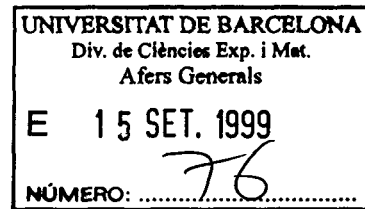


TESI DOCTORAL

Pepita Giménez Bonafé

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

Novembre, 1999



TESI DOCTORAL

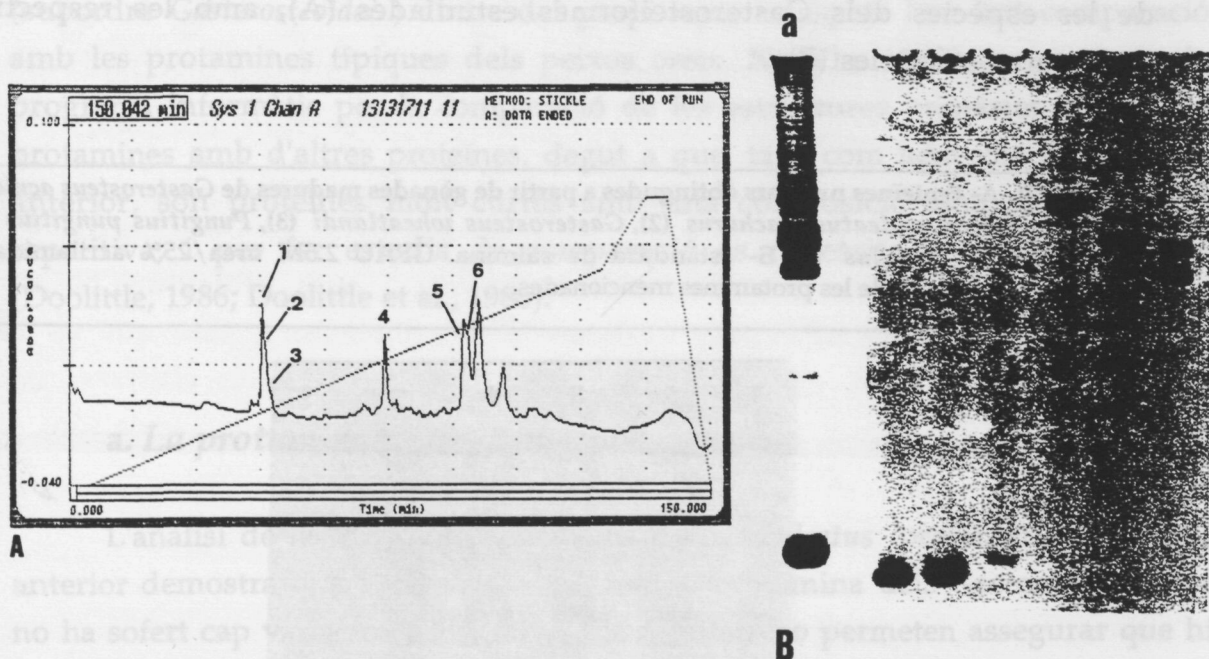
Pepita Giménez Bonafé

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



Novembre, 1999

Fig.III.D.19. Purificació de la protamina de *Aulorhynchus flavidus* mitjançant tècniques d'HPLC. A- Perfil cromatogràfic. B- GPAU 2.5M urea/15% acrilamida: a-proteïnes nuclears totals.



La proteïna purificada també es va seqüenciar tota d'una passada. Tal i com la Fig.III.D.20 mostra, és la protamina més petita de les aquí estudiades, amb tan sols 36 residus aminoacídics, i alhora molt més bàsica, amb el 56% de la molècula formada només per Arg. Al igual que la resta de protamines de la família *Gasterosteoidae*, la proteïna comença pel triplet PRR, i les Arg es troben la major part d'elles organitzades en *clusters* separats per aminoàcids no bàsics. Només presenta la Ser com aminoàcid fosforilable, on 2 de les 3 Ser es troben en posició N-terminal, i la tercera en C-terminal. Aquesta protamina també es compara amb més detall amb la resta de protamines en el proper apartat.

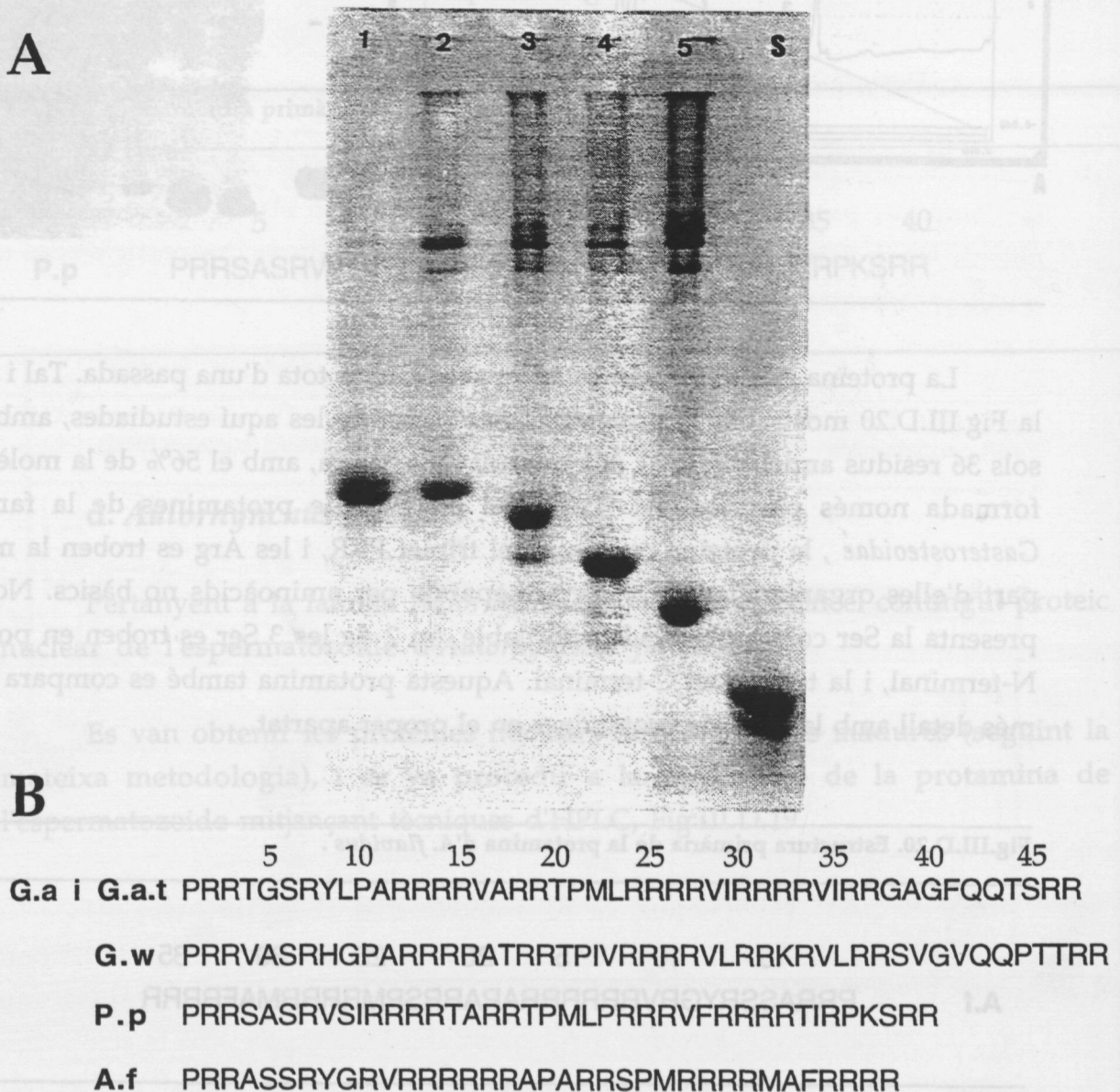
Fig.III.D.20. Estructura primària de la protamina d'*A. flavidus*.

A.f 5 10 15 20 25 30 35
 PRRASSRYGRVRRRRRRRAPARRSPMRRRRRMAFRRRR

e. Resum del subordre Gasterosteoidei

A la Fig.III.D.21 es mostra un gel d'electroforèsi comparant les protamines de les espècies dels Gasterosteiformes estudiades (A), amb les respectives estructures primàries (B).

Fig.III.D.21. A- Proteïnes nuclears obtingudes a partir de gònades madures de *Gasterosteus aculeatus* (1), *Gasterosteus aculeatus trachurus* (2), *Gasterosteus wheatlandi* (3), *Pungitius pungitius* (4) i *Aulorhynchus flavidus* (5). S- estàndard de salmina. GPAU 2.5M urea/25% acrilamida. **B-** Estructures primàries de les protamines mencionades.



