

TESI DOCTORAL

Pepita Giménez Bonafé

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

Novembre, 1999

En el procés de condensació, la protamina dels arqueogastròpodes, conjuntament amb altres proteïnes minoritàries, entraria en un estat fosforilat en el nucli de l'espermàtida, i aniria desplaçant directament les histones unides al DNA. A més a més dels processos de fosforilació/defosforilació, en el control d'aquesta funció és possible que intervingui la part N-terminal organitzada amb els residus alternants. La unió de la protamina amb el DNA, i el desplaçament de les histones formaria les estructures granulars compactes que es poden observar en la progressió de l'espermiogènesi.

Un altre aspecte és conèixer la **molècula que condensa la cromatina espermàtica en els cenogastròpodes**. En el cas de *M. brandaris* (acabat d'estudiar en aquest treball), i també en altres cenogastròpodes (Daban et al., 1991, Chiva et al., 1992), en el nucli espermàtic es troben protamines molt simples (Fig.III.C.14). Els detalls de l'estructura primària d'aquestes molècules han estat comentades en l'apartat III.C.2.b. En resum, són molècules formades per molt pocs tipus de residus aminoacídics, i que podrien provenir d'un pèptid ancestral (R₆[GK]₈) que ha sofert duplicacions i alguna mutació addicional.

Fig.III.C.14. Estructura primària de les protamines presents en el nucli espermàtic del cenogastròpode *Murex brandaris*.

P1	RRRRRSKGGKAKGKGGKRRRRRKGKGGKGGKGGKGGRRRR CRRGRGCKKRKGKKGGKRRRRRGGKGGK
P2	RRRRRGKGRGKKRKGKGGKRRRRGSKGRKKKKGGKGGKRRRR RRRRRKGGKGGK
P3	RRRRRGKGGKGGKGGKRRRRRGRKGKGGKGGKGGKGGKRRRR RRRRRKGKGGK

Tot i que aquest tipus de protamines expliquen l'alt grau de condensació del DNA de l'espermatozoide, no expliquen per sí soles el tipus de procés que es dona per arribar a aquesta condensació (v. Fig.III.C.7). En el cas de *M. brandaris* almenys una protamina (i molt possiblement les altres dues també) és

sintetitzada en l'espermàtida en forma de precursor, el qual va sofrir deleccions progressives (Fig.III.C.1C); és molt possible que en cada delecció es modifiqui la interacció de la proteïna amb el DNA, i que el processament controlat de les deleccions sigui el responsable del procés morfològic de la condensació de la cromatina. És interessant assenyalar que el procés de defosforilació de les serines pot tenir només importància en les últimes etapes de la condensació, en l'empaquetament final (quan les lamel·les es fonen entre sí).

v. Comparació de les protamines dels arqueogastròpodes i dels cenogastròpodes

En les Fig.III.C.13 i 14 apareixen les seqüències de la protamina de *M. turbinata* i la protamina P1 de *M. brandaris*. Malgrat és molt difícil assegurar inequívocament si existeix o no una relació evolutiva entre aquests dos tipus de protamina, l'anàlisi de les organitzacions d'aquestes molècules suggereix fortament que són anàlogues (fan una mateixa funció i per tant tenen característiques químiques similars), però no homòlogues (no provenen l'una de l'altra per mutacions acumulatives o bé, d'un mateix ancestre)

Les similituds importants entre totes dues protamines són:

- alta basicitat i presència de *clusters* d'arginines,
- zones d'alternància d'aminoàcids Bàsic-No bàsic.

Similituds que es donen en la majoria de protamines, siguin o no homòlogues.

Les diferències més importants són les següents:

- la protamina dels murícids prové d'un precursor, el qual conté un gran nombre de tipus d'aminoàcids diferents (hidrofòbics, acídics, bàsics) que no presenta cap relació d'identitats amb la dels arqueogastròpodes,
- en *M. brandaris* es dona un processament del precursor, processament que sembla ser la causa principal de la regulació de les interaccions progressives DNA-proteïna durant l'espermioogènesi. El procés de fosforilació/defosforilació només participa en l'estadi final de la condensació. En canvi, en la protamina dels arqueogastròpodes, els processos de fosforilació/defosforilació podrien jugar un

paper més important en la regulació de les interaccions DNA-proteïna (Daban et al., 1995). I per últim,

- l'anàlisi dels repetits interns de les protamines de *M. brandaris* (Fig.III.C.8) suggereix un origen a partir d'un minigen (tal i com s'ha vist en el punt 2 d'aquest apartat). Les alternàncies GK no es troben en els arqueogastròpodes (en el seu lloc es troben RS), i tant la lisina com la glicina són residus que apareixen en baixa proporció en aquestes protamines.

c. Resum de les dades disponibles

De certes famílies d'arqueogastròpodes varen emergir els cenogastròpodes. Entre altres propietats, varen adquirir la fertilització interna a partir de la externa, canvi que es va donar associat a canvis a altres nivells, entre ells, es va produir una diferència important a nivell de la forma de l'espermatozoide, en la forma del seu nucli, del procés morfològic de la condensació de la cromatina espermio-gènica, i de les proteïnes que efectuen aquesta condensació.

d. Interpretacions alternatives

De fet, un dels primers punts generals que emergeix de la comparació dels processos biològics relacionats amb el canvi de fecundació externa cap a interna és la qüestió de com es produeixen aquests canvis: es donen tots ells a l'atzar i convergeixen per a donar una nova funció?, o bé el fet de que es donin certs canvis facilita que puguin aparèixer o seleccionar-se altres canvis evolutius relacionats?. Aquest punt pertany a un tema del procés evolutiu general encara no ben resolt, i no el tractarem aquí. En aquest apartat ens centrarem en el possible significat dels canvis de les protamines, i el seu efecte sobre la condensació de la cromatina i la forma nuclear.

Una anàlisi clàssica s'hauria de fer en termes d'avantatge evolutiva: les protamines dels cenogastròpodes produeixen un millor empaquetament i donarien una major protecció al DNA espermàtic. Segons la nostra opinió, aquests punts són difícils de sostenir: l'empaquetament del DNA espermàtic en arqueogastròpodes i cenogastròpodes (Puigjaner et al., 1986; Càceres et al., 1999) és molt similar a nivell local (és a dir, les cadenes de DNA estan pràcticament

adjacents en els dos tipus d'espermatozoides); per altre cantó, la quantitat de protamina per a empaquetar el DNA és gairebé idèntica en arqueogastròpodes que en cenogastròpodes (Daban et al., 1991), i la concentració de càrrega de les protamines d'uns i altres és també quasi idèntica. Un detall notable és que aquests valors semblen marcar el límit màxim de la basicitat de les protamines en general. Recollint aquestes dades, no sembla que les protamines dels cenogastròpodes siguin més eficients que les dels arqueogastròpodes en condensar el DNA.

Respecte el segon punt "clàssic" de la funció de les protamines (l'aspecte de la protecció del DNA, doncs l'espermatozoide abandona el seu medi orgànic, Bloch, 1969 i 1979; Subirana, 1975), és difícil d'interpretar objectivament al no haver experiments conclusius al respecte. De tota manera, és molt estrany que en els animals de fertilització externa (que alliberen a l'aigua els espermatozoides i oòcits), la naturalesa només s'hagi dedicat a protegir el genoma de l'espermatozoide, però no el de l'oòcit (el qual es troba completament dispers en la vesícula germinal).

Una interpretació alternativa és que la selecció actua sobre la forma final de l'espermatozoide, i en concret sobre la forma del nucli, pel fet que representa la fracció principal del volum cel.lular. En aquest cas, la progressió de la condensació de la cromatina espermiogènica (i per tant el tipus de protamina que la produeix) podria representar un important factor permissiu de la forma final nuclear. És a dir, alguns tipus de processos de condensació (però no tots) són compatibles amb aquesta forma. De fet, existeix una correlació general *grosso modo* : quan la cromatina es condensa durant l'espermiogènesi en grànuls grans, en general dóna nuclis arrodonits, i quan ho fa en grànuls molt petits, o principalment en fibres o lamel·les, els nuclis solen ser allargats o en espiral (v. la comparació entre *M. turbinata* i *M. brandaris* , per exemple).

