TESI DOCTORAL

Pepita Giménez Bonafé

•

Proteïnes que estructuren i remodelen la cromatina espermàtica. Alguns casos especials

Novembre, 1999

.

.

Fig.III.B.18. Espectrometria de masses de la proteïna p, molècula precursora de la protamina P, provinent d'epidídim (A) i de gònada (B), on en aquesta última es troba en forma fosforilada (7,427 Da forma no fosforilada, i 7,507 Da forma fosforilada). El pic de 7,525 i 7,526 Da correspon a la protamina contaminada amb'un fosfòric (de massa 98 Da).





p1 RRRRRRGHRGRRGRRGGRRSRGRRRRAA

Una possible relació entre la proteïna p' i les p1 i p2 seria l'existència d'un gen ancestral que es duplicaria i donaria per una banda, al gen de la proteïna p' (el qual s'expresa en l'epidídim i gairebé deixa de fer-ho en espermatòfors), i per altra banda a un altre gen que es tornaria a duplicar donant els gens de les protamines p1 i p2 (gens que s'expresen en epidídim i espermatòfor).

Fig.III.B.20. Espectrometria de masses de la proteïna p', variant minoritària de la protamina p1, provinent d'espermatòfors (A) i de gònada (B), on en aquesta última es troba en forma fosforilada (4,468.7 Da forma fosforilada, i 4,388.7 Da forma no fosforilada). El pic de 4,487 Da és la protamina contaminada amb un fosfòric (de massa 98 Da).



3. Estudi comparatiu de les Protamines dels Cefalòpodes

a. Comparació entre diferents ordres: O. vulgaris (Octopoda) versus sèpies i calamars (Sepiida i Teuthida, respectivament)

En l'apartat anterior hem vist com el nucli espermàtic de l'octòpode O. vulgaris presenta majoritàriament 3 protamines (P, p1 i p2), de les quals en destaca la **protamina P** per ser extraordinàriament simple, ja que només conté tres tipus d'aminoàcids, Arg, Ser i Gly (entre 44 residus), i només un d'ells és una serina, amb lo qual l'arginina i la glicina formen 43 dels 44 residus que té la molècula (suposant el 97.7%). A més a més, tal i com ja s'ha comentat, la serina es troba col.locada després del grup inicial d'arginines, i segurament (per analogia amb els decàpodes) és una serina que és fosforilada durant l'espermiogènesi.

Per altra banda, l'extraoridinària simplicitat de la molècula és típica d'aquelles proteïnes que són sintetitzades en forma de precursor. Els precursors que donen lloc a les protamines conten un extrem N-terminal que molt possiblement és el responsable d'organitzar la progressió espermiogènica de la interacció protamina-DNA (veure apartat III.C.3), i un extrem C-terminal molt especialitzat en l'empaquetament òptim del DNA. La proteïna p, molècula precursora de la protamina P, és una molècula molt bàsica que presenta 3 aminoàcids principals: és molt rica en Arg (70% enfront del 79.5% present en la protamina P), Gly (18% enfront d'un 18.2%) i Ser (5.4% enfront d'un 2.3%).

Per trobar la relació existent a nivell evolutiu entre les protamines d'O. vulgaris i les dels decàpodes, hem fet un estudi comparatiu d'aquestes molècules començant per la sèpia i el calamar. Les protamines de tots dos grups han estat estudiades per altres autors però aquí hem fet una anàlisi evolutiva no explicitada en els treballs citats.

Tant la sèpia, Sepia officinalis, com el calamar, Loligo pealii, contenen en el nucli espermàtic madur una protamina que presenta microheterogeneitat, havent-hi dues formes (Sp1 i Sp2) que només difereixen en la posició de certs residus en certes posicions. Aquestes dues formes provenen de dues molècules precursores (P1 i P2) composades per la pròpia protamina més una seqüència addicional en l'extrem N-terminal (que posteriorment perdran). A la Fig.III.B.21 es comparen les seqüències N-terminal dels precursors P1 i P2 de les sèpies i calamars, entre la mateixa espècie (sèpia/sèpia), i entre espècies diferents (sèpia/calamar). Pel que fa referència a aquesta zona podem dir que entre els precursors P1 i P2 tant de la sèpia com del calamar, hi ha 4 mutacions de diferència (residus subratllats). En canvi, entre els precursors P1 de la sèpia i calamar no hi ha cap diferència, ni tampoc entre els precursors P2 dels mateixos.

Fig.III.B.21. Seqüència N-terminal dels precursors P1 i P2 de les protamines Sp1 i Sp2 de la sèpia (Sepia officinalis) i calamar (Loligo pealeii). (Extret de Wouters-Tyrou et al., 1988 i 1995, respectivament).

	5	10	15	20 21	
MK	VAAN <u>S</u> S	KML <u>A</u> I	EKL <u>E</u> L <u>N</u>	<u>/I</u> KGG	Precursor P1 Sèpia
MK	VAAN <u>T</u> S	KML <u>V</u>	EKL <u>D</u> LI	<u>L</u> KGG	Precursor P2 Sèpia
	_				
	5	10	15	20 21	
MK	VAAN <u>S</u> S	KML <u>A</u>	EKL <u>E</u> L <u>N</u>	<u>M</u> KGG	Precursor P1 Calamar
MK	VAAN <u>T</u> S	KML <u>V</u>	EKL <u>D</u> L]	<u>L</u> KGG	Precursor P2 Calamar
	5	10	15	20 21	
MK	VAANSS	KMLA	EKLELN	MKGG	Precursor P1 Sèpia
MK	VAANSS	KMLA	EKLELN	MKGG	Precursor P1 Calamar
	5	10	15	20. 21	
			15	20 21	
MK	VAANTS	SKMLV	EKLDL	LKGG	Precursor P2 Sepia
MK	VAANTS	SKMLV	EKLDLI	LKGG	Precursor P2 Calamar

Aquestes comparacions indiquen molt clarament que, en un principi, abans de que les famílies de sèpies i calamars se separessin, existia una part comú a tots dos precursors (P1 i P2) que es va duplicar i una còpia va donar lloc al precursor P1, i l'altra còpia al precursor P2; això ho corroboraria el fet de que entre les seqüències dels precursors P1 de totes dues famílies per una banda, i entre les de les P2 per altra, no hi ha cap diferència. En aquesta duplicació, però, totes dues còpies divergirien en 4 posicions, que són les 4 mutacions trobades entre les P1 i P2 dins d'una mateixa família. Tot això queda il.lustrat en la Fig.III.B.22.



Durant i després de la separació de les famílies de les sèpies i calamars no s'ha produït cap mutació viable que diferencïi els precursors a nivell de proteïna, el que significa que aquestes seqüències han de tenir una funció bastant o molt específica.

Si el que fem és **comparar les seqüències C-terminal dels precursors**, el que estem fent és comparar les **seqüències de les protamines**. En la Fig.III.B.23 hi ha presents les seqüències de les protamines Sp1 i Sp2 tant de sèpia com calamar, i també es comparen 2 a 2.

Entre les protamines **Sp1 i Sp2 de la sèpia** hi ha poca divergència, només hi ha cinc posicions diferents fàcilment explicables per 3-5 mutacions a nivell d'aminoàcids, canvis d'aminoàcids que no provoquen cap variació important en l'organització de la molècula. Curiosament sembla que hi ha hagut més variació evolutiva en la part N-terminal del precursor (4 canvis sobre 21 residus) que en la part C-terminal, protamina (5 canvis sobre 57 residus). Ara bé, si es comparen les protamines **Sp1 de la sèpia i del calamar**, només hi ha un aminoàcid diferent: la Sp1 de calamar presenta una Arg addicional. Això concorda amb el que ha passat en la part N-terminal del precursor de la Sp1 (P1) de totes dues famílies, en la qual no hi ha cap diferència (com hem vist a la Fig.III.B.21). El que aquestes seqüències ens estan dient és que hi ha hagut molt poca divergència en la proteïna "precursor-protamina P1" de sèpies i calamars, el que podria indicar que aquesta proteïna seria el producte d'un gen ancestral que es va duplicar en les espècies precursores.

