalenskaya et al., 1981) i el cogombre de mar *Holothuria tubulosa* (Cornudella i Rocha, 1979), que contenen variants de la histona H1, presenten els nucleosomes amb repetitivitats de 224 i 227 parells de bases respectivament. També els eriçons de mar *Strongylocentrotus intermedius* (Arceci i Gross, 1980), *Arbacia lixula* (Spadafora et al., 1976) i *Strongylocentrotus purpuratus* (Keichline i Wasserman, 1979), que contenen variants de la histona H1 presenten un "repeat" que es diferencia del de la típica cromatina somàtica (231, 241 i 250 parells de bases, respectivament).

Pel que fa a l'estructura de la nuclioprotamina, hem de dir que en general és significativament diferent de l'estructura nucleosòmica, encara que possiblement les diferents nuclioprotamines no posseeixen gaire més característiques en comú que la d'empaquetar d'una manera més compacte el DNA nuclear. Aquesta major compactació pot ser assolida mitjançant la completa neutralització de les càrregues negatives del DNA per part de la protamina a través dels seus residus aminoacídics bàsics (predominantment arginines però també lisines i histidines en algunes ocasions). Els estudis per difracció de raigs X indiquen que en alguns casos (cefalòpodes) la nuclioprotamina pot ser una estructura quasi cristal·lina (Suau i Subirana, 1977; Subirana, 1983). Altres nuclis d'espermatozoides amb nuclioprotamina s'han revelat amb estructures menys regulars: per exemple *Mytilus* (Ausió i Subirana, 1982), aus (Chiva i Subirana, 1986) i mamífers (Balhorn, 1982). En molts altres casos no tenim cap mena d'informació respecte tal estructura anomenada genèricament nuclioprotamina.

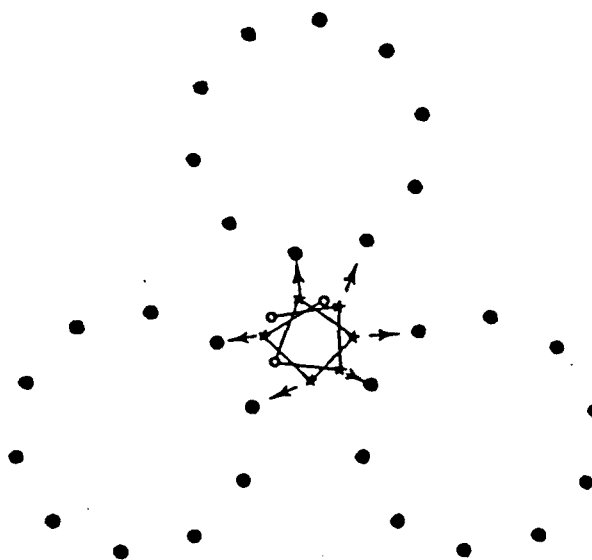
Així doncs, no es coneix en definitiva com s'efectua la interacció DNA-protamina, no obstant, s'han proposat diversos models per intentar explicar l'estructura de la nuclioprotamina. Basant-se en estudis sobre les protamines queratinoses P1 de mamífers, Balhorn i col·laboradors (Balhorn, 1982; Balhorn et al., 1991) han proposat un model que bàsicament proposa que el segment central de poliarginina de les protamines P1 s'uniria al solc estret del DNA neutralitzant les seves càrregues i permetent un empaquetament més estret. Els extrems amino i carboxi-terminals podrien trobar-se plegats cap a l'interior de la molècula quedant fixats per ponts disulfur; altres ponts

disulfur podrien formar-se amb molècules de proteïna veïnes facilitant l'empaquetament. Per la seva banda, Puigjaner et al. (1986), basant-se en l'estudi dels complexos de tipus semicristal·lí formats entre el DNA i la protamina de *Gibbula divaricata* (mol·lusc gastròpode), van proposar un model en què la protamina es situa al solc ample del DNA. Els residus neutres que sobresurten es situarien al solc estret de molècules de DNA adjacents aconseguint-se així un empaquetament quasi hexagonal dels complexos. Recentment, Subirana (1990) ha proposat un nou model basant-se en la comparació entre les protamines i l'extrem N-terminal de la histona H1. Segons aquest model, les molècules de protamina podrien situar-se paral·lelament a les de DNA de tal manera que una molècula de protamina s'uniria a tres molècules de DNA (figura I-3).

---

Figura I-3. Model de nucli-protamina proposat per Subirana (1990). Els punts negres representen els fosfats del DNA. Al centre es representa un fragment helicoidal d'una molècula de protamina, on els residus carregats són simbolitzats per estrelles i els no carregats per cercles buits. Els símbols estan situats en les posicions dels carbonis dels aminoàcids (primer àtom de les cadenes laterals). Les fletxes indiquen càrregues dels fosfats veïns que podrien ser neutralitzades pels residus d'arginina del segment helicoidal de la figura. (Segons Subirana, 1990).

---



Finalment, cal recordar que a més d'espermatozoides amb nuclihistona i espermatozoides amb nucliprotamina, existeixen també alguns espermatozoides on s'ha trobat una organització dual nuclihistona/nucliprotamina. Així, per exemple, les digestions amb nucleases dels nuclis espermàtics de *Spisula solidissima* (Ausió i van Holde, 1987) mostren que un 20-25% del DNA està organitzat en forma de nuclihistona mentre que la resta forma una estructura més compacta de nucliprotamina. En alguns mamífers (Tanphaichitr et al., 1978; Gusse et al., 1986) també queden restes d'histones al nucli de l'espermatozoide; s'observa aquest fenomen també, per exemple, en altres mol·luscs (Daban, 1991). Això pot significar que moltes espècies amb nucliprotamina poden posseir una certa proporció del seu DNA espermàtic unit a histones formant estructures nucleosòmiques. De fet, estudis efectuats en l'espècie humana revelen que els espermatozoides humans retenen una certa quantitat d'histones somàtiques (un 15% en pes referit al pes de les protamines) i que almenys parcialment es dona especificitat de seqüència en la repartició del DNA entre histones i protamines en un mateix nucli (Gatewood et al., 1987).

### 1.2.2. La fibra de 30 nm i altres estructures d'ordre superior en nuclis d'espermatozoides

De manera semblant al que passa amb les cèl·lules somàtiques, els espermatozoides que contenen histones en el seu nucli també formen fibres de 30 nm. Hem de dir, però, que els gruixos de les fibres de "30" nm en espermatozoides no són tan constants com els que presenten les cèl·lules somàtiques sinó que es podria establir un paral·lelisme entre la variabilitat de la repetitivitat nucleosòmica en nuclis espermàtics i la variabilitat de la fibra de 30 nm, enfront de la relativa constància en nuclis somàtics. Aquestes estructures s'han observat en diversos equinoderms (Zentgraf et al., 1980a, 1984; Aboukarsh i Kunkle, 1985; Avramova et al., 1984), mol·luscs (Subirana et al., 1981; Avramova et al., 1984) i peixos (Muñoz-Guerra et al., 1982), però la

seva mida, o sigui el diàmetre de la fibra, varia segons les espècies de 25 a 50 nm.

Un tipus d'organització similar a la fibra de 30 nm també s'ha trobat en nuclis d'espermatozoides que no posseeixen histones (Casas et al., 1993, en premsa). O sigui, en alguns casos la nuclioprotamina també forma fibres d'un diàmetre variable però sempre al voltant dels 30 nm. És evident que aquestes fibres no són conseqüència d'una disposició més o menys regular de nucleosomes ja que no existeixen histones en tals complexos. Subirana (1992) suggereix que la formació de les fibres d'aproximadament 30 nm és una conseqüència pràcticament obligada quan es consideren els paràmetres termodinàmics de les interaccions entre el DNA i el contraíó. L'efecte del contraíó no és el principal determinant de la forma (fibrilar) dels complexos sinó que en tot cas podria ser responsable de les petites variacions del diàmetre de les fibres.

Conseqüentment, respecte a les fibres de 30 nm als espermatozoides hem d'interpretar que els nuclis espermàtics amb protamina (o sigui la nuclioprotamina) pot presentar (o pot haver presentat en alguns estadis de l'espermioogènesi) una estructura en forma de fibres de "30" nm però que aquestes fibres no són homòlogues a les que presenten els espermatozoides amb nuclihistones o les que presenten les cèl·lules somàtiques.

L'organització a nivells superiors de la nuclioprotamina és bastant difícil d'estudiar aplicant mètodes bioquímics degut als artefactes originats pels mètodes de descondensació i dispersió de la cromatina quan aquesta està formada per protamina i DNA. Segurament, els estudis que preserven més les estructures serien els efectuats a través de la microscopia electrònica en seccions de les diverses cèl·lules espermioogèniques, ja que així es pot observar l'evolució de les estructures que utilitza la cromatina en condensar-se fins al grau final assolit a l'espermatozoide. Hi ha un nombre extraordinàriament elevat de treballs per microscopia electrònica d'aquests processos. Aquests estudis han revelat també una diversitat extraordinària en els patrons de condensació utilitzats per aconseguir la compactació final del nucli espermàtic. Els diferents tipus d'estructures superiors en espermatozoides s'han classificat genèricament per mètodes de microscopia electrònica en tres tipus de patrons: patró de condensació granular, patró de condensació

fibril·lar i patró de condensació lamel·lar (Kaye i McMaster Kaye, 1966; McIntosh i Porter, 1967; Walker, 1971; López, 1979; Amor, 1987). És clar que, una vegada més, la gran diversitat en els patrons de condensació ha d'estar correl·lacionada amb la diversitat de les PEB presents en el món animal.

En resum, en el nucli de l'espermatozoide es reconeixen dos grans divisions composicionals/estructurals:

1) **Nuclihistona:** Formada per l'associació d'histones i/o variants, amb el DNA. Formen nucleosomes de repetitivitat variable, fet segurament relacionat amb les variants de les histones H1 espermàtiques. Formen fibres d'uns 30 nm (encara que el diàmetre és bastant variable) que es disposen properes entre en el nucli de l'espermatozoide.

2) **Nucliprotamina:** Formada per l'associació de proteïnes bàsiques que no són histones i DNA. No formen nucleosomes sinó uns complexos amb el DNA que van associant-se en diverses estructures d'ordre superior. Aquestes estructures permeten empaquetar el DNA nuclear en un volum menor que les histones, per la qual cosa es poden considerar *a priori* com estructures (i proteïnes) més especialitzades en la seva funció que les anteriors.

## **2. Les proteïnes espermàtiques bàsiques en els deuteròstoms**

Nombrosos treballs i les revisions sobre el tema (v. per exemple Bloch, 1969; Subirana, 1983; Poccia, 1986; Kasinsky, 1989) mostren que les proteïnes de naturalesa bàsica del nucli espermàtic constitueixen un grup molt divers i heterogeni de molècules que compleixen una mateixa funció general (la de condensar el nucli de l'espermatozoide) a través de diferents formes d'interacció amb el DNA.

Entre els animals on ja s'ha establert la simetria bilateral es poden definir dues línies ben establertes, la dels organismes protòstoms (en els que el blastopor embriònic donarà lloc a la boca) i la dels deuteròstoms (en els que el blastopor esdevé l'anus). En aquest apartat farem un petit repàs d'alguns dels aspectes relacionats amb aquestes proteïnes en les espècies estudiades de deuteròstoms. De fet, dels principals grups d'animals que formen els deuteròstoms (equinoderms, hemicordats, tunicats, cefalocordats, agnats, peixos i tetràpodes) només es posseïa informació sobre els equinoderms, peixos i tetràpodes.

### **2.1. Equinoderms**

#### **2.1.1. Consideracions generals**

Els equinoderms posseeixen histones al nucli espermàtic. Dins d'aquestes histones, les histones H1 i H2B es mostren molt més variables que les altres i sovint es consideren específiques de l'espermatozoide ja que es diferencien clarament de les H1 i H2B somàtiques. Addicionalment, algunes espècies poden posseir, en quantitats minoritàries, altres proteïnes addicionals (v. apartat 2.1.2.). La cromatina de l'espermatozoide dels equinoderms

està organitzada en nucleosomes, encara que amb repetitivitats diferents a les somàtiques (v. apartat 1.2.1.).

L'H1 espermàtica posseeix les regions N i C-terminals expandides amb respecte a les H1s somàtiques (Hartman et al., 1977). L'H2B específica posseeix una regió central hidrofòbica apta per la interacció histona-histona i, a la regió N-terminal, conté en algunes espècies un pentapèptid repetit varies vegades. A aquesta proteïna se li ha atribuït una gran importància en el sentit que sovint se l'ha considerada com el precursor evolutiu de les protamines típiques dels peixos: von Holt et al. (1984) proposen que la protamina típica pot haver evolucionat a partir de l'H2B espermàtica dels equinoderms, i més concretament a partir del pentapèptid repetitiu. Degut a què aquestes molècules presenten un interès especial pel nostre treball, a l'apartat 2.1.3. s'especifica amb més detall les característiques d'aquestes histones específiques de l'espermatozoide.

### 2.1.2. Variabilitat dins dels equinoderms

S'han estudiat les proteïnes específiques bàsiques (PEB) de representants dels subtipus Echinozoa (holotúries i eriçons de mar) i Asterozoa (estrelles de mar). Del primer s'han estudiat representants de dues classes, Holothuroidea i Echinoidea, mentre que del segon només s'ha estudiat la classe Stellerioidea.

A *Holothuria tubulosa* (Holothuroidea) el nucli espermàtic conté les cinc histones somàtiques més la presència d'una histona H1 heterogènia específica de l'espermatozoide (Phelan et al., 1972) i la presència d'un component específic de major mobilitat anomenat  $\Phi_0$  (Subirana, 1970) que representa un 4% del pes total d'histones (Azorín et al., 1983). Altres gèneres del mateix grup (*Stichopus*) presenten un patró electroforètic del mateix estil (Zalenskaya et al., 1980).

La proteïna  $\Phi_0$  és una molècula de baix pes molecular amb un elevat contingut d'arginina (a més de Lys i Ala) a la que sovint s'ha referit com a "protamine-like" o com a "H1-related". En el cas d'*Holothuria tubulosa*, aquesta proteïna conté 77 residus aminoacídics disposats en la seqüència que s'indica a la figura I-4. La seqüència d'aquesta proteïna ha estat determinada tant a partir de la proteïna (Jordan, 1982) com del DNA complementari (Prats, 1989) (encara que es presenten petites discrepàncies en els resultats obtinguts pels dos mètodes) i mostra certes similituds amb l'extrem carboxi-terminal de les histones H1. Basant-se en reconstruccions tridimensionals a partir de micrografies electròniques, Subirana et al. (1985) han suggerit que la cromatina espermàtica de l'holotúria està organitzada en fibres de 30 nm formades per nucleosomes agrupats en discs i disposats en forma d'una zig-zaga plegada a modus d'acordió.

---

Figura I-4. Estructura primària de la proteïna  $\Phi_0$  del cogombre de mar *Holothuria tubulosa* (Holothuroidea, Echinodermata) on s'observa la tendència de les alanines a disposar-se en dímers (Prats, 1989).

---

1            5            10            15            20            25            30  
V A R R Q T K K A R K P A A R R R S A A K R A A P A A K K A A  
  
          35            40            45            50            55            60  
S R R R P K S A K K A K P A A R R R S S V K P K A A K A A A Q  
  
          65            70            75  
V R R R S R R I R R A S V S K

---

Cornudella i Rocha (1979) varen estudiar els canvis conformationals de la cromatina durant el desenvolupament de la línia germinal espermiogènica en *Holothuria tubulosa* a través de digestions amb nucleasa micrococcal. En aquest estudi varen mostrar que durant els primers estadis de

---



la maduració de la gònada, la degradació del DNA és molt major que en els estadis finals i que la producció de partícules nucleosòmiques també varia durant el desenvolupament (implicant al menys el 70% de la cromatina en l'estadi final de la maduració mentre que en cèl·lules immadures es manté molt més baix. Segons aquest estudi, la repetitivitat nucleosòmica, en canvi, no varia en la maduració d'aquesta cromatina, mantenint-se en uns 227 pb com a mitjana, però sí que disminueix l'accessibilitat de l'enzim sobre la cromatina en estadis avançats. Les conclusions estructurals d'aquest treball són que la major part del DNA espermàtic està organitzat en forma de nucleosomes i que aquests estan fortament empaquetats.

De la classe Echinoidea s'han estudiat diversos eriçons de mar (Strickland et al., 1978, 1982a, 1982b; Brandt et al., 1979; Giancotti et al., 1980; Zalenskaya i Zalensky, 1980; Imschenetzky et al., 1984; entre d'altres). Tots ells contenen histones de les quals les H1 i H2B són específiques de l'espermatozoide, però no presenten el component addicional  $\Phi_0$  de l'holotúria. Les seqüències de les histones H2B i H1 han estat completades en diferents espècies (Strickland, M. et al., 1988, 1978; Strickland, W.N. et al., 1977, 1980a, 1980b; De Petrocellis et al., 1980; von Holt et al., 1984) (v. també apartat 2.1.3.). Es tracta d'histones de major mida que les corresponents somàtiques (que estan completament absents a l'espermatozoide) i que estan associades a una cromatina que presenta nucleosomes però que mostra varies propietats físiques no comuns: és molt més compacta, molt més estable a la desnaturalització tèrmica o iònica, i més resistent a la digestió amb nucleasa micrococal que la cromatina somàtica; a més, té el major "linker" reportat fins al moment (uns 100 pb). S'ha proposat que les extensions N-terminal repetitives de les histones H1 i H2B espermàtiques podrien estar relacionades amb aquestes propietats.

D'entre les espècies pertanyents al subtipus Asterozoa, *Ophiothrix fragilis* conté histones (Subirana i Palau, 1968) com també en presenten les estrelles de mar *Marthasterias glacialis* (Strickland et al., 1980) i *Aphelasterias japonica* (Zalenskaya et al., 1980), entre d'altres. Aquests últims autors mostren també que existeixen petites variacions interespecífiques en les

---

histones H1, H2B i H2A així com diferències significatives entre l'H1 espermàtica i somàtica.

### 2.1.3. Estructura i interacció amb el DNA de les histones H1 i H2B espermàtiques dels equinoderms

Hem escollit amb aquest propòsit el cas de l'eriçó de mar *Parechinus angulosus* ja que ha estat el més ben estudiat (Strickland, M. et al., 1977, 1978; Brandt et al., 1979; Strickland, W.N. et al., 1977, 1980a, 1980b, von Holt et al., 1984).

#### a) La histona H2B espermàtica de *Parechinus angulosus*

L'H2B d'aquesta espècie es presenta en tres formes anomenades H2B(1), H2B(2) i H2B(3) caracteritzades per la repetició d'un grup pentapèptid a la part N-terminal de la molècula; totes elles han estat completament seqüenciades (Strickland, W.N. et al., 1977; Strickland, M. et al., 1977, 1978). Les seves seqüències, juntament amb la seqüència de l'H2B de timus de vedella (que per ser la primera que es va seqüenciar s'utilitza generalment com estàndard), apareixen a la figura I-5.

La histona H2B(1) (Strickland, M. et al., 1977) mostra una regió N-terminal altament bàsica, igual com passa a l'H2B de timus de vedella, però, i a diferència d'aquesta, l'eriçó conté una extensió addicional que inclou un pentapèptid repetit quatre vegades. En les tres primeres repeticions la seqüència d'aquest pentapèptid és Pro-Thr-Lys-Arg-Ser (posicions 6-10, 11-15 i 16-20) mentre que la quarta repetició (Pro-Ser-Gln-Lys-Ser) sembla una mutació d'aquesta estructura (posició 1-5). El pentapèptid repetitiu condueix cap a una regió rica en Lys i Gly on es repeteix el motiu Lys-Gly-Gly o variacions del mateix. Aquestes dues zones (la dels pentapèptids i la dels tripèptids) presenten molt poca homologia amb la histona H2B somàtica de timus de vedella (v. figura I-5). Dels 15 residus següents (posicions 39-53), el 73% són residus aminoacídics bàsics; la proteïna espermàtica conté més

arginines que la seva corresponent somàtica. La part restant de la molècula (a partir del residu 54 al residu carboxi-terminal) és molt semblant a la mateixa regió de l'H2B de vedella.

Figura I-5. Estructura primària de les tres formes de l'H2B espermàtica, H2B(1), H2B(2) i H2B(3), de l'eriqó de mar *Parechinus angulosus* (Echinoidea, Echinodermata) comparades amb l'H2B de vedella (\*) utilitzada com a estàndard somàtic. Les diferents seqüències han estat alineades per homologies. La numeració fa referència a la posició d'alineament i no necessàriament a les posicions a la seqüència. Les línies contínues indiquen delecions en l'alineament. (Adaptat de von Holt et al., 1979).

	5	10	15	20	
H2B (1)	Pro-Ser-Gln-Lys-Ser-Pro-Thr-Lys-Arg-Ser-Pro-Thr-Lys-Arg-Ser-Pro-Thr-Lys-Arg-Ser-				
H2B (2)	Pro-Arg-Ser-Pro-Ala-Lys-Thr-Ser-Pro-Arg-Lys-Gly-Ser-Pro-Arg-Lys-Gly-Ser- <del>-----</del>				
H2B (3)	Pro-Arg-Ser-Pro-Ala-Lys-Thr-Ser-Pro-Arg-Lys-Gly-Ser-Pro-Arg-Lys-Gly-Ser-Pro-Arg-Lys-Gly-Ser-				
H2B •	Pro-Glu- <del>-----</del> Pro-Ala-Lys-Ser-Ala-Pro-Ala- <del>-----</del> Pro-Lys-Lys-Gly-Ser- <del>-----</del>				
	25	30	35	40	
H2B (1)	<del>-----</del> Pro-Gln-Lys-Gly-Gly-Lys-Gly-Gly-Lys-Gly-Ala-Lys-Arg-				
H2B (2)	Pro-Ser-Arg-Lys-Ala-Ser-Pro-Lys-Arg-Gly-Gly-Lys- <del>-----</del> Gly-Ala-Lys-Arg-				
H2B (3)	Pro-Ser-Arg-Lys-Ala-Ser-Pro-Lys-Arg-Gly-Gly-Lys- <del>-----</del> Gly-Ala-Lys-Arg-				
H2B •	<del>-----</del>				
	45	50	55	60	65
H2B (1)	Gly-Gly-Lys-Ala-Gly-Lys-Arg-Arg-Arg-Gly-Val-Gln-Val-Lys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Glu-Ser-Tyr-				
H2B (2)	Ala-Gly-Lys-Gly-Gly-Arg-Arg-Arg-Arg- <del>-----</del> Val- <del>-----</del> Val-Lys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Glu-Ser-Tyr-				
H2B (3)	Ala-Gly-Lys-Gly-Gly-Arg-Arg-Arg-Arg- <del>-----</del> Val- <del>-----</del> Val-Lys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Glu-Ser-Tyr-				
H2B •	Lys-Lys-Ala-Val-Thr-Lys-Ala-Gln-Lys-Lys-Asp-Gly-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-Ser-Arg-Lys-Glu-Ser-Tyr-				
	70	75	80	85	
H2B (1)	Gly-Ile-Tyr-Ile-Tyr-Lys-Val-Leu-Lys-Gln-Val-His-Pro-Asp-Thr-Gly-Ile-Ser-Ser-Arg-Ala-Met-Ser-				
H2B (2)	Gly-Ile-Tyr-Ile-Tyr-Lys-Val-Leu-Lys-Gln-Val-His-Pro-Asp-Thr-Gly-Ile-Ser-Ser-Arg-Ala-Met-Ser-				
H2B (3)	Gly-Ile-Tyr-Ile-Tyr-Lys-Val-Leu-Lys-Gln-Val-His-Pro-Asp-Thr-Gly-Ile-Ser-Ser-Arg-Ala-Met-Ser-				
H2B •	Ser-Val-Tyr-Val-Tyr-Lys-Val-Leu-Lys-Gln-Val-His-Pro-Asp-Thr-Gly-Ile-Ser-Ser-Lys-Ala-Met-Gly-				
	90	95	100	105	110
H2B (1)	Val-Met-Asn-Ser-Phe-Val-Asn-Asp-Val-Phe-Glu-Arg-Ile-Ala-Ala-Glu-Ala-Gly-Arg-Leu-Thr-Thr-Tyr-				
H2B (2)	Val-Met-Asn-Ser-Phe-Val-Asn-Asp-Val-Phe-Glu-Arg-Ile-Ala-Gly-Glu-Ala-Ser-Arg-Leu-Thr-Ser-Ala-				
H2B (3)	Val-Met-Asn-Ser-Phe-Val-Asn-Asp-Val-Phe-Glu-Arg-Ile-Ala-Ser-Glu-Ala-Ser-Arg-Leu-Thr-Ser-Ala-				
H2B •	Ile-Met-Asn-Ser-Phe-Val-Asn-Asp-Ile-Phe-Glu-Arg-Ile-Ala-Gly-Glu-Ala-Ser-Arg-Leu-Ala-His-Tyr-				

(segueix)

(continuació I-5)

	115	120	125	130
H2B (1)	Asn-Arg-Arg-Ser-Thr-Val-Ser-Ser-Arg-Glu-Val-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-			
H2B (2)	Asn-Arg-Arg-Ser-Thr-Val-Ser-Ser-Arg-Glu-Ile-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-			
H2B (3)	Asn-Arg-Arg-Ser-Thr-Val-Ser-Ser-Arg-Glu-Ile-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-			
H2B •	Asn-Lys-Arg-Ser-Thr-Ile-Thr-Ser-Arg-Glu-Ile-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-			
	135	140	145	150
H2B (1)	Ala-Lys-His-Ala-Val-Ser-Glu-Gly-Thr-Lys-Ala-Val-Thr-Lys-Tyr-Thr-Thr-Ser-Arg			
H2B (2)	Ala-Lys-His-Ala-Val-Ser-Glu-Gly-Thr-Lys-Ala-Val-Thr-Lys-Tyr-Thr-Thr-Ser-Arg			
H2B (3)	Ala-Lys-His-Ala-Val-Ser-Glu-Gly-Thr-Lys-Ala-Val-Thr-Lys-Tyr-Thr-Thr-Ser-Arg			
H2B •	Ala-Lys-His-Ala-Val-Ser-Glu-Gly-Thr-Lys-Ala-Val-Thr-Lys-Tyr-Thr-Ser-Ser-Lys			

---

L'anàlisi de la seqüència de l'H2B(2) de *Parechinus angulosus* (Strickland, W.N. et al., 1977) quan es compara amb la de l'H2B(1) mostra certes diferències en l'extrem N-terminal, mentre que els 2/3 carboxi terminals de les dues molècules són pràcticament idèntics. Aquí exposarem breument els detalls més interessants: Les dues proteïnes tenen en comú una relació arginina/lisina elevada en contrast amb l'H2B somàtica de timus de vedella. Igual que l'H2B(1), també posseeix una regió N-terminal expandida que no està present a l'H2B de vedella i on es pot reconèixer la repetició de variants d'un pentapèptid del mateix estil. També conté la zona rica en Lys i Gly i la zona bàsica posterior.

L'estructura primària de l'H2B(3) (Strickland, M. et al., 1978) presenta les mateixes característiques generals que les anteriors: L'extrem N-terminal es mostra expandit i contenint un pentapèptid repetitiu (el motiu Pro-Arg-Lys-Gly-Ser es troba repetit 3 vegades; posicions 9-13, 14-18 i 19-23). La resta de la molècula és comparable amb les anteriors H2Bs de l'eriçó de mar.

Es pot definir una estructura general pels pentapèptids presents en les tres formes de la histona espermàtica H2B de *Parechinus angulosus*: una prolina N-terminal, un aminoàcid carboxi-terminal de tipus hidroxil i d'un a tres aminoàcids bàsics centrals. Aquesta estructura general es pot trobar,

encara que no generalment com a una unitat repetitiva, en un bon número d'altres proteïnes que es troben associades al DNA, tals com les HMG (revisat per von Holt et al., 1979, 1984). Com discuteixen aquests autors, l'estructura d'aquests pentapèptids, degut a la seva basicitat i al lloc de fosforilació potencial que suposa el residu carboxi-terminal, podria ser particularment adequada per funcionar com a centres d'associació reversible entre el DNA i les proteïnes nuclears. Un altre detall important discutit per aquests autors és que, en protamines, aquesta estructura es dóna repetidament en quatre molècules del grup de les clupeïnes (protamines de l'arengada) i dues del grup de les iridines (protamines de la truita irisada) (v. Ando, 1973), de manera que s'ha suggerit una relació evolutiva entre aquests dos tipus de proteïnes espermàtiques: la presència primerenca de les histones i la més recent aparició de les protamines en l'escenari evolutiu ha fet pensar que les histones espermàtiques dels eriçons de mar (particularment l'H2B) puguin ser un possible ancestre de les protamines (von Holt et al., 1979, 1984).

b) *La histona H1 espermàtica de Parechinus angulosus*

En primer lloc cal dir que la histona H1 és en general la més variable de totes les histones i que mostra no solament especificitat interespecífica sinó també molt freqüentment especificitat de teixit en una mateixa espècie.

L'estructura general de la histona H1 somàtica consta d'un extrem N-terminal variable de conformació estesa, una regió central amb estructura globular i una part C-terminal també de conformació estesa. L'extrem N-terminal consta, en general, d'uns 40 residus aminoacídics (encara que la mida és variable) d'entre els quals destaquen els aminoàcids Lys, Ala i Pro (Rall i Cole, 1971; Jones et al., 1974). A continuació trobem una regió hidrofòbica d'aproximadament 80 residus aminoacídics en totes les espècies estudiades (v. per exemple von Holt et al., 1979). El contingut en aminoàcids bàsics en aquesta regió és molt baix, amb poca Ala i sense Pro i, *in vivo* presenta una estructura globular (Hartman et al., 1977; Avilés, 1978). Aquesta zona globular es mostra molt més conservada que els extrems amino i carboxi-terminals, sent la majoria de les substitucions d'aminoàcids de tipus

---

conservatiu. Finalment, la regió C-terminal, amb més de 100 aminoàcids, torna a ser rica en Lys, Ala i Pro.

La proteïna H1 espermàtica de l'erició *Parechinus angulosus* (Strickland, W.N. et al., 1980a, 1980b) presenta els mateixos tres dominis ja descrits. El domini globular central és molt semblant al de les histones H1 somàtiques però l'extrem C-terminal, a diferència d'aquestes, es veu enriquit en l'aminoàcid arginina, característica que l'apropa més a la histona H5 de l'eritròcit de pollastre. En aquest extrem es poden distingir una sèrie de duplicacions variables del tipus associació de Ser-Pro flanquejades per residus bàsics. La zona o domini N-terminal d'aquesta molècula és major que en les histones somàtiques i es caracteritza per la presència del motiu repetitiu Ser-Pro-bàsic-bàsic (similar al motiu repetitiu descrit per la zona C-terminal). Aquest tetrapèptid segurament és una zona important en la interacció amb el DNA (Suzuki, 1989). Altres espècies d'ericons de mar també contenen histones H1 similars a la descrita (Strickland, W.N. et al., 1982a).