Si això és cert, el paper que juga la progressió espermiogènica de les interaccions entre el DNA i les protamines és un factor determinant del tipus de condensació, i a la vegada permissiu del tipus de forma nuclear. Això podria explicar parcialment els canvis simultanis de la forma nuclear, condensació de la protamina, i tipus de protamina. Aquesta interpretació no necessàriament és vàlida per aquells espermatozoides en els quals el nucli representa una fracció molt minúscula del volum cel.lular.

D. Gasterosteiformes

D. *Gasterosteiformes*

1. Interès que presenta l'estudi de les protamines dels *Gasterosteiformes*.

Dintre dels peixos ossis, el subordre *Gasterosteoidi* (*Gasterosteiformes*) comprèn una sèrie de famílies que han sofert una extraordinària diversificació a nivell genètic, i una elevada variació fenotípica (Taylor et al., 1997).

En aquest subordre, és especialment interessant el cas del "complex d'espècies" anomenat *Gasterosteus aculeatus*, el qual ha experimentat en molt poc temps una radiació adaptativa en els llacs de la Columbia Britànica (entre d'altres indrets), constituint un dels exemples evolutius més estudiats en l'actualitat, juntament amb la família dels Cíclids (peixos d'aigua dolça) en els llacs de l'Àfrica oriental (Stiassny i Meyer, 1998).

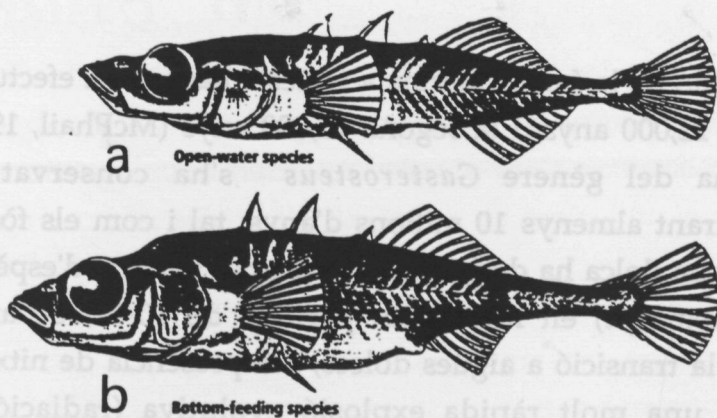
Molts dels llacs de la Columbia Britànica (Canadà) es van originar com a conseqüència de la desglaciació soferta a finals de Pleistocè (fa aproximadament 12,000 anys) (McPhail, 1994). Aquest fet va permetre que moltes espècies colonitzessin de forma independent una sèrie de sistemes amb els nítxos ecològics buits, permetent així una ràpida especiació (adaptació) d'alguns grups. El principal d'aquests grups va ser el citat "complex d'espècies" *Gasterosteus aculeatus*.

La invasió de la forma marina a aquests llacs es va efectuar en dues onades: la primera fa 12,000 anys, i la segona 10,000 anys (McPhail, 1994). Mentre que la forma marina del gènere *Gasterosteus* s'ha conservat morfològicament invariable durant almenys 10 milions d'anys, tal i com els fòssils ho demostren, la forma d'aigua dolça ha donat lloc a una gran varietat d'espècies (algunes de les quals s'han extingit) en només un període de 10-12,000 anys. Sembla doncs evident, que la transició a aigües dolces, i la presència de nítxos ecològics lliures, ha provocat una molt ràpida explosió evolutiva (radiació evolutiva) de les formes ancestrals marines. També és interessant assumir que bona part d'aquests canvis s'han de basar en la presència d'un material genètic adequat, amotllable a la situació.

En tota la sèrie de llacs de la Columbia Britànica, es dona un curiós fenomen lligat als processos d'adaptació dels Gasterosteiformes (*G. aculeatus*). Aquests llacs contenen dues formes de *G. aculeatus*, una limnètica (de petit tamany) i una bènctica (de tamany major), Fig.III.D.1. Fins a l'actualitat es pensa que les formes bènctiques (que viuen en el fons) provenen de la primera invasió (fa 12,000 anys), mentre que les limnèctiques (que viuen més en la superfície) provenen de la segona invasió (fa 10,000 anys) i que, independentment en cada llac han ocupat el nítxo ecològic limnèctic al trobar el bentos ocupat per les espècies provinents de la primera invasió (Kassen et al., 1995; Schluter i McPhail, 1992). Darrerament Taylor et al., (1994) proposen una hipòtesi basada en l'anàlisi del DNA mitocondrial que consisteix en que en cada llac s'ha donat una evolució independent de les formes bènctiques cap a les limnèctiques, presentant una evolució paral·lela.

L'interès principal del nostre treball amb el complex *G. aculeatus* i el subordre *Gasterosteoides* ha estat el de poder estudiar les protamines d'un grup de ràpida evolució, i poder-les així comparar amb les protamines dels peixos ossis.

Fig.III.D.1. Diferències en la forma del cos dels Gasterosteiformes (*G. aculeatus*) segons siguin limnèctics (a) o bènctics (b).



En un treball anterior (Saperas et al., 1994) es varen tipificar les protamines dels peixos ossis, i es van descriure els trets més importants de la seva evolució.

Una de les conclusions més importants a la que es va arribar (al igual que a Buesa et al., 1998) és que les protamines típiques presenten una variabilitat limitada, al ser molt similars en les diferents famílies pertanyents a un mateix ordre.

En el present apartat III.D (v. Fig.III.D.2) presentem els resultats d'estudis de les protamines de:

- Tres poblacions diferents del complex *G. aculeatus* : una població limnètica, una de bènica (ambdúes d'aigua dolça), i una última d'anòdroma (viuen en l'oceà, però fan la posta en els llacs).

- Tres espècies diferents del subordre *Gasterosteoidi* : *Gasterosteus weatlandi* , *Pungitius pungitius* , i *Aulorhynchus flavidus* .

Fig.III.D.2. Breu classificació dels Gasterosteiformes estudiats en el present treball.

Peixos teleostis

Subordre *Gasterosteoidi*: (genèricament *sticklebacks*):

- Família *Gasterosteoidae* : *Gasterosteus aculeatus*
Gasterosteus aculeatus trachurus
Gasterosteus weathandi
Pungitius pungitius
- Família *Aulorhynchidae* : *Aulorhynchus flavidus*

Les raons per les quals hem escollit aquestes poblacions i espècies són les següents:

a) L'estudi de les poblacions del complex *G. aculeatus* permetrà observar si existeixen diferències entre les protamines de les diferents poblacions d'una mateixa "espècie-complex".

b) L'estudi entre *G. aculeatus* i *G. weatlandi* , pertanyent al mateix gènere, ens permetrà estudiar la rapidesa de la divergència de les protamines entre dues espècies pròximes.