Entre les protamines **Sp1 i Sp2 del calamar** s'observa una divergència una mica superior en comparació amb el que ocorre a la sèpia. I si el que es compara són les protamines **Sp2 de sèpia i calamar** podem veure com hi ha hagut més mutacions que en el cas de les Sp1, per tant la Sp2 de calamar ha variat més que la Sp1: per una banda trobem dues inversions (o canvi de posició d'un aminoàcid) respecte a la proteïna Sp1 de la sèpia, en posició 13-14 el doblet RS passa a ser SR (canvi de posició de la Ser), i en posició 35-37 el triplet RRS passa a ser SRR (canvi de posició de les Arg i Ser); per altra banda, en totes dues Sp2 hi ha hagut una pèrdua que s'ha conservat al llarg de l'evolució, pèrdua del residu 41, mutació que per tant, probablement s'hauria produit en el gen de la Sp2 ancestral. A més a més, un cop les dues famílies es van separar, la Sp1 de calamar va adquirir una arginina addicional (entre les posicions 14 i 15), i la Sp2 va perdre alguns residus (Arg25 i Tyr26, posicions numerades respecte la Sp1).

Evidentment, cal a dir que poden haver hipòtesis alternatives, i aquí el que s'exposa és una de les més senzilles i per tant, més probables.

Fig.III.B.23. Seqüència de les protamines Sp1 i Sp2 de sèpia i de calamar. Amb fletxes s'indiquen els aminoàcids que li segueixen a la sequència que no queden alineats amb la resta. (Extret de Martin-Ponthieu et al., 1991, i Wouters-Tyrou et al., 1995, respectivament). 5 10 15 20 25 40 45 30 35 50 55 56 57 58 RRRRRSRRRRR<u>RS</u>RRRSRSPYRRRYRRRRRRRR<u>RS</u>RRRYRRRSYSRRRYRRRR Sp1 Sèpia RRRRRSRRRRR<u>SR</u>RRSRSPYRRRYRRRRRRR<u>SRR</u>RR - YRRRRSYSRRRYRRRR Sp2 Sèpia 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 56 57 58 Sp1 Sèpia RRRRRSRRRRRSRRRSRSPYRRRYRRRRRRRRRRRRRYRRRRSYSRRRYRRRR Sp1 Calamar ↓ <u>R</u> 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 56 57 58

RRRRRRSRRRRSRRRSPYRRRYRRRRRRR<u>R</u>R<u>S</u>RRRYRRRSYSRRRYRRRR **Sp1 Calamar** ↓ <u>R</u>

 $\begin{array}{c} RRRRRSRRRSRSRRRSRSPYRR - -RRRRRRSSRRRSSRRRSSRRSSPSRR Sp2 Calamar \\ \downarrow \\ \underline{KRR} \\ \hline \\ \underline{RR} \\$

15 20 5 10 25 30 35 40 50 55 56 57 58 45 RRRRRSRRRRR<u>SR</u>RRRSRSPYRRRYRRRRRRR<u>SRR</u>RRR -YRRRRSYSRRRYRRRR Sp2 Sèpia RRRRRRRRR - <u>SR</u>RRRSRSPYRR - - RRRRRRRR<u>S</u>R<u>R</u>RRR - YRRRRSYSRRRYRRRR Sp2 Calamar 1 <u>RRRR</u> R

Després d'analitzar les sequències de les protamines de la sèpia (Sepia officinalis) i calamar (Loligo pealii), i de les seves parts precursores, podem agafar una d'aquestes proteïnes com a representant de la família dels decàpodes per fer una interpretació evolutiva, la qual sembla ser clara i fàcil:

Hauria d'haver existit un gen ancestral (Fig.III.B.22), quan encara les dues famílies no s'havien separat, que tindria una part precursora i una part Cterminal molt bàsica. El gen sofriria una duplicació complerta, abans de la separació de les famílies, i les dues còpies resultants experimentarien al mateix temps petits canvis.

Posteriorment a la duplicació, les famílies de sèpies i calamars es van separar, i cadascuna d'elles va "heredar" els dos gens. La divergència entre les protamines de les sèpies i calamars ha estat molt petita en general; la proteïna provinent del gen P2 (tant extrem N-terminal com C-terminal) és on es troben les diferències més importants (v. Fig.III.B.21 i 23). Aquest punt té l'interés de que cau dins la interpretació clàssica de l'evolució de proteïnes: un gen es duplica i una de les seves formes pot variar més ràpidament, mentre que l'altra es conserva (Zuckerkandl, 1975).

Cal mencionar, però, que l'estructura primària del precursor de la protamina P d'O. *vulgaris* és molt diferent a la trobada en les sèpies i calamars, i per això no s'ha pogut fer cap estudi comparatiu.

Un aparent problema el pot presentar el calamar *Ilex argentinus.*, el qual està caracteritzat a nivell de composició aminoacídica (Kadura i Khrapunov, 1988; Khrapunov et al., 1988) i dóna uns resultats lleugerament diferents als de *Loligo pealii*. De tota manera és molt possible que les anàlisi de la composició aminoacídica de les protamines d'aquest calamar continguin un error no despreciable, i per tant no el considerarem (de fet les anàlisi d'aminoàcids d'extractes, com és el que es va fer en el cas d'*Ilex argentinus*, sempre donen un marge d'error important, mentre que la seqüència d'una proteïna és una dada absoluta).

Una vegada coneguda l'estructura i evolució de les protamines en els decàpodes, és més fàcil poder fer alguna suggerencia sobre la possible relació d'aquestes proteïnes amb les **protamines d'***O. vulgaris*.

A la Fig.III.B.24 es comparen les sequències de les protamines Sp1 i Sp2 de sèpia i calamar, amb les protamines P, p1 i p2 presents en O. vulgaris.

Fig.III.B.24. Comparació entre les seqüències de les protamines de sèpia i calamar (Sp1 i Sp2), i les protamines d'O. *vulgaris* (P, p1 i p2). Amb fletxes s'indiquen els aminoàcids que li segueixen a la seqüència que no queden alineats amb la resta.

	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55 5	6 57 58
RRI	RRRRSI	RRRRR <u>I</u>	<u>RS</u> RRR	SRSPYR	RRYRI	RRRRR	RR <u>R</u> R <u>S</u> RI	RRRYR	RRRSYS	RRRY	RRRR	Sp1 Sèpia
RRI	RRRRSI	RRRRRS	<u>SR</u> RRR	SRSPYR	RRYRI	RRRRR	RR <u>S</u> R <u>R</u> RI	RR - YI	RRRRSY	SRRRY	(RRRR	Sp2 Sèpia
RRJ	RRRRS	RRRR <u>S</u> H	R <u>R</u> RRR ↓ <u>RRR</u>	SRSPYR	RR	RRRRR	RR <u>S</u> R <u>R</u> R	RR-YR	RRRSYS	SRRRY ↓ <u>₽</u>	RRRR	Sp2 Calamar
RRI	RRRRS	RRRRRI	RSRRR	SRSPYF	RRYR	RRRRR	RR <u>R</u> R <u>S</u> R	RRRY	RRRRSY	SRRR	YRRRR	Sp1 Calamar
RRI	RRRRR	RSRGRE	RGRRR	GRRRGI	RRRGR	RRGRR	RRRRRG	GRRR	RR I	? O. vu	lga r is	
		R RF	RRRR	G H RGR	RGRO	G RR	SRGRRR	RA A	P	1 O. vı	ılga r is	
		Y RF	RRRRR	G R RGR	RR RC	G R RR R	SRGRRR	. A H	iGG p	2 O. vu	lga r is	

Es pot veure que tant les protamines Sp1 i Sp2 dels decàpodes com la protamina principal d'O. *vulgaris*, protamina P, comencen per un grup de poliarginines que acaba en una serina; a partir d'aqui, les protamines dels decàpodes s'organitzen bàsicament en grups d'arginines, la majoria separats per serines o tirosines. La **protamina** P està organitzada en una unitat que es va repetint: $(GR_n)_m$ vegades, on n és variable. Així doncs, sembla evident que la natularesa ha seleccionat l'organització dels residus bàsics en grups (Arg en el cas d'O. *vulgaris*) separats per residus no bàsics, en lloc d'una poliarginina. En aquest cas, i respecte els residus no bàsics, ens hem trobat amb una situació similar a la del neogastròpode *Murex brandaris* (tal i com es veurà en el proper apartat), on el residu no bàsic és la glicina, que representa un aminoàcid pràcticament "sense volum" degut a que el seu grup -R es troba limitat a un hidrògen, fet que permet optimitzar al màxim l'empaquetament del DNA.

