

TESI DOCTORAL

Pepita Giménez Bonafé

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

Novembre, 1999

4. Organització del genoma en el nucli espermàtic

L'organització de la cromatina espermàtica en una arquitectura específica té sentit per diverses raons:

La precisió en la forma i les dimensions del nucli és extraordinàriament elevada (tret possiblement dels espermatozoides humans). En algunes soques de ratolí estudiades, el 95% dels nuclis espermàtics tenen exactament la mateixa forma i dimensions, i els coeficients de variació són només del 4% (Wyrobeck et al., 1976). La forma i el volum del nucli espermàtic ha d'estar sota control genètic, ja que els defectes en la morfogènesi nuclear (forma, volum i condensació de la cromatina) condueixen a una fertilitat disminuïda (Meistrich, 1993). La morfogènesi del nucli espermàtic es troba determinada per una sèrie de factors entre els quals forma part l'arquitectura de la condensació de la cromatina.

Una altra raó més important per a l'organització del genoma en el nucli espermàtic prové de la necessitat que es puguin transcriure els gens apropiats immediatament després de la fertilització; el mecanisme de metilació de certs gens del DNA espermàtic pot ser una de les premisses necessàries per a la regulació del genoma embrionari, i l'accessibilitat immediata d'aquests gens en pot ser una altra.

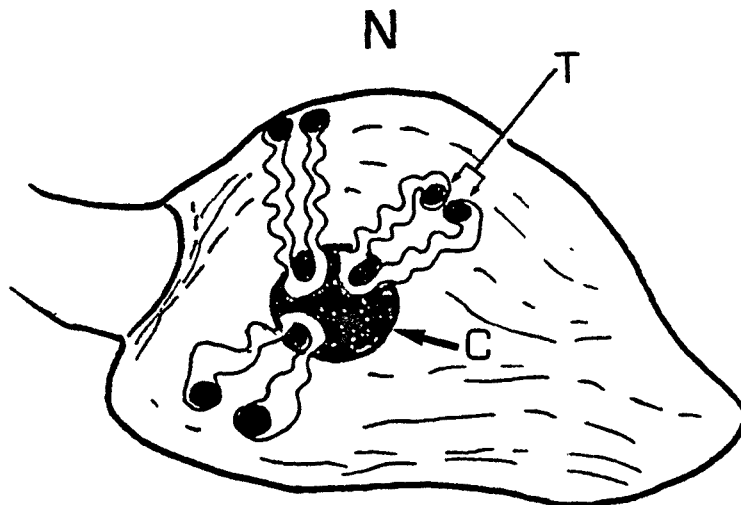
El desenvolupament de les diverses tècniques d'hibridació *in situ* i de la microscòpia confocal ha aportat informació interessant sobre la localització dels diferents dominis cromosòmics en els nuclis. Aquestes tècniques s'han aplicat fonamentalment als nuclis somàtics on s'ha demostrat que els cromosomes ocupen diferents territoris, que les disposicions dels centròmers i telòmers varien organitzadament d'acord amb el cicle cel·lular, i també que la matriu nuclear organitza el cromosoma somàtic (Stroubolis i Wolfe, 1996; Hozak, 1996, i referències incloses). Els estudis sobre l'arquitectura del genoma en l'espermatozoide encara són escassos. Els estudis per microscòpia òptica ja han demostrat des de fa temps que la cromatina dels centròmers ocupa llocs especials i reproduïbles en els nuclis de les espermàtides i espermatozoides (Schmid i Krone, 1975 i 1976; Dressler i Schmid, 1976).

Més recentment Powell et al. (1991) han examinat la distribució de diferents seqüències de DNA repetitiu en l'espermatozoide boví a través de la hibridació

amb sondes específiques. En aquests experiments s'observava que algunes sondes presentaven una distribució a l'atzar, mentre que d'altres (concretament les que hibridaven amb les seqüències centromèriques i DNA ribosòmic) es col·locaven en una fina banda equatorial. Sembla clar que el DNA centromèric ocupa una posició predeterminada en el nucli espermàtic, la qual cosa podria estar relacionada amb la unió d'una histona especial a aquest DNA (Palmer et al., 1991).

Altres experiments han demostrat la preservació del centròmer com un domini cromosòmic en l'espermatozoide humà i també interaccions específiques entre centròmers de cromosomes no homòlegs i entre telòmers. En un estudi combinat de fluorescència d'hibridació *in situ*, microscòpia convencional d'epifluorescència i microscòpia confocal d'escandiallatge per làser, Zalensky et al. (1995) defensen que el DNA de l'espermatozoide no està distribuït a l'atzar, sinó que hi ha almenys unes certes regions distribuïdes específicament (v. Fig.I.A.11). En un altre tipus d'estudi, Gatewood et al. (1987) varen examinar la distribució de seqüències poc repetitives de DNA en l'espermatozoide humà. En el seu treball varen obtenir separatament una fracció de DNA (un 15%) associat a histones i una fracció (85%) associat a protamines i varen demostrar que cada una d'aquestes fraccions contenien seqüències específiques i, per tant, uns gens concrets es trobarien associats a la protamina.

Fig.I.A.11. Organització dels cromosomes en l'interior del nucli espermàtic (N); C- Cromocentre (en l'interior); T- Telòmers disposats a la perifèria.



La matriu nuclear espermàtica hauria de ser la base estructural per a l'organització de la cromatina espermàtica. Els estudis morfològics són contradictoris (v. la revisió de Meistrich, 1993), però Bellvé (1982) descriu una matriu de material fibrós a l'interior del nucli espermàtic del ratolí. Altres investigadors defensen que, en cas d'existir, la matriu nuclear espermàtica no estaria formada per les laminines típiques que conformen la matriu somàtica (Moss et al., 1987). Ward et al. en una sèrie de treballs (Ward i Coffey, 1989, 1990 i 1991; Ward i Cummings, 1991; Ward et al., 1989) han detectat la presència d'una matriu de composició desconeguda en l'espermatozoide d'hàmsster. Proposen un model d'arquitectura nuclear en alguns aspectes similar al somàtic (explicat en el peu de la Fig.I.A.12). Malgrat que aquest model no ha estat comprovat, serveix com a indicador de l'existència d'elements estructurals que poden organitzar la cromatina i donar suport estructural al nucli espermàtic.

En síntesi, els experiments són escassos però suggereixen que els diferents gens no es troben empaquetats i col·locats de qualsevol manera sinó que alguns d'ells ocuparien posicions especials i crítiques en el nucli espermàtic, mentre que d'altres es podrien trobar associats a subpoblacions específiques de proteïnes espermàtiques. De fet, la consideració de la precisió i la reproductibilitat en l'empaquetament de la cromatina espermàtica i dels seus processos durant l'espermioogènesi ens condueix a comparar-la amb l'especificitat de la condensació del cromosoma mitòtic: "... és molt difícil imaginar com es pot produir una condensació reproduïble dels cromosomes (mitòtics) sense l'existència de llocs en *cis* que serveixin com a marcadors específics per a dirigir la condensació" (Koshland i Strunnikov, 1996).

5. Evolució de l'estructura de la cromatina espermàtica

Un dels aspectes més sorprenents de l'estructura de la cromatina espermàtica és la manca d'un model representatiu i la gran variabilitat entre diferents espècies. Aquest fet es troba indiscutiblement associat, entre altres coses, a la també extraordinària variabilitat de les proteïnes específiques espermàtiques i dels processos de recanvi proteic durant l'espermioogènesi.

Les idees sobre l'evolució de les proteïnes específiques del nucli espermàtic porten implícita una concepció de l'evolució de l'estructura de la cromatina. El

concepte més repetit en la bibliografia és que les protamines provenen de les histones, possiblement de la H1, per mitjà d'una progressiva basificació dels seus extrems i finalment mitjançant una pèrdua de la zona globular (Subirana i Colom, 1987; Ausió, 1995). Simplificadament:

Histona H1 —————> **Protamines intermèdies** —————> **Protamines**
(histones modificades)

Per raó que en alguns espermatozoides es troben histones canòniques, en altres histones *linker* modificades, i en d'altres simplement protamines, la conseqüència immediata és que l'estructura de la cromatina espermàtica ha seguit el procés següent:

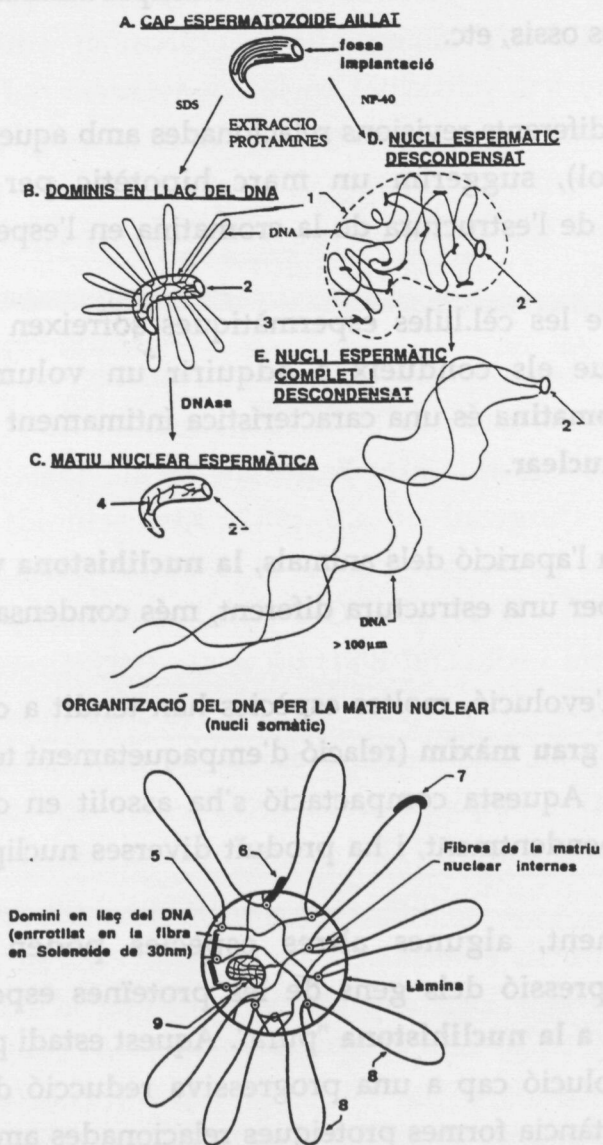
Nuclihistona —————> **Nuclihistona modificada** —————> **Nucliprotamina**

Aquest model, malgrat que és simple i que pot ser cert en casos particulars, no és en absolut aplicable a nivell general (Chiva et al., 1995; Saperas et al., 1994 i 1996; i la introducció de Kasinsky, 1995). És impossible harmonitzar-lo amb els següents fets:

1. La cromatina espermàtica de tipus nuclihistona "pura" es troba esporàdicament en animals que no es poden considerar d'ascendència "primitiva", sinó en animals que varen aparèixer relativament tard en l'evolució: s'ha descrit nuclihistona pura en alguns peixos ossis, també en algunes espècies aïllades de bivalves i en *Limulus polyphemus* (Saperas et al., 1994; Ausió, 1995; Muñoz Guerra et al., 1982, respectivament).

2. Els animals d'ascendència més primitiva (és a dir, els que varen aparèixer primer) estudiats en aquest aspecte són els Cnidaris. Aquest grup no conté nuclihistona en el seu espermatozoide sinó que el DNA es troba organitzat exclusivament per una proteïna intermèdia (una proteïna amb un cor globular de tipus H1 i uns extrems de tipus protamina). Els Cnidaris es varen separar molt tempranament de la resta d'animals, però ja presenten aquesta proteïna especialitzada (Rocchini et al., 1996). Això indica que la nuclihistona espermàtica es va perdre en estadis molt antics de l'evolució (si és que va existir alguna vegada com a model ancestral).

Fig.I.A.12. Model de Ward i Coffey segons el qual es proposa una organització del nucli espermàtic similar en certs aspectes a l'arquitectura general dels nuclis somàtics. El genoma espermàtic (a dalt) es trobaria ancorat i organitzat per diverses estructures tals com la teca perinuclear (1), l'anell nuclear (2), i la matriu nuclear espermàtica (3 i 4). La matriu també organitzaria el DNA espermàtic en llaços (*loops*) de diferent mida. A sota: esquema de l'organització del nucli somàtic i, llocs d'unió del DNA a la matriu (5); gen actiu (pròxim a la matriu) (6); gen inactiu (7); dominis en *loop* del DNA (8); nuclèol residual (forma part del complex de la matriu nuclear).



3. El seguiment de qualsevol línia filogenètica no indica que s'hagi respectat estrictament la tendència **nuclihistona** → **nucliprotamina** dins de cada una d'elles, encara que sí es pot aplicar a casos particulars. Com a exemple, en

revisar les proteïnes que estructurin la cromatina en diversos taxons de Deuteròstoms (Chiva et al., 1995) s'observa que: els equinoderms posseeixen nuclihistona especialitzada; els tunicats i els cefalocordats, nucliprotamina; els agnats, nuclihistona pura; els condrictis exhibeixen una nucliprotamina molt especialitzada similar en certs aspectes a la dels mamífers; els peixos ossis contenen nuclihistona pura, nuclihistona especialitzada o nucliprotamina segons els diferents grups; els amfibis poden contenir nuclihistona especialitzada, una organització intermèdia entre nuclihistona i nucliprotamina, i nucliprotamina similar a alguns peixos ossis, etc.

A partir de les diferents revisions relacionades amb aquest tema (i citades al llarg d'aquest capítol), suggerim un marc hipotètic per a interpretar les "evolucions" diverses de l'estructura de la cromatina en l'espermatozoide:

1. Els nuclis de les cèl.lules espermàtiques sofreixen contínuament una pressió evolutiva que els condueix a adquirir un volum molt reduït. La **condensació de la cromatina** és una característica íntimament relacionada amb la **reducció del volum nuclear**.

2. Molt aviat en l'aparició dels animals, **la nuclihistona va ser reemplaçada** en l'espermatozoide per una estructura diferent, més condensada.

3. Al llarg de l'evolució, moltes espècies han tendit a **compactar el DNA espermàtic fins a un grau màxim** (relació d'empaquetament tendint al valor 1 en les nucliprotamines). Aquesta compactació s'ha assolit en diverses línies i en diversos temps independentment, i ha produït diverses nucliprotamines.

4. Contràriament, algunes altres espècies poden haver perdut la funcionalitat de l'expressió dels gens de les proteïnes específiques, i la seva cromatina ha **revertit a la nuclihistona "pura"**. Aquest estadi pot ser un nou punt de partida d'una evolució cap a una progressiva reducció del nucli, on poden adquirir molta importància formes proteïques relacionades amb la histona H1.

Resumidament, sembla que hi ha hagut una gran independència entre les línies taxonòmiques, i també un gran nombre de reversions a nuclihistona dins d'un marc general de tendència a la reducció del volum nuclear.

Un dels objectius generals d'aquest treball és el d'analitzar alguns casos especials que ens ajudin a comprendre, almenys parcialment, alguna d'aquestes aparents contradiccions.

B. La remodelació de la cromatina espermàtica

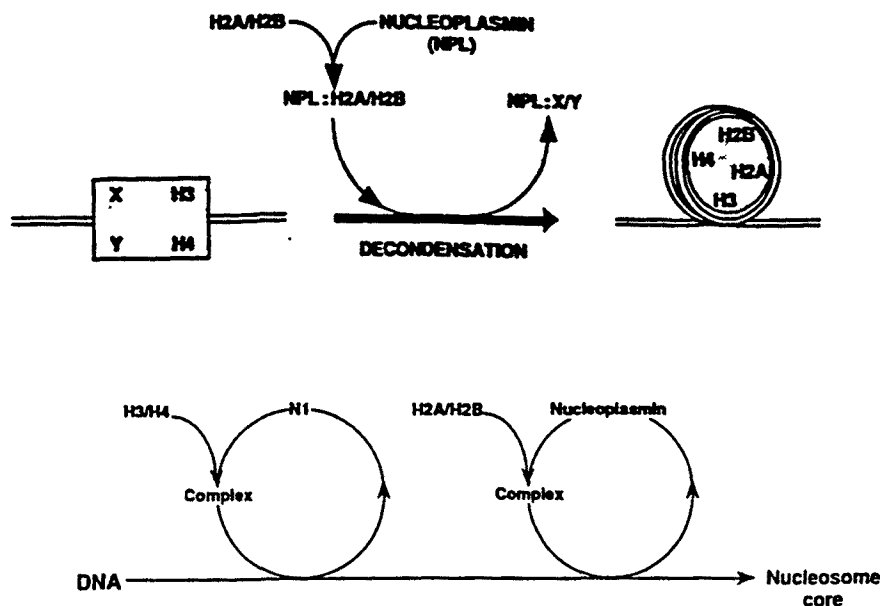
En les cèl·lules eucariotes, els canvis en l'estructura de la cromatina tenen un elevat impacte en molts processos cel·lulars, tals com la regulació de l'expressió gènica, la recombinació, la reparació del DNA, etc. Particularment tenim el cas de la **fertilització**, on la **cromatina espermàtica és completament remodelada** en el citoplasma de l'ou. Un cop el nucli de l'espermatozoide ha entrat en l'ou, la cromatina tant condensada que presenta el nucli espermàtic es descondensa, i les proteïnes bàsiques nuclears espermàtiques (SNBP's) sintetitzades durant l'espermatogènesi i que han participat en la condensació del DNA espermàtic, són reemplaçades per les histones presents en el citoplasma de l'òcit. Aquesta reestructuració de la cromatina fa que el nucli espermàtic passi de la forma compactada a tenir una estructura en nucleosomes, condició necessària per la formació del pronucli masculí (v. Poccia, 1986).

S'han descrit diverses proteïnes i factors que actuen en l'ensamblatge de la cromatina en nucleosomes, tals com la nucleoplasmina i les proteïnes N1/N2 en *Xenopus laevis* (Laskey et al., 1978; Earnshaw et al., 1980; Sealy et al., 1986; Bürglin et al., 1987; Dingwall et al., 1987; Kleinschmidt i Frankle, 1982; Kleinschmidt et al., 1985 i 1986; Dilworth et al., 1987), la proteïna 1 d'ensamblatge de nucleosomes (NAP-1) i la proteïna CRP1 en *Drosophila melanogaster* (Ishimi et al., 1984 i 1987; Ishimi i Kikuchi, 1991; Ito et al., 1996; Crevel et al., 1997), i el factor 1 d'ensamblatge de la cromatina (CAF-1) en mamífers (Smith i Stillman, 1989 i 1991; Kaufman et al., 1995), entre d'altres. La nucleoplasmina (i la proteïna CRP1) i la proteïna NAP-1 desplaçarien les SNBP's del nucli condensat i en el seu lloc posarien les histones H2A i H2B, mentre que la proteïna N1/N2 i CAF-1 interaccionarien més amb les histones H3 i H4, reconstituïnt-se d'aquesta manera l'estructura en nucleosomes, Fig.I.B.1.

La **nucleoplasmina** ha estat descrita com a model conegut de proteïna que actua en la remodelació de la cromatina, reestructurant els nucleosomes durant la fecundació. És la proteïna més abundant trobada en els òcits i òvuls de *Xenopus laevis* (presentant una ubicació nuclear), i té el paper d'actuar en la primera etapa de descondensació de la cromatina espermàtica. Quan la fecundació té lloc, hi ha dos fases de descondensació: una primera etapa molt ràpida, on es dona el recanvi proteic (les protamines, genèricament parlant, són reemplaçades per les histones presents en l'ou) i per tant hi ha un inflament immediat de la cromatina, i una

segona etapa, més lenta, on hi ha una sèrie d'esdeveniments, com transport nuclear, que faran que la membrana nuclear es reconstitueixi (Longo i Kunkle, 1978).

Fig.I.B.1. Model que il·lustra la reestructuració de la cromatina espermàtica un cop donada la fecundació. La nucleoplasmina desplaçaria les proteïnes bàsiques nuclears espermàtiques (X, Y) i col·locaria en el seu lloc les histones H2A i H2B. En la col·locació de les histones H3 i H4 intervindria la proteïna N1/N2. Tot això a *Xenopus laevis*. (Tret de Laskey i Leno, 1990; Laskey et al., 1993, respectivament).



Tal i com s'ha mencionat, la nucleoplasmina ha estat trobada i estudiada en amfibis, però no hi ha cap prova de que sigui una molècula universal, un sistema de remodelació idèntic en totes les espècies. Si considerem la extraordinària variabilitat que presenta la cromatina espermàtica, es fa difícil pensar en l'existència d'una única proteïna universal que actuï en la descondensació del nucli espermàtic.



II. Materials i Mètodes

A. Material biològic

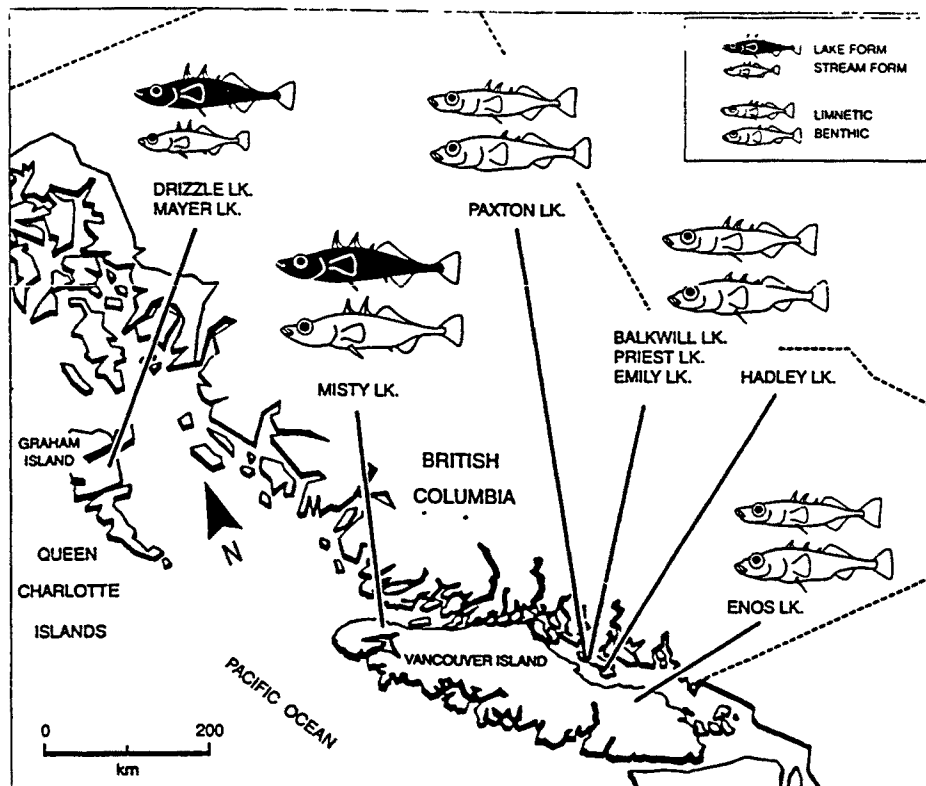
1. *Espècies estudiades*

Les espècies estudiades en aquest treball pertanyen a dos grups zoològics diferents. Per una banda hem treballat amb Mol.luscs, tals com els cefalòpodes (pops) i cenogastròpodes (un tipus concret de cargol de mar), i per altra banda hem estudiat peixos teleostis. En tot moment en el que hem estat interessats ha estat amb les gònades, i altres òrgans reproductors que continguessin les gàmetes corresponents (espermatozoides i oòcits).

Dintre dels **Cefalòpodes**, hem estudiat dues espècies que pertanyen a la mateixa família (*Octopodidae*): *Eledone cirrhosa* (conegut vulgarment pel nom de popet), i *Octopus vulgaris* (pop galleg). S'ha treballat amb les gònades, epidídim i espermatòfors d'aquests animals. Les espècies han estat adquirides directament de pescadors, o en els mercats (sobretot el Mercat de la Boqueria de Barcelona), provinents totes elles de la costa Mediterrània catalana. El mateix ha estat pel cas del **Cenogastròpode** *Murex brandaris* (conegut com a cargol punxer). En tots tres casos, l'adquisició de les espècies ha estat durant els mesos de maig a juliol, on trobàvem les gònades en un estat més o menys avançat de maduració. El material biològic extret dels animals s'ha guardat a -20°C.