3. Comparació entre les Protamines del subordre *Gasterosteioidei*

En aquest apartat intentem comparar les protamines dels Gasterosteiformes (subordre *Gasterosteioidei*) dintre del propi taxó, i després fem una comparació amb les protamines típiques dels peixos ossis. No s'ha utilitzat cap tipus de programa informàtic per la comparació de les estructures primàries d'aquestes protamines amb d'altres proteïnes, degut a que, tal i com hem vist en l'apartat anterior, són proteïnes molt curtes amb una composició aminoacídica molt repetitiva, i per fer estudis de comparació es necessita un tamany mínim (Doolittle, 1986; Doolittle et al., 1986).

a. La protamina de *G. aculeatus*

L'anàlisi de les diferents poblacions de *G. aculeatus* presentat en l'apartat anterior demostra que a nivell de proteïna, la protamina dels Gasterosteiformes no ha sofert cap variació significativa. Els resultats no permeten assegurar que hi hagi una variabilitat intraespecífica clara, ni tan sols microheterogeneïtat. Aquest fet contrasta amb el que ocorre en les protamines típiques dels peixos ossis, les quals poden presentar diferents formes dins d'un mateix animal (McKay et al., 1986).

Com a conseqüència, l'estructura primària presentada a la Fig.III.D.9 es pot considerar com a representativa de la seqüència de la protamina del "complex d'espècies" *G. aculeatus*, les característiques de la qual s'han explicat en l'apartat III.D.2.a.ii.

b. Les protamines de *G. aculeatus* i *G. wheatlandi*

Ambdúes protamines presenten 47 i 48 residus aminoacídics respectivament, i alineades presenten 32 identitats en quan a la posició dels aminoàcids, un canvi conservatiu en càrrega bàsica (R \rightarrow K en posició 32), i un canvi conservatiu en quan a aminoàcid potencialment fosforilable (en posició 46, S \rightarrow T)(Fig.III.D.22).

Fig.III.D.22. Comparació entre les seqüències primàries de *G. aculeatus* (G.a) i *G. wheatlandi* (G.w). Subratllats es presenten els residus que varien en les dues seqüències.

	5	10	15	20	25	30	35	40	45
G.a	PRRTG <u>SR</u> YL <u>PARRRR</u> VA <u>RR</u> TP <u>ML</u> RRRRV <u>I</u> RRRRV <u>I</u> RRG <u>AG</u> E <u>QQ</u> - <u>TS</u> RR								
G.w	PRR <u>VAS</u> R <u>HG</u> P <u>ARRRR</u> A <u>TR</u> RT <u>P</u> IVRRRR <u>V</u> L <u>RR</u> K <u>R</u> V <u>L</u> RR <u>S</u> V <u>G</u> V <u>Q</u> Q <u>P</u> T <u>T</u> RR								

Les variacions que s'observen entre una i altra protamina no afecten pràcticament a les càrregues bàsiques de les molècules, sinó que es donen fonamentalment en els residus no bàsics que separen els *clusters* (grups) d'arginines. Els canvis que es donen en els primers 2/3 de la molècula són:

TG \longleftrightarrow VA

YL \longleftrightarrow HG

VA \longleftrightarrow AT

ML \longleftrightarrow IV

I \longleftrightarrow L

En el terç final (terç C-terminal), les variacions són menys clares de classificar. Afecten a una Ser (GA \longleftrightarrow SV) (el canvi S \longleftrightarrow T es considera un canvi conservatiu, ja que tots dos són residus fosforilables), i també es dona un indel (inserció/delecció) d'una Pro.

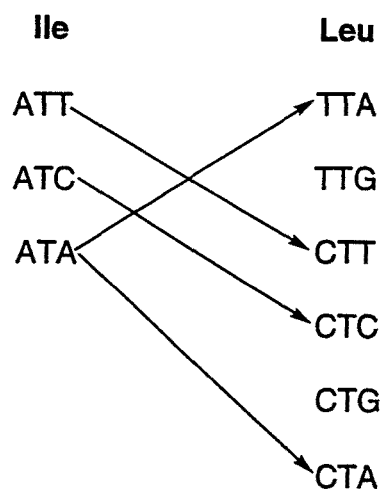
Hi ha quatre residus potencialment fosforilables: Ser₆, Thr₂₀, Thr₄₅ i Ser/Thr 46, residus que conserven les posicions en les dues protamines.

Com es veurà més endavant, les protamines del gènere *Gasterosteus* són de major tamany i més complexes que les protamines dels altres Gasterosteiformes, i també que les protamines típiques dels peixos ossis. Un detall que pot ser d'interès per poder comprendre la possible relació existent entre aquestes molècules es troba en el repetit que comprén els residus 24-29:

	24	30
en <i>G. aculeatus</i> trobem	RRRRVI	RRRRVI
en <i>G. wheatlandi</i>	RRRRVL	RRKRVL

Una de les interpretacions a aquesta zona repetida seria la de suposar que, prèviament a la divergència d'aquestes protamines (al formar-se el gènere, família, etc) es va produir una repetició del motiu R₄VI (o R₄VL), i després es van donar mutacions del tipus I \leftrightarrow L i R \leftrightarrow K independentment. De fet és fàcil passar de qualsevol codó de la Isoleucina a la Leucina només canviant un nucleòtid (v. Fig.III.D.23).

Fig.III.D.23. Triplets de nucleòtids que donen lloc als aminoàcids Isoleucina (Ile) i Leucina (Leu).



Malgrat aquesta aparent facilitat per interpretar el repetit, hi ha altres alternatives possibles i no menys improbables, ja que les protamines tendeixen a presentar grups d'arginines separats per pocs residus no bàsics, i es pot trobar una zona repetida sense que provingui de la repetició total, o parcial, d'una part del gen. Aquest punt s'entendrà millor quan es faci la comparació de totes les protamines dels Gasterosteiformes estudiades aquí (v. apartat d).

c. La protamina de P. pungitius i les protamines dels Gasterosteus

Les protamines del gènere *Gasterosteus* contenen 47-48 residus aminoacídics, mentre que la protamina de *P. pungitius* en presenta 40. Per comparar aquestes dues protamines hi ha dues possibilitats:

a) comparar la protamina de *Pungitius* amb la de *Gasterosteus* però eliminant d'aquesta última el repetit R₄VI, amb lo qual totes dues protamines tindrien aproximadament el mateix nombre de residus, o bé,

b) comparar totes dues seqüències sense introduir cap variació en la longitud de la molècula de la protamina del gènere *Gasterosteus*.

Encara que la primera alternativa semblaria la més adequada, el fet és que les seqüències queden alineades molt més fàcilment (amb més identitats i menys suposicions de canvis evolutius, és a dir, amb major "parsimonia") si es comparen les molècules sense "escurçar" les protamines dels *Gasterosteus*, Fig.III.D.24.

Fig.III.D.24. Comparació entre les seqüències de les protamines del gènere *Gasterosteus* (*G. aculeatus* i *G. wheatlandi*) i el gènere *Pungitius* (*P. pungitius*).

	5	10	15	20	25	30	35	40	45		
G.w	<u>VA</u>	<u>HG</u>	<u>AT</u>	<u>IV</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>SV</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	<u>I</u>
G.a	PRRTG <u>S</u> RYLPARRRRVARRTPMLRRRRVIRRRRVIRRGAGFQQ - TSRR										
P.p	PRRSASRVSI - RRRRTARRTPMLPRRRVFERRRRRTIR - - - - - PKSRR										

Tal i com passava entre els *Gasterosteus* es pot considerar que l'organització de les primeres 2/3 parts de la molècula és similar. En aquesta zona, tant els *clusters* de residus bàsics com els residus fosforilables (Ser6 i Thr20) es mantenen, i canvien lleugerament els residus que separen els grups d'aminoàcids bàsics, d'una manera similar a la variació que es dona dintre del propi gènere *Gasterosteus*. El repetit que s'apreciava en aquest gènere (RRRRVI RRRRVV en *G. aculeatus*, i RRRRVL RRKRVL en *G. wheatlandi*) en *Pungitius* es transforma en: PRRRVF RRRRTI.

Això últim no permet assegurar que provingui d'una repetició parcial del gen, però sí que suggereix que aquesta zona completa ja formava part del gen ancestral de la protamina de la família *Gasterosteoidae*.

Un altre detall interessant és que la zona TPML (posicions 20-23) es conserva entre *G. aculeatus* i *P. pungitius*.

La diferència més evident es troba en l'extrem C-terminal. En aquesta part, la protamina de *P. pungitius* conté 6-7 aminoàcids menys, el que dona la diferència important en tamany amb les altres protamines.

Sembla que la part amb més permisibilitat de variació evolutiva és la que correspon a l'extrem C-terminal.

En quan a l'alineació exposada a la Fig.III.D.24, hem d'explicar que el pentapèptid PKSRR situat en posició C-terminal de la protamina de *P. pungitius*, s'ha col.locat en unes posicions que resulten conservatives amb respecte les protamina dels *Gasterosteus*.

d. La protamina d'*A. flavidus* i les protamines anteriors

La comparació entre la protamina d'*Aulorhynchus flavidus* (família *Aulorhynchidae*) amb la resta de protamines (família *Gasterosteoidae*) és un punt interessant per entroncar la similitud entre les protamines del subordre *Gasterosteoidaei*, i també (com veurem més endavant) per trobar la relació que presenta amb la protamina típica dels peixos ossis.

La protamina d'*A. flavidus* és la menor de totes les estudiades, amb 36 residus, tamany que l'aproxima al que tenen les "protamines típiques" dels peixos ossis.

La Fig.III.D.25 mostra la millor manera (dintre de les que s'ha intentat) d'alinejar les seqüències. Es pot observar que la protamina d'*A. flavidus* comparteix una organització estructural similar als primers 2/3 de les molècules anteriors, i que el terç final (C-terminal) es troba completament absent.