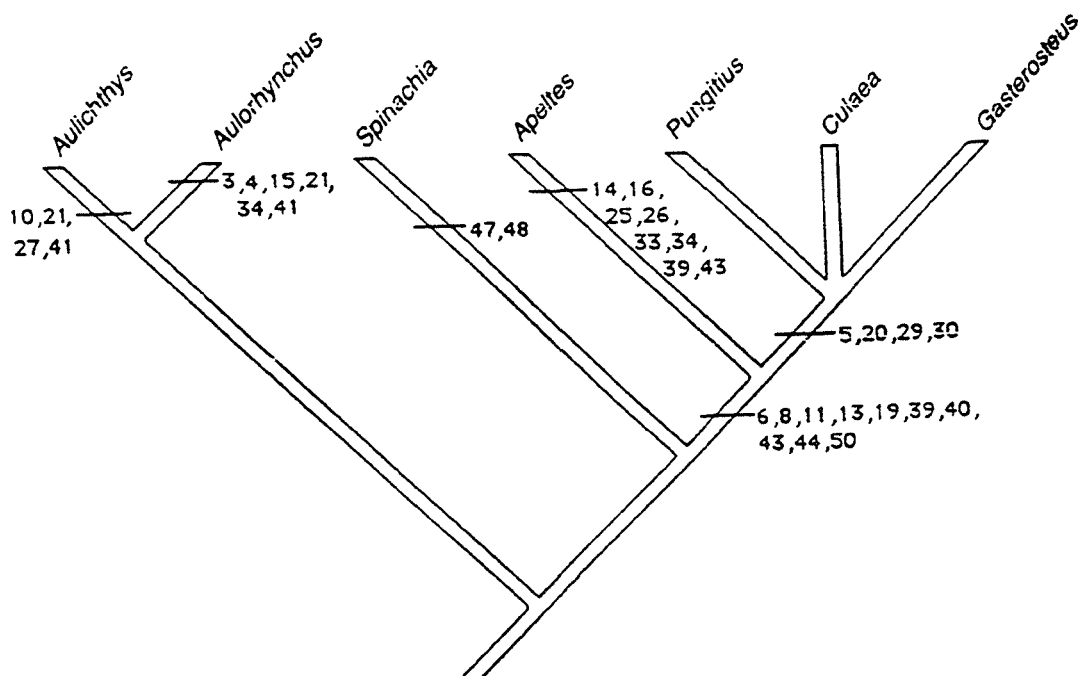
b) *P. pungitius* pertany a la mateixa família que les dues espècies anteriors (família *Gasterosteoidae*), el que ens ofereix la possibilitat d'analitzar la divergència entre gèneres diferents.

c) I per últim, estudiem una espècie ubicada en una família diferent a la resta, la família *Aulorhynchidae*, que pertany al mateix subordre que la família *Gasterosteoidae* (subordre *Gasterosteoidaei*), i que per tant ens permetrà comparar protamines entre famílies diferents.

Un altra de les raons de l'estudi de les protamines dels Gasterosteiformes ha estat la de poder-les **comparar** amb les proteïnes espermàtiques dels **peixos ossis** en general, per tal d'obtenir més informació de la variabilitat evolutiva d'aquestes molècules.

Les reaccions filogenètiques entre totes aquestes espècies mencionades es mostren de forma simplificada a la Fig.III.D.3.

Fig.III.D.3. Arbre filogenètic pel subordre *Gasterosteoidaei*. Extret de Bell i Foster, 1994.



2. Purificació i caracterització de les protamines dels Gasterosteiformes

a. "Complex d'espècies" *Gasterosteus aculeatus*

i. Composició proteica dels nuclis espermàtics gonadals

Els Gasterosteiformes són peixos de mida molt petita (5-6 cm), de manera que és de la gònada sencera (3-4 mm) de la qual s'obtenen els nuclis espermàtics, sense poder fer una purificació dels espermatozoides a partir dels epidídims.

Es va partir de gònades amb diferents colors: gònades blanques, grisses i negres. A partir d'elles, i per separat, es va fer una obtenció de les proteïnes nuclears espermàtiques.

La major part del material estava conservat en etanol al 90%. Els tampons utilitzats en la purificació de les proteïnes nuclears de tots els Gasterosteiformes estudiats han estat els següents:

Tampó A: NaCl 150 mM
TrisHCl 20 mM pH 7.5

Tampó B: tampó A
Tritó X-100 0.5%

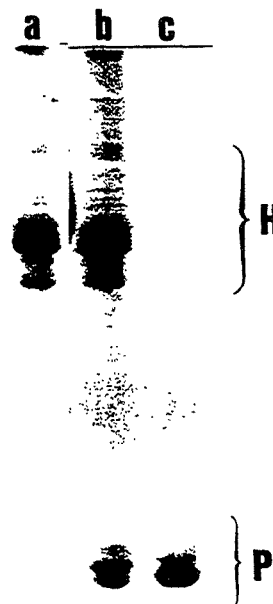
Tampó C: tampó B
TLCK 10 mg/ml (inhibidor proteolític)

De 3 a 6 gònades (per preparació) es van homogeneïtzar amb un homogeneïtzador adaptable a eppendorfs (*Barnat mixer*) enfront de 80 µl de tampó C, i un cop tot el material va estar ben dispers, es va centrifugar (10,500 g, 5 min) i el sediment es va homogeneïtzar de nou amb 80 µl de tampó C per assegurar la dissolució de les membranes cel·lulars. Seguidament, es va centrifugar (10,500 g, 5 min) i el sediment resultant (nuclis) es va extreure afegint 80 µl de HCl 0.4N; per ajudar a l'extracció de les proteïnes nuclears, es va homogeneïtzar un parell de cops, i es va centrifugar (10,500 g, 10 min) per recuperar les proteïnes solubles en el sobrenadant. Al sobrenadant se li va afegir 6

volums d'acetona freda, i les proteïnes es van deixar precipitar durant tota la nit a -20°C . A l'endemà es van centrifugar (10,500 g, 10 min), i el sediment resultant es va assecar a l'*speedvac* per eliminar les restes d'acetona/HCl.

La Fig.III.D.4 mostra el resultat. Les gònades de color blanc són gònades que presenten majoritàriament histones, i unes proteïnes de migració electroforètica superior que es troben de forma minoritària. Aquestes darreres proteïnes es troben en major quantitat en les gònades grisses, i en nombre de 3, gònades on la proporció d'histones ha disminuït amb respecte les primeres. I per últim, en les gònades de color negre obtenim majoritàriament una proteïna que migra en la zona de les 3 proteïnes d'elevada mobilitat electroforètica (en concret, de la proteïna que migra més dintre de les tres), i les histones desapareixen gairebé al complet.

Fig.III.D.4. Proteïnes nuclears de *Gasterosteus aculeatus*, provinents de gònades blanques (a), grisses (b) i negres (c). H- histones; P- protamina. GPAU 2.5M urea/25% acrilamida.



Aquests resultats ja ens els hem trobat en altres ocasions quan hem treballat amb gònades en diferent estat de maduresa (v. III.B.1.b). Les gònades blanques, amb presència d'histones, fonamentalment equivaldrien a l'estat més immadur, mentre que les negres, amb gairebé absència d'histones i presència d'una proteïna de mobilitat electroforètica major, correspondria a la gònada madura, després d'haver passat per un estadi intermedi (gònades grisses), estat en el que es donaria el pas d'histones cap a protamines. Com a conclusió es pot dir que la gònada madura presenta una única protamina que condensa el nucli espermàtic.

Tal i com es pot apreciar a la Fig.III.D.4, en la regió de migració de la protamina, en les gònades grisses trobem 3 bandes que donen lloc majoritàriament a una sola banda en la gònada madura (negra). Això ens podria fer pensar en la possibilitat d'existència de formes precursors que donarien lloc a la protamina final, o bé l'existència de microheterogeneïtat per la proteïna. Una altra possibilitat a tenir en compte seria la de que la proteïna es pogués trobar en diferents estats de fosforilació, i d'aquí les bandes tan properes entre elles (ja que tindrien una diferència entre elles de l'ordre de la càrrega d'un fosfat).

Per conèixer la procedència de les tres bandes que donaven lloc a majoritàriament una banda, es va procedir a la purificació de les mateixes, i a detectar la possible fosforilació.

Per separar les tres proteïnes de les histones presents en les gònades grisses es van utilitzar tècniques d'HPLC. Tant l'obtenció, purificació com posterior caracterització de les SNBP's (proteïnes bàsiques nuclears espermàtiques) dels Gasterosteiformes s'ha realitzat al laboratori del Dr. Joan Ausió, al Dept. de Bioquímica i Microbiologia de la Universitat de Victoria, Canadà.