Pel que fa referència als **Peixos teleostis**, diverses de les espècies amb les que s'ha treballat pertanyen al subordre *Gasterosteoidi*, (Gasterosteiformes) i en anglès es coneixen pel nom genèric d'*sticklebacks* (peix espinós). Dintre d'aquest grup hem estudiat les espècies *Gasterosteus aculeatus* (G.a), la subespècie *Gasterosteus aculeatus trachurus* (G.a.t), *Gasterosteus wheatlandi* (G.w), *Pungitius pungitius* (P.p) i *Aulorhynchus flavidus* (A.f). D'aquests peixos s'ha treballat exclusivament amb la gònada (3-4 mm) degut al tamany tan petit dels conductes deferents. La procedència d'aquests peixos ha estat canadenca: les espècies G.a, G.a.t i A.f provenen de l'oceà Pacífic, de diferents llacs de l'Illa de Vancouver, a la Columbia Britànica (Fig.II.A.1), i G.w i P.p de diferents llacs del Québec. Al llarg de molts anys (1983-1997) s'han anat col·lectant gònades de les diferents espècies durant els mesos de maig i juny. La major part del material utilitzat ha estat conservat en etanol al 90%, a -20°C. La majoria del material ha estat cedit pel Dr. Harold Kasinsky, de la University of British Columbia (UBC), a Vancouver, Canadà.

Fig.II.A.1. Distribució d'algunes de les espècies de Gasterosteiformes en diferents llacs de la Columbia Britànica (Canadà).

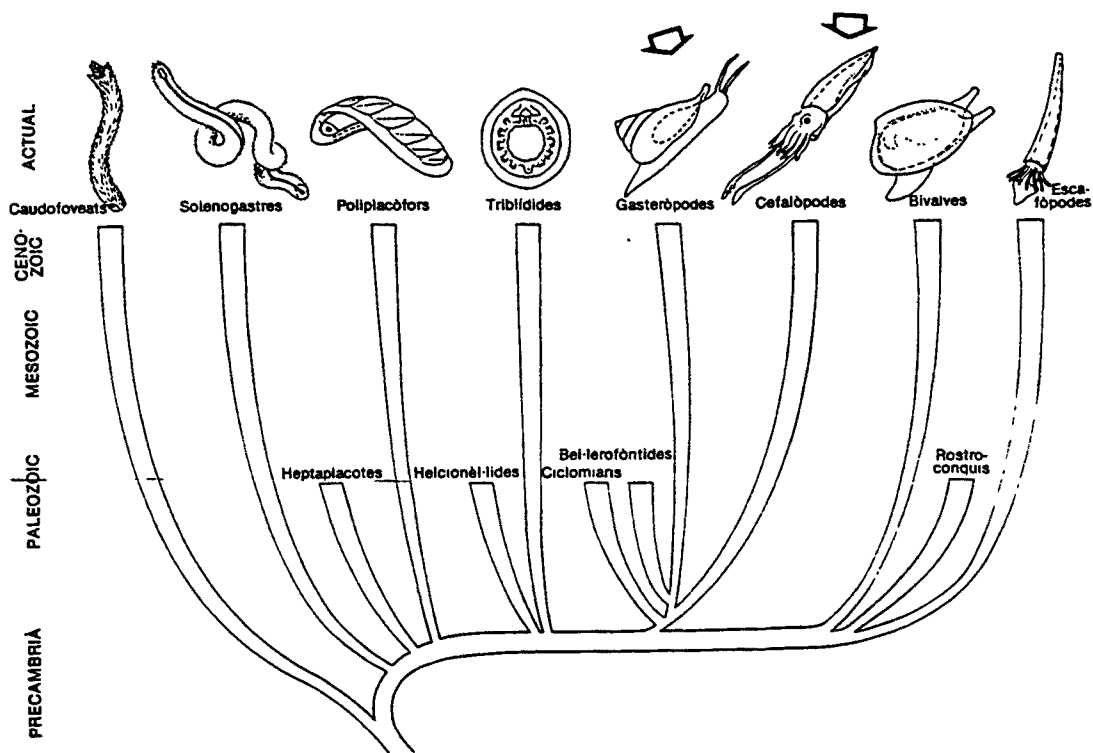


Un segon tipus de peix teleosti amb el qual hem treballat ha estat el llobarro, *Dicentrarchus labrax*, dintre del ordre dels Perciformes. A diferència de la resta d'espècies, en aquest cas el que ens ha interessat han estat els òvuls. S'ha treballat amb dos tipus d'òvuls: per una banda, s'han usat oòcits activats mitjançant espermatozoides de la pròpia espècie que havien estat prèviament irradiats amb raigs UV, i posteriorment s'han congelat a -80°C ; aquest oòcits han estat cedits pel Dr. Francesc Piferrer, de l'Institut de Ciències del Mar (CSIC) a Barcelona, i provenen de l'Institut d'Aquicultura de Torre de la Sal (CSIC) a Castelló. Per altra banda, s'ha treballat amb òvuls fecundats, recollits després de la posta i congelats a -80°C , cedits per la Dra. Zanuy i Juan Fscó. Asturiano, de l'Institut d'Aquicultura de Torre de la Sal (CSIC) també a Castelló. Aquests últims òvuls provenen de peixos que han estat alimentats amb diferents dietes: tenim

una dieta estàndard, una dieta "ROPUFA" (formada pels mateixos components que la dieta estàndard però amb olis diferents, éssent àcids grassos insaturats), i una dieta "Krill" (amb els mateixos olis que la dieta estàndard, però diferents components). La diferència de dieta, però, no ha influït en els nostres objectius de treball, per tant no detallem els diversos components que formen part d'ella.

2. Posició filogenètica de les espècies estudiades

A continuació es presenten dos esquemes on es mostra la possible ubicació filogenètica dels mol.luscs i peixos utilitzats en aquest estudi. El primer d'ells ubica als mol.luscs i està tret de Altaba, 1991, i el segon als peixos, i prové de Nelson, 1984 i 1994.

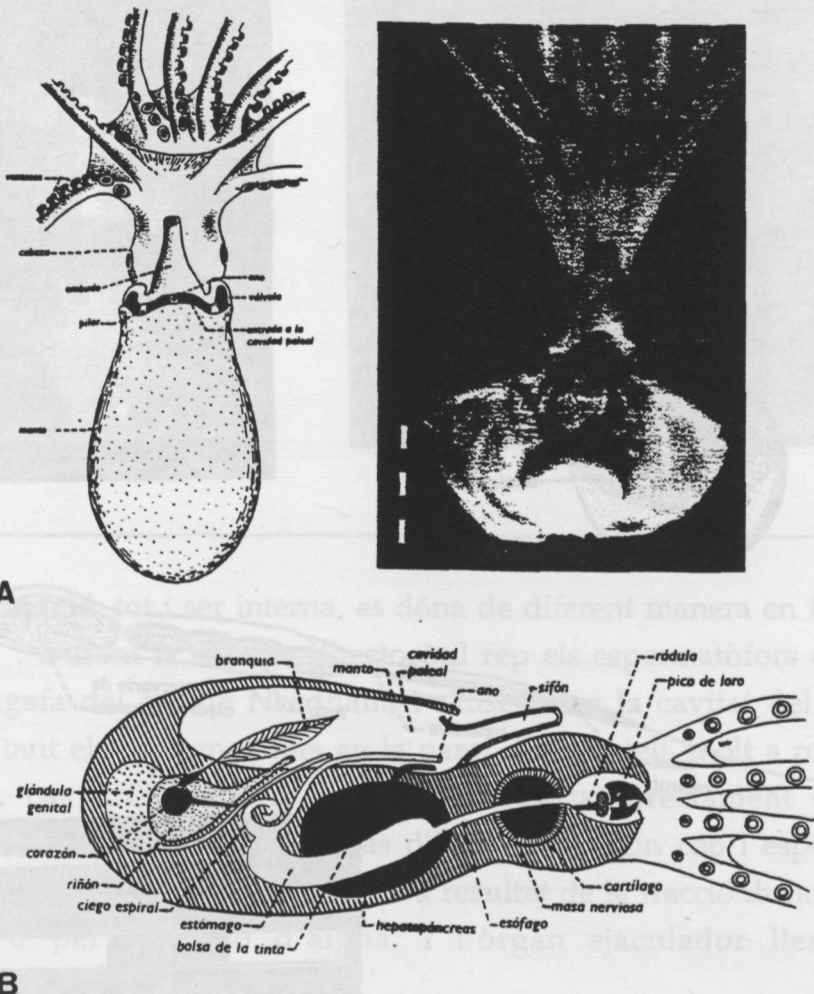


3. Descripció de l'aparell reproductor dels Cefalòpodes Octòpodes

Per entendre millor l'apartat de Resultats que correspon als cefalòpodes, aquí exposem breument la morfologia de l'aparell reproductor masculí de les dues espècies d'octòpodes estudiades, així com el seu comportament sexual.

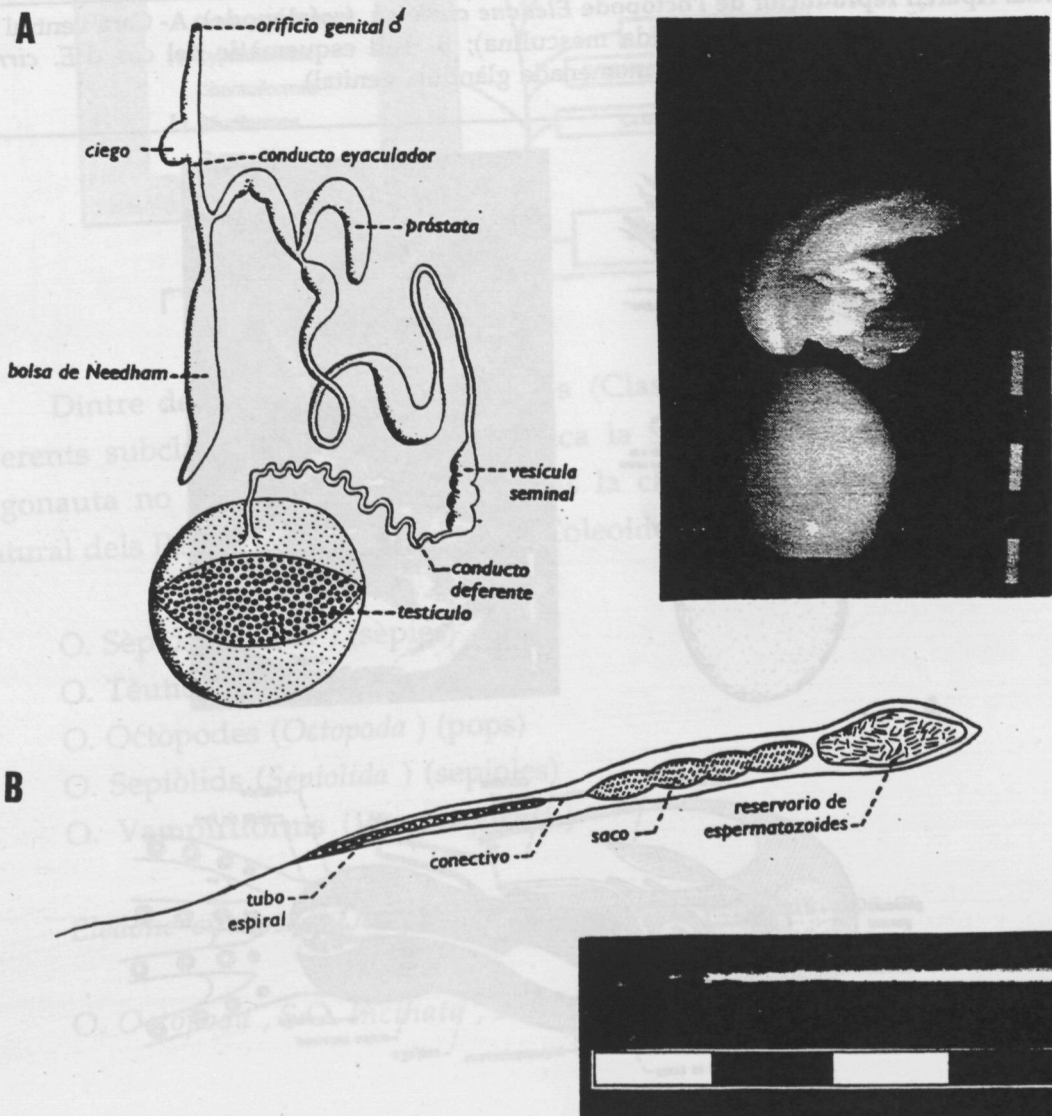
Els sexes en els Octòpodes (i en general en els Cefalòpodes) estan separats, presentant dimorfisme sexual i fecundació interna. En el mascle, la **gònada** està localitzada en la part posterior del cos (Fig.II.A.2), i està formada per una massa de petits túbuls seminífers que es troben molt apretats entre ells i tancats en una càpsula, oferint tot el conjunt un aspecte de bola (v. la part dreta de la Fig.II.A.2A).

Fig.II.A.2. Aparell reproductor de l'octòpode *Eledone cirrhosa* (cefalòpode). A- Cara ventral (a la part dreta s'observa la posició de la gònada masculina); B- Tall esquemàtic del cos d'*E. cirrhosa*, on s'aprecia la posició de la gònada (aquí anomenada glàndula genital).



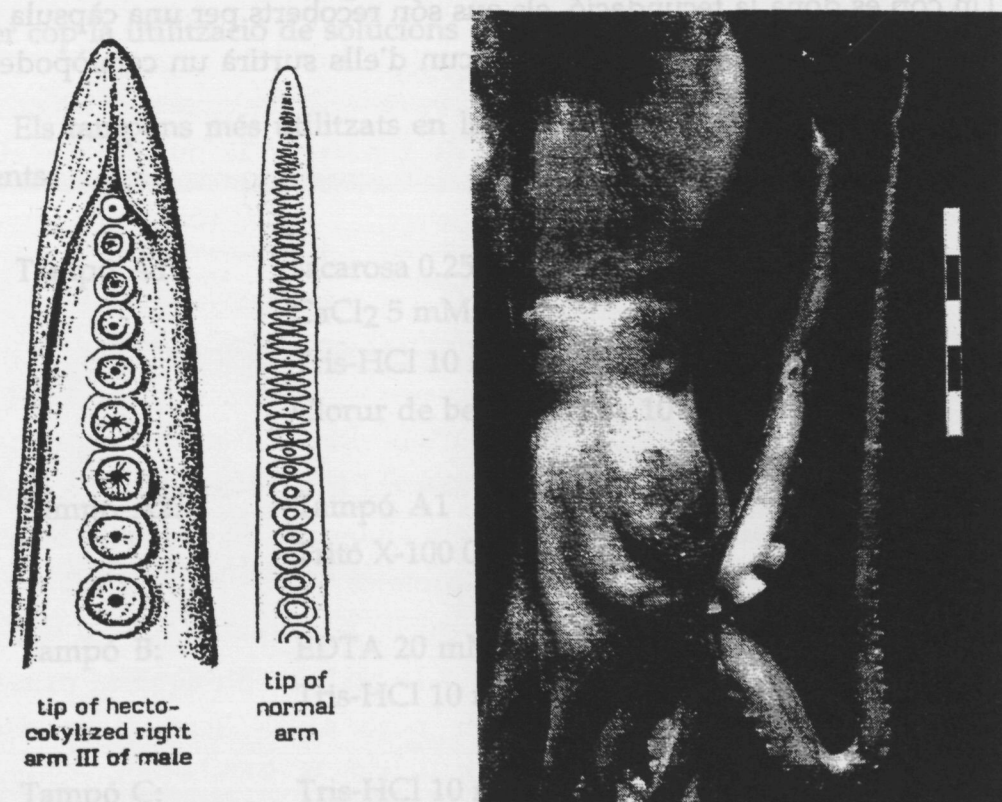
A partir de la gònada surt el vas deferent, molt llarg i tortuós (que equivaldria a l'epidídim dels mamífers, on els espermatozoides acaben de madurar), que condueix a una regió complexa on s'elaboren els **espermatòfors**, els quals s'emmagatzemen en el sac de Needham, i són els responsables de transferir les masses d'espermatozoides del mascle a la femella (Fig.II.A.3B). Cada espermatòfor té una mida d'1 cm o més de longitud, i presenta una veïna externa amb un extrem més ample que és el que conté la massa d'espermatozoides envolcallats per una estructura fina a la que li continua un sac cimentari, i un filament ejaculador en forma d'espíral. La veïna externa de l'espermatòfor queda tancada per un caputxó que es continua per un fil.

Fig.II.A.3. Estructures reproductores d'*Eledone cirrhosa*. A- Aparell genital masculí. B- Espermatòfor (Cada rectangle de l'escala representa 1 cm).



Un dels braços del mascle es modifica per realitzar la funció de transferència dels espermatòfors durant l'aparellament, i rep el nom d'hectocòtil (Fig.II.A.4); el grau de modificació és variable, en *Octopus*, per ex., l'extrem d'aquest braç té forma de cullera.

Fig.II.A.4. Hectocòtil (braç modificat amb funció reproductora). Hectocòtil (esquerra) i braç normal (dreta) d'*Eledone cirrhosa*. (Cada rectangle de l'escala representa 1 cm).



La fecundació, tot i ser interna, es dona de diferent manera en *E. cirrhosa* que en *O. vulgaris*. Durant la còpula, l'hectocòtil rep els espermatòfors que surten pel sífó o bé els agafa del sac de Needham, i s'inserta en la cavitat del mantell de la femella depositant els espermatòfors en la paret del mantell, molt a prop de l'orifici de l'oviducte, cas d'*O. vulgaris*, o bé els inserta directament en la gònada (atravesant els oviductes), com és el cas d'*E. cirrhosa*. Un cop l'espermatòfor està dintre de la femella, s'obre el caputxó com a resultat de la tracció durant el procés de transferència o per absorció d'aigua, i l'òrgan ejaculador llença la massa

d'espermatozoides; en el cas d'*O. vulgaris*, el sac cimentari s'adhereix a la paret del mantell, i la massa d'espermatozoides es desintegra; en el cas d'*E. cirrhosa* la massa es desintegra a l'interior de la gònada, quan els oòcits estan madurs. En tots dos casos, si la femella no és el suficientment madura sexualment, l'esperma rebut queda emmagatzemat durant llargs períodes de temps fins que la femella presenta els oòcits madurs, moment on els espermatòfors (ara en forma de masses d'esperma) alliberaran lentament els espermatozoides. (El temps d'emmagatzematge, però, és molt més llarg en *Eledone* que en *Octopus*).

Un cop es dona la fecundació, els ous són recoberts per una càpsula protectora, i així són expulsats a l'exterior. De cadascun d'ells surtirà un cefalòpode minúscul, d'aspecte idèntic a l'adult.

B. Mètodes preparatius

1. *Obtenció de nuclis d'espermatozoides*

El procés d'obtenció de nuclis espermàtics a partir de gònades, epidídims o espermatòfors consisteix en un seguit d'homogeneïtzacions amb tampons generalment isosmòtics a pH fisiològics i centrifugacions, per tal d'aconseguir un enriquiment en nuclis de cèl.lules espermàtiques. Els mètodes emprats es basen en modificacions del mètode original de Chaveau et al. (1956), autors que descriuen per primer cop la utilització de solucions de sacarosa per l'aïllament de nuclis intactes.

Els tampons més utilitzats en la major part d'obtenció de nuclis han estat els següents:

Tampó A1:	sacarosa 0.25 M CaCl ₂ 5 mM Tris-HCl 10 mM pH7.0 Clorur de benzamidina 10 mM (en fresc)
Tampó A2:	Tampó A1 Tritó X-100 0.1% o bé 0.5%
Tampó B:	EDTA 20 mM Tris-HCl 10 mM pH7.0
Tampó C:	Tris-HCl 10 mM pH7.0
Solució Salina:	NaCl 0.4 N Clorur de benzamidina 10 mM (en fresc)

a. *Obtenció de nuclis espermàtics d'Eledone cirrhosa*

i. **Proves preliminars per l'obtenció de nuclis espermàtics**

El procés d'obtenció de nuclis d'espermatozoides en el cas de l'octòpode *Eledone cirrhosa* és un procés complicat i laboriós, degut a la dificultat de purificació que aquests nuclis presenten. Aquest cefalòpode (tal i com es veurà en els resultats)

presenta un nucli que denominem "queratinós" degut a que està compactat per protamines riques en cisteïna, aminoàcid que proporciona una estructura molt estable degut a l'oxidació dels seus grups tiol (-SH) amb la conseqüent formació de ponts disulfur (S-S). A més a més, el flagell de l'espermatozoide d'aquest pop també és ric en cisteïna i en ponts disulfur (Baccetti et al., 1976a i 1976b), el que fa que la cèl.lula en general presenti una elevada resistència i, per part del nucli, una elevada rigidesa.

L'experiència ens ha mostrat que totes dues estructures presenten similar densitat, i que tant nucli com cues tenen una morfologia semblant (tots dos molt llargs i de diàmetre similar). Això fa que resulti difícil de separar-los pels mètodes clàssics d'obtenció de nuclis. En la Fig.II.B.1 es descriuen algunes de les proves que es van fer per arribar al procediment final de separació de nuclis i flagells, el qual s'explica al següent apartat.

ii. Obtenció de nuclis a partir d'epidídimis i espermatozòfors

Com es mostra a la Fig.II.B.2, es parteix d'epidídimis o d'espermatozòfors, els quals es descongelen (si no es parteix de material fresc) i es posen a agitar en tampó A1, perquè així els espermatozoides es vagin alliberant. El clorur de benzamidina té com a finalitat el impedir la degradació proteica ja que ha mostrat ser un potent inhibidor proteolític en les obtencions de nuclis espermàtics (Chiva et al., 1988); la sacarosa proporciona un medi isosmòtic a la cèl.lula. En aquesta primera fase es pretèn 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 del calci (que pot ser també magnesi) en aquest tampó: els ions divalents col.laboren en el manteniment d'una estructura nuclear estable.

Fig.II.B.1. Diferents mètodes utilitzats per intentar purificar nuclis de l'espermatozoide d'*Eledone cirrhosa*. ALIQ.: alíquota d'espermatozoides; solució reductora: DTT 10 mM o 20 mM (segons l'alíquota) en Tris-HCl 10 mM pH 8.5.

	TRACTAMENT	PROCEDIMENT	RESULTATS
ALIQ. 1	CTAB 10%	Homogeneïtzació Filtració tela empessa	Agrumollament dels espermatoz.
ALIQ. 2	NaCl 0.4N	Homogeneïtz. Filtració gassa	Dispersament dels esperm. sense grumolls
ALIQ. 3	NaCl 0.4N Escalfament (80°C)	Homogeneïtz. Escalfament (80°C) Homogeneïtz. Filtració gassa	Nuclis separats dels flagells. El fet d'escalfar amb el NaCl és clau
ALIQ. 4	NaCl 0.4N Escalfament (80°C) DTT 10mM TrisHCl10mMpH8.5 Gradient sacarosa 0.8-2M	Homogeneïtz. Escalfament (80°C) Homogeneïtz. Filtració gassa Centrifugació Sediment+sol. reductora Homogeneïtz. Centrif. gradient sacarosa	El coixí de sacarosa 2M no ha separat els nuclis dels flagells*
ALIQ. 5	Sediment del procediment 4 DTT 20mM TrisHCl10mMpH8.5	Reduccions observades al m.o a diferents temps	A mida que la incubació s'apropa a l'hora, desapareixen els flagells però trobem agregats; els nuclis no estan solts
ALIQ. 6	Sediment del procediment 4 DTT 10mM TrisHCl10mMpH8.5 urea 2M	idem	idem

*Coixins de sacarosa 2.6 M han separat bastant bé els nuclis dels flagells, però quan es treballa amb petites alíquotes; per quantitats grans de material, aquest mètode no resulta ser molt apropiat.