La relació evolutiva de la protamina P d'O. vulgaris amb els Decàpodes es pot assumir, però és difícil de precisar degut a que la part precursora de la protamina (que acostuma a ser la part més conservada) en els decàpodes és diferent a la trobada en aquest octòpode (tal i com hem pogut veure a la Fig.II.B.17). Per altra banda, la simplicitat de les molècules, la forma similar d'empaquetar la cromatina durant l'espermiogènesi, i la seqüència de la part N- terminal de la protamina (R_nS) sembla que recolzaria una possible relació d'homologia a partir d'un gen ancestral que ha variat molt a partir de la serina, ja que la major part de la molècula de la protamina P sembla estar organitzada per les repeticions (GR_n)_m.

La Taula III.B.VI resumeix les dades més significatives de les protamines P, p1 i p2 d'O. *vulgaris*, dels Decàpodes i d'E. *cirrhosa*, l'altre octòpode.

	Р	p1	p2	Sp1	Sp2	E. ci rr hosa
				Sèpia	Calamar	
Basicitat	79.5%	67.9%	70%	77.2%	79.3%	56%
Nombre Residus	44	28	30	57	58	84
PM (espect. mas.)	6,031.0 Da	3,539.0 Da	3,943.0 Da	8,410 Da	8,563.5 Da	11,696.0 Da
PM (seqüència)	6,030.0 Da	3,538.0 Da	3,942.5 Da	8,412.9 Da	8,562.1 Da	11,696.1 Da
Tipus de Residus	3 (a)	5 (b)	6 (c)	4 (d)	4 (e)	10 (f)

(a)- (15er; 8Gly; 55Arg)
(b)- (1His; 1Ser; 2A; 6Gly; 18Arg)
(c)- (1His; 1Tyr; 1Ser; 1Ala; 6Gly; 20Arg)
(d)-(1 Pro; 5 Tyr; 7 Ser; 44 Arg)
(e)-(1 Pro; 4 Tyr; 7 Ser; 46 Arg)
(f)- (8Pro; 1Val; 1Phe; 1Gly; 11le; 1Leu; 5Ser; 16Lys; 19Cys; 31Arg)

Com es pot veure, les **protamines p1 i p2** (que són minoritàries respecte la protamina P) són proteïnes petites (28 i 30 residus respectivament) i relativament simples, encara que respecte la protamina principal, protamina P, presenten alguns residus addicionals (His, Tyr i Ala).

La comparació de les seves seqüències (v. Fig.III.B.24) indica que hi ha una gran possibilitat de que siguin homòlogues, ja que presenten un gran nombre d'identitats (tal i com s'ha descrit en l'apartat anterior). Conseqüentment, tal i com ja s'ha mencionat, en aquest treball proposem que poden provenir d'un mateix gen que s'ha duplicat. Aquest aspecte és més interessant si analitzem la sequència consensus entre elles dues, que és $R_m(GR_n)$ on n és variable, sequència només interrompuda per una Ser.

És per tant probable que el gen de les protamines p1 i p2 provingui, o almenys estigui relacionat, amb la zona $(GR_n)_m$ de la protamina principal P. Recordem que és precisament aquesta zona la que es diferencia de les protamines dels Decàpodes, podent ser un tret exclusiu adquirit pels Octòpodes.

Apart d'altres consideracions químiques, i si prenem com a representatiu l'arbre evolutiu representat en la Fig.III.B.25, podem dir que en *O. vulgaris* es mantenen característiques de les protamines dels Decàpodes (alta basicitat, simplicitat, síntesi en forma de precursor), però almenys una part de la seqüència de la protamina ha variat simplificant-se i convertint-se en (GR_n). Aquesta part es troba unida a la protamina principal, o formant dues protamines minoritàries que han divergit entre sí.





b. Comparació dintre de la mateixa família (Octopodidae): O. vulgaris versus E. cirrhosa

Malgrat que *E. cirrhosa* està classificat dintre de la família dels octòpodes (*Octopodidae*), i per tant ha de ser una espècie molt propera a *O. vulgaris*, es fa evident (ja des de que es comença a estudiar la nucleomorfogènesi) que ens trobem davant d'un cas especial, que ha sofert una ràpida divergència respecte la resta de cefalòpodes estudiats.

Pel que fa referència a la **nucleomorfogènesi** (apartat III.A.1), l'espermatozoide d' *E. cirrhosa* presenta una sèrie de detalls importants:

- a) Els nuclis dels espermatozoides es comporten com a varetes espiralitzades rígides. Si els ponts disulfur establerts entre les cisteïnes de la protamina es redueixen, els nuclis perden la seva rigidesa.
- b) Durant l'espermiogènesi, el nucli no és rígid, ja que va canviant progressivament de forma, comportant-se de forma "plàstica"; l'últim canvi que sofreix és la espiralització, que té lloc gràcies a la força de constricció efectuada pels microtúbuls que envolten al nucli.
- c) Una vegada s'ha produit l'espiralització del nucli, els microtúbuls desapareixen, i el nucli es manté espiralitzat i rígid.

Tot això, probablement, el que ens està indicant és que la protamina va interaccionant amb el DNA, i només quan els microtúbuls han donat la forma helicoidal al nucli, s'acaben de formar tots els ponts disulfur interprotamínics, donant rigidesa i estabilitat al nucli. Aquest podria ser un exemple entre forma final del nucli espermàtic i la necesitat d'una protamina rica en cisteïnes. De tota manera aquesta hipòtesi encara ha de ser estudiada i comprobada.

La nucleomorfogènesi espermàtica presenta una important correlació (no una relació causa-efecte) amb la manera en la qual la cromatina es condensa durant l'espermiogènesi, i amb les proteïnes responsables de la mencionada condensació (protamines i molècules relacionades). La protamina d'*E. cirrhosa* és completament diferent a la resta de protamines descrites en els cefalòpodes, és a dir, hi ha molta més diferència entre les protamines d'*E. cirrhosa* i *O. vulgaris* que entre les protamines d'*O. vulgaris* i els decàpodes (cal mencionar que no és el primer cas trobat, en el condricti *Scyliorhinus canicula*, la protamina Z3 és molt més similar a la dels peixos ossis que a la de *Hydrolagus colliei*, un altre condricti) (Saperas et al., 1996), i a més a més presenta aspectes funcionals (concretament l'establiment d'una xarxa d'enllaços covalents R-cys-S-S-cys-R) completament diferents a la resta de protamines de cefalòpodes estudiades. De fet, la protamina d'*E. cirrhosa* sembla provenir d'**un gen diferent a la resta de protamines dels cefalòpodes**. La comparació entre molècules (v. Taula III.B.VI) indica les següents diferències:

- Basicitat significativament més baixa en E. cirrhosa que en les altres.

- Presència d'una gran quantitat de cisteïnes amb funció i regulació molt elaborada durant l'espermiogènesi.

- Presència d'una major quantitat de tipus de residus aminoacídics (front la simplicitat trobada en les protamines madures dels decàpodes)

- Grups d'aminoàcids bàsics heterogenis, formats per la mescla de lisines i arginines.

- Tamany molecular significativament superior.

- Dificultats per alinear les sequències aminoacídiques ente *E. cirrhosa* i la resta de protamines dels cefalòpodes.

- Diferència important en la morfologia de la condensació de la cromatina durant l'espermiogènesi.

En síntesi, pel que fa referència a la protamina, sembla que s'ha produït una important "discontinuïtat" evolutiva en *E. cirrhosa* dins dels cefalòpodes. Aquest punt conjuntament amb d'altres, es comentarà en el capítol de la Discussió general.

C. Murex brandaris

C. Murex brandaris

1. Antecedents sobre el treball realitzat de M. brandaris

Aquest apartat C suposa l'acabament d'alguns dels punts iniciats i desenvolupats en la tesi de la Dra. Carme Càceres que porta com a títol "Estudi de les proteïnes que condensen el DNA al llarg de l'espermiogènesi del cargol *Murex brandaris* " (Càceres, 1995).

M. brandaris és un mol.lusc cenogastròpode, i dintre d'aquest grup es considera un neogastròpode. El interès d'estudiar aquest grup (*M. brandaris* és un representant típic) es basa en que a partir de certes famílies d'arqueogastròpodes de fertilització externa varen sorgir els mol.luscs cenogastròpodes, els quals van adquirir la fertilització interna en la seva emergència evolutiva, i amb ella tota una sèrie de canvis relacionats amb la biologia de la reproducció (Daban et al., 1991; Chiva et al., 1991).

En el treball de Tesi Doctoral de C. Càceres (Càceres, 1995) es varen arribar a establir tota una sèrie de fets molt interessants, que es resumeixen a continuació, i que es mostren a la Fig.III.C.1:

a) El nucli espermàtic es troba format per DNA i tres protamines: P1, P2 i P3. Aquestes protamines presenten una composició molt simple (concretament la P3 només està formada per 3 tipus d'aminoàcids).

b) La protamina P1 va ser purificada i seqüenciada fins al residu 59; com veurem, aquesta proteïna conté 72 residus. La protamina P2 també va ser purificada i seqüenciada fins al residu 53; com també veurem, en conté 58.