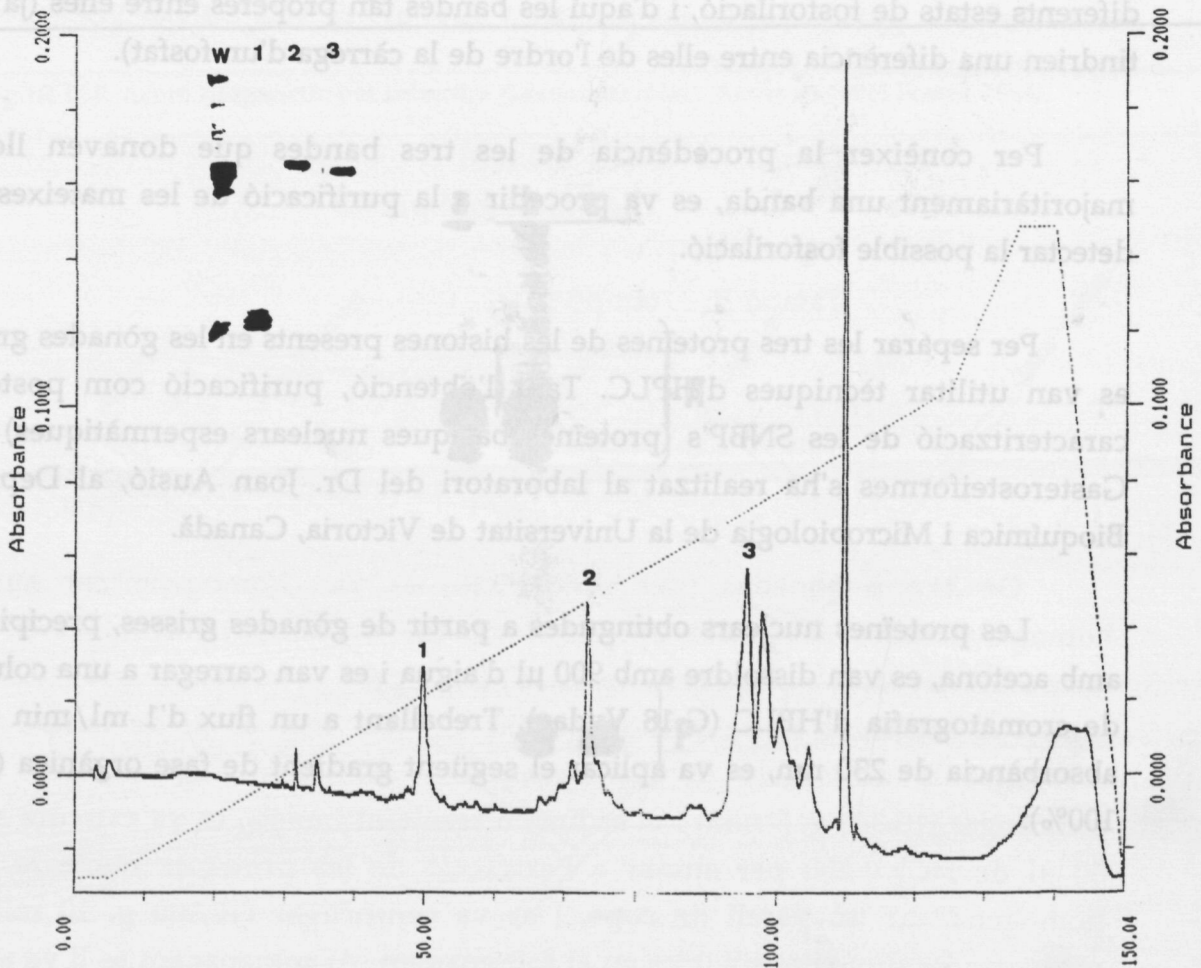
Les proteïnes nuclears obtingudes a partir de gònades grisses, precipitades amb acetona, es van dissoldre amb 900 µl d'aigua i es van carregar a una columna de cromatografia d'HPLC (C-18 Vydac). Treballant a un flux d'1 ml/min i una absorbància de 230 nm, es va aplicar el següent gradient de fase orgànica (ACN 100%):

0-0%	0-5'
0-60%	5'-15'
60-80%	15'-25'
80-80%	25'-30'
80-0%	30'-40'

ésent l'agent contra-ió TFA 0.1%.

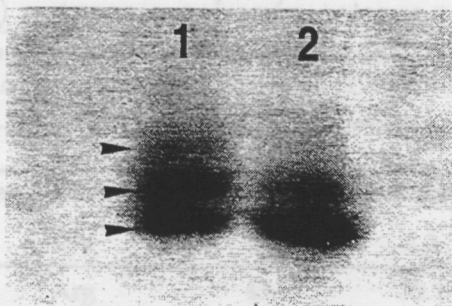
Totes tres proteïnes van ser eluïdes en un mateix pic (al voltant del 20% d'ACN), Fig.III.D.5, quedant separades de les histones (que surten al voltant del 40% d'ACN).

Fig.III.D.5. HPLC de les proteïnes nuclears de *G. aculeatus* provinents de gònades immadures (grisses). Perfil cromatogràfic, i GPAU 2.5M urea/25% acrilamida de les fraccions obtingudes. w-proteïnes totals.



Un cop vàrem tenir totes tres proteïnes juntes però pures, optàrem per considerar la tercera hipòtesi proposada: per veure si totes tres proteïnes eren diferents formes fosforilades de la mateixa proteïna, la fracció purificada que les contenia va ser incubada amb fosfatasa alcalina: 1 µg de la barreja es va incubar amb 1 unitat de fosfatasa alcalina (en presència de 5 µl de Cl_2Mg 0.2 mM i Cl_2Zn 0.2 mM en TrisHCl 100 mM pH 8.0), a 37°C durant 1h. Al mateix temps es va fer un control treballant amb les mateixes condicions però sense afegir l'enzim. La reacció es va aturar afegint tampó de mostres per un gel d'electroforèsi. El resultat de la incubació es va veure en un GPAU, Fig.III.D.6.

Fig.III.D.6. Incubació de les protamines de *G. aculeatus* provinents de gònades immadures (grisses) amb fosfatasa alcalina. 1- Control; 2- Incubació amb l'enzim. GPAU 2.5M urea/25% acrilamida.



Com es pot veure, les tres bandes no incubades amb fosfatasa alcalina (control) passen a ser gairebé una sola banda en la fracció incubada (cal remarcar que la reacció de la fosfatasa alcalina mai es dona al 100%), el que està indicant que les tres proteïnes són diferents formes fosforilades de la protamina final trobada en la gònada madura, ja que la banda de major mobilitat electroforètica d'entre aquestes tres és la corresponent a la proteïna purificada de gònades madures. En els GPAU les protamines presenten major migració conforme més càrregues positives presenten, de manera que d'entre les 3 proteïnes, la que migra més és la que menys fosfats (PO_4^{2-}) presenta.

El que tots aquests resultats ens estan dient és que al llarg de la maduració gonadal, en *G. aculeatus* hi ha un reemplaçament de les histones per la protamina, que en un principi està fosforilada i que a mida que la gònada

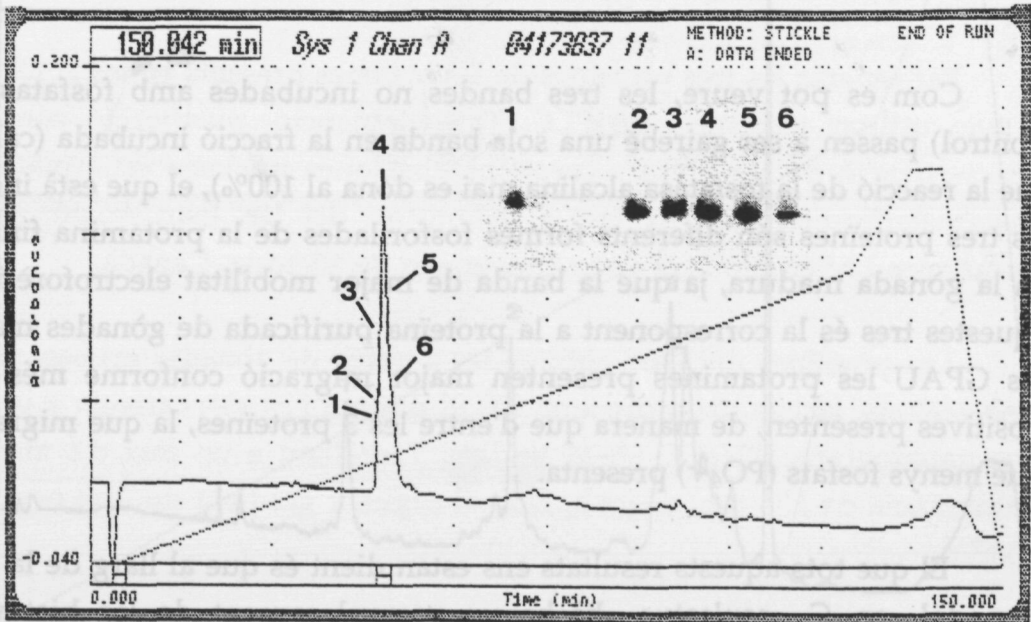
madura, la protamina es va defosforilant per donar la forma final defosforilada, present en l'espermatozoide. Aquest és un cas que ja s'ha descrit en altres espècies (Saperas et al., 1994), i altres exemples els tenim tot al llarg d'aquest treball.

