

TESI DOCTORAL

Núria Saperas Plana

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

Desembre, 1992

III. Resultats

El bloc de resultats s'ha estructurat en una sèrie de capítols dedicats als diferents grups d'organismes estudiats. Així, als dos primers grans apartats d'aquest bloc es mostren els patrons bàsics de PEB presents a alguns grups de procordats. Concretament, al primer d'ells s'estudiaran les PEB dels tunicats ascidiacis i taliacis, i al segon les dels cefalocordats (amfioxos), grups del tot desconeguts fins al moment sota aquest punt de vista.

Als següents capítols s'estudien diferents organismes pertanyents ja al grup dels cordats. En primer lloc es presenten els resultats obtinguts fruit de la caracterització de les PEB presents als agnats, a continuació les dels condrictis holocèfals i, finalment, dins dels peixos ossis, s'han estudiat les PEB d'un bon nombre d'espècies pertanyents als teleostis. De fet, és sobre aquest últim grup on s'ha basat, principalment, el desenvolupament del present treball.

Per facilitar el seguiment dels capítols següents, a la figura III-1 es presenta, de forma esquemàtica, la situació dels diferents grups que ens afecten dins de l'escala zoològica.

És important destacar que el treball s'ha realitzat sobre un considerable número d'espècies distribuïdes en diferents grups zoològics. En alguns casos, com per exemple els teleostis o els tunicats, ens ha estat possible obtenir forces espècies d'un mateix grup mentre que en altres casos ens hem hagut de conformar amb una sola espècie (cas dels cefalocordats, per exemple). No obstant, no s'ha de perdre de vista la importància de les diferents espècies *per se*; així, per exemple, mentre que no seria justificable l'estudi d'una sola espècie de teleosti per definir el patró d'un caràcter en tots els teleostis, sí que ho pot ser l'estudi d'un sol cefalocordat degut al molt petit nombre d'espècies que componen aquest grup (unes 20 espècies, Nelson 1984).

Adicionalment, s'ha de considerar la dificultat que suposa el treballar amb determinades espècies; així, seguint amb el mateix exemple, en general és molt més difícil d'obtenir i manipular un cefalocordat que un teleosti.

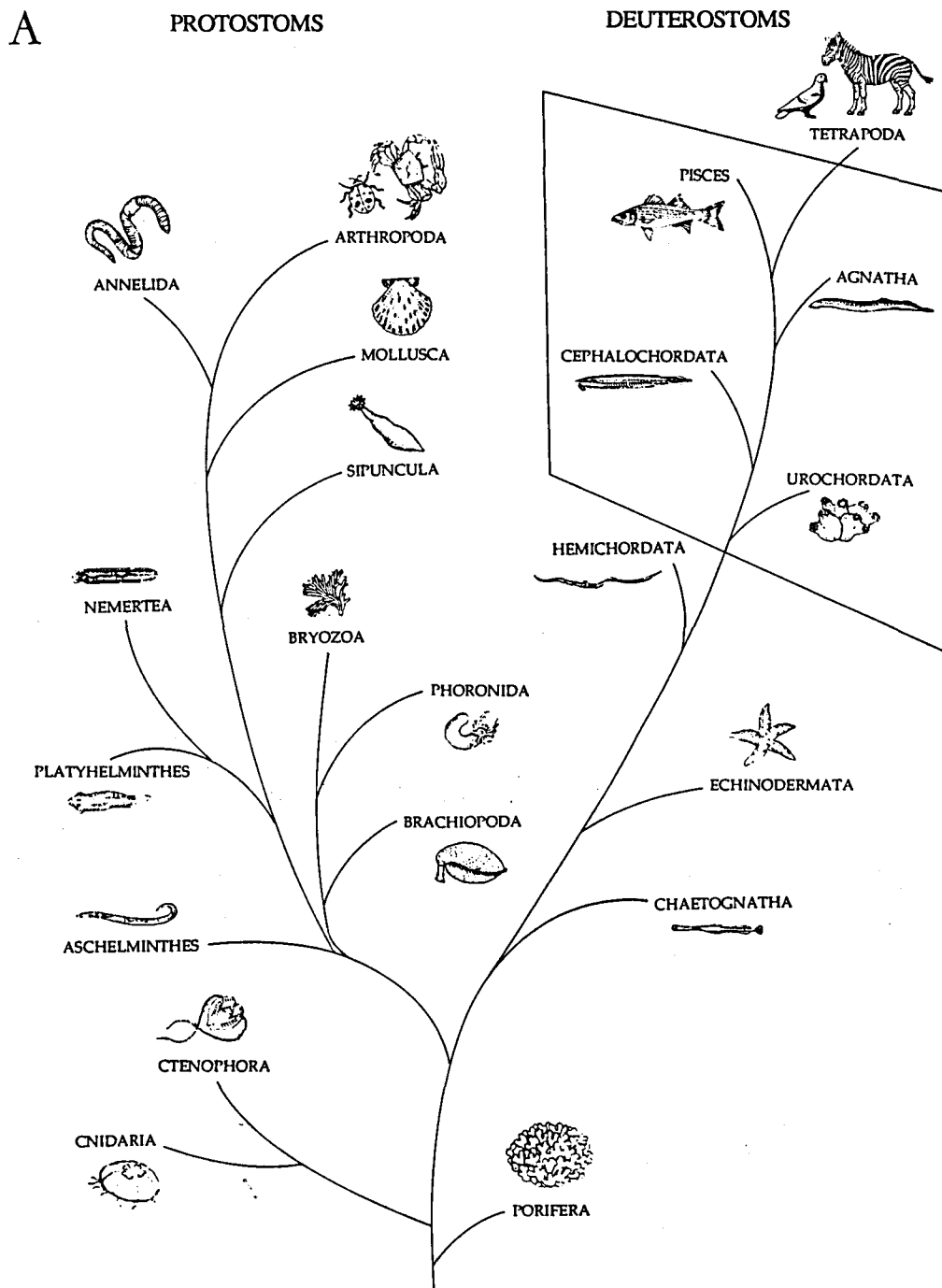
Un altre punt que cal aclarir, abans d'expressar els resultats obtinguts, és que no sempre ha estat possible reunir quantitats suficients de mostra com per realitzar estudis en detall. De fet, sovint no és gens fàcil trobar les espècies

en època de maduresa sexual, factor que suposa, d'entrada, una limitació important en la consecució de mostres. Per tant, quan ha estat necessari només s'han utilitzat alguns dels criteris més immediats per a identificar la presència d'una protamina típica, que són:

- a) No ser extraïble amb AA 35% (Subirana et al., 1973).
- b) Ser extraïble amb HCl 0.25-0.4 N (Subirana et al, 1973).
- c) Mobilitat electroforètica elevada (Subirana et al, 1973).
- d) Insolubilitat en tampons que contenen SDS i, per tant, no detectables en gels que contenen aquest detergent (Chiva et al., 1987).

Sempre que ha estat possible, s'ha completat la caracterització de les proteïnes en qüestió amb una anàlisi composicional i, en algunes ocasions, inclús amb la presentació de la seva seqüència total o parcial.

Figura III-1. A. Representació de la situació a l'escala zoològica dels grans grups estudiats en aquest treball (enquadrats). Adaptat de Willmer (1990) i Nelson (1984). B. Classificació dels grups estudiats en aquest treball (en negreta). L'esquema representa, a grans trets, les categories més altes dins dels grups de deuteròstoms. Adaptat de Nelson (1984) i Parker et al. (1987).



TIPUS	SUBTIPUS	SUPERCLASSE	GRAU	CLASSE	SUBCLASSE	(...)	SUBDIVISIÓ
Echinodermata							
Chordata	Hemichordata						
	Urochordata			Asciacea			
				Thaliacea			
				Larvacea			
	Cephalochordata						
	Vertebrata	Agnatha		Myxini			
				Cephalaspidomorphi			
		Gnathostomata	Pisces	Chondrichthyes	Holocephali		
					Elasmobranchii		
				Osteichthyes		(...)	Halecomorphi
							Teleostei
			Tetrapoda				

B

1. Proteïnes espermàtiques bàsiques als tunicats

1.1. Justificació

Malgrat que l'objectiu principal d'aquest treball és l'estudi de la distribució i característiques de les proteïnes espermàtiques bàsiques (PEB) als peixos, les grans diferències i particularitats d'aquestes en l'esmentat grup (v. capítol 5), ens va fer plantejar la necessitat d'estudiar aquestes proteïnes en grups filogenèticament anteriors, esperant que els resultats aportessin una nova llum al problema de l'origen i distribució d'aquestes molècules als vertebrats.

Entre els deuteròstoms (figura III-1), el grup més proper del qual s'havien estudiat les PEB eren els equinoderms (Subirana i Palau, 1968; Vanhoutte-Durand et al., 1977; Strickland, M. et al., 1987; Brand et al., 1979; etc.; revisat per von Holt et al., 1984). En aquest grup es presenten histones somàtiques al nucli espermàtic (v. també apartat I-2.1.), retenint-se l'organització nucleosòmica (Cornudella i Rocha, 1979; Keichline i Wassarman, 1979). En algunes espècies la condensació és assolida per variants de l'H2B i H1 específiques de l'esperma (Subirana, 1970; Zalenskaya i Zalensky, 1980; Zalenskaya et al., 1980); en altres espècies poden aparèixer algunes proteïnes minoritàries més similars aparentment a les protamines dels vertebrats, com és el cas de la Φ_0 d'*Holothuria tubulosa* (Subirana, 1970). No obstant, en cap cas s'ha descrit l'aparició de molècules amb les característiques típiques de les protamines dels vertebrats que substitueixin les histones al nucli de l'espermatozoide, com es dona als vertebrats.

Aquest fet justifica l'interès de l'estudi d'un grup situat entre aquests dos. Els tunicats o urocordats, per la seva interessant posició filogenètica (pertanyen, igual que els vertebrats, al grup dels cordats -figura III-1,B-) i disponibilitat de material, van ser un dels grups escollits amb aquesta finalitat. Concretament, s'han estudiat extensivament dues espècies del

gènere *Styela*, *S. montereyensis* i *S. plicata* ,(Ordre Pleurogona, Classe Ascidiacea), així com 7 espècies més pertanyents també a la classe Ascidiacea i una espècie pertanyent a la classe Thaliacea.

1.2. Estudi de les PEB d'*Styela montereyensis*

Les gònades dels diferents individus van ser disseccionades i es va separar la part femenina de la masculina (es tracta d'espècies hermafrodites). Aquesta última va ser tallada amb estisores en un tampó de sacarosa 0.25 M / CaCl₂ 5 mM / Tris-HCl 10 mM pH 7.0, contenint clorur de benzamidina 50 mM com a inhibidor proteolític. D'aquesta manera s'aconsegua que s'anés alliberant el contingut de la gònada. El conjunt es va filtrar per eliminar les restes del teixit i es va procedir a l'obtenció dels nuclis espermàtics tal i com s'explica a la figura II-1.

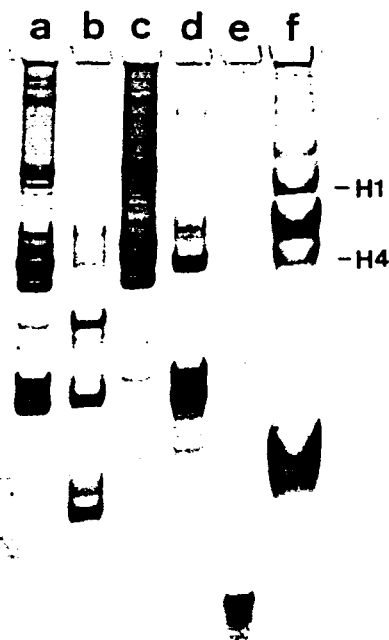
Figura III-2. Espermatozoides vius d'*Styela montereyensis* observats amb microscopi de contrast de fases (x4.000). (Fotografia cedida per Ellen Rosenberg).



Els controls al microscopi de contrast de fases van posar en evidència la riquesa en espermatozoides de la mostra, així com la morfologia d'aquests. Com s'aprecia a la figura III-2, l'espermatozoide presenta un cap molt elongat, d'uns 5 μm de llargada, i un flagel de 20 a 30 μm . Aquesta morfologia sembla correspondre's amb l'espermatozoide de "tipus ascidià" delineat per Franzén (1956, 1976, 1983).

Pel que fa a les proteïnes, aquestes van ser solubilitzades a partir dels nuclis per extraccions amb àcids diluïts (v. II-2.3.). El contingut proteïc global va ser extret amb HCl 0.4 N. Addicionalment, amb una alíquota diferent es van realitzar una sèrie d'extraccions seqüencials amb PCA 5%, AA35% i HCl 0.4 N. El material restant després de l'extracció global amb HCl 0.4 N va ser reduït i alquilat (v. II-2.6.2.1., mètode 1) i a continuació re-extret amb HCl 0.4 N per determinar la presència de proteïnes queratinoses. No obstant, no es va obtenir la solubilització de noves proteïnes per aquest procediment.

Figura III-3. Electroforesi en gel d'acrilamida/acètic/urea de les proteïnes espermàtiques bàsiques d'*Styela montereyensis*. a) Dotació global, extreta amb HCl 0.4 N; b) Extracte amb PCA 5%; c) Extracte amb AA35% després del PCA; d) Extracte amb HCl 0.4 N després de l'AA; e) Estàndard de protamina de salmó (salmina); f) Estàndard d'histones i protamina d'*Hydrolagus colliei*.



Les proteïnes extretes van ser precipitades amb acetona, rentades i analitzades composicionalment (taula III-1) i per electroforesi en gels de poliacrilamida/acètic/urea (figura III-3).

Taula III-1. Composició en aminoàcids (% mols) de les PEB del tunicat *Styela montereyensis*.