Fig.III.D.25. Comparació entre les seqüències de la protamina d'*A. flavidus* (família *Aulorhynchidae*) i les protamines de *G. aculeatus*, *G. wheatlandi* i *P. pungitius* (família *Gasterosteidae*). Amb fletxes s'indiquen els aminoàcids que li segueixen a la seqüència que no queden alineats amb la resta.

	5	10	15	20	25	30	35	40	45
G.w	PRR <u>VA</u> SR <u>HGPA</u> RRRR <u>AI</u> RRTP <u>I</u> <u>V</u> RRRRV <u>L</u> RRKR VLRRSVGVQQPTIRR								
G.a	PRR TG SR YLPA RRRR VA RRTPM L RRRRV <u>I</u> RRRR VIRRAGGFQQ -TSRR								
P.p	PRR <u>SA</u> SR <u>VSI</u> - RRRR <u>IA</u> RRTPM L <u>PRRRV</u> <u>E</u> RRRR <u>IIR</u> - - - - - <u>PKSPR</u>								
A.f	PRR <u>AS</u> SR <u>YGRV</u> RRRR <u>AA</u> RRSPM - RRRRA <u>E</u> RRRR - - - - -								
			↓ ↓		↓				
			RR P		M				

Tal i com ocorre en tot el subordre, es conserva l'inici PRR (que també es troba a la protamina típica dels peixos ossis), així com les posicions dels residus potencials a ser fosforilats (Ser6 i Trh20) i per últim, també es conserva el motiu T/SPM (residus 20-22).

La Taula III.D.II resumeix les característiques més significatives de les protamines estudiades del subordre *Gasterosteidae*.

e. Resum i plantejament del següent pas

Les protamines del subordre *Gasterosteidae* presenten en la seva primera part una estructura molt probablement homòloga, on la seqüència *consensus* seria la següent:

PRR (2X) SR (4X) RRRR (2X) RR T/S PM/I (X) RRRR (XX) RRRR

on X són els residus que separen els aminoàcids conservats, i són aminoàcids que no es donen a l'atzar, sinó que predominen uns tipus concrets de residus (com són l'Ala i la Val sobretot, i la Leu, Pro, Thr, Gly i Ser entre d'altres) (v. Fig.III.D.25).

Taula III.D.II. Dades més significatives de les protamines del subordre *Gasterosteoides*: protamines de *G. aculeatus*, *G. wheatlandi* i *P. pungitius* (família *Gasterosteoidae*) i protamina d'*A. flavidus* (família *Aulorhynchidae*).

	G.a	G.w	P.p	A.f
Basicitat	45%	46%	50%	56%
Nombre de residus	47	48	40	36
PM (espect. masses)	5,899.0 Da	-	-	-
PM (seqüència)	5,899.2 Da	5,892.05 Da	5,112.2 Da	4,707.6 Da
Tipus de residus	13 (a)	12 (b)	11 (c)	9 (d)

(a)- (21 Arg; 3 Pro; 3 Thr; 3 Gly; 3 Ala; 3 Val; 2 Ser; 2 Leu; 2 Ile; 2 Gln; 1 Tyr; 1 Met; 1 Phe)

(b)- (20 Arg; 4 Pro; 4 Thr; 2 Gly; 3 Ala; 6 Val; 2 Ser; 2 Leu; 1 Ile; 2 Gln; 1 His; 1 Lys)

(c)- (19 Arg; 4 Pro; 3 Thr; 2 Ala; 2 Val; 4 Ser; 1 Leu; 2 Ile; 1 Met; 1 Lys; 1 Phe)

(d)- (20 Arg; 3 Pro; 1 Gly; 4 Ala; 1 Val; 3 Ser; 1 Tyr; 2 Met; 1 Phe)

D'altra banda, la part C-terminal es mostra molt variable en el taxó.

Existeixen doncs, dues alternatives principals de cara a interpretar com s'han modificat les protamines en el taxó:

a) La protamina del subordre *Gasterosteoides* és diferent de la protamina típica (agafant com a protamina representativa la de *G. aculeatus*).

b) La protamina del subordre *Gasterosteoides* prové de la protamina típica dels peixos ossis, i progressivament s'ha anat complicant.

En la següent secció mostrem que la protamina d'*Aulorhynchus flavidus* és una "protamina típica" de peix ossi, el que afavoreix la segona hipòtesi, la qual serà discutida al final.

f. Les "protamines típiques" i la protamina d'*A. flavidus*

La Fig.III.D.26 mostra un recull de seqüències de les protamines típiques de dos ordres de peixos ossis, l'ordre Salmoniformes i l'ordre Perciformes (modificat a partir de Saperas et al., 1994), i la protamina d'*A. flavidus*.

Quan s'analitza l'organització de la protamina i la variabilitat que permet, es fàcil concluir que la protamina d'*A. flavidus* és una protamina típica.

La protamina típica (v. Fig.III.D.26) comença per una zona PR₄₋₅, zona 1, li segueix una zona 2 formada per 1-3 residus en la qual predominen estadísticament les Ala i Ser, i a continuació es troba el dipèptid SR, zona 3, molt conservat degut a que la Ser és un aminoàcid susceptible a ser fosforilat. La zona 4 que li continua es troba formada per una agrupació d'aminoàcids en la que destaca la presència d'una Arg i un parell de residus no bàsics, aminoàcids que es troben restringits a ser Val, Pro i Ile. A continuació li segueix un cluster homogeni de 5 Arg (zona 5), i posteriorment trobem una zona (zona 6) que varia entre els Salmoniformes i Perciformes, però que separa dos clusters importants d'arginina i conté residus fosforilables. Les zones 7 i 9 tornen a ser clusters d'Arg, separats per dos residus no carregats (zona 8).

Amb algunes diferències, la protamina d'*A. flavidus* es troba organitzada de igual forma que les protamines típiques (de fet, les primeres 2/3 parts de les altres protamines del subordre encara s'hi assemblen més):

La protamina d'*A. flavidus* també presenta una zona 1, però més curta (amb dos Arg menys); les zones 2 (AS) i 3 (SR) són pràcticament iguals a la protamina típica ideal, i la zona 4 està formada pels aminoàcids més comuns en les protamines (R i V) en addició d'una Gly i una Tyr. Les zones 5, 7 i 9 són pràcticament idèntiques (clusters d'Arg), i la zona 6 presenta un interès especial: aquesta regió és major en els Perciformes que en els Salmoniformes, i en ella s'hi troben motius tals com:

ARRAPM
YRRSTAA

els quals són quasi iguals al que presenta la protamina d'*A. flavidus*.

APARRRSPM A.f
ARRAPM
YRRSTAA

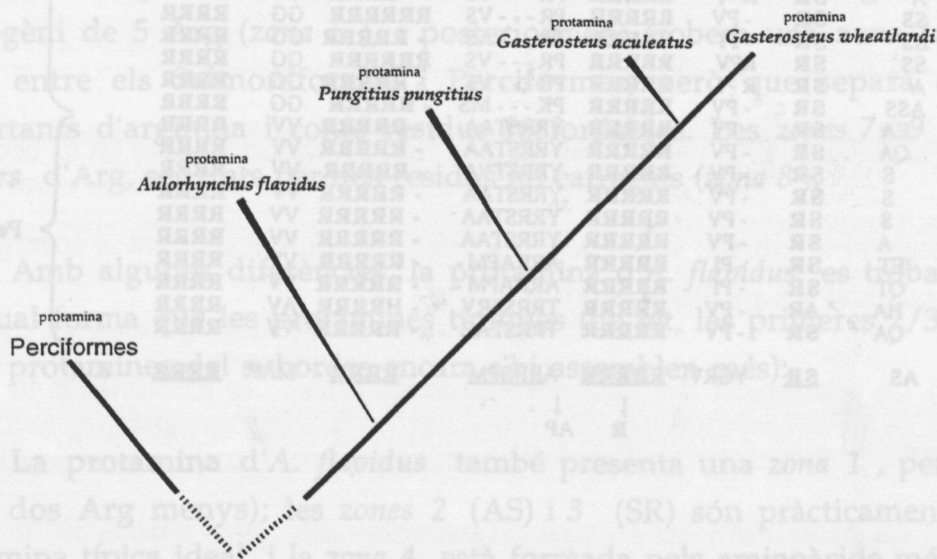
Fig.III.D.26. Comparació de les seqüències de les protamines dels ordres Salmoniformes i Perciformes (amb protamina típica), i la protamina d'A. *flavidus*. Adaptat de Saperas et al., 1994.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	
PRRRR	A	SR	R - V	RRRRR	PR --- VS	- RRRRR	GG	RRRR	} Salmoniformes
PRRRR	A	SR	R - I	RRRRR	PR --- VS	- RRRRR	GG	RRRR	
PRRRR	SS	SR	- PV	RRRRR	AR --- VS	RRRRRR	GG	RRRR	
PRRRR	SS	SR	- PV	RRRRR	PR --- VS	RRRRRR	GG	RRRR	
PRRRR	SS	SR	RPV	RRRRR	PR --- VS	RRRRRR	GG	RRRR	
PRRRRR	SS	SR	- PI	RRRRR	PR --- VS	- RRRRR	GG	RRRR	
PRRRR	SS	SR	- PV	RRRRR	PRR --- VS	RRRRRR	GG	RRRR	
PRRRR	SS	SR	- PV	RRRR -	ARR --- VS	RRRRRR	GG	RRRR	
PRRRRR	S	SR	- PI	RRRR -	PRR --- VS	- RRRRR	GG	RRRR	
PRRRRR	A	SR	R - V	RRRRR	PR --- VS	- RRRRR	GG	RRRR	
PRRRR	A	SR	- PV	RRRR -	PRR --- VS	- RRRRR	GG	RRRR	
PRRRR	S	SR	PPV	RRRRR	PR --- VS	RRRRRR	GG	RRRR	
PRRRR	A	SR	R - I	RRRRR	PR --- VS	- RRRR	GG	RRRR	
PRRRR	SS	SR	- PV	RRRRR	PR --- VS	RRRRRR	GG	RRRR	
PRRRRR	SS	SR	- PI	RRRRR	PR --- AS	- RRRRR	GG	RRRR	
PRRRR	SS	SR	RPV	RRRRR	PR --- VS	RRRRRR	GG	RRRR	
PRRRR	A	SR	R - I	RRRRR	PR --- VS	- RRRRR	GG	RRRR	
PRRRR	ASS	SR	- PV	RRRRR	PK --- MS	- RRRRR	GG	RRRR	
PRRRR	EA	SR	- PV	RRRRR	YRRSTAA	- RRRRR	VV	RRRR	
PRRRR	QA	SR	- PV	RRRRR	YRRSTAA	- RRRRR	VV	RRRR	
PRRRRR	S	SR	- PV	RRRRR	YRRSTVA	- RRRRR	VV	RRRR	
PRRRRR	S	SR	- PV	RRRRR	YRRSTAA	- RRRRR	VV	RRRR	
PRRRRR	S	SR	- PV	RRRRR	YRRSTAA	- RRRRR	VV	RRRR	
PRRRRR	A	SR	- PV	RRRRR	YRRSTAA	- RRRRR	VV	RRRR	
PRRRR	ET	SR	- PI	RRRRR	ARRAPM -	- RRRRR	VV	RRRR	
PRRRR	QT	SR	- PI	RRRRR	ARRAPM -	- RRRRR	VV	RRRR	
PRRRR	HA	AR	- PV	RRRRR	TRRSSRV	- HRRRR	AV	RRRR	
PRRRR	QA	SR	- PV	RRRRR	TRRSTAE	- RRRRR	VV	RRRR	
PRR	AS	SR	YGRV	RRRRR	ARRSPM -	- RRRR -	MAF	RRRR	A.f
				↓	↓				
				R	AP				
									} Perciformes