ii. Caracterització de la protamina nuclear

Un cop es va saber que el nucli de l'espermatozoide presentava una única protamina, el següent pas va ser el de caracteritzar-la.

Es van obtenir les proteïnes nuclears a partir de gònades madures en quantitat suficient com per purificar la protamina per HPLC. Treballant amb les mateixes condicions que per les protamines de les gònades immadures, la protamina de *G. aculeatus* es va purificar en un sol pic, quedant ben separada de les restes d'histones que aquestes gònades presenten (restes molt minoritàries), Fig.III.D.7.

Fig.III.D.7. Purificació per HPLC de la protamina de *G. aculeatus*. Perfil cromatogràfic, i GPAU 2.5M urea/15% acrilamida.



El primer que es va fer un cop es va tenir la protamina pura va ser una **anàlisi d'aminoàcids**, Taula III.D.I.a. Els resultats mostren que és una proteïna molt bàsica (amb un elevat contingut en Arg), i una elevada variabilitat aminoacídica. Presenta els dos tipus d'aminoàcids fosforilables (Ser i Thr), residus hidrofòbics (com l'Ala, Val, Leu i Ile, entre d'altres), i polars (Gly i Tyr). Segons les anàlisi d'aminoàcids de Lemke et al. (1999), aquesta protamina presenta 1 Met; en els nostres anàlisis potser la metionina s'ha degradat degut al procés d'hidròlisi àcida (amb el HCl 6N) al que la proteïna ha estat sotmesa. Cal remarcar que la coincidència entre els nostres resultats i els obtinguts per Lemke et al. (1999) no és molt bona, i això és per la metodologia utilitzada per aquesta autors on, un cop tenen la protamina separada en el gel d'electroforèsi d'acrilamida, retallen la banda que conté la proteïna, i tot plegat ho hidrolitzen, de manera que això genera artefactes, i d'aquí la no similitud amb els nostres resultats.

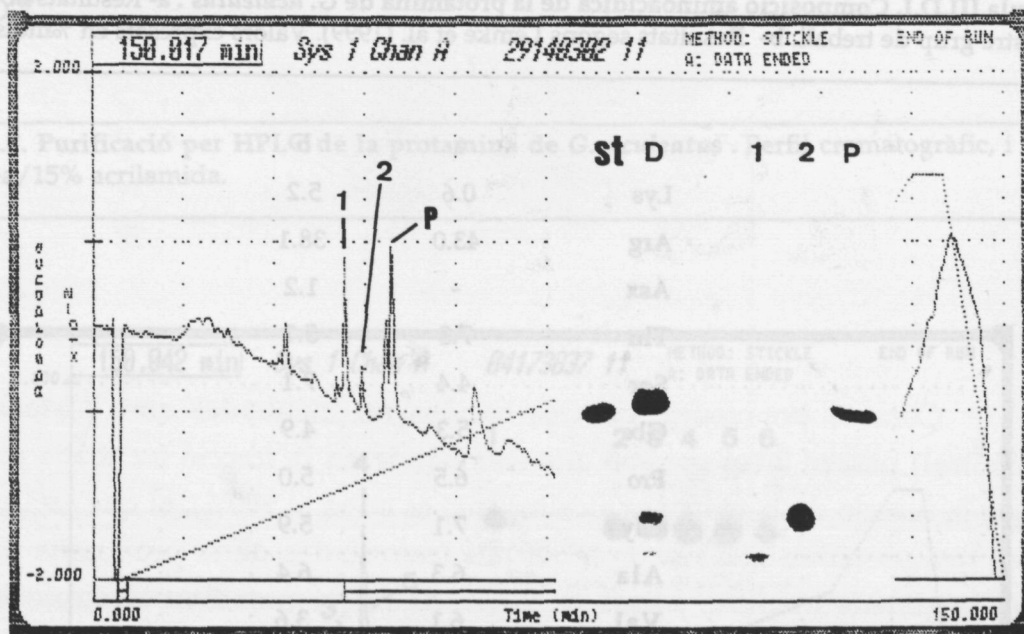
Taula III.D.I. Composició aminoacídica de la protamina de *G. aculeatus* . a- Resultats obtinguts en el nostre grup de treball. b- Resultats segons Lemke et al. (1999). Valors expressats en %mols.

	a	b
Lys	0.6	5.2
Arg	43.0	38.1
Asx	-	1.2
Thr	7.3	5.1
Ser	4.4	7.1
Glx	5.3	4.9
Pro	6.5	5.0
Gly	7.1	5.9
Ala	6.3	6.4
Val	6.1	3.6
Met	traces	1.3
Ile	3.7	2.0
Leu	5.2	4.1
Tyr	2.5	2.4
Phe	2.2	1.3

Per confirmar la presència de la metionina en la protamina de *G. aculeatus*, la proteïna es va digerir amb bromur de cianògen (BrCN), compost químic que provoca un trencament específic per aquest aminoàcid, de manera que si aquesta hi era present, la proteïna quedaria tallada en dos.

Es van digerir 150 µg de protamina amb 50 µg de BrCN (en presència d'HCl 0.1N) durant 2h, a temperatura ambient i a la foscor. El producte de la digestió es va aplicar a una columna d'HPLC per procedir a la separació dels pèptids generats. Tal i com s'esperava es van obtenir 2 pèptids, els quals es van separar molt bé, Fig.III.D.8. Aquest resultats confirmaven l'existència de la metionina.

Fig.III.D.8. Digestió de la protamina de *G. aculeatus* amb BrCN. Perfil cromatogràfic del resultat de la digestió carregada en una columna d'HPLC, i GPAU 2.5M urea/15% acrilamida de les fraccions obtingudes. st- estàndard protamina; D- digestió; P- protamina.



Mitjançant degradació automàtica d'Edman es va arribar a obtenir la seqüència sencera de la protamina de *G. aculeatus*. La Fig.III.D.9 mostra l'estructura primària de la protamina. És una proteïna de 47 residus aminoacídics, on el 45% de la molècula està formada per només Arg, les quals es troben generalment organitzades en grups de 2 i 4 residus; els residus fosforilables (Ser i Thr) es troben distribuïts al llarg de la molècula sense presentar una polaritat