A continuació es centrifuga la suspensió a 17,700 g, 10 min, i el sediment resultant s'homogeneïtza enfront de solució salina que conté una certa quantitat d'agent reductor (NaCl 0.4N, DTT 10 mM com agent reductor, i clorur de benzamidina 10mM) amb un Dounce. Fins aquest pas els nuclis i les cues dels espermatozoides romanen junts. La mostra es bombolleja amb nitrogen gas per així

evitar possibles reaccions oxidants (amb el nitrogen s'elimina l'oxigen atmosfèric i per tant les reaccions d'oxidació), i posteriorment s'escalfa a 80°C, aconseguint així una separació dels nuclis de les cues; en tot moment es fan controls al microscopi òptic per veure el moment en el que nuclis i flagells es separen; cap als 2-3 min. aconseguim obtenir nuclis solts, amb l'estructura típica del nucli espiralitzat intacta, mentre que els flagells desapareixen. El fet de que els nuclis resisteixin la temperatura és degut a la presència d'una gran quantitat de ponts disulfur que estableixen la seva estructura (veure resultats), i a la gran estabilitat que dona la protamina.

Els flagells es redueixen més fàcilment, i les seves proteïnes són solubilitzades pel NaCl. Al microscopi òptic només trobem els nuclis solts, ja que els flagells s'acaben per "fondre".

El següent pas és homogeneïtzar la mostra amb un Dounce i centrifugar-la durant 1 segon a 2,500 g (és a dir, deixem que el rotor arribi a 2,500 g, i immediatament l'aturem) per així eliminar restes d'agregats. El sobrenadant resultant es torna centrifugar a 17,700 g, 5 min, obtenint així un sediment ric en nuclis.

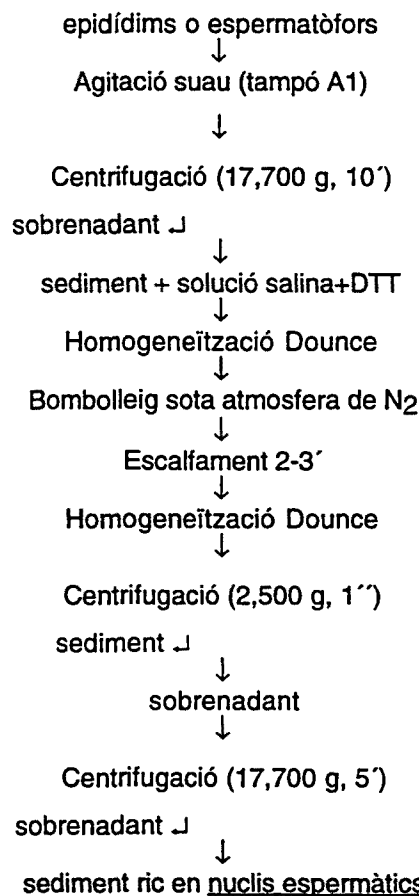
Aquest ha estat el mètode més utilitzat en la purificació de nuclis espermàtics, ja que és el que més bon resultat ens ha donat. Tot i això, cal a dir que la purificació al cent per cent no ha estat possible quan hem utilitzat grans quantitats de material, degut a la dificultat en separar nuclis de flagells d'aquests espermatozoides en concret.

iii. Purificació de nuclis amb finalitat analítica

En l'apartat anterior es descriu el procés d'obtenció de nuclis espermàtics en quantitats suficients com per fer una posterior extracció de les seves proteïnes amb la finalitat de fer posteriors estudis. Però s'ha de tenir en compte que la puresa de nuclis no és del cent per cent, donada la dificultat que presenten aquests nuclis de separar-se de les cues, de manera que les proteïnes que s'obtidran no seran només dels nuclis, sinó que hi haurà una barreja amb la resta de proteïnes pertanyents als flagells que s'hagin co-purificat.

Si el que es vol és una mostra de nuclis pura per així conèixer exactament quines són les proteïnes que presenta, l'obtenció de nuclis es realitzarà d'una manera molt més acurada, variant el protocol fins ara explicat. El resultat serà una mostra molt rica en nuclis, però en quantitat molt petita, la suficient com per fer una posterior extracció i caracterització de les proteïnes/proteïna nuclears a nivell electroforètic, sense contaminació d'altres proteïnes.

Fig.II.B.2. Obtenció de nuclis espermàtics d'*E. cirrhosa* a partir d'epidídims o espermatòfors.



Es parteix d'una petita alíquota d'espermatozoides que s'han obtingut agitant els epidídims o espermatòfors en tampó A1. Aquests espermatozoides s'escalfen en presència de NaCl 0.4N un parell de minuts, de manera que aconseguim trencar la unió entre els nuclis i els flagells; ara el que cal és purificar els nuclis. Aquesta suspensió s'incuba amb una solució que desestabilitza els flagells: DTT 10mM, Tris-HCl 10mM pH 8.5 i urea 2M. Controls al microscopi òptic mostren com, en cada pas,

la mostra es va enriquir en nuclis. Per eliminar les restes de flagells presents, es centrifuga el conjunt en presència de sacarosa 2.6M (17,700 g, 1h). El resultat és una interfase, on hi ha les restes de flagells, i un sediment amb una elevada riquesa en nuclis.

b. Obtenció de nuclis espermàtics d'*Octopus vulgaris*

i. Obtenció de nuclis a partir d'epidídims i espermatòfors

Els processos de purificació de nuclis han estat diversos, i hem utilitat un o altre depenent de la dificultat en la que ens trobàvem al llarg del procediment. Cal recordar, però, que l'obtenció de nuclis d'espermatozoides en *O. vulgaris* és molt més fàcil que en el cas d'*E. cirrhosa*.

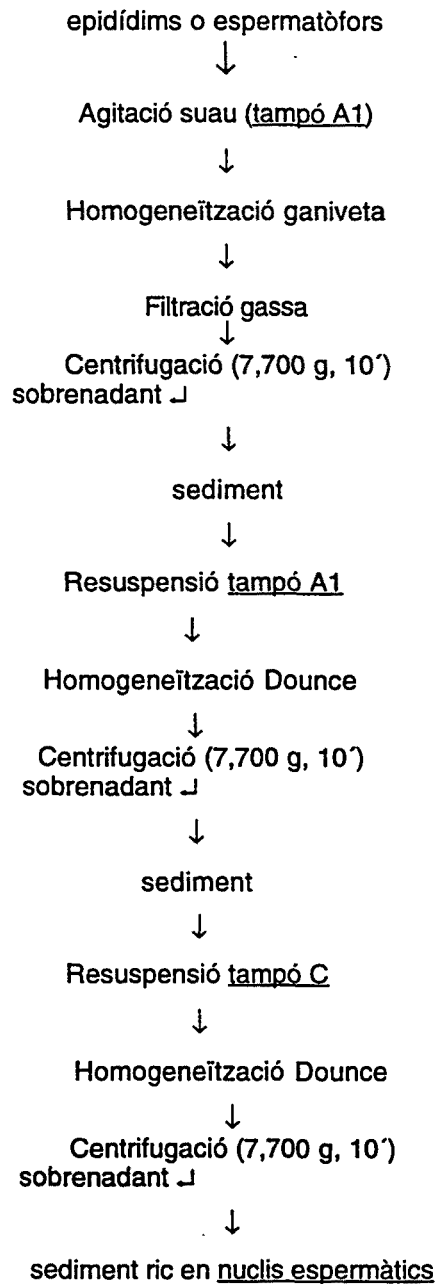
- Mètode estàndard

Es parteix d'epidídims o espermatòfors que es posen a agitar enfront de tampó A1, perquè així es vagin desprenent els espermatozoides.

A continuació s'homogeneïtza amb un homogeneïtzador de ganiveta per dispersar bé el material i separar nuclis de cues. Un cop el material està homogeneïtzat, es filtra en gassa per eliminar grumolls de material (restes de parets de tubs seminífers, d'espermatòfors, etc), i el filtrat es centrifuga durant 10 min. a 7,700 g. El sediment resultant es resuspèn en tampó A1, i de nou s'homogeneïtza amb un Dounce; la suspensió es centrifuga a 7,700 g, 10 min, i ara el sediment es resuspèn homogeneïtzant amb tampó C. Un cop la mostra està ben dispersa, es centrifuga un altre cop a 7,700 g durant 10 min, i el sediment resultant és el ric en nuclis. El protocol seguit s'esquemmatitza en la Fig.II.B.3.

En tot moment es van fent controls al microscopi òptic de contrast de fase per veure la riquesa en nuclis de la mostra i la seva progressiva purificació.

Fig.II.B.3. Obtenció de nuclis espermàtics d'*Octopus vulgaris* a partir d'epidídims o espermatòfors.



- Obtenció en condicions reductores

Un segon mètode utilitzat per obtenir nuclis a partir d'espermatòfors i/o epidídims és el de sotmetre la mostra a condicions reductores de manera que els flagells desapareguin però que la fracció nuclear quedi intacta.

Els espermatòfors i/o epidídims s'agiten amb tampó A1, i s'homogeneïtzen i centrifuguen de la mateixa manera que en el mètode anterior; el sediment resultant s'homogeneïtza amb NaCl 0.4N (en TrisHCl 10 mM pH 8.8 i clorur de benzamidina 25 mM), i es centrifuga (4,400 g, 5min). Ara el sediment es resuspèn amb β -mercaptoetanol 1M (en NaCl 0.4N, TrisHCl 10 mM pH 8.8 i clorur de benzamidina 25 mM), s'homogeneïtza, i es deixa incubant a temperatura ambient durant 30min, en agitació suau i sota atmosfera de nitrogen. Controls al microscopi de contrast de fase mostren una gran disminució en la quantitat de flagells (degut a que aquests s'han reduït). A continuació es torna a centrifugar (1,900 g, 5min), i es repeteix el procés amb el sediment, perquè s'acabin de reduir les restes de cues que queden. L'últim sediment es renta amb tampó C, es centrifuga (1,900 g, 5min), i el sediment resultant és la fracció rica en nuclis.

- Mètode simplificat

Els epidídims i/o espermatòfors s'homogeneïtzen enfront de NaCl 0.15N i clorur de benzamidina 50 mM, i es deixen agitant-se en aquesta solució 30 min, a 4°C perquè s'acabin de desprendre els espermatozoides. Posteriorment es centrifuguen a 3,900 g, 5 min, i el sediment resultant és una mostra enriquida en nuclis espermàtics.

ii. Obtenció de nuclis a partir de gònades

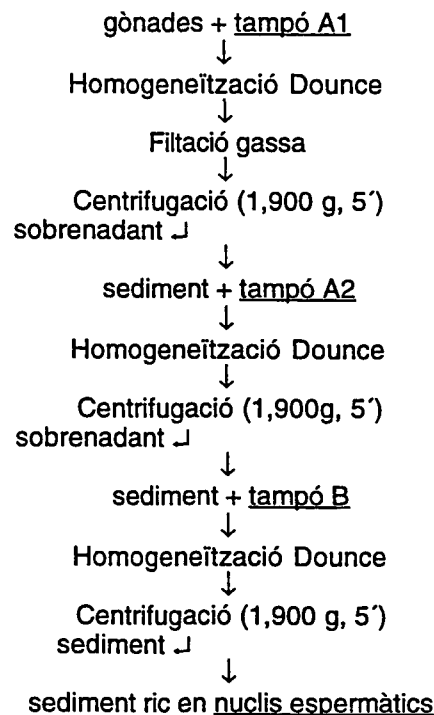
Les gònades s'homogeneïtzen enfront de tampó A1 (medi isosmòtic proporcionat per la sacarosa) en un Dounce perquè es vagin desprenent els diferents tipus de nuclis cel·lulars (ja que aquí les cèl·lules es trenquen). Un cop dispersos, es filtra en gassa i es centrifuga a 1,900 g, 5 min. Quan es treballa amb gònades, les centrifugacions han de ser a baixes velocitats degut a que en les gònades homogeneïtzades hi ha moltes partícules petites provinents de diferents parts del teixit que convé eliminar.

El sediment resultant s'homogeneïtza enfront de tampó A2 (que conté tritó X-100 0.5%) i quan està ben dispers es centrifuga a 1,900 g, 5 min. El sediment es torna a resuspendre, però amb tampó B i s'homogeneïtza suaument altre cop amb el Dounce, centrifugant posteriorment a 1,900 g, 5 min. El material recollit en el sediment consta d'una població enriquida en nuclis gonadals. La Fig.II.B.4 mostra el procediment aquí explicat.

iii. Obtenció de nuclis d'espermàtides avançades i espermatozoides gonadals

A partir de gònades es poden obtenir els nuclis de les espermàtides més avançades i dels espermatozoides gonadals. El procediment és més llarg que en el cas anterior ja que el que es pretén és separar les fases més avançades de l'espermatogènesi, com són espermàtides avançades i espermatozoides, de la resta de cèl.lules espermàtiques (espermatogònies, espermatoòcits de primer i segon ordre i espermàtides immadures, cèl.lules de Sertoli i altres cèl.lules acompanyants, etc).

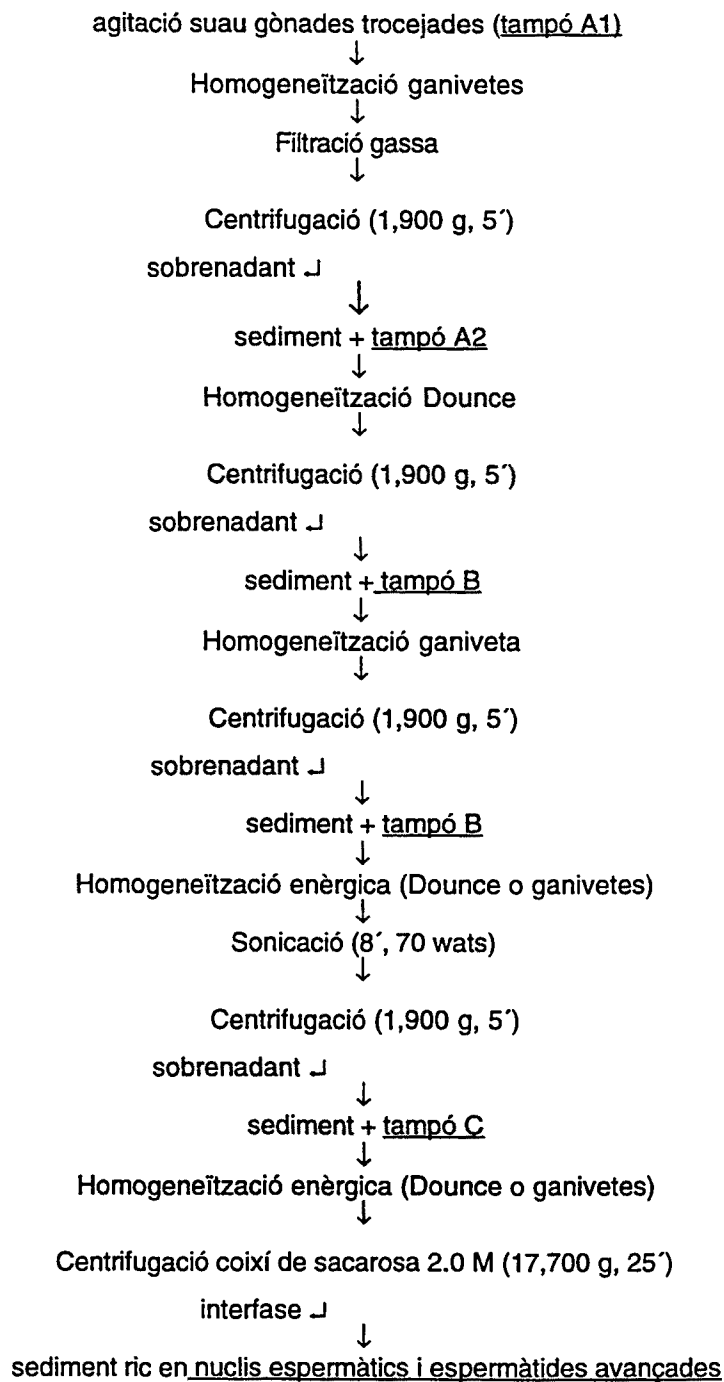
Per la separació ens basem en la gran resistència mecànica que tenen els nuclis de les fases avançades de l'espermatogènesi, i per tant en el diferent comportament front determinats tamps i enfront d'un tractament mecànic (Platz i Meistrish, 1977). Les espermatogònies i espermatoòcits tenen una forma arrodonida i els hi manca el flagell, mentre que les espermàtides madures ja tenen flagell i el nucli menys arrodonit. Els espermatozoides gonadals tenen el nucli en forma de bastó. El procediment és una adaptació del mètode de Platz i Meistrish (1977), basat en primer lloc, en obtenir nuclis gonadals totals. Una vegada purificats, els nuclis gonadals es sotmeten a un xoc hipotònic (diverses homogeneïtzacions enèrgiques amb homogeneïtzador de ganiveta) i a una sonicació també enèrgica. D'aquesta manera els nuclis de cèl.lules poc avançades es trenquen completament, quedant solubles, mentre que els nuclis d'espermàtides avançades i espermatozoides gonadals, en contenir la protamina que compacta el DNA, aguanten bé el tractament per ultrasons i no perden la seva identitat. Una vegada aplicats aquests tractaments, els nuclis "avançats" es poden separar dels nuclis "solubilitzats" per centrifugació a baixa velocitat.

Fig.II.B.4. Obtenció de nuclis espermàtics d'*O. vulgaris* a partir de gònades.

El procediment es pot seguir a la Fig.II.B.5. Les gònades es trocegen i s'homogeneïtzen amb un homogeneïtzador de ganiveta. Es filtra amb gassa i després es centrifuga a 1,900 g, 5 min. El sediment resultant es resuspèn amb tampó A2, i s'homogeneïtza amb un Dounce; aquest tampó conté tritó, el qual dissol les membranes.

Seguidament es centrifuga a 1,900 g, 5 min. El sobrenadant es descarta i el sediment el resuspensem en tampó B, que conté EDTA; d'aquesta manera s'acaben d'inflar els nuclis arrodonits. S'homogeneïtza amb l'homogeneïtzador de ganiveta, i així comencem a trencar nuclis que encara no contenen protamina, i es centrifuga a 1,900 g, 5 min. El sediment (cromatina una mica inflada) es torna a homogeneïtzar enfront del tampó B. Ara l'homogeneïtzat es sonica durant 8 min a intensitat màxima (70 wats) i d'aquesta manera es destrueixen membranes i restes de nuclis sense protamina. En aquest estadi, en el microscopi òptic de contrast de fase s'observen nuclis d'espermatozoides madurs i encara alguns nuclis rodons inflats. Es centrifuga a 1,900 g, 5 min i el sediment es torna a homogeneïtzar en tampó C.

Fig.II.B.5. Obtenció de la fracció d'espermàtides avançades i espermatozoides gonadals a partir de gònades d'*O. vulgaris*.



L'homogeneïtzat es centrifuga en un coixí de sacarosa 2.0 M a 17,700 g, 25 min. S'obté una interfase que es descarta, i un sediment que conté la major part de nuclis d'espermàtides avançades i espermatozoides gonadals.

*c. Obtenció de nuclis espermàtics de *Murex brandaris**

En aquesta espècie els nuclis d'espermatozoides es van obtenir d'una banda a partir de conductes deferents (els quals estan plens d'esperma), i per altra banda, es van obtenir nuclis d'espermàtides avançades de la gònada.

Quan es parteix de conductes deferents, s'allibera l'esperma i s'homogeneïtza enfront de tampó A, en aquest cas format per sacarosa 0.25M, MgCl₂ 10mM, CaCl₂ 3mM, Tritó X-100 0.1% en Tris HCl 10mM pH 7.0, i clorur de benzamidina 10mM, es filtra i es centrifuga a 2,000 g, 5 min, i amb el sediment resultant es repeteix el procediment 2-3 vegades per així anar eliminant restes de cues. L'últim sediment ric en nuclis s'homogeneïtza enfront de tampó B (EDTA 20mM en Tris HCl 10mM pH 7.0), i es centrifuga a 2,000 g, 5 min. El sediment resultant s'homogeneïtza amb tampó C (Tris HCl 10 mM, pH 7.0), i així s'eliminen les restes de sals degudes als tampons anteriors. Al llarg de tot el procés d'obtenció de nuclis es van fer controls microscòpics per observar el progressiu enriquiment en nuclis i controlar la seva puresa.

Per obtenir nuclis de les espermàtides avançades gonadals es va utilitzar el mètode utilitzat a *O. vulgaris*, explicat a l'apartat II.B.1.b.iii, seguint el procediment descrit per Càceres et al. (1994).

*d. Obtenció de nuclis espermàtics de *Dicentrarchus labrax**

Per obtenir nuclis d'espermatozoides, hem seguit el mètode descrit a Saperas et al. (1994). Vàrem partir d'esperma, el qual es va homogeneïtzar enfront de tampó A1 en un homogeneïtzador tipus "turmix" durant 30 segons a mitja velocitat, i 30 segons més a velocitat màxima. Es va centrifugar a 3,900 g, 5 min, i el sediment es va resuspendre amb tampó A2 que conté tritó X-100 0.5%, detergent que permeabilitza i dissol les membranes, ja que el nostre objectiu era purificar nuclis per fer futures incubacions amb extractes d'oòcits, amb lo qual volíem que els nuclis fossin

permeables a les proteïnes presents en els extractes. La suspensió es va a homogeneïtzar amb un Dounce i incubar a -20°C durant 5 min.

Passat el temps en que suposadament el tritó ha permeabilitzat les membranes dels nuclis, per obtenir els nuclis nets, es va centrifugar a 3,900 g, 5 min, i el sediment es va resuspendre amb tampó A1, homogeneïtzant amb un Dounce, tornant a centrifugar (3,900 g, 5 min), i tornant a resuspendre el sediment amb tampó A1, per tal d'acabar d'eliminar les restes de detergent. L'últim sediment es va resuspendre amb tampó A1 que, addicionalment al clorur de benzamidina, contenia PMSF 1 mM també com a inhibidor proteolític. A aquesta suspensió rica en nuclis (cal recordar que en cada pas es van fent controls al microscopi òptic per veure el progressiu enriquiment) se li va afegir un volum i mig de glicerol, i d'aquesta manera es van conservar a -20°C . En aquest cas els nuclis no es congelen directament (com sí s'ha fet en la resta d'espècies) degut a que la finalitat d'aquests nuclis ha estat la de realitzar proves bioquímiques (incubacions), i no obtenir el contingut proteic dels nuclis (histones i protamines, entre d'altres) com ha estat en la resta de casos.

2. *Obtenció d'òvuls de Dicentrarchus labrax*

a. *Obtenció d'òcits activats in vitro*

Aquests òcits van ser cedits pel Dr. Francesc Piferrer, de l'Institut de Ciències del Mar (CSIC) de Barcelona. Per una banda es van obtenir espermatozoides de *Dicentrarchus labrax* (llobarro) i es van irradiar amb lum ultraviolada, perquè el seu contingut genètic (DNA) quedés danyat. Aquests espermatozoides es van posar en contacte amb òcits de llobarro, i aquests últims van quedar fecundats, però amb la presència de només un pronucli, el femení, ja que el masculí estava malmés. Aquesta fou una manera de fecundar uns òcits amb l'ajut d'espermatozoides sense que ells aportessin el seu material genètic, per així activar tots els processos que es donen quan un òcit passa a ser òvul.

b. *Obtenció d'òcits fecundats*

Es van recollir postes d'òvuls que havien estat fecundats en tancs en l'Institut d'Aquicultura de Torre de la Sal (CSIC), a Castelló. Les postes s'han recollit amb aigua de mar, durant les 18h i les 10h de l'endemà. Per separar els òvuls viables dels inviubles, s'han posat en una proveta, i s'han separat els que suraven (viubles) dels que sedimentaven (inviubles). En tots dos casos, als òvuls s'els hi ha tret l'aigua de mar, i s'han congelat immediatament a -80°C .