Aminoàcid	PCA 5%	AA35% ¹	HCl 0.4 N ²	Histones del cor nucleosòmic (rang) ³
Lys	20.3	10.6	9.4	9.7 - 15.6
His	1.0	2.4	0.8	1.5 - 2.4
Arg	18.6	11.6	40.6	8.5 - 13.6
Asp	3.8	7.5	2.6	4.3 - 7.3
Thr	5.3	4.1	5.2	2.5 - 7.2
Ser ⁴	6.5	3.6	4.6	2.2 - 7.1
Glu	3.7	9.3	1.8	6.4 - 12.0
Pro	8.5	3.6	2.6	1.5 - 4.3
Gly	12.3	10.8	14.1	6.3 - 15.4
Ala	10.0	9.4	7.3	7.8 - 16.4
Cys	--	--	--	0.0 - 0.4
Val	2.8	7.0	2.0	4.7 - 8.9
Met	0.6	1.4	1.8	0.8 - 2.4
Ile	2.5	4.8	2.4	4.0 - 5.8
Leu	2.5	8.2	3.3	4.5 - 9.1
Tyr	1.2	3.1	1.7	2.3 - 4.1
Phe	0.5	2.6	--	1.1 - 2.7

- (1) Extracte amb AA35% després del d'amb PCA.
- (2) Extracte amb HCl 0.4 N després del d'amb AA.
- (3) Calculat a partir de von Holt et al., 1979.
- (4) No corregit per pèrdues hidrolítiques a *S. montereyensis*.

1.2.1. Contingut proteïc

La figura III-3 mostra que les proteïnes bàsiques globals extretes del tunicat solitari *Styela montereyensis* amb HCl 0.4 N formen un grup complex que es reparteix fonamentalment en dues zones del gel (figura III-3, a): pro-

teïnes que migren en la regió electroforètica de les histones i que representen un 40% del conjunt de proteïnes extretes, i unes altres proteïnes amb major migració, que formen el 45% del total. Les proporcions van ser averiguades per densitometria. L'electroforegrama mostra també altres proteïnes minoritàries amb diferents graus de mobilitat.

D'altra banda, es veu que a partir de les extraccions seqüencials es solubilitzen diferents grups de proteïnes. Així, amb el tractament amb PCA 5% es solubilitzen proteïnes molt riques en lisina (taula III-1); no en và, aquesta tècnica s'ha utilitzat clàssicament per l'extracció de les histones de la família de les H1, que són riques en lisina. Aquest conjunt de proteïnes es presenten al segon pou de la figura III-3, on es pot apreciar restes de l'H1 juntament amb altres proteïnes de major mobilitat electroforètica. S'ha de fer constar que, en general, totes aquestes proteïnes semblen ser components minoritaris de l'extracte global (pou a) presentat a la mateixa figura.

La composició aminoacídica d'aquestes proteïnes (taula III-1) sembla relacionada amb la de la histona H1 (alt percentatge de Lys -20.3%- i contingut moderadament elevat d'Ala -10%- i Pro -8.5%-), exceptuant l'elevada proporció del residu aminoacídic Arg (18.6%). Cal també destacar un important contingut en Gly (12.3%).

En conjunt, les proteïnes extretes amb PCA 5% suposen un 5-10% del pes les proteïnes bàsiques totals contingudes als nuclis.

Les proteïnes extretes amb AA 35% després del PCA exhibeixen una mobilitat electroforètica igual a la de les histones, alhora que altres components presenten una mobilitat menor (figura III-3, c). Pel que fa a la seva composició aminoacídica (taula III-1), es veu que es correspon a la del conjunt d'histones del cor nucleosòmic (presentada a la mateixa taula). Per tant, assumim que en conjunt es tracta d'una població d'histones presents als nuclis dels espermatozoides emprats. El pes de les proteïnes extretes amb AA 35% equival a un 15% del pes de totes les proteïnes espermàtiques, fet pel qual considerem aquesta fracció com a minoritària.

Finalment, en l'extracció amb HCl 0.4 N després d'acètic (figura III-3, d) es troben tres proteïnes majoritàries juntament amb d'altres de minoritàries. La composició aminoacídica revela que es tracta de proteïnes molt bàsiques, ja que més de la meitat dels seus aminoàcids són de tipus bàsic (taula III-1), destacant l'alt contingut en Arg (40.6%). Aquest extracte representa, en pes, el 75% de totes les proteïnes nuclears espermàtiques bàsiques, la qual cosa indica que les proteïnes extretes amb HCl són les contingudes majoritàriament als nuclis dels espermatozoides d'*Styela montereyensis*.

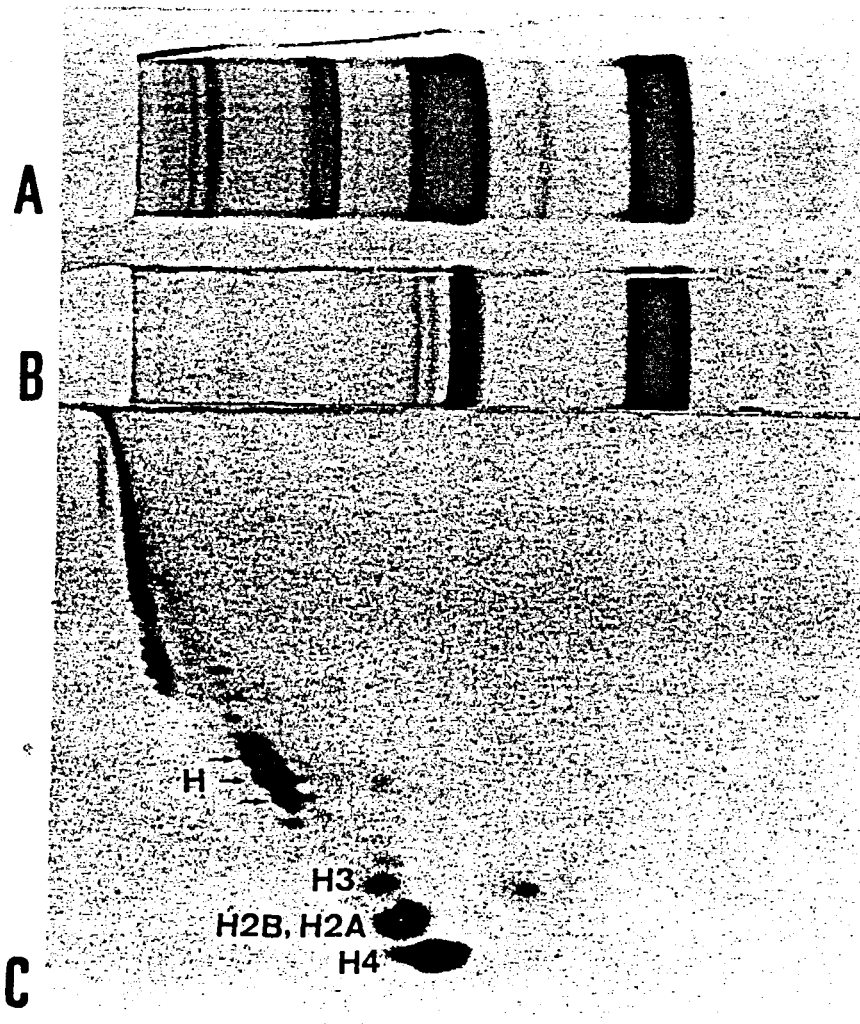
Degut a la complexitat del patró electroforètic de les proteïnes globals extretes amb HCl 0.4 N (sense altres extraccions prèvies), es va considerar oportú d'obtenir el seu desenvolupament electroforètic en un gel bidimensional, sent desenvolupada la primera dimensió en gel de poliàcrilamida/acètic/urea (v. II-3.1.3.) i la segona dimensió en gel amb SDS. Els resultats es mostren a la figura III-4.

El patró bidimensional comprèn el joc complet de les histones del cor del nucleosoma resolt en quatre taques principals, i tres proteïnes (anomenades H a la figura III-4) que presenten una migració similar a la de la histona H1 de vertebrats en experiments control. No obstant, malgrat la coincidència en el comportament electroforètic, no poden ser classificades com histones H1 ja que no van solubilitzar-se en l'extracte amb PCA 5% (v. figura III-3, b). Caldria una anàlisi més profunda per caracteritzar inequívocament aquestes proteïnes.

A la figura III-4 s'observa, igualment, la presència de 3 bandes majoritàries que es mostren insolubles en SDS i no penetren en la segona dimensió. Justament, aquestes tres proteïnes són les mateixes que s'havien mostrat no extraïbles amb AA 35 % però sí amb HCl 0.4 N (figura III-3A, c i d). La incapacitat de les protamines molt riques en Arg en penetrar als gels de SDS ha estat observat prèviament tant en vertebrats (Kolk i Samuel, 1975) com en invertebrats (Ausió, 1986).

Així doncs, tenint en compte el comportament en gels de SDS, la seva extractabilitat enfront d'àcids i la riquesa en Arg revelada per la composició aminoacídica (taula III-1), es poden classificar aquestes proteïnes com protamines segons els criteris definits per Subirana (1983), és a dir que la suma Lys + Arg sigui igual al 45-80% i la suma Ser + Thr representi el 10-25% del total de residus.

Figura III-4. Electroforesi en gel bidimensional de l'extracte global amb HCl 0.4 N (proteïnes bàsiques totals) a partir dels nuclis espermàtics d'*Styela montereyensis*. La primera dimensió va ser en GPAU (A) i la segona en gel de SDS (C); igualment, es mostren les proteïnes que van resultar insolubles en SDS (B).

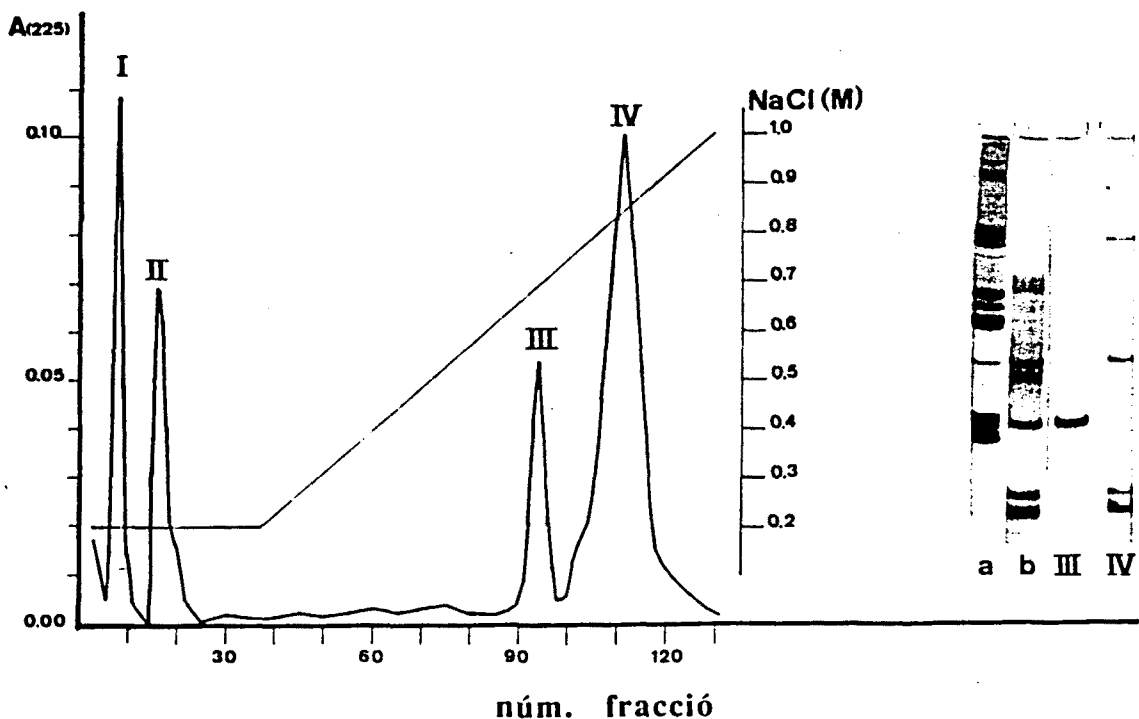


1.2.2. Fraccionament cromatogràfic i anàlisi aminoacídica

Com un nou pas per a intentar individualitzar l'estudi de les proteïnes nuclears espermàtiques d'*S. montereyensis*, es va procedir al fraccionament cromatogràfic dels extractes PCA 5% i HCl 0.4 N després d'acètic. L'extracte AA 35% no es va tractar d'igual manera ja que conté les histones somàtiques, que ha han estat repetidament caracteritzades en moltes espècies.

Les proteïnes extretes amb PCA 5% (figura III-3, b) van ser carregades en una columna de carboximetil cel·lulosa (Whatman CM 52), 2 x 15 cm, i eluïdes amb un gradient de NaCl de 0.2 a 1 M en tampó acetat 50 mM pH 6.0. Com s'aprecia a la figura III-5, el perfil d'elució obtingut consisteix en 4 pics; no obstant, no es va detectar cap proteïna en cap dels dos primers pics, ni per electroforesi ni per anàlisi d'aminoàcids.

Figura III-5. Comportament en cromatografia de CM-cel·lulosa de les PEB d'*Styela montereyensis* extretes amb PCA 5%. A l'electroforesi es presenta el contingut nuclear global de proteïnes (a), l'extracte amb PCA 5% (b) i les proteïnes eluïdes als pics III i IV (els pics I i II no contenen proteïnes).



El tercer pic consisteix en una única proteïna que s'elueix a una concentració de 0.65 M de NaCl. Aquesta proteïna presenta una composició en aminoàcids similar a l'H1 testicular de l'estrella de mar *Asterias rubens* (ambdues presentades a la taula III-2), excepte per una quantitat més elevada de glicina (16.2%). Conté només una petita proporció d'arginina (2.3%) i té una diversitat aminoacídica reduïda, contenint només 10 tipus de residus.

Les restants proteïnes provinents d'aquest extracte van ser eluïdes juntes a NaCl 0.85 M (pic IV, figura III-5). La característica més remarcable de la seva composició en aminoàcids (taula III-2) és el relativament alt contingut en Arg (22%) en relació amb la Lys (25%). Aquests resultats indiquen que l'extracte PCA 5% és heterogeni, no només pel que fa a les proteïnes riques en Lys sinó també per la distribució de l'Arg entre aquestes proteïnes.