Posteriorment, aquestes reiteracions de tetrapèptids (H1 espermàtica) o de pentapèptids (H2B espermàtica) s'han reïnterpretat com a posseïdores d'una unitat funcional mínima consistent en un grup Ser-Pro adjacent a un dipèptid bàsic (el també anomenat "pèptid SPKK") (v. Poccia, 1991). Aquest autor apunta també que la conservació de les posicions d'aquests tetrapèptids en les seqüències de les histones espermàtiques H1 i H2B de diferents espècies d'erició de mar (v. figura I-6) remarca el paper crític que ha de jugar aquesta unitat. Així, les dues càrregues positives dels residus bàsics formarien fortes unions iòniques amb el DNA mentre que la fosforilació de l'única Ser (o Thr) proveïria amb dues càrregues negatives que neutralitzarien efectivament la càrrega en cada segment. D'altra banda, la Pro és un residu conegut com a disruptor d'estructures secundàries tals com hèlixs  $\alpha$  o làmines  $\beta$ ; l'estructura secundària que s'ha predit com associada a aquestes regions de tetrapèptids agrupats és predominantment de colzes  $\beta$  (" $\beta$  turns"), que podrien ser alterades potencialment per la fosforilació de la Ser (Poccia i Green, 1992).

Tenint en compte aquestes característiques, els darrers autors citats postulen que les seqüències Ser-Pro-bàsic-bàsic han de tenir un paper important en la interacció reversible entre les molècules que les contenen i el DNA. Aquesta suposició es veu també suportada per dues activitats enzimàtiques que semblen tenir aquests motius com a diana específica: Suzuki et al. (1990a) troben en extractes d'òocits d'eriçó de mar una activitat proteolítica específica pels motius Ser-Pro-Lys-Lys (l'anomenada "SPKK-proteasa"). Segons aquests autors, tal proteasa podria contribuir no només al desempaquetament de la cromatina espermàtica en la fertilització, sinó també a l'activació de la transcripció del genoma d'origen patern durant la fertilització. Els mateixos autors (Suzuki et al., 1990b) troben també una proteïna kinasa que fosforila les histones espermàtiques H1 i H2B d'eriçó de mar, precisament en repeticions dels tetrapèptids Ser(P)-Pro-bàsic-bàsic.

Cal tenir en compte que el nucli de l'espermatozoide ha de ser reactivat després de la fertilització; es dona, doncs, un empaquetament de la cromatina durant l'espermioogènesi i un desempaquetament de la mateixa després de la fertilització. L'alteració bioquímica més evident associada amb aquest procés implica la fosforilació reversible d'aquests tetrapèptids SPKK (Poccia i Green, 1992); segons expliquen aquests autors, les histones espermàtiques H1 i H2B de l'eriçó de mar funcionarien durant l'espermatoogènesi a través de les seves regions conservades, mentre que s'impedeix que les extensions addicionals formin interaccions fortes amb el DNA a través d'una extensiva fosforilació que neutralitza les càrregues positives. Al final de l'espermioogènesi, quan el nucli esfèric de les espermàtides tardanes es converteix en el nucli cònic present en la cèl·lula madura, aquestes histones són defosforilades, desmascarant-se la càrrega positiva de les repeticions SPKK i permetent una forta interacció amb el DNA. Després de la fertilització, les mateixes proteïnes són immediatament i específicament refosforilades, just abans de la descondensació de la compacta cromatina, o reactivació de la replicació i transcripció. Aquesta refosforilació disminuiria l'afinitat pel DNA d'aquestes molècules. Cal dir, però, que malgrat la fosforilació es requerida per la descondensació, no és un fet suficient ja que pot donar-se inclús quan la descondensació és bloquejada amb un inhibidor (Poccia et al., 1990).

La identificació d'altres proteïnes posseïdores de motius SPKK mostra com, virtualment, totes les proteïnes que contenen més d'un pèptid SPKK són proteïnes que s'uneixen amb àcids nuclèics; aquestes proteïnes inclouen les PEB del pollastre i el músclo ( $\phi_3$ ), varies proteïnes trobades en virions madurs i un cert número d'enzims i reguladors (per un llistat complet d'aquestes proteïnes veure Poccia i Green, 1992).

Figura I-6. Seqüència d'aminoàcids dels extrems N-terminals de les histones específiques de l'espermatozoide de varies espècies d'erioç de mar destacant (en negreta) els motius de tipus SPKK (Poccia, 1991).

HISTONE	SPECIES	N-TERMINAL SEQUENCE
Sp H1	( <i>S. purpuratus</i> )	(X <sub>1</sub> )AA <b>SPRR</b> <b>SPKK</b> <b>SPRK</b> <b>SPKK</b> <b>SPRK</b> RS
Sp H1	( <i>P. angulosus</i> )	(X <sub>1</sub> )AA <b>SPRK</b> <b>SPRK</b> <b>SPKK</b> <b>SPRK</b> ASA <b>SPRR</b> KA
Sp H1	( <i>E. crassa</i> )	(X <sub>1</sub> )AA <b>SPRK</b> <b>SPRK</b> <b>SPRK</b> <b>SPKK</b> K?? <b>SPRK</b> R?
Sp H1	( <i>S. granulatus</i> )	(X <sub>1</sub> )AA <b>SPRK</b> <b>SPKR</b> G <b>SPKK</b> SP??
Sp H1	( <i>S. nudus</i> )	(X <sub>1</sub> )AA <b>SPRR</b> <b>SPKK</b> <b>SPRR</b> <b>SPKK</b> KSS <b>SPRR</b> K
Sp H1	( <i>P. milianis</i> )	(X <sub>1</sub> )AA <b>SPRK</b> <b>SPRK</b> <b>SPKK</b> <b>SPRK</b> ASA <b>SPRK</b> K
Sp H1	( <i>E. esculentus</i> )	(X <sub>1</sub> )AA <b>SPRK</b> <b>SPRK</b> <b>SPKK</b> <b>SPRK</b> ASA <b>SPRR</b>
Sp H2B (1)	( <i>S. purpuratus</i> )	PSQRSPT <b>KRSP</b> T <b>KRSP</b> Q
Sp H2B (1)	( <i>P. milianis</i> )	PRSKSPT <b>KRSP</b> T <b>KRSP</b> Q
Sp H2B (1)	( <i>P. angulosus</i> )	PRSKSPT <b>KRSP</b> T <b>KRSP</b> T <b>KRSP</b> Q
Sp H2B (1)	( <i>E. esculentus</i> )	PSQKSPT <b>KRSP</b> T <b>KRSP</b> Q
Sp H2B (2)	( <i>S. purpuratus</i> )	PRSPSKT <b>SPRK</b> G <b>SPRR</b> G <b>SPSRK</b> A <b>SPKR</b> G
Sp H2B (2)	( <i>P. milianis</i> )	PKSPSKS <b>SPRK</b> G <b>SPRK</b> G <b>SPRK</b> G <b>SPRK</b> G <b>SPRK</b> G
Sp H2B (2)	( <i>L. pictus</i> )	PRSPSKS <b>SPRK</b> G <b>SPRK</b> G <b>SPRK</b> G <b>SPRK</b> G <b>SPRK</b> G
Sp H2B (2)	( <i>P. angulosus</i> )	PRSPAKT <b>SPRK</b> G <b>SPRK</b> G <b>SPSRK</b> A <b>SPKR</b> G
Sp H2B (2)	( <i>E. esculentus</i> )	PKSPSKS <b>SPRK</b> G <b>SPRK</b> A <b>SPKR</b> G
Sp H2B (2)	( <i>E. crassa</i> )	PKSPSKG <b>SPRK</b> G <b>SPRK</b> G <b>SPTRR</b> G
Sp H2B (3)	( <i>P. angulosus</i> )	PRSPAKT <b>SPRK</b> G <b>SPRK</b> G <b>SPRK</b> G <b>SPSRK</b> A <b>SPKR</b> G
Sp H2B (3)	( <i>E. esculentus</i> )	PRSPSKS <b>SPKK</b> G <b>SPRK</b> A <b>SPKR</b> GGK

X<sub>1</sub> = X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>SPOKR where X<sub>1</sub> = P or A; X<sub>2</sub> = G or A.

En resum, d'entre les diverses particularitats d'aquestes histones espermàtiques destaquen els pèptids repetitius situats als extrems bàsics. Aquests extrems afectaran la mida del nucleosoma i el seu empaquetament.



## 2.2. Peixos ossis

La primera descripció d'una protamina, així com el nom d'aquesta proteïna, daten de fa més d'un segle arran dels estudis de Miescher (1874) sobre una molècula bàsica nitrogenada que trobava complexada amb l'acídica "nucleïna" (més tard anomenada àcid desoxiribonucleic o DNA) de l'espermatozoide d'un peix, el salmó del Rhin (*Salmo salar*). Estudis posteriors van demostrar la naturalesa de tipus polipeptídic de les protamines (Kossel, 1928; Felix, 1960).

És precisament pel fet d'haver-se descrit per primer cop en un peix que sovint es fa referència a les protamines dels osteïctis com a "protamines típiques" o "protamines verdaderes". De fet, però, aquestes no són les úniques PEB que es poden trobar als nuclis dels espermatozoides dels peixos ossis sinó que les diferents espècies presenten una considerable diversitat en el tipus de PEB que posseeixen. Aquesta diversitat pot anar des de la no observació de canvis aparents respecte a les histones somàtiques, com és el cas de *Carassius auratus* (Muñoz-Guerra et al., 1982), fins a la presència de protamines "típiques" en gran número d'espècies, passant per casos tan especials com el del peix pla *Pseudopleuronectes americanus* (Kennedy i Davies, 1980) que presenta una sèrie de molècules que comparteixen algunes característiques pròpies de les protamines típiques però que, com veurem més endavant, són molt més grans (80.000-200.000 daltons enfront dels 5.000-10.000 d'aquelles) i presenten altres característiques diferencials (v. apartat 2.2.3.).

A continuació farem un repàs de la literatura existent sobre els diferents tipus de PEB que es poden trobar als osteïctis agrupant aquestes en tres grans categories: a) espècies posseïdores de protamines; b) espècies posseïdores d'histones al nucli del seu espermatozoide; i c) casos especials.

### 2.2.1. Espècies posseïdores de protamines.

#### Característiques generals d'aquestes protamines i els seus gens

Abans d'entrar a discutir casos concrets cal definir en primer lloc quines són les característiques de les protamines "verdaderes" o "típiques". Es tracta de molècules de mida petita (27-34 aminoàcids) i de gran basicitat, conferida principalment per l'aminoàcid Arg, que es troba present en gran quantitat en la molècula (50-80%). Els residus d'arginina solen trobar-se units en grups de 4 a 6 residus. La Ser és un altre aminoàcid important en la molècula (10-15%), conferint a aquesta la capacitat de ser fosforilada. Hi ha molt pocs, o cap, residus acídics i hidrofòbics. De fet, la diversitat en aminoàcids de les protamines és molt baixa (6-10 tipus diferents de residus), de manera que les agrupacions d'arginines estan separades per un reduït nombre de residus característics (Ser, Pro, Gly, Val, principalment).

Aquestes molècules substitueixen les histones somàtiques al nucli de l'espermatozoide, on esdevindran les proteïnes majoritàries. Les càrregues positives de les arginines afavoreixen la neutralització de les càrregues negatives dels fosfats del DNA. Els processos de fosforilació-defosforilació són realment importants en aquestes molècules ja que intervenen en la modulació de la seva capacitat d'unió al DNA, d'aquí la importància de l'aminoàcid Ser. Al tractar-se de petites molècules amb alta densitat de càrrega, les protamines "típiques" presenten una elevada mobilitat electroforètica en gels de poliacrilamida/acètic/urea.

A la figura I-7 es troben representades un bon nombre de les seqüències de protamines de peixos ossis disponibles. A partir de l'anàlisi i comparació d'aquestes i altres seqüències, Oliva i Dixon (1991) han trobat les següents característiques distintives d'aquestes molècules: L'aminoàcid N-terminal és una Pro (en la majoria dels casos) o una Ala, seguit per una agrupació de 4 arginines; totes tenen una Ser (aminoàcid fosforilable) en la posició 9 o 10 (tenint en compte les interrupcions introduïdes a les seqüències) sovint formant part d'un grup de 2 o 3 serines, i casi sempre s'ha conservat o bé una Val o una Ile en la posició 13 (generalment precedida per

una Pro i seguida per una agrupació de 5 arginines i una segona Pro). La part carboxi-terminal també està força conservada, sent PRVSR<sub>6</sub>GGR<sub>4</sub> la seva seqüència *consensus*. En general trobem, doncs, en les molècules de protamina, 4 agrupacions llargues d'arginines (4-6 residus) i 2 de curtes (1-3 residus) separades per un número limitat i característic d'aminoàcids tals com la Ser, Pro o Gly/Val (Oliva i Dixon, 1991).

Figura I-7. Alineament de les seqüències de diverses protamines de peixos ossis. A l'esquerra s'indica el nom de l'espècie i de la protamina. Els requadres indiquen les zones de residus bàsics. Les interrupcions dins de les seqüències s'han incorporat amb la finalitat de maximitzar la semblança entre les diferents protamines. (Adaptat d'Oliva i Dixon, 1991).

truita irisada (iridines)	1a	P R R R R	A S R R	V	R R R R R P	R	V S	R R R R R	G G R R R R	
	b	P R R R R	A S R R	I	R R R R R P	R	V S	R R R R R	G G R R R R	
	2a	P R R R R	S S S	H P V	R R R R R A	R	V S	R R R R R	G G R R R R	
	b	P R R R R	S S S	H P V	R R R R R P	R	V S	R R R R R	G G R R R R	
	c	P R R R R R	S S R R P V	R R R R R P	R	V S	R R R R R	G G R R R R		
	3a	P R R R R	S S S	R P I	R R R R R P	R	V S	R R R R R	G G R R R R	
		P R R R R	S S S	H P V	R R R R R P	R R	V S	R R R R R	G G R R R R	
		P R R R R R	S S S	H P V	R R R R	A R R	V S	R R R R R	G G R R R R	
		P R R R R R	S S S	R P I	R R R R	P R R	V S	R R R R R	G G R R R R	
		P R R R R	A S R R	V	R R R R R P	R	V S	R R R R R	G G R R R R	
		P R R R R	A S R	P V	R R R R	P R R	V S	R R R R R	G G R R R R	
		P R R R R	S S R R P V	R R R R R P	R	V S	R R R R R	G G R R R R		
		P R R R R	A S R R	I	R R R R R P	R	V S	R R R R	G G R R R R R	
salmó (salmina)		A R R R R	S S S	H P V	R R R R R P	R	V S	R R R R R A	G R R R R	
arengada (clupeïnes)	Y I	A R R R R	S S S	H P V	R R R R	P R R R T T	R R R R	A G	R R R R R	
	Y II	P R R R R	T Y R	A S	R P I	R R R R	P R R	V S	R R R R	A R R R R
	Z	A R R R R R S	R T A S A	P V	R R R R	P R R	V S	R R R R	A R R R R	
tonyina (tinines)		P R R R R E	A S	R	P V R R R R R V	R R	S T A A	R R R R R V V	R R R R	
		P R R R R Q	A S	R	P V R R R R R V	R R	S T A A	R R R R R V V	R R R R	
		P R R R R R	S S	R	P V R R R R R V	R R	S T A A	R R R R R V V	R R R R	
		P R R R R R	S S	R	P V R R R R R V	R R	S T A A	R R R R R V V	R R R R	
espèl ( <i>Esox lucius</i> )		P R R R R A	S S G	R P V R R R R R P	R M S		R R R R R G G	R R R R R		
esturió (esturina B) (osteïlina A)		A R R R R R	S S	R P G	R R R R R	R R	H	G R R R R	G R R	
		A R R R R R H	A S T	K L	K R R R R R	R R	H	C K H S H E		

No obstant, malgrat poder-se definir uns trets generals per aquestes molècules, a la mateixa figura (I-7) es pot apreciar que hi ha un cert grau de variabilitat entre les seqüències de les diferents protamines d'osteïctis, variabilitat molt més acusada que la que es pot trobar entre les histones,

proteïnes molt més conservades evolutivament. D'altra banda, és també característic de les "protamines verdaderes" el mostrar un considerable grau de microheterogeneïtat, és a dir variacions dins de les protamines d'una mateixa espècie o inclús individu. Així trobem per exemple que a *Esox lucius* hi ha la mateixa probabilitat de trobar tant una Ser com una Gly en la posició 28 de la seqüència i en la posició 9 es troba més freqüentment Gly que Ser (Speckert et al., 1983). Però potser el cas més evident d'entre els existents a la bibliografia és l'estudi de McKay et al. (1986a), on es van purificar i seqüenciar 6 protamines diferents a partir de la gònada d'un sol individu de l'espècie *Salmo gairdneri* (o *Oncorhynchus clarki*, veure més endavant) (figura I-7, 6 primeres seqüències). Aquestes protamines s'han agrupat en 3 famílies segons el grau de similitud o discrepàncies entre les diferents molècules. No obstant, totes elles són clarament homòlogues, diferenciant-se només per un o molt pocs residus aminoacídics. De fet, prèviament a aquest estudi, altres autors ja havien obtingut altres seqüències aminoacídiques de la protamina d'aquesta espècie per diferents sistemes. Algunes d'aquestes seqüències concorden amb alguna de les trobades per McKay et al. (1982), però altres no (v. seqüències 7-13 a la figura I-7). Oliva i Dixon (1991) proposen que una possible explicació per aquestes diferències, a part d'errors experimentals o causats per la major dificultat en les tècniques de seqüenciació en els primers estudis, podria ser la diferent procedència de les mostres de partida (Japó, Dinamarca, EEUU, Canadà) de manera que podria donar-se variabilitat en les seqüències procedents de diferents poblacions geogràfiques. Una altra explicació que proposen és que podrien donar-se variacions inclús dins dels diferents individus d'una mateixa població (ja que sovint es treballa amb mostres procedents de diferents individus). Finalment, en algun cas podria ser que s'hagués partit d'una espècie diferent.

Altres espècies estudiades pertanyents als salmoniformes també mostren protamines del tipus descrit. Així, *Esox lucius* (Speckert et al., 1983) si bé presenta canvis en alguns aminoàcids, aquests solen ser de tipus bastant conservatiu, de manera que no s'espera que afectin significativament l'estructura de la nuclioprotamina (v. figura I-7). Igualment, es poden trobar proteïnes amb seqüències similars entre les arengades (clupèids) i les tunyines (escòmbrids). A partir de *Clupea pallasii* s'han seqüenciat 3 protamines, les

---

anomenades clupeïnes YI, YII i Z, molt semblants entre sí (Ando et al., 1962; Ando i Suzuki, 1966, 1967), i a partir de la tunyina *Thunus thynnus* 4 protamines més (Y1, Y2, Z1 i Z2) (Bretzel, 1972, 1973). En aquest últim cas, les diferències més notables amb les altres protamines vistes són el canvi de la Pro-17 per una Tyr i la substitució del motiu consensus VS pel grup STAA. Les dues últimes seqüències de la figura I-7 corresponen a protamines d'esturions: estellina A (*Acipenser stellatus*; Yulikova et al., 1979), i esturina B (*Acipenser guldenstadti*; Yulikova et al., 1976). Les seqüències trobades a l'esturió presenten la regió amino-terminal força similar a les altres protamines vistes però, en canvi, la resta de la proteïna varia molt més respecte a aquestes (v. figura I-7).

Els aspectes bioquímics i funcionals en què intervenen les protamines dels peixos han estat estudiats en profunditat pel grup d'en Dixon (v. entre d'altres Threvithick et al., 1969; Louie i Dixon, 1972a, 1972b; Sanders i Dixon, 1972; Gedamu et al., 1977; Iatrou i Dixon, 1978; Iatrou et al., 1978; Sinclair i Dixon, 1982; Christensen et al., 1984). Aquests autors han mostrat (com s'observa a la figura I-8) que el RNA missatger de la protamina és transcrit en estadis relativament primerencs de l'espermatogènesi (o sigui abans de la diferenciació de les espermatòides), i emmagatzemat en el citoplasma en forma inactiva. Concretament, el RNA missatger es troba poliadenilat i associat amb proteïnes al citoplasma, formant partícules discretes de ribonucleoproteïna (RNP) (Gedamu et al., 1977). Al cap d'uns 15 dies d'emmagatzemament, en l'estadi d'espermatòides mitges, el RNAm pateix un procés de "activació" en el qual pot estar implicada la dissociació d'alguna de les molècules proteïques del complex ribonucleoprotèic; a més, durant la traducció sembla que es va escurçant el tracte poliA (v. figura I-8). En definitiva, l'activació del missatger produeix la traducció de la protamina, la qual entra al nucli en forma fosforilada i desplaça les histones somàtiques, algunes de les quals es troben en un estat d'elevada acetilació (Christensen i Dixon, 1982; Christensen et al., 1984, Oliva i Mezquita, 1986; entre d'altres). El progressiu desplaçament de les histones, la interacció de la protamina fosforilada amb el DNA i la seva posterior desfosforilació van produir l'empaquetament de la cromatina i la condensació del nucli espermàtic.

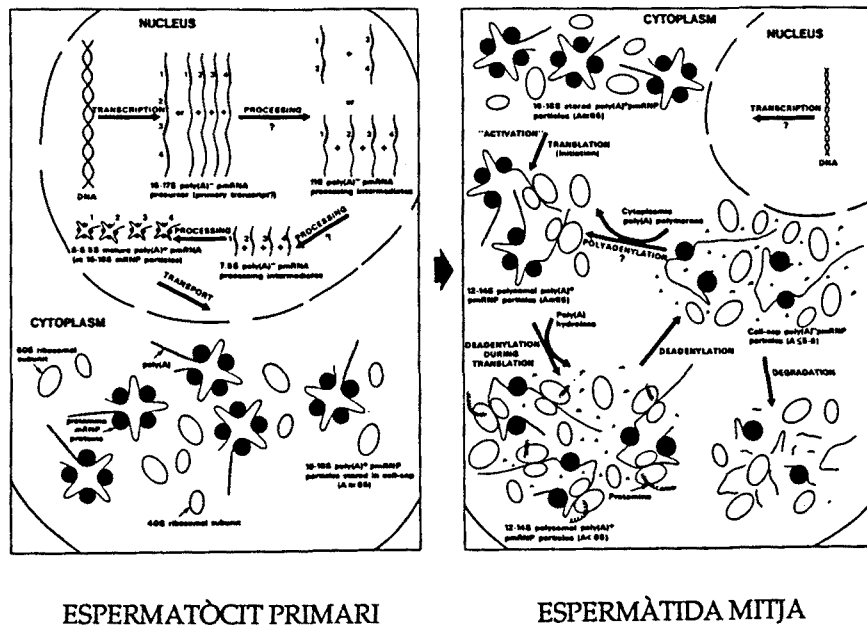


Figura I-8. Evolució de la molècula de RNA missatger de la protamina durant l'espermatogènesi dels peixos. La part de l'esquerra representa el tipus de cèl·lula on es detecta primerament la presència del RNAm de la protamina al citoplasma (espermatòcit primari), i la part dreta de la figura representa el tipus cel·lular on comença la traducció de la protamina (espermàtida mitja) (Segons Iatrou i Dixon, 1978).

A partir de l'aïllament del RNA missatger poliadenilat, purificació i preparació del cDNA, es van poder determinar les primeres seqüències pels gens de la protamina en *Salmo gairdneri* (States et al., 1982); les seqüències deduïdes eren idèntiques a les dels polipèptids de la família 2 (2a, 2b, 2c) (v. figura I-7). Altres seqüències obtingudes a partir del cDNA o DNA genòmic d'aquesta mateixa espècie (Iwai i Ando, 1967; Jenkins, 1979; Gedamu et al., 1981; Sakai et al., 1981; Aiken et al., 1983) es poden assimilar en general a algun dels membres de les 3 famílies descrites per McKay et al. (1986a). Cal dir, però, que mentre que a partir d'estudis d'aquest tipus ja s'havien suggerit les famílies 1 i 2, encara no s'ha trobat cap cDNA o DNA genòmic corresponent a la tercera família de protamines. En resum, a partir dels treballs amb DNA també s'evidencia la microheterogeneïtat en les seqüències de les protamines.

D'altra banda, les similituds entre els cDNAs (i els polipèptids) de les famílies 1 i 2 suggereixen que cada una d'elles pot haver derivat d'un precursor comú per duplicació del gen i subsegüent divergència (Oliva i Dixon, 1991).

Pel que fa al número de còpies dels gens de la protamina, aquest s'estima en un mínim de 15-20 còpies en salmònids (Dixon et al., 1985). Aquests gens no posseeixen introns, no estan agrupats (com es dona en els gens de les histones) (Connor et al., 1984), i tots posseeixen en forma altament conservada la caixa TATA i senyals de poliadenilació. Com és revisat per Oliva i Dixon (1991), hi ha també altres característiques conservades compartides amb les protamines d'altres grups zoològics (aus i mamífers); així, hi ha sempre entre 28 i 32 nucleòtids entre la caixa TATA i el punt de la iniciació de la transcripció, i sempre es troba la seqüència palindròmica TGACGTCA o CRE ("cAMP regulatory element") entre les posicions -48 a -57.

Ara bé, si bé els gens presenten una estructura en comú, hem de dir que contràriament a la considerable conservació de les seqüències de les protamines (v. figura I-7), les seqüències de les zones codificants dels gens no es conserven de la mateixa manera (v. els treballs de Daisley i Davies, 1982; Dixon et al., 1985; i, especialment, Moir, 1985). Les proves d'hibridació utilitzant com a sonda el gen de la protamina de truita irisada indiquen que les seqüències codificadores divergeixen dràsticament ja entre espècies posseïdores de protamines de seqüència aminoacídica molt similar, com és el cas de les clupeïnes (v. figura I-7), i inclús dins d'espècies molt properes taxonòmicament (altres salmònids) (Moir, 1985). Una observació interessant fruit del treball d'aquests autors amb els gens de les protamines (Moir, 1985; Moir i Dixon, 1988) és que el gen de *Salmo gairdneri* està més estretament relacionat amb els gens del salmó del Pacífic, *Oncorhynchus keta* i *O. kisutch*, que amb el salmó de l'Atlàntic, *Salmo salar*. Com es revisa a Oliva i Dixon (1991), aquest resultat concorda amb els obtinguts a partir de DNA mitocondrial que conclouen que *S. gairdneri* i les espècies del gènere *Oncorhynchus* (*O. keta* i *O. kisutch*) van divergir més recentment entre sí que respecte altres espècies del gènere *Oncorhynchus* (Thomas et al., 1986). De fet, cal fer constar que l'espècie *Salmo gairdneri* ha estat recentment assignada al gènere *Oncorhynchus* com *O. mykiss* (Smith i Stearley, 1989).

---

Pel que hem vist, doncs, el sistema de les protamines es basa en una família multigènica amb seqüències que han variat molt més ràpidament que les proteïnes en sí. En salmònids s'ha trobat un mínim de 15-20 membres d'aquesta família encara que sembla que a cada espècie només s'expressa un subgrup d'aquests gens i que els subgrups particulars que s'expressen en cada espècie poden variar àmpliament. Tampoc se sap de moment si el subgrup que s'expressa és l'únic present al genoma o bé si hi ha altres gens presents però inactius (Oliva i Dixon, 1991).

### 2.2.2. Espècies posseïdores d'histones

Estudis simultanis en altres espècies d'osteïctis van posar en evidència que en molts espermatozoides de peixos no apareixen protamines sinó que es mantenen les histones (del mateix tipus que les somàtiques o bé amb algunes variacions).

El peix *Carassius auratus* (Cyprinidae, Cypriniformes) no presenta components proteïcs bàsics específics de l'espermatozoide (Muñoz-Guerra et al., 1982), és a dir, al seu nucli espermàtic només es detecten histones de tipus somàtic, sense que presentin cap diferència significativa amb les histones somàtiques estàndard obtingudes del timus de vedella (ni en la mobilitat electroforètica ni en la composició en aminoàcids); segons els autors, inclús les subfraccions de l'H1 (la histona més variable) són similars a les del timus de vedella. En el mateix treball van estudiar també l'estructura de la cromatina de l'espermatozoide d'aquesta espècie demostrant que està organitzada en nucleosomes amb una repetitivitat de 205 parells de bases (propera a la de la cromatina somàtica). La cromatina de l'espermatozoide de *Carassius auratus* no es troba plenament condensada (com s'observa en altres espècies posseïdores de protamines) sinó que el nucli apareix com a feixos de fibres d'uns 25 nm de diàmetre.

Una altra espècie que no mostra aparentment la presència de cap proteïna específica de l'espermatozoide és la carpa *Cyprinus carpio*



(Cyprinidae, Cypriniformes) (Subirana et al., 1975). En canvi, un altre ciprínid, *Ctenopharyngodon idella*, acumula una histona H1 específica (TH1) alhora que manté un complement d'histones de tipus somàtic (Khrapunov i Berdyshev, 1981; Kadura et al., 1983a). La cromatina de l'espermatozoide de *Ctenopharyngodon idella* també es troba organitzada en nucleosomes però s'observa que la seva resistència a la digestió amb nucleasa micrococal augmenta al llarg de l'espermioogènesi (Kadura et al., 1983b), fet possiblement relacionat amb la histona H1 específica TH1. Estudis més antics amb altres ciprínids també indicaven la presència d'histones i absència de protamines al nucli de l'espermatozoide (Kossel i Schenk, 1928; Kossel i Staudt, 1926; Vendrely i Vendrely, 1966).

L'estudi de les PEB d'un altre teleosti, l'*Opsanus tau* (Batrachoidiformes), també mostra la no existència de protamines al nucli de l'espermatozoide (Subirana et al., 1975; Casas et al., 1981). Aquests autors no troben cap histona característica de l'espermatozoide d'aquesta espècie excepte la histona H1, que mostra una major mobilitat electroforètica que la de timus de vedella (Casas et al., 1981). No obstant, la millor manera per poder afirmar que es tracta d'una H1 específica de l'espermatozoide d'aquesta espècie seria poder-la comparar amb un teixit somàtic de la pròpia espècie. Pel que fa a la cromatina, a l'espermàtida jove se'n troben dos tipus, una més densa amb fibres d'uns 200 Å de diàmetre a la perifèria del nucli, i una més difosa amb fibres d'uns 100 Å a la regió central. En els estadis següents la cromatina difosa desapareix trobant-se tot el nucli organitzat en fibres de 200 Å. Cap a la maduració de l'espermatozoide aquestes fibres es fan menys evidents, apareixent com grànuls i filaments de mides variables (50-100 Å). L'espermatozoide madur no mostra el mateix grau de compactació assolit per les espècies amb protamines. Com destaquen els mateixos autors, és interessant el fet que les fibres de 200 Å de diàmetre trobades a les espermàtides d'*O. tau* són similars a les que es troben tant a les cèl·lules somàtiques com als primers estadis de l'espermioogènesi de moltes espècies, incloses les que posseeixen protamina. Potser l'H1 específica que posseeixen intervé en aquesta diferència a les fases finals de la condensació de la cromatina de l'espermatozoide respecte a la somàtica. L'espècie *Opsanus beta* també presenta histones al nucli espermàtic (Bloch, 1969, 1976).