Tal i com s'ha dit en l'apartat II.A.1, s'han recollit òvuls pertanyents a peixos alimentats amb diferents dietes (estàndard, ROPUFA i krill). L'objectiu d'aquesta diferent alimentació ha estat aliè als nostres experiments, ja que aquests tipus d'alimentació no han influït sobre els extractes que hem obtingut a partir d'aquests òvuls.

3. *Obtenció d'extractes d'òvuls de *Dicentrarchus labrax**

a. *Obtenció del Termoestable*

L'objectiu d'aquest termoestable és el d'obtenir un extracte que contingui majoritàriament les/la proteïna amb funció nucleoplasmina (proteïna que remou protamines en el nucli espermàtic per col·locar histones i així es regeneri l'estructura en nucleosomes del DNA espermàtic), ja que s'ha descrit que aquesta proteïna és estable a elevades temperatures (80°C) (Laskey et al., 1978; Mills et al., 1980). El procediment per obtenir aquest termoestable s'ha basat en la combinació dels mètodes de Kawasaki et al. (1994) i Sealey et al. (1989).

Òcits de llobarro activats *in vitro* es van homogeneïtzar primer amb tampó d'homogeneïtzació, format per 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). En tot moment s'ha treballat amb material de plàstic per prevenir el que certes proteïnes quedessin enganxades en el vidre (com és el cas de la nucleoplasmina de *Xenopus*).

Aquest homogeneïtzat es centrifuga a 12,000 g, 15 min, i s'obté un sediment (oòcits), un sobrenadant (extracte de proteïnes), i una capa lipídica en la part superior (lípidis provinents del vitel). Es descarten els lípidis i s'agafa el sobrenadant (que és un extracte cru d'òvuls), i es filtra per eliminar les restes de lípidis que s'hagin pogut quedar. El següent pas és eliminar els lípidis i lipoproteïnes de l'extracte, i per això es va fer una extracció afegint un volum de cloroform:éter (3:1), barrejant, i esperant a que les fases es separin: s'obté una fase superior (sobrenadant) amb només proteïnes, una fase intermitja amb el vitel, i una fase inferior amb la barreja del cloroform/éter que conté els lípidis i lipoproteïnes.

El sobrenadant ric en proteïnes es centrifuga per aclarir-lo (27,000 g, 20 min), i d'aquesta manera s'obté un sobrenadant que és un extracte cru sense lípidis. La nucleoplasmina de *Xenopus* resulta ser termoestable a 80°C mentre que d'altres proteïnes es desnaturalitzen i floculen a l'arribar a aquesta temperatura; aprofitant aquesta característica, a l'extracte obtingut se li afegixen 0.0025 volums de PMSF 34 mM (que optimitza la precipitació de proteïnes que no són nucleoplasmina, en el cas de *Xenopus laevis*), i s'escalfa a 80°C durant 15 min. Posteriorment l'extracte es refreda i es centrifuga a 17,400 g, 10 min, i s'obté un sediment format per totes les proteïnes que s'han desnaturalitzat, i un sobrenadant amb les proteïnes termoestables, del que diem "termoestable".

b. Obtenció d'extractes directes

Per obtenir un extracte directe d'oòcits fecundats el que es fa és simplement homogeneïtzar els oòcits en presència de PMSF 1 mM, sonicar-los durant 1 min a intensitat màxima (70 wats), i centrifugar l'homogeneïtzat a 27,000 g, 30 min. El sobrenadant resultant és l'extracte directe que conté totes les proteïnes presents en l'oòcit fecundat.

A aquest extracte obtingut a partir del sobrenadant provinent d'una centrifugació a 27,000 g s'anomena *low speed* (LSS, de *low speed supernatant*). Si aquest mateix sobrenadant es torna a centrifugar, però aquest cop a 153,400 g, durant 1h, a 4°C, el que s'obté és un sobrenadant molt més net i ric en proteïnes solubles, extracte que ara s'anomenarà *high speed* (HSS, de *high speed supernatant*).

Aquest procediment s'ha seguit en l'obtenció dels extractes de diferents oòcits fecundats provinents de peixos alimentats amb dietes diferents, i dels oòcits activats *in vitro*.

4. *Extracció de les SNBP's*

Es coneix com a SNBP's a les proteïnes bàsiques nuclears espermàtiques (*sperm nuclear basic proteins*). 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 seguit de centrifugacions a altes velocitats durant un temps suficient. Així com en 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, assegurar un mínim de velocitat tal que sedimenti tot allò que no siguin proteïnes solubilitzades.

a. *Obtenció d'Histones*

Quan es té una mostra que conté una barreja de proteïnes nuclears en les que hi ha histones i protamines, per separar les histones de la resta, el que es farà serà una extracció específica amb àcid acètic al 35% (AA 35%) (Subirana et al., 1973): es parteix d'un sediment ric en nuclis espermàtics obtingut segons l'apartat II.B.1. al que se li afegeixen 3-4 volums d'AA35% i s'homogeneïtza amb el Dounce per tal de solubilitzar les histones. A continuació es centrifuga a 17,700 g, 5 min, i el sobrenadant resultant conté les histones solubilitzades. El procés es pot repetir una segona vegada per assegurar una completa extracció de les mateixes.

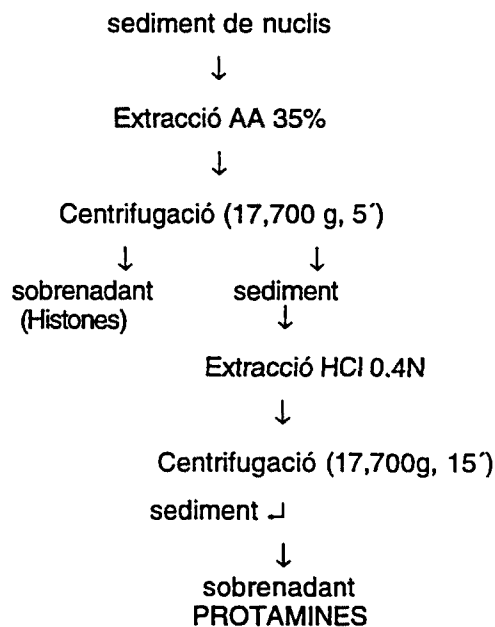
b. *Obtenció de Protamines*

Si el que es vol obtenir és la dotació global de les proteïnes bàsiques nuclears d'una preparació de nuclis, es farà una extracció amb HCl 0.4N de tal manera que s'obtidran tant histones com protamines. S'afegiran de 3 a 4 volums d'HCl 0.4 N al sediment de nuclis, s'homogeneïtzarà amb un Dounce i es centrifugarà a 17,700 g, 15 min, obtenint en el sobrenadant les proteïnes bàsiques totals solubilitzades.

Però si només es volen les protamines (en el cas que en els nuclis coexisteixin histones i protamines), primer s'extrauran les histones amb AA 35% i després es tornarà a extreure però amb HCl 0.4N, de tal manera que es solubilitzaran les protamines. La Fig.II.B.6 indica el procediment.

Quan les protamines tenen un elevat contingut en cisteïna, aquestes poden formar ponts disulfur intra i intermoleculars amb la qual cosa es dificulta la seva solubilització. Aquests ponts, que estableixen el complex nucli-protamina, impedeixen l'extracció d'aquestes proteïnes, així que prèvia extracció el que es farà serà reduir els ponts disulfur (v. apartat II.B.5) per tal de que aquests es trenquin i les protamines es puguin solubilitzar.

Fig.II.B.6. Extracció de les protamines en els nuclis espermàtics.

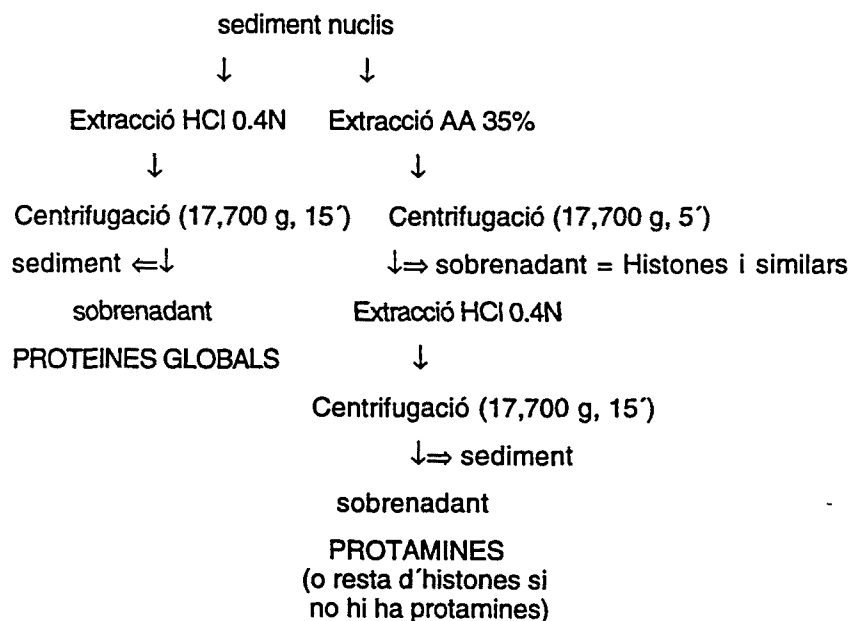


c. Obtenció de les SNBP's de naturalesa desconeguda

Quan *a priori* no es coneix el tipus de proteïnes bàsiques nuclears espermàtiques (SNBP's) que compacten el DNA d'una espècie, s'adopta una estratègia en la qual es separen per una banda les proteïnes totals (histones i protamines) i per altra banda, es fa una extracció fraccionada d'histones primer, i de protamines després.

El procediment es pot seguir en la Fig.II.B.7. Es parteix d'un sediment enriquit en nuclis espermàtics del qual es faran dues al·lqüotes; sobre una d'elles es realitza una extracció de les proteïnes globals amb HCl 0.4N, mentre que sobre l'altra es realitzen extraccions successives amb AA 35% i HCl 0.4N per si hagués protamines en el nucli de l'espècie en qüestió.

Fig.II.B.7. Extracció de proteïnes espermàtiques bàsiques de naturalesa desconeguda.



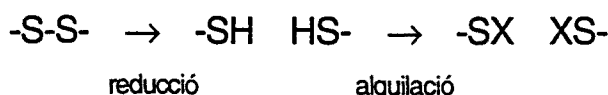
Així doncs, l'extracció global amb HCl servirà per veure el conjunt de proteïnes espermàtiques bàsiques que una espècie presenta en el nucli del seu espermatozoide, així com per determinar les proporcions relatives en què es presenta cada una de les diferents proteïnes. D'altra banda, l'extracció combinada

d'AA i HCl dóna una informació complementària que ajudarà a identificar les diferents proteïnes com histones o protamines (ja que les protamines seran extretes amb el HCl però no amb l'AA).

5. Reducció del ponts disulfur formats per les cisteïnes

En l'espermatogènesi de certes espècies, s'ha observat que les proteïnes espermàtiques bàsiques del nucli tenen un elevat contingut en cisteïna (cys). Es el cas dels condrictis (Bols i Kasinsky, 1976; Gusse et al., 1983; Saperas et al., 1993c), i les protamines de mamífers (Oliva i Dixon, 1991).

Durant la maduració de l'espermatozoide, els grups -SH de les cisteïnes poden oxidar-se formant ponts disulfur (S-S) intra i intermoleculars. Com hem dit abans, això impedeix la solubilització de les proteïnes, per tant és necessari reduir els ponts disulfur i modificar químicament els residus de cisteïna prèviament a l'extracció. L'alquilació estabilitza els sofres, eliminant la seva reactivitat i evitant la nova formació de l'enllaç per oxidació.



Els grups "X" d'aquest esquema poden ser diversos depenent del tipus d'alquilació que es faci. La Fig.II.B.8 presenta els diferents tipus d'alquilació que s'han utilitzat en aquest treball.

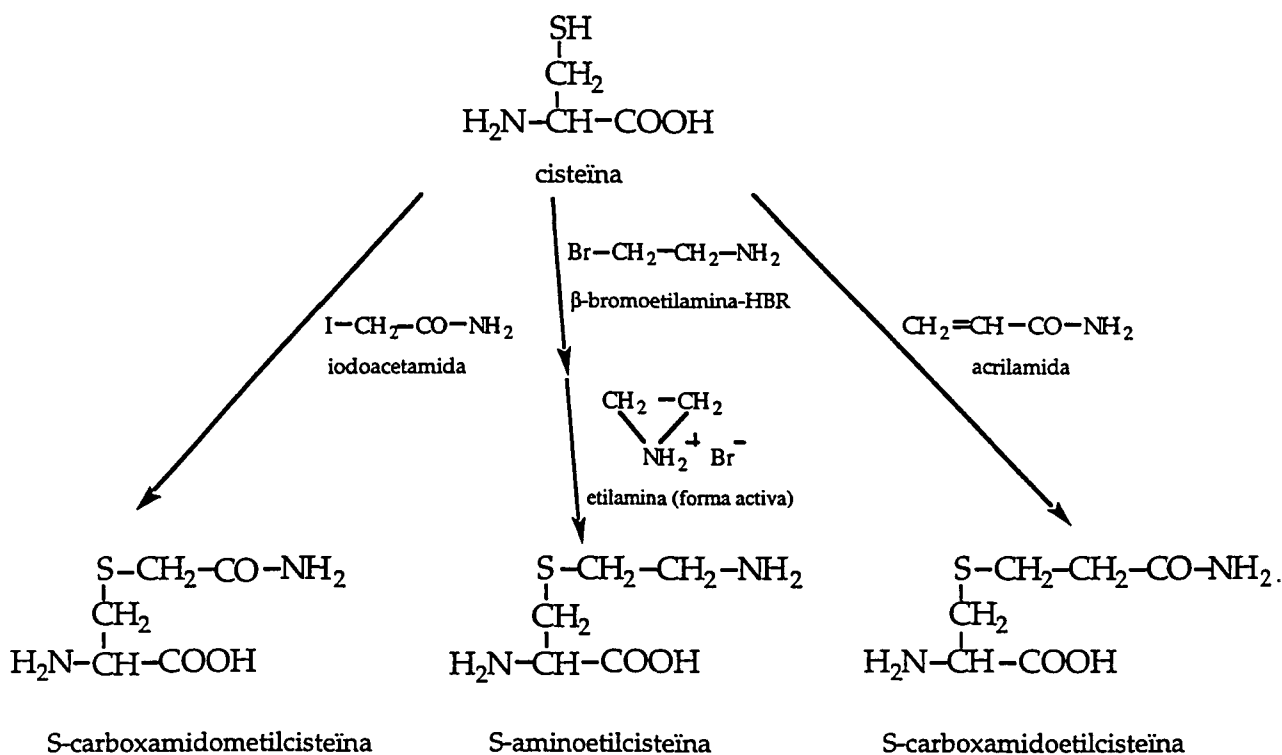
a. Reducció i Alquilació amb β -bromoetilaminaHBr (AE)

Assumint una proporció *a priori* de 0.5 mM de cisteïna per gram de proteïna (Hofmann, 1964), es dissol el sediment de nuclis (provinent d'un volum d'uns 200 ml) en 100 ml de urea 8 M (preparada en fresc); la urea desnatura les proteïnes fent més accessibles els ponts disulfur intramoleculars per la posterior reducció i alquilació. A continuació s'afegeix la següent solució reductora:

Solució Reductora I: 5 ml EDTA (2mg/ml)
 30 ml Tris-HCl 3 M pH 8.6
 1 ml (15 nmols) β -mercaptoetanol

el β -mercaptoetanol és l'agent reductor, de tal manera que els ponts disulfur acaben de quedar exposats i es redueixen passant a grups tiol (-SH). La reducció es fa a temperatura ambient sota atmosfera de nitrogen, durant 5 h en agitació. L'exposició dels grups SH i la seva oxidació és el factor limitant més important per la seva reducció.

Fig.II.B.8. Diferents formes d'alquilació de les cisteïnes un cop reduïts els ponts disulfur.



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

Un tipus d'alquilació és mitjançant la β -bromoetilaminaHBr (ALDRICH). A la mescla anterior (100 ml) se li afegeixen 12 gr. de l'agent alquilant, i s'incuba durant tota la nit en agitació sota atmosfera de nitrogen. A aquesta reacció se li anomena **aminoetilació (AE)**, i les cisteïnes queden en la forma de S-

aminoetilcisteïna (v. Fig.II.B.8). La β -bromoetilamina és un compost que per sí sol no reacciona: és quan passa a etilamina quan s'uneix al grup tiol reduït i per tant alquila. Perquè es doni aquesta reacció ha d'haver un pH bàsic, i és per això que un cop afegida la β -bromoetilamina s'ha de comprovar que el pH sigui 8-8.6, ajustant, si és necessari, amb NaOH 10 N.

Un cop les mostres estan alquilades ve la posterior extracció. Per a això s'afegirà HCl fins arribar a una concentració final de HCl 0.4N, s'agitarà durant 10 min i es centrifugarà durant 1 h a 27,200 g per tal de que sedimenti tot allò que no són proteïnes. El sobrenadant resultant conté les proteïnes solubilitzades entre les quals es troben les riques en cisteïna aminoetilades.

b. Reducció i Alquilació amb Iodacetamida (CM)

El mètode utilitzat és una adaptació modificada del mètode de Gusse et al. (1983). En aquest cas, la solució reductora és la següent:

Solució Reductora II: urea 8 M (en fresc)
 EDTA 2 mg/ml
 Tris-HCl 3M pH 8.6
 DTT 10 mM (agent reductor)

Els nuclis s'incuben amb 10 volums de la solució reductora durant 5 h a temperatura ambient, sota atmosfera de nitrogen i en agitació suau. Passat el temps d'incubació, es procedeix a l'alquilació, afegint iodacetamida fins a 25 mM, es comprova el pH (reajustant-lo amb cristalls de Tris si cal), i es torna a posar a agitar en les mateixes condicions i a les fosques, durant 5 h més o bé incrementant el temps tota la nit. A aquesta reacció se li anomena **carboximetilació (CM)**, i les cisteïnes queden modificades en la forma de S-carboxamidometilcisteïna (Fig.II.B.8).

Posteriorment, es porta la mescla fins a HCl 0.4N, i d'aquesta manera s'extrauen les proteïnes. Es centrifuga durant 1 hora a 27,200 g, i en el sobrenadant obtenim les proteïnes solubilitzades.

c. Doble Reducció i Alquilació amb Iodacetamida (CM)

Si ens volem assegurar que les proteïnes presentin la totalitat de les cisteïnes estat reduït i alquilat, es pot fer una doble reducció i alquilació. Com a solució reductora es pot fer servir la següent:

Solució Reductora IIIa: EDTA 2mM
Tris-HCl 50 mM pH 8.8
DTT 10 mM (agent reductor)

Els nuclis s'homogeneïtzen amb aquesta solució amb l'ajut d'un Dounce, fins obtenir una solució el més homogènia possible. Un cop els nuclis estan ben homogeneïtzats, s'incuben sota atmosfera d'argó (que també pot ser nitrogen), a 37°C durant 3 hores. Passat el temps, es procedeix a l'alquilació, afegint iodacetamida fins a 40 mM, i tornant a incubar sota atmosfera d'argó a 37°C durant 2 hores. Un cop la reacció d'alquilació ha finalitzat, es centrifuga a 2,500 g, 10 min, i el sediment (nuclis reduïts i alquilats) s'extreu amb HCl 0.4N per així obtenir les proteïnes carboximetilades solubles (segons II.B.4)

Un cop es tenen les proteïnes solubilitzades, es dialitzen extensivament enfront d'aigua i es liofilitzen. Ara es tornen a reduir amb més quantitat d'agent reductor:

Solució Reductora IIIb: EDTA 2mM
Tris-HCl 50 mM pH 8.8
DTT 50 mM (agent reductor)

Les proteïnes es dissolen en la solució reductora i s'incuben sota atmosfera d'argó a 37°C durant 3 hores. Passat el temps, es procedeix a l'alquilació, aquest cop afegint iodacetamida fins a 200 mM (es posa 4 vegades més d'agent alquilant que d'agent reductor), i es continua incubant sota atmosfera d'argó a 37°C durant 2 hores més. Un cop la reacció d'alquilació ha finalitzat, les proteïnes alquilades i solubles es dialitzen extensivament enfront d'aigua, i es liofilitzen. D'aquesta manera totes les cisteïnes han quedat ben reduïdes i alquilades.



d. Reducció i Alquilació amb Acrilamida

Un altre tipus d'alquilació que s'ha usat ha estat l'alquilació amb acrilamida, on les cisteïnes queden en la forma de S-carboxamidoetilcisteïna (Fig.II.B.8). Aquest tipus d'alquilació es va utilitzar en el cas d'una de les protamines de *Murex brandaris* que presentava dues cisteïnes i, tot i que la protamina es podia extreure amb HCl 0.4N sense necessitat de ser reduïda prèviament, s'havia de reduir i alquilar perquè les cisteïnes no donessin problemes alhora de la seqüenciació de la protamina.

La proteïna (4 nmols) es va dissoldre en 100 μ l de $\text{NH}_4 \text{HCO}_3$ 0.1M, clorur de guanidina 6M pH8.3, i posteriorment es van afegir 1.54 mg de DTT (agent reductor), mantenint la reacció durant 30 min a 70°C. Passat el temps, la mostra es va refredar i alquilar, afegint-hi 50 μ l d'acrilamida 6M, i incubant durant 45 min aquest cop a temperatura ambient.

Un cop la proteïna està alquilada, s'ha de desalar, eliminar totes les substàncies en les que està dissolta. Per això, la mostra s'aplica a una columna C-18 d'HPLC (v. II.B.8.f) i es renta amb 100% d'agent contra-ió (TFA 0.05%) durant 5 min, i d'aquesta manera aconseguim eluir les sals, i immediatament després es renta amb 100% de fase orgànica (ACN 60% en TFA 0.05%) per alliberar la proteïna.

6. Precipitació de les proteïnes

Els passos anteriors condueixen a la solubilització 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 tres sistemes de precipitació diferents, els quals es presenten a continuació.

a. Precipitació amb acetona

Els diferents sobrenadants en HCl 0.4N que contenen les proteïnes solubilitzades, es poden tractar amb acetona per fer precipitar les proteïnes; en el cas de les proteïnes que s'hagin extret prèvia reducció i alquilació, caldrà que els

sobrenadants es dialitzin extensivament enfront d'aigua abans de precipitar amb acetona, per evitar que precipitin alguns dels components de les solucions utilitzades (com la urea). Al sobrenadant dialitzat se li afegirà 6 volums d'acetona freda (-20°C) i es deixarà a -20°C durant 1 hora. Perquè es doni aquesta precipitació es necessita un medi el suficientment àcid, de manera que cal afegir HCl fins a una concentració de 0.1N perquè la precipitació es doni correctament.

A continuació es centrifuga a 17,700 g, 5 min, 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 0.1N). Es fan un total de 3-4 rentats. L'últim rentat es fa amb acetona pura, i el sediment resultant s'asseca al buit (v. apartat II.B.7). Si no es fes aquest últim rentat, degut a que 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, s'elimina les restes d'HCl i aquest perill desapareix.

En el cas de les proteïnes extretes amb HCl 0.4N que han estat prèviament reduïdes i alquilades, el que s'ha fet després de la diàlisi, més que precipitar amb acetona ha estat la posterior liofilització, per evitar el més mínim la contaminació per part de les solucions reductores emprades.

b. Precipitació amb àcid tricloracètic (TCA)

El TCA precipita les proteïnes espermàtiques bàsiques de manera diferencial segons la seva concentració, així al 5% precipita bàsicament les histones nucleosòmiques mantenint-se solubles les de tipus H1, mentre que a un 20-25% precipiten totes les proteïnes espermàtiques bàsiques (Platz i Meistrich, 1977). Per aquesta raó, al sobrenadant procedent de l'extracció àcida se li afegeix TCA fins al 20%. Després d'una breu agitació i de mantenir-ho en fred 15 min, es centrifuga a 17,700 g, 15 min. El sediment, que conté les proteïnes precipitades, es renta de la mateixa manera que es descriu en l'apartat anterior.