Per altra banda, la protamina P3 va ser seqüenciada en la seva totalitat (54 residus) però, contrariament al que es mostra en aquest capítol, es va definir com una protamina microheterogènia amb tres formes diferents.

c) Les protamines provenen de molècules precursores que entren en el nucli a l'inici de l'espermiogènesi. En el decurs de la mateixa, els precursors experimenten una complexa sèrie de deleccions que fan que la cromatina dels nuclis de les espermàtides es vagi reorganitzant. Es varen identificar i seqüenciar 9 precursors de la protamina P1.

Fig.III.C.1. Resum del treball realitzat per Càceres, 1995. A- Canvi de la dotació proteica en els nuclis espermàtics a mida que avança la maduresa gonadal; de a—> d gònada de més immadura a més madura, on en d tot són espermatozoides; h- estàndard d'histones. B- Seqüències (parcials o totals) de les tres protemines presents en el nucli espermàtic madur. C- Processament postraduccional del precursor de la protamina P1, que es dóna al llarg de l'espermiogènesi.



P1 RRRRRRSKGKGKGKGKGKGKGKRRRRRKGKGKGKGKKKGKGRRRRSRRGRGSKKRKG KKG? ...

d) L'últim punt important d'aquest treball va ser mostrar que les protamines finals (és a dir, les formes que es troben en els nuclis espermàtics), són molècules molt especialitzades en quan a la funció de compactar el DNA, tant pel fet de ser riques en aminoàcids bàsics, com pel fet de presentar una elevada simplicitat composicional.

Els resultats exposats aqui resumidament es troben publicats a Càceres et al., 1994, i Càceres, 1995., on es troben d'una manera més explícita. La Fig.III.C.1, composada a partir del treball de Càceres, 1995, mostra els punts que aquí s'han explicat.

Els **objectius** que ens hem plantejat per acabar aquest treball han estat els següents:

i) Purificació i seqüenciació complerta de les protamines P1, P2 i P3 obtingudes a partir de nuclis espermàtics madurs.

ii) Anàlisi per espectrometria de masses del pes molecular de les tres protamines obtingudes a partir de nuclis espermàtics madurs.

iii) Reexaminació per espectrometria de masses del pes molecular de la protamina P1 obtinguda a partir de gònades.

iv) Reexaminació dels diferents nivells de canvis que ha comportat el pas evolutiu de l'adquisició de la fertilització interna a partir de la fertilització externa en els mol.luscs gastròpodes.

Els punts i-iv s'exposen en l'apartat III.C.2, mentre que el punt iv es discuteix en l'apartat III.C.3.

2. Obtenció, purificació i seqüenciació de les proteïnes nuclears espermàtiques de *M. brandaris*

a. Purificació de les Protamines

Per obtenir nuclis d'espermatozoides es van escollir gònades en diferents estadis de maduresa. S'anaven fent controls al microscopi òptic per verificar si la majoria de cèl.lules observades eren espermatozoides madurs o bé cèl.lules pertanyents als diferents estadis de l'espermiogènesi.

Es varen fer dos tipus de preparacions: per una banda es van obtenir nuclis d'espermatozoides a partir de gònades madures (i conductes deferents), i per altra banda, es van obtenir nuclis d'espermàtides avançades de la gònada.

i. Obtenció de nuclis espermàtics a partir de conductes deferents de gònades madures

A partir de conductes deferents de gònades madures es va fer una obtenció de nuclis espermàtics. Dels conductes deferents es va alliberar esperma, el qual es es va homogeneïtzar enfront de tampó A (sacarosa 0.25M, Mg Cl₂ 10mM, Ca Cl₂ 3mM i Tritó X-100 0.1% en Tris HCl 10mM pH 7.0, i clorur de benzamidina 10mM com a inhibidor proteolític), es va filtrar i centrifugar (2,000 g, 5 min), i amb el sediment es va repetir el procediment 2-3 vegades per així anar eliminant restes de cues dels espermatozoides. L'últim sediment ric en nuclis es va homogeneïtzar enfront de tampó B (EDTA 20mM en Tris HCl 10mM pH 7.0), centrifugar (2,000 g, 5 min), i el sediment resultant es va homogeneïtzar amb tampó C (Tris HCl 10 mM, pH 7.0), per així eliminar les restes de sals degudes als tampons anteriors. Al llarg de tot el procés d'obtenció de nuclis es van fer controls microscòpics per a observar el progressiu enriquiment en nuclis i controlar la seva puresa.

Per obtenir les proteïnes nuclears, la suspensió anterior es va centrifugar (2,000 g, 5 min), i el sediment es va extreure amb HCl 0.4N, i les proteïnes solubles van ser precipitades amb 6 volums d'acetona. El resultat va ser una mostra on teniem les tres protamines juntes (P1, P2 i P3), tal i com indica el pou w del

GPAU de la Fig.III.C.2. El següent pas era l'obtenció de les tres protamines per separat, és a dir, la seva purificació.

Fig.III.C.2. Purificació mitjançant tècniques d'HPLC de les protamines de *M. brandaris* obtingudes a partir d'espermatozoides provinents de conductes deferents de gònades madures. Perfil cromatogràfic durant la separació de les tres protamines, i GPAU 6.25M urea/15% acrilamida de les fraccions obtingudes; W- mostra de partida.



Per poder purificar les tres protamines es van aplicar tècniques d'HPLC. El treball de purificació de les protamines, així com les tècniques d'espectrometria de masses i seqüenciació, es van fer al laboratori del Dr. Pierre Sautière, a l'Institut Pasteur de Lille (França).

Es va fer una primera purificació aplicant la barreja de proteïnes a una columna C-18 (Nucleosil) d'HPLC, treballant a un flux de 2 ml/h, on l'agent contra-ió era TFA 0.05%, i la fase orgànica ACN 60% (en TFA 0.05%), aplicant el gradient d'aquest últim:

0-0%	0-5'
0-50%	5'-65'
50%-100%	65'-70'
100%	70'-75'

es va treballar a una sensibilitat de 500 V, i les fraccions es van col.lectar manualment.

El resultat es veu a la Fig.III.C.2. Es van obtenir 5 fraccions, on gairebé teniem pura la protamina P3 en la fracció I, la P2 en la fracció III, i la P1 en la fracció V. En aquest tipus de cromatografia les proteïnes hidrofòbiques s'elueixen abans, i les proteïnes bàsiques queden més fortament unides a la matriu de la columna, eluïnt-se al final del gradient.

Les fraccions I, III i V es van tornar a passar per columna d'HPLC, per separat, amb la finalitat d'aconseguir purificar del tot les tres protamines. Aquesta vegada, les fraccions es van assecar a l'*speedvac* i dissoldre en TFA 0.05%, i es van aplicar a una columna C-18 de dimensions menors a l'anterior (v. II.B.8.f), i per tant el flux es va disminuir a 1 ml/min, i es va treballar a una sensibilitat de 1000 V, fent un gradient de 0-20% de fase orgànica en 60 min (on la fase orgànica continua éssent la mateixa que l'anterior, i el mateix per l'agent contra-ió). D'aquesta manera es van arribar a purificar totes 3 protamines al complert, tal i com la Fig.III.C.3 mostra.



ii. Obtenció de nuclis espermatogènics a partir de gònades

A partir de gònades es va fer una obtenció de nuclis espermatogènics, tal i com s'explica a l'apartat II.B.1.b.iii.

Per obtenir les proteïnes nuclears, el sediment resultant de l'extracció amb AA 35%, es va tornar a extreure, aquest cop amb HCl 0.4N, i les proteïnes solubles es van precipitar amb 6 volums d'acetona. El resultat va ser una mostra on teniem la fracció histones, proteïnes intermèdies, i les protamines (pou w Fig.III.C.4).

Per tal de purificar les protamines de la resta de components, es va utilitzar la **cromatografia de bescanvi iònic (CM-52)**. Les protamines en pols (provinents de la precipitació amb acetona) es van redissoldre en HCl 0.4N, i dialitzar enfront del tampó d'equilibratge de la matriu (NaCl 0.2N en acetat sòdic 50mM pH 6.0), i es van aplicar a la columna. Treballant a un flux de 40 ml/h i agafant fraccions de 5 ml, la columna es va rentar amb el tampó d'equilibratge, es va fer un segon rentat amb de major força iònica amb NaCl 0.6N (en acetat sòdic 50 mM pH 6.0), i finalment es va aplicar un gradient de NaCl de 0.6N a 2N (en acetat sòdic 50 mM pH 6.0), i en aquest tipus de cromatografia, les proteïnes més bàsiques s'elueïxen de la matriu a forces iòniques elevades.