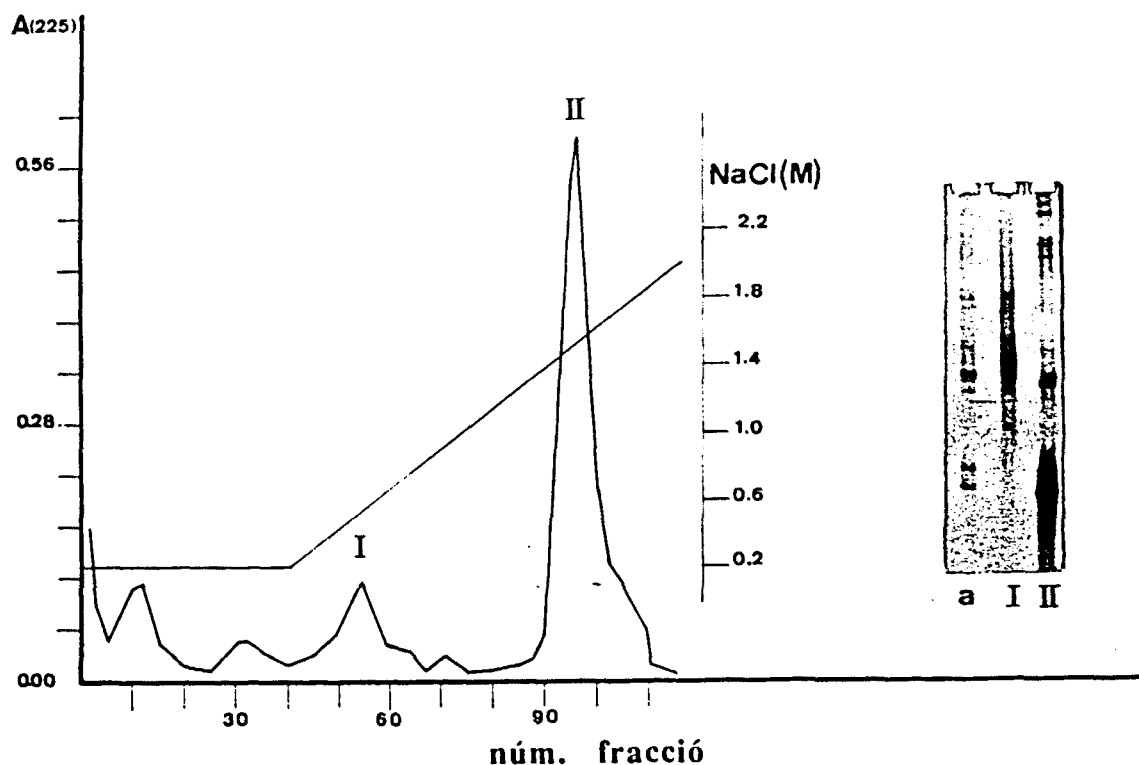
Taula III-2. Composició aminoacídica (% mols) de les fraccions cromatogràfiques obtingudes a partir de l'extracte amb PCA 5% (v. figura III-5) i de l'H1 de l'estrella de mar *Asterias rubens*.¹

Aminoàcid	Pic III	Pic IV	H1 d' <i>Asterias rubens</i>
Lys	37.2	25.0	35.4
His	--	2.3	1.0
Arg	2.3	22.0	4.9
Asp	3.2	3.3	3.0
Thr	4.6	5.0	3.1
Ser	7.2	6.7	5.8
Glu	2.3	3.2	3.3
Pro	8.1	4.5	6.7
Gly	16.2	9.3	3.7
Ala	17.2	8.5	23.3
Cys	--	--	--
Val	1.7	3.2	4.6
Met	--	--	0.8
Ile	--	3.5	1.2
Leu	--	2.8	1.8
Tyr	--	0.8	0.7
Phe	--	--	0.3

(1) Vanhoutte-Durand et al., 1977

A la figura III-6 es mostra el perfil d'elució en CM-cel·lulosa de les proteïnes reextretes amb HCl 0.4 N. El primer pic és eluït a NaCl 0.6 M i conté restes d'histones contaminants. Desgraciadament, les protamines es van eluir conjuntament en un sol pic ente 1.5 i 1.6 M NaCl. A la taula III-3 es mostra la dràstica reducció en la diversitat d'aminoàcids que constitueixen les proteïnes del pic II, presentant-se només 9 tipus de residus. A més a més, la proporció d'Arg (49.5%) és comparable al contingut d'Arg de les protamines dels vertebrats però, a diferència d'aquestes, en les protamines dels tunicats es reté encara una considerable proporció de Lys (16.6%).

Figura III-6. Comportament en cromatografia de CM-cel·lulosa de les PEB d'*Styela montereyensis* extretes amb HCl 0.4 N després d'acètic. L'electroforegrama mostra l'extracte cru carregat a la columna (a), així com les proteïnes eluïdes als pics I i II.



Taula III-3. Composició aminoacídica (% mols) de les fraccions cromatogràfiques obtingudes a partir de l'extracte HCl 0.4 N després d'AA (v. figura III-6).

Aminoàcid	Pic I	Pic II
Lys	14.4	16.6
His	2.8	--
Arg	10.8	49.5
Asp	6.7	1.1
Thr	4.3	3.4
Ser	4.2	1.9
Glu	9.3	--
Pro	5.1	--
Gly	8.5	16.9
Ala	9.0	5.0
Cyst/2	--	--
Val	7.7	--
Met	--	--
Ile	5.1	1.4
Leu	6.4	1.6
Tyr	2.7	--
Phe	2.9	--

En resum, la principal conclusió que s'extreu de l'estudi d'aquesta espècie és la següent: El nucli espermàtic de l'urocordat solitari *Styela montereyensis* conté majoritàriament protamines, les quals comprenen 3 molècules majoritàries molt bàsiques. Addicionalment, aquests nuclis poden contenir proteïnes minoritàries de tipus histones i altres enriquides en Lys. De tota manera, la funció de compactació del DNA és efectuada principalment per les protamines ja que reemplacen casi completament a les histones durant l'espermioogènesi.

1.3. Estudi de les PEB d'*Styela plicata*

Les gònades de diferents individus d'aquesta espècie van ser homogeneïtzades, filtrades i conservades en etanol al 90%. A partir d'aquesta mostra es va procedir a l'obtenció dels nuclis espermàtics segons el mètode esquematitzat a la figura II-1.

Les proteïnes bàsiques associades a aquests nuclis van ser extretes amb àcids diluïts. Concretament, es va fer una primera extracció amb AA 35% i una reextracció amb HCl 0.4 N; les proteïnes així obtingudes es van precipitar amb 6 volums d'acetona, rentar i assecar. A partir de pols protèica de l'extracte amb AA 35% es va efectuar una solubilització amb PCA 5%, segons el procediment resumit a la figura II-2, amb la finalitat de separar la histona H1 i altres proteïnes riques en Lys. Com ja s'ha explicat, la solubilització amb PCA 5% és més efectiva si es parteix ja de pols protèica que si es realitza directament sobre els nuclis, encara que conceptualment equival al mateix.

1.3.1. Contingut protèic

A la figura III-7 es mostren les proteïnes presents en cada un dels extractes segons va revelar l'anàlisi en gels de poliacrilamida/acètic/urea. En general, els diferents patrons recorden els obtinguts en *Styela montereyensis* però amb algunes diferències.

Si comparem les proteïnes solubilitzades amb PCA 5% en les dues espècies, observem que mentre que a *S. montereyensis* trobàvem poques bandes a la zona de les histones, sent les bandes majoritàries de mobilitat major que aquestes (figura III-3, b), a *S. plicata* (figura III-7, b) les bandes majoritàries es troben a la zona on migren les histones o una mica per sota, mentre que la majoria de bandes minoritàries presenten una mobilitat major que aquelles.

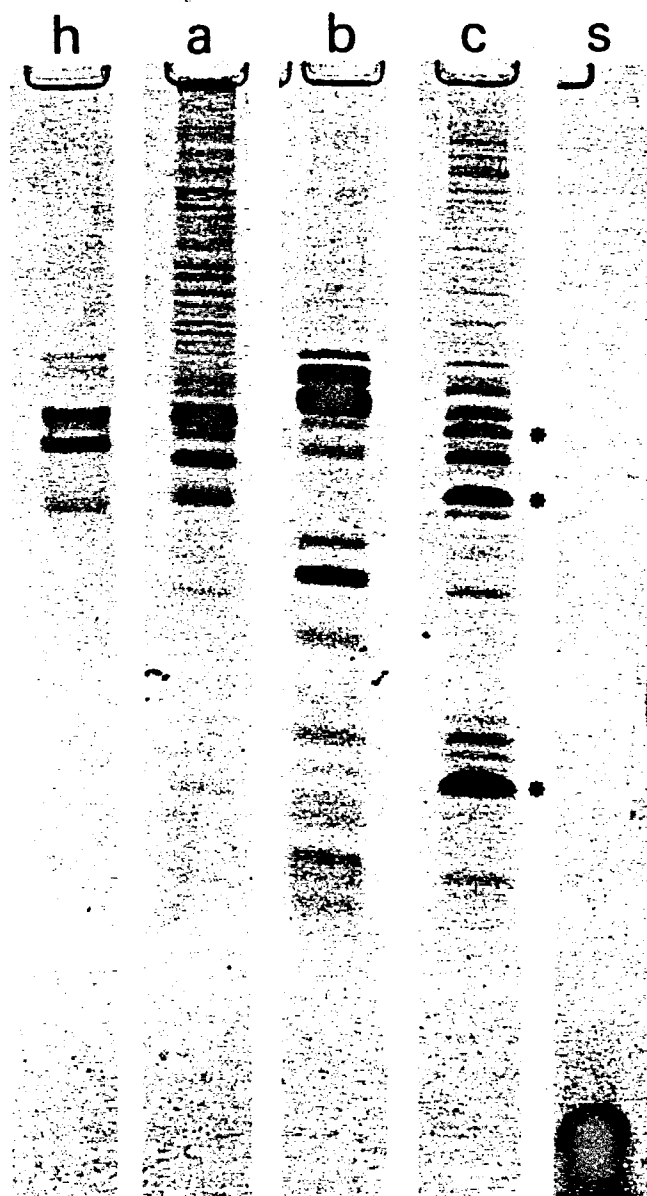
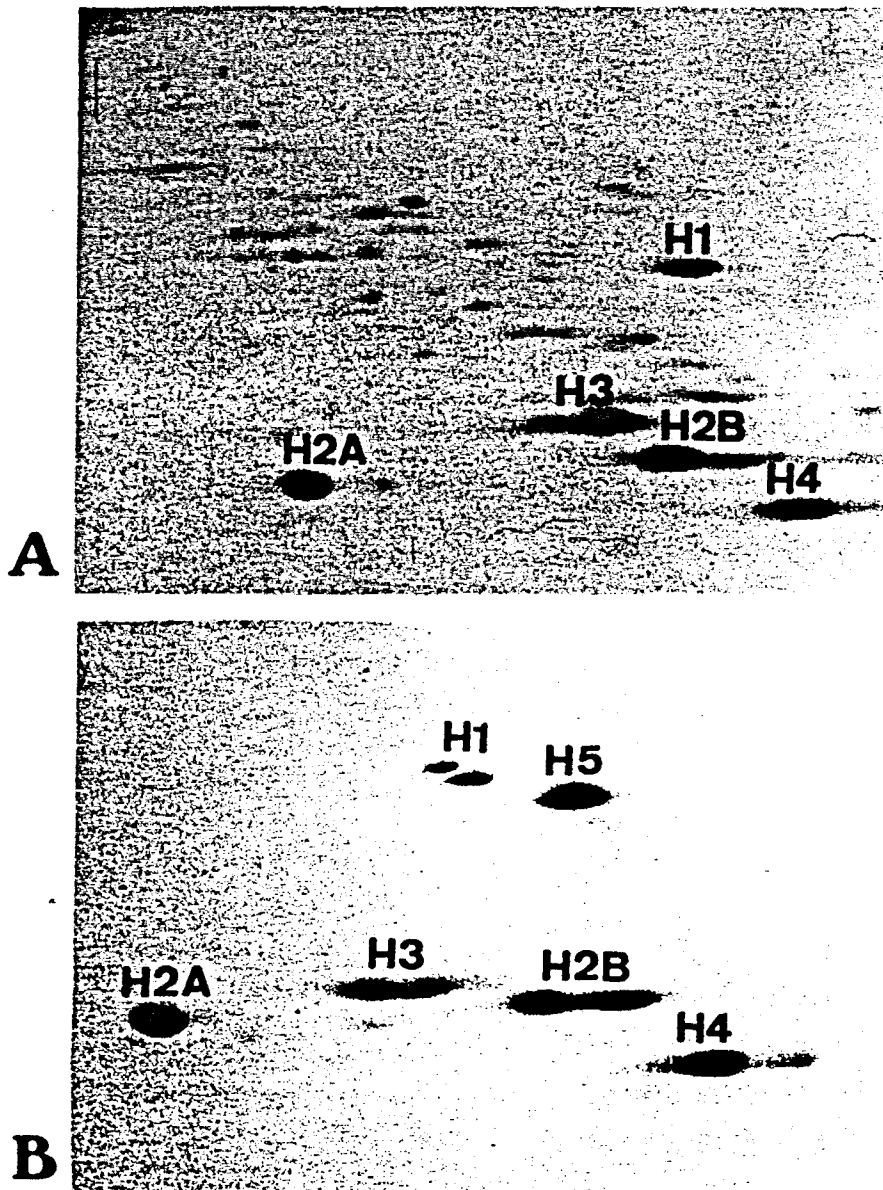


Figura III-7. Electroforesi en gel de poliacrilamida/acètic/urea de les PEB d'*Styela plicata*. a) Extracte AA 35%; b) Proteïnes solubles en PCA 5% de l'extracte amb AA; c) Extracte HCl 0.4 N post AA. Estàndards: h) Histones d'eritròcit de pollastre; s) Protamina de salmó (salmina).

L'extracció feta amb AA 35% (figura III-7, a) presenta un aspecte molt similar en les dues espècies, consistint majoritàriament en la fracció d'histones més una sèrie de bandes de menor mobilitat. L'anàlisi en gel bidimensional (primera dimensió en gel d'acrilamida contenint tritó i la segona dimensió en gel amb SDS) (figura III-8, A) revela la presència de la

dotació completa d'histones, posseint l'H1 una mobilitat similar a la de l'H5 d'eritròcit de pollastre (figura III-8, B). No s'ha d'oblidar, però, que les proteïnes d'aquest extracte suposen una fracció minoritària respecte a la dotació protèica global.