g. Conclusió general

Els resultats fins aquí mostrats suggereixen que l'ancestre de la protamina del subordre *Gasterosteidae* comparteix un origen comú amb la protamina de l'ordre dels Perciformes. Aquest origen vindria reflectit per l'organització de la primera part (els primers 35 residus aproximadament). Les espècies més antigues han conservat més el tipus de protamina ancestral, mentre que el canvi evolutiu que ha conduït a les protamines del gènere *Gasterosteus* ha fet que experimentessin una sèrie de modificacions tals com l'elongació i variacions en l'extrem C-terminal, principalment (Fig.III.D.27). Hem de dir, que aquesta permisivitat evolutiva de l'extrem C-terminal pot ser un punt de referència important per entendre el canvi evolutiu d'altres protamines.

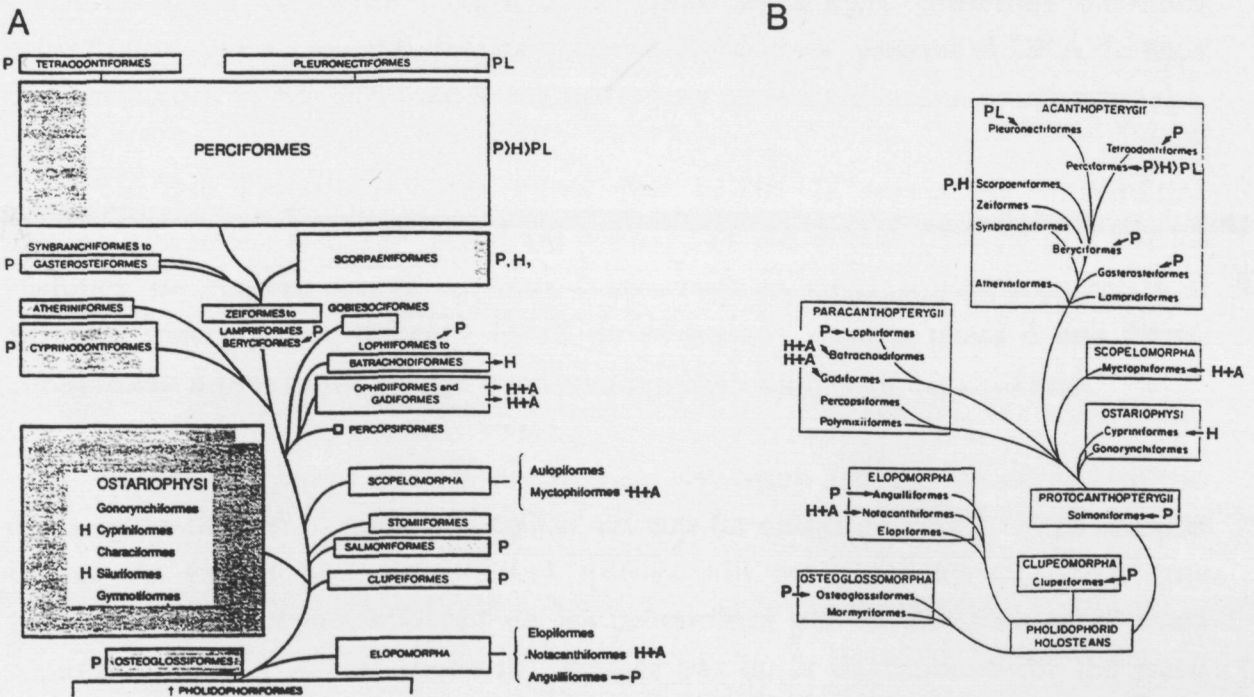
Fig.III.D.27. Arbre filogenètic de les protamines del subordre *Gasterosteidae*.



Un altre punt a destacar és que d'acord amb la ràpida variació genètica dels Gasterosteiformes, les protamines han sofert variacions molt importants dins del mateix subordre molt superiors a les variacions que es donen a les protamines típiques (i inclús, han experimentat variacions notables dintre de la mateixa família, tal i com hem vist). Per comprendre aquest aspecte és interessant comparar les protamines dels Salmoniformes i Perciformes (dos ordres molt

diferents i separats a la filogenia) (Fig.III.D.28), i les protamines de *P. pungitius* i *G. aculeatus* (dos gèneres dintre d'una mateixa família).

Fig.III.D.28. Arbres filogenètic de peixos teleostis. A- Extret de Nelson (1984). B- Extret de Moyle i Cech (1982).



E. Dicertrachus labrax

Hem escollit dos arbres filogenètics diferents perquè de fet, no hi ha un consensus estricte entre la filogenia dels peixos, i en tots dos arbres es pot veure que els Perciformes i els Gasterosteiformes estan "relativament" pròxims.

E. Dicentrarchus labrax

E. *Dicentrarchus labrax*

1. Búsqueda preliminar de l'activitat descondensadora en els òvuls de *D. labrax*

En la primera part d'aquest treball (III.A-D) bàsicament hem estudiat com està composta la cromatina del nucli espermàtic. Els nuclis estan formats per un DNA altament condensat degut a la presència d'unes proteïnes bàsiques específiques que, en general, han desplaçat a les histones, passant el DNA de tenir una estructura en nucleosomes a una estructura molt condensada (compactada).

Un cop l'espermatozoide entra dins l'òocit, la cromatina espermàtica retorna a la seva estructura inicial; les protamines són substituïdes de nou per les histones, de manera que es regenera l'estructura en nucleosomes, formant-se el pronucli masculí. Així doncs, a nivell de cromatina, aquesta passa d'una forma condensada a una forma menys condensada i amb diferent organització.

En aquest apartat tractem precisament del segon aspecte: la descondensació de la cromatina en el nucli espermàtic un cop ha entrat en l'òocit. Hem intentat iniciar un estudi preliminar sobre quines són les proteïnes o factors que participen en el reemplaçament de les protamines per les histones en el nucli espermàtic de *D. labrax* (llobarro), primer pas en la descondensació del nucli espermàtic.

Els estudis *in vivo* i *in vitro* han demostrat que la descondensació de la cromatina espermàtica es dona en dues fases: una primera fase molt ràpida en la qual la cromatina (el nucli) augmenta significativament de volum (on hi ha el reemplaçament de les proteïnes bàsiques per les histones), i una segona fase que és més lenta on hi ha una reestructuració de l'envolcall nuclear i un import de proteïnes cap a l'interior del pronucli (Longo i Kunkle, 1978). El nostre objectiu ha estat l'estudi de la primera fase de descondensació nuclear.