En resum, el fet que molts espermatozoides continguin histones i no protamines és molt interessant pel fet que implica no només diferències en les proteïnes nuclears sinó també diferències en el tipus de condensació de la cromatina i en el control dels processos cel·lulars que regulen l'expressió i funció d'aquestes molècules. D'altra banda, es pot assumir que, en general, l'estructura de la nuclihistona a l'espermatozoide dels osteïctis no mostra trets que la diferenciïn de forma important de la nuclihistona de les cèl·lules somàtiques (o de la dels equinoderms, etc.), explicades amb anterioritat.

Les espècies vistes fins ara són algunes de les més estudiades, però de cap manera les úniques. Per un llistat més extensiu de les espècies d'osteïctis estudiades es pot consultar la taula que apareix a l'annex 2 al final d'aquest treball (o bé el resum de la mateixa que apareix a la taula IV-1). D'altra banda, no sempre es pot classificar les PEB d'una espècie dins de la dicotomia histones/protamines. Aquests casos els hem agrupat en el següent apartat.

### 2.2.3. Casos especials

L'any 1980 Kennedy i Davies van descobrir que, a més d'histones, l'espermatozoide del peix pla *Pseudopleuronectes americanus* posseïa un conjunt de proteïnes d'alt pes molecular de característiques composicionals intermitges entre les histones i les protamines. Concretament, es tracta d'una sèrie d'almenys 16 proteïnes d'un pes molecular entre 80.000 i 200.000 daltons, i que constitueixen el 25-30% del total de proteïnes bàsiques del nucli. Quant a la seva composició, quatre aminoàcids (Arg, Ser, Lys i Pro) constitueixen el 75% dels residus aminoacídics totals. De totes maneres, encara que posseeixen elevades quantitats d'aminoàcids bàsics (23.7% d'Arg, 14.0% de Lys) i de l'aminoàcid fosforilable Ser (22.8%), característiques que les atancen a les protamines típiques, no poden ser considerades com homòlogues d'aquestes. Els estudis de Young i Davies (1987) van mostrar que malgrat la gran mida i número de components, aquestes proteïnes poden ser reduïdes a un grup relativament simple de pèptids per una digestió límit amb Lys-C.

Nou d'aquests pèptids, que junts suposaven la meitat de la massa del digerit, van ser purificats i seqüenciats, i les seves seqüències van ser dividides en dos grups d'homologia: set dels pèptids contenien, totalment o parcialment, un dodecapèptid amb la seqüència *consensus* Ser-Pro-Met-Arg-Ser-Arg-Ser-Pro-Ser-Arg-Ser-Lys i que apareixia repetit en tàndem. Aquest dodecapèptid conté una seqüència de fosforilació *consensus* (Arg-Ser-Arg-Ser-Pro) reconeguda prèviament en un altre treball (Kennedy i Davies, 1985) i en la qual les dues serines són fosforilades durant les primeres fases de l'espermioogènesi. L'altra grup d'homologia conté la seqüència Arg-Arg-Val-X-X-Pro-Lys, on X-X pot ser Gln-Thr o bé Pro-Ser. Aquestes seqüències, dodecapèptids i heptapèptids, formen almenys el 35% i l'11%, respectivament, de les proteïnes d'alt pes molecular de l'espermatozoide del *P. americanus* i es presenten, per tant, repetides moltes vegades en aquestes proteïnes. Val la pena destacar en aquest punt el fet que la Ser apareix en forma alternant, sovint amb aminoàcids bàsics, en el dodecapèptid (fet que, com veurem, es troba també en altres PEB).

Pel que fa a l'estructura de la cromatina de l'espermatozoide en aquesta espècie, les digestions amb nucleasa micrococal mostren que els nucleosomes es retenen com a element estructural més important al llarg de tota l'espermioogènesi. Sembla que les evidències experimentals apunten cap a un model en què aquestes proteïnes d'elevat pes molecular interaccionin uniformement amb 3, 4 o més nucleosomes, mantenint-los junts dins del nucli de l'espermatozoide (Kennedy i Davies, 1982). Sembla també que els numerosos punts de possible fosforilació proporcionats per les abundants serines permeten compensar l'elevat número de càrregues positives proporcionades pels aminoàcids bàsics, permetent així la unió d'aquestes proteïnes de forma ordenada i correcta amb el DNA. La subsegüent eliminació dels fosfats reforçaria aquesta unió.

Un cas similar al del *Pseudopleuronectes americanus* és el d'un altre peix pla, l'*Hippoglossus hippoglossus*, on també apareixen una sèrie de proteïnes d'alt pes molecular d'alta basicitat. No obstant, en aquest cas les histones no són retingudes en quantitats equimolars a l'esperma madur sinó que les bandes corresponents a almenys dues de les histones del cor nucleosòmic no apareixen a les electroforesis (Moir, 1987).

#### 2.2.4. Problemàtica evolutiva

A la figura I-9 es mostra la distribució dels diferents tipus de PEB en els principals grups de teleostis a partir del quadre proposat per Kasinsky a la revisió que va efectuar l'any 1989. Malgrat aquest autor classifica les PEB segons els criteris citoquímics de Bloch (1969, 1976), en aquest esquema es pot evidenciar un fet que ha atret l'atenció de molts autors i que és que la distribució d'histones i protamines sembla ser de tipus "aleatori", és a dir, no sembla que la distribució de les diferents PEB en els peixos ossis segueixi una classificació filogenètica amb, per exemple, una línia on tots els membres posseïssin histones, una altra línia on només aparegués protamina, etc.

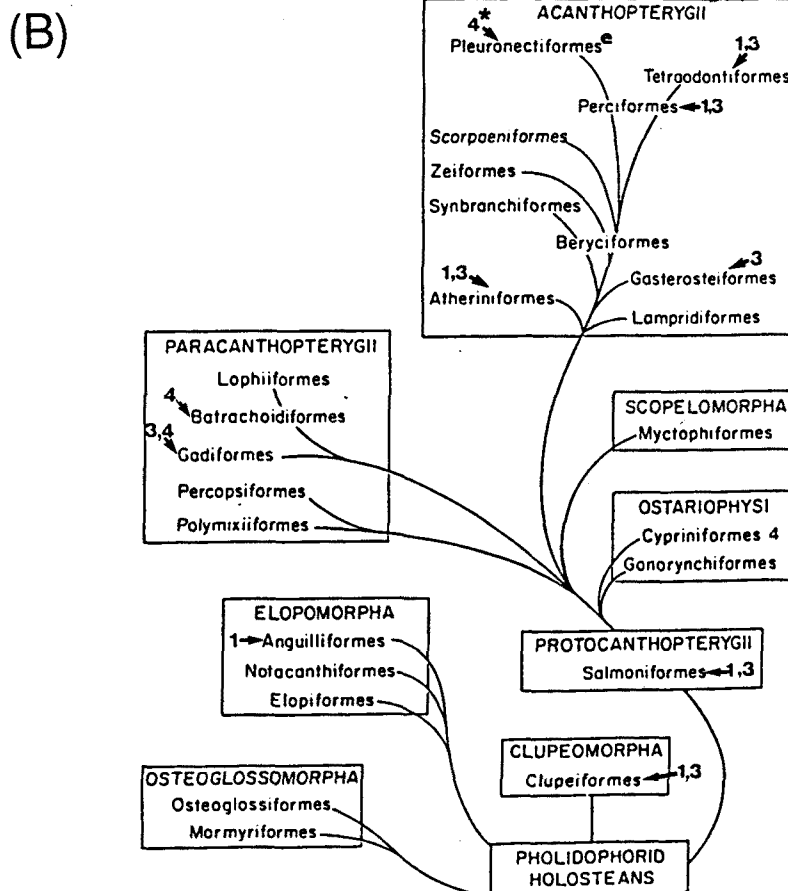
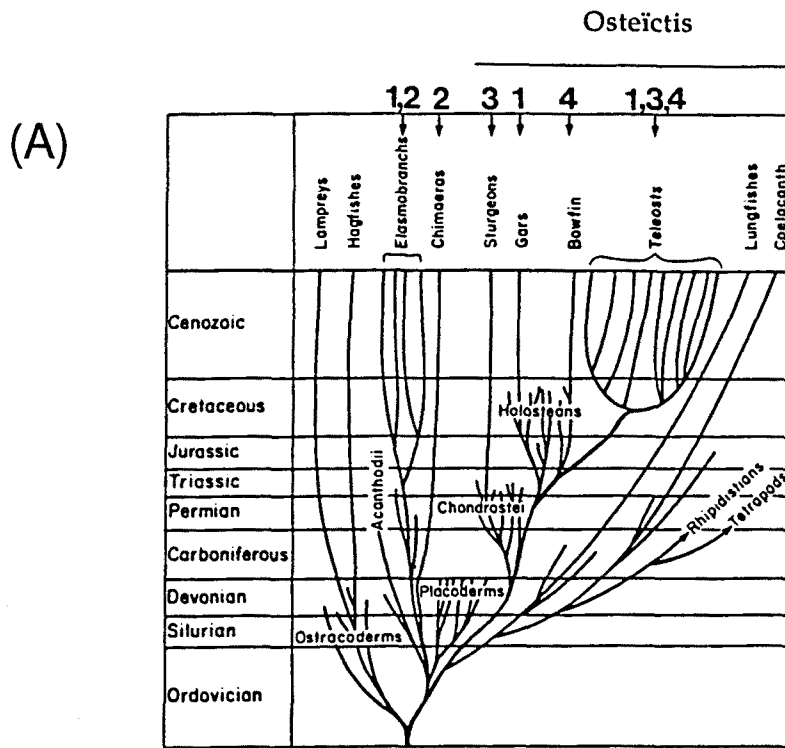
S'han fet vàries propostes per intentar trobar una explicació per aquesta distribució tant irregular, però de moment no ni ha cap que sigui acceptada unànimement.

Ja hem comentat anteriorment que les PEB exhibeixen en general una gran diversitat. La filosofia general d'aquest ràpid canvi evolutiu ha estat discutida des de diferents aproximacions. Per exemple, Bloch (1969, 1976) i Subirana (1975) l'enfoquen des del punt de vista molecular i suggereixen que la remarcable varietat en el tipus de PEB pot ser atribuïda al fet que la seva funció (empaquetament, protecció del DNA) és de naturalesa inespecífica.

Des d'una altra perspectiva, Nandi et al. (1979) han proposat que la presència de proteïnes del tipus histones o protamines al nucli de l'espermatozoide podria estar relacionada amb la salinitat del medi. Basant-se en l'estudi electroforètic de les PEB de 26 espècies pertanyents a 6 ordres diferents d'osteïctis, aquests autors proposen que la protamina apareix associada a les espècies marines o resistents a la salinitat, mentre que les espècies exclusivament d'aigua dolça presentarien histones. Aquests autors raonen que la major resistència de la nucliprotamina enfront de la salinitat podria ser avantatjós per aquells peixos que han de lliberar els seus espermatozoides al medi durant la fertilització externa. L'existència d'organismes marins amb fecundació externa però posseïdors d'histones als seus espermatozoides la justifiquen per medi de comportaments especials (com l'agrupació

i la fertilització sincronitzada que presenten els eriçons de mar). A partir de totes aquestes observacions Nandi et al. (1979) proposen un possible significat evolutiu de les protamines: aquests autors suggereixen que els peixos d'aigua dolça i posseïdors d'histones van ser els primers en aparèixer mentre que la protamina va evolucionar més tard com una necessitat per l'adaptació a l'hàbitat marí (no implicant una major resistència de l'individu enfront de la salinitat però sí una major eficiència de l'espermatozoide en aquest nou medi). A la discussió d'aquest treball veurem, però, com existeixen nombroses excepcions a aquesta hipòtesi.

D'altra banda, Kasinsky i col·laboradors han mostrat en una sèrie de treballs (Kasinsky et al., 1978, 1981, 1985, 1987; Kasinsky, 1985, 1986; Chiva et al., 1988) que la diversitat de les PEB no és igual en els diferents taxons sinó que sembla existir una correlació amb la biologia de la reproducció donant-se més variació en aquells taxons que presenten fertilització externa enfront dels que presenten fertilització interna, on es dona una constància en el model de PEB presentat. Així, fan constatar que mentre es dona diversitat en el tipus de PEB dels peixos ossis i anurs (v. apartat 2.3.), animals amb fertilització externa majoritàriament, en els vertebrats amb fecundació interna, tals com els peixos cartilaginosa, els uraodels, rèptils, ocells i mamífers euteris i metateris (v. apartats 2.3. i 2.4.), aquestes molècules es mostren similars en els diferents representants de cada taxó (Kasinsky et al., 1981, 1985). Kasinsky (1989) proposa que aquest fet podria estar relacionat amb la constància de l'ambient (tracte femení) que suposa la fecundació interna envers de la diversitat dels medis externs. Encara més, aquest autor proposa que els diferents tipus de fecundació estarien associats amb determinats tipus de PEB (Kasinsky, 1989). Així relaciona els organismes que presenten fecundació externa amb la presència d'histones o proteïnes intermèdies (amb alt percentatge d'arginina, més Lys i/o His), i la fecundació interna amb la presència de protamines "típiques" o queratinoses o bé proteïnes intermèdies. L'autor suggereix que aquestes observacions poden indicar que l'evolució de les proteïnes bàsiques del nucli de l'espermatozoide, lluny de ser a l'atzar, està relacionada amb el modus de fertilització, externa *versus* interna, aquesta última tendint a afavorir la unió de protamines amb el DNA (Kasinsky, 1989).



---

Figura I-9. (Pàgina anterior) Distribució dels diferents tipus de PEB als principals grups d'osteïctis i altres grups propers (A) i als principals grups de teleostis (B). El número designa el tipus de PEB segons els criteris citoquímics de Bloch (1969, 1976): 1, protamina ("típica"); 2, protamina queratinosa (amb Cys); 3, proteïnes intermèdies (contenint Arg però també Lys i/o His); 4, histones. Amb el símbol "4\*" es vol indicar la presència de PEB d'alt pes molecular juntament amb histones. L'esquema s'ha adaptat, amb petites modificacions, a partir del que apareix a Kasinsky (1989) i que està basat en el quadre filogenètic proposat per Moyle i Cech (1982).

---

Un altre plantejament que intenta explicar la dicotomia histona/protamina i la seva irregular distribució en els peixos ossis (i amfibis) és el proposat per Jankowski et al. (1986). En estudiar el gen de la protamina de *Salmo gairdneri*, aquests autors van trobar que aquest gen estava flanquejat per seqüències que mostraven fortes similituds organitzacionals i de seqüència amb els LTR ("long terminal repeats") de retrovirus d'aus (concretament del virus del sarcoma de les aus). Aquest fet, juntament amb la distribució "esporàdica" de la protamina al regne animal, o dit d'una altra manera, la no presència de protamina en l'espermatozoide de totes les espècies de peixos, van conduir a aquests autors a proposar un origen forani, extern, del gen de la protamina. De fet, Jankowski et al. (1986) proposen tres possibles explicacions per aquesta distribució irregular de la protamina: a) els gens de la protamina podrien haver-se perdut en alguns ordres de peixos; b) aquests gens podrien haver-se translocat a una nova posició al genoma de manera que els faltessin els senyals adequats per la seva expressió; o bé, c) l'absència dels gens de la protamina podria contemplar-se com la situació normal i el que certs ordres en posseeixin podria deure's a una transmissió horitzontal com a resultat de la seva incorporació, a partir d'altres espècies, a vectors retrovírics. Aquesta tercera explicació és la que defensen els mencionats autors degut a les similituds entre les seqüències abans mencionades.

Finalment, cal recordar que cap de les diferents hipòtesis presentades es pot considerar com a definitiva, podent-se inclús descartar alguna d'elles. D'altra banda, també cal tenir en compte que les diferents hipòtesis vistes enfoquen el mateix problema des de perspectives diferents i que, per tant, no

necessàriament s'exclouen entre sí. Al capítol corresponent a la discussió d'aquesta tesi es valoraran aquestes diferents hipòtesis alhora que es proposarà la nostra opinió sobre el tema.

Una altra qüestió relacionada amb aquesta problemàtica evolutiva és la recollida per Daisley (1980) sobre si es pot considerar un paral·lelisme entre histones / espècies més "primitives", i protamines / espècies més "evolucionades". Que no es pot establir aquest paral·lelisme en els peixos és la resposta que emergeix de la comparació entre dos "fòssils vivents", *Amia calva* i *Lepisosteus osseus*. Segons explica Daisley (1980), *A. calva*, que va divergir del tronc principal dels peixos fa 175 milions d'anys, reté histones a la cromatina dels seus espermatozoides, mentre que *L. osseus*, que va divergir fa 210 milions d'anys, conté protamina. En aquest treball, Daisley suggereix que la situació als peixos sembla indicar que no es tracta del resultat d'una expressió selectiva del gen de la protamina sinó que més aviat la retenció de les histones en l'espermatozoide de peixos suggereix la manca del gen de la protamina.

### 2.3. Peixos cartilaginosos

Gràcies als estudis citoquímics de Bols i Kasinsky es va evidenciar que es donava un canvi en el tipus de proteïna presentat al nucli del gàmeta masculí al llarg de l'espermioogènesi en els condirectis (Bols i Kasinsky, 1976; Bols et al., 1980). Aquests autors van demostrar que a les espermàtides tempranes de l'holocèfal *Hydrolagus colliei* es donava un canvi des d'histones del tipus somàtic a proteïnes de tipus protamines, i d'aquestes a protamines queratinoses (amb cisteïna) a l'espermatozoide madur (Bols i Kasinsky, 1974, 1976). Una transició del mateix estil s'observava també a la rajada *Raja rhina* i al tauró *Squalus acanthias* (Bols i Kasinsky, 1974; Bols et al., 1980). D'aquesta manera, sembla que les evidències citoquímiques apunten cap a una relativa constància en el model de PEB, protamines queratinoses, a



l'esperma de les dues línies de peixos cartilaginosa (holocèfals i elasmobranquis). D'altra banda, segons Stanley (1983) els espermatozoides d'*Hydrolagus*, *Squalus*, *Scyliorhinus* i *Raja* tenen tots en comú el presentar un nucli elongat, helicoidal i amb un petit acrosoma cònic situat sobre la punta del nucli.

No obstant, malgrat l'existència d'aquests estudis citoquímics, a nivell bioquímic només s'ha estudiat amb profunditat una sola espècie, el tauró *Scyliorhinus canicula*. Gusse i Chevallier (1978, 1980b, 1981) van estudiar electroforèticament els canvis protèics associats a la reorganització de l'estructura de la cromatina durant l'espermioogènesi d'aquesta espècie. Durant l'etapa d'espermàtides rodones només observaven la presència d'histones de tipus somàtic al nucli; en canvi, al principi de l'elongació nuclear començaven a detectar-se unes noves proteïnes bàsiques, la S1 i la S2, que migraven per sota de les histones i que coexistien durant un temps amb aquestes però que, a mida que progressava l'elongació augmentaven en proporció alhora que s'observava una disminució en la proporció d'histones. Cap al final de l'elongació nuclear comencen a aparèixer una nova sèrie de proteïnes de major mobilitat electroforètica, les anomenades Z1, Z2, Z3 i S4 (minoritària), que reemplacen gradualment les proteïnes intermediàries S1 i S2 i que empaqueten fortament el DNA en les espermàtides elongades. Les quatre noves proteïnes són totes riques en Arg, però la Z1, Z2 i S4 es diferencien de la Z3 en què contenen cisteïnes en la seva molècula. Ja durant l'etapa d'esprialització del nucli es dona una progressiva oxidació de les cisteïnes de la Z1, Z2 i S4, formant-se ponts disulfur de manera que als espermatozoides madurs l'única proteïna extraïble directament amb HCl 0.25 N és la Z3, mentre que per extreure la Z1, Z2 i S4 calen primer tractaments reductors per trencar els ponts disulfur formats. Així, durant l'espermioogènesi d'*S. canicula* (concretament durant l'elongació nuclear) es donen dues transicions de proteïnes nuclears bàsiques (Gusse i Chevallier, 1981). Estudis bioquímics en dos elasmobranquis més (*Squalus acanthias* i *Schroederichthys chilensis*) semblen indicar canvis similars en les PEB durant l'espermioogènesi (Olivares et al., 1990).

Tant les proteïnes intermediàries S1 i S2 com les PEB finals Z1, Z2, Z3 i S4 han estat analitzades composicionalment i seqüenciades. En funció de les característiques composicionals, aquestes últimes han estat considerades clàssicament com a protamines (v. taules III-401 i III-402). Com revelen els resultats de Chevaillier et al. (1987), la Z1 consisteix en una cadena de 50 residus aminoacídics més del 50% dels quals són de tipus bàsic (predominant l'Arg, 32%); aquesta molècula conté també un considerable contingut en Cys (9.1%). La seva seqüència (figura I-10) mostra un extrem N-terminal enriquit en aminoàcids hidrofòbics (tots els de la molècula excepte 3) i una duplicació interna de 8 aminoàcids –amb només una substitució conservativa– (subratllat a la figura); els aminoàcids bàsics solen trobar-se en agrupacions heterogènies de 2 a 6 residus. La Z1 és la protamina d'aquesta espècie amb major diversitat d'aminoàcids.

La Z2 (Martinage et al., 1985) és una molècula de 46 aminoàcids amb proporcions d'aminoàcids bàsics i cisteïnes similars a la Z1; la diversitat aminoacídica segueix sent elevada (14 diferents aminoàcids). A diferència de la Z1, però, la meitat N-terminal de la molècula és altament bàsica (15 dels 23 residus existents d'Arg i Lys es troben en aquesta meitat), mentre que els residus hidrofòbics es troben preferencialment a l'extrem C-terminal. Els 3 residus fosforilables es troben agrupats a la zona central de la molècula. Els aminoàcids bàsics es troben en agrupacions heterogènies en general majors que en la Z1 (v. figura I-10).

---

Figura I-10. Estructura primària de les protamines d'*Scyliorhinus canicula*: Z1 (Chevaillier et al., 1987), Z2 (Martinage et al., 1985), Z3 (Sautière et al., 1981) i S4 (Sautière et al., 1984). Les parts de la seqüència que apareixen subratllades indiquen duplicacions internes de la molècula.

---

Z1 G S C K P K K K Q A P C F L R R R H L R R L N V C K R D T S K T Y R R R R H V R R L P K K R R R R C

Z2 M K C G R K R R R R R R H A C K R K K R A C K Q R S S T I V R A H L V H R R R A A R R C P R

Z3 A R S R S R S Y G R G R R R G G R R R R R R R R R R R G G R

S4 G C K K R K A R K R P K C K K A R K R P K C K R R K V A K K K C

---

Pel que fa a la tercera protamina amb Cys d'*S. canicula*, la S4 es presenta com a minoritària respecte a les altres i amb característiques molt diferents (Sautière et al., 1984). Es tracta d'una molècula menor (32 aminoàcids) amb molt poca diversitat en residus aminoacídics (només 7 tipus diferents), el 65.6% dels quals són de tipus bàsic. A diferència de les anteriors, però, la Lys és l'aminoàcid bàsic majoritari (en la Z1 i la Z2 ho era l'Arg), no es presenta His, i la Cys es troba en major proporció (un 12% enfront de l'aproximadament 8-9% de la Z1 i Z2). Igual que passava en la Z1, es troba una duplicació interna en la seva molècula; en aquest cas es tracta d'un nonapèptid situat en tàndem (subratllat a la figura I-10). Una altra característica molt peculiar d'aquesta molècula és l'absència d'aminoàcids fosforilables.

Finalment, la protamina Z3 es diferencia de les 3 vistes fins ara en no presentar Cys. Igual que la S4, és una molècula petita (31 aminoàcids) i de baixa diversitat aminoacídica (només 5 tipus diferents de residus aminoacídics), no obstant presenta característiques molt diferents. Es tracta d'una proteïna molt bàsica (64.5%), propietat conferida exclusivament per residus d'Arg. La seva seqüència (Sautière et al., 1981) va revelar que aquestes arginines es troben alternant amb serines a l'extrem N-terminal de la proteïna, després apareixen puntejades per glicines i, finalment, a la part C-terminal apareix un gran grup d'11 arginines seguides. Els aminoàcids hidroxilats de la molècula es troben a l'extrem N-terminal (v. figura I-10).

La Z3 d'*Scyliorhinus*, degut a les seves característiques, s'ha relacionat amb les protamines dels peixos ossis. Com aquestes, es tracta d'una molècula petita, amb gran riquesa en Arg (que es presenta en forma d'agrupacions), baixa diversitat aminoacídica i exenta de Cys. Així, Chevaillier et al. (1987) proposen que probablement ambdós tipus de proteïnes es van originar a partir d'una mateixa seqüència ancestral de DNA abans de la divergència dels condriactis i osteïctis durant el Devònic. Aquest punt serà discutit més endavant en relació amb els resultats obtinguts en una espècie de l'altra línia dels condriactis, els holocèfals (v. discussió: IV-1.4. i IV-2.1.). Cal també fer esment d'una altra qüestió que és el perill que pot suposar el comparar molècules molt petites (v. Doolittle, 1986) i que pràcticament són poliarginines.

Pel que fa a les altres protamines d'*S. canicula*, Z1, Z2 i S4 presenten seqüències amb característiques ben diferents entre sí i respecte a les protamines dels peixos. Aquestes proteïnes no semblen provenir d'un únic pèptid ancestral ni de la mateixa família de gens (Chevaillier et al., 1987). Els mateixos autors proposen que, degut a les seves diferents característiques i dominis estructurals, les 4 protamines d'*S. canicula* podrien complir papers específics en l'empaquetament del DNA.

D'altra banda, les proteïnes de transició S1 i S2 s'han relacionat amb l'inici de la condensació de la cromatina de l'espermatozoide en aquesta espècie. Ambdues són riques en aminoàcids bàsics, sobretot la S1 (aproximadament un 50%, predominant clarament l'Arg, mentre que en la S2, amb basicitat al voltant del 35%, la Lys és una mica més abundant que l'Arg). Cap de les dues conté Cys (Chauvière et al., 1983). Aquestes proteïnes no es troben relacionades estructuralment amb les protamines de l'esperma i no poden ser considerades com els seus precursors (Chauvière et al., 1989).

## 2.4. Tetràpodes

La protamina típica dels peixos ossis representa una base important per a poder interpretar les proteïnes espermàtiques que presenten els tetràpodes. Cada un dels grups següents en l'ordre taxonòmic: amfibis, rèptils, aus i mamífers, semblen posseir protamines que poden provenir de la protamina típica dels peixos ossis o bé d'un ancestre comú.

### 2.4.1. Amfibis

Els treballs pioners sobre les PEB dels amfibis han estat efectuats bàsicament pel grup del doctor Kasinsky (Bols i Kasinsky, 1972, 1973; Kasinsky et al., 1978, 1985a; Mann et al., 1982; v. també la revisió de Kasinsky, 1989). En aquesta sèrie de treballs han mostrat que existeix una clara diferència en el grau de diversitat que presenten les PEB dels dos ordres constituents d'aquest grup, anurs i urodels. Mentre que en urodels apareix una protamina de característiques similars a les dels peixos, en el grup dels anurs es dona una notable diversificació en les proteïnes bàsiques presents al nucli de l'espermatozoide, de forma similar al que passa als osteïctis.

#### 2.4.1.1. Anurs

Malgrat s'han estudiat més casos, hem escollit tres gèneres com als més representatius de la variabilitat en les PEB dels anurs: *Rana*, *Xenopus* i *Bufo*.

a) Els estudis electroforètics i composicionals realitzats en diferents espècies de *Rana* (*R. ridibunda* i *R. catesbiana*, Kasinsky et al., 1985a; *R. pipiens*, Alder i Gororvsky, 1975) mostren la presència d'histones en el nucli de l'espermatozoide d'aquests organismes, amb l'única peculiaritat de posseir una H1 específica amb una relació Lys/Arg més elevada que la present en l'H1 del fetge (somàtica). Els estudis citoquímics amb les mateixes o altres

espècies de *Rana* confirmen que les histones són les PEB característiques d'aquest gènere (Bols i Kasinsky, 1972; Kasinsky et al., 1985a).

b) Contrastant amb el cas de *Rana*, en les diferents espècies de *Xenopus*, malgrat poder-se definir un patró general, es troba una variabilitat tal en les PEB que els seus patrons electroforètics poden ser inclús utilitzats com a marcadors d'espècies individuals (Mann et al., 1982). *X. tropicalis* i *X. epitropicalis* mostren la presència d'histones amb una proteïna específica addicional a la zona corresponent a l'H1 en els gels electroforètics (Mann et al., 1982); la resta d'espècies de *Xenopus* estudiades (*X. laevis*, *X. borealis*, *X. muelleri*, *X. ruwenzoriensis*, *X. vestitus*, *X. amieti*, *X. wittei*) presenten, a més d'histones, altres bandes de major mobilitat que aquestes però menor mobilitat que les protamines típiques (Mann et al., 1982). A aquestes proteïnes específiques de l'esperma se les ha anomenades SP (1-6) i citoquímicament se les ha classificat com a tipus 3 o intermèdies, o sigui riques en Lys (i/o His) a més d'Arg. El número i mobilitat d'aquestes bandes és característic de cada espècie de *Xenopus* i, en menor grau, de cada subespècie de *X. laevis*. Encara afegeix més variabilitat el cas de la SP2, que en realitat és un doblet de proteïnes de manera que dins d'una mateixa població hi ha individus que només presenten la proteïna SP2a, altres la SP2b i altres les dues alhora en proporcions 1:1. Aquest fet s'ha interpretat en termes de genètica clàssica (existència de 2 al·lels per aquesta proteïna de manera que poden trobar-se individus homozigots per una o altra forma i individus heterozigots) (Mann et al., 1982).

Estudis més recents mostren que les proporcions de les histones a l'espermatozoide no són iguals a les proporcions somàtiques. A *Xenopus laevis*, a més de les proteïnes SP es presenten les histones somàtiques H3 i H4 i una menor quantitat de les histones H2A i H2B, però no H1; de les proteïnes SP d'aquesta espècie, SP3-6 contenen un elevat percentatge d'Arg (33-41%) i una baixa relació Lys/Arg, sent les SP3-5 extraordinàriament similars entre sí (Yokota et al., 1991). A la taula I-1 es mostren les anàlisis composicionals de les proteïnes SP2-6 i les histones H3 i H4 de *X. laevis*, i a la figura I-11(B) la seqüència de la proteïna SP4 de la mateixa espècie. Un problema interessant és com funcionen les SPs i les histones H3/H4 en l'empaquetament dels

nuclis de l'espermatozoide madur quan els continguts en H2A i H2B estan reduïts.

Taula I-1. Composició aminoàcida de les proteïnes SP2-6 i de les histones H3 i H4 que es troben al nucli de l'espermatozoide de *Xenopus laevis* (segons Yokota et al., 1991).