Es van fer repetides columnes i en totes elles es reproduia el resultat, Fig.III.C.4; en el principi del gradient de NaCl s'elueixen les histones i d'altres proteïnes que presenten similar migració electroforètica (i que no han estat acabades de solubilitzar en l'extracció amb l'AA 35%), i posteriorment li segueixen les proteïnes intermèdies, mentre que al final, tal i com calia esperar, surten les proteïnes més bàsiques, les protamines, totes tres juntes en un mateix pic. Fig.III.C.4. Cromatografia de bescanvi iònic (CM-52) de les proteïnes obtingudes a partir de nuclis d'espermatozoides provinents de gònades immadures. W- proteïnes totals; F- fracció; A₂₃₀-absorbància a 230 nm. El GPAU és de 6.25M urea/15% acrilamida.



De la mateixa manera que pel cas de les protamines provinents de gònades madures, es van aplicar tècniques d'HPLC per separar la barreja de totes tres protamines, treballant amb condicions idèntiques. En aquest cas, però, només vàrem arribar a una purificació acceptable de la protamina P1 (no mostrat).

b. Caracterització de les Protamines

Un cop es van tenir totes tres protamines pures, el primer que es va fer va ser hidrolitzar una alíqüota de cadascuna d'elles per fer una **anàlisi d'aminoàcids** i així conèixer la seva composició abans de seqüenciar-les.

Tal i com la Taula III.C.I indica (i tal com mostraven els experiments fets per la Dra. Càceres), la composició aminoacídica de les protamines de M. brandaris revela que totes elles són molècules molt simples i molt bàsiques. La protamina P1 (la composició de la qual és la mateixa tant si prové de gònades madures com immadures) està formada per 6 tipus de residus diferents, la P2 només per 4, i la P3 només per 3 tipus d'aminoàcids (Arg, Lys i Gly). L'arginina, lisina i glicina són el major component de totes tres protamines (representant un 94.9% en P1, un 96.7% en P2, i un 100% en P3). Una altra característica que ens mostra l'anàlisi d'aminoàcids és la baixa proporció d'aminoàcids fosforilables presents en les tres proteïnes (2% en P1, 3.2% en P2, i 0% en P3), fet curiós si es té en compte que els processos de fosforilació/defosforilació són els que regulen les interaccions de les protamines dels vertebrats amb el DNA. Un altre fet que destaca és la presència de cisteïnes en la protamina P1, cisteïnes que no deuen formar ponts disulfur intermoleculars, a priori, pel fet de que aquesta protamina s'extreu juntament amb la resta amb HCl 0.4N, sense necesitat de ser reduïda ni alquilada (al contrari del cas de la protamina de *Eledone cirrhosa*, apartat III.A.2).

	<u>P1</u>	P2	P3
Lys	34.4	37.1	38.2
Arg	34.0	36.5	36.3
Ser	2.0	3.2	-
Gly	26.5	23.1	25.3
Ala	1.1	-	-
Cys ·	1.9	-	-

Taula III.C.I. Composició aminoacídica de les proteïnes nuclears (protamines) de l'espermatozoide de *M. brandaris* . Valors expressats en % nmols.

Un cop vam conèixer la composició aminoacídica de les protamines, es van aplicar tècniques d'**espectrometria de masses** per saber el seus pesos moleculars. El resultat es mostra a la Fig.III.C.5A.

La protamina P1 té una massa de 8,415 Da quan la protamina prové de conductes deferents, i per tant d'espermatozoides madurs, on la P1 es troba defosforilada. Si es parteix de gònades, el que trobem són dues formes de la protamina, Fig.III.C.5B, la no fosforilada com a majoritària (8,417 Da), i una forma

minoritària que es troba monofosforilada (8,497 Da), al haver una diferència de 80 Da entre elles, massa que correspon a la d'un fosfat. Així doncs, la protamina P1 es troba fosforilada en la gònada i es defosforila en l'espermatozoide madur.

D'altra banda, la **protamina P2** té un pes molecular de 6,962 Da, i se suposa que és la forma no fosforilada, pel fet de provenir d'espermatozoides (i no sabem si es fosforila o no), i la **protamina P3** de 6,474 Da (proteïna que no es fosforila al no tenir ni serines ni treonines, aminoàcids fosforilables, v. Taula III.C.I).

El següent pas a abordar va ser la determinació de l'estructura primària de les protamines, és a dir, la seva **seqüència** mitjançant degradació automàtica d'Edman.

Gràcies a l'elevada puresa de les mostres, i a l'innovadora tecnologia emprada a l'Institut Pasteur (Lille, França), les seqüències de totes tres protamines es van realitzar tot d'una passada (Fig.III.C.5C), sense necesitat d'haver de digerir la proteïna, donant uns cicles molt nets i sense cap dubte alhora d'identificar els aminoàcids (v. Annex). Les protamines P2 i P3 es van seqüenciar sense cap modificació prèvia, resultant ser proteïnes de 58 i 54 residus respectivament; la protamina P3, a diferència del que els treballs de Càceres (1995) reportaven, no presenta microheterogeneitat.

Pel que fa referència a la seqüència de la protamina P1, la protamina va haver de ser modificada químicament abans de la seva seqüenciació, degut a la presència de les cisteïnes trobades en les anàlisi d'aminoàcids (que potser podrien formar alguns ponts disulfurs, no éssent molts però sí lo suficientment importants com per crear problemes alhora d'experimentar els diferents cicles que es donen en la degradació d'Edman). Així doncs, la protamina P1 es va reduir i alquilar. Fig.III.C.5. Estructura primària de les protamines de *M. brandaris*. A- Espectrometria de masses de les protamines P1, P2 i P3 provinents d'espermatozoides de conductes deferents. B- Espectrometria de masses de la protamina P1 provinent d'espermatozoides de gònades immadures. C- Seqüència de les protamines.



La protamina P1 pura (4 nmols) es va dissoldre en 100 μ l de NH₄ HCO₃ 0.1M, clorur de guanidina 6M pH8.3, i posteriorment es van afegir 1.54 mg d^e DTT (agent reductor), mantenint la reacció durant 30 min a 70°C. Passat el temps,

274

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. Aquest tipus d'alquilació modifica les cisteïnes convertint-les en S-carboxamidoetilcisteïna (v. Fig.II.B.8).

El següent pas era seqüenciar la protamina, però primer s'havia de desalar, eliminar totes les substàncies en les que estava dissolta provinents de les reaccions de reducció i alquilació. La mostra es va aplicar a una columna C-8 d'HPLC, la columna es va rentar en 100% de l'agent contra-ió (TFA 0.05%) durant 5 min, i d'aquesta manera s'eluïen les sals, i immediatament després la protamina s'alliberava rentant amb 100% de fase orgànica (ACN 60% en TFA 0.05%).

El pic obtingut en la desalació, protamina P1, es va aplicar al seqüenciador, i per degradació automàtica d'Edman es va establir la seva seqüència, Fig.III.C.5C. Cal recordar que tant l'anàlisi d'aminoàcids com l'espectrometria de masses, s'han efectuat sobre la protamina nadiva, sense modificar, mentre que la seqüència s'ha realitzat a partir de la protamina que té les cisteïnes modificades com a S-carboxamidoetilcisteïnes.

Tenint els espectres de masses i la seqüència al complert de les proteïnes, es va calcular la massa de les protamines a partir de la seqüència, i es va veure que en el cas de la protamina P1 la massa calculada i observada era la mateixa si es partia d'espermatozoides, mentre que la massa observada era 80 Da superior si del que es partia era d'espermàtides avançades provinents de gònada (on el pes molecular és de 8,497 Da), fet que ens confirma la fosforilació d'aquesta protamina en la gònada, Taula III.C.II.

Taula III.C.II. Comparació dels pesos moleculars de les protamines calculats a partir de la seqüència (massa calculada), i a partir d'espectrometria de masses (massa observada).

	<u>PM a partir de la seqüència</u>	<u>PM a partir</u> d'espect. masses
P1	8,415 Da	8,415 Da
P2	6,960 Da	6,962 Da
P3	6,473 Da	6,474 Da

Com es pot veure a partir de la seqüència (Fig.III.C.5C), totes tres protamines estan organitzades d'una forma molt peculiar, ja que presenten grups d'arginines separats per dipèptids GK que es van repetint múltiples vegades. Sobre l'organització de les protamines es parlarà amb més detall en l'apartat 3.