S'han descrit diverses proteïnes i sistemes que participen en el reemplaçament de les protamines per les histones, o bé engalten nucleosomes; en *Xenopus laevis* hi ha la nucleoplasmina, proteïna que recanvia les proteïnes específiques bàsiques per les histones H2A i H2B, actuant per tant en la primera

fase de descondensació (Philpott i Leno, 1992), i reestablint així l'organització en nucleosomes; les proteïnes N1/N2 actuen passant les histones H3 i H4 (Kleinschmidt i Franke, 1982; Kleinschmidt et al., 1985 i 1986; Dilworth et al., 1987); altres proteïnes són la proteïna d'ensamblatge de nucleosomes-1 (NAP-1), amb funció similar a la nucleoplasmina (Ishimi et al., 1984 i 1987; Ishimi i Kikuchi, 1991), i el factor-1 d'ensamblatge de la cromatina (CAF-1), amb funció similar a les proteïnes N1/N2 (Kleinschmidt i Franke, 1982; Kleinschmidt et al., 1985; Dilworth et al., 1987; Smith i Stillman, 1991; Kaufman et al., 1995). D'entre aquestes molècules, la **nucleoplasmina** ha estat descrita com un probable mecanisme genèric universal de remodelació de la cromatina espermàtica (Rice et al., 1995).

Tal i com hem vist en els apartats anteriors i en la bibliografia revisada, tant la forma d'empaquetament del DNA com les proteïnes responsables del mateix, són molt variables, i no tan sols entre diferents grups zoològics, sinó també entre diferents espècies i fins i tot dintre d'una mateixa família (cas d'*E. cirrhosa* i *O. vulgaris*). Si es comparen 2 protamines diferents de dintre d'aquest treball, com per exemple la protamina del cefalòpode *E. cirrhosa* i la protamina P3 del cenogastròpode *M. brandaris*, podem veure com, tot i que les dues protamines tenen la mateixa funció (empaquetar el DNA) i ho fan amb la mateixa eficiència (totes dues empaqueten al màxim la cromatina espermàtica), són molècules molt diferents: la primera molt rica en cisteïna, amb una elevada variabilitat aminoacídica (fins a 10 aminoàcids diferents), i d'elevat pes molecular (formada per 84 residus), mentre que la segona no té cisteïnes i només està formada per 3 tipus d'aminoàcids diferents, éssent una molècula petita (54 residus).

Degut a la gran diversitat que la cromatina espermàtica presenta, és de suposar que els mecanismes d'acció de l'oòcit en la remodelació del complex protamina-DNA han de ser també diversos. Sabem que l'anisogàmia ha conduït a que els gàmetes siguin molt diferents; la major part de les activitats cel·lulars potencials estan concentrades en l'oòcit, mentre que l'espermatozoide es troba molt simplificat, i especialitzat pràcticament en una única funció, la de penetrar en l'oòcit.

En aquest darrer apartat, intentem engegar el tema de l'estudi de les molècules presents en l'oòcit de l'espècie *Dicentrarchus labrax* (llobarro) que

actuen sobre la remodelació de la cromatina del propi espermatozoide. Hem escollit el llobarro perquè és una espècie relativament propera als anfibis, amb una protamina típica similar a la dels mateixos (Kasinsky, 1989; Buesa et al., 1998). Per iniciar aquest tema és més fàcil partir d'un sistema en el que es pugui ser aplicada la metodologia estandaritzada utilitzada en els anfibis.

a. Activació d'oòcits de *D. labrax*

Quan l'oòcit és fecundat, s'engeguen tots els processos de la remodelació de la cromatina (entre d'altres), i per tant, les molècules que hi participen es troben en major quantitat i en estat actiu.

Tal i com s'explica a II.B.2, en aquest treball s'han utilitzat dos tipus d'oòcits activats. Per una banda s'han usat oòcits fecundats amb espermatozoides prèviament irradiats amb llum ultraviolada per tant, oòcits activats *in vitro*, i per altra banda òvuls fecundats *in vivo*.

b. Aplicació dels mètodes estandaritzats per a detectar una molècula "nucleoplasmina-like"

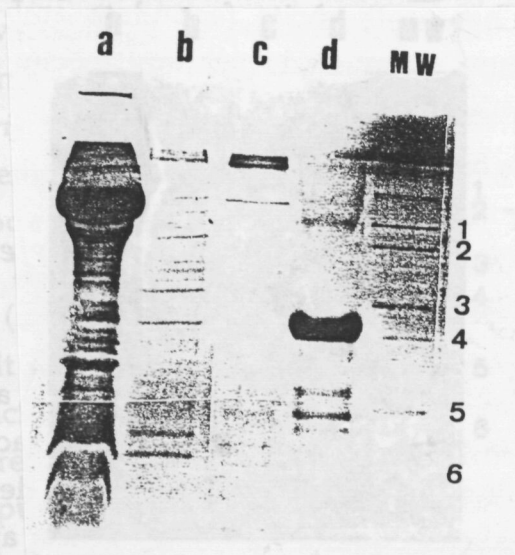
Tal i com ja s'ha esmentat, a *Xenopus laevis* (i altres anfibis) s'ha trobat una proteïna que actua en la primera etapa de descondensació de la cromatina espermàtica, la nucleoplasmina (NP), proteïna que ha estat descrita com a model de molècula universal en realitzar aquesta funció. En aquest apartat hem utilitzat la metodologia emprada en la NP de *Xenopus* per veure si trobàvem una molècula similar en el llobarro. Avancem que en els extractes d'òvuls obtinguts segons aquesta metodologia no hem trobat cap proteïna tipus "NP-like" i que hem hagut de modificar el procediment per trobar un extracte amb activitat descondensadora (tal i com veurem al proper apartat 2).

La metodologia emprada ha estat una combinació dels mètodes de Kawasaki et al. (1994) i Sealey et al. (1989).

A partir d'oòcits de llobarro activats *in vitro* es va obtenir un primer extracte: els oòcits es van homogeneïtzar enfront de tampó d'homogeneïtzació

(EDTA-Mg₂ 1mM, PMSF 1 mM i clorur de benzamidina 10 mM), i després amb tampó de processament (etilenglicol 10% (v/v), sacarosa 250 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 2.5 mM, DTT 2 mM, EDTA-Mg₂ 1 mM, PMSF 1 mM, HEPES 10 mM pH 7.5, i clorur de benzamidina 10 mM), es van centrifugar (12,000 g, 15 min), i es va obtenir un sobrenadant amb totel les proteïnes que conté l'òocit, sobrenadant anomenat **extracte cru inicial**; una alíqüota d'aquest extracte es va córrer en un gel d'SDS, Fig.III.E.1, pou *a*.

Fig.III.E.1. Procés d'obtenció d'un termoestable a partir d'òocits de *D. labrax* utilitzant la metodologia emprada en *Xenopus laevis*. a- extracte cru inicial; b- extracte cru sense lípids; c- Termoestable; estàndard de NP de *Xenopus*; MW- marcador de pes molecular (kDa): 1- 66.3, 2- 55.4, 3- 36.5, 4- 31.0, 21.5, 6- 14.4. Gel d'SDS 15% acrilamida.

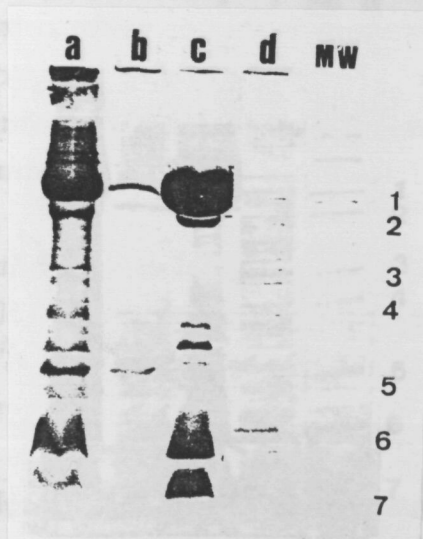


L'extracte cru inicial es va deslipidificar fent una extracció dels lípids i lipoproteïnes amb cloroform:èter (3:1), i es va obtenir un sobrenadant amb només les proteïnes, extracte anomenat **extracte cru sense lípids**, Fig.III.E.1, pou *b*. La NP de *Xenopus* resulta ser termoestable a 80°C, mentre que d'altres proteïnes es desnaturalitzen i per tant floculen a l'arribar a aquesta temperatura. Aprofitant aquesta característica l'extracte cru deslipidificat es va escalfar a 80°C (en presència de 0.0025 volums de PMSF 34 mM) durant 15 min, i centrifugar (17,400 g, 10 min). Al sediment hi havia presents les proteïnes desnaturalitzades, i en el sobrenadant vàrem resuperar les proteïnes resistents, el **termoestable**, Fig.III.E.1, pou *c*.

Tal i com es veu a la Fig.III.E.1, en el termoestable no destaca cap proteïna, i el que és més, durant el procés d'extracció amb cloroform:éter hi ha hagut una important pèrdua de proteïnes (en el gel d'electroforèsi s'han carregat les mateixes quantitats d'extracte, i només cal comparar l'extracte cru inicial amb l'extracte deslipidificat per veure que hi ha hagut una elevada pèrdua).

Es va fer una segona obtenció d'un termoestable aquest cop partint d'un extracte cru sense deslipidificar. La Fig.III.E.2 mostra el resultat. En aquest cas no s'han perdut tantes proteïnes, però tampoc s'han obtingut proteïnes representatives, ja que moltes de les proteïnes presents en ell també s'han trobat en el floculat (desnaturalitzat) format quan l'extracte s'ha escalfat (Fig.III.E.2, pou b).