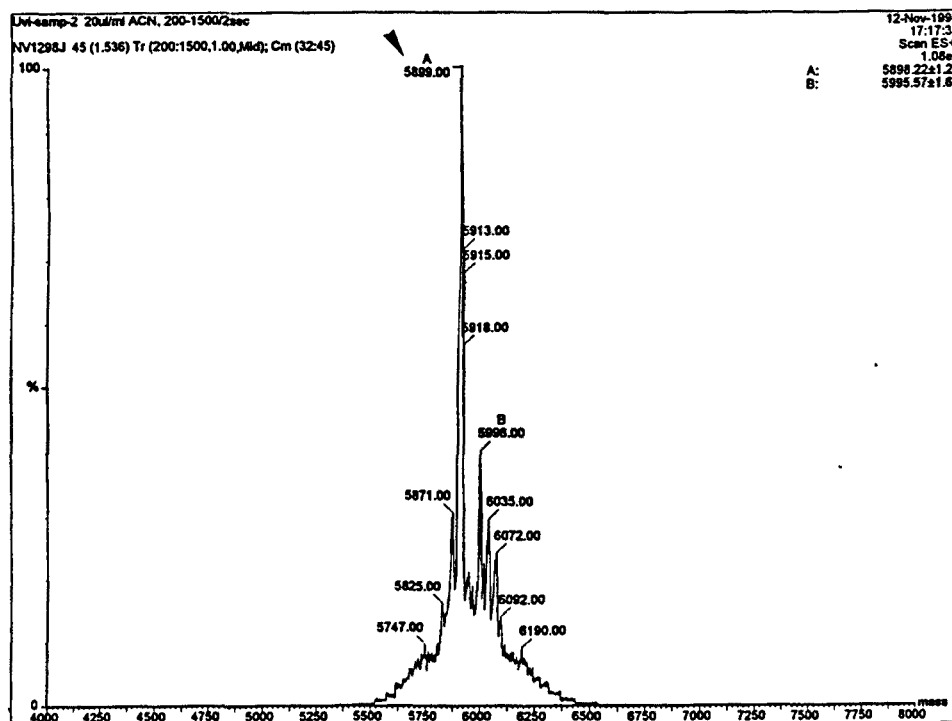
determinada. El motiu RRRRVI es repeteix tres cops: en la posició 24-29, 30-35, i en la 12-17 (on la Ile canvia per una Ala, però aquest últim continua éssent un aminoàcid hidrofòbic).

Fig.III.D.9. Estructura primària de la protamina de *G. aculeatus* .

5 10 15 20 25 30 35 40 45
G.a PRRTGSRYPARRRRVARRTPMLRRRRVIRRRRVIRRGAGFQQTSRR

Aplicant tècniques d'espectrometria de masses es va observar que la protamina de *G. aculeatus* tenia un pes molecular de 5,899 Da, Fig.III.D.10, massa que coincideix amb el pes molecular calculat a partir de la seqüència (5,899.02 Da).

Fig.III.D.10. Espectrometria de masses de la protamina de *G. aculeatus* . La protamina presenta un PM de 5,899 Da.

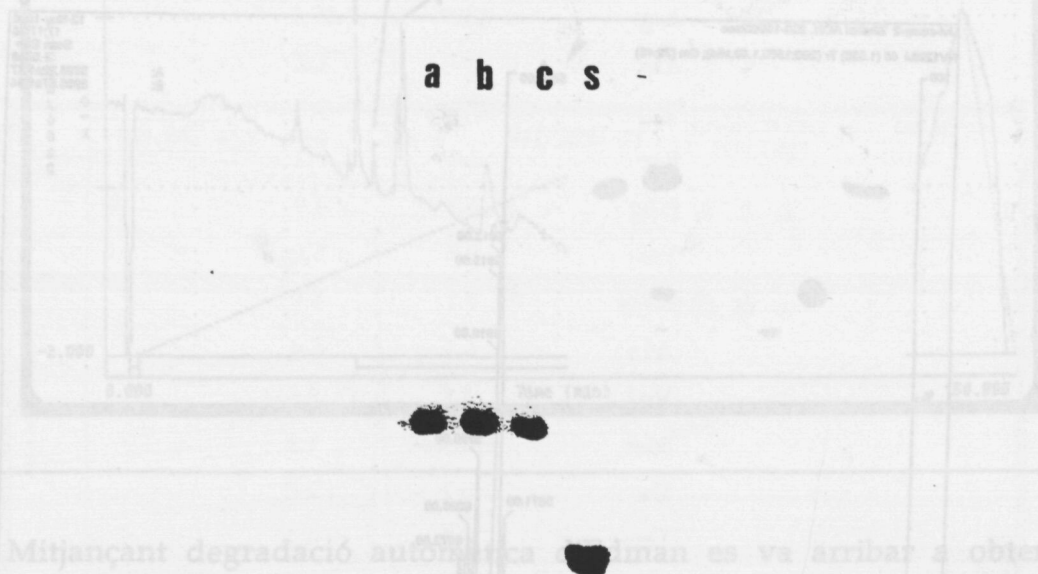


iii. Comparació entre diferents poblacions de *G. aculeatus*

Un cop coneguda la composició proteica nuclear (protamina) de l'espermatozoide de *G. aculeatus*, el següent pas va ser comparar la mateixa espècie en diferents poblacions. Es van escollir una espècie **limnètica** i una **bènica** per una banda, i una espècie que en contes de viure sempre en llacs, viu en el mar i va al llac només a passar els ous, espècie anomenada **anòdroma** (*Gasterosteus aculeatus trachurus*).

Es va fer una obtenció de les proteïnes nuclears de gònades madures pertanyents a totes tres espècies seguint el procediment explicat en l'apartat IV.B.1.1. Com es pot apreciar a la Fig.III.D.11, no hi ha diferència en mobilitat electroforètica entre les protamines de *G. aculeatus* limnètic, bènica i *G. a. trachurus* anòdrom.

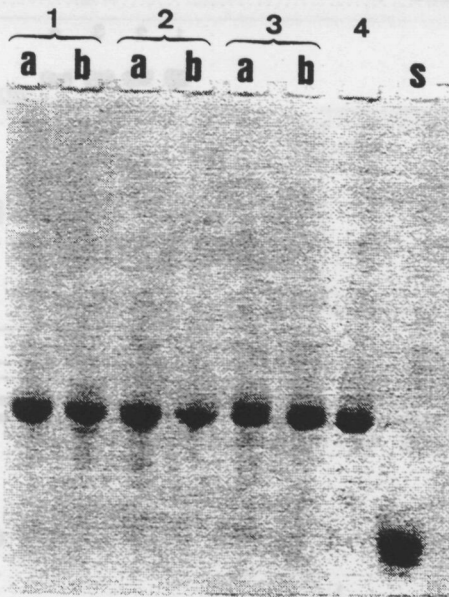
Fig.III.D.11. Proteïnes nuclears provinents de gònades madures de *G. aculeatus* limètic (a), *G. aculeatus* bènica (b), i *G. aculeatus trachurus* anòdrom (c). s- estàndard de salmina. GPAU 2.5M urea/15% acrilamida.



Mitjançant degradació autolítica de salmó es va arribar a obtenir la seqüència sencera de la protamina de *G. aculeatus*. La Fig.III.D.9 mostra l'estructura primària de la protamina. És una proteïna de 47 residus aminoacídics, on el 45% de la molècula està formada per només Arg, les quals es troben generalment organitzades en grups de 2 i 4 residus; els residus fosforilables (Ser i Thr) es troben distribuïts al llarg de la molècula sense presentar una polaritat

Es van fer diverses obtencions de proteïnes nuclears d'espècies limnètiques i bèniques provinents de diferents llacs de la Columbia Britànica (*Priest lake*, *Paxton lake* i *Enos lake*), i el resultat va ser el mateix, no hi havia diferència a nivell de mobilitat electroforètica entre les diferents protamines (Fig.III.D.12).

Fig.III.D.12. Comparació entre les proteïnes nuclears de diferents poblacions de *G. aculeatus*. 1- *G. aculeatus* Priest lake. 2- *G. aculeatus* Paxton lake. 3- *G. aculeatus* Enos lake. 4- *G. aculeatus* trachurus (anòndrom). s- estàndard de salmina. a- limnètic; b- bènica. GPAU 2.5M urea/15% acrilamida.