Aminoàcid	SP2	SP3	SP4	SP5	SP6	H3	H4	SP4*
Lys	15.2	2.0	1.2	1.8	1.8	8.7	10.8	1.3
His	4.1	1.5	1.3	1.4	1.8	1.6	2.0	1.3
Arg	15.5	33.1	36.1	34.6	41.2	13.7	13.7	35.9
Asp	5.1	5.6	5.1	4.2	2.2	4.1	5.2	3.9
Thr	5.3	11.0	11.1	11.9	12.7	7.3	6.5	11.5
Ser	7.9	11.9	13.3	12.9	11.6	4.4	2.2	14.1
Glu	5.6	4.4	2.8	3.9	3.8	11.6	6.6	--
Gly	8.5	8.3	6.7	7.9	7.1	5.8	16.7	6.4
Ala	10.6	11.5	12.2	12.3	13.3	13.6	7.3	11.5
Cys	0.5	0.8	0.1	0.7	0.3	0.5	0.3	--
Val	5.2	1.8	1.3	1.7	1.7	4.6	8.1	1.3
Met	0.1	2.0	3.5	1.9	0.4	0.4	0.3	3.9
Ile	2.9	0.4	0.1	0.1	0.1	5.2	5.7	--
Leu	5.6	1.9	1.4	1.5	0.1	9.1	8.2	1.3
Phe	1.3	0.2	-	0.5	0.3	3.3	2.0	--
Tyr	1.8	2.5	2.6	1.9	0.1	1.5	3.2	2.6
Trp	--	--	--	--	--	--	--	--
Pro	4.8	1.1	1.2	0.8	1.5	4.6	1.2	1.3
Asn	--	--	--	--	--	--	--	1.3
Gln	--	--	--	--	--	--	--	2.6
Lys/Arg	0.98	0.06	0.03	0.05	0.04	0.64	0.79	0.04

\*Composició de la SP4 obtinguda pels mateixos autors a partir del cDNA.

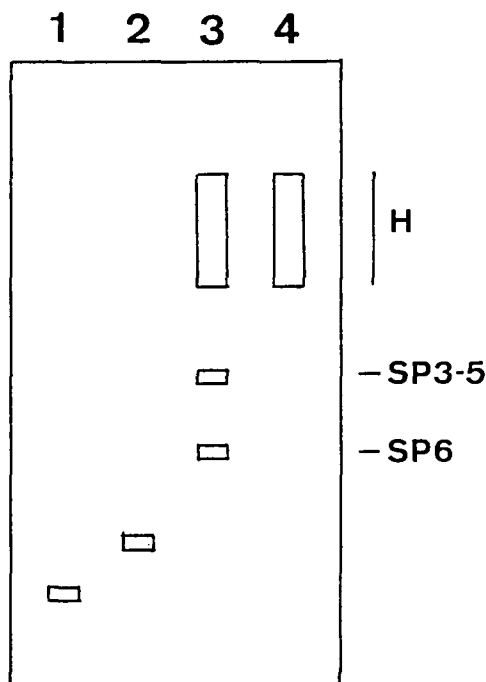
La gran variabilitat en les PEB del gènere *Xenopus* s'ha relacionat amb un esdeveniment de la seva evolució (v. Kasinsky, 1989). *Xenopus* és un gènere poliploide (Bisbee et al., 1977) que va aparèixer d'un ancestre comú a *X. tropicalis* i *X. laevis*. Aquesta duplicació del genoma va donar lloc a dues

línies diferents fa uns 30 milions d'anys: una amb un número de cromosomes diploid  $2n=20$  o  $40$  (*X. tropicalis* i *X. epitropicalis*), i una altra línia amb un número  $2n=36$ ,  $72$  o  $108$  (incloent *X. laevis*, *X. borealis*, *X. muelleri*, *X. vestitus* i *X. ruwenzoriensis*). Citoquímicament es veu que els dos representants de la línia  $2n=20$ ,  $40$  posseeixen histones, mentre que tots els representants del grup  $2n=36$ ,  $72$ ,  $108$  presenten a més les proteïnes intermèdies SP.

c) L'extracció àcida a partir de l'esperma madur de *Bufo* no rendeix histones sinó només unes proteïnes específiques de mobilitat electroforètica molt més elevada que aquelles i que per les seves característiques poden classificar-se com protamines. Aquestes proteïnes han estat estudiades en detall en *Bufo japonicus* (Takamune et al., 1991), on consisteixen en tres components, les protamines P1, P2 i una forma fosforilada de la P2. Les dues proteïnes P1 i P2 presenten una composició molt similar; es tracta de proteïnes de 39 aminoàcids amb una única diferència en la seqüència: l'aminoàcid corresponent a la posició 28 és un Asp a la P1 i un Glu a la P2 (figura I-11, A), substitució de tipus conservatiu. Aquesta seqüència ha estat confirmada per la trobada a partir del cDNA (Takamune et al., 1991). Ambdues contenen un 43% d'Arg, 5.2% de Lys, 5.2% de Ser i 7.7% de Thr; així, segons el criteri de Subirana, pel qual les protamines es poden definir com proteïnes contenint 45-80% d'Arg+Lys i 10-25% de Ser+Thr (Subirana, 1983), la P1 i P2 de *B. japonicus* poden ser considerades protamines. De fet, anàlisis estadístics de la seqüència d'aminoàcids suggereixen que aquestes protamines són homòlogues a les protamines típiques dels peixos ossis (Takamune et al., 1991). Igual que en aquestes, les arginines es troben agrupades; la proteïna específica de l'esperma de *Xenopus laevis* SP4, en canvi, mostrava només una agrupació d'arginines mentre que la resta es presenta en dímers (Hiyoshi et al., 1991) (v. figura I-11, B). La mida i mobilitat electroforètica també són similars a les de les protamines dels osteïctis (v. l'esquema de la figura I-12 on es comparen, *grosso modo*, les mobilitats relatives de les protamines de peixos, *Bufo*, *Xenopus* i *Rana*). De fet, les proteïnes P1 i P2 podrien considerar-se com una proteïna microheterogènia (una altra característica que trobàvem en les protamines dels peixos ossis).







---

Figura I-12. Representació esquemàtica de les mobilitats relatives de les PEB característiques dels peixos ossis i amfibis en gels d'acrilamida/acètic/urea: *Clupea* (1), *Bufo* (2), *Xenopus* (3) i *Rana* (4). H = zona electroforètica de les histones.

---

D'altra banda, Moriya i Katagiri (1991), utilitzant anticossos marcats amb or col·loidal, han quantificat els increments de les PEB als nuclis de *Bufo japonicus* i *Xenopus laevis* durant l'espermioènesi. Els autors mostren que no es troben proteïnes específiques durant el començament de l'elongació en espermatides sinó que aquestes comencen a aparèixer al principi de la condensació de la cromatina i que la seva quantitat va incrementant gradualment i després dràsticament al final de l'espermioènesi.

Els RNA missatgers de les protamines de *Bufo* només estan presents a partir de les espermatides i després es van acumulant (Mita et al., 1991). Aquesta és una diferència interessant respecte als peixos, on hem dit que la transcripció es donava en fases premeiòtiques. En canvi, en el cas de la SP4 de *Xenopus laevis* es veu que els RNA missatgers estan presents tant en els

espermatòcits primaris com a les espermàtides (Hiyoshi et al., 1991), o sigui que es dóna una transcripció premeiòtica i una traducció postmeiòtica com en els peixos (encara que en aquest cas la proteïna no presenta homologia amb la protamina dels peixos). De moment es desconeix el possible sentit evolutiu d'aquest fet, però en els grups taxonòmics següents que s'han estudiat (aus, mamífers) la transcripció del gen de la protamina ja serà sempre haploid.

#### 2.4.1.2. Urodels

Com ja comentàvem al principi de l'apartat 2.4., contràriament al que ocorre als anurs, els urodels es caracteritzen per la constància en el model de PEB presentada. Les espècies de salamandres i tritons estudiades (v. per exemple Picheral, 1970, 1979; Bols et al., 1976) mostren la presència de proteïnes que es poden classificar com protamines segons les anàlisis citoquímiques i electroforètiques (encara que no s'han fet anàlisis composicionals). A les electroforesis aquestes protamines apareixen com a 2-3 bandes que migren molt a prop de la protamina salmina, de forma similar a les protamines de *Bufo*. Citoquímicament i amb la utilització d'agents reductors s'ha vist que en algunes espècies d'urodels es pot passar abans per un estadi de protamines queratinoses (Picheral, 1970, 1979; Bedford i Calvin, 1974; Bols et al., 1976).

En resum, sembla que les protamines dels urodels i d'alguns anurs (com *Bufo*) poden estar relacionades evolutivament amb la protamina dels peixos, però la variabilitat presentada, igual que en el cas dels osteïctis, resta encara per clarificar. Aquesta variabilitat, no obstant, només sembla concentrar-se en el grup dels anurs, posseïdors de fecundació externa, i no en els urodels, posseïdors de fecundació interna.

## 2.4.2. Rèptils

Els estudis realitzats sobre espècies representants dels ordres Squamata, Testudines i Crocòdilia mostren una gran similitud en les seves PEB.

Dins de l'ordre Squamata s'han estudiat 13 espècies de serps, ja sigui citoquímicament, electroforèticament o composicionalment (Kasinsky et al., 1978; Mann, 1981; Kasinsky et al., 1987). En *Elaphe*, *Thamnophis* i *Coluber* s'ha vist que el patró electroforètic consisteix en dues bandes que es mouen lleugerament per sobre de la protamina de salmó, a la regió corresponent a la protamina de *Bufo* (Kasinsky et al., 1978). L'anàlisi composicional del component més ràpid d'*Elaphe guttata* mostra la presència d'un 30% d'Arg, a més de quantitats considerables de Lys i His (Kasinsky, 1985; Kasinsky et al., 1987) (v. taula I-2). Malgrat totes les espècies de serps estudiades pertanyen a una sola família (Colubridae), la semblança entre aquestes proteïnes i les de la resta de rèptils fa suposar que la desena de famílies de serps restant posseiran característiques similars.

Encara dins de l'ordre Squamata, les PEB d'espècies representants de 6 famílies diferents de llargandaixos es mostren molt similars electroforèticament a les de les serps (2 bandes protèiques de migració similar a la protamina de *Bufo*) (Kasinsky et al., 1987). L'anàlisi aminoacídic del component de major mobilitat d'*Anolis carolinensis* mostra també una elevada proporció d'Arg juntament amb quantitats importants de Lys i His (Kasinsky et al., 1987) (v. taula I-2).

Taula I-2. Composició aminoacídica de les PEB dels rèptils. La composició de les protamines de *Salmo* (peixos), *Bufo* (amfibis) i *Coturnix* (aus) s'adjunten amb fins comparatius. t=traces.

	Squamata		Testudines		Crocodilia				<i>Coturnix japonica</i> (4) (aus)	<i>Bufo japonicus</i> (5) (amfibis)	<i>Oncorhynchus keta</i> (6) (peixos)
	<i>Elaphe guttata</i> (1)(serp)	<i>Anolis carolinensis</i> (2) (iguana)	<i>Chrysemis picta</i> (3) (tortuga)	Component pral.	A2	A3	A4				
Lys	7.0	10.1±2.4	1.0	1.9±0.7	4.5±3.1	3.2±1.3	--	5.4	--	--	
His	7.6	9.7±0.4	4.0	6.8±2.4	9.7±4.9	10.9±5.8	--	9.6	--	--	
Arg	29.5	22.2±3.4	65.3	29.8±7.5	39.2±4.2	28.3±8.8	67.3	42.1	67.2	67.2	
Asx	4.3	2.8±1.5	--	3.8±1.0	3.9±0.7	5.1±1.1	--	2.0	--	--	
Thr	1.9	0.7±0.5	2.5	6.3±3.4	2.8±2.5	3.3±3.6	1.4	6.9	--	--	
Ser	14.5	9.7±3.5	7.0	8.6±2.9	11.1±2.6	7.9±5.3	12.0	5.7	9.9	9.9	
Glx	4.2	3.4±0.4	4.4	5.5±1.0	1.8±1.0	2.7±1.9	--	4.7	--	--	
Pro	0.6	1.0±1.2	t	2.3±1.1	0.3±0.5	1.8±1.9	--	9.7	9.1	9.1	
Gly	18.7	29.4±4.3	13.2	16.9±0.7	17.1±0.7	19.6±9.2	6.5	0.8	6.5	6.5	
Ala	3.7	3.7±0.5	1.3	8.9±2.7	4.6±1.5	8.5±3.9	1.9	4.9	1.3	1.3	
Cys	--	--	--	--	--	--	--	0.3	--	--	
Val	3.45	3.4±1.4	--	2.3±2.7	1.2±1.2	2.7±0.6	1.6	5.3	4.7	4.7	
Met	--	t	--	0.4±0.2	t	0.2±0.2	--	--	--	--	
Ile	1.2	0.9±0.6	--	1.3±0.6	0.4±0.3	0.9±0.2	--	--	1.3	1.3	
Leu	1.6	1.6±0.8	--	1.5±0.8	1.3±0.9	1.3±0.5	--	--	--	--	
Tyr	0.8	0.4±0.3	--	2.4±0.9	1.7±1.1	1.7±0.9	8.1	2.7	--	--	
Phe	0.6	0.6±0.5	--	1.4±0.4	0.3±0.4	0.7±0.4	--	--	--	--	

(1) Mitjana de les anàlisis que apareixen a Kasinsky et al., 1987.

(2) Kasinsky et al., 1987.

(3) Chiva et al., 1989.

(4) Chiva et al., 1987.

(5) Calculat de la seqüència resolta per Takamune et al., 1991.

(6) Ando et al., 1973.

Aquesta uniformitat observada en els Squamata està d'acord amb les observacions fetes al microscopi electrònic (Furieri, 1970) sobre la similitud del cap de l'espermatozoide de les 15 espècies estudiades de serps i llargandaixos: es tracta d'un espermatozoide amb un cap llarg i corbat, amb forma lanceolada; el nucli es mostra condensat i opac com a resultat de la coalescència de les fibres de cromatina (Cruz-Hofling i Cruz-Landim, 1978; Butler i Gabri, 1984). Aquesta similitud en la morfologia del cap de l'espermatozoide s'extén a 7 espècies de tortugues (Furieri, 1970); en canvi, contrasta amb els diferents graus de condensació de la cromatina que trobàvem a *Bufo*, *Rana* i *Xenopus* (v. apartat 2.4.1.1.).

L'anàlisi electroforètica de la tortuga *Chrysemis picta* (ordre Testudines) revela que el contingut protèic bàsic de l'esperma d'aquesta espècie es resol en 3 components en gels de poliàcrilamida/acètic/urea; d'aquests components, el més lent migra igual que la protamina del gall mentre que el més ràpid i principal migra per sobre de la salmina (Chiva et al., 1989). La presència de 3 components protèics ha estat també observada en la tortuga *Chrysemis scripta elegans* (Kasinsky et al., 1987), i *Emys orbicularis* conté un conjunt de proteïnes de mobilitats similars a les de *C. picta* (Elsevier i Pieau, 1988). El component principal de *C. picta* mostra una clara microheterogeneïtat en els gels electroforètics; igualment el component més lent a vegades apareix com un doblet, com també ho fa el component de mobilitat intermitja (Chiva et al., 1989). La microheterogeneïtat en les PEB de les tortugues ja havia estat observada prèviament en *Deirochelys reticularia* (Kasinsky et al., 1987) i *Emys orbicularis* (Elsevier i Pieau, 1988), així com també en *Anolis sagrei* (Squamata) (Kasinsky et al., 1987). L'anàlisi composicional del component principal de *C. picta* (taula I-2) mostra un molt elevat percentatge d'Arg (65.3%) i quantitats importants de Gly (13.2%) i Ser (7%); la Lys i His també hi són presents (1% i 4%, respectivament) (Chiva et al., 1989). Aquesta proteïna pot ser considerada una protamina (Arg+Lys=45-80%; Ser+Thr=10-25%). Chiva et al. (1989) postulen que les PEB de les tortugues estan relacionades molt estretament amb les protamines de les aus. Així fan constar la notable similitud composicional entre aquesta protamina i la de les aus (v. taula I-2). S'observa que en tots dos casos la suma dels aminoàcids Arg, Ser i

Gly constitueixen la major part de la proteïna (85-86% del total). Una diferència important és la manca de Tyr a la tortuga, mentre que es presenta en quantitats importants a les aus (5-8%); d'altra banda, les aus no presenten ni Lys ni His.

Finalment, s'ha estudiat només una espècie de l'ordre Crocodilia, *Alligator mississippiensis* (Kasinsky et al., 1987), la qual posseeix al nucli del seu espermatozoide tres components protèics bàsics principals (A2, A3 i A4) rics en Arg (28-40%) però també amb presència de Lys i His (taula I-2). Actualment els doctors Ausió i Kasinsky estan treballant en la seqüenciació de les PEB de la tortuga *Chrysemis picta* i de l'al·ligàtor *Alligator mississippiensis*.

Recapitulant, doncs, les PEB dels rèptils es mostren molt més similars entre elles que en el cas dels peixos ossis i amfibis anurs, tractant-se en general de 2 o 3 proteïnes (que poden presentar microheterogeneïtat), molt riques en Arg però també amb presència de Lys i His, i que migren a la zona entre les protamines d'aus i les dels peixos.

### 2.4.3. Aus

Els estudis citoquímics, electroforètics i composicionals de 7 espècies d'aus pertanyents a 5 ordres diferents (Chiva et al., 1987, 1988) mostren que les seves PEB presenten propietats molt similars entre elles. Citoquímicament totes les espècies posseeixen proteïnes de tipus 1 (protamines) que es mouen en els gels de poliacrilamida/acètic/urea entre les histones somàtiques i la protamina dels peixos ossis. A *Coturnix japonica* i *Columbia livia* es poden trobar varies protamines de similar pes molecular, mentre que a *Anas platyrhynchos*, *Carduelis carduelis* i *Melopsittacus undulatus* només es presenta una sola protamina (Chiva et al., 1988), com passa també amb *Gallus domesticus* (Mezquita i Teng, 1977). No es troba mai histones al nucli espermàtic madur de les aus estudiades (1988). Quant a la composició

aminoacídica, 4 aminoàcids constitueixen el 90-96% de la molècula: Arg, el més abundant amb diferència (58-67%), Ser (12-18%), i en menor quantitat Tyr (6-9.0%) i Gly (4.5-8.5%) (v. també taula I-2). La mida d'aquestes molècules, segons la seva composició i mobilitat electroforètica, s'ha estimat en uns  $65 \pm 5$  aminoàcids (Chiva et al., 1987).

Fins al moment només es coneixen les seqüències de dues protamines d'aus: la del gall i la de la guatlla. La protamina del gall va ser seqüenciada primerament per Nakano et al. (1976) a partir de la proteïna. Ara bé, la seqüència obtinguda anys més tard per Oliva i Dixon (1989) a partir del gen mostra diferències amb la primera. La seqüenciació de 28 residus aminoacídics a partir de l'extrem N-terminal de la protamina del gall (Oliva i Dixon, 1989) confirma, no obstant, la seqüència predida a partir del gen. A més a més, la seqüència resolta a partir de la protamina de *Coturnix japonica* (guatlla) (Oliva et al., 1989) sembla també indicar que la seqüència obtinguda per Oliva i Dixon (1989) és la correcta.

A la figura I-13(A) es mostren les seqüències completes de les protamines del gall i de la guatlla. Ambdues molècules tenen una mida al voltant dels 60 aminoàcids (56, guatlla; 61, gall), aproximadament doble de la mida que solen presentar les protamines dels peixos (27-34 aminoàcids). Basant-se en homologies internes en la protamina del gall (Chevaillier, 1983), Dixon et al. (1985) van proposar un possible origen de la protamina de les aus arran d'una duplicació parcial a partir d'una PEB ancestral del tipus trobat als Clupeiformes i Salmoniformes.

D'altra banda, tant la protamina del gall com la de la guatlla comencen amb el tetrapèptid ARYR (molt conservat també en les protamines de mamífers, com es veu en el següent apartat i a la figura I-13, B) seguit d'una sèrie alternant Arg-Ser (o Thr). La majoria de les arginines de la molècula semblen trobar-se agrupades en la part central de la proteïna (similarmet al que es dona en mamífers). No obstant, i a diferència dels mamífers, les protamines de les aus no contenen cisteïna. Una altra diferència important és que els gens de les protamines d'aus, igual que els dels peixos i a diferència dels dels mamífers, no presenten introns. El número de còpies del gen de la protamina del gall sembla ser de dues còpies per genoma haploid. Els dos loci



estan separats entre sí per 4 Kb i codifiquen per polipèptids idèntics (Oliva i Dixon, 1989). En la guatlla també s'han trobat dues còpies del gen de la protamina (Oliva et al., 1989); no obstant, la seqüència d'aquest cDNA mostra varies diferències en la regió codificant respecte a la de la gallina.

Pel que fa a la transició d'histones a protamines durant l'espermiogènesi, s'ha vist que l'aparició de la protamina als nuclis de les espermàtides testiculars del gall va associat amb un desplaçament complet de les histones de manera que aquestes van disminuint a mesura que augmenta la quantitat de protamines (Mezquita i Teng, 1977; Agell et al., 1983; Oliva i Mezquita, 1983). Igualment, aquest procés va associat amb la desaparició de les proteïnes HMG (Chiva i Mezquita, 1983) i altres proteïnes no histones (Mezquita i Teng, 1977). En altres espècies d'aus també s'observa la substitució total de les histones per protamines al llarg de l'espermiogènesi (Chiva et al., 1988). D'altra banda, no s'han trobat evidències de cap proteïna intermediària durant aquesta substitució, a diferència del que passa a les espermiogènesis dels peixos cartilaginosis i mamífers (Chevaillier, 1978; Bols et al., 1980; Chauvière et al., 1983; Grimes, 1986).

De tot el que hem vist, cal concloure una uniformitat general en el model de PEB present a les aus. Al nucli del seu espermatozoide trobem una única proteïna (o un component majoritari) del tipus protamina "típica", encara que de major mida, amb una mobilitat electroforètica i composició molt similar en totes les espècies estudiades. D'altra banda, les protamines de les aus, de mida aproximadament doble de les dels peixos ossis, es mostren no obstant molt més eficients en el desassemblatge dels nucleosomes *in vitro* (Oliva i Mezquita, 1986; Oliva et al., 1987).

#### 2.4.4. Mamífers

Les proteïnes bàsiques trobades al nucli de l'espermatozoide dels mamífers euteris són protamines de tipus queratinós, o sigui, amb cisteïna. La presència dels residus de Cys permet la formació de ponts disulfur intra i intermoleculars; aquestes unions covalents poden proporcionar unions creuades addicionals i augmentar per tant l'estabilitat de la cromatina espermàtica.

En cada espècie es poden trobar varies protamines a l'espermatozoide, però totes elles poden classificar-se en un dels 2 tipus anomenats P1 i P2. No obstant, aquestes protamines no són les que desplacen les histones somàtiques sinó que es donen una sèrie d'etapes intermèdies: Així, en primer lloc apareixen variants d'histones específiques del testicle que reemplacen en diferent grau les histones somàtiques; durant la fase haploide es dona el reemplaçament de les histones (tant les somàtiques remanents com les variants específiques) per un tipus especial de proteïnes anomenades proteïnes de transició i, finalment, en els últims estadis de l'espermioogènesi aquestes seran substituïdes per les protamines (P1, P2) (revisat a Meistrich, 1989). Cal dir que les proteïnes de transició dels mamífers no són homòlogues a les trobades als condrictis, tractant-se en tot cas d'un convergència evolutiva.

Les anomenades protamines P1 dels mamífers euteris posseeixen un elevat contingut en Arg (al voltant del 50%) i una quantitat de Cys entre el 9 i el 20%. Actualment es disposa de la seqüència de les P1s de varies espècies de mamífers euteris (v. figura I-13, B). Totes aquestes seqüències semblen mostrar l'existència de tres "dominis" en aquestes proteïnes: La regió central de la molècula és molt rica en Arg i possiblement és un lloc d'unió amb el DNA (Sautière et al., 1984) que ha estat conservat entre diferents espècies. Igualment es mostra conservada la regió N-terminal, que sempre s'inicia amb el tetrapèptid ARYR –amb l'única excepció del conill (Ammer i Henschen, 1988) on l'Ala es veu substituïda per una valina (un canvi, en qualsevol cas, de tipus conservatiu)–. A continuació apareixen dos residus de Cys i una regió d'alternància Ser (o Thr algunes vegades) - residu bàsic (Arg principalment), seguida d'un altre motiu força conservat corresponent a una

agrupació de 5-7 arginines. Aquestes seqüències també estan presents en marsupials (Balhorn et al., 1989). Contrastant amb el vist fins ara, l'extrem carboxi terminal de les protamines P1 és més variable entre les diferents molècules (v. figura I-13, B).

**Figura I-13.** A. Estructura primària de les protamines d'aus. a) guatlla; b) gall. B. Estructura primària de les protamines P1 de mamífers. a) toro; b) cabra; c) moltó; d) ratolí; e) rata; f) conill; g) home; h) cavall; i) porc. C. Seqüència *consensus* proposada per a les protamines d'aus i P1 de mamífers. Les parts subratllades representen zones de la molècula més conservades i els aminoàcids designats amb minúscules representen residus altament conservats però que varien en alguna de les seqüències. Les interrupcions en les seqüències s'han introduït per maximitzar la semblança entre les diferents protamines. Adaptat d'Oliva i Dixon (1991).

#### A. Aus

- a) ARYRRTRTRSRSRRRRRSRRRRS-----SRRRRYGRSRRSYRSVGRRRRR-YGRRRRRRRRY  
 b) ARYRRSRTRSRSPRSRRRRRRSGRRRSPRRRRRYGSARRSRRSVGGRRRR-YGSRRRRRRY

#### B. Mamífers

- a) ARYRCCLTHSGSRRCRRRRRRRC-----RRRRRFRGRRRRRR-VCCR-R--YTVIRCTRQ--  
 b) ARYRCCLTHSRRCRRRRRRRC-----RRRRRFRGRRRRRR-VCCR-R--YTVVCTRQ--  
 c) ARYRCCLTHSRRCRRRRRRRC-----RRRRRFRGRRRRRR-VCCR-R--YTVVCTRQ--  
 d) ARYRCCRSKRSRRC-RRRRRRRC-----RRRRRCCRRRRRR--CCRRRSYT-IRC--KKY  
 e) ARYRCCRSKRSRRC-RRRRRRRC-----RRRRRCCRRRRRR--CCRRRSTT-FRC--KRY  
 f) VRYRCCRSQSRSRRC-RRRRRRRC-----RRRRRCCRRRRVR-KCCR-R-IYT-LRC--RRY  
 g) ARYRCCRSQSRSRYRQRQS-----RRRRRRSCTRRRAMCCRPR--YR-PRC-RRH  
 h) ARYRCCRSQSRSRRCRRRRRRRC-----RRRRRSV--RQRR-VCCR-R--YTVLRCRRRR-  
 i) ARYRCCRSHSRRC-RPRRRRC-----RRRRRCCPRRRRRAVCCR-R--YTVIRCRRCR-

#### C. Consensus

aRYRccrthSrSrcrRrrrRrc-----rRRRRrccrrRrrr-ycCRrRr-Yt--RcrrrrrY

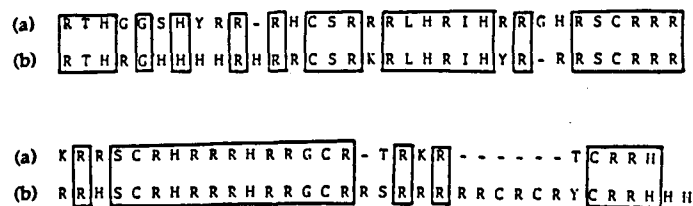
Oliva i Dixon (1991) subratllen la similitud entre les seqüències d'aquestes protamines P1 i les de les protamines de les aus i postulen una relació d'homologia entre ambdós tipus de proteïnes. Basant-se en la comparació de les seqüències aminoacídiques, aquests autors proposen una seqüència *consensus* per a les protamines de les aus i mamífers (v. figura I-13, C). La presència de Cys en les protamines de mamífers però no en les de les aus podria indicar, segons aquests autors, una funció menys essencial d'aquestes residus comparats amb els grups d'aminoàcids conservats, de manera que, per exemple, aquests fossin els responsables del procés de condensació de la cromatina mentre que les cisteïnes podrien només participar en donar una estabilització final a la nuclioprotamina (Oliva i Dixon, 1991).

La protamina del tipus P2 és també del tipus queratinós (amb Cys) i presenta una gran basicitat (aproximadament del 50%), però es diferencia composicionalment de la P1 principalment per la substitució del 25-30% de les arginines per histidines a la P2 (mentre que a les P1s no trobem cap histidina o només una). També posseeixen agrupacions de residus bàsics encara que aquestes són aquí heterogènies (v. figura I-14). Cal tenir en compte, però, que la similitud observada a nivell de proteïna no es manté en un mateix grau a nivell dels gens: Mentre que els alineaments de les seqüències aminoacídiques de les protamines P1 i P2 donen un valor de similitud del 56% al ratolí i d'un 56.3% a l'home (Bellvé et al., 1988), no es troben homologies significatives a nivell de seqüència de nucleòtids; el mateix passa entre les protamines d'aus i les P1 i P2 de mamífers (Oliva i Dixon, 1991). Una altra diferència important entre les protamines P1 i P2 dels mamífers és que, mentre que la P1 és sintetitzada en la forma que la trobem a l'espermatozoide madur, la P2 és primerament sintetitzada en forma d'un precursor (Elsevier, 1982; Domenjoud et al., 1988; Johnson et al., 1988a; Yelick et al., 1987; Hecht, 1989).

Tant el RNA missatger de la P1 com el de la P2 de ratolí es detecten per primer cop en les espermatides rodones i són emmagatzemats en forma de partícules ribonucleoprotèiques. La síntesi protèica no començarà fins al cap

d'aproximadament una setmana, ja en les espermatides elongades (Kleene et al., 1983, 1984). El RNAm que apareix als polisomes és extensivament desadenilat de manera que és més curt que el transcrit original (Kleene et al., 1984). A diferència de la P1, sintetitzada en la forma final, un cop traduïda la proteïna precursora de la P2 del ratolí, aquesta es segueix processant, estant ja unida al DNA, de manera que se n'eliminen els primers 43 aminoàcids donant lloc així a la protamina P2 final (Yelick et al., 1987). Aquest fragment N-terminal de 43 aminoàcids es mostra composicionalment molt diferent de la forma P2 final, sent molt menys bàsic que aquesta. D'aquesta manera, la seva presència podria regular la unió d'aquesta proteïna amb el DNA de forma que aquesta es donés d'una forma més ordenada (Yelick et al., 1987). En el cas de la protamina P2 humana hi deu haver un nou processament de l'extrem N-terminal ja que es troben dos tipus de P2 (P2a i P2b) que només difereixen en què la P2a posseeix un tripeptid extra (R-T-K) que no es presenta a la P2b (McKay et al., 1986b).

Figura I-14. Estructura primària de les protamines P2 de l'home (a) i el ratolí (b). Les parts requadrades representen les zones d'identitats entre les dues molècules. Adaptat d'Oliva i Dixon (1991).