Fig.III.E.2. Comparació entre el termoestable amb lípids (c) i el delipidificat (d). a- extracte cru inicial; b- proteïnes desnaturalitzades; MW- marcador de pesos moleculars (kDa): 1- 66.3, 2- 55.4, 3- 36.5, 4- 31.0, 5- 21.5, 6- 14.4, 7- 6.0. Gel d'SDS 15% acrilamida.



Tant l'extracte cru, el deslipidificat i el termoestable, es van posar en contacte amb nuclis d'espermatozoides de llobarro per veure si hi havia una activitat de remoció, activitat que es veuria al veure un inflament dels nuclis espermàtics, ja que la protamina estaria éssent substituïda per les histones, passant la cromatina a una forma més relaxada.

Una alíquota de 30 µl de cadascun dels extractes es va posar en contacte amb 1.6 milions de nuclis espermàtics de llobarro, i es van fer observacions al microscopi de contrast de fase a diferents temps (5', 15', 30', 45' i 60'), sense observar cap tipus d'inflament dels nuclis.

Una de les possibles explicacions que donem al fet de que aquests extractes no descondensin els nuclis espermàtics de la pròpia espècie és que, si existeix una "NP-like" a llobarro, aquesta (que té localització nuclear) estaria molt diluïda i per tant la seva eficiència seria gairebé nul·la (s'ha de pensar que la NP dintre de l'oòcit ja es troba diluïda, i a més a més, durant l'obtenció dels extractes s'ha diluït encara més amb l'ús dels tampons d'homogeneïtzació, processament, etc).

Així doncs, l'obtenció d'un termoestable en *Xenopus laevis* que donava lloc a l'enriquiment de l'extracte en la NP, pel cas de *D. labrax* no va funcionar.

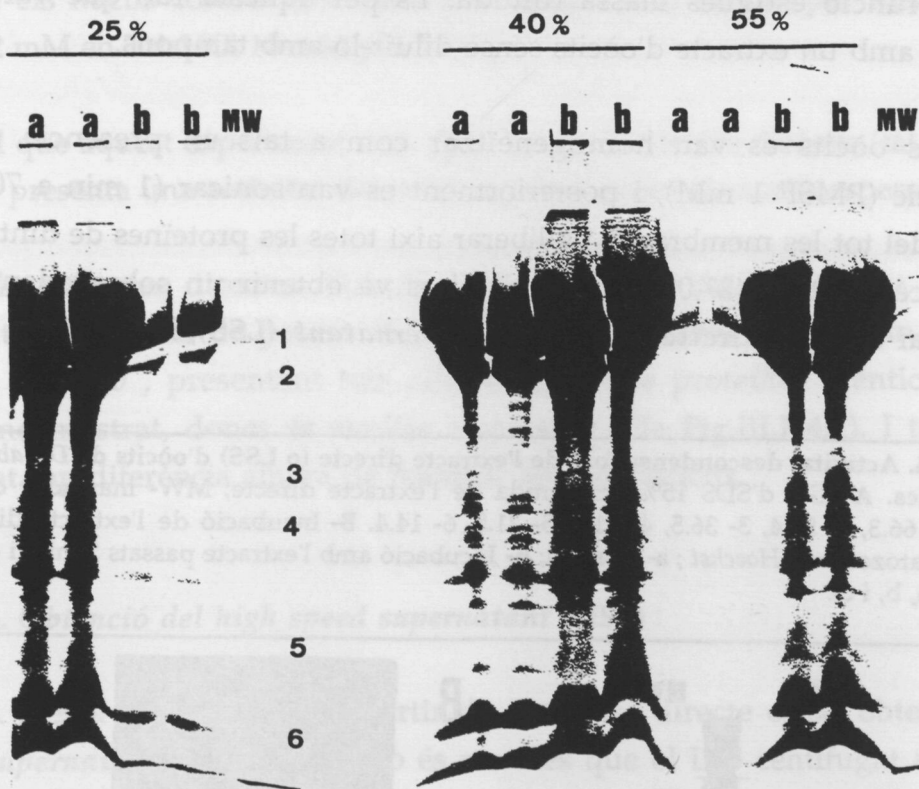
Un segon mètode que s'ha utilitzat en *Xenopus* per enriquir un extracte en NP ha estat la **precipitació amb sulfat d'amoni saturat**: la NP de *Xenopus* és soluble quan està en una solució de sulfat d'amoni saturat al 55%. Es va voler aprofitar també aquesta característica per veure si trobàvem algo semblant en els extractes de *D. labrax*, de manera que l'extracte cru inicial es va portar progressivament a diferents percentatges de saturació de sulfat d'amoni (en TrisHCl 20 mM pH 7.4) fins arribar a un 55% de saturació.

Una alíquota d'extracte cru inicial es va dialitzar enfront de sulfat d'amoni saturat al 25%. Posteriorment es va centrifugar (10,500 g, 15 min), i el sobrenadant es va tornar a dialitzar, aquest cop amb sulfat d'amoni saturat al 40%. De la mateixa manera es va tornar a recuperar el sobrenadant, i es va dialitzar amb sulfat d'amoni saturat al 55%. De totes les diàlisis es van separar alíquotes tant dels sediments (proteïnes precipitades) com dels sobrenadants (proteïnes solubles al percentatge de saturació sotmeses).

Les alíquotes provinents de cada percentatge de saturació (tant sediments com sobrenadants) es van dialitzar extensivament enfront d'aigua abans de ser carregades en el gel d' SDS (per eliminar les sals i que aquestes no interfereixin en el desenvolupament de l'electroforèsi). Tal i com la Fig.III.E.3 mostra, les proteïnes de l'extracte són solubles fins al 25% de saturació, i al 40% es troben

totes en el sediment. Per segona vegada, no es van reproduir els resultats que s'obtenen amb *Xenopus*.

Fig.III.E.3. Proves de precipitació amb sulfat d'amoni saturat amb l'extracte cru inicial de *D. labrax* ; a- sobrenadant; b- sediment. MW- marcador de pes molecular (kDa): 1- 66.3, 2- 55.4, 3- 36.5, 4- 31.0, 5- 21.5, 6- 6.0. Gel d' SDS 15% acrilamida.



Així doncs, es va optar per modificar la metodologia i obtenir uns extractes directes de diferent manera, per trobar l'activitat remodeladora de la cromatina en els oòcits de *D. labrax*.

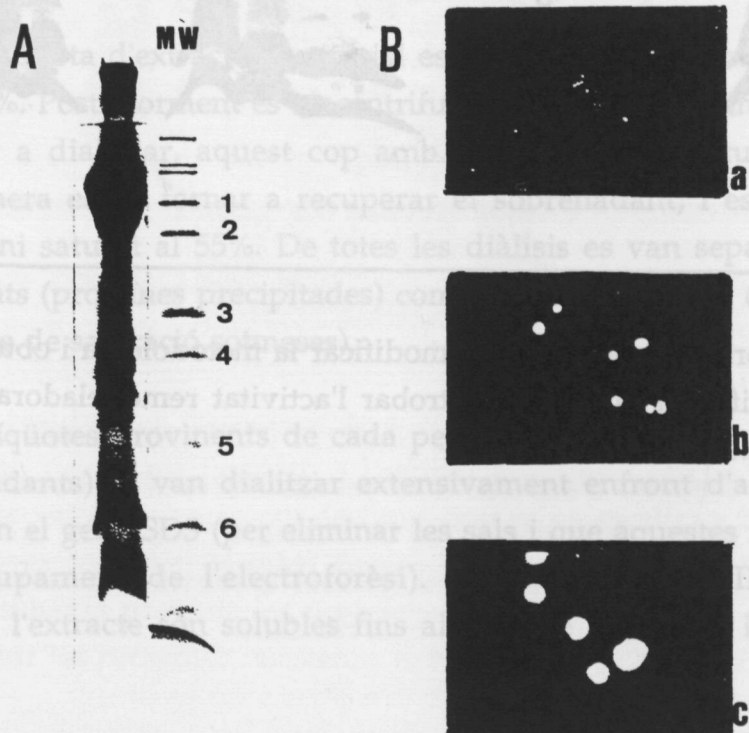
c. Alternatives utilitzades per manifestar l'activitat de l'òcít sobre la nucliprotamina espermàtica

i. Obtenció d'extractes directes (low speed supernatant, LSS)

Tal i com s'ha mencionat en l'apartat anterior, una de les possibles causes per la qual l'extracte d'òcits de *D. labrax* no descondensi el DNA espermàtic de la pròpia espècie, podria ser el fet de que la proteïna (o proteïnes) que participa en aquesta funció estigués massa diluïda. Es per aquesta raó que vàrem decidir treballar amb un extracte d'òcits sense diluir-lo amb tampons.

Els òcits es van homogeneïtzar com a tals en presència d'inhibidor proteolític (PMSF 1 mM), i posteriorment es van sonicar (1 min a 70 wats) per trencar del tot les membranes i alliberar així totes les proteïnes de dintre dels ous. Es van centrifugar (27,000 g, 30 min) i es va obtenir un sobrenadant que es va anomenar **extracte directe o low speed supernatant (LSS)**, Fig.III.E.4A.