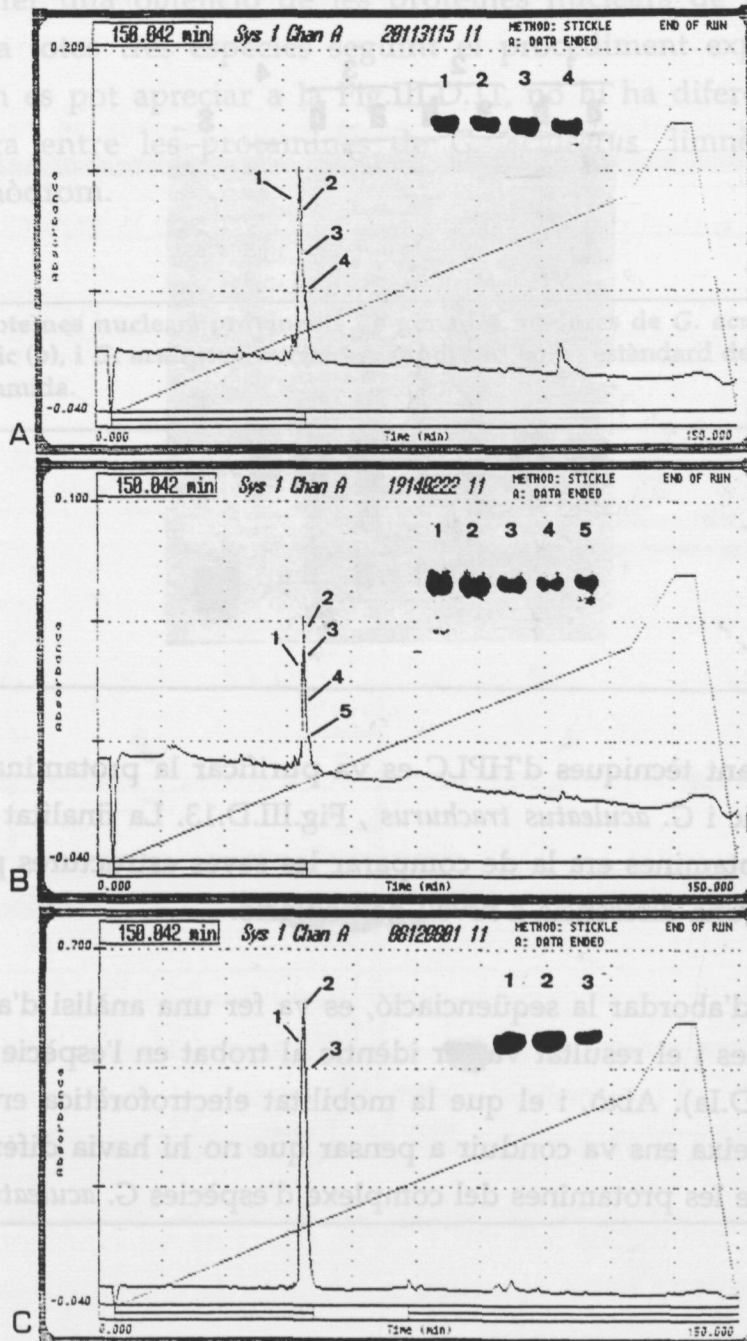


Mitjançant tècniques d'HPLC es va purificar la protamina de *G. aculeatus* limnètic, bènica i *G. aculeatus* trachurus, Fig.III.D.13. La finalitat de la purificació d'aquestes protamines era la de comparar les seves estructures primàries i veure si hi havia alguna diferència a nivell de població.

Abans d'abordar la seqüenciació, es va fer una anàlisi d'aminoàcids de les tres protamines i el resultat va ser idèntic al trobat en l'espècie inicial estudiada (v. Taula III.D.Ia). Això, i el que la mobilitat electroforètica entre totes tres fós també la mateixa ens va conduir a pensar que no hi havia diferència a nivell de població entre les protamines del complexe d'espècies *G. aculeatus*.

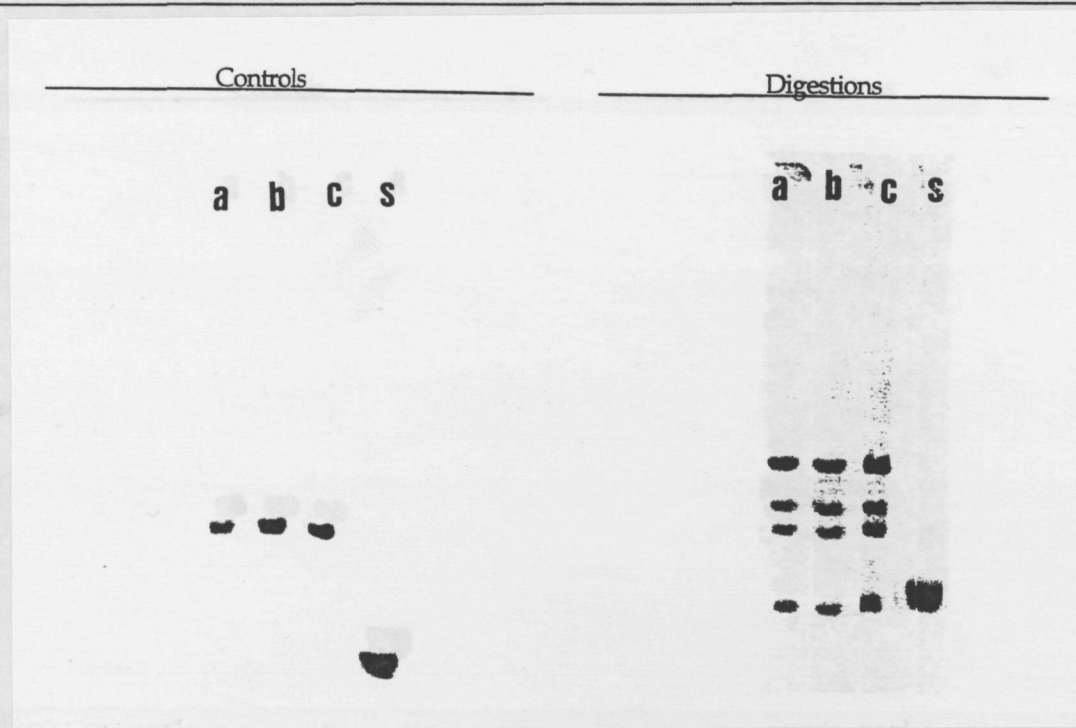
Per confirmar el que pensàvem, es va decidir fer un experiment a nivell analític. Les protamines de *G. aculeatus* limnètic, bènctic i anòdrom (G.a.t) es van digerir amb la proteïnasa d'*Astacus fluviatilis* per veure si la digestió donava un patró peptídic similar o diferent entre les diferents protamines, el que ens diria si les proteïnes eren iguals o no.

Fig.III.D.13. Purificació de les protamines de diferents poblacions del complex d'espècies *G. aculeatus*. Perfil cromatogràfic de l'HPLC i el respectiu GPAU 2.5M urea/15% acrilamida de les proteïnes nuclears de G.a limnètic (A), G.a bènctic (B) i G.a.t anòdrom (C).



Cada protamina (2 µg) es va incubar amb l'enzim amb una relació d'enzim:substrat 1:12,000 (en presència de bicarbonat amònic 0.1M pH 8.0). Es va fer una incubació de 5 min a temperatura ambient, i la reacció es va aturar acidificant el medi, afegint tampó de mostres per un GPAU, de manera que la digestió es va córrer en un gel d'electroforèsi. Paral·lelament es va fer un control de cada digestió sense afegir l'enzim. El resultat es pot veure a la Fig.III.D.14: totes tres protamines donen el mateix patró peptídic.

Fig.III.D.14. Digestió de les protamines de *G.a limnètic* (a), *G.a bèntic* (b) i *G.a.t anòdrom* (c) amb la proteïnasa d'*Astacus fluviatilis*. s- estàndard de salmina. GPAU 2.5M urea/15% acrilamida.



Tots aquests resultats ens indicaven que les tres protamines eren iguals. Es va fer la seqüència de la protamina de *G. aculeatus trachurus* i va resultar ser la mateixa seqüència que la de *G. aculeatus* (Fig.III.D.9), i també el mateix pes molecular es va obtenir quan es van aplicar tècniques d'espectrometria de masses (no mostrat).