Una circumstància interessant respecte a aquesta proteïna és que si bé la protamina P1 s'ha trobat en tots els mamífers euteris analitzats fins al moment, la protamina P2 només s'ha trobat bàsicament a l'espermatozoide de l'home (McKay et al., 1986b) i el ratolí (Bellvé i Carraway, 1978) (v. figura I-

14), on representen el 50-60% del total de protamina. Aquest fet planteja una problemàtica interessant quan es compara per exemple el cas de la rata i el ratolí, espècies molt properes filogenèticament però que en canvi presenten al nucli del seu espermatozoide una composició protèica diferent (P1 a rata, P1+P2 a ratolí). No obstant, experiments posteriors van mostrar un fort senyal d'hibridació entre el cDNA de la P2 de ratolí i el DNA de rata; el mateix passava amb els DNAs d'altres animals com el toro, el gos i el porc, on tampoc es detecta protamina P2 en les electroforesis realitzades a partir dels extractes protèics del nucli d'aquests espermatozoides (Johnson et al., 1988b). Més tard s'ha comprovat en algunes espècies que el fet de no presentar P2 pot deure's a problemes en la transcripció o traducció de la proteïna. Així, a la rata s'ha vist que existeix el gen de la P2 i que aquest és molt similar al de la P2 del ratolí; no obstant, la quantitat de RNAm per la P2 present en rata és molt baixa (només un 2-5% del nivell de transcrits trobats per la P2 del ratolí) (Bower et al., 1987) i la proteïna P2 madura no s'ha detectat a l'espermatozoide. Els estudis de Bunick et al. (1990) mostren que quan es compara el gen de la P2 de rata amb el corresponent del ratolí s'observen importants diferències en una posició on, a la proteïna del ratolí, el precursor és fragmentat per donar la proteïna madura, així com diferències en el promotor. Segons aquests autors, aquests resultats suggereixen que la transcripció reduïda juntament amb la presència de punts de processament alterats contribueixen a la manca de P2 al nucli espermàtic de la rata. Creuen, a més, que al DNA d'aquesta espècie pot trobar-s'hi unida, com a component protèic minoritari, la proteïna precursora de la P2. Anàlogament, una problemàtica similar s'ha observat en el cas del toro i el porc: malgrat no presentar-se el producte del gen a l'espermatozoide madur, s'ha vist que el gen de la P2 existeix en aquestes espècies i que es transcriu i es tradueix (encara que en nivells baixos). Maier et al. (1990) observen diverses mutacions que alteren l'estructura primària de la proteïna de manera que aquesta esdevindria no funcional i per tant es veuria reemplaçada per la protamina P1 (degradant-se la P2 durant les últimes fases de l'espermioogènesi). En la mateixa línia, és interessant també el fet que diferents gèneres d'hàmsters presenten nivells de P2 variant des de zero a quantitats similars de P1 i P2 (Corzett et al., 1987).

Bunick et al. (1990), basant-se en la distribució d'aquestes proteïnes, apunten que la protamina P1 podria complir un paper essencial en la condensació de la cromatina, mentre que el de la P2 no ho seria. Oliva i Dixon (1991), basant-se també en la heterogènia distribució de la P2 als mamífers enfront de l'àmplia distribució de la P1, així com en la similitud entre les protamines d'aus i la P1 de mamífers, i la no presència de P2 en aus, especulen que la protamina principal en mamífers (en termes d'aparició evolutiva més primerenca i en termes de funció) seria la P1; la família de la protamina P2 podria haver aparegut més tard com una molècula de suport en la determinació de l'estructura del nucli de l'espermatozoide, o potser inclús relacionada amb l'aparició de cisteïnes per permetre la formació d'unions creuades.

Tant el gen de la protamina P1 com el de la P2 contenen un intró a la seva seqüència, a diferència dels salmònids i les aus, on no se n'ha trobat cap (revisat a Oliva i Dixon, 1991). Pel que fa al número de còpies, tant la P1 com la P2 de ratolí i la P1 de toro presenten una sola còpia per genoma haploid (Elsevier, 1982; Johnson et al., 1988a; Krawetz et al., 1988, 1989). Els gens de la P1 i la P2 s'han pogut localitzar al cromosoma 16 tant a l'home (Krawetz et al., 1989) com al ratolí (Hecht et al., 1986). Així doncs, els gens d'aquestes protamines són autosòmics i no localitzats al cromosoma Y.

Entre els mamífers no euteris, els marsupials presenten un tipus de protamina sense Cys, com els ocells. Així ho revelen les anàlisis citològiques realitzades en les espècies *Didelphus virginiana* i *Smithopsis crassicaudata*. La caracterització electroforètica en una tercera espècie (*Antechinus stuarti*) mostra la presència d'una sola banda de mobilitat similar a la protamina del gall (revisat per Kasinsky, 1989). L'anàlisi electroforètica de les proteïnes de *Macropus eugenii* va mostrar un conjunt heterogeni de bandes d'alta mobilitat que, en ser analitzades composicionalment, van resultar ser protamines (Fifis et al., 1990). Balhorn et al. (1989) troben a dues espècies de marsupials, l'opòssum *Monodelphis domestica* i el ualabi *Petrogale xanthopus*, una proteïna similar a la protamina 1 dels mamífers euteris (encara que sense Cys) compactant el DNA espermàtic; no es va detectar cap proteïna corresponent a la protamina 2. Igual que les protamines

---

d'aus i les P1 de mamífers, les protamines d'aquests marsupials presenten el pèptid ARY a l'extrem N-terminal. La resta de les seqüències parcials semblen diferir bastant en les dues espècies, de manera que mentre que la del ualabi és similar a la dels mamífers euteris, la de l'opòssum no ho és (Balhorn et al., 1989).

A nivell genòmic, Johnson et al. (1988b) van veure que els cDNAs de les P1 i P2 de ratolí hibridaven (de forma subtil però reproduïble) amb la protamina de l'opòssum, i la P1 també amb la protamina del ualabi. Igualment, el DNA d'un monotrema (ornitorinc) també conté seqüències de DNA amb alguna homologia amb el cDNA de la P2 del ratolí.

Així doncs, tenim que als mamífers euteris el nucli de l'espermatozoide és condensat per un o dos tipus de proteïnes queratínoses, P1 i P2, de diferents característiques i distribució, apareixent la P2 només en determinades espècies possiblement degut a problemes en el processament de la proteïna precursora o a alteracions transcripcionals o post-transcripcionals. D'altra banda, als marsupials només apareixen protamines sense cisteïna.



### 3. Plantejament i objectius del present treball

Malgrat l'estudi de les proteïnes espermàtiques bàsiques es remonta a fa més d'un segle (Miescher, 1874), la informació que se'n disposa és encara molt fragmentària. Entre els invertebrats només s'han examinat amb una extensió considerable les PEB de quatre phyla (mol·luscs, anèlids, artròpodes i equinoderms), posseint-se només observacions aïllades de tres phyla més (platihelminths, nematodes, equiuroides) (v. la revisió efectuada per Kasinsky, 1989). La informació disponible sobre les PEB presents als vertebrats és en comparació més àmplia, disposant-se de dades citoquímiques i/o bioquímiques d'espècies representants de la majoria dels grans grups; a nivell d'estructura primària, s'han dilucidat les seqüències aminoacídiques de les PEB d'algunes, encara que poques, espècies: alguns peixos ossis, especialment salmònids (v. apartat I-2.2.); un elasmobranqui (v. I-2.3.); dos amfibis (v. I-2.4.1.); dos aus (v. I-2.4.3.); i alguns mamífers (v. I-2.4.4.). Així, la informació de què disposem es mostra encara limitada per a poder comprendre l'evolució d'aquestes proteïnes, especialment en aquells grups on no es dona una uniformitat en el model de PEB presentat, com és el cas dels peixos ossis.

Tradicionalment, la distribució heterogènia dels diferents tipus de PEB als peixos ossis ha plantejat l'interrogant de com pot haver funcionat l'evolució d'aquestes proteïnes fins arribar a donar la situació actual. D'altra banda, dins dels deuteròstoms hi ha un gran buit d'informació pel que fa al tipus de PEB present als grups existents entre els equinoderms i els peixos. Dins d'aquest marc, el nostre treball ha pretès ampliar els coneixements sobre la distribució i característiques de les PEB presents no només als peixos ossis (grup al que hem dedicat la major atenció) sinó també sobre les PEB que es troben als principals grups de deuteròstoms encara desconeguts sota aquest punt de vista, tot això amb l'esperança de poder oferir una visió més global del problema que suposa la distribució i evolució d'aquestes proteïnes. Amb aquesta finalitat, els objectius que ens vam proposar van ser els següents:

– Caracterització de les PEB del major número possible d'espècies de diferents famílies i ordres de peixos ossis no estudiats fins al moment i anàlisi

de la seva distribució, intentant dilucidar al mateix temps fins a quin punt es corresponen o no amb les classificacions filogenètiques.

– Caracterització de les PEB d'un representant dels holocèfals (línia de peixos condriactis no estudiada més que a nivell citoquímic) i comparació amb les PEB de la línia dels elasmobranquis per intentar discernir quines són les característiques comunes pel grup dels condriactis en general.

– Caracterització de les PEB d'un agnat, grup no estudiat fins al moment sota aquest punt de vista.

– Estudi de les PEB d'un representant dels cefalocordats, grup del que no es posseïa cap informació i que es troba estretament relacionat amb els vertebrats.

– Estudi de les característiques i distribució de les PEB de diferents grups de tunicats, animals també molt relacionats amb els vertebrats.

– Obtenció de les seqüències aminoacídiques parcials o totals del major número de PEB que, ja sigui per poder-se considerar com a representatives d'un grup d'organismes o bé per les seves especials característiques, oferissin un interès especial.

– Valoració de les possibles relacions entre les PEB característiques de cada un dels grups estudiats en aquest treball i entre aquestes i les dels altres deuteròstoms ja estudiats per altres autors.

## ***II. Materials i Mètodes***



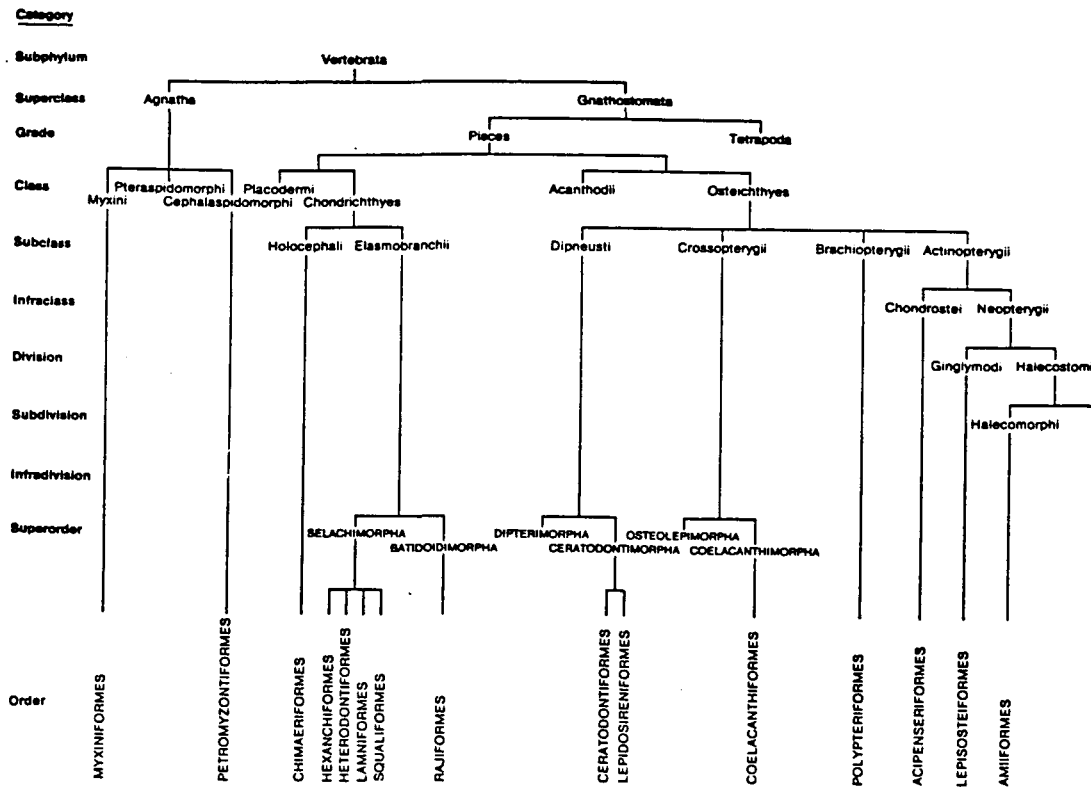
## 1. Material biològic

El present estudi s'ha realitzat sobre les proteïnes espermàtiques bàsiques (PEB) d'un bon número d'espècies pertanyents a diferents grups zoològics: peixos (ossis i cartilaginosos), agnats i procordats (tunicats i cefalocordats). Concretament, dins del grup dels cordats s'han estudiat 32 espècies de peixos ossis, un peix cartilaginós i un agnat. Entre els procordats, hem caracteritzat les PEB de 10 espècies de tunicats i d'un cefalocordat.

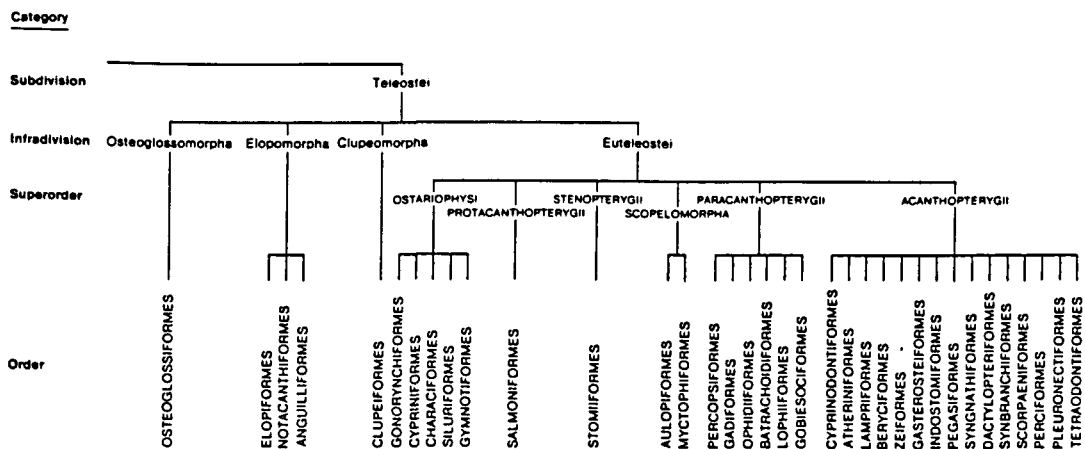
Amb aquesta finalitat es va haver de col·lectar individus mascles en estat de maduresa sexual procedents de diverses fonts. Així, molts dels individus han estat obtinguts a través de diferents campanyes oceano-gràfiques, altres han estat adquirits directament a llotges o mercats, alguns van ser aconseguits a través d'altres persones, etc. Sempre que ha estat possible s'ha treballat sobre esperma; en la resta de casos s'han utilitzat testicles en estat de maduresa avançada.

A la figura II-1 es mostra la classificació dels grans grups de cordats dels que hem estudiat algun representant. El llistat de les espècies estudiades es presenta a les taules II-1 (cordats) i II-2 (procordats).

Figura II-1. Jerarquia de les categories més altes dins dels peixos i altres grups relacionats (Nelson, 1984).



(continuació)



Taula II-1. Llistat dels cordats estudiats especificant la mostra, zona i data de recollida. Classificació segons Nelson (1984) i nomenclatura segons Lloris et al. (1984), Lloris (1986), Lloris et al. (1991), Hart (1973) i Hureau (1986). Abreviatures: E, esperma; G, gònada; A, Atlàntic; C, Cantàbric; M, Mediterrani; P, Pacífic.

Espècie i classificació	Nom vulgar	Mostra	Zona	Data
<b>Superclasse AGNATHA</b>				
<b>Ordre Petromyzontiformes</b>				
Família Petromyzontidae				
<i>Petromyzon marinus</i> (Linnaeus, 1758)	Llampresa de mar	E, G	A	XI/90
<b>Superclasse GNATHOSTOMATA</b>				
<b>Classe CHONDRICHTHYES</b>				
<b>Ordre Chimaeriformes</b>				
Família Chimaeridae				
<i>Hydrolagus colliei</i> (Lay i Bennett, 1839)	Quimeres	E, G	P	VI/88,89,91
<b>Classe OSTEICHTHYES</b>				
<b>Ordre Notacanthiformes</b>				
Família Notacanthidae				
<i>Notacanthus sexspinis</i> Richardson, 1846	"Espinudo del Cabo"	E	A	II/90
<b>Ordre Clupeiformes</b>				
Família Clupeidae				
<i>Sardina pilchardus</i> (Walbaum, 1792)	Sardina	G	M	II-III/90
<b>Ordre Salmoniformes</b>				
Família Salmonidae				
<i>Alepocephalus rostratus</i> Risso, 1820	Ullot negre	G	M	X/89
<b>Ordre Myctophiformes</b>				
Família Myctophidae				
<i>Lampanyctus crocodilus</i> (Risso, 1810)	Mare d'amploia	E+G	M	VII/89
<i>Symbolophorus veranyi</i> (Moreau, 1888)	Anxova lluminosa	E+G	M	VII/89
<b>Ordre Gadiformes</b>				
Família Moridae				
<i>Mora moro</i> (Risso, 1810)	Mòllera moranella	G	M	X/89
Família Gadidae				
<i>Micromesistius poutassou</i> (Risso, 1826)	Maire	G	M	II/90
<i>Phycis blennoides</i> (Brünnich, 1768)	Bròtola	G	C	VIII/89
Família Merlucciidae				
<i>Merluccius capensis</i> Castelnau, 1861	"Lluç del Cap"	E	A	II/90
<i>Merluccius merluccius</i> (Linnaeus, 1758)	Lluç	G	M	X/89

(segueix)

## II. Materials i Mètodes

(continuació)

<i>Espècie i classificació</i>	<i>Nom vulgar</i>	<i>Mostra</i>	<i>Zona</i>	<i>Data</i>
<b>Ordre Ophidiiformes</b>				
Família Bythitidae				
<i>Cataetyx laticeps*</i> Koefoed, 1927	Abrivat de fons	G	M	X/89
<b>Ordre Lophiiformes</b>				
Família Lophiidae				
<i>Lophius budegassa</i> Spinola, 1807	Rap vermell	G	M	XI/90
<b>Ordre Scorpaeniformes</b>				
Família Scorpaenidae				
<i>Helicolenus dactylopterus dactylopterus</i> (Delaroche, 1809)	Serrà penegal	E+G	M A	X/89, XI/90 II/90
Família Triglidae				
<i>Trigla lucerna</i> Linnaeus, 1758	Lluerna	E	M	VI/89
<b>Ordre Perciformes</b>				
Família Percichthyidae				
<i>Dicentrarchus labrax</i> (Linnaeus, 1758)	Llobarro	E	M	V/89, I/90
Família Sparidae				
<i>Diplodus annularis</i> (Linnaeus, 1758)	Esparrall	G	M	X/89
<i>Diplodus sargus sargus</i> (Linnaeus, 1758)	Sard	E	M	IV/90
<i>Lithognathus mormyrus</i> (Linnaeus, 1758)	Mabre	E	M	VI/89, VII-VIII/90
<i>Pagellus acarne</i> (Risso, 1826)	Besuc	E, G	M	X/89
<i>Sparus aurata</i> Linnaeus, 1758	Orada	E	M	XI/89, XII/90
Família Mullidae				
<i>Mullus barbatus</i> Linnaeus, 1758	Moll de fang	G	M	V-VII/90
<i>Mullus surmuletus</i> Linnaeus, 1758	Moll roquer	E, G	M	VI/89, V/90, IV/91
Família Labridae				
<i>Symphodus ocellatus ocellatus</i> (Forsskål, 1775)	Enrocador d'ulls	E	M	VI/90
Família Nototheniidae				
<i>Eleginops maclovinus</i> (Valenciennes, 1830)	"Róbalo austral"	E	A	VIII/90
Família Harpagiferidae				
<i>Harpagifer</i> sp.	"Diablitos"	E	A	1990
Família Channichthyidae				
<i>Champscephalus esox</i> (Günther, 1861)	"Pez de hielo"	E	A	1990

(segueix)



(continuació)

<i>Espècie i classificació</i>	<i>Nom vulgar</i>	<i>Mostra</i>	<i>Zona</i>	<i>Data</i>
<b>Ordre Perciformes (cont.)</b>				
Família Trachinidae				
<i>Trachinus draco</i> Linnaeus, 1758	Aranya blanca	G	M	VII/89
Família Uranoscopidae				
<i>Uranoscopus scaber</i> Linnaeus, 1758	Rata	E	M	VII/89
Família Blenniidae				
<i>Lipophrys trigloides</i> (Valenciennes, 1836)	Futarra	G	M	IV/90
Família Trichiuridae				
<i>Lepidopus caudatus</i> (Euphrasen, 1788)	Sabre	E+G	M	VII/89
Família Gempylidae				
<i>Thyrsites atun</i> (Euphrasen, 1791)	"Sierra"	E	A	II/90
Família Scombridae				
<i>Scomber</i> sp.	Verat	G	M	IV/90

\* Fecundació interna.

Taula II-2. Llistat dels procordats estudiats especificant la mostra, zona i data de recollida. Classificació segons Parker et al. (1987) i Nelson (1984). Nomenclatura segons Kozlof (1987) i Fischer et al. (1987). Abreviatures: E, esperma; G, gònada; M, Mediterrani; P, Pacífic; p-e, primavera-estiu.

<i>Categoria</i>	<i>Espècie</i>	<i>Mostra</i>	<i>Zona</i>	<i>Data</i>
<b>Subtipus UROCHORDATA</b>				
<b>(= TUNICATA)</b>				
<b>Classe ASCIDIACEA</b>				
<b>Ordre Enterogona</b>				
Família Corellidae	<i>Chelyosoma productum</i> Stimpson, 1864	G	P	p-e/88,89
Família Ascidiidae	<i>Ascidia callosa</i> Stimpson, 1852	G	P	p-e/88,89
	<i>Asciella aspersa</i> (Müller, 1776)	G	M	V/89
	<i>Phallusia mammillata</i> (Cuvier, 1815)	G	M	V/89
<b>Ordre Pleurogona</b>				
Família Styelidae	<i>Cnemidocarpa finmarkiensis</i> (Kiaer, 1893)	G	P	p-e/88,89
	<i>Styela montereyensis</i> (Dall, 1872)	G	P	p-e/88,89
	<i>Styela plicata</i> (Lesueur, 1823)	G	M	VI/89
Família Pyuridae	<i>Pyura haustor</i> (Stimpson, 1864)	G	P	p-e/88,89
	<i>Boltenia villosa</i> (Stimpson, 1864)	G	P	p-e/88,89
<b>Classe THALIACEA</b>				
Ordre Salpida	<i>Thalia democratica</i>	G+E	P	XII/90
<b>Subtipus CEPHALOCHORDATA</b>				
<b>(= ACRANIA)</b>				
<b>Ordre Amphioxiformes</b>				
Família Branchiostomatidae	<i>Branchiostoma floridae</i>	E	P	VIII/91

## 2. Mètodes preparatius

### 2.1. Obtenció i conservació d'esperma i gònades

Quan els individus presentaven esperma fluent, aquest es va obtenir per massatge abdominal. En la resta d'ocasions es va procedir a la dissecció de les gònades.

La conservació del material s'ha dut a terme en ambdós casos en etanol al 90% (prèvia trituració, en el cas de les gònades), mantenint-ho a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins al moment del seu processament. No obstant, l'experiència ens ha demostrat que la conservació a baixa temperatura no és una precaució imprescindible, almenys durant períodes de temps no prolongats.

### 2.2. Obtenció dels nuclis espermàtics

Bàsicament, la metodologia emprada per l'obtenció de la fracció nuclear de les cèl·lules espermàtiques consisteix en efectuar una sèrie d'homogeneïtzacions amb tampons isosmòtics a pH fisiològic, seguides de centrifugacions curtes a baixa velocitat; d'aquesta manera, els consecutius sediments es van enriquint en nuclis (fracció més voluminosa). El mètode seguit es basa en una modificació del mètode original de Chaeveau et al. (1956), autors que descriuen per primer cop la utilització de solucions de sacarosa per l'aïllament de nuclis intactes.

Els tampons emprats són el següents:

**Tampó A1:** Sacarosa 0.25 M  
CaCl<sub>2</sub> 5 mM  
Tris-HCl 10 mM pH 7.0  
Clorur de benzamidina 10 mM (en fresc)

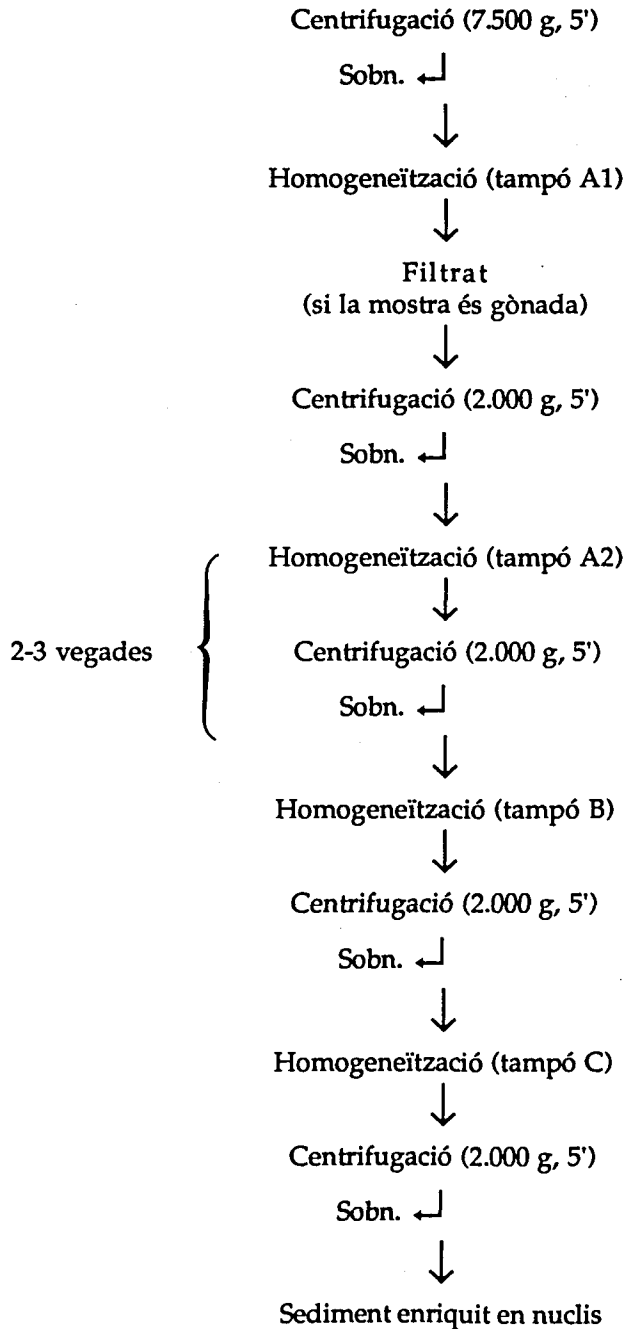
<b>Tampó A2:</b>	Tampó A1 Tritó X-100 0.1%
<b>Tampó B:</b>	EDTA 20 mM Tris-HCl 10 mM pH 7.0
<b>Tampó C:</b>	Tris-HCl 10 mM pH 7.0

El protocol seguit s'esquematitza a la figura II-1. Totes les operacions es realitzen en fred. La primera centrifugació té com a funció, simplement, el desfer-se de l'alcohol en que es conservava la mostra. L'homogeneïtzació amb tampó A1, degut a la seva concentració en sacarosa, proporciona un medi isosmòtic amb la cèl·lula. En aquesta primera fase es pretén començar a trencar les cèl·lules però sense destruir-ne els orgànuls, particularment el nucli. Si d'entrada es fes esclatar la cèl·lula i els orgànuls, podrien unir-se amb molta facilitat al DNA elements procedents d'altres compartiments cel·lulars, de manera que després podríem trobar, durant la posterior extracció de proteïnes, proteïnes alienes no associades inicialment al DNA. S'intenta conservar de moment les condicions més favorables per la preservació del nucli. A la mateixa raó obeeix la utilització de calci en aquest tampó; els ions divalents col·laboren en el manteniment d'una estructura nuclear estable.

Per impedir la degradació protèica s'utilitza clorur de benzamidina, potent inhibidor proteolític (Chiva et al, 1988). La benzamidina s'afegia en pols en el moment de la utilització del tampó. Totes les homogeneïtzacions es van fer amb homogeneïtzador de tipus Dounce fins obtenir una bona dispersió de la mostra.

Després de centrifugar i decantar el sobrenadant, el sediment obtingut s'homogeneïtza amb tampó A2 que porta com a única variant respecte a l'A1, la presència de tritó X-100 al 0.1%. El tritó X-100 és un detergent que, en dissoldre els lípids, desestructura les membranes biològiques. Es recomana repetir aquest pas, així com la successiva centrifugació, de dues a tres vegades.

Figura II-2. Protocol per l'obtenció de nuclis espermàtics a partir de mostres conservades en etanol. Els tampons utilitzats es detallen al text.



A continuació, el sediment es tracta amb el tampó B. Aquest, encara que manté un pH fisiològic, ja no representa un medi isosmòtic per la cèl·lula. El motiu principal per produir aquest xoc osmòtic és l'alliberar els residus citoplasmàtics i trossets de flagels que encara poguessin estar associats als nuclis. A part, l'inflament de la cromatina facilitarà la posterior extracció de proteïnes associades al DNA. Aquest inflament de la cromatina es veurà també afavorit per la capacitat de l'EDTA per quelar ions divalents, provocant una desestabilització dels nuclis.

L'últim tampó emprat dona també un medi hiposmòtic i, bàsicament, serveix per acabar de rentar el sediment.

Tant a l'inici com al llarg del procés s'efectuen diversos controls al microscopi de contrast de fases per comprovar la riquesa en nuclis espermàtics de la mostra.

### **Variants sobre el mètode d'obtenció de nuclis**

Sobre l'esquema bàsic del mètode presentat, i basant-se en el mateix fonament, es poden introduir forces modificacions. Així, per la destrucció de membranes i nuclis somàtics es pot emprar un sonicador a temps i intensitats controlats (Platz et al., 1977).

D'altra banda, per aconseguir una major puresa en nuclis al sediment, es pot recórrer a la ultracentrifugació (58.000 g, 2 h) utilitzant sacarosa 2.4 M en els mateixos tampons descrits (Mezquita i Teng, 1977). S'aconsegueix així augmentar molt la viscositat del medi de manera que, en principi, només els nuclis arribaran a sedimentar. No obstant, en el nostre cas, els resultats obtinguts amb la utilització d'aquest mètode no compensaven el major esforç requerit, fet pel qual es va continuar utilitzant el mètode descrit primerament.

### 2.3. Extracció de les proteïnes nuclears bàsiques

Tant les histones com les protamines són proteïnes de naturalesa molt bàsica, de manera que per la seva extracció s'utilitzen mètodes basats en la seva solubilització en àcids diluïts seguida de centrifugacions a alta velocitat durant un temps suficient. Així com en el pas previ, l'obtenció de nuclis, el que interessava era no passar d'un màxim de velocitat en les centrifugacions per evitar la sedimentació d'altres orgànuls que no fossin els nuclis, en l'extracció de proteïnes interessa el contrari, és a dir, assegurar un mínim de velocitat tal que sedimenti tot allò que no sigui el material proteïc que ens interessa (que es manté en solució al sobrenadant).