El fet de precipitar amb TCA en comptes de fer-ho amb acetona té l'aventatja de que és un mètode més ràpid, i es manipulen volums més petits, però té l'inconvenient que les proteïnes s'enganxen molt a les parets dels recipients, i costa més de veure el sediment (ja que no és de color blanquinós com resulta quan és precipitat amb acetona, sinó transparent).

c. Precipitació amb sulfat d'amoni

Una forma de precipitar les proteïnes és portant-les a un cert percentatge de saturació de sulfat d'amoni. El sulfat d'amoni precipita de forma específica proteïnes atenent al percentatge de saturació al qual es trobi. A la Taula II.B.I s'exposen els diferents percentatges de saturació al que s'arriba afegint una determinada quantitat de la sal, a temperatura de 25°C, partint d'una concentració determinada inicial de la mostra en qüestió.

Taula II.B.I. Percentatges de saturació de sulfat d'amoni per precipitar proteïnes, a 25°C. Indica els grams per litre de sulfat d'amoni que s'han d'afegir, partint d'una concentració inicial per arribar a un percentatge de saturació concret.

Initial Concentration of Ammonium Sulfate Per Cent Saturation	Final Concentration of Ammonium Sulfate Per Cent Saturation																			
	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
0	56	84	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	610	662	713	767
10		28	57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	540	592	640	694
20			28	57	88	107	120	153	185	220	256	294	333	373	415	459	506	556	605	657
25				28	58	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	471	520	569	619
30					30	48	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	438	485	533	583
35						38	50	82	114	147	182	219	256	297	338	386	434	481	529	579
40							42	74	107	142	177	214	252	292	333	378	428	472	522	572
45								81	114	149	184	221	259	299	340	386	438	485	533	583
50									94	129	164	200	238	278	319	364	411	457	506	556
55										107	142	177	214	252	292	333	378	428	472	522
60											114	149	184	221	259	299	340	386	438	485
65												121	156	193	231	271	312	358	405	453
70													128	164	200	238	278	319	364	411
75														135	171	210	250	293	339	383
80															138	177	216	256	302	345
85																141	179	220	264	307
90																	144	183	227	269
95																		147	190	232
100																			153	194

La saturació es pot fer de dues maneres, bé afegint els grams de sulfat d'amoni pertanyents al percentatge de saturació, bé dialitzant la mostra amb el sulfat d'amoni saturat al percentatge desitjat. En tots dos casos, però, cal afegir 1µl de NaOH 1N per cada gram de sulfat d'amoni per millorar la precipitació de les proteïnes.

Un cop s'ha afegit el sulfat d'amoni, es "vorteja" la mescla (perquè la sal quedi ben dissolta) i es deixa que les proteïnes precipitin durant tota la nit. Si la saturació es fa mitjançant la diàlisi de la mostra, el pH pot ser controlat tenint el sulfat d'amoni saturat en TrisHCl 20mM al pH desitjat.

Un cop les proteïnes han precipitat (es veu perquè la mostra està tèrbola), es centrifuga a 10,500 g, 15 min, i en el sediment es recullen les proteïnes precipitades. Aquestes es renten amb sulfat d'amoni saturat al percentatge desitjat, tornant a centrifugar amb les mateixes condicions, i el sediment resultant es resuspen amb aigua i es dialitza extensivament. Per concentrar les proteïnes o assecar-les, s'usa la metodologia explicada en els apartats II.B.9 i II.B.7, respectivament.

7. *Assecat de les proteïnes*

Per eliminar l'acetona que impregna el sediment proteic obtingut, aquest s'assecar mitjançant un dessecador connectat a una trompa de buit durant uns 10-15 min.

Un sistema utilitzat molt sovint 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). Per això, es dialitza el sobrenadant amb les proteïnes solubilitzades enfront d'aigua destil·lada (o HCl 5 mM), i després es congela fins a -80°C (amb CO_2 sòlid i acetona) per així liofilitzar-se.

Un altre mètode per assecar fraccions de columnes, però aquest cop de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) en fase reversa, és mitjançant un concentrador de nitrogen, el qual manté en constant contacte, corrents de nitrogen gas en les solucions de proteïnes, arribant-se a evaporar el disolvent i quedant les proteïnes seques enganxades en el recipient (tub).

I per últim, un altre mètode per assecar proteïnes ha estat l'ús de l'*speedvac*, centrífuga que va a unes 400 g, acoblada a una bomba de buit, de manera que permet l'evaporació del disolvent. Aquest mètode s'ha utilitzat sobretot quan volíem conèixer les proteïnes que contenien una determinada fracció cromatogràfica: les

proteïnes dissoltes en el tampó d'elució s'assecaven a l'*speedvac* i d'aquesta manera es preparaven per ser carregades en un gel d'electroforèsi.

8. Mètodes cromatogràfics per la purificació de proteïnes

A continuació es descriuen les tècniques emprades per la separació de proteïnes, les quals requereixen el pas per una columna amb una determinada matriu, i la consegüent elució fraccionada atenent a diferents principis segons el tipus de cromatografia utilitzada.

a. Cromatografia de bescanvi iònic (CM-52)

Aquest tipus de cromatografia es basa en l'atracció de molècules amb càrregues oposades (matriu cromatogràfica i proteïnes). Les proteïnes presenten grups ionitzables, i el fet que puguin presentar una càrrega neta positiva o negativa, o bé simplement diferències de càrregues, pot utilitzar-se per la separació de mesclades d'aquestes molècules. El nombre d'enllaços electrostàtics entre la matriu i la proteïna depèn, no només del material emprat sinó també del pH i força iònica del tampó utilitzat.

Quan les proteïnes es carreguen en una matriu que té una càrrega oposada, al principi quan la força iònica és baixa, es troben enganxades a ella (establint-se enllaços electrostàtics proteïna-matriu). Perquè aquestes es desenganxin s'aplica un gradient creixent d'un competidor per tal que progressivament les proteïnes es vagin dissociant de la matriu, i així obtenir-les eluïdes. La Taula II.B.II mostra diferents tipus de matrius emprades en aquest tipus de cromatografia.

Tant histones com protamines són proteïnes molt bàsiques, per tant, varem utilitzar matrius de bescanvi iònic, la més utilitzada va ser una matriu de carboximetil cel.lulosa CM-52 (Whatman).

Els dos tipus de columnes utilitzades van ser de 2.5 cmx23 cm per *Eledone cirrhosa* i *Murex brandaris*, i d'1cmx8cm per *Octopus vulgaris*, treballant amb fluxes de 40 i 35 ml/h respectivament i col·lectant fraccions de petit volum (entre 1 i

5 ml). Les proteïnes van ser eluïdes amb un gradient de NaCl en solucions d'acetat sòdic 50 mM i pH 6.0 o 6.5.

Taula II.B.II. Tipus de matrius usades en la Cromatografia de bescanci iònic.

Some Commonly Used Ion Exchange Groups ^a		
Group	pH range	Structure
Anion exchangers Q (quaternary ammonium)	2-12	$-\text{CH}_2-\overset{+}{\text{N}}\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$
DEAE (diethylaminoethyl)	2-9	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{+}{\text{N}}\begin{matrix} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{matrix}$
QAE (quaternary aminoethyl)	2-12	$-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\overset{+}{\text{N}}\begin{matrix} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{matrix}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_3$
Cation exchangers SP (sulphopropyl)	2-12	$-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2-\overset{-}{\text{SO}}_3$
S (methyl sulphonate)	2-12	$-\text{CH}_2-\overset{-}{\text{SO}}_3$
CM (carboxymethyl)	6-11	$-\text{O}-\text{CH}_2-\overset{-}{\text{COO}}$

^aThese groups may be immobilized on various stationary phases, such as cellulose, dextran, agarose, and glass beads.

Procediment:

En el cas d'*Eledone cirrhosa* s'ha treballat a pH 6.5, i en el d'*Octopus vulgaris* i *Murex brandaris* a pH 6.0, equilibrant sempre amb tampó acetat.

- Es dispersa la matriu (CM-52) amb tampó acetat sòdic 0.2 M pH 6.0 (o 6.5) i es deixa sedimentar. A continuació s'acaba d'equilibrar, dispersant i re-sedimentant, 2 o 3 vegades amb el primer tampó d'elució que es tingui previst utilitzar.

- Un cop la matriu està equilibrada, es fa el buit i s'empaqueta en la columna.

- La columna es deixa rentant juntament amb tot el circuit, amb el primer tampó d'elució, durant tota la nit a flux de treball.

- Es carrega la mostra prèviament preparada amb el primer tampó d'elució.

Les proteïnes que s'han de carregar en la columna poden estar de dues maneres:

- a) barreja de proteïnes en pols (bé liofilitzades, bé precipitades amb acetona o TCA i assecades)
- b) proteïnes dissoltes en aigua o qualsevol tampó

Si tenim el primer cas, les proteïnes es dissoldran amb el primer tampó d'elució, el tampó de càrrega. Hauran de quedar ben dissoltes, i si cal s'homogeneïtzarà amb un Dounce per millorar la dissolució. Un cop dissoltes, es centrifuga per eliminar les molècules no dissoltes, i el sobrenadant es carrega a la columna.

Si les proteïnes estan dissoltes, es dialitzaran enfront del primer tampó d'elució. Si, un cop dialitzades s'ha format un precipitat, es centrifugarà la mostra a 27,200 g, 5 min; el sobrenadant contindrà les proteïnes dissoltes, i el sediment s'intentarà redissoldre de nou amb el mateix tampó (ajudant-nos del Dounce, si cal). Tornarem a centrifugar amb les mateixes condicions, i recuperarem el sobrenadant, que juntarem amb el primer. Aquest sobrenadant serà el que es carregarà en la columna.

- Una vegada carregades a la columna, es fa un rentat amb el tampó de càrrega (primer tampó d'elució) equivalent a dos o tres volums de columna. Amb aquest rentat s'elueixen totes les proteïnes que s'han enganxat inespecíficament a la matriu.

- A continuació, bé es fa un rentat amb un tampó de major força iònica (cas d'*O. vulgaris* i *Murex brandaris*), bé s'aplica directament el gradient creixent de NaCl.

- Les proteïnes es detecten espectroscòpicament llegint a 225 nm, longitud d'ona on l'enllaç peptídic dona una bona absorció amb un mínim d'interferències. La lectura pot fer-se, a més a més, a 275 nm i 320 nm, per detectar la presència d'aminoàcids aromàtics i de possible contaminació de DNA, respectivament.

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

- 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 en l'apartat II.B.6.

Els tampons utilitzats han estat els següents:

a) Per *E. cirrhosa* :

- 1^{er} tampó d'elució (i de càrrega)

NaCl 0.1 N en acetat sòdic 50 mM pH 6.5

- un cop acabat el rentat es va aplicar directament el gradient de NaCl format per NaCl 0.1 N en acetat sòdic 50 mM pH 6.5 → NaCl 2N en acetat sòdic 50 mM pH6.5

b) Per *M. brandaris* :

- 1^{er} tampó d'elució (i tampó de càrrega)

NaCl 0.2N en acetat sòdic 50 mM pH 6.0

- 2^{on} tampó d'elució

NaCl 0.6N en acetat sòdic 50 mM pH 6.0

- acabat el segon rentat, es va aplicar el gradient de NaCl format per

NaCl 0.6 N en acetat sòdic 50 mM pH 6.0 → NaCl 2N en acetat sòdic 50 mM pH6.0

c) Per *O. vulgaris* :

- 1^{er} tampó d'elució (i tampó de càrrega)

NaCl 0.2N en acetat sòdic 50 mM pH 6.0

- 2^{on} tampó d'elució

NaCl 0.8N en acetat sòdic 50 mM pH 6.0

- acabat el segon rentat, es va aplicar el gradient de NaCl format per

NaCl 0.8 N en acetat sòdic 50 mM pH 6.0 → NaCl 2.2N en acetat sòdic 50 mM pH6.0

Per conservar la columna un cop utilitzada, la matriu es renta exhaustivament amb el primer tampó d'elució i azida sòdica 10 mM per evitar el creixement de fongs.

b. Cromatografia de matriu d'agarosa amb protamina unida

Un dels principis en el que es basa la cromatografia és que hi hagi una matriu on quedin enganxades les proteïnes d'interès i després puguin ser eluïdes aplicant un eluent que competeixi amb les proteïnes per la unió a la matriu, i aconseguixi així desenganxar-les.

Un tipus especial de columna utilitzada pel cas de molècules acídiques és la matriu d'agarosa amb protamina unida. Les protamines són proteïnes altament bàsiques degut a l'elevat contingut en arginina (i en menor proporció lisina i histidina) que presenten, de manera que tenen una càrrega neta positiva, característica que es pot aprofitar si el que es vol és "caçar" molècules acídiques amb la conseqüent càrrega neta negativa. És per això que s'han utilitzat matrius que tenen unit com a component principal protamines.

Aquest tipus de cromatografia es fa servir per purificar DNA (molècula negativa degut als fosfats), però nosaltres l'hem utilitzat per purificar proteïnes acídiques provinents d'extractes d'òvuls (tal i com es veurà en l'apartat de Resultats). El tipus de matriu que s'ha usat ha estat *Protamine-agarose* (SIGMA, P-4530), reïna formada per agarosa amb protamina suspesa en NaCl 0.5M en 0.02% de timerosal (inhibidor proteolític).

S'ha treballat amb un volum molt petit de matriu, al voltant dels 2 ml, empaquetant la columna es una petita columna de plàstic de la casa BioRad (8cmx1.5cm). La matriu s'equilibra amb NaCl 0.15N en TrisHCl 10 mM pH 7.2-7.4, i les proteïnes s'elueixen incrementant la concentració de sals (on els anions competiran per la matriu).

Procediment:

- La matriu s'equilibra amb el tampó d'equilibratge treballant a un flux de 12 ml/h.
- Es carreguen les proteïnes en dissolució prèviament dialitzades amb el tampó d'equilibratge. Quan la mostra s'aplica a la columna, la columna es manté en agitació suau durant uns 20 min per així ajudar a que les proteïnes específiques s'uneixin a la protamina de la matriu.
- S'aplica un gradient de NaCl en forma creixent, i en passos discrets, és a dir, de forma consecutiva es va aplicant un tampó de concentració superior a l'anterior i es deixa d'aplicar en el moment en que s'ha eluït completament un pic.

Els diferents tampons que s'han utilitzat com a gradient han estat NaCl 0.2N, 0.4N, 0.6N, 1N, 2N i 4N en TrisHCl 10 mM pH 7.2-7.4. S'ha treballat a un flux de 12 ml/h recollint fraccions d'1-2 ml, i llegint-les a 230 nm. Un cop s'han obtingut les diferents fraccions, s'han dialitzat enfront d'aigua per eliminar les sals.

Aquest tipus de columna es pot regenerar, rentant la matriu amb 10 volums de NaCl 0.5N en TrisHCl 0.1M pH 8.5, treballant a un flux de 10 ml/h. Posteriorment a la regeneració, la columna s'equilibra pel seu posterior ús.

c. Cromatografia d'Hidroxiapatita

La cromatografia d'hidroxiapatita és un tipus de cromatografia no molt usual dintre del camp de la purificació de proteïnes. Una de les raons és perquè dona uns perfils cromatogràfics imprevisibles, té molt baixa capacitat i la manipulació de la matriu és molt delicada.

La hidroxiapatita està constituïda per la forma cristalina del fosfat de calci, amb la fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{OH})_2$. El mecanisme d'interacció de les proteïnes amb aquesta matriu ha estat estudiada per Gorbunoff (1990). Quan la hidroxiapatita s'equilibra amb tampó fosfat (el més utilitzat) adquireix una càrrega global negativa, de manera que si es carreguen proteïnes amb càrrega positiva existeixen interaccions inespecífiques de les mateixes amb la matriu. Per eluir aquestes proteïnes bé s'incrementa la concentració de fosfat, bé s'afegeix una sal com el NaCl, o bé s'usen ions Ca^{2+} o Mg^{2+} , els quals s'acomplexaran amb els ions fosfat de la matriu i la neutralitzaran, desengantant-se així les proteïnes.

En el cas de les proteïnes acídiques, la interacció de les proteïnes amb la matriu és un balanç entre la repulsió electrostàtica entre la càrrega negativa de la columna i la unió específica amb els llocs on hi ha el Ca^{2+} pertanyent a la matriu; l'última característica depèn de la disposició dels grups carboxil de les proteïnes més que del seu nombre. L'elució de les proteïnes es donarà amb ions que s'acomplexin de forma més forta al Ca^{2+} que als grups carboxil, tals com el fosfat o el fluor (el Cl⁻ no serveix perquè no s'acomplexa amb el Ca^{2+}).

Aquest tipus de cromatografia serveix com a una guia de fraccionament d'una mescla de proteïnes desconeguda, bé retenint proteïnes acídiques, bé bàsiques. En el nostre cas, el que volíem era retenir i purificar les proteïnes acídiques d'extractes d'òvuls.

El mètode utilitzat per la purificació de proteïnes àcídiques a partir d'extractes d'òvuls de llobarro està basat en una modificació del mètode de Cotten i Charlkley (1987).

La columna (HTP-BioRad) (uns 100 ml de matriu) es va equilibrar amb Na_2HPO_4 10 mM, NaCl 2M en HEPES 20 mM pH 7.0, treballant a un flux de 40 ml/h, i se li va aplicar la mostra prèviament dialitzada amb Na_2HPO_4 10 mM, NaCl 1M en HEPES 20 mM pH 7.0. La matriu es va rentar amb el tampó d'equilibratge a un flux de 40 ml/h, recollint fraccions d'1 ml. Posteriorment es va aplicar un gradient en *steps* (passos discrets) incrementant la concentració de fosfat: Na_2HPO_4 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM i 1M (en HEPES 20 mM pH 7.0), eluïnt-se proteïnes en cada cas. Les fraccions obtingudes es van dialitzar extensivament enfront d'aigua, i posteriorment concentrat a l'*speedvac*.

La idea és fer una primera columna en la que es pugui veure en quin rang de concentració de fosfat surten les proteïnes d'interès, per més tard fer una segona columna optimitzant el rang de concentració de fosfat en el que les proteïnes surten i així separar-les millor.

d. Cromatografia DE-52 DEAE Cel.lulosa

La cromatografia de DEAE-*Cellulose* és un altre tipus de cromatografia de bescanvi iònic, com la CM-52 (carboximetil cel.lulosa), on la separació de les proteïnes està basada en la seva càrrega amb respecte la de la matriu.

L'intercanvi iònic es basa en que ions carregats poder ser intercanviats per altres ions de la mateixa càrrega (éssent irrelevant la massa de l'ió). També és possible que una proteïna amb càrrega neta negativa es pugui intercanviar per ions Cl^- ; aquest procés es pot revertir quan es fa un rentat amb ions Cl^- en la forma de solucions de NaCl o KCl. Aquest rentat remou proteïnes unides dèbilment, mentre que un gradient creixent d'aquestes solucions desenganxarà les proteïnes més fortament unides.

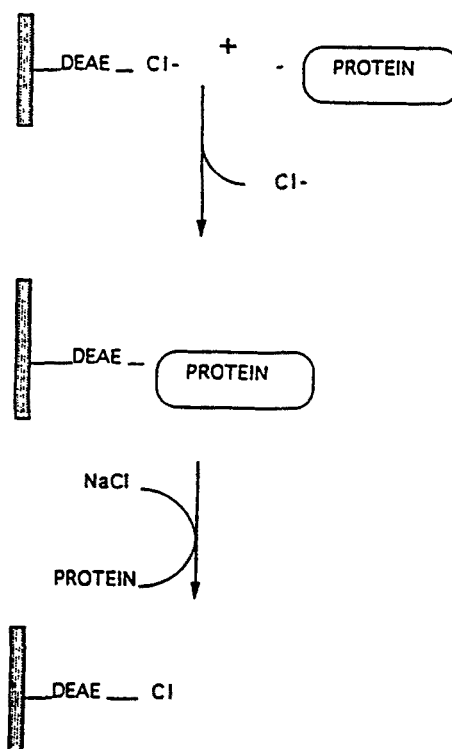
La fase estacionària (matriu) d'aquest tipus de cromatografia és un compost insoluble, un polímer hidratat com pot ser la cel.lulosa, el dextrà o el Sephadex, immobilitzant-se un ió intercanviador en aquesta fase (v. Taula II.B.II). En la DEAE-

cel.lulosa la matriu està formada per microgrànuls de dietilaminoetil-cel.lulosa, on el Cl^- s'intercanviarà amb proteïnes àcídiques (tal i com la Fig.II.B.9 mostra).

El mètode en que ens hem basat és una modificació de Sealey et al., (1989).

Les mostres es van preparar amb 1 mM EDTA en TrisHCl 25 mM pH 8.0, i es van aplicar a una columna de DE-52 DEAE Cellulose (Whatman), matriu prèviament equilibrada amb el mateix tampó. Es va carregar a un flux de 30 ml/h, i posteriorment es va fer un primer rentat amb el tampó d'equilibratge, agafant fraccions de 3 ml. Per eluir les proteïnes enganxades específicament, es va aplicar un gradient continu de 0M a 0.6M (o a 1M) de NaCl (en 1 mM EDTA en TrisHCl 25 mM pH 8.0) treballant a un flux de 25 ml/h, i recollint fraccions també de 3 ml.

Fig.II.B.9. Bases de la cromatografia de DEAE-cel.lulosa.



Les fraccions obtingudes es van analitzar en gels d' SDS al 15%, i posteriorment van ser dialitzades enfront d'aigua, i concentrades a l'*speedvac*.

e. Cromatografia d'Isoelectroenfoc (Cromatofocusing)

L'Isoelectroenfoc és un tipus de cromatografia d'intercanvi iònic (on l'intercanviador és un anió) que té com a principi el que les proteïnes siguin eluïdes segons el seu punt isoelèctric (pI). S'utilitzen tampons que generen un gradient lineal de pH al llarg de la columna de manera que les proteïnes es van desenganxant quan arriben al punt on el seu pI és el mateix que el pH de la columna.

En la matriu es forma un gradient de pH decreixent quan s'equilibra amb un tampó d'inici (*start buffer*) i es renta amb un *polybuffer* a pH baix. La separació de les proteïnes resulta ser normalment superior a l'obtinguda per tècniques convencionals de cromatografia de bescanvi iònic.

El tipus de matriu que s'ha utilitzat ha estat PBE-94 (Pharmacia Biotech), i com a eluent s'ha utilitzat el *Polybuffer* 74 amb un pH 4.0. Si es coneixen els pH's dels components de la mostra, s'esculleix un *polybuffer* amb un rang de pH que faci que les proteïnes d'interès s'elueixin després d'1/3-1/2 del gradient del pH. Per ex., per una mostra amb un pI entre 8 i 7.5 s'haurà d'escollir un gradient de pH entre 9 i 6, o si el pI és de 6-5.5, el gradient de pH serà entre 7 i 4. És millor usar gradients de pH estrets per arribar a una màxima resolució. En el nostre cas, les proteïnes d'extractes d'òcits que es volien purificar estaven en un rang de pH àcid, per tant es va escollir el *polybuffer* 74 que fa que el gradient de la matriu arribi a un pH de 4.0.

En aquest tipus de cromatografia tots els tampons han de ser desgasificats, ja que la reacció de l'aigua amb el CO₂ present en l'aire fa que el gradient de pH generat en la matriu fluctuï. Una altra recomenació és empaquetar la matriu en una columna llarga i estreta perquè el gradient de pH doni millor resolució. I per últim, les proteïnes s'han de detectar a 280 nm, ja que els anfolits del *polybuffer* absorbeixen a 254 nm, i l'imidazol present en els tampons a 225 nm. A mida que les proteïnes es van eluïnt es van fent lectures de pH.