Fig.III.E.4. Activitat descondensadora de l'extracte directe (o LSS) d'òcits de *D. labrax* sobre nuclis espermàtics. A- Gel d' SDS 15% acrilamida de l'extracte directe; MW- marcador de pes molecular (kDa): 1- 66.3, 2- 55.4, 3- 36.5, 4- 31.0, 5- 21.5, 6- 14.4. B- Incubació de l'extracte directe amb nuclis d'espermatozoides i *Hoechst*; a- Control; b- Incubació amb l'extracte passats 5 min, i c- passats 10 min. B- 125x (a, b, i c).



El LSS es va incubar amb nuclis de llobarro en presència de *Hoechst*. Aproximadament 32,000 nuclis espermàtics (2 µl) es van incubar amb 2 µl de *Hoechst* (reactiu que s'uneix a la cromatina) i 6 µl de LSS, i la incubació es va seguir al llarg del temps, a temperatura ambient, i mirant al microscopi òptic de fluorescència. Als 5 min de la incubació, els nuclis espermàtics ja augmentaven de volum (Fig.III.E.4B), la cromatina entra en la primera fase de descondensació: els nuclis s'inflen. A la Fig.III.E.4B podem veure la diferència en el volum nuclear que presenten els nuclis incubats amb el LSS (durant 5 i 10 min) amb respecte els nuclis control (incubats amb tampó EM, format per KCl 100 mM i MgCl₂ 2 mM en TrisHCl 10 mM pH 7.4).

El que aquest experiment està dient és que l'extracte d'oòcits (tal i com calia esperar) presenta una **activitat descondensadora** sobre els nuclis espermàtics.

Els extractes directes d'oòcits es van obtenir indiferentment dels oòcits fecundats provinents de peixos alimentats amb diferents dietes, com dels oòcits activats *in vitro*, presentant tots ells un patró de proteïnes idèntic en un gel d' SDS (no mostrat, doncs és similar al present a la Fig.III.E.4A). I tampoc han presentat cap diferència alhora de realitzar les incubacions.

ii. *Obtenció del high speed supernatant (HSS)*



A més a més del LSS, a partir de l'extracte directe es va obtenir el *high speed supernatant (HSS)*, que no és res més que el LSS centrifugat a 153,400 g, durant 1h a 4°C, recuperant un sobrenadant molt més net.

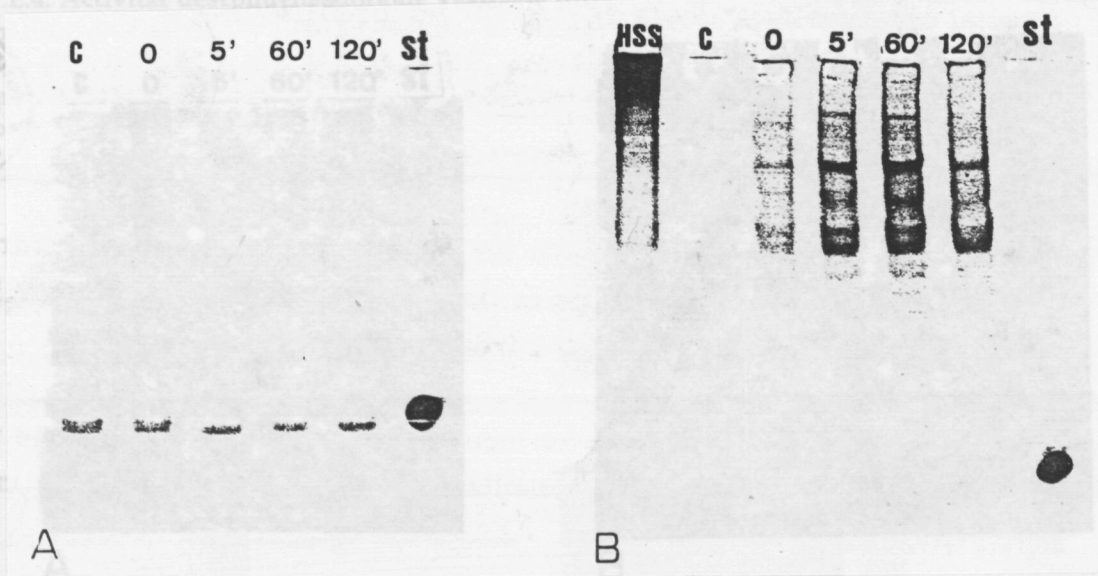
Amb el HSS també es van fer incubacions amb nuclis de llobarro utilitzant el mètode del *Hoechst*, i els resultats van ser els mateixos, la cromatina espermàtica s'inflava.

Un cop se sabia que la cromatina espermàtica es descondensava en presència d'extractes d'oòcits, es va procedir a averiguar si hi havia un desplaçament de la protamina espermàtica durant aquest procés. Per això es van fer incubacions de nuclis espermàtics amb el HSS a diferents temps, i es va mirar en cada temps el desplaçament de la protamina.

Es van incubar 1 milió de nuclis espermàtics de llobarro amb 150 µl de HSS, durant 5min, 1h i 2h, a temperatura ambient. Passat el temps d'incubació es van separar els nuclis dels sobrenadants, i es van extreure les proteïnes de tots dos (usant la metodologia descrita a II.C.9). Com a control, els nuclis es van incubar amb tampó EM.

La finalitat de la incubació era la de trobar una disminució en la quantitat de protamina en els nuclis espermàtics a mida que avançava el temps d'incubació, mentre que aquesta augmenta la seva presència en els sobrenadants, el que estaria indicant que la protamina estaria éssent remoguda dels nuclis (i equivaldria a l'inflament dels nuclis observats al microscopi de fluorescència) cap a l'exterior (sobrenadant). El resultat de la incubació es pot veure a la Fig.III.E.5.

Fig.III.E.5. Incubació de nuclis espermàtics amb HSS, per veure l'activitat de remoció que present l'extracte d'oòcits. A- Proteïnes extretes dels nuclis incubats. B- Proteïnes extretes dels sobrenadants resultants de la incubació. C- control; 0', 5', 60' i 120'- diferents temps d'incubació; HSS- estàndard; st estàndard de protamina de *D. labrax*. GPAU 6.25M urea/15% acrilamida.



Tal i com es pot veure comparant la figura A (nuclis) i la B (sobrenadants), en la incubació control la protamina es troba al complet en els nuclis, i quan s'incuba amb l'extracte (HSS) la quantitat de protamina va disminuïnt en els

nuclis i apareix en els sobrenadants a mida que el temps avança. Als 5 min ja tenim protamina desplaçada, en els sobrenadants i després d'1h, i a les 2h, en els sobrenadants hi ha més quantitat. Així doncs, l'extracte està desplaçant protamina dels nuclis espermàtics. De tota manera cal fer notar que la proporció de protamina remoguda és relativament baixa, i que en aquestes condicions no sembla que pugui ser desplaçada totalment.

Un aspecte que destaca és la presència de bandes electroforètiques que migren com les histones en els nuclis espermàtics incubats. En els gels d'electroforèsi pertanyents a les proteïnes nuclears extreïdes dels nuclis incubats amb l'extracte, a més a més de les restes de protamina hi ha bandes co-migrants amb histones. Les possibles histones dels nuclis incubats no s'aprecien molt bé en el GPAU de la Fig.III.E.5A, però en d'altres gels sí que es veuen. Un d'ells és el de la incubació que es mostra a la Fig.III.E.6A (tal i com s'explica més endavant).

S'han repetit múltiples vegades aquestes incubacions, utilitzant tant extractes directes del tipus LSS, com HSS dels oòcits fecundats provinents de peixos alimentats amb diferents dietes, com dels oòcits activats *in vitro*, i els resultats han estat tots ells reproduïbles.

iii. *Suplementació de l'extracte per augmentar la seva activitat*

En els experiments anteriors s'ha posat de manifest que tant l'extracte directe (LSS) com el HSS són capaços de descondensar la cromatina espermàtica (inflar els nuclis) per una banda, i per altra banda remoure parcialment la protamina. Aquest és el primer pas per la formació del pronucli masculí. Però *in vivo*, els extractes d'oòcits han de ser capaços de produir una remodelació completa de la cromatina, és a dir, desplaçar totalment la protamina nuclear (per afegir histones), i això no ho hem vist, ja que en els nostres resultats només hem obtingut una petita part de remoció de protamina (tal i com s'ha vist a la Fig.III.E.5, on en els nuclis encara queda força quantitat de protamina i com a conseqüència, en els sobrenadants hi ha molt poca).

Per intentar incrementar l'activitat de remoció de l'extracte d'oòcits, aquest s'ha **suplementat amb ATP** i tot el sistema de regeneració de l'ATP per una banda, i se li ha afegit una **combinació (cóctel) d'inhibidors** per altra, per

assegurar-nos de que la causa de la baixa activitat no fos per una possible proteòlisi de l'extracte.

- Efecte de l'ATP

El fet de que les protamines siguin desplaçades és perquè en el seu lloc siguin introduïdes les histones, ensamblant-se els nucleosomes. Se sap que l'ensamblatge de la cromatina en extractes crus d'òcits de *Xenopus laevis* (Glinkin et al., 1984), de cèl.lules HeLa (Banerjee i Cantor, 1990) o d'embrions de *Drosophila melanogaster* (Becker i Wu, 1992; Kamakaka et al., 1993) és un procés dependent d'ATP.