La protamina P3 (54 residus) és una proteïna molt simple (tal i com ja s'havia vist en les anàlisi de composició aminoacídica, Taula III.C.I), i no presenta cap aminoàcid fosforilable. La protamina P2 (58 residus) destaca per presentar un grup de 12 aminoàcids bàsics (posicions Lys40 fins Lys51), i té dues serines com a aminoàcid fosforilable, una d'elles que es troba en la meitat de la molècula (Ser29), i l'altra en l'extrem C-terminal (Ser53), posicions, doncs, de possible regulació de la unió de la protamina al DNA. Per últim, la protamina P1, tot i tenir 72 residus, tal i com ja s'ha esmentat, es va seqüenciar sencera d'una sola tirada; té una sola serina en posició N-terminal (Ser7), i a diferència de la protamina P2, presenta dos aminoàcids addicionals, dues cisteïnes cap a l'extrem C-terminal (Cys46 i Cys52), i una alanina en l'extrem N-terminal (Ala13).

c. Reexaminació dels resultats obtinguts a Càceres (1995) considerant les dades aportades en el present treball

Els estudis realitzats per la Dra. Càceres (1995) varen mostrar que la protamina P1 provenia del processament postraduccional d'una molècula precursora que anava experimentant deleccions en l'extrem N-terminal fins donar lloc a la forma final de la protamina. En aquests estudis es van purificar fins a un total de 9 precursors, es van seqüenciar els seus extrems N-terminal, i es van aplicar tècniques d'espectrometria de masses, coneixent així el pes molecular de cadascun d'ells.

Coneguda finalment la seqüència de la protamina P1, s'ha pogut verificar el pes molecular de cadascun dels 9 precursors a partir de la seqüència, i els resultats són coherents amb el que es va trobar en un inici a partir de l'espectrometria de masses, Taula III.C.III: en aquesta taula els pesos moleculars s'han calculat assumint que aquestes molècules són precursors de la forma monofosforilada de la protamina P1 (la P1 trobada en gònada).



Taula III.C.III. Formes precursores de la protamina P1. NS- nombre de residus; Mwo- pes molecular calculat a partir de l'espectrometria de masses; Mwe- pes molecular estimat a partir de la seqüència, assumint que són precursors de la forma monofosforilada de la protamina.

Protein	NS	Mwo	Mwe
		Da	Da
Pr-P1	52	12,662	12,657
Pr8	50	12,092	12,090
Pr7	54	11,820	11,819
Pr6	52	11,550	11,549
Pr5	40	11,074	11.075
Pr4	7	NDª	10,082
Pr3	29	ND	9798
Pr2	43	ND	9635
Pr1	25	9248	9249

A la Fig.III.C.6 veiem la seqüència al complert del precursor més llarg trobat de la P1 (Pr-P1) com va experimentant deleccions postraduccionals donant lloc a la protamina que es troba en la gònada, encara fosforilada (8,497 Da); en el moment en que l'espermatozoide madura és quan la P1 es defosforila, la serina perd el fosfat, passant a la forma final de la protamina P1 (8,417 Da).

La molècula Pr-P1 és, sense cap mena de dubte, el precursor de la forma monofosforilada de la protamina P1, ja que el pes molecular de la P1 monofosforilada (8,497 Da) més el pes molecular corresponent als primers 35 residus del Pr-P1, dóna una valor gairebé idèntic (12,657 Da) al pes molecular calculat a partir d'espectrometria de masses del propi precursor (12,662 Da). A més a més, la composició aminoacídica del Pr-P1 calculada a partir de la seqüència, suposant com a extrem C-terminal la pròpia P1, és molt similar a l'obtinguda a partir de la hidròlisi del precursor (Taula III.C.IV). D'altra banda, els últims 17 residus seqüenciats del Pr-P1 (Fig.III.C.6) coincideixen amb els primers 17 residus de la protamina P1. I com a darrer punt, la presència d'alanina (en posició 48) del Pr-P1 acaba de corroborar que aquesta molècula és precursora de la P1, ja que ni la P2 ni P3 presenten aquest aminoàcid.

٠.

÷

Fig.III.C.6. Processament del precursor Pr-P1 per donar lloc a la protamina final P1. P- fosfat. PM-Pes molecular, en Da.

		Р	<u>PM</u>
Pr-P1 A	LRKVDRNRFVLDNVTPQPREAKRYKI	EEEEFPGHGRRRRRRSKGKGKAKGKG 1 P	2,662
PR(8)	DRNRFVLDNVTPQPREAKRYK	EEEEFPGHGRRRRRRSKGKGKAKGKG 1 P	12,090
PR(7)	NRFVLDNVTPQPREAKRYK	CEEEEFPGHGRRRRRRSKGKGKAKGKG (P	11,820
PR(6)	FVLDNVTPQPREAKRYK	EEEEFPGHGRRRRRRSKGKGKAKGKG P	11,550
PR(5)	NVTPQPREAKRY	KEEEEFPGHGRRRRRRSKGKGKAKGKG P	11,074
P) '4)	KRY	KEEEEFPGHGRRRRRRSKGKGKAKGKG P	10,082
PR	YE	KEEEEFPGHGRRRRRRSKGKGKAKGKG P	9,798
PR(2)	1	KEEEEFPGHGRRRRRRSKGKGKAKGKG P	9,635
PR(1)		EEFPGHGRRRRRRSKGKGKAKGKG P	9 <i>,</i> 249
P1 gònad	a	RRRRRSKGKGKAKGKG	8,497
P1 esper	natozoide	RRRRRSKGKGKAKGKG	8,417

Taula III.C.IV. Composició aminoacídica del precursor de la P1 (Pr-P1), calculada a partir de la hidròlisi de la molècula (a), i a partir de la seva estructura primària (b) considerant al Pr-P1 una forma precursora directa de la P1 monofosforilada. Valors expressats en % mols.

	A	b		a	b
	mo	!%		mo	! %
Lvs	26.1	26.2	Рго	2.9	2.8
His	1.4	0.9	Gly	20.8	19.6
Arg	27.1	27.1	Ala	2.3	2.8
Ast	4.0	3.8	Cys	0.9	1.9
Asn		1.9	Val	2.1	2.8
Asn		1.9	Met		,
Thr	1.2	0.9	Ile		
Ser	1.3	0.9	Leu	1.2	0.9
GlT	6.6	9.3	Tyr	0.2	0.9
Ghu		8.4	Phe	1.9	1.9
Gln		0.9	Тгр	ND°	

^a Not determined.

Tal i com s'ha comentat en l'apartat III.C.1, les protamines (almenys la P1, no sabem què passa amb la P2 i P3) provenen de molècules precursores que entren en el nucli espermiogènic a l'inici de l'espermiogènesi, i a mida que aquesta avança, els precursors es van modificant (experimentant deleccions en l'extrem N-terminal, per ex., com és el cas del Pr-P1) fins donar la protamina final. Tots aquests canvis a nivell de la composició proteica nuclear es reflecteixen a nivell de la **morfologia que presenta la cromatina** tot al llarg d'aquest procés. La Fig.III.C.7 ens mostra els diferents patrons de condensació que adopta la cromatina al llarg de l'espermiogènesi mentre s'està donant el reemplaçament d'histones per les proteïnes intermèdies, que acabaran per donar lloc a les protamines. El que s'explica a continuació pretén ser un model en el que s'intenta correlacionar els canvis en la morfologia de la cromatina amb els canvis que es donen a nivell del proteïnes en el nucli espermàtic, especialment els canvis que es donen a nivell dels precursors de la P1, que és el que coneixem.

En la Fig.III.C.7A veiem una espermàtida temprana que té una cromatina amb una estructura granular (en B es veu amb més detall), etapa on s'estaria donant l'inici del recanvi proteic, el reeplaçament de les histones per les molècules precursores i protamines (fosforilades) que començarien a entrar en el nucli.