Figura III-8. Electroforesi bidimensional de les proteïnes d'*S. plicata* extretes amb AA 35% (A) en comparació amb les histones d'eritròcit de pollastre (B) utilitzades com a estàndard. La primera dimensió és en gel de poliacrilamida amb urea 6 M, tritó X-100 6 mM, i la segona dimensió en gel de poliacrilamida contenint SDS.



Finalment, en l'extracció amb HCl post AA (figura III-7, c) apareixen el que presumiblement són restes d'histones juntament amb 3 proteïnes majoritàries (asteriscs) i altres de minoritàries. D'entre les majoritàries, una presenta una mobilitat igual a la de l'H4 mentre que, de les altres 2, una migra per sobre d'aquesta i l'altra té una mobilitat electroforètica força major, intermèdia entre les histones i la salmina. La migració d'aquesta última banda és lleugerament superior a les bandes de major mobilitat obtingudes en l'extracte equivalent a partir d'*S. montereyensis* (v. figura III-20). Igual que passava amb *S. montereyensis*, cap de les proteïnes majoritàries d'aquest extracte penetren en gels de SDS, fet que és indicatiu d'una elevada basicitat de les molècules i de què no són histones malgrat algunes posseeixin una similar mobilitat electroforètica.

1.3.2. Fraccionament cromatogràfic

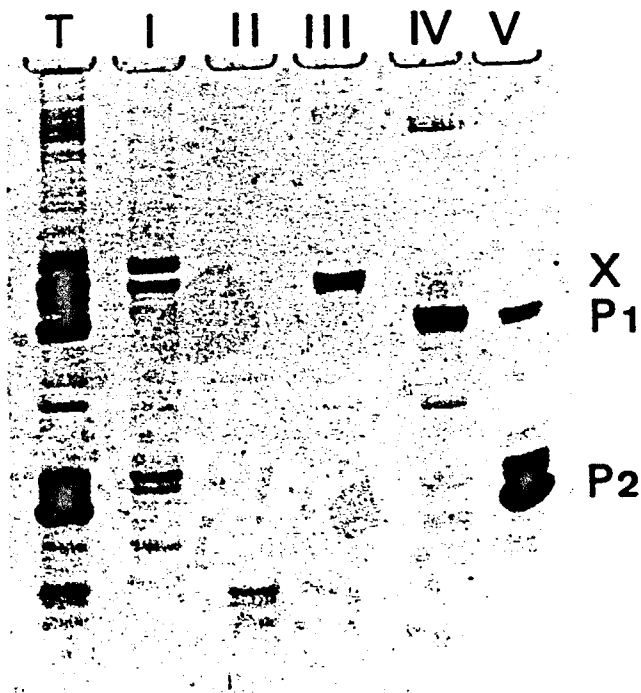
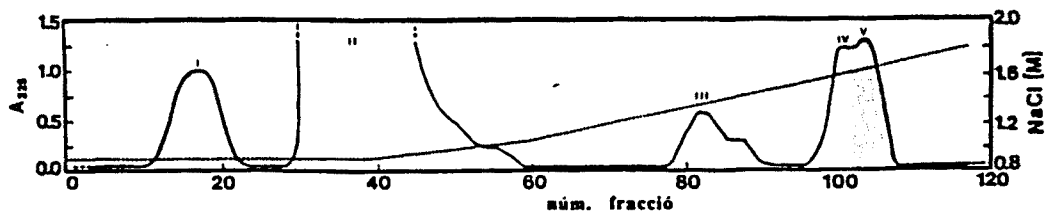
Amb la finalitat de poder aïllar i caracteritzar els components majoritaris de l'extracte HCl post AA i comprovar en cada un d'ells si tenien naturalesa de protamines (com feien suposar els experiments previs amb *S. montereyensis*), es va procedir al fraccionament d'aquest extracte en columnes de CM-cel·lulosa (Whatman CM 52) d'una mida de 2.5 x 50 cm. Per l'elució de les proteïnes es va fer un rentat amb NaCl 0.9 M i a continuació es va aplicar un gradient de 0.9-2.5 M NaCl. Totes les solucions de NaCl contenien acetat sòdic 50 mM, pH 6.00.

Concretament i després de centrifugar per eliminar les substàncies no dissoltes, es van carregar uns 40 mg de l'extracte protèic dissolts en la solució amb NaCl 0.9 M contenint clorur de benzamidina 10 mM. Es va comprovar, mitjançant control electroforètic, que el sediment resultant de la centrifugació contenia la majoria de les histones residuals, així com una molt mínima proporció de les proteïnes majoritàries característiques d'aquest extracte.

Els pics obtinguts en la cromatografia, així com les proteïnes contingudes als mateixos, es mostra a la figura III-9. Mentre que en els pics I i

II s'elueixen la majoria de proteïnes minoritàries, als següents pics s'elueixen progressivament les proteïnes majoritàries. Així, al pic III trobem una única banda corresponent a la proteïna majoritària de menor migració (que anomenarem X), al pic IV es troba casi pura la que presentava una migració com la de la histona H4 (i que a partir d'ara anomenarem P1) i, finalment, al pic V es troba principalment la majoritària de major mobilitat (que anomenarem P2 en endavant).

Figura III-9. Cromatografia en CM-cel·lulosa a partir de l'extracte HCl post AA d'*Styela plicata* i electroforegrama mostrant el contingut proteïc d'aquest (T) i dels diferents pics obtinguts (I-V).

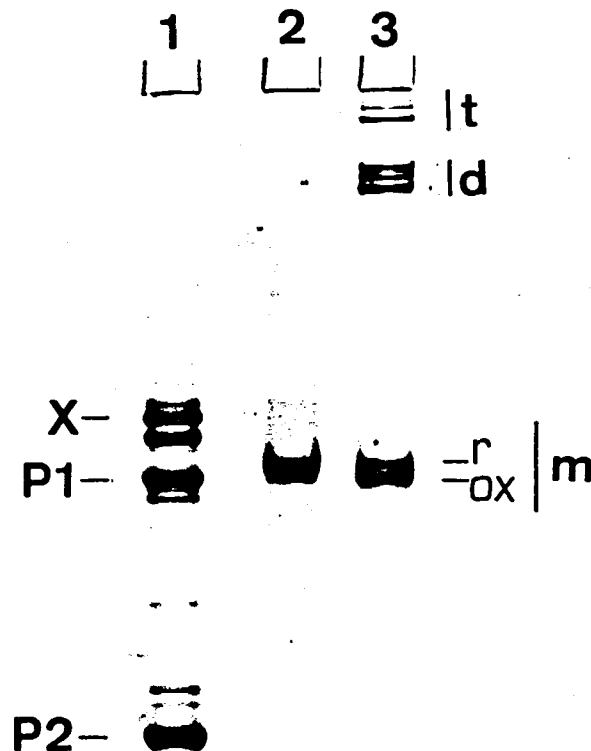


a) Purificació de la proteïna P1

Amb la finalitat de millorar la purificació de la proteïna P1, uns 300 µg de la fracció protèica corresponent al pic IV de la figura III-9 van ser injectats en una columna Vydac C18, 4.6 x 250 mm, 5 µm, 300 Å, per la seva separació mitjançant HPLC en fase reversa. Les proteïnes es van eluir amb un gradient d'acetonitril utilitzant TFA 0.1% com a fase aquosa.

El fraccionament resultant consistia en un perfil d'elució molt complex amb múltiples pics (no mostrat). Les anàlisis electroforètiques corresponents a aquests pics van revelar que possiblement la naturalesa d'aquest comportament era degut a la presència de diversos agregats (v. figura III-10, 3).

Figura III-10. Estats oxidats i reduïts de la P1. Extracte obtingut amb HCl 0.4 N després d'una extracció amb AA 35% a partir dels nuclis espermàtics de *S. plicata* (1). P1 després d'un tractament reductor (2) sobre la P1 obtinguda després d'un fraccionament amb HPLC (3). ox, forma oxidada; r, forma reduïda; m, monòmer; d, dímers; t, trímers.

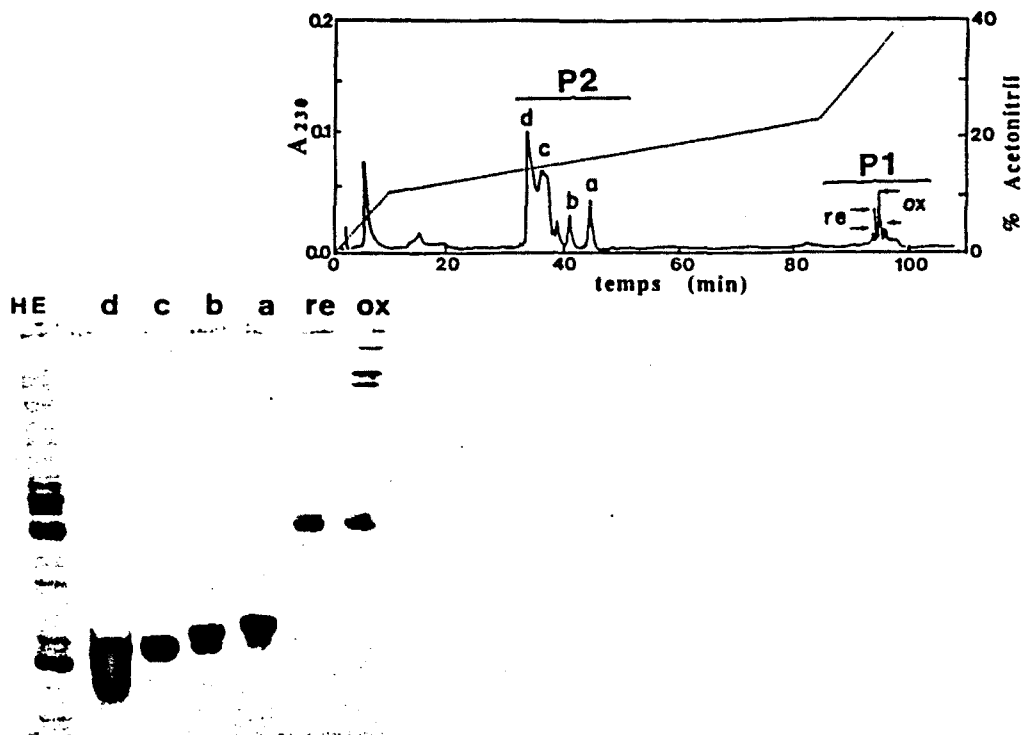


Per comprovar-ho, es van tractar aquests agregats amb 2-mercaptoetanol a pH 7.6 en una solució contenint urea (v. II-2.6.1.). Efectivament, aquest tractament va transformar tots els agregats (figura III-10, 3) en la forma monomèrica reduïda de la P1 (figura III-10, 2). A partir de l'observació d'agregats major que els dímers, es va concloure que almenys hi havia dues cisteïnes responsables d'aquest fenomen a la molècula de P1.

b) Purificació de la proteïna P2

A partir de la barreja de proteïnes obtinguda al pic V de la figura III-9 es va procedir a la purificació de la P2 per HPLC utilitzant el mateix tipus de columna i eluents que amb la P1.

Figura III-11. Purificació per HPLC en fase reversa de la fracció V de la figura III-9 i electroforegrama mostrant el contingut proteïc de les diferents fraccions. HE = proteïnes obtingudes a partir de l'extracte HCl post AA d'*Styela plicata*; d = productes de degradació de la P2; re i ox, forma reduïda i oxidada de la P1, respectivament.



A la figura III-11 es mostra el gradient aplicat així com els pics apareguts i les proteïnes que representen. Es pot observar com, a més de la P2 (pou c), s'han pogut resoldre les dues bandes que migraven just per sobre d'ella (pous a i b) i les formes oxidada i reduïda de la P1. Les proteïnes dels pous a i b podrien correspondre a bandes de fosforilació de la proteïna P2; de fet, la composició de les tres bandes (a, b i c) és gairebé idèntica, v. taula III-4).

En resum, doncs, mitjançant la combinació de les cromatografies de bescanvi iònic i HPLC es va aconseguir purificar perfectament les tres proteïnes majoritàries d'*Styela plicata* (figura III-12).

Figura III-12. Estat de puresa de les tres proteïnes majoritàries d'*S. plicata* després de l'ús combinat de cromatografia de bescanvi iònic i HPLC. 1. Proteïna X obtinguda al pic III de la figura III-9; 2. P1 (forma reduïda); 3. P2 (figura III-11, c). HE, proteïnes inicials corresponents a l'extracte HCl post AA.



1.3.3. Composició aminoacídica

A partir de les proteïnes majoritàries purificades (v. figura III-12) es van efectuar les corresponents anàlisis d'aminoàcids, els resultats de les quals es mostren a la taula III-4.

Taula III-4. Composició aminoacídica (mols %) de les proteïnes majoritàries del tunicat *S. plicata*, comparades amb les PL-I de mol·luscs i amb les protamines de diferents grups de vertebrats (tr = traces).