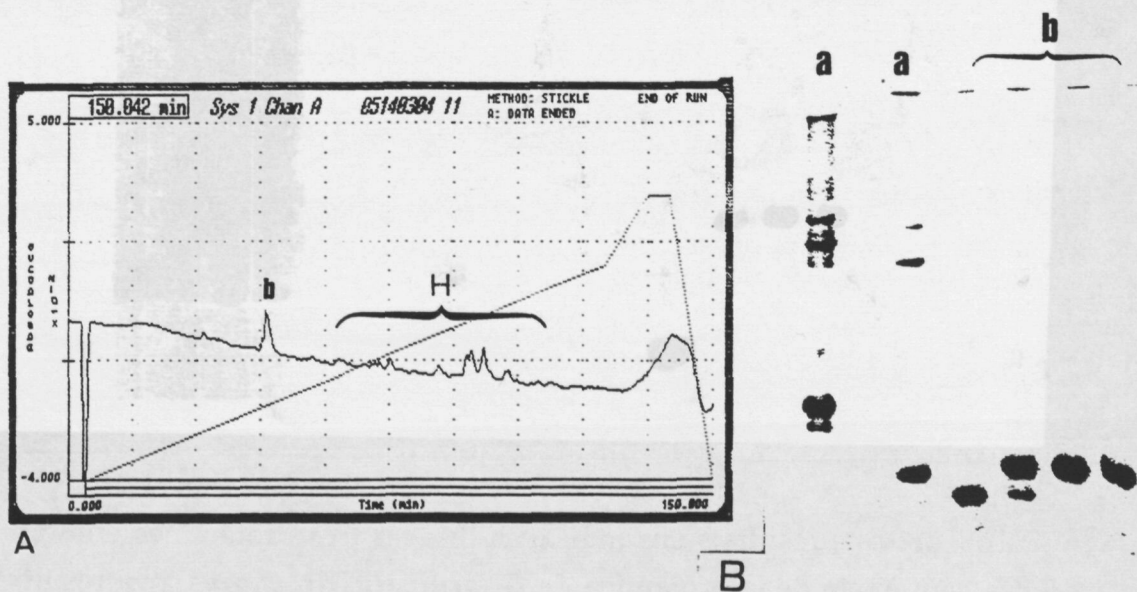
Així doncs, es va arribar a la conclusió de que, malgrat la diversitat anatòmica i genètica trobada en el complex d'espècies *G. aculeatus*, no sembla que

a nivell de protamina aquesta espècie hagi sofert variacions entre les diferents poblacions estudiades.

b. *Gasterosteus wheatlandi*

S'han obtingut les proteïnes nuclears de gònades madures de l'espècie *Gasterosteus wheatlandi* seguint la mateixa metodologia que la emprada per *G. aculeatus* (v. III.D.2.a.i). A partir d'elles i mitjançant tècniques d'HPLC es va purificar la protamina (ja que degut a que treballem amb gònades, sempre hi ha restes d'histones provinents de cèl.lules que es troben en diferents estadis de l'espermatogènesi), Fig.III.D.15.

Fig.III.D.15. Purificació de la protamina de *G. wheatlandi* mitjançant tècniques d'HPLC. A- Perfil cromatogràfic. B- GPAU 2.5M urea/15% acrilamida: a- proteïnes nuclears totals; b- protamina; H- histones.



Un cop purificada la protamina, es va **seqüenciar** completament, sense necessitat de ser tallada. Tal i com es pot veure a la Fig.III.D.16, és una proteïna que conté 48 residus aminoacídics (un més que la protamina de *G. aculeatus*), dels quals el 46% són aminoàcids bàsics (Arg sobretot, i li continuen la Lys i His), on les Arg també es troben organitzades en grups separats per aminoàcids no bàsics. Els residus fosforilables (Ser i Thr) es troben distribuïts al llarg de la

molècula, al igual com passava en la protamina pertanyent al complex d'espècies *Gasterosteus aculeatus*. En un proper apartat es compara la protamina de *G. wheatlandi* amb la de *G. aculeatus*.

Fig.III.D.16. Seqüència de la protamina de *G. wheatlandi*.

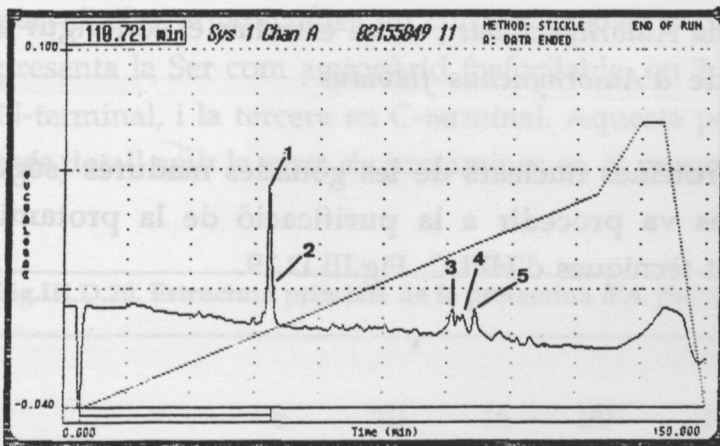
G.w PRRVASRHGPARRRRRATRRTPIVRRRRVLRKRKRVLRSSVGVQQPTTRR



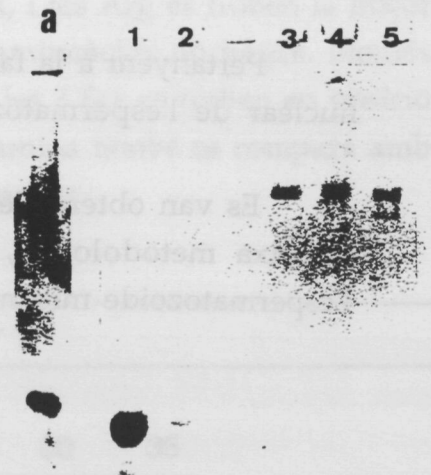
c. Pungitius pungitius

Un altre gènere dintre del subordre *Gasterosteoides* que vàrem estudiar va ser *Pungitius pungitius*. De la mateixa manera que en els casos anteriors, es van obtenir les proteïnes nuclears a partir de gònades madures, i a partir d'elles es va purificar la protamina nuclear, Fig.III.D.17.

Fig.III.D.17. Purificació de la protamina de *Pungitius pungitius* mitjançant tècniques d'HPLC. A- Perfil cromatogràfic. B- GPAU 2.5M urea/15% acrilamida: a-proteïnes nuclears totals.



A



B

Un cop es va tenir la protamina pura, es va obtenir la **seqüència** directa. La Fig.III.D.18 mostra l'estructura primària de la molècula. És una proteïna de 40 residus aminoacídics, molt bàsica, on el 50% d'ella està formada fonamentalment per Arg. Tal i com hem vist per les protamines de *G. aculeatus* i *G. wheatlandi*, la protamina de *P. pungitius* comença per una Pro a la que li segueixen 2 Arg. També presenta els dos tipus d'aminoàcids fosforilables, 3 Tyr repartides al llarg de la molècula, i 4 Ser, de les quals 3 es troben en l'extrem N-terminal (en els primers 10 residus), i la quarta en posició final (C-terminal). Les Arg es troben majoritàriament formant part de *clusters* separats per aminoàcids no bàsics. Una comparació més extensa d'aquesta protamina respecte la resta de protamines del subordre *Gasterosteoides* es fa a l'apartat següent.

Fig.III.D.18. Estructura primària de la protamina de *P. pungitius*.

	5	10	15	20	25	30	35	40	
P.p	PRRSASRVSIRRRRTARRTPMLPRRRRVFRRRRTIRPKSRR								

d. *Aulorhynchus flavidus*

Pertanyent a la família *Aulorhynchidae*, es va estudiar el contingut proteic nuclear de l'espermatozoide d'*Aulorhynchus flavidus*.

Es van obtenir les proteïnes nuclears de les gònades madures (seguint la mateixa metodologia), i es va procedir a la purificació de la protamina de l'espermatozoide mitjançant tècniques d'HPLC, Fig.III.D.19.