Es van fer incubacions de nuclis espermàtics de *D. labrax* amb extracte directe (LSS) suplementat amb ATP (seguint el mètode descrit a Berrios i Avilion, 1990). Una quantitat de 150 µl de LSS es van suplementar amb ATP-Mg²⁺ 2 mM, fosfocreatina 20 mM i creatinquinasa 50 µg/ml, per tal d'afegir tant una font d'energia (ATP) com un sistema regenerador d'ATP (fosfocreatina i creatinquinasa) a l'extracte.

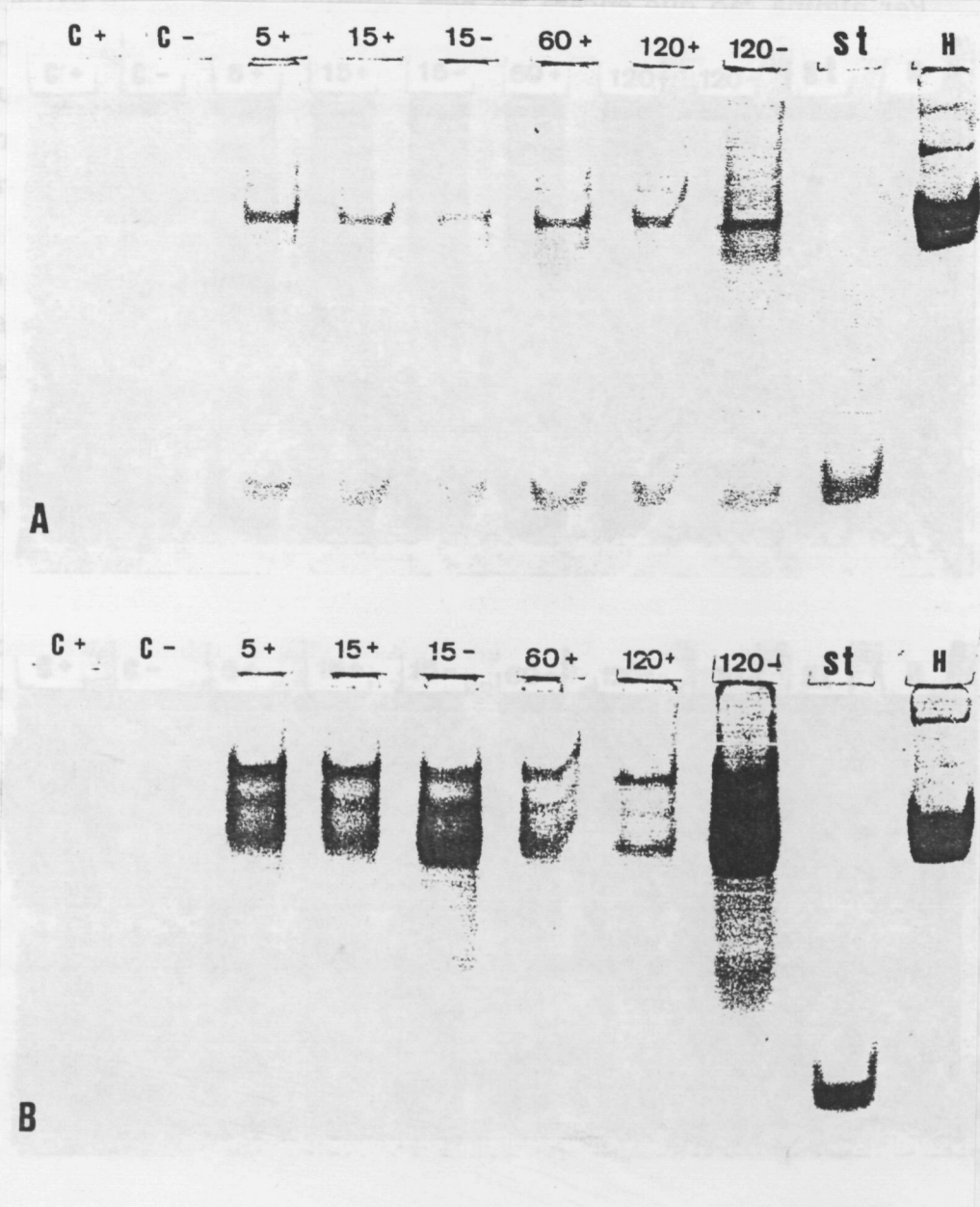
Un milió de nuclis espermàtics de llobarro es van incubar amb LSS suplementat, durant diferents temps (5 min, 15 min, 1h i 2h30 min), i alhora es va fer un incubació paral.lela amb el LSS sense suplementar. De les incubacions es van separar els nuclis dels sobrenadants i es van extreure les seves proteïnes. El resultat va ser idèntic al trobat anteriorment: en els sobrenadants trobàvem protamina que havia estat remoguda dels nuclis, però l'ATP no havia tingut cap efecte potenciador sobre l'activitat de l'extracte, ja que tant les incubacions amb ATP com sense donaven el mateix resultat (equivalent al trobat a la Fig.III.E.5).

- Efecte dels inhibidors proteolítics

Hem provat l'efecte que podia tenir un còctel de diversos inhibidors proteolítics sobre l'activitat de l'extracte dels òcits. El HSS es va suplementar amb 10 µg/ml de cadascun dels següents inhibidors: antipaina, aprotinina, leupeptina, pepstatina A, i DTT 2 mM (modificant el mètode descrit a Berrios i Avilion, 1990).

De la mateixa forma que en els casos anteriors, es va incubar un milió de nuclis espermàtics amb 150 µl de HSS suplementat i sense suplementar amb el còctel d'inhibidors, relitzant la incubació a diferents temps (5 min, 15 min, 1h i 2h) (de fet, als temps 5' i 1h, la incubació es va fer només suplementada). Tal i com la Fig.III.E.6 mostra, de nou no obtenim cap diferència en quan a activitat entre tos dos extractes.

Fig.III.E.6. Incubació de nuclis espermàtics amb HSS suplementat (+) i sense suplementar (-) amb un còctel d'inhibidors a diferents temps (v. text). A- Proteïnes extretes dels nuclis incubats. B- Proteïnes extretes dels sobrenadants resultants. C- control; st- estàndard de protamina de *D. labrax* ; H- estàndard d'histones d'eritròcit de pollastre. GPAU 6.25M urea/15% acrilamida.



En aquesta figura, tal i com ja s'ha mencionat, els nuclis espermàtics presenten proteïnes que, si ens atenim a la seva mobilitat electroforètica, podrien ser histones. Hem de tenir en compte que en el *pool* present en l'òvul hi ha d'haver histones amb funció de substituir a la protamina per reestablir-se l'estructura dels nucleosomes.

Es va fer una combinació de HSS suplementat amb ATP (i el sistema regenerador) i el cóctel d'inhibidors, i es va incubar amb nuclis espermàtics, però el resultat continuava éssent equivalent al trobat fins al moment, no aconseguíem incrementar l'activitat de l'extracte.

Per alguna raó que encara no hem esbrinat, obtenim un extracte d'òcits que remou protamina dels nuclis espermàtics però que, funcionalment no és completament competent, ja que no produeix la remoció total. Les causes poden ser múltiples, doncs és un tema molt ampli i obert al seu estudi, de manera que cal aprofundir en ell. Vàrem pensar que potser el pH de l'extracte no era l'adequat per promoure al complet el desplaçament de la protamina, així és que es va mesurar i va donar un pH de 7.0, pH fisiològic idoni perquè l'extracte pogués actuar. Així doncs, el pH no és el responsable de la baixa eficiència de l'extracte. Altres aspectes que podrien estar involucrats serien la concentració de sals que de bon principi presenten els òcits, refererint-nos als òcits fecundats *in vivo*, ja que han estat òcits recollits en aigua de mar, i tot i que aquesta s'ha eliminat, han pogut quedar restes (però aquest aspecte no s'aplica als òcits activats *in vitro*, els quals actuen igual que els primers).

Els extractes d'òcits han de presentar tota la maquinària necessària per reemplaçar les proteïnes bàsiques específiques per les histones; per una banda han d'estar presents les proteïnes, factors o proteïna (podem pensar en una molècula "NP-like ") que realitzin la funció, i per altra banda ha d'haver un *pool* d'histones (histones emmagatzemades) que siguin les que reemplaçaran a les proteïnes que empaqueten tan fortament al DNA (Adamson i Woodland, 1977; Poccia et al., 1981; Salik et al., 1981). Hem fet electroforèsis bidimensionals d'extractes d'òcits, separant les proteïnes en una primera dimensió en un gel/poliacrilamida/tritó/urea (GPTU), i desenvolupant la segona dimensió en un gel d' SDS al 15% d'acrilamida, i hem pogut localitzar les histones presents en aquests extractes (no mostrat). Un dels temes (dintre d'altres) que ens ha quedat per resoldre ha estat el de trobar específicament quines són les histones que s'han

unit al DNA durant el recanvi, diferenciant-les d'entre les histones presents en el *pool* de l'òvul.

Tot i que l'extracte no és completament competent, si que és vàlid per a intentar examinar els primers passos en la remodelació del nucli espermàtic, és a dir, la descondensació immediata degut a la remoció de la protamina. El següent pas que ens vàrem plantejar va ser el delimitar quines proteïnes o factors participaven en aquesta funció.