#### 2.3.1. Extracció d'histones

Per l'extracció d'histones o bé de la dotació global de proteïnes espermàtiques bàsiques d'una espècie, s'ha utilitzat HCl 0.4 N (Subirana et al., 1973).

El sediment resultant de l'obtenció de nuclis (veure 2.2.) s'homogeneïtza amb 4-5 volums de l'àcid per solubilitzar les proteïnes, i a continuació es centrifuga a 11.000 g durant 10 minuts retenint el sobrenadant. El procés es pot repetir una segona vegada per assegurar-se una completa extracció de les proteïnes. Un esquema del procediment es presenta a la figura II-5(A).

En algunes ocasions l'HCl va ser substituït per H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a la mateixa concentració, que també solubilitza les histones (Hoffmann i Chalkley, 1978).

#### Extracció de la histona H1

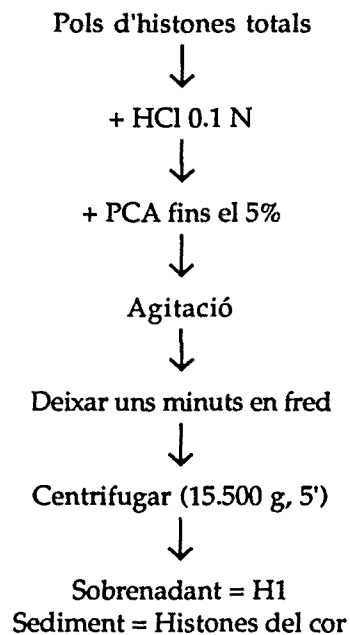
En alguns casos va interessar obtenir la histona H1 separatament de la resta d'histones; en aquests casos es va utilitzar la propietat de l'H1 de ser soluble en àcid perclòric (PCA) al 5% (Goodwin et al., 1978).

El procés a seguir pot ser anàleg al de l'apartat anterior (rentar amb uns 3 volums de l'àcid i després centrifugar), però vam comprovar que la separació és molt més efectiva si es parteix de les histones totals obtingudes a partir de l'extracte amb HCl 0.4 N, un cop ja assecades, seguint el protocol detallat a la figura II-3.

---

Figura II-3. Separació de l'H1 de la resta d'histones a partir d'un extracte d'histones totals en pols.

---



Per facilitar l'acció del PCA, la pols protèica es dissol prèviament; en el nostre cas, utilitzàvem amb aquesta finalitat una petita quantitat d'HCl 0.1 N (de l'ordre del mililitre). A continuació, s'afegeix PCA fins el 5%. Seguidament s'agita, es deixa uns minuts en fred i es centrifuga durant uns 5 minuts a alta velocitat. La histona H1 quedarà solubilitzada a la fracció del sobrenadant, mentre que les histones del cor quedaran recollides en el sediment.

---



### 2.3.2. Extracció de protamines

#### 2.3.2.1. Solubilització en àcids

El sistema que més freqüentment hem utilitzat és la solubilització de les protamines en HCl 0.4 N prèvia extracció amb àcid acètic al 35% (l'àcid acètic al 35% extreu les proteïnes de tipus histones però no les protamines) (Subirana et al., 1973). D'aquesta manera eliminem les restes d'histones i altres impureses que puguin haver a la mostra obtenint, en la posterior extracció amb clorhídric, la fracció protamínica molt més pura.

Partint de la fracció de nuclis obtinguda segons el procediment descrit a la figura II-2, s'homogeneïtza exhaustivament aquest sediment amb 4-5 volums d'AA 35%, centrifugant la dispersió obtinguda a 11.000 g durant 10 minuts. El sediment obtingut s'homogeneïtza ara amb 4-5 volums d'HCl 0.4 N i es repeteix la centrifugació, obtenint-se la protamina en el sobrenadant. Aquest últim pas pot repetir-se una segona vegada per assegurar una major extracció de la protamina. A la figura II-5(B) s'esquematitza aquest procés.

#### 2.3.2.2. Insolubilització en solucions contenint SDS

En certes ocasions es va utilitzar el mètode descrit per Chiva i Subirana (1987) per l'extracció de protamines. Aquest mètode va ser ideat per a l'obtenció de protamines testiculars riques en arginina i es basa en la insolubilitat de les proteïnes riques en aquest aminoàcid en solucions que contenen el detergent SDS. Un precedent d'aquest tipus d'aplicació de l'SDS el trobem en els treballs d'O'Brien i Bellvé (1980) que l'utilitzaven per separar l'acrosoma del nucli d'espermatozoides de mamífer.

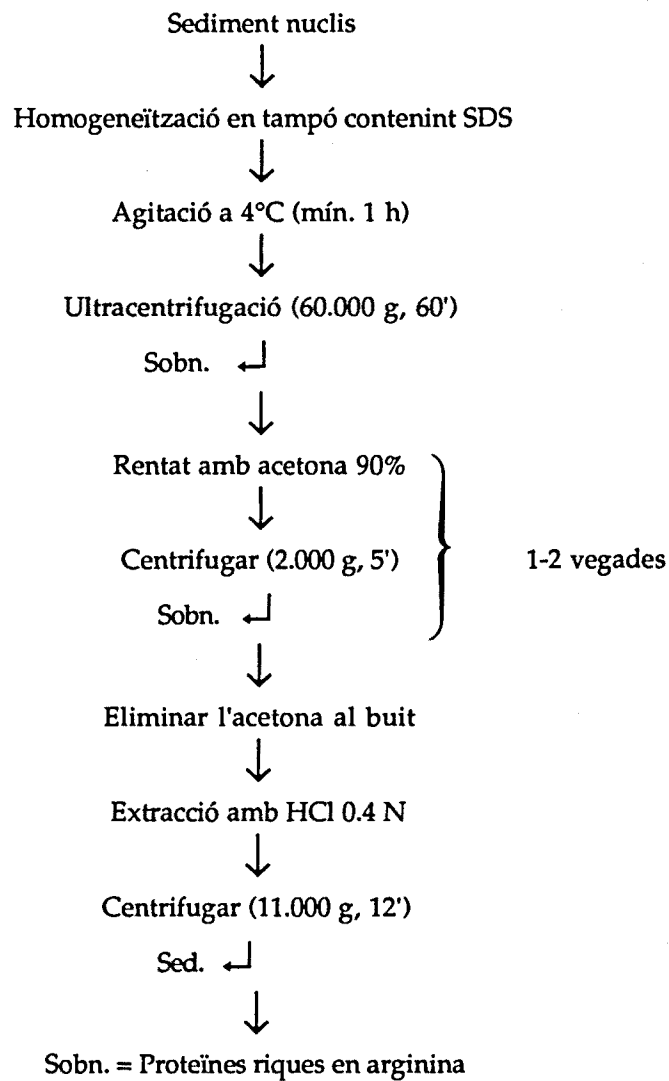
El protocol a seguir es descriu a la figura II-4, sent el també amb SDS emprat el següent:

Tris-HCl 0.0625 M pH 6.8  
SDS 2%  
2-mercaptoetanol 0.7 M  
EDTA 5 mM

---

Figura II-4. Mètode d'obtenció de proteïnes riques en arginina per insolubilització en solucions contenint SDS.

---



La fracció nuclear obtinguda segons el procediment descrit a la figura II-2 s'homogeneïtza en uns 15 volums del tampó contenint SDS i es deixa agitant a 4°C durant almenys 1 hora. Passat aquest temps, el tampó contindrà en solució totes les proteïnes excepte aquelles molt riques en arginina, que es mantenen unides al DNA en forma insoluble. La solució resultant és altament viscosa, fet pel qual es precisa de la ultracentrífuga (60.000 g, 1 h) per poder separar la fracció solubilitzada de la insolubilitzada.

Aquesta última, recollida en el sediment, es renta amb acetona al 90% per eliminar les restes de SDS (Weber i Osborn, 1969) i es procedeix a una breu centrifugació passant seguidament a assecar al buit les restes d'acetona que impregnen el sediment. Ara ja es pot procedir, com sempre, a l'extracció de les proteïnes per solubilització amb HCl 0.4 N.

Com es descriu a Chiva i Subirana (1987), amb aquest sistema el nivell de contaminació per histones és molt baix, i la recuperació de les formes fosforilades de la protamina és molt superior a l'obtinguda pel mètode de la sonicació. A més, la reproductibilitat és molt bona.

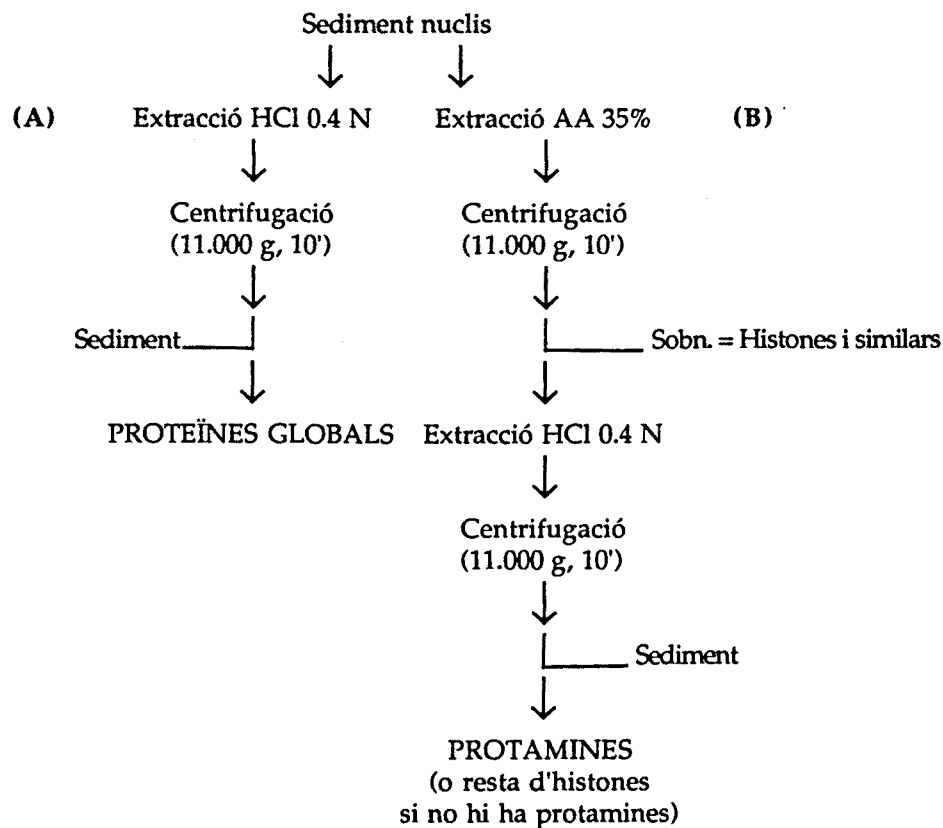
### 2.3.3. Extracció de proteïnes espermàtiques bàsiques de naturalesa desconeguda

Fins ara hem tractat els diferents sistemes emprats específicament per l'extracció d'histones o bé de protamines. No obstant, el cas més freqüent és el d'enfrontar-se davant d'una espècie de la que, *a priori*, no es coneix quin tipus de proteïnes espermàtiques bàsiques (PEB) presentarà compactant el seu DNA.

L'estratègia adoptada en aquestes situacions és la que es resumeix a la figura II-5, és a dir, es fracciona el conjunt de nuclis espermàtics obtinguts en dues alíquotes; sobre una d'elles es realitza una extracció de les proteïnes globals amb HCl 0.4 N, segons es va veure a l'apartat 2.3.1., mentre que sobre l'altra es realitzen extraccions successives amb AA 35% i HCl 0.4 N (veure 2.3.2.1.) per si hi hagués protamines al nucli de l'espècie en qüestió.

Així doncs, l'extracció global amb HCl ens servirà per veure el conjunt de proteïnes espermàtiques bàsiques que una certa espècie presenta al nucli del seu espermatozoide, així com per determinar les proporcions relatives en què es presenta cada una de les diferents proteïnes. D'altra banda, l'extracció amb AA i HCl després d'acètic ens proporcionen informació complementària que ens ajudarà a identificar les diferents proteïnes com histones o protamines (ja que les protamines seran extretes amb l'HCl però no amb l'AA).

Figura II-5. Extracció de PEB de naturalesa desconeguda.



En alguns casos es van realitzar extraccions seqüencials amb PCA 5%, AA35% i HCl 0.4 N (segons modificació del mètode de Subirana et al., 1973). L'extracte amb PCA 5% extreurà proteïnes de tipus H1 o molt riques en Lys (Goodwin et al., 1978); l'extracte amb AA35% post PCA contindrà les histones del cor del nucleosoma (moderadament riques en Lys i Arg); i, finalment, l'extracte amb HCl post AA contindrà aquelles PEB riques en Arg.

## 2.4. Precipitació de proteïnes

Els passos anteriors condueixen a l'obtenció de les proteïnes desitjades, però aquestes es troben en un medi líquid, de manera que s'ha d'utilitzar algun agent que les faci precipitar i després recuperar-les per centrifugació. Al llarg d'aquest treball s'han utilitzat dos sistemes de precipitació diferents que es presenten a continuació.

### 2.4.1. Precipitació amb acetona

Els diferents sobrenadants àcids contenidors de la proteïna es poden tractar amb acetona per fer precipitar aquella. El procediment a seguir és el següent: S'afegeixen al sobrenadant 6 volums d'acetona i es deixa a  $-20^{\circ}\text{C}$  durant tota la nit. Aquesta reacció necessita un medi el suficientment àcid, de manera que, en el cas del sobrenadant provinent de l'extracció amb acètic, cal afegir HCl fins a una concentració de 0.25 N perquè la precipitació es doni correctament.

L'endemà es centrifuga a 11.000 g durant 10 minuts descartant-se el sobrenadant. El sediment es renta amb una barreja d'acetona i àcid clorhídric (6 volums d'acetona i 1 volum d'HCl 0.1 N) que ens assegura una màxima precipitació de proteïnes amb una mínima precipitació de sals.

La barreja obtinguda es centrifuga igual que abans i sobre el sediment es fa un últim rentat amb acetona pura, centrifuguem a les mateixes condicions i passem a assecar el sediment. Si no féssim aquest últim rentat, degut a què

l'acetona és molt més volàtil que l'HCl, aquest podria anar-se concentrant molt, arribant inclús a perjudicar a la proteïna. Al rentar amb acetona pura, en canvi, eliminem les restes d'HCl i aquest perill desapareix.

#### 2.4.2. Precipitació amb àcid tricloracètic (TCA)

El TCA actua precipitant les PEB de manera diferencial segons la seva concentració, així al 5% precipiten bàsicament les histones nucleosòmiques mantenint-se solubles les de tipus H1, mentre que a un 20-25% precipiten totes les PEB (Platz et al., 1977). Per aquesta raó, al sobrenadant procedent de l'extracció àcida se li afegia en ocasions, TCA fins al 20%. Després d'una breu agitació i de mantenir-la en fred uns 5 minuts, la solució es centrifuga (11.500 g, 15'). El sediment, que conté les proteïnes precipitades, es renta de la mateixa manera que es descriu a l'apartat anterior. No obstant, és convenient en aquest cas el dur a terme els rentats per duplicat, almenys el d'acetona, ja que el TCA costa més de rentar.

Hi ha una sèrie d'avantatges en l'ús del TCA sobre l'acetona, com són l'estalvi de temps, el manipular volums menors i que no precipita les sals, no obstant, té l'inconvenient que les proteïnes s'enganxen molt a les parets dels recipients.

#### 2.5. Assecat de proteïnes

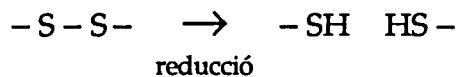
Per eliminar l'acetona que impregnava el sediment proteïc obtingut, aquest era assecat mitjançant un dessecador connectat a una trompa de buit durant uns 10-15 minuts.

Hi ha altres sistemes per l'assecat de proteïnes que van ser utilitzats en altres ocasions. Un d'ells és la utilització del "speed-vac", és a dir, un sistema d'assecatge per buit que incorpora la força centrífuga per assegurar una millor retenció del material a assecar. Aquest sistema va ser utilitzat, bàsicament, per assecar les fraccions recollides per HPLC (v. 2.7.1.2.).

Un altre sistema, utilitzat a vegades per assecar les fraccions obtingudes de columnes de bescanvi iònic, és la liofilització, és a dir la congelació de la fase aquosa per després passar aquesta, en condicions de baixa pressió directament a gas (sublimació) a l'augmentar la temperatura.

## 2.6. Reducció dels ponts disulfur formats entre cisteïnes

Durant l'espermogènesi d'algunes espècies, s'ha observat l'aparició de PEB que contenen cisteïna. Entre els vertebrats, aquest seria el cas dels condrictis (Bols i Kasinsky, 1976; Gusse et al., 1983) i dels mamífers (Loir i Lanneau, 1978; Balhorn et al., 1984). Durant la maduració de l'espermatozoide, els grups -SH de les cisteïnes poden oxidar-se formant ponts disulfur, intra i intermoleculars. Aquests ponts, que estableixen el complex nucleoprotamina, poden dificultar l'extracció d'aquestes proteïnes o també originar, per una mateixa proteïna, l'aparició de diferents formes a les electroforesis o durant els aïllaments (dímers, trímers...). Per aquesta raó, hem utilitzat en determinades ocasions mètodes reductors per trencar aquests ponts.



### 2.6.1. Reducció sense modificació química

El mètode seguit (Kuehl, 1979) es basa en la utilització d'una solució reductora en condicions desnaturalitzants per facilitar la reducció. L'agent reductor emprat és el 2-mercaptoetanol i les condicions desnaturalitzants vénen donades per l'alta concentració d'urea.

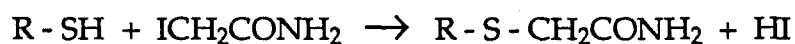
El protocol a seguir és el següent: Per 25 µg de proteïna s'afegeixen 7.5 µl d'aigua, 15 µl d'urea 10 M, 1 µl de Tris-HCl 0.5 M pH 7.6 i 2 µl de 2-mercaptoetanol. El conjunt s'incuba durant 3.5 hores a temperatura ambient i a les fosques.

### 2.6.2. Reducció i modificació química

Per evitar que els ponts disulfur que es trenquen per reducció es tornin a formar, es procedeix sovint a l'alquilació, és a dir, a afegir un altre grup químic que s'hi uneixi de forma estable. D'altra banda, l'alquilació dels grups tiols de les cisteïnes permet la identificació d'aquest aminoàcid, en les anàlisis composicionals, com el seu derivat alquilat.

#### 2.6.2.1. Reducció i alquilació amb iodoacetamida

D'entre els agents alquilants, potser els més usats són l'àcid iodoacètic i la iodoacetamida. Nosaltres vam seguir dos mètodes basats ambdós en l'ús de la iodoacetamida com a agent alquilant. La reacció que es dona és la següent:



La formació del derivat de la proteïna es dona mitjançant una unió covalent i és força estable.

#### Mètode 1:

Es tracta d'una adaptació del mètode de Gusse et al. (1983) que utilitza la següent solució reductora:

Tris-HCl 50 mM pH 8.8  
EDTA 2 mM  
DTT 10 mM (agent reductor)

El sediment de nuclis obtingut segons s'ha explicat anteriorment (v. 2.2.), es dispersa en 5-10 volums de la solució reductora. El conjunt es porta a agitació suau durant 1 hora a 37°C i, a ser possible, en atmosfera de nitrogen. Passat aquest temps es procedeix a alquilar afegint iodoacetamida fins a 12.5 mM, es comprova el pH (reajustant-lo amb cristalls de Tris si cal) i es torna a posar a agitar en les mateixes condicions.



Aquesta solució pot centrifugar-se i procedir a l'extracció de les proteïnes associades als nuclis sedimentats tal i com s'ha explicat a l'apartat 2.3.

**Mètode 2 (Gusse et al., 1983):**

Aquest mètode és molt similar a l'anterior ja que utilitza el mateix agent reductor (DTT) i alquilant (iodoacetamida); no obstant, el procés és més dràstic ja que no sols augmenta la concentració de l'agent reductor i alquilant sinó que, a més, introdueix condicions desnaturalitzants per les proteïnes.

**Solució reductora:** DTT 20 mM  
Urea 8 M  
NaCl 0.5 M

S'afegeix als nuclis o proteïnes, de 5 a 10 volums d'aquesta solució i s'incuba en les mateixes condicions descrites al mètode 1. A continuació s'afegeix la iodoacetamida fins a una concentració de 50 mM i es torna a incubar igual que abans.

S'ha de tenir en compte una diferència important respecte al mètode anterior que és que, així com abans les proteïnes quedaven al sediment, en aquest cas, degut a l'acció del NaCl juntament amb la urea, les proteïnes es solubilitzen passant al sobrenadant.

**2.6.2.2. Reducció i alquilació amb 4-vinilpiridina**

En aquest cas, la proteïna reduïda es fa reaccionar amb 4-vinilpiridina per donar [2-(4'-piridil)etil]cisteïna. La piridiletíl-cisteïna és estable durant les fases de purificació, anàlisi i seqüenciació, i les seves propietats poden ajudar en la purificació per HPLC en fase reversa sota condicions àcídiques. A més, el derivat feniltiohidantoïna (v. 3.8.2.3.) de la piridiletíl-cisteïna s'identifica ràpidament (Hermodson et al, 1972), mentre que el de la carboximetil-cisteïna no ho és tan ràpidament. D'altra banda, la piridiletíl-cisteïna té una alta

absorbància a 254 nm, fet que pot ser avantatjós durant la purificació de pèptids.

**Protocol (Ausió, 1992):**

1. Sobre 20 µg de proteïna s'afegeixen:

30 µl urea 10 M  
5 µl Tris-HCl 0.5 M (pH 8.0)  
1 µl EDTA 50 mM (pH 8.0)  
1 µl 2-mercaptoetanol  
7 µl H<sub>2</sub>O

2. S'incuba durant 2-3 h a temperatura ambient i a les fosques.

3. Alquilació: Afegir 8-9 µl de 4-vinilpiridina.

4. Incubar 2 h a temperatura ambient.

5. Dessalar immediatament a través d'una columna de fase reversa de característiques adequades (v. 2.7.1.2.).

## 2.7. Purificació de proteïnes

### 2.7.1. Mètodes cromatogràfics

#### 2.7.1.1. Cromatografia de bescanvi iònic

Aquest tipus de cromatografia es fonamenta en l'atracció entre partícules de càrregues oposades. Les proteïnes presenten grups ionitzables, i el fet que puguin presentar una càrrega neta positiva o negativa pot utilitzar-se per la separació de barreges d'aquests components. La càrrega neta exhibida dependrà del pH de la dissolució.

Tant histones com protamines són proteïnes molt bàsiques, per tant, es van utilitzar matrius de bescanvi catiònic. En la majoria dels casos aquesta matriu va ser carboximetil cel·lulosa CM-52 (Whatman), encara que en determinades ocasions es va utilitzar CM-Sephadex C-25 (Pharmacia).

En general, es van emprar columnes de  $2.5 \times 50$  cm i fluxs de 40 ml/h, col·lectant fraccions de 6 ml. Les mostres es van eluir amb gradients de NaCl en solucions amb acetat sòdic 50 mM i pH 6.00 (amb acètic). En principi, les proteïnes espermàtiques bàsiques apareixen sempre a valors inferiors al 2 M de NaCl.

#### Protocol:

1. S'empaqueta la columna previ equilibrat de la matriu, primer amb acetat sòdic 0.2 M pH 6.00 i després 2 o 3 vegades amb el primer tampó d'elució de mostres que es tingui previst utilitzar.

2. Es deixa rentant la columna i tot el circuit amb aquesta solució durant tota la nit.

3. Es carrega la mostra dissolta en el mateix tampó.

4. Es fa un primer rentat amb aquest tampó i a continuació s'aplica el gradient de NaCl.

5. Les proteïnes es detecten espectroscòpicament llegint a 220-225 nm, longitud d'ona on l'enllaç peptídic dóna una bona absorció amb un mínim d'interferències.

6. El pendent del gradient s'obté per lectura dels índexs de refracció de diferents alíquotes corresponents a fraccions on no s'hagi eluït proteïna.

7. Les proteïnes eluïdes es poden recuperar per diàlisi extensiva enfront d'HCl 5 mM i posterior liofilització o bé es poden precipitar (directament o prèvia diàlisi amb HCl 5 mM) per algun dels sistemes vistos a l'apartat 2.4.

### 2.7.1.2. Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) en fase reversa

L'HPLC en fase reversa és una de les tècniques més populars d'entre totes les tècniques cromatogràfiques emprades. El terme "fase reversa" va ser acunyat originalment per Howard i Martin (1950) i expressa el fet d'utilitzar, a diferència de la metodologia convencional, una fase mòbil més polar que la fase estacionària. Dit d'una altra manera, les cromatografies en fases "normals" es desenvolupen amb fases estacionàries que en termes físicoquímics són relativament polars, en contrast amb els suports de fase reversa que són essencialment no polars.

La fase estacionària es compon usualment de partícules esfèriques de sílice a les que s'hi uneixen covalentment grups silanoalquils originant, d'aquesta manera, una superfície hidrofòbica. Els grups alquil poden ser de diferent nombre de carbonis, sent els més comuns els de tipus C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub> i C<sub>18</sub>.

Els tampons d'elució utilitzats en HPLC de fase reversa de pèptids i proteïnes consisteixen en un agent contra-ió i un gradient creixent d'un solvent orgànic per provocar la desorció de la mostra, i s'apliquen a alta pressió. L'agent contra-ió més freqüentment utilitzat és el trifluoroacètic (TFA) al 0.05-0.2%, mentre que l'acetonitril (ACN) és la fase orgànica més comú, ja que dona pics més ben definits i millor resolució que cap altre solvent orgànic. L'etanol i l'isopropanol poden ser utilitzats sols o en combinació amb ACN per eluir proteïnes més hidrofòbiques.

La utilització d'un contra-ió suposa un medi de neutralització, permetent la separació de molècules altament polars o compostos iònics. Els polipèptids s'adsorbeixen a la superfície hidrofòbica i es desadsorbeixen quan s'arriba a una concentració específica crítica del solvent orgànic. D'aquesta manera, les molècules més hidrofòbiques requeriran altes concentracions de solvent orgànic per eluir-se, mentre que les més hidrofíliques s'eluiran més depressa. D'altra banda, la longitud de la cadena de carbonis també influeix en el temps de retenció. En principi, quan la longitud de les cadenes alquil lligades a la matriu augmenta, augmenta també la retenció dels compostos. En general, es recomanen columnes de tipus C<sub>4</sub> per la separació de proteïnes i pèptids de més de 3-5.000 Daltons i per polipèptids molt hidrofòbics de

qualsevol mida, mentre que les C<sub>18</sub> es recomanen per pesos moleculars menors de 3-5.000.

Els sistemes i columnes més utilitzats al llarg del present treball van ser els següents:

a) Columna tipus Delta-Pak C<sub>4</sub>, 300Å, 3.9x150 mm, acoplada a un sistema de bombes LKB 1250 amb detector d'absorbància UV i visible de renglera de diodes ABI 1000 S. Aquest sistema va ser emprat als Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

b) Columna LKB C<sub>18</sub> (Spherisorb ODS-2, 5 µm, 4x250 mm) acoplat a un sistema detector i bombes de la mateixa marca. El sistema va ser utilitzat al Servei de Seqüenciació de Proteïnes de la Universitat de Barcelona.

c) Columnes Vydac C<sub>4</sub> i C<sub>18</sub> (5 µm, 300Å, 4.6x250 mm) acoplades a un sistema de bombes Beckman (112 Solvent Delivery Module) i a un detector de longitud d'ona variable (164 Variable Wavelength Detector). Aquest sistema va ser utilitzat al Department of Biochemistry and Microbiology, University of Victoria (Canada).

d) Columna Beckman C<sub>18</sub> (Ultrasphere, 5µm, 80Å, 4.6x250 mm) acoplada al "System Gold" de Beckman. Igualment, es va accedir a aquest sistema al Department of Biochemistry and Microbiology, University of Victoria (Canada).

En tots els casos, el flux era d'1ml/min i les proteïnes recollides en les diferents fraccions van ser secades al buit amb un speed-vac.

### 2.7.2. Electroelució

Un altre sistema de purificació de proteïnes és l'electroelució de mostres a partir de gels electroforètics. El mètode consisteix en l'aplicació d'un camp elèctric que arrossegi la proteïna fora del gel cap a una membrana semipermeable de característiques adequades perquè hi quedi retinguda. concretament, s'utilitza una membrana de diàlisi que reté molècules fins a

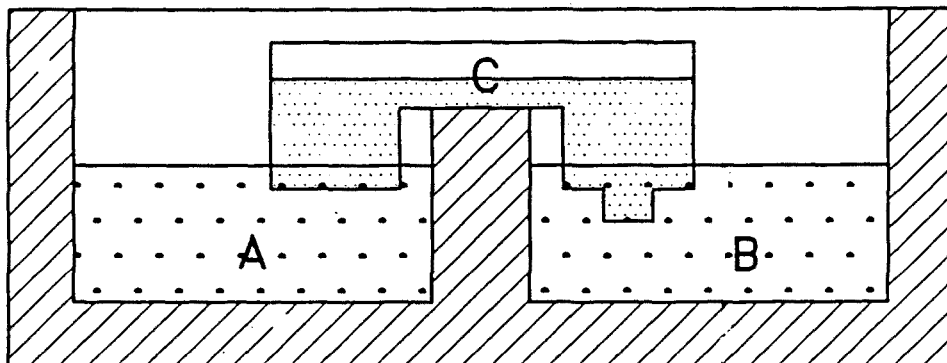
un límit de pes molecular de 3.500 Daltons. El tampó d'electroelució pot variar en funció del tipus de gel on es trobi la proteïna. En el nostre cas es van utilitzar gels de poliacrilamida contenint SDS i, com a tampó, Tris 0.05 M pH 8.3 / Glicina 0.38 M / SDS 0.1% (v. apartat 3.1.3.).

L'aparell electroelutor utilitzat va ser l'Isco Little Blue Tank. Consta d'una cubeta separada en dos compartiments per un septe central (figura II-6, A i B). Aquests compartiments, que és on es troben els electrodos, s'omplen amb el tampó d'electroelució sense arribar a superar el nivell del septe central.

---

Figura II-6. Secció transversal de l'electroelutor Isco Little Blue Tank.

---



Sobre el septe central es situen les cubetes de mostra (figura II-6, C), que posseeixen també dos petits compartiments o pous al fons dels quals es troba la membrana de diàlisi. Aquests pous es comuniquen per dalt entre sí amb tampó d'electroelució i per sota comuniquen cada un d'ells amb el tampó d'un dels compartiments de la cubeta principal. El tampó de la cubeta de mostres pot ser el mateix que el de la principal però s'aconsella que, per

---

augmentar la força del camp elèctric, sigui de concentració menor (però mai inferior a 4 mM). Nosaltres vam utilitzar el tampó ja descrit diluït a la meitat.

En un dels pous es posa la mostra a separar, que es veurà arrossegada pel camp elèctric fins a l'altra membrana, on quedarà retinguda. També es pot posar la mostra al mateix pou on ha de quedar retinguda per incrementar l'eficàcia del procés. En aquest cas, la mostra es situa sobre una reixeta que impedeix el contacte directe entre el gel i la membrana.