Procediment:

- La matriu (PBE-94) s'equilibra amb l'*start buffer*, format per imidazol 0.025M pH 7.4 (tampó equilibrat amb HCl), i es desgasifica; posteriorment s'empaqueta i s'equilibra amb 10-15 volums del mateix tampó, fins que el tampó que surti de la

columna tingui el mateix pH que el tampó d'entrada, treballant a un flux de 20 ml/h. La columna que s'ha fet servir és de 6 cmx300 cm (model LKB4200).

- La mostra es dialitza extensivament enfront de l'*start buffer* perquè presenti un pH de partida de 7.4.

- Abans d'aplicar la mostra a la columna, es carreguen 2-3 ml de *polybuffer 74*, per així evitar que les proteïnes s'exposin a extrems de pH. El *polybuffer 74* s'usa en una dilució d'1:8. Es treballa amb un flux de 15 ml/h, i les fraccions que es recullen són d'1 ml aprox.

- S'aplica el tampó eluent, *polybuffer 74*, treballant amb les mateixes condicions. D'aquesta manera les proteïnes es van eluint segons el seu pI.

- La cromatografia s'acaba quan el tampó eluent que surt de la columna arriba al pH de 4.0.

Les proteïnes que són eluïdes estan dissoltes en els anfolits pertanyents al *polybuffer*, de manera que s'han de re-purificar. Hi ha diversos mètodes per eliminar el *polybuffer*, éssent el més simple el de precipitar les proteïnes amb sulfat d'amoni (v. apartat II.B.6.c)

Per regenerar la matriu, aquesta es renta amb 2-3 volums de NaCl 1M, per remoure possibles substàncies unides; si es vol fer un rentat més exhaustiu, es farà amb HCl 0.1M, però amb aquest rentat s'haurà d'equilibrar de nou la columna amb el tampó d'inici (*start buffer*) per augmentar el pH.

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

Un altre mètode per separar proteïnes i pèptids mitjançant mètodes cromatogràfics és el que comunament es coneix com a HPLC (cromatografia líquida d'alta resolució en fase reversa). Aquest mètode està basat en la hidrofobicitat de les proteïnes respecte a una matriu que és no polar a la que s'aplica un gradient de manera que les proteïnes hidrofíliques s'elueixen al principi d'ell (cas de les protamines) i les més hidrofòbiques al final.

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. És a dir, les cromatografies en fases "normals" es desenvolupen amb fases estacionàries que en termes fisicoquímics són

relativament polars, en contrast amb els suports de fase reversa que són essencialment no polars.

La fase estacionària està formada per partícules esfèroidals de sílice a les que s'hi uneixen covalentment grups silanoalquil originant d'aquesta manera, una superfície hidrofòbica. Els grups alquil poden ser de diferent número de carbonis, sent els més corrents els de tipus C₄, C₈ i C₁₈.

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 freqüent utilitzat és l'àcid 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.

L'ús 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 C₄ per la separació de proteïnes i pèptids de més de 3,000-5,000 Da i per polipèptids molt hidrofòbics de qualsevol mida, mentre que les C₁₈ es recomanen per pesos moleculars menors de 3,000-5,000 Da.

Els sistemes i columnes utilitzats al llarg d'aquest treball han estat els següents:

- Columna tipus Spherisorb C-18 ODS-2 5 m, acoblada a un sistema de bombes LKB 1250 amb detector d'absorbància UV i visible de renglera de diodes ABI 1000 S. Aquest sistema es va fer servir als Serveis Científico-Tècnics de la U.B.

- Columna tipus Vydac C-18 218tp54, acoblada a un seqüenciador tipus Waters model 510 amb un detector UV Waters 441 (absorció realitzada a 260 nm). Aquest sistema s'ha fet servir al laboratori del Prof. J. Vandekerckhove, Dept. de Bioquímica de la Facultat de Medicina, a la Universitat de Gante (Bèlgica).

- Columna tipus Vydac C-18 d'1 cmx50 cm (per la separació de protamines), i de 2 mmx150 mm (per la separació de pèptids) per una banda, i Nucleosil C-18 de 500mmx10mm i 250mmx4.6mm per altra, acoblades al sistema *Applied Biosystems 130A Separation System*, amb un detector d'absorbància de 220 i 280 nm. Les columnes treballaven a una temperatura de 40°C per millorar la separació dels pics. Aquest sistema s'ha utilitzat al laboratori del Dr. Pierre Sautière, a l'Institut Pasteur de Lille, França.

- Columna Vydac C-18 acoblada a un sistema de bombes LKB i treballant amb el sistema *GOLD*, i un detector d'absorbància de 230 nm. Aquest sistema s'ha utilitzat tant per la separació de protamines com de pèptids, al laboratori del Dr. Joan Ausió, al Departament de Bioquímica i Microbiologia de la Universitat de Victoria, Canadà.

9. Concentració de proteïnes en dissolució

a. Ús de centricons

De vegades tenim proteïnes que es troben molt diluïdes, i si les volem separar per HPLC, partint d'un volum de 2-3 ml i fent injeccions de 100-200 µl necessitariem fer moltes rondes i en cadascuna d'elles recuperariem les proteïnes en molt poca quantitat. En aquests casos el que interessa és concentrar les proteïnes amb la mínima pèrdua, i el que s'ha utilitzat han estat uns microconcentradors Centricon-3 (AMICON, Grace), més comunament anomenats centricons.

Amb els centricons s'aconsegueix concentrar petits volums de solucions macromoleculares per centrifugació a través d'una membrana que reté molècules d'un determinat pes molecular. Hi ha diferents tipus de centricons depenent del tamany de les proteïnes a concentrar, i per tant del tamany del porus de la membrana; en el nostre cas s'han fet servir centricons amb una membrana que reté molècules d'un pes molecular mínim de 3,000 Da (Centricon-3).



El Centricon-3 consta d'un tub de retenció, un tub on es carrega la mostra (reservori de mostra), la membrana i un tub on es reté el filtrat. El procés de concentració consta de dues fases, la primera de filtrat i la segona de recuperació. Es carrega la mostra en el tub de càrrega i es centrifuga; el que és menor al tamany del porus de la membrana és filtrat i es recull en el tub de retenció del filtrat, i les proteïnes que ens interessin segons el seu tamany i el porus de la membrana es queden en el tub de càrrega. Quant més temps centrifuguem, el volum de la mostra disminueix i la concentració augmenta.

La segona fase consisteix en recuperar el màxim de proteïna, ja que part d'ella pot haver quedat enganxada en la membrana. Es recupera la proteïna invertint el tub de càrrega prèviament tapat amb el tub de retenció, i es fa una segona centrifugació. Així es minimitzen les pèrdues per adhesió a la membrana i a les parets del tub de càrrega.

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 tapar-la totalment i sense que la velocitat de filtració es vegi reduïda significativament. A més a més, és millor fer servir un rotor cobert per minimitzar l'evaporació de la mostra.

Procediment:

- Col·locar el tub de càrrega amb el tub de filtrat.
- Carregar la mostra en el tub de càrrega amb molta cura de no tocar la membrana amb la pipeta *Pasteur*.
- Centrifugar utilitzant un rotor tapat, o sinó, també es pot tapar el tub de càrrega amb 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 3h a 7,500 g per concentrar 2 ml fins a un volum final de 40µl).
- Separar el tub de càrrega del tub de retenció, tapar el tub de càrrega amb el de retenció (si no ho estava abans) i invertir el conjunt.
- Centrifugar a 300-1,000 g durant 2 min per transferir el concentrat al tub de retenció.
- Separar els dos tubs i guardar el tub de retenció amb la mostra concentrada.

b. Ús de centripreps

Un sistema paral·lel al del centricon és l'ús de centripreps (AMICON), usats per concentrar volums superiors, fins a un màxim de 15 ml. El sistema és molt semblant a l'anterior.

El centriprep està format per dos tubs, un exterior que conté a un tub interior. El tub interior té una membrana com a base, membrana del tamany de porus desitjat (en el nostre cas hem usat porus de 10,000 Da, i d'aquí el nom de Centriprep-10) i és on es posa la mostra a concentrar, de manera que quan tots dos tubs es centrifuguen, el que és inferior al tamany del porus és filtrat i passa a l'interior del tub exterior, concentrant-se en el tub interior les proteïnes d'interès.

Les centrifugacions es realitzen a 3,000 g, i en un temps de 40 min s'arriba a disminuir un volum de 15 ml a la meitat.

Aquest sistema, al igual que els centricons, pot presentar un problema, i és que pot passar que determinades proteïnes es quedin enganxades a la membrana del centriprep. Si és així, s'haurà de rentar la membrana amb una solució d'elevada força iònica per desenganxar-les d'ella, com per exemple NaCl 2M.

c. Liofilització

Els centricons van bé per concentrar volums de 2-3 ml; per volums superiors es pot recórrer a la liofilització. Bé prèvia diàlisi o no, es liofilitza i les proteïnes (pols) es dilueixen en el volum desitjat, fent que les pèrdues de material siguin mínimes.

d. *Speedvac*

Un altra manera de concentrar les proteïnes que es troben en dissolució és reduir el dissolvent mitjançant la seva evaporació, utilitzant un *speedvac*. L'*speedvac* és una micròfuga que treballa a baixes gravitats (400 g aprox.) connectada a una bomba de buit, i en la qual es pot regular la temperatura, de

manera que el dissolvent es pot evaporar més o menys ràpid en funció de la temperatura.

Així doncs, el volum d'una mostra es pot reduir fins al volum desitjat depenent del temps que s'estigui concentrant (on el dissolvent s'estarà evaporant). El problema és que amb aquest mètode, s'està evaporant només el líquid de manera que les sals es van concentrant progressivament, per lo que es recomana dialitzar la mostra extensivament abans de concentrar-la.

C. Mètodes analítics

1. Mètodes electroforètics

L'electroforèsi és una de les tècniques més utilitzades actualment en el camp de la biologia molecular. És un mètode per separar molècules, basat en la mobilitat diferencial dins d'un camp elèctric degut a la seva relació càrrega/massa i a la seva conformació molecular, en la que s'utilitza un gel com a matriu de suport. La separació depèn de la relació massa/càrrega dels compostos i de la seva interacció amb l'estructura porosa del gel.

A continuació s'exposen diferents tipus d'electroforèsi utilitzats en aquest treball. El medi de suport ha estat la poliacrilamida, i hem seguit el mode d'electroforèsi vertical en placa.

a. Gels de poliacrilamida/acètic/urea (GPAU)

L'electroforèsi en poliacrilamida/acètic/urea separa les proteïnes fonamentalment segons la càrrega elèctrica. Ens permet separar proteïnes bàsiques tals com les protamines, les quals no entren en gels d' SDS.

La poliacrilamida actua com a medi de suport, éssent una malla plàstica formada per llargues fibres d'acrilamida entrecreuades per ponts de bisacrilamida (N,N'-metilen-bisacrilamida). La presència d'àcid acètic confereix un pH àcid al medi, de tal manera que les proteïnes queden carregades de forma positiva; així doncs, l'orientació dels electrodes en la font d'electroforèsi serà de positiu a negatiu. La urea, agent desnaturalitzant, elimina les interaccions entre les proteïnes i afavoreix la seva migració en el gel. Com a catalitzador de la reacció de polimerització del gel hi haurà l'aigua oxigenada.

La mida del porus del gel, i per tant la seva capacitat per separar diferents molècules proteiques, ve determinada tant per la concentració dels monòmers com per la relació acrilamida/bisacrilamida. Més altes concentracions d'acrilamida condueixen a porus de menor tamany, però els efectes de la concentració d'entrecruador són més complicats. A una concentració determinada 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 poliacrilamida conduents cap a porus majors (Goldenberg, 1989). Sovint s'utilitzen concentracions elevades de bisacrilamida en els gels empiladors per generar porus grans que no actuïn com un tamís sobre les proteïnes.

Els GPAU portats a terme en aquest treball s'han basat en el mètode de Hurley (1977), el qual és una modificació del mètode de Panyim i Chalkley (1969), en el que es substitueix el PSA i TEMED per tiourea fins al 0.09% i aigua oxigenada fins al 0.002%, per així evitar una pre-electroforèsi i escurçar el temps de polimerització. S'han utilitzat concentracions d'acrilamida del 15% i 25%, i urea 2.5M i 6.25M per la separació d'histones i protamines. Per la separació de petits pèptids hem utilitzat malles de poliacrilamida més denses, augmentant la concentració d'acrilamida fins al 30%, i urea 2.5M. El tampó de migració sempre ha estat l'àcid acètic al 5%.

i. Separació d'Histones i Protamines

Per la separació d'histones i protamines s'han utilitzat tres tipus de GPAU depenent de les concentracions d'urea i proporcions d'acrilamida utilitzades. Els tres tipus de gels que s'han preparat (sempre al 5% d'AA) han estat:

GPAU 2.5M urea/15% acrilamida
GPAU 6.25M urea/15% acrilamida
GPAU 2.5M urea/25% acrilamida

La recepta per cadascun d'ells es mostra a les Taules II.C.I, II i III respectivament. El que es fa és barrejar els components afegint el catalitzador (H_2O_2) al final. El temps de polimerització és d'uns 15-20 min, a temperatura ambient.

Els GPAU 2.5M urea/25% acrilamida, al presentar un percentatge major d'acrilamida, fa que es puguin separar millor proteïnes que en un gel al 15% es troben molt properes. Aquest tipus de gel s'ha utilitzat, per ex., quan s'ha volgut separar diferents formes fosforilades d'una mateixa proteïna, on la diferència entre elles és simplement la càrrega d'un fosfat (80 Da). A diferència dels altres tipus de GPAU, a més a més de preparar un gel separador, s'ha preparat un gel empilador (el que es coneix pel nom d'*stacking*), per on les proteïnes passen abans d'entrar en el

gel separador. Aquest gel té la finalitat de fer que totes les proteïnes que entren en el gel separador ho facin a la mateixa alçada.

El que primer es prepara és el gel separador, barrejant els components que s'indiquen en la Taula II.C.III. Perquè el gel polimeritzi no ha d'estar en contacte amb l'oxigen, ja que aquest és un potent inhibidor de la reacció, de manera que es posa una fina capa d'AA5% fred; un cop ha polimeritzat, es treu l'AA i s'afegeix el gel empilador. Les quantitats per fer aquest gel empilador també estan a la Taula II.C.III. Aquest tipus d'electroforèsi és discontinu (introduït primerament per Reisfeld et al., 1962; Davis, 1964; i Ornstein, 1964), de manera que una mateixa mostra corre en dos gels de diferent concentració per així obtenir una major resolució dels components proteïnics.

Taula II.C.I. Solucions i quantitats necessàries per un GPAU 2.5M urea/15% acrilamida, de 0.75 mm de gruix.

SOLUCIONS	8 ml	12ml
acrilamida 30%bis0.2%	4 ml	6 ml
ac.acètic 43%	1 ml	1.5 ml
urea 10M	2 ml	3 ml
tiourea	7mg	10.5 mg
aigua	1 ml	1.5 ml
H ₂ O ₂ 30%	45 µl	60 µl

Les mostres a carregar en el gel d'electroforèsi es dissolen a una concentració d'1 mg/ml en el tampó de mostres. Pels GPAU 6.25M urea/15% acrilamida s'ha utilitzat el següent tampó:

Tampó de mostres I: β-mercaptoetanol 20 mM
 urea 8 M
 àcid acètic 5%
 verd de metil 1%

Pels GPAU 2.5M urea/15% i 25% d'acrilamida s'ha utilitzat el tampó:

Tampó de mostres II: urea 8 M
 àcid acètic 5%
 punta de pironina

Per gels que seran tenyits amb blau de Coomassie, la mostra haurà de contenir, idealment, 1-2 µg de cada espècie proteica per generar bandes ben definides en pous de 0.5 cm d'amplada (Goldenberg, 1989). Quan les quantitats de proteïna són molt més inferiors, el que es farà serà tenyir el gel amb plata.

Taula II.C.II. Solucions i quantitats necessàries per un GPAU 6.25M urea/15% acrilamida, d'1.5 cm de gruix.

SOLUCIONS	12 ml	30ml	60ml
acrilamida 30%bis0.2%	6 ml	15 ml	30 ml
ac.acètic 43.2%	1.5 ml	3.75 ml	7.5 ml
urea	4.5 gr	11.25 gr	22.5 gr
tiourea	15 mg	26.3 mg	52.5 mg
fins a ... d'aigua	12 ml	30 ml	60 ml
H ₂ O ₂ 30%	67.5 µl	168.75 µl	337.5 µl

Les electroforèsis es desenvolupen a intensitat constant, 20 mA (uns 150 V), fins que el colorant arriba al final de la placa (unes 6 hores en plaques de 20cmx20cm). Pel cas del gels d'elevada concentració d'acrilamida (25%), a les proteïnes els hi costa més atravesar la malla tan tupida, de manera que triguen molt més; és per aquesta raó que es corren a un voltatge superior (150 V durant 10 min, i 250 V la resta) a 4°C (perquè les proteïnes no donin bandes distorsionades) fins que el colorant arribi a 2 cm del final de la placa.

Taula II.C.III. Solucions i quantitats necessàries per un GPAU discontinu 2.5M urea/25% acrilamida (gel separador), de 0.75 mm de gruix.

<u>Gel separador</u>		<u>Gel empilador</u>		
<u>SOLUCIONS</u>	<u>8 ml</u>	<u>16 ml</u>	<u>SOLUCIONS</u>	<u>16 ml</u>
acrilamida 60%bis 2%	3.3 ml	6.6 ml	acril 20%bis1%	320 µl
ac.acètic 43%	1 ml	2 ml	ac.acètic 43%	200 µl
urea 10M	2 ml	4 ml	urea 10M	400 µl
tiourea	7mg	14 mg	tiourea	1.8 mg
aigua	1.7 ml	3.4 ml	aigua	680 µl
H ₂ O ₂ 30%	45 µl	90 µl	H ₂ O ₂ 30%	7.5 µl

ii. Separació de pèptids

En aquest cas la concentració d'acrilamida és molt més elevada que en el casos anteriors, éssent del 30% perquè així els porus del gel siguin encara més petits, ja que el que estarà atravesant aquesta malla seran molècules de mida molt més petita que les proteïnes (estem parlant de pèptids de 30 aminoàcids fins a uns 4-5 aminoàcids); la concentració final d'urea que s'ha utilitzat ha estat de 2.5M, AA 5%.

Aquest tipus d'electroforèsi també és discontinua. La mostra passarà primer per un gel empilador (*stacking*), i posteriorment per un gel separador, on les proteïnes es separaran segons la relació càrrega/massa.

Aquest tipus de gels es van fer per analitzar els pèptids resultants de les digestions de la protamina d'*Octopus vulgaris* quan es va fer l'estudi de la seva estructura primària.

Al igual que pel cas dels gels al 25% d'acrilamida (i 2.5M urea), el que primer es prepara és el gel separador, barrejant els components que s'indiquen en la Taula II.C.IV, després es posa una fina capa d'AA5% fred (perquè es doni la reacció de polimerització d'aquest gel, i al mateix temps es formi una interfase ben recta), i un cop ha polimeritzat, es treu l'AA i s'afegeix el gel empilador.

Les mostres es preparen amb el següent tampó de mostres:

Tampó de mostres III: β-mercaptoetanol 20 mM
 urea 8M
 àcid acètic 5%
 verd de metil 1%
 traces de pironina

que no és res més que el tampó de mostres I dels GPAU per histones i protamines però amb la pironina. La pironina és un colorant que migra igual que si fós un pèptid de 12 aminoàcids (segons experiments realitzats), de manera que serveix com un guia mentre l'electroforèsi té lloc.

Les condicions durant el desenvolupament de l'electroforèsi són les mateixes que pels gels al 25%: es corren a 4°C, 10 min a 100V, i la resta a 250V. L'electroforèsi s'atura quan el colorant (pironina) arriba a la meitat del gel, perquè així no hi hagin possibles pèrdues de pèptids més petits de 12 aminoàcids.

Taula II.C.IV. Solucions i quantitats per un GPAU discontinu per pèptids, 2.5M urea/30% d'acrilamida (gel separador), de 0.75 mm de gruix.

<u>Gel Separador</u>		
SOLUCIONS	5ml	10ml
acrilamida 60% bis 2%	2.5 ml	5ml
àc. acètic 43.2%	625 µl	1.25ml
urea 10 M	1.25 ml	2.5ml
aigua	625 µl	1.25ml
tiourea	4.4 mg	8.75mg
H ₂ O ₂ 30%	28.125 µl	56.25ml

<u>Gel Empilador</u>		
SOLUCIONS	1.6ml	3.2ml
acrilamida 20% bis 1%	320 µl	640 µl
ac. acètic 43.2%	200 µl	400 µl
urea 10 M	400 µl	800 µl
aigua	680 µl	1.360 µl
tiourea	1.8 mg	3.6 mg
H ₂ O ₂ 30%	7.5 µl	15 µl

b. 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 (i les seves subfraccions) completament. La resolució de les diferents isoformes de les histones pot millorar significativament per l'addició de detergents no iònics als gels 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).

En general, es fixa la concentració de detergent (Tritó X-100 6 mM) i es varia la concentració de urea (inhibidor de la unió amb el detergent), per tal d'escollir les condicions que millorin la resolució. Cal evitar modificacions químiques en tractar la mostra, com l'oxidació de Met, Trp i Cys.

En aquest treball s'han fet gels amb dues concentracions diferents de urea: 6M urea/6 mM Tritó X-100, i 7.5M urea/6 mM Tritó X-100. És qüestió de fer proves utilitzant diferents concentracions de urea per veure quina és l'adequada per obtenir una millor resolució en la separació de les proteïnes que es tinguin. Les solucions mare, així com les quantitats necessàries de cada component s'indiquen a la Taula II.C.V.

Procediment:

- Es barregen els components excepte el TEMED i el PSA, i es desgasifica al buit durant uns minuts.
- S'afegeix el TEMED i el PSA (preparat en fresc).
- Es monta el gel i un cop polimeritzat, es renten els pous amb AA 5%.
- Es fa una pre-electroforèsi per tal d'eliminar el front d'ions que podria interferir en la migració de les proteïnes. Per això, es carreguen els pous amb tampó de pre-corrugada format per AA 5% i les mateixes proporcions de urea i tritó del gel. La pre-electroforèsi es fa a voltatge constant, al voltant de 80 V, durant tota la nit, i com a tampó de corrugada es fa servir AA 5%.



- Es fa una pre-càrrega, carregant en els pous el mateix tampó de pre-electroforèsi afegint-hi cisteamina HCl 0.5M. D'aquesta manera s'eviten els fenòmens d'oxidació de les proteïnes al seu pas pel gel. Es corre de 30 min a 1 hora.

- Es renova el tampó de cubeta (AA 5%) i es carreguen les mostres, les quals s'han preparat amb el mateix tampó que pels GPAU (tampó de mostres I, v. II.C.1.a.i.). L'electroforèsi té lloc a 20 mA.

Taula II.C.V. Solucions i quantitats pels GPTU amb les proporcions 6M urea/6 mM Tritó X-100 (6/6), i 7.5M urea/6 mM Tritó X-100 (7.5/6), per gels d'1.5 mm de gruix.

SOLUCIONS	6/6 (90 ml)	7.5/6 (90 ml)
60 % acrilamida 0.4 % bisacrilamida	18 ml	18 ml
urea 10M, AA 6.67 %	54 ml	67.5 ml
Tritó X-100 0.3M	1.8 ml	1.8 ml
TEMED	450 µl	450 µl
AA	450 µl	---
aigua	13.5 ml	720 µl
PSA 10%	900 µl	765 µl

c. Gels d' SDS

Hem vist com els GPAU separaven les proteïnes bàsicament per la seva càrrega elèctrica; una altra manera de separar proteïnes és pel seu pes molecular, i en aquest cas el gel que s'utilitza conté un detergent, el dodecil sulfat sòdic (SDS), que actua com agent desnaturalitzant (Shapiro et al., 1967; Weber i Osborn, 1969; Dunker i Rueckert, 1969).