	Tunicat <i>Styela plicata</i>			Mol·luscs Macoma <i>nasula</i> (1)		Mol·luscs Cryptochiton <i>stelleri</i> (2)		Peixos Oncorhynchus <i>keta</i> (3)		Amfibis Bufo <i>japonicus</i> (4)		Rèptils Chrysemys <i>picta</i> (5)		Aus Gallus <i>domesticus</i> (6)		Mamífers Bos <i>taurus</i> (7)	
	X	P1	P2a	P2b	P2c	PL-I	X (PL-I)	Salmina	Salmina	X (PL-I)	P1	X (PL-I)	P1	X (PL-I)	P1	X (PL-I)	P1
Lys	14.8	14.3	15.8	16.9	17.4	21.8	9.6	-	-	5.4	-	1.0	-	-	-	-	-
His	1.0	1.1	-	-	-	2.3	1.7	-	-	9.6	-	4.0	-	-	-	-	2.1
Arg	33.8	32.5	50.8	49.5	50.4	26.9	40.9	67.2	67.2	42.1	65.3	-	-	58.5	50.0	-	50.0
Asx	5.1	4.6	0.2	-	1.2	0.8	2.7	-	-	2.0	-	-	-	-	-	-	-
Thr	2.8	1.2	2.0	3.1	3.1	4.0	3.9	-	-	6.9	2.5	-	-	1.6	-	-	6.3
Ser	5.3	4.6	1.4	1.4	1.1	20.2	8.5	9.9	9.9	5.7	7.0	-	-	17.2	4.2	-	4.2
Glx	2.6	2.2	0.3	0.7	-	0.8	1.4	-	-	4.7	4.4	-	-	-	-	-	2.1
Pro	2.5	1.4	-	-	-	1.8	1.2	-	-	9.7	-	-	-	-	-	-	-
Gly	12.0	13.2	21.5	20.8	18.7	2.2	5.9	6.5	6.5	0.8	13.2	tr	-	8.6	4.2	-	4.2
Ala	8.1	7.1	4.5	3.4	3.3	11.3	8.5	1.3	1.3	4.9	1.3	-	-	3.2	2.1	-	2.1
Cys	-	0.7*	-	-	-	0.7	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-
Val	4.2	4.6	0.2	-	-	2.4	7.4	4.7	4.7	5.3	-	-	-	1.7	6.3	-	6.3
Met	-	1.4	1.3	0.7	0.7	0.2	1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ile	1.5	2.4	-	-	-	1.4	2.0	1.3	1.3	-	-	-	-	-	-	-	2.1
Leu	2.7	4.5	1.9	2.5	3.3	2.1	2.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.1
Tyr	2.3	2.2	-	0.9	0.7	0.5	1.8	-	-	2.7	-	-	-	-	-	-	4.2
Phe	1.3	2.2	-	-	-	0.7	0.8	-	-	-	-	-	-	6.2	4.2	-	2.1

(1) Tret d'Ausió, 1988.
 (2) Tret de Subirana et al., 1973.
 (3) Tret d'Ando et al., 1973.
 (4) Composició mitja dels components P1 i P2; tret de Takamune et al., 1991.
 (5) Tret de Chlva et al., 1989.
 (6) Tret de Nakano et al., 1976.
 (7) Tret de Coeligh et al., 1969.
 * La proteïna no va ser aïllada abans de la hidròlisi.

Les proteïnes X i P1 presenten una composició molt similar. Ambdues són proteïnes molt bàsiques, representant la suma dels aminoàcids bàsics la meitat de la seva composició global; destaquen sobretot la quantitat d'Arg (~32-34%) i Lys (~14.5%). D'altra banda, presenten una elevada diversitat d'aminoàcids (15-17 tipus diferents de residus), dels quals destaquen, d'entre els no bàsics, la Gly (~12-13%) i l'Ala (~7-8%). En línies generals, aquesta composició recorda la de les PL-I d'invertebrats marins (Ausió, 1986), constituint les principals diferències les diferents quantitats de Gly i Ser. A la composició de la proteïna P1 es van detectar, a més, quantitats apreciables de Cys inclús sense haver fet cap tractament d'alquilació previ (v. més endavant).

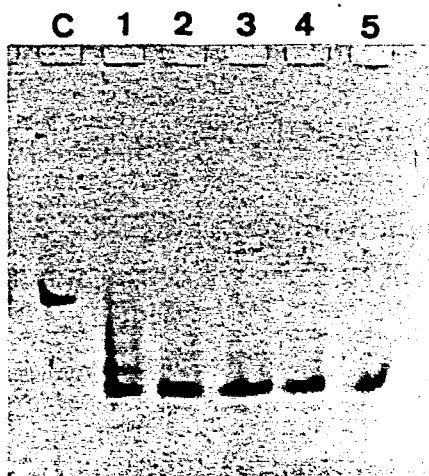
Per la seva banda, la P2, la proteïna majoritària de major mobilitat, presenta un elevat contingut en Arg (un 50%), similar al de les protamines dels vertebrats, encara que manté una proporció de Lys major que en aquestes, menys residus fosforilables i més Gly. La diversitat d'aminoàcids és menor que en el cas de les proteïnes X i P1 (només 10 tipus de residus diferents).

1.3.4. Comportament de la P1 enfront de la tripsinització i anàlisi aminoacídica del pèptid resistent obtingut

Degut a la similitud entre la P1 i la PL-I dels mol·luscs, es va decidir examinar si aquestes proteïnes podrien estar relacionades estructuralment. Un dels trets més característics de totes les PL-I és la presència d'un nucli resistent a la tripsina similar al de l'H1 (Ausió et al., 1987; Ausió, 1988; Jutglar et al., 1991); per tant, es va procedir a la tripsinització de la P1 d'*S. plicata*. En línies generals, l'experiment es va realitzar com es descriu a l'apartat II-3.7.1. però amb algunes variacions: Com s'havia vist en experiments previs que la P1, sota determinades condicions, formava agregats que desapareixien per reducció, es va decidir realitzar la tripsinització en condicions reductores. Per això, la proteïna es va incubar amb una solució de Tris 25 mM, pH 7.5, contenint un 5% de 2-mercaptoetanol durant 2.5 hores. A continuació es va portar la solució a una concentració de NaCl de 2 M i es va afegir l'enzim en

proporció 1:750 (enzim:substrat). La reacció es va parar a diferents temps afegint també de mostres per electroforesi contenint l'inhibidor TLCK de manera que la relació enzim:inhibidor fos d'1:10. Paral·lelament es va realitzar un control en les mateixes condicions però sense afegir l'enzim. Les alíquotes recollides als diferents temps van ser analitzades en gel de poliacrilamida/acètic/urea (figura III-13).

Figura III-13. Tripsinització de la protamina P1 d'*Styela plicata*. C = Control (P1 no digerida); 1 = 2 minuts; 2 = 8 minuts; 3 = 16 minuts; 4 = 32 minuts; 5 = 64 minuts.



Les electroforesis van revelar l'existència d'un únic pèptid altament resistent a l'atac per la tripsina i amb una mobilitat similar a la del nucli resistent a la tripsina de les PL-I (figura III-13, 2-5), que presumiblement correspongui a alguna estructura de tipus globular present a la P1.

Per poder analitzar la composició d'aquest pèptid es va dur a terme una nova tripsinització, partint de 500 µg de la proteïna P1, però aquest cop aturant-la als 30 minuts afegint l'inhibidor de tripsina provinent de la soja en proporció 1:4 (enzim:inhibidor). Per recuperar el pèptid i alhora eliminar les sals de la mostra abans de la seva purificació per HPLC, es va procedir a precipitar la mostra amb TCA 20% (v. II-2.4.2.). Després de rentar la mostra amb acetona i assecar-la, aquesta es va redissoldre en aigua i es va injectar en el mateix tipus de columna utilitzat en la purificació de la proteïna sencera.

Les solucions eluents emprades també van ser les mateixes que anteriorment.

L'anàlisi aminoacídica d'aquest pèptid es va dur a terme després de la seva piridiletillació i dessalat per HPLC (utilitzant la mateixa columna i eluents), segons el sistema descrit a l'apartat II-2.6.2.2. (v. figura III-14). S'observa en general una notable similitud entre aquest pèptid i els equivalents obtinguts a partir de l'H1 i altres proteïnes relacionades. No obstant, hi ha diferències importants com és la presència d'un percentatge important d'aminoàcids acídics a la P1 (11.3%) i l'existència de Cys, no presents en els altres casos. La quantitat de Cys detectada és consistent amb la presència de 2 residus per molècula de P1.

Taula III-5. Composició aminoacídica (mols %) del nucli resistent a la tripsina de la P1 d'*S. plicata* comparat amb el d'altres proteïnes relacionades amb la histona H1.

	P1 <i>Styela plicata</i> (tunicat)	PL-I <i>Spisula</i> <i>solidissima</i> (bivalve) (1)	H1 espermàtica <i>Parechinus angulosus</i> (eriçó de mar) (2)	H5 eritròcit de pollastre (3)	H1 (CTL-1) tímus de vedella (4)
Lys	12.5	12.0	8.5	11.4	16.7
His	2.1	2.7	2.4	3.8	--
Arg	11.5	6.7	8.5	7.6	2.4
Asx	8.9	--	--	--	--
Thr	1.2	1.3	4.9	2.5	6.0
Ser	8.1	10.7	7.3	15.2	11.9
Glx	1.4	--	--	--	--
Pro	3.1	2.7	4.9	1.3	3.6
Gly	8.1	10.7	8.5	8.9	10.7
Ala	10.2	22.7	18.3	12.7	16.7
Cys	2.5*	--	--	--	--
Val	9.1	6.7	11.0	3.8	7.1
Met	3.3	4.0	4.9	1.3	--
Ile	2.3	2.7	2.4	7.6	2.4
Leu	6.8	--	4.9	7.6	10.7
Tyr	4.5	1.3	2.4	3.8	1.2
Phe	1.3	1.3	1.2	1.3	1.2
Trp	--	1.3	--	--	--

(1) Tret de Ausió et al., 1987.

(4) Tret de Liao i Cole, 1981.

(2) Tret de Strickland et al., 1980a. * El pèptid va ser piridiletilat abans de la hidròlisi.

(3) Tret de Briand et al., 1980.

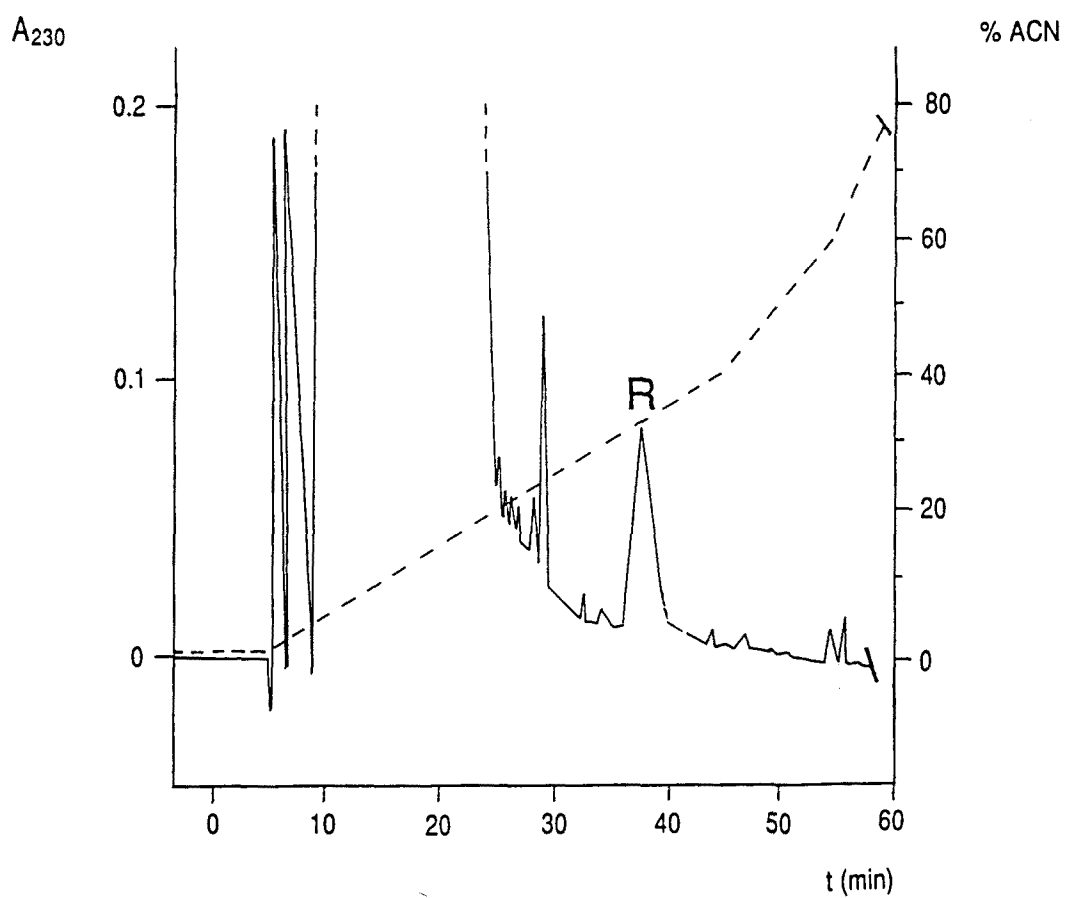


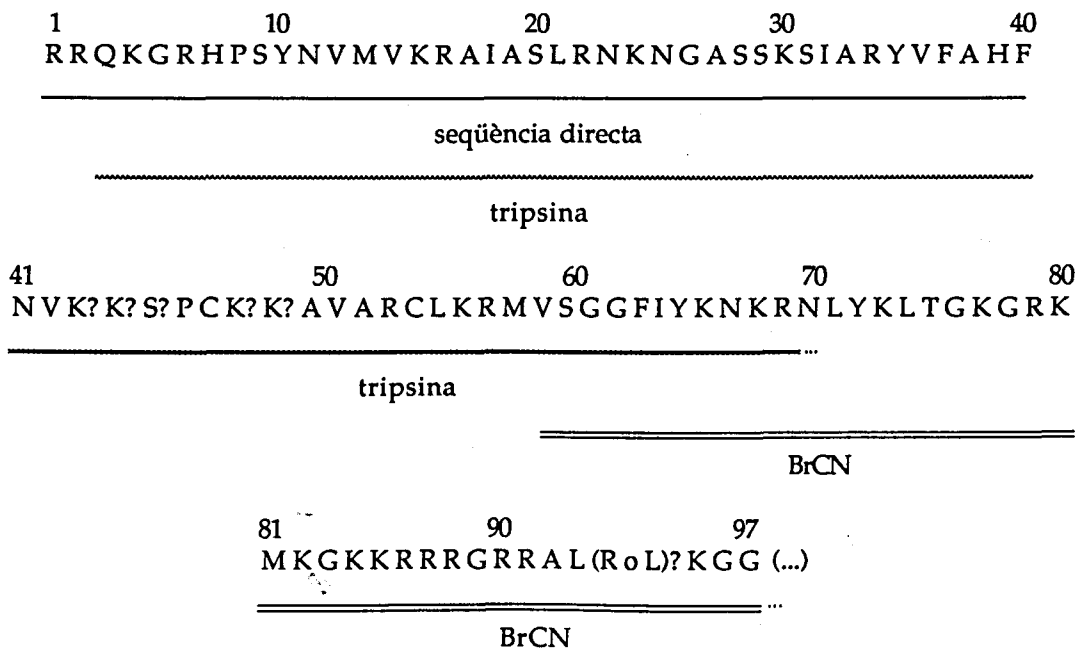
Figura III-14. Separació per HPLC del pèptid resistent a la tripsina (R) de la proteïna P1 d'*Styela plicata* després de la seva piridiletilació.