Es recomana no utilitzar mostres tenyides ja que les proteïnes queden fixades al gel, resultant en electroelucions molt llargues o amb recuperacions molt pobres.

#### **Protocol:**

1. Deixar les cubetes de mostres en aigua destil·lada durant uns 10-30 minuts i a continuació deixar-les immerses en el tampó d'electroelució durant 10-30 minuts més perquè s'equilibrin les membranes.

2. Muntar el sistema i omplir les cubetes amb els tampons d'electroelució. Cal evitar la formació de bombolles d'aire sobre les membranes.

3. Identificació de la proteïna: Es pot fer amb una tinció molt ràpida del gel (però llavors la proteïna costa més d'electroeluir), o bé corrent en un dels pous exteriors un duplicat de la mostra, retallant-lo i tenyint-lo ràpidament mentre la resta del gel es guarda embolicat i amb refrigeració per evitar la difusió de les bandes proteïques. Un cop visualitzada la banda en el control es pot deduir en quina zona del gel principal es troba la proteïna i retallar-la.

4. Trossejar la banda retallada en petits cubs de màxim 5 mm d'aresta i col·locar-los a la cubeta de mostres.

5. Posar en marxa el camp elèctric. Teòricament és suficient amb unes 4-8 hores a una corrent constant de 4-5 mA per cubeta de mostres per recuperar la majoria de les proteïnes a partir de gels de poliacrilamida.

6. Un cop finalitzada l'electroelució, retirar els trossos de gel i recollir el líquid del pou on s'ha retingut la mostra. Aquestes proteïnes podran ser recuperades per diàlisi enfront d'HCl 5 mM i posterior liofilització o bé per precipitació (v. 2.4.). Si en l'electroelució s'ha utilitzat algun tampó amb moltes sals, és millor dialitzar abans de precipitar.

7. Rentar les membranes amb NaCl 3-5% seguit d'esbandit a fons amb aigua destil·lada. Guardar les cubetes de mostres amb una solució bacteriostàtica, com ara azida sòdica al 0.1%, fins a la pròxima utilització.

## 2.8. Concentració de proteïnes en dissolució

Es va utilitzar amb aquest fi el sistema microconcentrador Centricon-3 (Amicon, Grace). S'aconsegueix així la concentració de petits volums de solucions macromoleculares per centrifugació a través d'una membrana que reté molècules d'un pes molecular mínim de 3.000 Daltons.

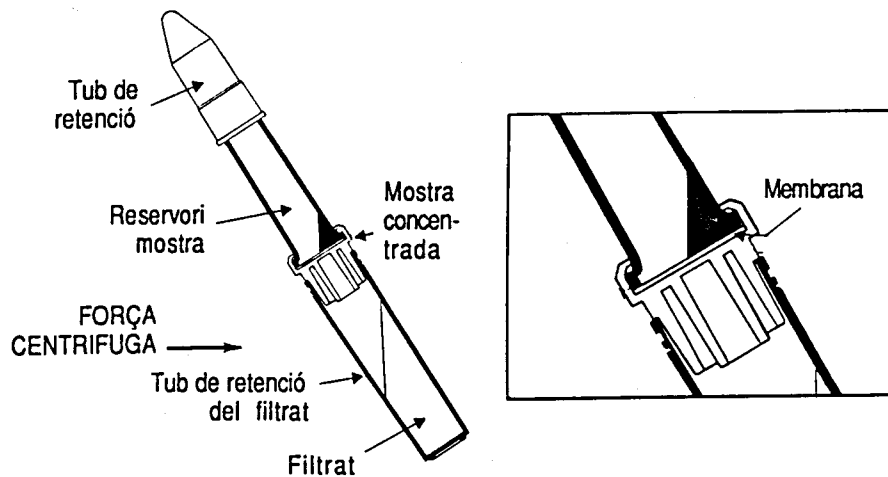
El Centricon-3 consta d'un tub de retenció, un tub on es carrega la mostra, la membrana i un tub on es reté el filtrat (figura II-7). El procés de concentració consta de dues fases, una de filtrat i una de recuperació. Un cop carregada la mostra al tub corresponent, es centrifuga; d'aquesta manera els solvents i els soluts de baix pes molecular travessen la membrana passant cap al tub de filtrat, mentre que les molècules majors que els porus de la membrana queden retingudes. A mesura que el volum de la mostra va disminuint, la concentració va augmentant. El màxim volum al que es pot arribar a partir de la mostra inicial és d'uns 25-40 µl, fet que assegura que inclús centrifugacions extensives no condueixin a una concentració fins a completa sequedat.

En la fase de recuperació, la mostra es transfereix al tub de retenció per inversió del conjunt i segona centrifugació. Així es minimitzen les pèrdues per adhesió a la membrana i a les parets del reservori.



Aquest microconcentrador està dissenyat per l'ús en centrífugues amb rotor d'angle fix, de manera que el concentrat es reté en un costat de la membrana, sense tancar-la totalment i sense que la velocitat de filtració es vegi reduïda significativament.

Figura II-7. Microconcentrador Centricon-3.



**Protocol:**

1. Insertar el dipòsit de mostres en el tub de filtrat com es mostra a la figura II-7.
2. Carregar la mostra al dipòsit corresponent (2 ml màxim) amb compte de no tocar la membrana amb la punta de la pipeta.
3. Utilitzar si és possible un rotor cobert per minimitzar l'evaporació de la mostra; també és possible tancar el dipòsit de mostres encaixant-hi el tub de

retenció. Centrifugar a una velocitat màxima de 4.000-7.500 g (amb tub de retenció encaixat) o bé de 4.000-6.500 g (sense tub de retenció) durant el temps necessari per assolir el grau de concentració desitjat (unes 3 hores a 7.500 g per concentrar 2 ml).

4. Treure el concentrador i separar el tub de filtrat del de mostres. El filtrat pot ser descartat o retingut si convé.

5. Invertir la posició del conjunt prèviament havent col·locat el tub de retenció si no s'ha fet abans.

6. Centrifugar a 300-1.000 g durant 2 minuts per transferir el concentrat al tub de retenció.

7. Separar les dues peces, llençar el concentrador i guardar el tub de retenció amb la mostra concentrada.

### **3. Mètodes analítics**

#### **3.1. Mètodes electroforètics**

L'electroforesi és una de les tècniques més utilitzades actualment en la biologia molecular. Moltes molècules biològiques importants, com són els aminoàcids, els pèptids, les proteïnes i els àcids nuclèics, posseeixen grups ionitzables de manera que pot fer-se que existeixin en dissolució en forma d'espècies amb càrrega elèctrica. A més, les molècules de càrrega elèctrica similar posseiran diferents relacions càrrega/massa degut a diferències inherents de pes molecular. En conjunt, aquestes diferències constitueixen una base suficient per una migració diferencial quan els ions en dissolució es sotmeten a un camp elèctric. Aquesta propietat es pot aprofitar, utilitzant un suport adequat, per resoldre barreges de molècules, determinar el punt isoelèctric d'una proteïna o bé el seu pes molecular, entre d'altres aplicacions.

Totes les modalitats d'electroforesi que s'exposen a continuació s'han realitzat seguint el model d'electroforesi vertical en placa. Els medis de suport emprats sempre han estat gels de poliacrilamida.

##### **3.1.1. Anàlisi de proteïnes bàsiques en gels de poliacrilamida/acètic/urea (GPAU)**

Els gels de poliacrilamida consisteixen en una malla plàstica formada per llargues fibres d'acrilamida entrecruades per ponts de bisacrilamida (N,N'-metilen-bisacrilamida). La polimerització dels monòmers d'acrilamida en dissolució és catalitzada per la presència de radicals lliures al medi. Això es pot aconseguir afegint petites quantitats de persulfat amònic (PSA) o bé amb riboflavina (que genera radicals lliures per fotodescomposició). Tant si s'utilitza PSA com riboflavina, cal també afegir N,N,N',N'-tetrametilen-diamina (TEMED), que catalitzarà la formació dels radicals lliures.

La mida del porus del gel, i per tant la seva habilitat per separar diferents molècules proteïques ve determinat tant per la concentració dels monòmers com per la relació acrilamida/bisacrilamida. Més altes concentracions d'acrilamida condueixen a porus de menor dimensió, però els efectes de la concentració de l'entrecruador són més complicats. A una concentració donada d'acrilamida, la mida mínima de porus s'obté amb concentracions de l'agent entrecruador al voltant del 5% de la concentració total del monòmer. A concentracions més altes de bisacrilamida es formen feixos de poli-acrilamida conduents cap a porus majors (Goldenberg, 1989). Sovint s'utilitzen concentracions elevades de bisacrilamida en els gels empiladors (v. 3.1.3.) per generar porus grans que no actuïn com un tamís sobre les proteïnes.

L'àcid acètic utilitzat en aquests gels suposa un medi àcid ideal perquè les proteïnes bàsiques emprades es trobin en estat ionitzat. La presència d'urea al gel, en funció de la concentració utilitzada, intervé en conferir una mobilitat específica a cada proteïna (Panyim i Chalkley, 1969; Hardison i Chalkley, 1978).

#### 3.1.1.1. GPAU segons la metodologia de Panyim i Chalkley

La majoria dels GPAU portats a terme en aquest treball s'han fet seguint, amb alguna petita modificació, les condicions descrites per Panyim i Chalkley (1969). Generalment s'han utilitzat concentracions d'acrilamida del 15% i urea 6.25 M per la separació d'histones i protamines, encara que en algunes ocasions s'ha utilitzat urea 2.5 M per intentar millorar la resolució de les histones (Panyim i Chalkley, 1969; Hardison i Chalkley, 1978). Per la separació de pèptids es poden utilitzar malles de poliacrilamida més denses, augmentant la concentració d'acrilamida fins al 30%. El tampó de migració sempre ha estat acètic al 5%.

Per la preparació dels GPAU s'han utilitzat les solucions i quantitats descrites a la taula II-3. La solució aconseguida es filtra al buit a través d'un filtre Millipore de 0.22  $\mu\text{m}$ ; això ens retindrà les partícules grolleres que

pogués contenir la solució, però, a més, servirà de desgasificació (convenient ja que l'oxigen inhibeix la polimerització). En aquestes condicions, el temps de polimerització del gel és d'uns 30-40 minuts.

Taula II-3. Solucions i quantitats necessàries per la preparació d'un GPAU al 15% d'acrilamida d'1.5 mm de gruix.

<i>Component</i>	<i>Plaques 8x10.5 cm</i>	<i>Plaques 10.5x14 cm</i>	<i>Plaques 20x20 cm</i>	<i>Concentració final</i>
Urea	5.63 g	11.26 g	28.15 g	6.25 M
Solució A: (acrilamida 30% bisacrilamida 0.2%)	7.5 ml	15 ml	37.5 ml	15% 0.1%
Solució B: (Àcid acètic 43.2% TEMED 4%)	1.87 ml	3.75 ml	9.4 ml	5.4% 0.5%
Aigua fins a	15 ml	30 ml	75 ml	--
PSA	30 mg	60 mg	150 mg	0.2%

Abans de carregar la mostra es duu a terme una pre-electroforesi fins a voltatge constant per eliminar les espècies carregades diferents dels anions acetat i els protons que hem introduït com a requeriment per la polimerització i que afecten a la reproductibilitat de les electroforesis. La duració d'aquesta operació varia segons sigui la mida de les plaques utilitzades i la intensitat aplicada però, en general, per plaques de 20x20 cm, es deixava tota la nit a una intensitat fixa d'uns 8 mA.

Una alternativa a aquest sistema que permet eliminar la necessitat de pre-electroforesi alhora que escurça dràsticament el temps de polimerització, és la substitució del TEMED i el PSA per tiourea i aigua oxigenada (Hurley, 1977). La preparació del gel seria anàloga a la vista però afegint tiourea en pols

fins a 0.0875% i, al final de tot, un 0.5% d'una solució mare d'aigua oxigenada al 30%.

Les mostres es dissolen a una concentració d'1 mg/ml en algun dels següents tampons de mostres (preferiblement el primer):

**Tampons de mostres:** 2-mercaptoetanol 20 mM  
Urea 8 M  
Àcid acètic 5%  
Verd de metil 1%

Urea 4 M  
Ácid acètic 5%  
Pironina 1%

Per gels que seran tenyits amb Coomassie blue (v. 3.1.4.), la mostra hauria de contenir, idealment, 1-2 µg de cada espècie proteïca per generar bandes ben definides en pous d'uns 0.5 cm d'amplada (Goldenberg, 1989).

Les electroforesis es desenvolupaven a uns 150 V fins que el colorant arribava al final de la placa (unes 6 hores en plaques de 20x20 cm).

### *3.1.1.2. GPAU segons el sistema discontinu de Reisfeld*

Aquest tipus de gel només es va emprar en l'experiment de determinació electroforètica del número de cisteïnes d'una proteïna (v. 3.6.) ja que en aquest cas es requeria un pH no tan baix com el que s'utilitza en els gels de Panyim i Chalkley (pH 3.2).

El sistema utilitzat va ser el descrit per Reisfeld et al. (1962) però afegint urea 8 M ja que ens interessava que l'electroforesi es desenvolupés en condicions desnaturalitzants. El tampó de recorregut (pH 4.5) consisteix en la següent solució:

**Tampó de recorregut:**  $\beta$ -alanina 3.12%  
Àcid acètic 0.8%

Com s'explica amb més detall a l'apartat 3.1.3., els gels discontinus consten d'un gel empilador i un gel separador. Les solucions mare per preparar aquests gels són les següents:

Solució A: KOH 0.48 M  
Àcid acètic glacial 17.2%  
TEMED 4%

Solució B: KOH 0.48 M  
Àcid acètic glacial 2.87%  
TEMED 0.46%

Solució C: Acrilamida 60%  
Bisacrilamida 0.4%

Solució D: Acrilamida 10%  
Bisacrilamida 2.5%

Solució E: Riboflavina 0.004%

#### **Gel separador:**

Per la preparació de 64 ml de gel separador (pH 4.3) calen:

- 30.75 g urea
- 16 ml solució C
- 8 ml solució A
- Aigua fins a 64 ml

Un cop ben dissolt i enrasat, se li afegeix persulfat amònic:

- 0.0896 g PSA

La gelificació s'assoleix en uns 10 minuts i el gel resultant conté un 15% d'acrilamida i urea 8 M.

#### **Gel empilador:**

Per la preparació de 20 ml de gel empilador (pH 6.8) calen:

- 9.61 g urea
- 5 ml solució D
- 2.5 ml solució B
- Aigua fins a 17.5 ml
- 2.5 ml solució E

El gel resultant conté un 2.5% d'acrilamida i urea 8 M.

#### **3.1.2. Anàlisi de proteïnes bàsiques en gels de poliacrilamida/tritó/urea (GPTU)**

Els GPAU poden arribar a mostrar els 5 principals tipus d'histones i algunes de les seves formes modificades; no obstant, sovint no és possible resoldre les histones H2A, H2B i H3 completament. L'addició de detergents no iònics als gels pot millorar significativament la resolució de les histones al provocar una reducció diferencial en la mobilitat electroforètica d'aquestes (Zweidler i Cohen, 1972). Aquest efecte és degut a la formació de micelles entre el detergent i les regions hidrofòbiques de les proteïnes i és molt sensible a petites diferències en les propietats hidrofòbiques de les molècules (Franklin i Zweidler, 1975, 1977).

La concentració de detergent pot variar-se en cada cas per optimitzar els resultats, tanmateix, per raons tècniques, en la majoria dels casos és més avantatjós utilitzar la mateixa concentració de detergent (per exemple tritó X-



100 6 mM) i variar la concentració d'urea (inhibidor de la unió amb el detergent) per triar les condicions que donin millor resolució.

L'elevada sensibilitat del mètode enfront de petits canvis en les propietats hidrofòbiques de les proteïnes requereix el prendre precaucions en el tractament de la mostra per evitar modificacions químiques tals com l'oxidació dels residus Met, Trp i Cys. Igualment, els gels, que es polimeritzen utilitzant agents oxidants com catalitzadors, s'han de tractar amb agents reductors després de la pre-electroforesi.

#### GPTU amb tritó X-100 6 mM i urea 6 M

Les solucions mare, així com les quantitats necessàries per la preparació d'aquests gels s'especifiquen a la taula II-4. Les mostres poden ser dissoltes en el primer dels tampons de mostres vistos a l'apartat 3.1.1. o, en el mateix tampó sense l'àcid acètic, a una concentració d'1 mg/ml.

Taula II-4. Preparació d'un GPTU amb tritó X-100 6 mM i urea 6 M segons el sistema descrit per Zweidler (1978). Les quantitats s'expressen com a fraccions del volum final.

<i>Solucions mare</i>	<i>Quantitat</i>
Acrilamida 60% / bisacrilamida 0.4%	0.200
Urea 10 M / Àcid acètic 6.67%	0.600
Tritó X-100 18.75% (p/v)	0.020
TEMED	0.005
Àcid acètic glacial	0.005
Aigua	0.150
PSA (40 mg/ml)	0.020

**Protocol (Zweidler, 1978):**

1. Barrejar tots els ingredients, excepte el PSA, com es descriu a la taula II-4 i desgasificar durant uns minuts.

2. Afegir el PSA, preparat en fresc, i barrejar immediatament sense formació de bombolles.

3. Abocar el gel a les plaques i deixar polimeritzar (1-2 h).

4. Pre-electroforesi amb acètic 5% fins a voltatge constant.

5. Carregar els pous fins a uns 5 mm del fons amb un solució d'acètic al 5% contenint urea i detergent en la mateixa concentració que el gel més cisteamina 2-HCl 0.5 M, i seguir la pre-electroforesi durant 30 minuts més per evitar fenòmens d'oxidació de les mostres al seu pas pel gel.

6. Renovar el tampó de recorregut, carregar les mostres (amb tampó contenint un agent reductor) i desenvolupar l'electroforesi a uns 150 V.

Encara que el mètode utilitzat normalment va ser aquest, en algunes ocasions es va recórrer a variants que utilitzaven la riboflavina en comptes del PSA. La riboflavina genera radicals lliures quan es sotmet a exposició a llum visible o UV. La fotopolimerització sòl deixar menys compostos reactius als gels després de la polimerització (Goldenberg, 1989), fet pel qual es pot optar per prescindir de la pre-electroforesi en algunes ocasions.

En aquest cas, el protocol seguit era el següent:

**Protocol (Bonner et al., 1980):**

Per 12 ml de gel calen:

- 3 ml acrilamida 60% / bisacrilamida 0.4%
- 720 µl àcid acètic glacial
- 60 µl TEMED

- 36 µl NH<sub>4</sub>OH 45 mM
- 4.32 g urea
- 177.6 µl Triton X-100 25%
- 800 µl riboflavina 0.004% (conservar en ampolla fosca a 4°C)
- Aigua fins a 12 ml

Polimeritzar amb exposició a llum UV.

Com a tampó de recorregut s'utilitzava en aquest cas glicina 0.1 M / àcid acètic 1 M.

### 3.1.3. Anàlisi de proteïnes bàsiques en gels bidimensionals amb la segona dimensió en gel discontinu amb SDS

En alguns casos interessa córrer una mateixa mostra en dos tipus diferents de gel per obtenir una major resolució dels components proteïnics. En aquest treball s'ha recorregut a aquesta tècnica en diverses ocasions, utilitzant com a primera dimensió gels d'acrilamida amb tritó o sense, i com a segona dimensió gels discontinus d'acrilamida contenint dodecil sulfat sòdic (SDS), on la mobilitat relativa dels polipèptids està relacionada amb el seu pes molecular (Shapiro et al., 1967; Weber i Osborn, 1969; Dunker i Rueckert, 1969).

L'electroforesi discontinua en presència de SDS (Laemmli, 1970) ofereix una extraordinària definició i és molt poc sensible a variacions de càrrega i estructura de les proteïnes. L'explicació per aquest fenomen va ser donada per Pitt-Rivers i Impiombato (1968) i Reynolds i Tanford (1970a, 1970b) que van trobar que, sota les condicions adequades, tots els polipèptids reduïts s'unien a una mateixa quantitat de SDS (1.4 g SDS/g polipèptid). Aquesta unió provoca la pèrdua de l'estructura secundària de les subunitats proteïques mitjançant la formació d'una micel·la aniónica que embolcalla totalment la proteïna; a més a més, la pròpia càrrega del detergent apantalla les càrregues intrínseques de la proteïna. Així, la càrrega global de la micel·la depèn quasi exclusivament del pes molecular de la pròpia proteïna. En aquesta situació, les proteïnes es

comporten com si tinguessin una forma similar i una relació càrrega/massa idèntica i en conseqüència, en principi, la seva mobilitat està relacionada únicament amb el seu pes molecular. No obstant, s'ha de tenir en compte que els polipèptids no reduïts contenint ponts disulfur intactes, no s'uniran a la quantitat òptima de SDS presentant diferent mobilitat.

L'SDS s'uneix principalment a les regions hidrofòbiques dels polipèptids, mentre que les regions hidrofíliques en capten molt menys. El perquè proteïnes amb diferents hidrofobicitats capten la mateixa quantitat de SDS per gram no és encara comprès (See i Jackowski, 1989). Les protamines, amb la seva forta densitat de càrregues positives, precipiten en presència de solucions contenint SDS, no podent-se utilitzar en aquest tipus de gels (Chiva et al, 1987).

Els gels discontinus (introduïts primerament per Reisfeld et al., 1962; Davis, 1964; i Ornstein, 1964) es basen en la presència de dos components: a) un gel empilador, on la mostra es concentra; i b) un gel separador, on es dona la separació electroforètica segons el pes molecular. L'efecte del gel empilador és doble: d'una banda, al ser més tou que el separador (v. 3.1.1.), fa que les proteïnes "xoquin" contra aquest últim; en segon lloc i més important, es genera un gradient de voltatge entre les dues zones. Al pH del tampó de recorregut (8.3) i al del gel separador (8.8), la glicina (principal ió del tampó de recorregut) té una càrrega neta negativa i corre en el mateix sentit que les proteïnes; però al gel empilador, amb pH 6.8, la glicina té càrrega zero. D'aquesta manera, es crea una gran diferència de potencial local que fa que les proteïnes que es trobin abans d'aquesta interfase es vegin accelerades mentre que les que comencen a passar-la s'enlenteixen, originant-se així bandes molt planes i ben definides.

En aquest treball, per l'elaboració de gels discontinus amb SDS, s'ha seguit el sistema de Laemmli (1970) adaptat per Thomas i Kornberg (1978), amb algunes modificacions. A les taules II-5 i II-6 s'exposen les solucions mare necessàries i les condicions finals dels gels separador i empilador, respectivament. El tampó de recorregut és el següent:

**Tampó de recorregut:** Tris 0.05 M pH 8.3  
 Glicina 0.38 M  
 SDS 0.1%

Taula II-5. Preparació del gel separador (40 ml).

<i>Solució</i>	<i>Components</i>	<i>Quantitat</i>	<i>Concentració final</i>
A	Acrilamida 36% Bisacrilamida 0.18%	20 ml	18% 0.09%
B	Tris 3 M pH 8.8 SDS 0.4%	10 ml	0.75 M 0.1%
--	Aigua bidestil·lada	8.99 ml	--
C	TEMED	0.01 ml	0.025%
D	PSA 1% (en fresc)	1 ml	0.025%

Taula II-6. Preparació del gel empilador (20 ml).

<i>Solució</i>	<i>Components</i>	<i>Quantitat</i>	<i>Concentració final</i>
A'	Acrilamida 10% Bisacrilamida 0.3%	10 ml	5% 0.15%
B'	Tris 0.5 M pH 6.8 SDS 0.4%	5 ml	0.125 M 0.1%
--	Aigua bidestil·lada	2.99 ml	--
C	TEMED	0.01 ml	0.05%
D	PSA 1% (en fresc)	2 ml	0.1%

**Obtenció del gel separador:**

1. Barrejar els volums corresponents de les solucions A i B i d'aigua.
2. Desgasificar.
3. Afegir els volums pertinents de C i D i homogeneïtzar la barreja final breument i amb suavitat per tal de no fer bombolles.
4. Amb l'ajut d'una pipeta, carregar el gel a les plaques.
5. Posar una capa d'uns 0.5 cm d'aigua o d'isobutanol per evitar el contacte amb l'aire (que inhibeix la polimerització) i per obtenir una interfase ben recta.
6. Deixar polimeritzar durant uns 30 minuts.
7. Retirar la capa d'aigua o isobutanol (rentant-la amb aigua).

**Obtenció del gel empilador:**

1. Es procedeix anàlogament als punts 1-4 anteriors, carregant aquest gel sobre el separador, fins a aconseguir una capa d' 1 cm.
2. Obtenir una interfase recta com al punt 5 anterior.
3. Deixar polimeritzar durant aproximadament 15 minuts.

**Protocol (electroforesi bidimensional):**

1. La primera dimensió es desenvolupa en el gel de la nostra elecció (GPAU o GPTU).

2. Un cop finalitzada l'electroforesi, es retalla verticalment la tira del gel corresponent a la zona on ha corregut la mostra. Aquesta tira servirà d'origen per a la segona dimensió.
3. Equilibrar aquesta tira posant-la en immersió amb agitació en la mateixa solució del gel empilador, però sense el TEMED ni el PSA, durant uns 15-30 minuts.
4. Col·locar la tira sobre el gel empilador.
5. Abocar nova solució per fer gel empilador fins cobrir tota la tira, que hi quedarà inclosa.
6. Deixar polimeritzar durant uns 15 minuts.
7. Desenvolupar l'electroforesi a uns 100-150 V.

**Observacions:**

1. Cal tenir en compte que durant l'equilibrat, la tira procedent de la primera dimensió s'inflarà. Així, si es partia d'un gel d'un gruix d'1.5 mm, és recomenable que la segona dimensió es faci en un gel de 3 mm de gruix per assegurar-nos que la tira pugui entrar dins de les plaques.

2. L'equilibrat de la tira de gel origen de la segona dimensió pot també fer-se amb la solució d'O'Farrell (1975), que consisteix en:

**Solució O'Farrell:** Glicerol 10%  
2-mercaptoetanol  
SDS 2.3%  
Tris-HCl 62.5 mM (pH 6.8)

3. Es pot crear un o més pous al costat de la tira provinent de la primera dimensió, on es pot córrer un marcador del front i patrons que ens ajudin en la identificació de les bandes. Aquestes mostres s'hauran de preparar de la següent manera:

a) Dissoldre les mostres a una concentració d'1 mg/ml en el següent tampó de mostres:

**Tampó de mostres:** Tris 0.0625 M pH 6.8  
SDS 2%  
Glicerol 12.5%  
2-mercaptoetanol 5%

b) Afegir el colorant (traces de blau de bromofenol).

c) Bullir les mostres al bany Maria durant 1-4 minuts i, seguidament, refredar-les ràpidament en gel.

d) Carregar la mostra als pous.

### 3.1.4. Detecció de les bandes

La majoria dels compostos biològics no són colorejats i, per tant, és necessari visualitzar-los d'alguna manera per poder determinar les seves posicions en el medi de suport un cop s'ha acabat la separació.

#### 3.1.4.1. Tinció amb Coomassie blue

El mètode més comú per visualitzar les bandes proteïques en un gel és la tinció amb Coomassie blue R-250. Aquest colorant sembla unir-se de forma més o menys similar a la majoria de les proteïnes i, aproximadament, en funció de la seva quantitat. Per obtenir tincions permanents, les proteïnes han de ser fixades al gel per precipitació. El temps de tinció pot ser des de 30 minuts fins a tota la nit, en funció del gruix del gel.

Posteriorment, el gel es destenyeix per difusió per eliminar el color de fons i obtenir un major contrast de les bandes. Això s'aconsegueix per



immersió del gel en una solució destenyidora, que s'anirà renovant les vegades que calgui fins assolir el grau de destinció desitjat.

És convenient que tant la tinció com la destinció es facin amb agitació. Les solucions de tinció i destinció que hem utilitzat han estat:

a) **Solució de tinció:** Coomassie blue R-250 al 0.25% en una solució d'aigua/metanol/acètic en proporcions de 5/5/1.

**Solució destenyidora:** Mateixa solució però sense el colorant.

b) **Solució de tinció:** Coomassie blue R-250 0.2%  
Isopropanol 25%  
Àcid acètic 10%

**Solució destenyidora:** Isopropanol 10%  
Àcid acètic 10%

En aquest treball s'ha utilitzat més freqüentment la primera de les combinacions ja que la segona provocava una major dilatació dels gels.

La solució de tinció pot reutilitzar-se repetides vegades. El mateix pot fer-se amb la solució destenyidora, prèvia decoloració amb carbó actiu.

#### 3.1.4.2. *Tinció amb Amido black amb sensibilitat incrementada*

Aquesta tècnica només va ser utilitzada en una ocasió en què la quantitat de mostra disponible era tan minça que no ens era possible detectar-la amb la tinció habitual amb Coomassie blue.

En la majoria dels primers treballs d'electroforesi de proteïnes amb gels de poliacrilamida s'utilitzava la tinció d'aquestes amb Amido black. Actualment aquest sistema ha estat quasi completament desplaçat pel Coomassie blue, que és molt més sensible. No obstant, el protocol que es

descriu a continuació incrementa almenys 100 vegades la sensibilitat de la tinció normal amb Amido black.

**Protocol** (adaptat de Wray i Stubblefield, 1970):

1. Tenyir durant 2-5 hores amb Amido black 0.1% en àcid acètic a l'1%.
2. Destenyir amb una solució contenint àcid sulfúric 1 M i urea 3 M.

Una possibilitat interessant que ofereix aquest sistema és el fet que, si el gel resulta "sobrecarregat" degut a l'alta sensibilitat d'aquest sistema, es pot posar a destenyir amb acètic 7%. Anàlogament, si després de tenyir i destenyir amb Amido black per mètodes convencionals el gel resulta "infracarregat", es té l'opció de retenyir el gel i tornar-lo a destenyir segons s'ha detallat als punts 1 i 2. D'aquesta manera s'augmenta molt la sensibilitat obtinguda, encara que sense arribar a l'aconseguida mitjançant l'aplicació directa del sistema de Wray i Stubblefield.

### **3.1.5. Conservació dels gels**

Els gels de poliacrilamida es poden conservar de forma permanent col·locant-los entre 2 fulls humits de cel·lofana i deixant-los secar a continuació.

No obstant, en el cas de gels de 3 mm de gruix, és preferible guardar-los en bosses de plàstic segellades ja que pel sistema anterior sovint es trenquen.

### 3.2. Quantificació de la intensitat de les bandes

Com ja havíem dit, el Coomassie blue sembla unir-se amb una afinitat similar a la majoria de proteïnes, de manera que la intensitat de la banda pot utilitzar-se com una mesura raonable de la quantitat de proteïna que hi és present mitjançant la integració dels pics obtinguts amb l'ús d'un microdensitòmetre.

De tota manera, és convenient calibrar primer l'aparell utilitzant una quantitat coneguda de la proteïna a mesurar. D'altra banda, la intensitat només és linealment proporcional a la quantitat de mostra dins d'uns límits i, a més, la resolució no sol ser tan fina com la de l'ull humà.