Els gels d' SDS són gels d'acrilamida discontinus, que contenen SDS. L'electroforèsi discontinua en presència d' 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 d' SDS (1.4 gr/gr polipèptid). Aquesta unió provoca la pèrdua de l'estructura secundària de les subunitats proteiques mitjançant la formació d'una micel.la

aniònica 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 d' SDS presentant diferent mobilitat, al igual com ocorre en altres proteïnes que són excepcions.

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 d' 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 que contenen SDS, no podent-se utilitzar en aquest tipus de gels (Chiva et al., 1987).

En aquest treball l'elaboració dels gels discontinus d' SDS ha seguit el sistema de Laemmli (1970) adaptat per Thomas i Kornberg (1978), amb algunes modificacions. Com en el cas de les GPAU per pèptids, aquest tipus de gels estan formats per un gel empilador i un gel separador. El gel empilador a més a més de concentrar les proteïnes, fa que es generi un gradient de voltatge entre tots dos gels. 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 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'enlenteixin, originant-se així bandes molt planes i ben definides. El gel separador, donarà la separació electroforètica segons el pes molecular.

En la Taula II.C.VI s'indiquen les solucions mare i quantitats necessàries per elaborar el gel d' SDS. El tampó de migració és el següent:

Tampó de migració:	0.6% Tris
	2.88% glicina
	0.1% SDS

Procediment:

- Es barregen els components del gel separador posant el PSA (catalitzador) al final.

- Perquè polimeritzi i l'oxigen (inhibidor) no interfereixi, es posa una fina capa d'aigua o isobutanol saturat. D'aquesta manera, la interfase queda també ben definida.

- Un cop polimeritzat (després d'uns 30 min), es treu l'aigua o isobutanol i es renta la interfase amb aigua.

- Es monta el gel empilador a sobre del gel separador, amb la pinta que definirà els pous, i es deixa polimeritzar durant aproximadament 15 min.

Taula II.C.VI. Solucions mare i quantitats per fer un gel d'SDS al 15% d'acrilamida d'1.5 mm de gruix.

<u>Gel empilador</u>			
<u>SOLUCIONS</u>	<u>3ml</u>	<u>16ml</u>	<u>24ml</u>
acrilamida 30% bis 0.8%	600 µl	3.2 ml	4.8 ml
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	0.75 ml	4 ml	6 ml
SDS 10%	30 µl	160 µl	240 µl
aigua	30 µl	8.48 ml	12.72 ml
TEMED	3 µl	16 µl	24 µl
PSA 10%	30 µl	160 µl	240 µl

<u>Gel separador</u>			
<u>SOLUCIONS</u>	<u>8ml</u>	<u>15ml</u>	<u>45ml</u>
acrilamida 30% bis 0.8%	4 ml	7.5 ml	22.5 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	2 ml	3.75 ml	11.25 ml
SDS 10%	80 µl	150 µl	450 µl
aigua	1.87 ml	3.5 ml	10.5 ml
TEMED	3.6 µl	6.75 µl	20.25 µl
PSA 10%	45.3 µl	85 µl	225 µl

Les mostres es preparen amb el tampó de mostres format per:

Tampó de mostres IV: Tris-HCl 0.0625M pH 6.8
SDS 2%
glicerol 10%
 β -mercaptoetanol 5% (=0.7 M)

En aquest cas, les proteïnes queden carregades negativament, així que la posició dels electrodes en la font d'electroforèsi serà de negatiu a positiu, al revès del que passa amb els GPAU.

A més a més de carregar les mostres, es carrega també un marcador de pes molecular, per així deduir el pes molecular de les bandes obtingudes (proteïnes). Les mostres s'hauran de bullir durant 2-3 min abans de ser carregades perquè així les proteïnes perdin la seva estructura secundària i migrin de manera uniforme pel gel. L'electroforèsi es duu a terme a 150V.

d. Anàlisi de proteïnes en gels bidimensionals

Per obtenir una major resolució dels components proteïnics es pot córrer una mateixa mostra en dos tipus de gels diferents, éssent el resultat un gel de dues dimensions. Com a primera dimensió les mostres es poden córrer en un GPAU, i un cop les proteïnes estan separades per la seva càrrega, es corren en una segona dimensió, aquest cop un del d' SDS, de manera que proteïnes diferents que abans estaven en la mateixa banda ara es separen per pes molecular.

S'han fet gels bidimensionals en els que la primera dimensió ha estat un GPAU 6.25M urea/15% acrilamida (v. II.C.1.a.i) o un GPTU (v. II.C.1.c), i un cop les proteïnes s'han separat per càrrega, les hem corregut en un gel d' SDS al 15% d'acrilamida (v. I.C.1.3) per així separar-les per pes molecular.

Procediment:

- Es fa la primera dimensió, en aquest treball un GPAU (també es podria fer un GPTU).
- Un cop finalitzada l'electroforèsi, es retalla verticalment la tira del gel corresponent a la zona on s'han separat les proteïnes. Aquesta tira servirà d'origen per la segona dimensió.

- Aquesta tira s'equilibra posant-la en immersió amb la mateixa solució del gel empilador d'un gel d' SDS (v. Taula II.C.VI), però sense el TEMED ni el PSA, durant uns 15-30 min en agitació.

- Amb l'ajut de pinces i en molta cura, es col·loca la tira equilibrada sobre el gel separador del gel d' SDS muntat.

- Un cop la tira està en contacte amb el gel separador (amb una fina capa del gel empilador, evitant les bombolles d'aire), s'acaba d'afegir el gel empilador.

- En un dels costats del gel es farà un pou que servirà per carregar un marcador de pes molecular.

- Es deixa polimeritzar durant uns 15 min.

- Es desenvolupa l'electroforèsi a un voltatge de 100-150 V.

Un aspecte que s'ha de tenir en compte al fer les bidimensionals és que la tira que serveix com a primera dimensió, a l'equilibrar-la s'infla, de manera que és recomanable fer el gel de la primera dimensió més prim que el de la segona, perquè així la tira pugui entrar dins de les plaques on està la segona dimensió. En el nostre cas hem fet la primera dimensió amb gels de 0.75 mm, i els gels de la segona dimensió, d'1.5 mm.

e. Detecció de les bandes en els gels d'electroforèsi

Un cop s'han separat les proteïnes en el gel d'electroforèsi, les diferents bandes s'han de visualitzar, i és per això que el gel es tenyeix, per detectar les proteïnes. En aquest treball s'han utilitzat tres mètodes de detecció de bandes.

i. Tinció amb blau de Coomassie

El mètode més comú per visualitzar les bandes de proteïnes en un gel és la tinció amb blau de Coomassie. 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 min 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.

Les solucions de tinció i destinció que s'han utilitzat han estat les següents:

Solució de tinció: *Coomassie blue* (R-250 pels GPAU, i G-250 pels gels d'SDS) al 0.25% en una solució d'aigua/metanol/àcid acètic en proporcions 5/5/1.

Solució destenyidora: la mateixa solució que la de tinció sense el colorant.

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

Per conservar el gel de forma permanent, aquest es col·loca entre dos fulls humits de cel·lofana i es deixa secar a continuació.

ii. Tinció amb plata

Aquesta tècnica s'utilitza quan la quantitat de mostra disponible és massa petita, de manera que no és possible detectar les proteïnes (o la totalitat d'elles) amb la tinció habitual del blau de Coomassie.

Procediment:

- Es fixa el gel durant 1 hora amb metanol 50%, AA 12% i 0.5 ml de formaldehid.

- Es renta amb etanol 50% durant 20 min, 3 cops, un mínim de 40 min.

- Pretractament (immersió) durant 1 h amb $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (0.2 gr/l o 20 mg/100 ml, o bé 0.1 gr/500 ml).

- Es renta 3 cops, 20 segons cada cop, amb aigua.

- Procés a les fosques (es pot tapar en paper d'alumini): impregnació durant 20 min en solució de plata, formada per:

1 l de solució de plata: 2 gr AgNO_3
0.75 ml HCHO 37%

aquest pas és millor fer-ho en agitació.

- Es renta dos cops durant 20 segons cada cop en aigua.
- Es revela durant 10 min amb solució de Na_2CO_3 (60 gr/l):

per 300 ml: 18 gr Na_2CO_3

150 ml HCHO 37%

5 o 6 cristalls de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 1$ (1 mg aprox.)

aquest pas també és millor fer-ho en agitació.

- Es renta 2 cops, 2 min cada un, amb aigua.
- Es renta 10 min en metanol 50%, AA 12%.
- Es fa un últim rentat amb metanol 50% durant 20 min. El gel es pot quedar d'aquesta manera fins l'hora de secar-lo, procedint de la mateixa manera que en el cas anterior.

iii. Tinció amb àcid pícric

Quan es corren pèptids petits en un GPAU 2.5M urea/30% acrilamida, els gels es posen a tenyir durant 10 min amb blau de Coomassie i després, de 30 a 40 min amb una solució formada per la combinació d'una "solució B" i àcid pícric:

3 parts de "solució B", formada per 1gr *Coomassie blue* R-250

50 ml H_2O

450 ml NaOH

7 parts d'àcid pícric 0.1 M

Els gels es destenyeixen en aigua, i es conserven de la mateixa manera que la resta de gels explicats, encara que aquest tipus de gel, degut a l'elevada concentració d'acrilamida, se sol trencar amb molta facilitat durant el seu assecat.

2. Determinació de la quantitat de proteïna en mostres en dissolució

No sempre tenim les proteïnes seques o liofilitzades en prou quantitat com per ser pesades. De vegades es recuperen quantitats molt petites de proteïnes, i la manera de recuperar-les sense perdre'n és disoldre-les (per ex. al recuperar proteïnes enganxades a un baló de liofilització) i d'aquí agafar alíqüotes per treballar. Per saber la quantitat de proteïna que hi ha a cada alíqüota s'han utilitzat dos mètodes.

a. Absorbància de les proteïnes a 230 nm

Les proteïnes tipus protamines donen una absorbància al voltant de 2 a 230 nm quan es troben a una concentració d'1 mg/ml (mentre que les histones a la mateixa concentració donen l'absorbància al voltant de 4.3 a 230 nm) (Ausió, 1980). Així, si es fa una dissolució de la mostra problema i es llegeix l'absorbància 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 0.1-4, fora dels quals es perd linealitat.

Aquest mètode s'ha fet servir per determinar la quantitat de protamina d'*Octopus vulgaris* alhora de fer les digestions per la seva posterior seqüenciació. Un cop es té una alíquota amb la proteïna dissolta quantificada, es pot liofilitzar i així treballar amb la proteïna en pols. I també s'ha utilitzat per saber quina quantitat de proteïna carregar en els gels d'electroforèsi per arribar a veure una banda (es necessiten uns 4 µg de proteïna per un gel d' 1.5 cm de gruix, i uns 0.4 µg per un gel de 0.75 mm).

b. Detecció colorimètrica pel mètode de Bradford

Una altra manera de quantificar proteïnes és mitjançant el mètode de Bradford (Kruger, 1994). Hi ha dos mètodes de quantificació, el *Standard Assay Method*, que determina quantitats relativament grans de proteïna, i el *Microassay Method*, que serveix per determinar petites quantitats de proteïna. Nosaltres hem utilitzat aquest segon mètode.

El mètode consisteix en construir una recta patró en la que s'expressen diferents concentracions d'albumina de sèrum boví (BSA) conegudes enfront de l'absorbància, i en la que s'interpolen lectures d'absorbància de diferents dilucions de la mostra problema per així saber la seva concentració.

Es construeix una recta patró amb BSA (0.1 mg/ml) en aigua i reactiu (reactiu:aigua, 1:5, v:v) (éssent el reactiu de la casa BioRad, format per *Coomassie blue* G-250, àcid fosfòric i metanol, on el colorant s'uneix a les proteïnes en dissolució i dóna un valor màxim d'absorbància entre 465 i 595 nm). La Taula

II.C.VII mostra les quantitats dels diferents components per la construcció de la mateixa.

Taula II.C.VII. Volums de la solució de BSA control (0.1 mg/ml) i dels components emprats per la construcció de la recta patró del mètode de Bradford (*Microassay*). Quantitats en μl .

<u>BSA</u>	<u>H₂O</u>	<u>Reactiu</u>
0	100	900
10	90	900
20	80	900
40	60	900
60	40	900
80	20	900
100	0	900

Un cop s'han preparat les diferents dilucions per construir la recta patró, immediatament després s'agiten i es llegeixen a 595 nm (ja que la reacció té un temps de vida mitja d'uns 30 min). Totes les dilucions es faran per duplicat, i el mateix amb la mostra problema, per així obtenir valors més fiables.

De la mostra problema es faran diferents dilucions, i s'afegirà també aigua fins a 100 μl i reactiu fins a un volum final d'1 ml, igual que per la recta patró. Les diferents dilucions es llegiran a 595 nm i els valors d'absorbància obtinguts s'interpolaran en la recta patró, per així conèixer les seves concentracions.

3. *Determinació de la composició aminoacídica d'una proteïna*

L'anàlisi consta de dues fases: una primera on es trencaran els enllaços peptídics de la proteïna, alliberant-se així els diferents aminoàcids, i una segona fase de identificació d'aquests aminoàcids.

a. Hidròlisi de la proteïna

El trencament dels enllaços peptídics que formen els aminoàcids es realitzarà mitjançant una hidròlisi àcida. El procediment estàndard consisteix en posar la proteïna amb HCl 6N en un tub que es segellarà després d'haver-hi fet el buit,

mantenint-lo a continuació a 110°C durant 24 hores. Addicionalment es pot afegir fenol a un 0.25% final, per així evitar la degradació de la Tyr (un dels aminoàcids més inestable enfront del HCl). Després es refredarà el tub a temperatura ambient, es trencarà el buit i s'eliminarà l'àcid amb l'ajut d'un rotavapor. Els aminoàcids quedaran així enganxats en les parets del tub. És important l'eliminació ràpida de l'àcid després de l'exposició del contingut dels tubs a l'aire, ja que pot donar-se 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 ex., el Trp es destrueix quasi completament, alguns enllaços peptídics no són totalment hidrolitzats (cas de les unions 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-traduccionament es destrueixen o es retornen a l'aminoàcid original.

Hi ha sistemes per minimitzar o corregir alguns d'aquests efectes; no obstant, com que els aminoàcids més afectats no es troben en les proteïnes objecte del nostre estudi, no s'han realitzat correccions sobre els resultats de les anàlisis d'aminoàcids.

b. Anàlisi d'aminoàcids

Una vegada hidrolitzada la proteïna, l'anàlisi s'efectua separant els aminoàcids en columnes cromatogràfiques, detectant la seva aparició i quantificant-la.

La majoria dels aminoàcids no poseeixen una absorció als UV o fluorescència significant a longituds d'ona adequades per la seva detecció. Així doncs, 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.

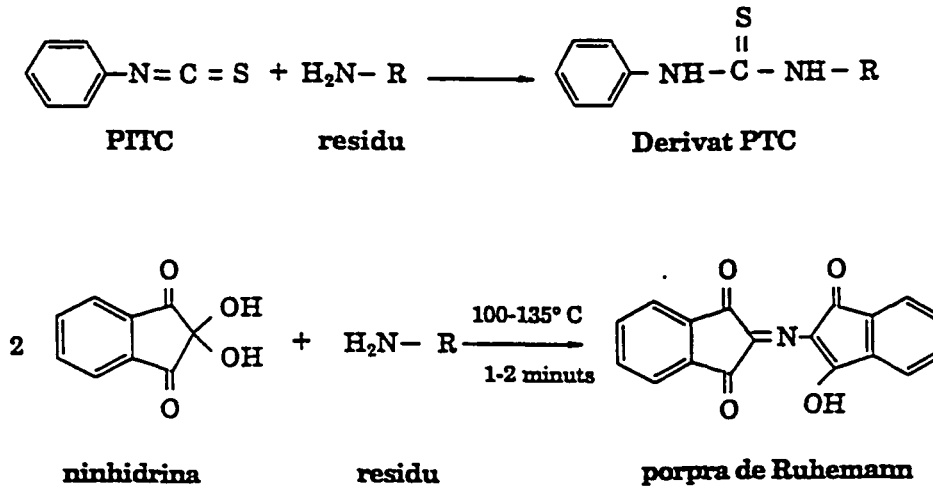
Entre les derivatitzacions pre-columna, és molt utilitzada la reacció amb fenilisotiocianat (PITC) (Heinrikson i Meredith, 1984), mentre que entre les post-columna és freqüent l'ús de l'ortoftaldehid (OPA) i la ninhidrina (Moore i Stein, 1948). La Fig.II.C.1 mostra les derivatitzacions amb PITC i ninhidrina.

L'autoanalitzador que més s'ha utilitzat ha estat de la marca *Pharmacia LKB Biotechnology*, model Alpha Plus (*Series Two*). La separació cromatogràfica de bescanvi iònic s'ha basat en el mètode ideat per Spackman et al. (1958). El tipus de columna és una reïna d'intercanvi catiònic de poliestirè divinil-benzè sulfonat, 5 μ , 200* 4 mm, i la temperatura de la columna es controla convenientment en cada moment. Les mostres es redissolten en tampó Citrat de Liti pH 2.2, es filtren amb filtres Millipore (pes molecular de 10,000 Da), i s'injecten en la quantitat desitjada. L'elució es fa mitjançant tampons de Citrat de Liti, de pH i intensitat creixent al llarg del programa. Aquest tipus d'anàlisi s'ha fet al Serveis Científico-Tècnics de la UB.

Un altre tipus d'autoanalitzador d'aminoàcids que s'ha utilitzat ha estat del tipus *Beckman System 6300* acoblat a un controlador *System Gold Analog Interface Module 406*. Els aminoàcids s'han diluït amb Tampó pH 2.2 (*Beckman*), i s'han aplicat a una columna d'intercanvi iònic del tipus sulfúric (2 mmx 150 mm), i després s'ha procedit a la derivatització dels aminoàcids postcolumna, amb ninhidrina (3 min, 140°C). Aquest tipus d'anàlisi s'ha realitzat a l'Institut Pasteur de Lille, França.

I per últim, un altre tipus d'analitzador d'aminoàcids utilitzat ha estat el model *Applied Biosystems 420A*, fent una derivatització postcolumna i seguint una metodologia anàloga a la descrita en Carlos et al. (1993a,b). Aquestes anàlisis composicionals es van realitzar al Protein Microchemistry Center, a la Universitat de Victoria, Canadà.

Fig.II.C.1. Reaccions de derivatització més corretment emprades per l'obtenció de derivats d'aminoàcids detectables espectroscòpicament: derivatització amb PITC (pre-columna), i ninhidrina (post-columna).



La majoria de les anàlisis s'han fet amb detecció post-columna, fent reaccionar l'elut amb ninhidrina en flux continu a temperatura elevada (135°C). Els aminoàcids formen així uns derivats acolorits amb màxim d'absorció al voltant de 570 nm i 440 nm. La identificació dels diferents aminoàcids es fa pel seu temps de retenció, comparant amb un patró que s'hagi elut en les mateixes condicions que la mostra, i la quantificació per comparació de les àrees de cada pic respecte a les àrees del patró de concentració coneguda.

4. Digestions específiques de proteïnes

En aquest treball ha estat necessària la digestió de proteïnes per tal d'obtenir pèptids de menor mida i així aquests ser seqüenciats amb major facilitat. Bàsicament s'han utilitzat tres enzims diferents amb diferents especificitats, amb la finalitat de trobar l'enzim que generés els pèptids/pèptid adequats.

a. Termolisina de *Bacillus thermoproteolyticus*

La termolisina és una endopeptidasa específica entre els enllaços α -amino de residus hidrofòbics i un altre aminoàcid, sempre que l'aminoàcid que reaccioni amb l' α -carboxílic del residu hidrofòbic no sigui una prolina.

Aquest enzim es va utilitzar per tallar la protamina d'*Eledone cirrhosa*. La protamina (10 nmols) es va digerir amb 1 μ g d'enzim (*Thermolysin Krist.*, 6000 PU/mg, Merck) durant 4 hores a 40°C, en presència de 100 μ l de bicarbonat d'amoni 0.1M pH 8.0, amb una relació d'enzim:substrat de 1:50. Passades dues hores de la digestió, es torna a afegir la mateixa quantitat d'enzim per així assegurar que tota la protamina quedi tallada. Per aturar la reacció, s'acidifica el medi afegint 50 μ l d'àcid fòrmic 70%, i després s'asseca el producte de la digestió a l'*speedvac*.

La barreja de pèptids resultants de la digestió es dissol amb TFA 0.05%, i s'aplica a una columna d'HPLC (C-18, Vydac) per la seva separació. Un cop separats els pèptids, els més addients es van seqüenciar.

b. Quimotripsina

La quimotripsina és una endopeptidasa que talla per residus hidrofòbics situats en l'extrem C-terminal, especialment per la Phe, Thr, Tyr i Leu, en ordre decreixent de susceptibilitat. De vegades hi ha trencament en l'extrem carboxil de la Met i His, sobretot a llargs temps d'incubació. Residus veïns poden influir en el ritme de tall i ponts peptídics on hi ha Pro es tornen relativament resistents (v. Aitken et al., 1989). La quimotripsina que s'ha utilitzat en aquest treball ha estat quimotripsina de pàncreas boví (SIGMA C-7762 tipus I-S), i s'ha usat per tallar una de les protamines d'*Octopus vulgaris*.

Procediment:

- Es dissol la proteïna en bicarbonat amònic 0.1M pH 8.0 fins una concentració final de 2 mg/ml de proteïna.

- S'afegeix l'enzim, preparat en fresc amb el mateix tampó (que és el que dona el pH bàsic necessari perquè l'enzim funcioni), en la proporció d'enzim:proteïna

desitjada. En aquest treball s'han fet les proporcions 1:2000, 1:1000, 1:500, 1:300 i 1:100. La incubació es fa a temperatura ambient.

- Es fan alíqüotes de la incubació a diferents temps, i s'atura la reacció. Per aturar la reacció es pot fer de dues maneres: baixant el pH de manera que l'enzim no pugui actuar, o bé baixant de cop la temperatura.

Per fer les digestions analítiques s'ha optat per acidificar el medi que conté la incubació, afegint-hi tampó de mostres de GPAU per pèptids (v. II.C.1.a.ii.), que conté AA i per tant disminueix el pH. D'aquesta manera, a més a més de parar la reacció de digestió, es tenen els pèptids preparats per ser carregats en un GPAU 2.5M urea/30% acrilamida i així fer un control electroforètic del resultat de la digestió.

Si es vol fer una digestió preparativa, l'alíqüota amb el medi d'incubació es congela ràpidament amb neu carbònica i acetona i es liofilitza, i d'aquesta manera queden els pèptids preparats per ser injectats a l'HPLC, separar-se i procedir a la seva seqüenciació.

Abans de realitzar digestions amb finalitat preparativa, es van realitzar digestions analítiques per triar les condicions més adequades. En les digestions analítiques, paral·lelament es va fer un blanc o control de manera que les condicions finals fossin les mateixes que en la mostra digerida, però sense afegir l'enzim.

c. *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).

L'enzim que es va utilitzar va ser elastasa de pàncreas porcí (SIGMA EC 3.4.21.36) en la proporció enzim:proteïna 1:100 . El procediment per fer la digestió a diferents temps és el mateix que el de la quimotripsina, i també es va utilitzar per l'obtenció de pèptids a partir d'una de les protamines d'*Octopus vulgaris* .

d. PE Biosystems CPP enzyme kit (PerSeptive Biosystems Inc.)

Aquest tipus d'enzim pertany a un *kit* comercial que forma part d'un paquet per seqüenciar proteïnes. S'ha fet una digestió d'una de les protamines d'*Octopus vulgaris* amb aquest enzim que és una exopeptidasa que reconeix l'extrem C-terminal dels aminoàcids, digerint una proteïna en sentit aminoterminal.