1.3.5. Estructura primària de la P1

Com veurem en els següents apartats (III-1.4.1. i III-1.4.2.), es pot trobar una proteïna del tipus P1 a tots els tunicats ascidiacs. Per tractar-se, doncs, d'una proteïna que pot considerar-se com a representativa d'aquest grup, i per poder determinar millor fins a quin punt s'assemblava a les proteïnes de tipus H1 ja estudiades, es va decidir abordar la seqüenciació d'una part de la proteïna P1 dels tunicats.

A partir de la proteïna P1 purificada per cromatografia (v. figura III-12, 2) es va procedir a la seqüenciació del seu extrem N-terminal. Igualment, es va seqüenciar el pèptid de la P1 resistent a la tripsina (v. figures III-13 i III-14). D'altra banda, partint de 300 µg de la proteïna P1 es va fer un tractament amb BrCN (aprofitant la presència d'un cert número de metionines a la proteïna). Les condicions utilitzades per aquest trencament són les explicades a l'apartat II-3.7.3. Un dels pèptids obtinguts en aquest experiment va ser seqüenciat (v. figura III-15).

Figura III-15. Seqüència parcial de la proteïna P1 d'*Styela plicata* i estratègia utilitzada.



Totes les determinacions de l'estructura primària de la P1 d'*Styela plicata* es van realitzar al Protein Microchemistry Center (University of Victoria, Canadà) utilitzant un seqüenciador automàtic en fase gasosa ABI model 473A (v. II-3.8.2.). La seqüència parcial obtinguda d'aquesta manera es mostra a la figura III-15.

A partir dels resultats mostrats a la figura III-15 i de la composició d'aminoàcids de la proteïna total i de la part globular o resistent a la tripsina (v. taules III-4 i III-5), es pot deduir que la PEB-P1 del tunicat ascidiaci *Styela plicata* mostra una cua N-terminal extremadament curta, consistent només en dues arginines, una part globular on es trobarien concentrats la major part dels aminoàcids hidrofòbics i les dues cisteïnes de la molècula, i una cua C-terminal (de la que no hem pogut determinar encara tota la seqüència per falta de mostra) on trobaríem acumulats els residus aminoacídics bàsics de la molècula.

Figura III-16. Comparació de la P1 d'*S. plicata* amb els bancs de seqüències mitjançant el programa Blast: (a) Llistat ordenat de les seqüències amb major grau d'identitats. (b) Alineament de part de la regió resistent a la tripsina de P1 d'*S. plicata* amb la primera de les seqüències del llistat que apareix a (a).

(a)	Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	High Score	Smallest Poisson Probability P(N)	N
GP:PEAHISH1R_1	Pea mRNA for H1 histone. H1 histone (AA 1-...	88	5.8e-06	1
SP:H1_PEA	HISTONE H1. >PIR:S00033 Histone H1b - Gard...	88	5.8e-06	1
SP:H1D_STRPU	HISTONE H1-DELTA. >PIR:A32137 Histone H1-d...	85	1.7e-05	1
GP:TIGH1234A_1	Tigriopus californicus histone H1 gene, co...	83	3.5e-05	1
SP:H5_CHICK	HISTONE H5. >GP:CHKH5 1 Chicken histone H5...	81	7.3e-05	1
PIR:H5SCH5	Histone H5 - Chicken 935.0 5.0 3.0 1.0 1.0	81	7.3e-05	1
GP:CIHISH5_1	Duck (Cairina moschata) histone H5 (H5) ge...	80	0.00010	1
SP:H5_CAIMO	HISTONE H5. >PIR:S07260 *Histone H5 - Musc...	80	0.00010	1
SP:H5_ANSAN	HISTONE H5. >PIR:HSGS5 Histone H5 - Goose ...	80	0.00010	1
GP:SUPHIS6_1	Sea urchin (P. miliaris) gene for histone ...	79	0.00015	1
GP:SUPHISPA_5	sea urchin (p.miliaris) histone complex: (...	79	0.00015	1
GP:SUPHISPO6_1	Sea urchin (P.miliaris) H1 gene, 5' end. h...	79	0.00015	1
SP:H1_WHEAT	HISTONE H1. >GP:WHTHISTH1_1 T.aestivum L m...	78	0.00021	1
GP:SUSHIO1_1	Sea urchin gene encoding histone H1 histon...	76	0.00044	1
SP:H1E_STRPU	HISTONE H1, EARLY EMBRYONIC.	76	0.00044	1
SP:H1_LYTPI	LATE HISTONE H1. >PIR:A25550 Histone H1 - ...	75	0.00063	1
SP:H12_CAEEL	HISTONE H1.2. >PIR:S08195 Histone H1.2 - C...	75	0.00063	1
SP:H11_ARATH	HISTONE H1.1. >PIR:S19698 *Histone H1 - Mo...	74	0.00090	1
PIR:HSMU11	Histone H1.1 - Mouse-ear cross (fragment) ...	74	0.00090	1
GP:ATHH11C_1	A.thaliana H1-1C mRNA for histone H1-1 (pa...	74	0.00090	1

(segueix)

(continuació)

SP:H10_HUMAN	HISTONE H1'. >PIR:HSHU10 Histone H1' - Hum...	74	0.00090	1
SP:H10_MOUSE	HISTONE H1.0. >PIR:S01296 Histone H1.0 - M...	74	0.00090	1
SP:H12_ARATH	HISTONE H1.2. >PIR:HSMU12 Histone H1.2 - M...	73	0.0013	1
SP:H1G_STRPU	HISTONE H1-GAMMA, LATE. >PIR:A26721 Histon...	73	0.0013	1
SP:H1B_STRPU	HISTONE H1-BETA, LATE EMBRYONIC. >GP:SUSH1...	72	0.0019	1
PIR:A28100	Histone H1-beta, embryonic - Sea urchin (S...	72	0.0019	1
SP:H1_MAIZE	HISTONE H1.	71	0.0027	1
SP:H1L_SPISO	HISTONE H1-LIKE PROTEIN (SPERM-SPECIFIC PR...	70	0.0038	1
PIR:A27540	Protamine-like protein - Atlantic surf cla...	70	0.0038	1
SP:H5A_XENLA	HISTONE H5A (XLH5A) (H1D) (H1-SA). >PIR:HS...	68	0.0078	1
SP:H1L5_ENSMI	HISTONE H1-LIKE PROTEIN EMS.	68	0.0078	1
SP:H1_PARAN	HISTONE H1, GONADAL. >PIR:HSUR1P Histone H...	66	0.016	1
SP:H1_CHITH	HISTONE H1. >PIR:S18006 *Histone H1 - Midg...	66	0.016	1
SP:H1L_CAEEL	HISTONE H1.1. >PIR:S09130 Histone H1 - Cae...	65	0.023	1
PIR:S01817	Histone H1.1 - Caenorhabditis elegans	65	0.023	1
PIR:S09388	*Histone H1 - Sea urchin (Parechinus angul...	65	0.023	1
SP:H1A_PLADU	HISTONE H1A, SPERM. >PIR:HSDU1A Histone H1...	65	0.023	1
SP:H1B_PLADU	HISTONE H1B, SPERM. >PIR:HSDU1B Histone H1...	64	0.032	1
PIR:PS0147	*Histone H1 - Sea urchin (Strongylocentrot...	63	0.046	1

(b) >GP:PEAHISH1R_1 Pea mRNA for H1 histone. H1 histone (AA 1-263)
Length = 266

Score = 88 (44.5 bits), Expect = 5.8e-06, P = 5.8e-06
Identities = 16/35 (45%), Positives = 27/35 (77%)

Query: 2 RQKGRHPSYNYVMVKRAIASLRNKGASSKSIARYV 36
R + HP+Y+ M+K AI SL++KNG+S +IA+++

Sbjct: 57 RNPASHPTYEEMIKDAIVSLKEKNGSSQYAIKFI 91

D'altra banda, i com ja suposàvem, la comparació per ordinador de part de la seqüència de la P1 amb el bancs de dades disponibles utilitzant el programa BLAST (programa que té accés a tots els bancs de dades de seqüències i que s'actualitza diàriament), dona com a molècules més similars a l'analitzada histones dels tipus H1 i H5 de diverses espècies (v. el llistat de les 40 seqüències més similars a la nostra proteïna a la figura III-16, a); cal destacar també la presència en aquest llistat d'una "protamine-like" en posició 29. A la mateixa figura (III-16, b) apareix l'alineament entre la seqüència parcial de la regió globular de la P1 del tunicat i la primera de les proteïnes del llistat. Efectivament, es pot observar com la comparació entre aquests dos fragments dona un elevat percentatge d'identitats (45%) i de similitud (77%) sobre 35 residus alineats. Aquest resultat no és sorprenent tenint en compte que el nucli resistent a la tripsina de les histones H1 és el domini més altament conservat d'aquestes proteïnes.

1.3.6. Possible relació entre les proteïnes P1 i P2 d'*Styela plicata*

Per la seva mobilitat i composició, hem estimat que la P1 d'*S. plicata* conté uns 130 residus aminoacídics. Si d'aquest número se li resten els aminoàcids constituents de la zona globular (assumint que aquesta està compresa entre els residus 3 i 81), el número obtingut correspon als aminoàcids que es troben als braços de la proteïna. En aquest cas, a més, com sabem que el braç N-terminal és molt curt, consistint només en dues arginines, tenim que aquest número correspon pràcticament a l'extrem C-terminal (v. taula III-6). A partir d'aquest valor (55) hem estimat el percentatge que correspon a cada un dels aminoàcids presents (v. taula III-6) obtenint un resultat altament remarcable: Si comparem aquests percentatges amb la composició aminoacídica de la proteïna P2 d'*S. plicata* (a la mateixa taula), s'observa una extraordinària correspondència entre els valors trobats en tots dos casos. Creiem que aquest resultat és molt important per les implicacions que pot comportar respecte a l'origen de PEB de tipus especialitzat. Aquesta qüestió es comentarà més endavant amb més detall al capítol corresponent a la discussió.

Taula III-6. Deducció de la composició aminoacídica de l'extrem C-terminal de la P1 d'*Styela plicata* i comparació amb la composició aminoacídica de la P2. N, número d'aminoàcids.

Aminoàcid	(a) P1 (%)	(b) N P1	(c) N globular P1	(d) N C-term. P1	(e) C-term. P1 (%)	(f) P2 (%)
Lys	14.3	19	14	5	9.1	17.4
His	1.1	1-2	2	--	--	--
Arg	32.5	42	8	32	58.2	50.4
Asx	4.5	6	6	--	--	1.2
Thr	1.2	2	1	1	1.8	3.1
Ser	4.6	6	7	--	--	1.1

(segueix)

(cont. taula III-6)

Aminoàcid	(a) P1 (%)	(b) N P1	(c) N globular P1	(d) N C-term. P1	(e) C-term. P1 (%)	(f) P2 (%)
Glx	2.2	3	1	2	3.6	--
Pro	1.4	2	2	--	--	--
Gly	13.2	17	6	11	20	18.7
Ala	7.1	9	7	2	3.6	3.3
Cys	0.7	1	2	--	--	--
Val	4.6	6	6	--	--	--
Met	1.4	2	3	--	--	0.7
Ile	2.4	3	3	--	--	--
Leu	4.5	6	4	2	3.6	3.3
Tyr	2.2	3	4	--	--	0.7
Phe	2.2	3	3	--	--	--

- (a) Composició aminoacídica (mols %) de la P1 (v. taula III-4).
 (b) Número de cada un dels residus aminoacídics de la P1 calculats a partir de la columna (a) i assumint que la P1 té 130 aminoàcids.
 (c) Número de cada un dels residus aminoacídics corresponent a la zona globular de la P1 assumint que aquesta va de l'aminoàcid 3 al 81.
 (d) Diferència (b) - (c); en el cas de l'Arg, a més, s'han restat els dos residus corresponents a l'extrem N-terminal.
 (e) Composició aminoacídica (mols %) de l'extrem C-terminal de la P1 calculada a partir de (d).
 (f) Composició aminoacídica (mols %) de la P2 (v. taula III-4, P2c).

En resum, les PEB d'*S. plicata* consisteixen en tres proteïnes majoritàries (X, P1, P2) i una fracció minoritària consistent en la dotació completa d'histones de tipus somàtic més altres proteïnes de mobilitat diversa. Malgrat no ser completament assimilables a les protamines dels vertebrats, les proteïnes X, P1 i P2 comparteixen alguns trets comuns amb aquelles. Així, no són extraïbles amb AA 35%, no penetren en gels amb SDS i presenten una

composició aminoacídica molt enriquida en aminoàcids bàsics. Respecte a aquesta última característica, la P2 seria, de les tres, la proteïna més semblant a les protamines dels vertebrats ja que la seva basicitat es deu principalment a una gran proporció d'Arg (de l'ordre del 50%), superior a la de les proteïnes X i P1 (de l'ordre del 30%). Les proteïnes X i P1 recordarien més, per la seva composició i estructura, a histones de la família de l'H1 o proteïnes relacionades amb aquestes (com són les PL-I dels mol·luscs). Així, la P1 presenta una zona globular on es concentren els residus hidrofòbics i dues cues on es concentren els aminoàcids bàsics, sent la cua N-terminal extremadament reduïda. La presència de dues cisteïnes a la part globular podria contribuir a l'estabilització d'aquesta regió. D'altra banda, hi ha indicis d'una possible aparició de la proteïna P2 a partir de l'extrem C-terminal de la P1.

Pel que fa a l'altre espècie d'*Styela* estudiada, *S. montereyensis*, podem concloure que, malgrat posseir algunes diferències, el patró en ambdues espècies és molt similar, presentant totes dues protamines dels tipus que hem anomenat P1 i P2.