No obstant, malgrat aquestes limitacions, la densitometria de gels permet una quantificació objectiva de les concentracions relatives de les diferents espècies presents a la mostra. El microdensitòmetre que es va utilitzar en aquest treball va ser un Joyce-Loebl MK III CS.

### 3.3. Determinació de la quantitat de proteïna en mostres en dissolució

Sovint, la quantitat de proteïna obtinguda a partir de les espècies estudiades no era suficient com per ser pesada. En aquests casos es va recórrer en ocasions a la determinació de la concentració de la mostra a partir de la seva absorció a 230 nm.

Les proteïnes tipus histones i protamines donen una absorptància al voltant de 2 a 230 nm quan es troben a una concentració d'1 mg/ml (Ausió, 1980). Així, si es fa una dissolució de la mostra problema i es llegeix l'absorptància a 230 nm, es pot deduir la seva concentració tenint en compte la dada anterior. Aquesta relació es pot aplicar per valors de lectura entre uns 0.1-4, fora dels quals ja no es compleix la Llei de Beer-Lambert i es perd la linealitat.

La mostra es pot liofilitzar i guardar en pols o bé es pot conservar en dissolució congelant-la a (-20)-(-80)°C per evitar-ne la degradació.

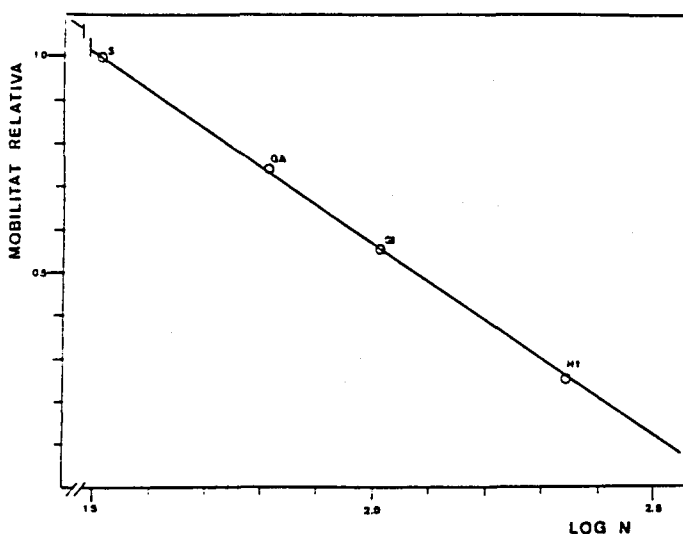
### **3.4. Determinació del número d'aminoàcids d'una proteïna**

És ben sabut que existeix una correlació entre la mobilitat de les proteïnes en gels amb SDS (v. 3.1.3.) i el seu pes molecular. No obstant, aquest tipus de gels no es pot utilitzar per l'anàlisi de protamines, ja que, degut a la seva alta densitat de càrregues positives, s'insolubilitzen en presència d'aquest detergent.

No obstant, Colom i Subirana (1979) van demostrar que protamines que presenten una densitat de càrrega similar mostren una mobilitat electroforètica en gels de poliacrilamida/acètic/urea inversament proporcional al logaritme del número dels seus residus aminoacídics. Aquests autors van provar el fenomen en gels amb un 20% d'acrilamida utilitzant polímers de la protamina iridina com a control.

Posteriorment, Daban et al. (1991) van comprovar la validesa d'aquest mètode emprant gels amb acrilamida al 15%. La recta patró obtinguda a partir de la representació del número d'aminoàcids de diversos estàndards enfront de la seva mobilitat electroforètica respecte a la de la salmina es mostra a la figura II-8.

Malgrat la bona coincidència observada pels estàndards, aquest mètode ha de considerar-se només com a indicatiu del pes molecular ja que hi poden haver desviacions degudes a variacions en la relació càrrega/massa. Així, la histona H4 mostra, tant en el mètode de Colom i Subirana com en el de Daban et al., una mobilitat massa baixa en comparació amb el seu pes molecular, probablement degut a la seva baixa relació càrrega/massa.



**Figura II-8.** Relació entre el logaritme del número d'aminoàcids (N) i la mobilitat electroforètica relativa de proteïnes de densitat de càrrega similar en gels d'acrilamida al 15%. Recta patró construïda per Daban et al. (1991). S = salmuna (Ando i Watanabe, 1969); GA = gallina (Nakano et al., 1976; Oliva i Dixon, 1989); GI = gibbulina (Colom i Subirana, 1979); HI (von Holt et al., 1979).

### 3.5. Determinació de la composició en aminoàcids d'una proteïna

Aquesta operació ens permetrà saber el percentatge de cada aminoàcid present en una proteïna. L'anàlisi consta de dues fases: una primera on es trenquen els enllaços peptídics de la proteïna per alliberar-ne els diferents aminoàcids, i una segona fase on aquests aminoàcids s'hauran d'identificar.

#### 1) Hidròlisi de la proteïna

El trencament de la proteïna fins a aminoàcids es realitza mitjançant una hidròlisi àcida. El procediment estàndard consisteix en posar la proteïna amb HCl 6 N en un tub que es segellarà després d'haver-hi fet el buit, mantenint-ho a continuació a 110°C durant 24 hores. Com a alternativa, les hidròlisis poden dur-se a terme a 150°C durant 1 hora. És convenient afegir

fenol al 0.1% (p/v) per evitar una destrucció massa important de la Tyr durant la hidròlisi.

Quan s'ha d'hidrolitzar un nombre considerable de mostres, pot ser preferible un mètode alternatiu en el què no es segella cada un dels tubs individualment sinó que són tots posats en un recipient major que serà el que es segellarà després d'haver desplaçat l'oxigen amb un gas inert. En aquest sistema, l'àcid no es col·loca dins dels tubs on hi ha la proteïna sinó a la seva base, dins del recipient principal que els conté. Així, la hidròlisi té lloc per humitejament de la mostra proteïca amb HCl destil·lat *in situ* en presència de fenol, i les possibles impureses no volàtils que poguessin contenir cada un dels components no es transmeten als hidrolitzats. Si s'utilitza aquest sistema, es recomana aplicar concentracions de fenol més elevades, d'un 1% (p/v) (Bidlingmeyer et al., 1984).

Durant el present estudi, es va utilitzar amb molta més freqüència la primera de les tècniques esmentades.

Després de refredar fins a temperatura ambient, es trenca el buit i s'elimina l'àcid per evaporació en un dessecador o en un rotavapor. És important l'eliminació ràpida de l'àcid després de l'exposició del contingut dels tubs a l'aire, ja que pot donar-se una degradació oxidativa dels aminoàcids en aquest estadi.

Com es descriu a Allen (1989), aquests sistemes d'hidròlisi presenten alguns problemes pel que fa a alguns aminoàcids. Així, per exemple, el triptòfan es destrueix quasi completament, alguns enllaços peptídics no són totalment hidrolitzats (cas de les unions de la Ile i Val entre elles o amb sí mateixes), i l'asparagina i la glutamina són convertides en els corresponents àcids. A més, molts residus aminoacídics modificats post-traduccionalment es destrueixen o es retornen a l'aminoàcid original.

Hi ha sistemes per minimitzar o corregir alguns d'aquests efectes; no obstant, en la mesura en què els aminoàcids més afectats no solen ser presents en les proteïnes objecte del nostre estudi, no s'han realitzat correccions sobre els resultats de les anàlisis d'aminoàcids.

## 2) Separació i identificació dels aminoàcids alliberats

La majoria dels aminoàcids no posseeixen una absorció als UV o fluorescència significant a longituds d'ona adequades per la seva detecció. Així, es fa necessària la formació de derivats d'aquests aminoàcids de manera que puguin ser detectats.

La derivatització dels aminoàcids pot dur-se a terme abans o després de la separació cromatogràfica dels mateixos (derivatització pre i post-columna) i bàsicament consisteix en la reacció del grup amino primari de l'aminoàcid de manera que es produeixi un derivat colorejat o fluorescent. Aquests, en el cas de modificacions pre-columna, han de ser estables sota les condicions implicades per la cromatografia.

Entre les derivatitzacions pre-columna, és molt utilitzada la reacció amb fenilisotiocianat (PITC) (Heinrikson i Meredith, 1984), mentre que entre les post-columna és freqüent l'ús de l'ortoftaldehid (OPA) i la ninhidrina (Moore i Stein, 1948).

Per la separació i identificació dels aminoàcids alliberats per hidròlisi s'han emprat dues tècniques durant aquest estudi:

a) Derivatització pre-columna i separació dels aminoàcids per HPLC de fase reversa (LKB-ABI, columna Spherisorb ODS2, 5 µm).

Un cop acabada la hidròlisi, la pols obtinguda es troba en un ambient molt àcid que cal neutralitzar afegint-hi un excés de la següent solució:

**Solució neutralitzadora:** TEA  
Acetat sòdic 1 M  
Metanol  
(en proporcions 1:2:2)

A continuació, s'evapora i es procedeix a derivatitzar mitjançant reacció a temperatura ambient durant 30 minuts amb la següent solució:

**Solució derivatitzadora:** Metanol  
TEA  
Aigua  
PITC  
(en proporcions 7:1:1:1)

S'asseca al buit durant almenys 5 hores i es procedeix a carregar la mostra al'HPLC per separar els feniltiocarbamil-aminoàcids. Les elucions es van fer amb els següents tampons:

**Eluient A:** Acetat amònic anhidre (8 g)  
Aigua ultrapura ( 2 l)  
pH ajustat a 6.0 amb àcid fosfòric 4 M  
Cianur sòdic com a conservant (100 mg)

**Eluient B:** Acetat amònic anhidre (16 g)  
Aigua ultrapura (920 ml)  
pH ajustat a 6.0 amb àcid fosfòric 4 M  
Acetonitril qualitat HPLC (880 ml)  
Metanol qualitat HPLC (200 ml)

La detecció es fa a 254 nm.

Aquest sistema es va utilitzar als Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

b) Autoanalitzador automàtic.

El funcionament d'aquest sistema es basa en els principis del mètode desenvolupat per Moore i Stein i els seus col·laboradors (Spackman et al., 1958) en el qual els aminoàcids són separats per cromatografia de bescanvi iònic sobre columnes de resina catiònica de poliestiré sulfonat i utilització de tampons aquosos (generalment de tipus citrat) de pH i força iònica creixents. La derivatització és del tipus post-columna.



Aquest sistema es va realitzar als Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona. Concretament, l'autoanalitzador utilitzat era el model Alpha Plus (sèrie Two) de Pharmacia LKB Biotecnologia. La columna utilitzada contenia una resina de poliestiré divinil benzè sulfonat i els tampons d'elució eren de citrat de liti. L'eluït es feia reaccionar en flux continu, a temperatura elevada (135°C), amb ninhidrina (derivatització post-columna). Els derivats colorejats formats d'aquesta manera tenen un màxim d'absorció al voltant dels 570 nm pels aminoàcids i de 440 nm pels iminoàcids.

Algunes de les anàlisis composicionals es van realitzar al Protein Microchemistry Center, University of Victoria (Canada), seguint una metodologia anàloga a la descrita i utilitzant el model Applied Biosystems 420A.

### 3.6. Determinació per electroforesi del número de cisteïnes d'una proteïna

A no ser que es disposi de la seqüència completa, és difícil saber quin número de residus d'un determinat aminoàcid està present en una proteïna. Es pot aproximar bastant bé a partir de la composició en aminoàcids i d'una estimació del número total d'aminoàcids d'una proteïna (v. 3.4. i 3.5.), no obstant, rarament el valor trobat està pròxim a un enter.

En aquest apartat es descriu un mètode per trobar el número integral d'un cert tipus d'aminoàcid basant-se en una modificació gradual i específica fins a generar un espectre de molècules posseint des de 0 a N grups modificats. Les espècies poden ser llavors comptades després d'una separació per un procés que diferenciï segons el número de grups modificats.

Concretament, pel cas de la Cys, Creighton (1980) va descriure un mètode basat en les diferències de càrrega elèctrica introduïdes per una modificació química específica. Posteriorment i fonamentant-se en el mateix principi, Hollecker i Creighton (1980) van descriure un mètode anàleg pel cas de la Lys. La modificació química es pot assolir bé per l'ús de concentracions

creixents d'un determinat reactiu, bé per la competència entre dos o més reactius diferents.

En el cas de la Cys es pot modificar el grup tiol per reacció amb àcid iodoacètic, el qual introduirà un grup acídic extra a cada Cys, fent que la càrrega de la molècula sigui més negativa. En canvi, si es fa reaccionar els grups tiol amb iodoacetamida, no es canvia la càrrega neta de la proteïna. En una barreja dels reactius, àcid i neutre, s'establirà una competència entre ells.

El mètode consisteix en afegir a la proteïna proporcions variables de iodoacetamida/iodoacetat per generar un espectre complet de proteïnes amb 0, 1, 2, ..., N grups carboximetils acídics, on N és el número integral de cisteïnes per molècula.

La utilització de la parella iodoacètic/iodoacetamida és particularment adequada ja que, a més de ser una reacció específica pels grups SH, és relativament ràpida i els productes obtinguts són força estables.

Com es descriu a Hollecker (1989), el mètode requereix que tots els grups tiol es presentin amb reactivitats comparables, de manera que s'han de tenir en compte les següents consideracions:

a) La reacció s'ha de dur a terme en condicions desnaturalitzants i reductores de manera que tots els grups tiol de la proteïna siguin químicament equivalents.

b) Només els tiols ionitzats són reactius; el pK de la majoria de tiols està generalment entre 8-10, d'aquesta manera, el pH de la solució protèica hauria de ser neutre o lleugerament alcalí.

c) Concentracions elevades de iodoacetat i iodoacetamida reaccionen lentament amb altres grups de la molècula a pH elevat. Per tant, el pH no hauria de ser gaire més alt de 8, les proteïnes no s'han d'exposar als reactius durant un temps innecessàriament llarg i les solucions s'han de posar en gel després de la reacció.

El protocol seguit per dur a terme l'experiment va ser el següent:

**Protocol:**

1. *Desnaturalització i reducció de la mostra:* 0.2 mg de proteïna s'incuben amb 1 ml d'una solució d'urea 8 M / DTT 10 mM / Tris-HCl 10 mM / EDTA 1 mM a pH 8.0 durant 30 minuts a 37°C.

2. *Alquilació:* La mostra va ser llavors alquilada per addició, sobre 80 µl de la solució anterior, de 20 µl de iodoacetamida 0.25 M, de iodoacetat 0.25 M o de barreges dels 2 en proporcions d'1:1, 1:3 i 1:9 (iodoacetamida:iodoacetat). La preparació de les solucions alquilants emprades es mostra a la taula II-7.

---

**Taula II-7. Solucions alquilants (0.25 M).**

---

Iodoacetamida: 46.5 mg en 1 ml de Tris-HCl 0.25 M (pH 8.0)

Iodoacetat: 46.5 mg en 0.25 ml de KOH 1 M i 0.75 ml de Tris-HCl 0.33 M (pH 8.0)

---

3. Barrejar gentilmente una vegada o dues amb una pipeta Ependorf i deixar 15 minuts a temperatura ambient. Passat el temps d'incubació, mantenir les mostres en gel.

4. Transferir 10 µl de cadascun dels 5 tubs a un sisè tub.

5. Les solucions estan llestes per a ser analitzades.

Com la modificació emprada varia la càrrega iònica, la separació de les espècies amb diferents grups modificats pot realitzar-se per electroforesi. El número d'espècies ( $N + 1$ ) i per tant el número de residus de cisteïna ( $N$ ) es determina per comptatge del número de bandes que apareixen al gel electroforètic.

El paràmetre crucial per l'electroforesi és el pH; els grups modificats han de diferir en la seva càrrega neta i idealment haurien de ser tots del mateix signe per poder ser analitzats en una sola electroforesi. Pel cas descrit, el pH haurà de ser major que 3.5.

D'altra banda, les molècules amb el mateix número de grups modificats variaran usualment en la identitat d'aquests grups. És important que totes les modificacions tinguin un efecte electroforètic similar, independentment de quins siguin els grups afectats; així, la separació s'ha de dur a terme amb molècules desnaturalitzades, cosa que es pot aconseguir si les electroforesis es fan en gels contenint urea 8 M.

És important, també, que la proteïna inicial doni una sola banda majoritària a la regió del gel on migraran les molècules modificades. La contaminació de proteïnes minoritàries en aquesta regió, o de proteïnes majoritàries en altres regions, no interferirà en l'anàlisi.

Tenint en compte tot això, es va emprar el mateix tipus de gel que va utilitzar Creighton (1980) a l'experiment original, és a dir, gels de poliacrilamida elaborats segons el sistema discontinu de baix pH de Reisfeld et al. (1962) (v. 3.1.1.2.), però contenint urea 8 M.

El mètode presentat té l'avantatge de poder-se aplicar a qualsevol proteïna, inclús si no en sabem ni la concentració ni el pes molecular. No obstant, no pot substituir de cap manera els mètodes estàndard d'anàlisi d'aminoàcids ja que no és gens probable el poder trobar reactius químics adequats per modificar aquells aminoàcids que no tenen grups reactius, com per exemple la Pro, Val, Leu, etc.

### 3.7. Trencament de proteïnes i pèptids

S'han utilitzat diferents enzims per digerir les proteïnes fins a l'obtenció de pèptids de menor mida. Els trencaments que produeixen els diferents enzims poden ser en llocs molt específics (enzims d'alta especificitat) o bé poden ser més inespecífics (enzims de baixa especificitat). L'elecció de l'enzim dependrà en cada cas de la composició de la proteïna o pèptid així com de l'objectiu perseguit. En els apartats següents s'exposen els enzims i condicions que s'han utilitzat al llarg d'aquest treball.

També s'ha recorregut en ocasions al trencament de proteïnes i pèptids per mètodes químics. El trencament químic és un complement invaluable de les proteases ja que sovint permet trencar per unions per les que encara no s'ha trobat cap enzim específic. Un avantatge addicional és que molts d'aquests mètodes són altament específics per aminoàcids com la Met o el Trp que no es troben molt freqüentment en les proteïnes. D'aquesta manera poden ser usats, per tant, per generar fragments relativament grans i poc nombrosos, facilitant la seqüenciació automàtica i reduint els problemes associats a la separació de mescles complexes de pèptids petits. En aquest treball només s'ha utilitzat el trencament amb bromur de cianogen.

#### 3.7.1. Tripsina de pàncreas boví

La tripsina és una serin-proteasa que catalitza la hidròlisi dels enllaços peptídics on hi intervenen l'Arg o la Lys (excepte, sovint, quan el següent residu és la Pro), tallant per l'extrem carboxil.

En principi, s'ha utilitzat aquesta digestió quan s'ha volgut posar de manifest la presència d'algun pèptid resistent al seu atac i que, en proteïnes de tipus histones o similars, generalment es correspon amb un domini de tipus globular (Allan et al., 1980; Ausió et al., 1987).

**Protocol:** La proteïna es va dissoldre en unes condicions finals de NaCl 2 M i Tris 25 mM pH 7.5, i es va afegir la tripsina (Sigma, tipus III) dissolta en

una solució de les mateixes característiques. La concentració de NaCl dóna una força iònica suficient per mantenir l'estructura terciària de la proteïna. A diferents temps es van agafar alíquotes i es va parar la reacció.

La relació enzim/substrat va variar en funció de l'experiment concret a realitzar, però generalment vam utilitzar valors entre 1:375 i 1:750. Igualment, els temps de digestió van dependre de la relació enzim/substrat triada.

La digestió es pot aturar de diferents maneres. Així, es pot precipitar el producte amb TCA fins al 20-25% (v. 2.1.4.2.), acidificar el medi o bé utilitzar algun inhibidor. L'àcid utilitzat pot ser HCl fins 0.4 N, podent-se precipitar la mostra a continuació, o bé es pot afegir una quantitat adequada del tampó de mostres per electroforesi en GPAU (l'àcid acètic que conté és suficient per parar la reacció i, a més, les mostres queden ja llestes per la seva anàlisi electroforètica). Aquest últim sistema és el que es va utilitzar en les digestions analítiques.

Quant a l'ús d'inhibidor, en algunes ocasions es va utilitzar TLCK (Sigma) a una relació d'1:10 (inhibidor:tripsina), i en altres l'inhibidor de la tripsina extret de la soja (Sigma, tipus I-S), en una proporció 4 vegades major que la quantitat de tripsina utilitzada.

Generalment, abans de realitzar digestions amb fins preparatius, es van realitzar digestions analítiques per triar les condicions més adequades. En les digestions analítiques, paral·lelament es va dur a terme un blanc o control de manera que les condicions finals fossin les mateixes que en la mostra digerida però sense afegir l'enzim.

### 3.7.2. Elastasa

L'elastasa és una endopeptidasa de baixa especificitat. En principi, mostra preferència per residus no polars petits, tals com l'Ala, encara que també s'han descrit casos de trencaments per Ser, gly, Val i Leu (Aitken et al., 1989).

Les condicions utilitzades en aquest treball van ser les següents: Sobre la proteïna en pols afegíem bicarbonat amònic 100 mM a pH 8 fins assolir una concentració d'uns 2-5 µg/µl. A continuació afegíem l'enzim (Sigma, tipus IV) en una proporció 1:100 (enzim:substrat) i a diferents temps aturàvem la reacció afegint tampó de mostres per electroforesi en GPAU (v. 3.1.1.1.) (digestions analítiques) o bé congelant amb neu carbònica i acetona i liofilitzant a continuació si es volia injectar la mostra a l'HPLC (digestions preparatives). Igual que pel cas de la tripsina, es van efectuar digestions analítiques prèvies per escollir les condicions convenients per les digestions preparatives.

### **3.7.3. Bromur de cianogen**

El BrCN produeix un trencament químic específic per l'aminoàcid Met. Es tracta d'un mètode molt popular degut a la seva especificitat i alta eficiència, encara que alguns enllaços particulars poden donar rendiments pobres (especialment els enllaços Met-Thr i Met-Ser). Ocasionalment es poden donar trencaments als residus Tyr i Trp, així com en altres punts inespecífics. No obstant, alguns d'aquests, sinó la majoria, resulten de les fortes condicions acídiques utilitzades. Altres reaccions que es poden donar, particularment quan s'utilitzen nivells alts de BrCN, inclouen l'oxidació de la cisteïna, cistina i àcid cistèic, i la brominació de les cadenes laterals de la tirosina (Aitken, 1989).

Concretament, les condicions utilitzades en aquest treball han estat les següents: La proteïna va ser dissolta en HCl 0.1 N a una concentració d'aproximadament 7 mg/ml en presència de BrCN en una relació d'1:3 (BrCN:proteïna) en pes. Després d'una incubació de 24 h a les fosques i a temperatura ambient, la mostra es va assecar amb un "speed-vac" (o bé es pot liofilitzar) i a continuació es va dissoldre en aigua per la separació per HPLC dels pèptids originats. Tot el procés s'ha d'efectuar extremant les precaucions degut a la potencial toxicitat del BrCN.

### 3.8. Determinació de la seqüència d'aminoàcids d'una proteïna

#### 3.8.1. Procediment general

La determinació de l'estructura primària d'una proteïna passa per una sèrie d'estudis o etapes, algunes de les quals ja s'han explicat amb anterioritat. Bàsicament, les anàlisis a fer serien les següents:

- Anàlisi de la composició en aminoàcids (v. 3.5.).
- Determinació de l'extrem carboxil de la proteïna.
- Degradació recurrent d'Edman sobre la proteïna sencera.
- Fraccionament de la proteïna (v. 3.7.).
- Separació dels fragments peptídics (v. 2.7.1.2.)
- Degradació recurrent d'Edman sobre aquests fragments.
- Alineació dels fragments i deducció de la seqüència final.

És a dir, sobre la proteïna pura sencera es fa una identificació de l'aminoàcid N-terminal i a continuació s'aborda la seqüenciació. En general, a no ser el cas de proteïnes molt petites, no es pot obtenir la seqüència completa en una sola atacada ja que la qualitat de les dades cap a l'extrem C-terminal va sent cada cop més pobre, de manera que s'ha de recórrer a la fragmentació de la proteïna en pèptids de mida més adient. Per l'elecció de l'agent de fraccionament, ja sigui químic o enzimàtic (v. 3.7.), és de vital importància conèixer la composició en aminoàcids de la proteïna en qüestió. Els pèptids obtinguts es poden separar per HPLC de fase reversa i un cop purificats podran ser seqüenciats. Finalment, es tracta de solapar aquest conjunt de seqüències fins a deduir-ne la seqüència total.

#### 3.8.2. Degradació recurrent d'Edman

Amb diferència, la tècnica més important utilitzada per la determinació de seqüències d'aminoàcids en pèptids és el procés de

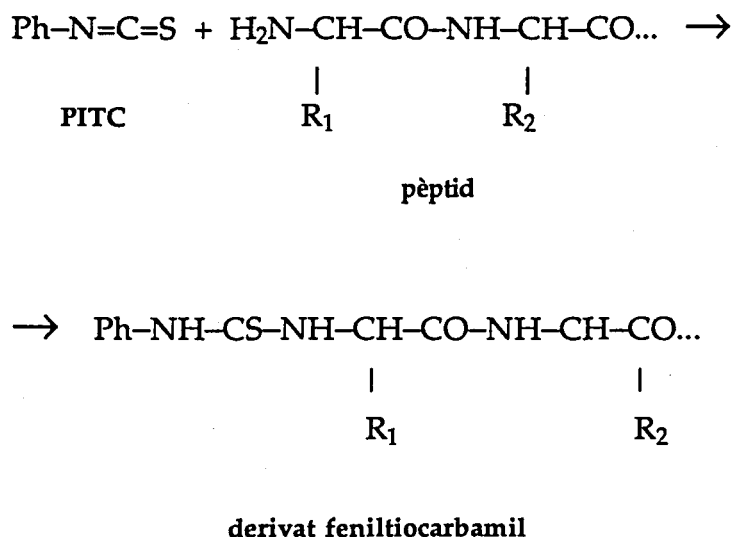


degradació introduït i desenvolupat per Edman (Edman, 1950, 1953, 1956; Ilse i Edman, 1963; Edman i Begg, 1967) i que porta el seu nom.

La química de la degradació d'Edman ha estat discutida amb gran detall per Edman i Henschen (1975) i per Tarr (1977) entre altres. Es tracta d'un procés cíclic en el qual cada residu aminoacídic es separa un a un a partir de l'extrem N-terminal del pèptid i és identificat com el seu derivat feniltiohidantoïna. Es donen tres fases en cada cicle: l'acoblament, trencament i conversió.

### 3.8.2.1. Acoblament

Consisteix en l'acoblament del PITC al residu amino-terminal formant-se un feniltiocarbamil (PTC). Amb aquest marcatge s'identifica l'extrem amino-terminal.

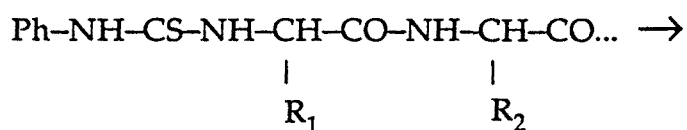


La reacció d'acoblament té lloc en una solució alcalina: es requereix el grup amino en forma lliure. El pK<sub>a</sub> mig dels grups amino-terminal dels pèptids és de 7.8 (Steinhardt i Beychok, 1964), i per tant el pH de la solució hauria de ser per sobre de 8. No obstant, han d'evitar-se condicions molt

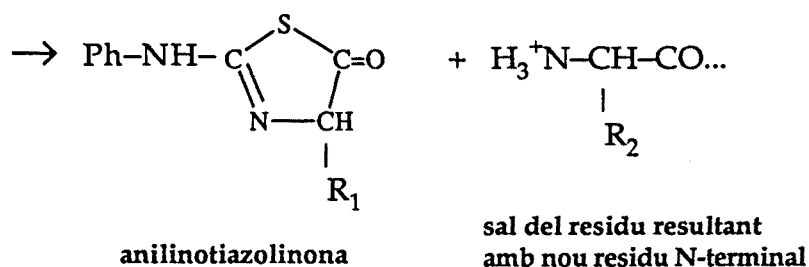
alcalines (pH per sobre de 10) ja que hi ha altres reaccions, com ara la hidròlisi del fenilisotiocianat, que es veurien catalitzades.

### 3.8.2.2. Trencament

Es separa el residu amino-terminal via ciclització en medi àcid, formant-se una tiazolinona.



derivat PITC



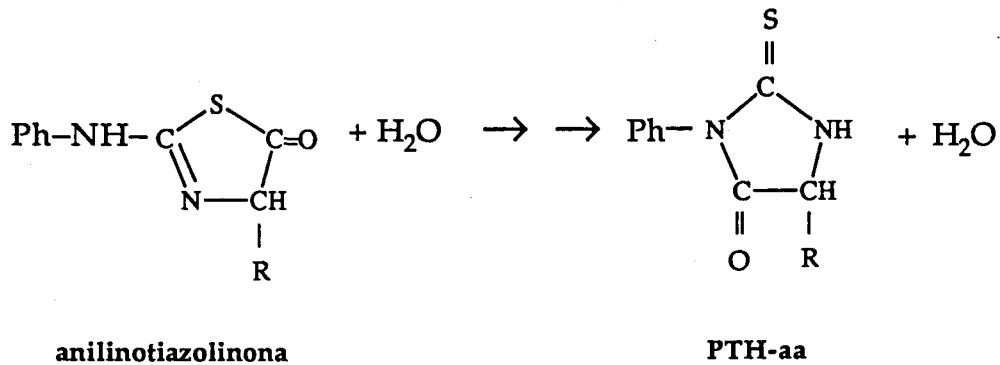
S'evita la presència d'aigua al medi de trencament principalment degut al perill d'hidròlisi dels enllaços més sensibles, catalitzada pel medi àcid.

### 3.8.2.3. Conversió

Els derivats anilintiazolinones dels aminoàcids no són prou estables per permetre una identificació cromatogràfica segura. Per tant, en aquesta fase

---

són convertits en uns derivats més estables, les feniltiohidantoïnes (PTH). La reacció es dona en medi àcid. Aquesta reacció passa per una fase intermèdia oberta que es torna a ciclar en una segona etapa per donar la feniltiohidantoïna.



La identificació cromatogràfica es fa per HPLC en fase reversa.

Les seqüències que apareixen en aquest treball han estat determinades en dos centres diferents: Les que van ser determinades al Servei de Seqüenciació de Proteïnes de la Universitat de Barcelona, van ser obtingudes amb un seqüenciador automàtic en fase gasosa (Applied Biosystems 470A) acoblat a un analitzador de PTH-aminoàcids per HPLC (Applied Biosystems 120A). Els cicles de preparació previs van ser del tipus 03rpr i els cicles de seqüència foren els estàndard 03rpth. Els cromatogrames van ser registrats en un SP-4290 i les dades emmagatzemades en un sistema de captura i tractament de dades Winner d'Spectra-Physics.

Al Protein Microchemistry Center (University of Victoria, Canadà) es va dur a terme la seqüenciació protèica amb un ABI model 473A. Els derivats anilinothiazolinona van ser convertits en PTH-aa amb TFA a una temperatura de conversió de 60°C. Aquests derivats van ser analitzats per HPLC en fase reversa en una columna Brownlee C18.