El següent pas és un estadi on la cromatina adopta una estructura fibrilar (Fig.III.C.7C i D) en una espermàtida que s'està elongant; en aquest moment s'estarien donant les primeres etapes del processament intranuclear dels precursors. Les fibres es van fusionant entre elles i van formant lamel.les, que en un principi estan desordenades en el nucli (Fig.III.C.7E); la formació d'aquestes lamel.les estaria relacionada amb les darreres etapes del processament dels precursors (deleccions N-terminals en el cas dels precursors de la P1), molècules que encara estan fosforilades. Fig.III.C.7. Condensació de la cromatina espermàtica al llarg de l'espermiogènesi de *M. brandaris*. A- Espermàtides tempranes amb la cromatina amb estructura granular (B, detall). C- Espermàtida elongada amb una cromatina estructurada en fibres (D, detall); dalt- tall transversal, baix- tall semilongitudinal. E- Estructura en lamel.les desordenades en una espermàtida més avançada. F-Cromatina organitzada en lamel.les ordenades, disposades concentricament a l'eix del nucli; a l'esquerra es mostra un tall transversal de l'espermàtida avançada, i a la dreta un tall longitudinal. G- Espermatozoide amb una cromatina que ha fusionat les lamel.les donanat lloc a una estructura compacta i altament condensada. Barra= 250 nm.



Posteriorment, aquestes lamel.les s'ordenen concentricament a l'eix del nucli (Fig.III.C.7F), moment on apareixeria la protamina P1 que es trobaria en estat monofosforilat. I finalment, en l'espermatozoide, les lamel.les es fusionen i donen lloc a una estructura de la cromatina altament conpactada, que és quan el nucli està condensat per les protamines finals, P1, P2 i P3 defosforilades (sabem que la P1, en aquest estadi, perd l'únic fosfat que té unit a la única serina).

Com hem pogut veure a partir de l'estructura primària de les protamines que compacten el DNA, totes tres mostren una organització peculiar en forma de grups d'arginines separats per zones molt riques en repeticions del motiu GK (Fig.III.C.5C). Utilitzant el mètode de Lipman i Pearson (1985) s'han fet **estudis** a **nivell teòric de les seqüències** i s'ha vist que cadascuna de les protamines presenta una seqüència *consensus* tal com $[R_6(GK)_8]_4$ per P1, i $[R_6(GK)_3K_4(GK)_5]_3$ per P2 i P3 (Fig.III.C.8). L'anàlisi dels motius que es repeteixen en les protamines ens suggereix una evolució particular d'aquestes proteïnes: totes tres proteïnes podrien provenir d'un minigen ancestral comú que, éssent de la forma $R_6(GK)_n$ pot haver adquirit o perdut 4 Lys (indel de KKKK, significant la paraula "indel" una possible inserció o delecció del motiu) i experimentat algunes duplicacions.

Aquesta darrera hipòtesi queda reflexada en la Fig.III.C.9; en ella es pot veure la possible relació evolutiva existent entre totes tres proteïnes. A partir d'un minigen ancestral es donaria una duplicació juntament amb un indel (inserció o delecció, no se sap) de 4 Lys, i una còpia donaria lloc al minigen ancestor de la protamina P1, i l'altra còpia al minigen ancestor de la P2 i P3. Hi hauria una segona "onada" de canvis en la que, per una banda, el minigen de la protamina P1 es duplicaria i es donarien fusions, deleccions i mutacions, fins donar la seqüència *consensus* $[R_6(GK)_8]_4$, i per altra banda, el minigen ancestor de les protamines P2 i P3 també experimentaria duplicacions i fusions, i finalment es duplicaria, donant lloc a dues còpies, una que seria el gen per la P2, i l'altra per la P3, i que cadascun per la seva banda experimentaria deleccions i mutacions per donar lloc a les dues protamines que són diferents, tot i que la seqüència *consensus* sigui la mateixa ([R₆(GK)₃K₄(GK)₅]₃). Fig.III.C.8. Anàlisi d'alineament de les protamines de *M. brandaris*. Motius de repetició i seqüències *consensus* per les protamines P1, P2 i P3. Les barres verticals indiquen les similituds amb respecte la seqüència *consensus*.



Fig.III.C.9. Possible relació evolutiva a nivell de gens entre les protamines P1, P2 i P3 de M. brandaris. Indel= inserció o delecció.



3. Les protamines dintre del marc dels canvis evolutius en els Mol.luscs Prosobranquis (arqueogastròpodes —> cenogastròpodes). Interpretacions alternatives.

a. Limitacions

La interpretació dels canvis de les protamines en els Prosobranquis presenta diverses dificultats. Una de les més importants es basa en la manca d'informació: mentre que els grups de Mol.luscs Prosobranquis són molt amplis i diversos, el nombre de protamines caracteritzades és evidentment molt limitat.

Els Mol.luscs Prosobranquis (seguint a Barnes, 1987) es poden diferenciar en diversos grups (Fig.III.C.10). El principal grup de prosobranquis primitius és el dels **arquegastròpodes** (el més nombrós i divers), també coneguts com a vetigastròpodes, grup que data del Cambrià (Altaba, 1991). Segons diversos autors (Barnes, 1987; Healey, 1984 i 1987), els **cenogastròpodes** varen sorgir en el Cretaci, evolucionant a partir de certes famílies d'arqueogastròpodes. Els cenogastròpodes comprenen (segons classificacions alternatives) els **mesogastròpodes i els neogastròpodes**, encara que els aspectes principals de la biologia de la reproducció, el tipus de protamina i el patró de condensació de la cromatina espermiogènica, són característiques compartides per moltes famílies de meso i neogastròpodes (v. Daban et al., 1991; Healey, 1984; Chiva et al., 1991).

En aquesta part de discussió ens centrarem en la comparació entre els arqueogastròpodes, representats per l'espècie *Monodonta turbinata*, i els cenogastròpodes (o part d'ells), representats pel murícid *Murex brandaris*. La raó de poder fer aquesta comparació simplificada es basa en el fet de que, tant les protamines dels arqueogastròpodes com la condensació de la seva cromatina, és molt similar entre totes les espècies estudiades (v. Daban et al., 1990 i 1991), i també al fet de que molts meso i neogastròpodes estan representats (en aquestes característiques) pels Murícids, i en concret, per *Murex brandaris* (Walker i McGregor, 1968; West, 1978; Huaquin i Bustos-Obregon, 1981; Buckland-Nicks et al., 1982; Healey 1984 i 1987; Jaramillo et al., 1986; Gallardo i Garrido, 1989; Amor i Durford, 1990).



Fig.III.C.10. Resum de la possible evolució dels diferents grups de Prosobranquis. (Modificat a partir de Barnes, 1980).

Com a conseqüència, la present discussió no pretén ser exhaustiva, sinó simplement pretén apuntar un esquelet bàsic que permeti comprendre l'existència d'una relació molt estreta entre l'evolució de la biologia de la reproducció de les espècies, i l'evolució dels seus gàmetes (concretament els canvis de la composició i estructura de la seva cromatina).

b. Fets diferencials entre els arqueogastròpodes i els cenogastròpodes que fan referència a la biologia de la reproducció.

i. Tipus de Fertilització

Monodonta turbinata, i en gereral el reste d'arqueogastròpodes, poseeix fertilització externa. Això significa que allibera els seus gàmetes al medi aquós (al mar sobretot), en quantitat molt elevada, i d'aquesta manera, tant espermatozoides com oòcits s'han de trobar lliurement, fecundar i desenvolupar el procés embrionari pertinent. La fertilització externa es considera un procés més primitiu que la fecundació interna, que pot presentar una relativa pèrdua d'efectivitat (rendibilitat) dels gàmetes, ja que el contacte entre l'espermatozoide i l'oòcit s'efectúa fins a cert punt a l'atzar, i molts dels gàmetes es perden després de la posta.

Els cenogastròpodes, i amb ells *Murex brandaris*, han adquirit la fertilització interna, el que implica l'aparició simultània d'una gran quantitat de canvis relacionats (ja que els animals han de posseir conductes sexuals especialitzats i glàndules anexes), i una fisiologia i comportament global adequat al nou tipus de fertilització. En aquest cas es pot donar una major rendibilitat dels gàmetes (en particular dels oòcits, doncs totes les espècies formen i alliberen espermatozoides en quantitats elevades), ja que els encontres no s'efectuen a l'atzar, sinó en compartiments especialitzats perquè la fecundació tingui lloc.

ii. Morfologia espermàtica

El canvi en la biologia de la reproducció dels Prosobranquis (fecundació externa —> fecundació interna) ha anat associat al canvi de la forma de l'espermatozoide. Els espermatozoides de *M. turbinata* i *M. brandaris*, corresponen molt clarament a la morfologia descrita per Franzén (1956) com a espermatozoide primitiu i espermatozoide modificat respectivament, i també a la classificació de Jamieson (1986a i b) de ect-aquasperm i introsperm, els quals corresponen respectivament a tipus de gàmetes que realitzen la fecundació en un ambient líquid extern (marí), o en un ambient líquid intern (compartiment especialitzat).