1.4. Estudi de les PEB d'altres tunicats de la classe Ascidiacea

En vistes a comprovar si el patró trobat al gènere *Styela* era general pels tunicats es va procedir a l'estudi de 7 noves espècies de tunicats que es detallen a continuació (classificació segons Parker et al., 1987):

Classe Ascidiacea

Ordre Enterogona

Subordre Phlebobranchiata

Família Corellidae: *Chelyosoma productum*

Família Ascidiidae: *Ascidia callosa*

Ascidiella aspersa

Phallusia mammillata

(segueix)

(cont.)

Ordre Pleurogona

Subordre Stolidobranchiata

Família Styelidae: *Cnemidocarpa finmarkiensis*

Família Pyuridae: *Pyura haustor*

Boltenia villosa

Després de separar la part masculina de la gònada, es va procedir com sempre a l'obtenció dels nuclis espermàtics (v. figura II-1). En cada cas es va procedir a l'observació amb el microscopi de contrast de fases com a control de l'estat de maduresa dels animals. Com era d'esperar segons els estudis de Franzén (1987) sobre morfologia dels espermatozoides d'ascidiacis, el nucli d'aquestes espècies és de tipus modificat.

1.4.1. Patró general de les PEB de la classe Ascidiacea

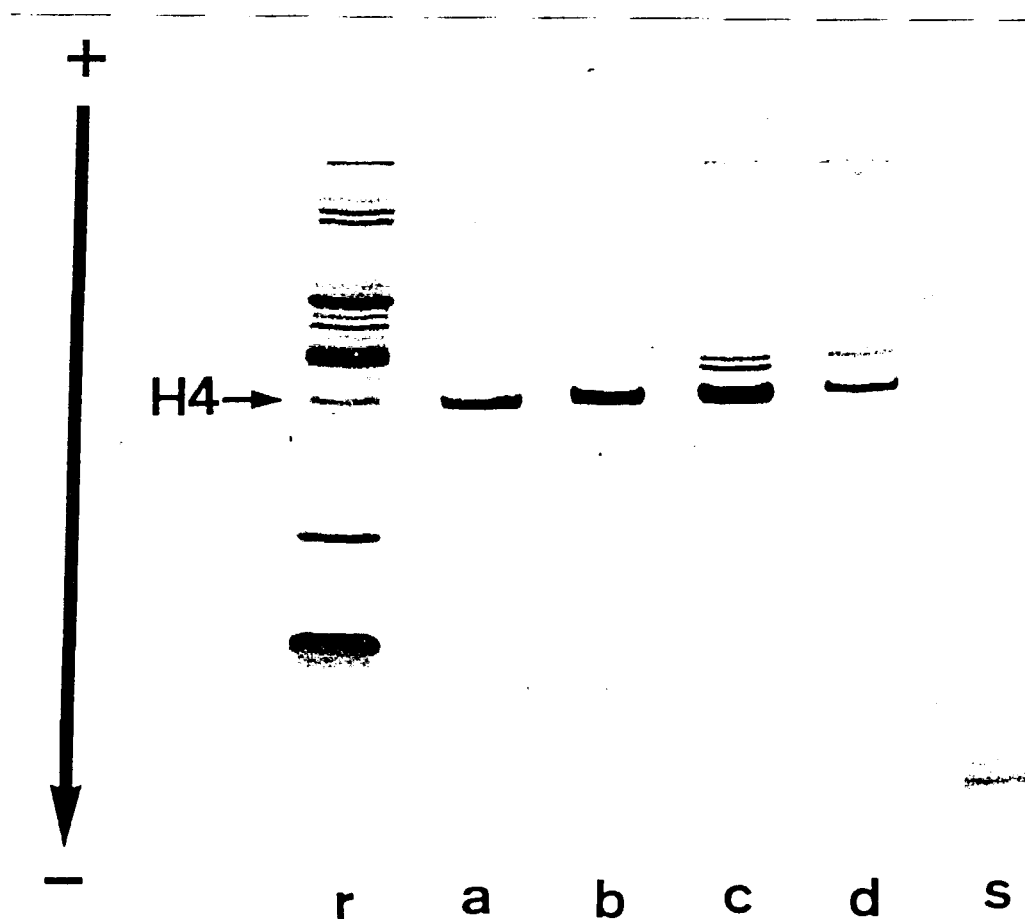
Per aquest estudi es van triar espècies representants de 4 famílies diferents: *Chelyosoma productum* (Corellidae), *Ascidia callosa* (Ascidiidae), *Cnemidocarpa finmarkiensis* (Styelidae) i *Boltenia villosa* (Pyuridae).

Sobre els nuclis espermàtics de les esmentades espècies es va procedir a l'extracció de les proteïnes bàsiques associades de la mateixa manera que en *Styela montereyensis*, és a dir, mitjançant extraccions seqüencials amb PCA 5%, AA 35 % i HCl 0.4 N. Com ja s'havia vist, l'extracte amb HCl 0.4 N contindrà aquelles PEB riques en Arg, mentres que els extractes amb PCA i AA contindran, respectivament, proteïnes de tipus H1 o molt riques en Lys i histones del cor nucleosòmic (moderadament riques tant en Lys com en Arg).

El desenvolupament electroforètic de les proteïnes solubilitzades amb HCl 0.4 N (després de PCA i AA) d'aquestes espècies es mostra a la figura III-17. La similitud entre els patrons de les diferents espècies és realment remarcable, sobretot tenint en compte que provenen de famílies diferents i,

inclús, d'ordres diferents. Totes les espècies posseeixen un component principal amb mobilitat electroforètica similar a la de la histona H4. Aquest component és l'únic present en *A. callosa* i *C. productum* (ambdues espècies pertanyents al subordre Phlebobranchiata, ordre Enterogona), mentre que a *B. villosa* i *C. finmarkiensis* (pertanyents al subordre Stolidobranchiata, ordre Pleurogona) s'observa la presència de petites quantitats de components addicionals d'una mobilitat lleugerament inferior.

Figura III-17. Patrons electroforètics de les PEB de 4 espècies pertanyents a 4 famílies diferents d'ascidiacis (extracte amb HCl post PCA i post AA. a) *Ascidia callosa* (Ascidiidae); b) *Chelyosoma productum* (Corellidae); c) *Boltenia villosa* (Pyuridae); d) *Cnemidocarpa finmarkiensis* (Styelidae). Estàndards: r) histones i protamines d'*Hydrolagus colliei* (condricti); s) protamina (salmina).



Malgrat les PEB d'aquestes espècies presenten una mobilitat electroforètica similar a la de la histona H4, han de ser interpretades com a protamines ja que no es solubilitzen amb AA 35% i, a més, es va comprovar que resultaven insolubles en tampons contenint SDS, com ja havíem observat en *Styela montereyensis*.

Un altre punt relacionat amb la composició protèica del nucli espermàtic és la presència d'histones somàtiques o variants d'aquestes. Es va observar que, mentre que a partir dels nuclis dels espermatozoides de les dues espècies pertanyents als Phlebobranchiata (*A. callosa* i *C. productum*) els extractes amb PCA 5% i AA 35% no mostraven la presència de cap resta d'histones, els pertanyents als Stolidobranchiata (*B. villosa* i *C. finmarkiensis*) sí que contenen molt petites quantitats d'H1 i histones del cor del nucleosoma solubilitzades pels extractes amb PCA i AA, respectivament. De tota manera, les petites quantitats d'aquestes proteïnes respecte les protamines extretes amb HCl indiquen que segurament es tracta de components residuals. Aquest fet concorda amb la quantificació prèvia duta a terme en *Styela montereyensis* on les histones residuals al nucli de l'espermatozoide no representen més del 20-25% del contingut protèic total.

1.4.2. Variabilitat de les PEB dins de les diferents famílies d'ascidiacis

Els resultats de l'última secció indicaven una conservació de les característiques electroforètiques de les protamines dels ascidiacis. No obstant, considerant l'alta variabilitat mostrada per les PEB en general (Kasinsky, 1989), així com el cas previ estudiat entre els tunicats (gènere *Styela*, v. 1.2. i 1.3.), es va considerar oportú, quan va ser possible, l'estudiar altres espècies pertanyents a aquestes famílies per comprovar si es donaven variacions entre les diferents espècies.

1.4.2.1. Família Ascidiidae (subordre Phlebobranchiata, ordre Enterogona)

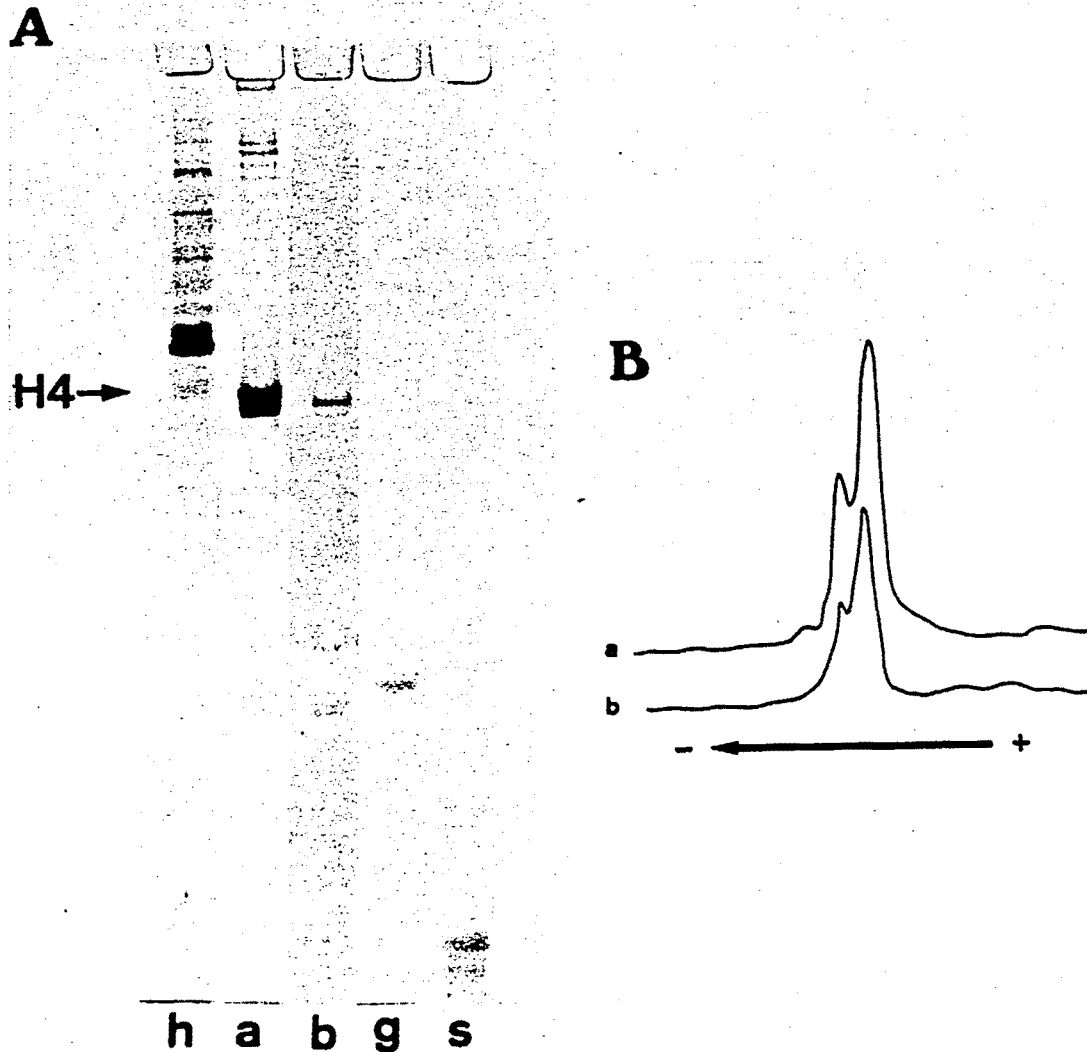
Es va estudiar per electroforesi en gel de poliacrilamida/acètic/urea el contingut protèic bàsic global dels nuclis espermàtics de dues espècies addicionals pertanyents als ascídids: *Ascidiella aspersa* i *Phallusia mammillata*.

Les proteïnes van ser extretes directament amb HCl 0.4 N (sense cap extracció prèvia ni amb PCA ni amb AA). Després de la precipitació, rentat i secat de les proteïnes, aquestes van ser desenvolupades electroforèticament però utilitzant gels més llargs que els utilitzats a l'apartat anterior.

Els perfils electroforètics (figura III-18A) indiquen que els components principals presents en les dues espècies són, igual que en el cas d'*A. callosa*, proteïnes amb mobilitat similar a l'H4. En aquests gels s'observa que aquest component principal pot ser resolt en dues bandes, com s'evidencia millor en la densitometria adjunta (figura III-18, B). Cap d'aquests components és soluble en tampons contenint SDS. No s'observa cap resta d'H1 o d'histones del cor del nucleosoma. Finalment, cal mencionar la presència d'alguns components minoritaris d'elevada mobilitat a *A. aspersa*.

Considerant aquests resultats juntament amb els de la secció anterior, es pot concloure que en les espècies estudiades del subordre Phlebobranchiata, apareixen dos trets interessants. En primer lloc, no es presenten histones al nucli de l'espermatozoide, sent aquestes substituïdes per un component principal. En segon lloc, aquest component principal té una migració electroforètica similar a la de la histona H4 i ha de tenir una composició aminoacídica molt bàsica, com demostra la seva insolubilitat en SDS.

Figura III-18. A. Contingut en PEB de dues espècies de la família Ascidiidae (extracció directa amb HCl 0.4 N). a) *Phallusia mammillata*; b) *Ascidella aspersa*; h, g i s representen estàndards d'histones somàtiques, protamina de gall i salmina, respectivament. B. Densitometria corresponent als pous a i b.