Amb aquesta digestió hi ha un alliberament d'aminoàcids, per tant la proteïna va disminuint de tamany (per l'extrem C-terminal), i aquestes disminucions en el pes molecular són enregistrades en un aparell d'espectrometria de masses acoblat a aquest sistema de digestió, de manera que en aquest cas no s'obtenen pèptids, sinó diferents pics contigus amb pesos moleculars decreixents, on la diferència de massa entre ells correspon a la massa de l'aminoàcid alliberat. Coneixent el pes molecular dels aminoàcids, l'aminoàcid alliberat pot ser reconegut, i d'aquesta manera conèixer els aminoàcids que hi ha a l'extrem C-terminal de la proteïna (v. també l'apartat II.C.5.d).

e. Proteïnasa d'*Astacus fluviatilis*

Aquest és un enzim amb acció endopeptidasa específica dels grups alfa-amino dels aminoàcids de cadena lateral curta (Thr, Ser, Gly i Ala, i amb menys afinitat, Leu). Es va utilitzar tant per la digestió d'una protamina d'*Octopus vulgaris*, com per algunes de les protamines dels Gasterosteiformes.

a) *Octopus vulgaris*

Una digestió a nivell analític ens va permetre conèixer les condicions adequades per la digestió de la protamina amb aquest enzim, arribant a la conclusió que la relació d'enzim:substrat havia de ser de 1:500, i la incubació havia de durar 1 hora a temperatura ambient. Es van digerir 87 µg de proteïna enfront de 7.9 µl d'enzim preparat segons la relació 1:500 (enzim:substrat), en presència de 43.5 µl de bicarbonat amònic 0.1M pH 8.0, tenint una concentració de proteïna de 2 mg/ml en el medi incubació. La reacció es va aturar afegint 800 µl de TFA 0.1%, per poder ser immediatament injectada a una columna d'HPLC i així separar els pèptids resultants.

b) Gasterosteiformes

La digestió de les protamines dels Gasterosteiformes es va realitzar amb finalitat analítica, per poder comparar els diferents patrons peptídics que donaven diferents protamines digerides amb el mateix enzim. Així doncs, els pèptids generats s'acabaven d'analitzar en un GPAU.

Cada proteïna (2 µg) es va incubar amb 1 µl d'enzim preparat segons la relació 1:12,000 (enzim:substrat), en presència de bicarbonat amònic 0.1M pH 8.0. La incubació es realitzava durant 5 min a temperatura ambient, i la reacció es parava afegint 3 µl de tampó de mostres II (2x) (v. II.C.1.a.) per ser carregada en un GPAU.

f. Bromur de Cianogen (BrCN)

El BrCN és un compost químic que produeix un trencament específic per l'aminoàcid Met. Es tracta d'un mètode molt utilitzat degut a la seva especificitat i alta eficiència, encara que alguns enllaços particulars poden donar rendiments pobres (especialment en enllaços Met-Thr i Met-Ser).

Aquest tipus de digestió s'ha utilitzat per les protamines dels Gasterosteiformes. La proteïna (150 µg) es va dissoldre amb 70 µl de HCl 0.1N. Posteriorment s'hi van afegir 10 µl de BrCN 5 mg/ml (en HCl 0.1N), éssent per tant 50 µg de BrCN (relació BrCN:proteïna en pes de 1:3), i la incubació es va realitzar a temperatura ambient, a la foscor, durant 24 hores. Passat el temps, la mostra es va assecar a l'*speedvac*, i a continuació se li va afegir 900 µl d'aigua per així ser carregada en una columna d'HPLC i poder separar els pèptids generats. Una petita alíquota, però, es dedica per fer un control electroforètic. Tot el procés s'ha d'efectuar amb extremes precaucions (treballant sota campana, entre d'altres) degut a la potencial toxicitat que presenta aquest compost.

5. Seqüenciació de proteïnes

a. Procediment general

Un cop es té una proteïna pura i es coneix la seva composició aminoacídica, el pas següent és determinar l'estructura primària de la mateixa. Per determinar la seqüència d'aminoàcids d'una proteïna cal passar per diferents etapes de caracterització:

- Anàlisi de la composició en aminoàcids (v. II.C.3)
- Determinació de l'extrem amino-terminal
- Degradació recurrent d'Edman sobre la proteïna sencera
- Digestió de la proteïna (v. II.C.4.)
- Separació dels fragments peptídics (v. II.B.8.f)
- 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 i clàssicament, a no ser pel cas de proteïnes petites, no es pot obtenir la seqüència completa en una sola anàlisi 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 digestió de la proteïna en pèptids de mida més addient. Actualment, però, si la mostra és extremament pura per una banda, i si s'utilitzen aparells de seqüenciació molt sofisticats (com és el cas del *Procise Sequencer/ABI 492* de Perkin Elmer) es pot arribar a seqüenciar de 70 a 80 residus aminoacídics d'una sola tirada (com veurem en el cas de la protamina P1 de *Murex brandaris* en l'apartat de Resultats).

Per fer les digestions sobre la proteïna, és essencial el conèixer la composició aminoacídica de la mateixa, per així escollir el tipus d'enzim o mètode. 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 de la proteïna.

b. Identificació dels extrems amino i carboxil

Per a identificar l'extrem amino podem recórrer a mètodes químics o enzimàtics. Hi ha enzims que catalitzen aquesta reacció, com l'aminopeptidasa M. Generalment, però, s'utilitzen hidròlisis químiques acoblades a un marcatge de l'aminoàcid N-terminal per compostos que en permeten la detecció per llum UV o fluorescència.

El mètode químic més correntment emprat és la degradació recurrent (o automàtica) d'Edman (Edman, 1950; 1953; 1956; Ilse i Edman, 1963; Edman i Begg, 1967), basat en un marcatge de l'aminoàcid N-terminal amb PITC (fenilisotiocianat). Aquest compost permet una degradació recurrent, per acoblament d'una reacció suau de tall en la que s'allibera només l'aminoàcid N-terminal. Aquest es aïllat i identificat, i la cadena polipeptídica és preparada per a seguir un nou cicle.

c. Degradació recurrent d'Edman

La degradació recurrent d'Edman és la tècnica més important utilitzada per la determinació de seqüències d'aminoàcids en pèptids i proteïnes. Aquest mètode està basat en el marcatge de l'aminoàcid amino-terminal amb PITC. Aquest compost permet una reacció de tall suau en la que s'allibera només l'aminoàcid amino-terminal. Aquest aminoàcid és identificat i la proteïna és sotmesa a un nou cicle. Segons el tipus d'aminoàcid que conté la proteïna es poden identificar entre 30 i 60 residus amino-terminals. El procés comprèn quatre fases: acoblament, hidròlisi, conversió i identificació, totes elles dutes a terme dins d'un seqüenciador automàtic acoblat a un sistema d'HPLC per a la identificació.

El tipus de seqüenciador utilitzat per fer les seqüències de la protamina d'*Eledone cirrhosa* i les protamines de *Murex brandaris* ha estat un *Procise Sequencer/ABI 492* (Perkin Elmer), acoblat a una columna d'HPLC del tipus PTH-C18 μ m, i usant com a solvents:

Solvent A: tetrahydrofurà 3.5%
20 ml/l Premix AB1401440

Solvent B: ACN/2-propanol (88:12)

Aquesta seqüenciació s'ha realitzat al laboratori del Dr. Pierre Sautière, a l'Institut Pasteur de Lille, França.

Per la seqüenciació de les protamines dels Gasterosteiformes s'ha utilitzat un seqüenciador del tipus ABI model 473A. Els derivats anilinoiazolinona van ser convertits en PTH-aa amb TFA a una temperatura de conversió de 60°C, i posteriorment van ser analitzats per HPLC en fase reversa en una columna de Brownlee C-18. Aquestes seqüències es van dur a terme al laboratori del Dr. Joan Ausió, al Protein Microchemistry Center, a la Universitat de Victoria, Canadà.

El seqüenciador utilitzat per les seqüències de les protamines d'*Octopus vulgaris* ha estat un model ABI477; els pèptids analitzats es van separar per HPLC, model ABI120A Narrow Bore, amb una columna de Brownlee, PTH-c18 5mm. Els solvents utilitzats van ser els següents:

Solvent A: 3.5% THF
100ml/L TFA
20 ml/L Premix ABI401440 (és un tampó acetat amb hexanosulfonat)

Solvent B: acetonitril/2-propanol (87.5:12.5)

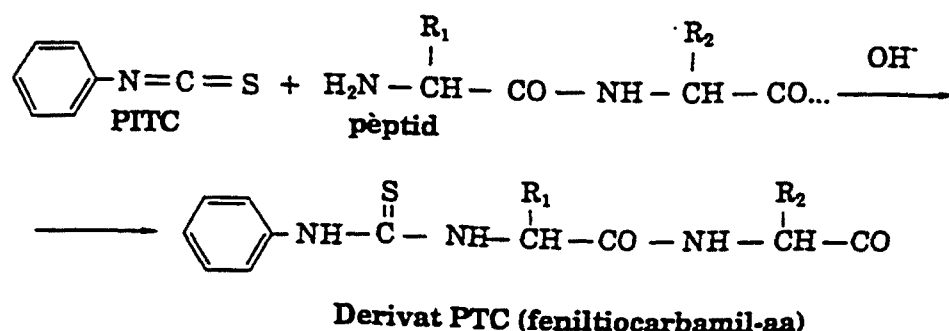
La seqüenciació s'ha realitzat al laboratori del Prof. J. Vandekerckhove, Dept. de Bioquímica de la Facultat de Medecina, a la Universitat de Gante (Bèlgica).

La seqüenciació dels precursors i variants de proteïnes d'*Octopus vulgaris* s'ha fet al laboratori del Dr. Eric Sautière, al Laboratoire de Neuroendocrinologie des Annélides, a l'Université des Sciences et Technologies de Lille, França. El seqüenciador utilitzat ha estat el model LF3000 de Beckman, on els PTH-aa's han estat separats i identificats mitjançant el sistema *Gold analytical microbore HPLC*, éssent la columna d'HPLC d'esferogel ODS Micro PTH (3 microns, 2.0x150 mm, i un flux de 0.2 ml/min).

A continuació s'expliquen els diferents passos que es donen en la degradació recurrent d'Edman.

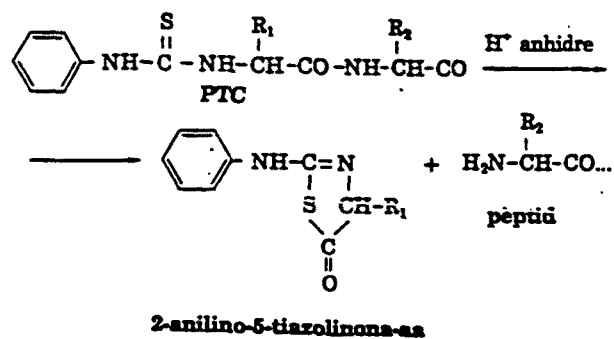
1- Acoblament

Consisteix en l'acoblament del PITC al residu amino-terminal formant-se un feniltiocarbamil-aminoàcid (PTC-aa); aquesta reacció té lloc en una solució alcalina ($10 > \text{pH} > 8$). Amb aquest marcatge s'identifica l'extrem amino-terminal.



2- Hidròlisi

El producte de la reacció anterior experimenta un procés de ciclització en medi àcid.



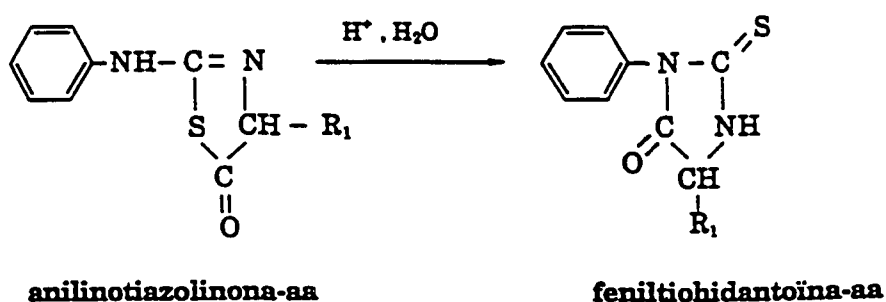
El compost resultant és una 2-anilino-tiazolinona.

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- Conversió

Els derivats anilinothiazolinonas 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 fase líquida i en medi diluït.



4- Identificació

Es duu a terme per HPLC en fase reversa, on cada aminoàcid té un temps d'elució conegut, a unes determinades condicions.

El darrer pas en la determinació de l'estructura primària de la proteïna és la reconstrucció a partir dels fragments. Cal que hagi solapament entre aquests (fent com a mínim dos tipus de digestió diferent) per a poder deduir-ne l'ordre.

d. Seqüenciació a partir de l'extrem carboxi terminal

Un del problema que molt sovint apareix en el moment de seqüenciar proteïnes (i sobretot protamines, degut al fet de presentar aminoàcids molt repetitius com són les Arg) és l'acabament de la seqüència, el conèixer els últims residus de l'extrem carboxiterminal. Així com el mètode clàssic de degradació recurrent d'Edman es basa en el reconeixement dels aminoàcids que es troben en posició aminoterminal, hi ha una nova alternativa basada en el reconeixement dels aminoàcids que es troben en posició carboxiterminal, solventant-se així el problema.

S'ha utilitzat un nou mètode de seqüenciació utilitzant el *Voyager Linear DE* de la casa comercial *PerSeptive Biosystems Inc.*, basat en la digestió de la proteïna amb una exopeptidasa que comença a digerir la proteïna per l'extrem carboxiterminal dirigint-se en direcció aminoterminal, podent-se així identificar els aminoàcids alliberats, tal i com s'explica a continuació.

Un cop es verifica la puresa de la proteïna (utilitzant àcid alfa-ciano 4-hidroxi cinamínic en 50% d'acetonitril) i es coneix la seva concentració, es digereix utilitzant l'enzim pertanyent al *PE Biosystems CPP enzyme kit*. La digestió es realitza fent diverses dilucions de l'enzim i aplicant la barreja de digestió a un aparell d'espectrometria de masses (MALDI). El que es detecta és una successió de pics, on hi ha un pic amb un pes molecular de partida (corresponent a la proteïna sense digerir), i tota una sèrie de pics consecutius on el pes molecular va disminuint progressivament, degut a la pèrdua d'un aminoàcid (resultat de la digestió); coneixent el pes molecular dels aminoàcids i calculant la diferència de pes molecular entre un pic i el del costat, es pot identificar l'aminoàcid alliberat.

Gràcies a aquest mètode es van detectar els últims residus situats en posició carboxiterminal d'una de les protamines d'*Octopus vulgaris* (tal i com es veurà en l'apartat de Resultats).

6. Espectrometria de masses

Durant el procés de seqüenciació d'una proteïna van apareixent dubtes pel que fa a la seva puresa, verificació del nombre de residus trobats per seqüenciació, microheterogeneïtat, fosforilacions, addicions de fosfats no covalents, ions de cationització, etc, pel que cal una determinació precisa del seu pes molecular. Per resoldre aquestes qüestions hi ha les tècniques de resonància magnètica nuclear o l'espectrometria de masses.

Per una banda, les mostres es van dissoldre en 200 µl d'ACN 20% en aigua i HCOOH 0.1% i es van aplicar a l'espectòmetre de masses *Spectrometer API I* de la casa Perkin Elmer Sclex, equipat amb una font *ion spray (nebulizer-assisted electrospray)* (Sciex, Toronto, Canadà). Els tampons s'injectaven amb una bomba de injecció mèdica (*Model 11, Harvard Apparatus South Natick, USA*) amb un flux de 5 µl/min. Els espectres de massa es van recollir a una resolució d'unitat mitjançant

escombratge de 400 a 1,200 m/z, amb una mida a cada pas de 0.1 Da i un temps de 2 ms. El potencial utilitzat fou de +4.5 KV, i els espectres es van recollir amb un voltatge de +90 V. Per analitzar els pesos moleculars es va utilitzar el programa *Mac BIO Spec*. Aquests espectres es van realitzar en el laboratori del Dr. Mostafa Kouach al Laboratoire d'Application de Spectrométrie de Masse de la Universitat de Lille II, a Lille, França.

Per altra banda, les mostres van ser aplicades en un espectròmetre de masses *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (Maldi), marca Bruker, model Reflex II. La mostra s'aplica embeguda en reïna α -ciano-4-hidroxi-cinàmic-àcid (Sigma c2020), generalment 1ml+1ml. S'aplica una acceleració de 28.5 Kv, la qual dóna 28.5 KeV d'energia per les monocàrregues, i es treballa amb una atenuació en el làser de 25 a 30. Aquesta tècnica es va realitzar al laboratori del Prof. J. Vandekerckhove, Dept. de Bioquímica de la Facultat de Medecina, a la Universitat de Gante, Bèlgica.

Quan hem tingut l'estructura primària d'una proteïna, i hem volgut comparar el pes molecular obtingut a partir de l'espectrometria de masses (massa observada) amb el pes molecular calculat a partir de la seqüència (massa calculada), hem utilitzat un programa informàtic anomenat *Mac ProMass* versió 1.05 (preparat pel Sr. Terry Lee, *Beckman Instruments*), on s'introdueix la seqüència i s'obté el pes molecular. Aquest programa, però, no calcula el pes molecular exacte de les cisteïnes quan es troben alquilades, per tant, aquest càlcul és millor fer-lo manualment en el cas de proteïnes riques en cisteïna.

7. Tècniques de Microscòpia

a. Estudi morfològic dels espermatozoides a nivell estructural i ultraestructural

i. Microscòpia Òptica

Aquesta tècnica ens ha permès adquirir una visió general del procés d'espermiogenesis d'*Eledone cirrhosa*, informació que s'ha complementat amb el respectiu treball amb microscòpia electrònica.

1- Fixació

Aquesta primera fase consisteix en fixar les estructures cel·lulars. Es va utilitzar el fixador de Bouin, i la fixació es va dur a terme durant 2-3 dies (100 cc de fixador per troços de mostra d'1 cm³). La composició d'aquest fixador és la següent:

Fixador de Bouin: solució aquosa saturada (1.4% aprox.) d'àcid pícric	75 ml
formaldehid 36-40%	25 ml
àcid acètic glacial	5 ml

2- Deshidratació

Es va fer una deshidratació amb percentatges d'alcohol creixents, utilitzant etanol:

	<u>nº canvis</u>	<u>temps total</u>
30%	6 x 1h	6h
50%	6 x 2h	12h
70%	4 x 1/2h	2h
90%	4 x 1h	4h
95%	2 x 1h	2h*
100%	5 x 1h	5h*

* aquests temps són estrictes.

3- Confecció dels blocs

Un cop la mostra està deshidratada, s'impregna amb una mescla de 100% etanol:toluol (1:1) durant 1h, i després amb només toluol durant 4h (fent canvis cada 30 min). Aquests temps també són estrictes.

Després s'inclouen en parafina:

parafina I	2-3h
parafina II	tota la nit
parafina III	2-3h

i es confeccionen els blocs.

4- Tinció

Un cop els blocs s'han tallat amb un micròtom (talls de 6 µcres), es procedeix a la tinció de les estructures de la mostra biològica. Es va utilitzar la doble tinció Hematoxilina-Eosina, que tenyeix els nuclis de color lila, i els citoplasmes de color rosa, respectivament.

La tècnica es basa en desparafinar les mostres amb xilè, hidratar-les de nou amb concentracions creixents d'alcohols amb la finalitat de que puguin entrar els colorants que són solubles, i tornar-les a deshidratar per poder-les muntar. El medi de muntatge utilitzat va ser el DPX.

Procés:

xilè I	15 min
xilè II	15 min
EtOH 100%	10 min
EtOH 90%	10 min
EtOH 70%	10 min
aigua	10 min
Hematoxilina	6-7 min
aigua	15-20 segons
Eosina	5 min
EtOH 100% I	3 min
EtOH 100% II	3 min
EtOH 100% III	5 min
xilè II	2 min
xilè I	2 min
muntatge DPX	

ii. Microscòpia Electrònica de Transmissió

Aquesta tècnica ens ha permès realitzar un estudi molt més detallat del procés d'espermiogenesis del cefalòpode *Eledone cirrhosa*.

1- *Fixació i Deshidratació*

Per la fixació del material es va optar per una doble fixació. Una primera fixació va ser amb paraformaldehid 2%-gluteraldehid 2.5% en tampó cacodilat 0.1M a 4°C, durant 1h 45 min. Es van fer rentats amb el mateix tampó cacodilat, durant 3h a temperatura ambient. La segona fixació va ser amb osmi 2%, en tampó cacodilat 0.1M, durant 1h 45 min a temperatura ambient.

Un cop fixades les mostres, es van rentar amb el mateix tampó que s'ha utilitzat per preparar el fixador, seguit d'un rentat amb aigua destil.lada de 5 a 10 min, i posteriorment es va procedir a la deshidratació. La deshidratació es va fer amb concentracions creixents d'acetona (50, 70, 90, 96 i 100%) a intervals de 10 a 30 min, a temperatura ambient.

2- *Inclusió*

En aquest pas la reïna, medi d'inclusió, va penetrant en totes les estructures cel.lulars, de manera que aquestes quedaran totalment incloses en ella. La inclusió es fa amb reïna en concentracions creixents (infiltració) fins arribar al 100%, que és la pròpia inclusió. Els medis d'inclusió utilitzats van ser reïnes epoxi del tipus Araldita i Spurr. Totes dues són reïnes no hidrofíliques, éssent l'Spurr menys viscosa i per tant amb millor poder de penetració. La recepta d'aquestes reïnes es dóna a la Taula II.C.VIII.

La inclusió amb barreges d'acetona i reïna Araldita es va fer amb les proporcions 1:1 i 1:3. (acetona:reïna), durant 1h en cada una a temperatura ambient. A continuació s'impregna amb la reïna pura durant 1h a temperatura ambient.

Pel cas de la reïna Spurr, la inclusió a partir de mesclades d'acetona i reïna es va fer a les proporcions 3:1, 1:1 i 1:3 (acetona:reïna), durant 30min, 1h 30min i 1h 45min respectivament, a temperatura ambient. La impregnació amb reïna pura va ser durant 6 hores a temperatura ambient.

Per la confecció dels blocs es posa la reïna pura en motllos de silicona durant 2 o 3 dies a 60-65°C, fins obtenir una perfecta polimerització de la mateixa.

3- Ultramicrotomia

Un cop els blocs estan piramidats, es tallen en seccions ultrafines de 45 a 80 nm amb ultramicròtoms SORVALL Porter-Blum MT2-B, REICHERT-JUNG i ULTRACUT-E utilitzant ganivetes de vidre i diamant (DU PONT) amb un angle de tall de 45°.

Taula II.C.VIII. Components de les reïnes Araldita-Epon i Spurr.

Composició de la reïna Araldita

Araldita M (C4212) o MY 753 o 502	6 ml
Epon	10 ml
Enduridor DDSA	25 ml
Dibutilftalat (només per araldita MY753 i 502)	0.2 ml
Accelerador BDMA (c35)	1.25 ml

Composició de la reïna Spurr

Diòxid de vinilciclohexè (VCD) o (ERL 4206)	10 gr
Propilenglicol, diglicidil éter (DER-736)	6 gr
Anhidrid nonenil-succínic	26 gr
Dimetilaminoetanol (S-1)	0.4 gr
Dibutilftalat	0.8 gr

4- Contrastació general

Els talls ultrafins es van recollir en reixetes de coure i es va fer una doble contrastació amb acetat d'uranil i citrat de plom. L'acetat d'uranil bé es prepara amb solució aquosa al 2%, bé acetat d'uranil 5mM en HCl 5 mM, i es deixa durant 30 min. Posteriorment es renta amb aigua destil.lada i desionitzada 3 cops, i s'impregna amb citrat de plom durant 10 min a temperatura ambient i en atmosfera anhidra. Es renta amb aigua bidestil.lada i s'eixuga amb paper de filtre.