Arribats a aquest punt és interessant assenyalar que els espermatozoides posseeixen una escala de tamany pròpia dels organismes que utilitzen flagell (els organismes de tamany immediatament superior ja utilitzen cilis), i que en aquest ordre de tamany les forces de cohesió molecular i les forces de viscositat dels líquids ofereixen un impediment importantíssim al moviment. Com a conseqüència, clàssicament s'ha interpretat que petites diferències en la viscositat del medi on els espermatozoides es mouen, poden imposar (o seleccionar) grans diferències en la forma de l'espermatozoide.

D'altra banda, també és important considerar que els flagells espermàtics actuen principalment en l'entrada de l'espermatozoide dintre de l'òvul, ja que són els moviments dels líquids orgànics i les contraccions dels conductes els responsables de dirigir els grans desplaçaments espermàtics en la fertilització interna, i les corrents i turbulències locals marines (així com la difusió) les principals causes dels desplaçaments espermàtics en el medi marí.

Sigui com sigui, els espermatozoides d'espècies de fertilització externa tendeixen a ser simples, amb un cap arrodonit, pocs mitocondris, i un flagell simple del tipus 9+2. És notori assenyalar que el nucli d'aquests espermatozoides (rodó o lleugerament elíptic) ocupa una fracció extraordinàriament elevada del volum global de l'espermatozoide (Fig.III.C.11A). Per contra, les espècies de fertilització interna tendeixen a modificar el seu espermatozoide: aquesta cèl.lula tendeix a allargar-se i a complicar les seves estructures; el nucli també representa una part important del volum cel.lular total (però menys que en el cas de les espècies de fecundació externa), i per tant l'allargament de la cèl.lula espermàtica comporta l'allargament del nucli (Fig.III.C.11B).

Els canvis generals comparats entre els espermatozoides dels arqueogastròpodes i els cenogastròpodes es troben revisats a Healy (1984 i 1987).

Fig.III.C.11. Comparació entre la morfologia nuclear d'un espermatozoide amb fecundació externa, com *Monodonta turbinata* (A), i un de fecundació interna, com és el cas de *Murex brandaris* (B); nucli (*); mp- peça mitja. B- 6000x





iii. Cóm s'arriba a l'empaquetament i forma final del nucli espermàtic

Els punts anteriors mostren que existeix una correlació general entre el canvi del tipus de fertilització, i el canvi de la forma de l'espermatozoide entre els arqueogastròpodes i els cenogastròpodes (aqui ens estem centrant en el nucli, i no considerem altres parts).

En tots els casos i independentment de la seva forma, el nucli es troba molt condensat. Tot i així, els estudis morfològics (Walker i McGregor, 1968; West, 1978; Huaquin i Bustos-Obregon, 1981; Buckland-Nicks et al., 1982; Healey 1984 i 1987; Jaramillo et al., 1986; Gallardo i Garrido, 1989; Amor i Durford, 1990) mostren que el camí que segueix la cromatina per a condensar-se és diferent entre les espermiogènesis dels arqueogastròpodes i les dels cenogastròpodes. En els arqueogastròpodes (*M. turbinata*), la cromatina de l'espermàtida temprana es va condensant en grànuls de tamany progressivament major, i el nucli espermàtic estaria format per la disposició apretada d'aquests grans grànuls (Fig.III.C.12). En canvi, en *M. brandaris* (cenogastròpode) la progressió de la condensació espermàtica és un procés molt més organitzat i complex, en el que es produeixen diverses transicions estructurals morfològiques, de grànuls es passa a fibres, després a lamel.les, les quals finalment es fusionaran entre elles per a formar una estructura única (equivalent pràcticament a un cristall orgànic) (tal i com hem vist a la Fig.III.C.7).

Fig.III.C.12. Condensació de la cromatina en l'arqueogastròpode Monodonta turbinata (espècie de fecundació externa).



Els estudis per difracció de raigs X suggereixen que a nivell local, la disposició del DNA en el nucli espermàtic no varia molt entre els arqueogastròpodes i els cenogastròpodes (Puigjaner et al., 1986, Suau i Subirana, 1977, Càceres et al., 1999). És a dir, dins dels grànuls de cromatina dels arqueogastròpodes, o en tot el seu nucli, el DNA es trobaria empaquetat en cadenes paral.leles molt properes, pràcticament arribant al màxim de compactació, de la mateixa manera que pel cas dels cenogastròpodes (cas concret de *M. brandaris*).

Sembla doncs, que hi ha també una correlació entre el tipus de condensació i la forma nuclear, però aquesta correlació no implica necessàriament una relació causa-efecte (veure més endavant), ja que en els cenogastròpodes el nucli es troba "perforat" pel canal endonuclear (que conté part de l'axonema), i possiblement el creixement d'aquest canal sigui el responsable en dirigir la progressió de la forma nuclear.

iv. Les proteïnes que condensen el nucli

Aquest és un punt que per raons històriques s'ha interpretat de manera molt simplificada. La condensació del nucli espermàtic s'efectua per les **protamines** que interaccionen amb el DNA, però de fet, és una conseqüència de la progressió de les interaccions proteïna-DNA que es produeixen al llarg de l'espermiogènesi. Els primers estudis sobre aquest tema es varen realitzar en peixos i sistemes relativament simples, en els quals, sembla que una molècula (protamina) va desplaçant les histones i empaquetant el DNA. Posteriorment s'ha anat veient que en molts altres casos es produeixen una sèrie de transicions composicionals i estructurals per arribar al nucli espermàtic (cites de mamífers i condrictis).

Hi ha altres aspectes, com són la participació de "xaperons moleculars" i factors que dirigeixen l'arquitectura espaial de la condensació cromatínica en l'espermiogènesi, que no s'han considerat mai, i que probablement han d'existir si pensem que totes les espermàtides d'una mateixa espècie es condensen exactament igual (per ex., hi ha un abisme bibliogràfic i de coneixements, entre el tema de la especificitat de la condensació del cromosoma mitòtic i la condensació de la cromatina espermàtica. En els arqueogastròpodes, la molècula que condensa el nucli espermàtic és una protamina majoritària que coexisteix, amb una petita quantitat amb d'altres proteïnes bàsiques (Colom i Subirana, 1981; Daban et al., 1991). Totes les **protamines dels arqueogastròpodes** són similars (Daban et al., 1990 i 1995), i venen representades per la protamina de *M. turbinata*.

La Fig.III.C.13 mostra l'estructura primària d'aquesta molècula (Daban et al., 1995): és una proteïna de 13,476 Da que conté 106 residus, i està formada per 7 tipus d'aminoàcids (2 Thr, 18 Ser, 5 Gly, 10 Ala, 4 Val, 6 Lys i 61 Arg). La seva organització mostra que hi ha dues regions principals: per una banda, presenta una regió amino-terminal (residus 1-27) en la que hi ha una alternància de residus Bàsic-Ser; en aquesta regió (com en la resta de la molècula) l'arginina és el residu bàsic principal, i es poden trobar fins a 7 dipèptids de la forma RS alternant, i un de la forma KS entre els residus 10 i 24.

Per altra banda, la resta de la molècula (residus 25-106) és l'altra regió on els residus d'arginina es troben organitzats en grups (*clusters*): en la part central de la molècula (residus 28-67), els *clusters* d'arginines alternen amb triplets d'altres residus (SAS, TAS, SVS, SRS); aquesta part central no conté lisines. La part C-terminal (residus 68-106) també conté grups d'arginines, però en aquest cas, alternen amb grups més heterogenis d'aminoàcids. La separació entre els *clusters* es pot efectuar mitjançant un únic residu (T, A) o per grups de 4, 5 o 8 residus (alguns dels quals contenen arginina o lisina). Per tant, la lisina torna a aparèixer en la part C-terminal, però mai provoca la disrupció dels *clusters* d'arginina. De fet, l'organització d'aquesta molècula mostra certs punts de similitud amb altres protamines d'aus i mamífers (Daban et al., 1995).

Fig.III.C.13. Estructura primària de la protamina de *M. turbinata* (arqueogastròpode). Extret de Daban et al., 1995.

5 10 15 20 25 40 45 30 35 50 ARAVRRRRARSRSRSRKSRSRSRSAKRSASRRRSRSAGRRRRRRRTASRRRRR 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 SASRRRSVSRRRRRRSRKSRGRRRRGRKVRRRRVKRAGRKGRRRTRRRRRR 105 ARR