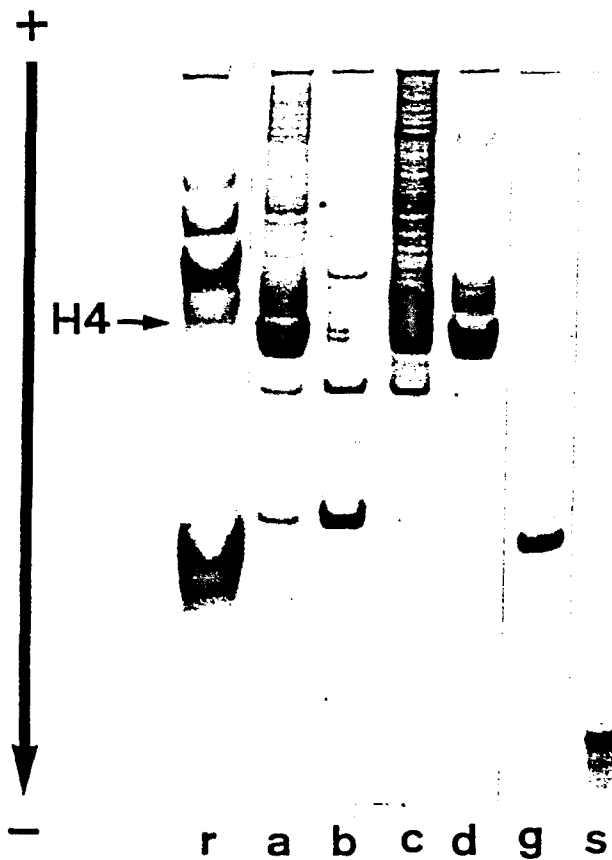


1.4.2.2. Família Pyuridae (subordre Stolidrobranchiata, ordre Pleurogona)

En aquest cas, la nova espècie estudiada va ser *Pyura haustor*. A la figura III-19 apareixen les proteïnes contingudes al nucli espermàtic d'aquesta espècie obtingudes per extracció global amb HCl 0.4 N (sense extraccions

prèvies) (pou a) i per extraccions seqüencials amb PCA, AA i HCl (pous b, c i d, respectivament). L'extracte amb PCA 5% és complex i conté, junt amb restes d'histones tipus H1 riques en Lys, altres components. L'extracte amb AA 35% conté histones residuals i altres bandes protèiques. Finalment, les protamines d'aquest grup (extracte amb HCl 0.4 N) mostren les mateixes característiques generals vistes fins ara que defineixen les protamines dels Phlebobranchiata; igualment, tampoc poden ser desenvolupades en gels de SDS.

Figura III-19. Contingut en PEB de *Pyura haustor* (Pyuridae, Stolidobranchiata). a) Extracte directe amb HCl 0.4 N (contingut protèic global); b) Extracte amb PCA 5%; c) Extracte amb AA 35% després de PCA; d) Extracte amb HCl 0.4 N després d'AA. Els carrils r, g i s contenen estàndard d'histones més una protamina d'*Hydrolagus colliei*, gallina i salmina, respectivament.



1.4.2.3. Família *Styelidae* (subordre *Stolidobranchiata*, ordre *Pleurogona*)

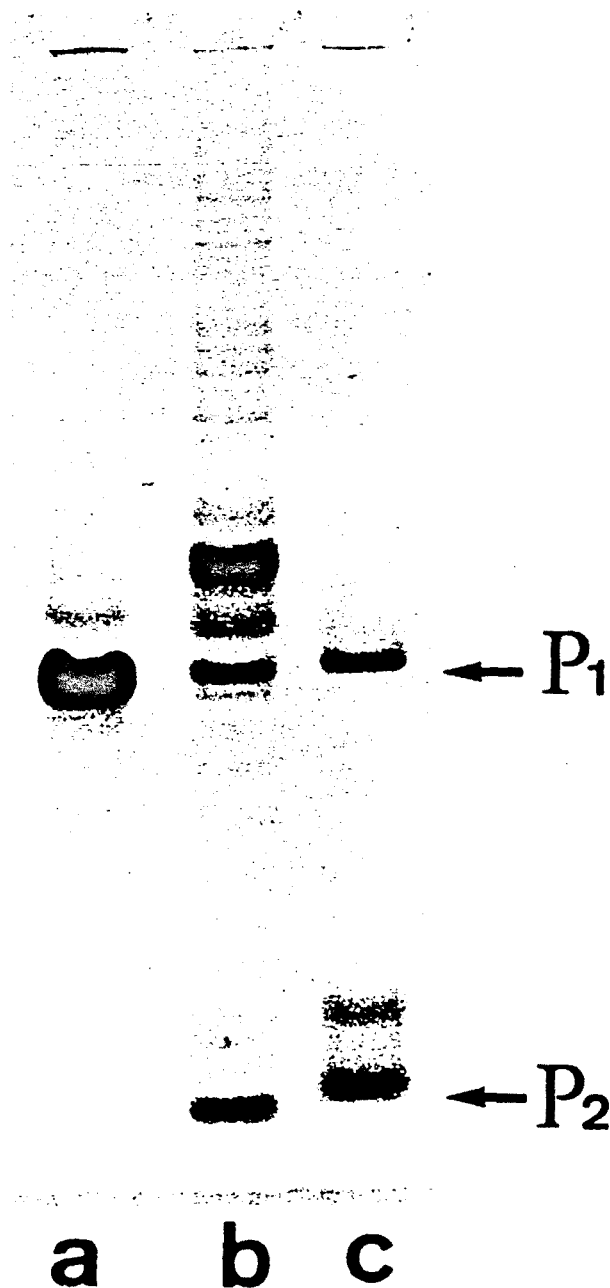
No s'ha estudiat cap espècie addicional pertanyent a aquesta família. No obstant, comparant els dos gèneres estudiats, *Styela* i *Cnemidocarpa* (v. 1.2., 1.3. i 1.4.1.), destaca el fet que es presentin patrons electroforètics ben diferenciats, quan entre les altres famílies l'homogeneïtat és la tònica general.

En resum, i com a conclusió, es poden definir una sèrie de característiques pel que fa a les PEB dels tunicats. En primer lloc i referent a la substitució de les histones somàtiques durant l'espermioquèsi, hem observat que les protamines les substitueixen completament als *Phlebobranchiata*. Als *Stolidobranchiata*, no obstant, s'han trobat restes d'histones, encara que és difícil de decidir l'origen d'aquestes (contaminació d'altres teixits o bé substitució no completa per part de les protamines). En qualsevol cas, aquestes restes d'histones sempre s'han presentat en molt petita quantitat en comparació amb les protamines, de manera que es pot dir que les protamines substitueixen, almenys, la major part de les histones durant l'espermioquèsi.

Pel que fa a la constància en el patró de proteïnes presentat, podem dir que, al nivell estudiat, els tunicats presenten poca variabilitat en el contingut i característiques de les seves protamines, amb l'única excepció del gènere *Styela*, que presenta algunes peculiaritats. Així, en totes les famílies estudiades (incloent-hi la família *Styelidae*) es presenta sempre un tipus de protamina amb mobilitat similar a la histona H4 (la que hem denominat P1 a l'apartat 1.3.) i que podríem considerar com la protamina característica dels tunicats. En canvi, a les dues espècies estudiades del gènere *Styela* (*S. montereyensis* i *S. plicata*), juntament amb la P1 apareixen també protamines de major mobilitat (P2). A més, aquestes dues espècies presenten diferències entre elles mateixes majors que les observades entre les altres espècies. Així, mentre que a *S. montereyensis* apareixen la P1, la P2 i una altra proteïna de mobilitat lleugerament inferior a la d'aquesta última (figura III-20, c), els tres components majoritaris d'*S. plicata* són la P1, la P2 i una proteïna de mobilitat lleugerament inferior a la P1 (figura III-20, b). Aquesta variabilitat de *Styela*, no obstant, només sembla característica d'aquest gènere, i no és repre-

sentativa de la línia dels tunicats (cal tenir en compte que en l'altra espècie estudiada d'aquesta família, *Cnemidocarpa*, es presentava el patró general dels tunicats).

Figura III-20. Comparació entre el patró de protamines típic dels ascidiacis amb els de 2 espècies del gènere *Styela*. a) *Pyura haustor*; b) *Styela plicata*; c) *Styela montereyensis*.

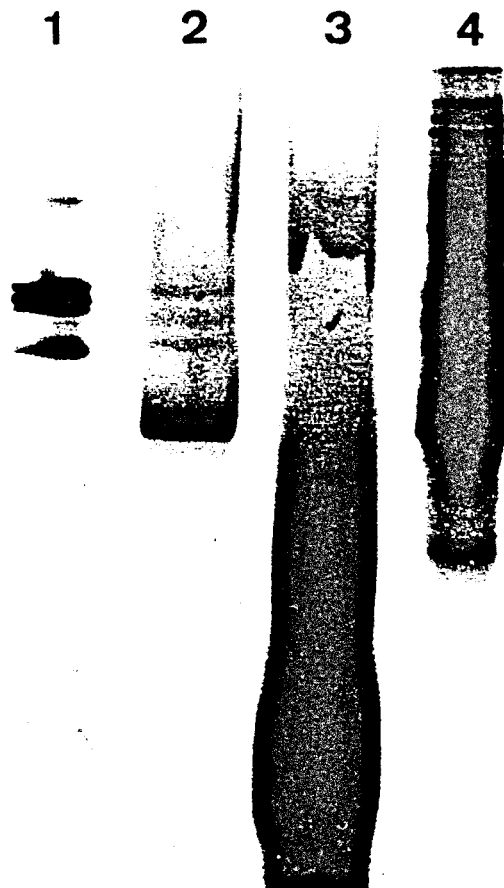


1.5. Estudi de les PEB de la classe Thaliacea (salpes)

Es va aconseguir esperma i gònada masculina de la salpa *Thalia democratica*. No obstant, la mostra de partida era tan escassa que es va optar per realitzar una extracció directa amb HCl 0.4 N, sense aïllar els nuclis prèviament.

Tot i així, després de fer l'electroforesi en gel de poliacrilamida / acètic / urea, les tincions convencionals es van mostrar incapaces de detectar cap banda; per aquesta raó es va recórrer a la tinció amb sensibilitat incrementada de Wray i Stubblefield (1970): Després de tenyir i destenyir amb Amido black seguint els sistemes convencionals i comprovar que no es detectava cap banda, es va retenir i destenyir el gel seguint el mètode esmentat (v. II-3.1.4.2.).

Figura III-21. PEB de la salpa *Thalia democratica* (2) comparades amb patrons d'histones de pollastre (1), salmina (3) i les PEB de l'amfiox *Branchiostoma floridae* (4). El gel va ser tenyit segons el protocol de Wray i Stubblefield (1970).



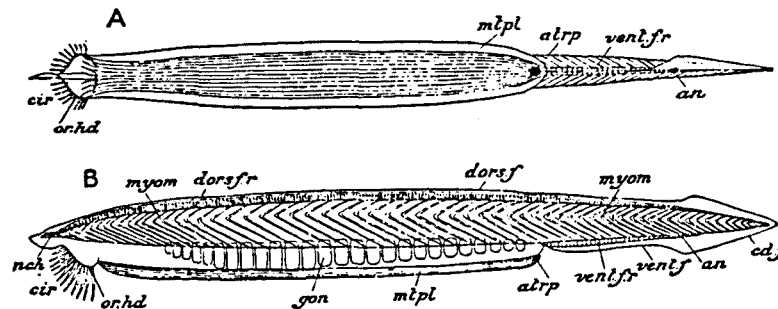
Efectivament, aquest mètode es va mostrar capaç de detectar les PEB d'aquesta espècie. Els resultats es mostren a la figura III-21. En aquesta figura s'observa la presència a *Thalia* d'una banda majoritària de mobilitat electroforètica una mica superior a la de les histones, i tres bandes menys intenses cap a la zona de les histones. Es presenten també altres bandes minoritàries (v. figura III-21, 2). Curiosament aquest patró recorda molt al trobat a l'amfiox (figura III-21, 4) (v. també apartat III-2).

2. Proteïnes espermàtiques bàsiques als cefalocordats

2.1. Introducció

Els cefalocordats són petits animals marins d'aspecte similar al dels peixos (figura III-22) sovint coneguts pel nom genèric d'amfioxos.

Figura III-22. Vista ventral (A) i lateral (B) d'un cefalocordat. *an*, anus; *atrp*, atriopòr; *cd. f.*, aleta caudal; *cir*, cirres; *dors. f.*, aleta dorsal; *gon*, gònades; *mtpl*, metapleura; *myom*, miòmers; *nch*, notocorda; *or. hd.*, cirres peribucals; *vent. f.*, aleta ventral; *vent. f. r.*, radis de l'aleta ventral (Tret de Parker et al., 1987).



Els cefalocordats o acranis es consideren procordats, igual que els tunicats. Encara que la seva història zoològica ha estat molt controvertida (havien estat inclús classificats com a gastròpodes), actualment se sap que els cefalocordats i els vertebrats comparteixen atributs indicatius d'una estreta relació entre ells. Pel que fa a la seva posició, sembla més probable que els cefalocordats siguin una branca separada i especialitzada de l'estoc que va

donar lloc als vertebrats, que no pas el que siguin una branca degenerativa del propi estoc principal dels vertebrats (Willmer, 1990). La interessant posició filogenètica d'aquest grup, juntament amb el fet de no haver estat mai estudiades les seves PEB, feien molt atractiu la seva caracterització bioquímica.

El grup dels cefalocordats comprèn tan sols dos gèneres: *Branchiostoma*, amb unes 15 espècies (una de les quals, *B. floridae*, és la que hem estudiat nosaltres), i *Epigonichthys* (= *Asymmetron*, *Heteropleuron*), que en comprèn 5 més (Nelson, 1984).

2.2. Caracterització de les PEB

A partir de l'esperma obtingut de l'espècie *Branchiostoma floridae* i conservat en etanol al 90%, es va procedir a la separació dels nuclis dels espermatozoides i a extreure'n les proteïnes bàsiques associades. L'obtenció dels nuclis es va dur a terme segons el procediment descrit a II-2.2. i per l'extracció de proteïnes, degut a la poca quantitat de mostra, es va procedir a realitzar una solubilització de les proteïnes directament amb HCl 0.4 N, sense cap altre extracció prèvia ni amb PCA ni amb AA. Un cop precipitades, rentades i assecades, aquestes proteïnes van ser analitzades en gels de poliacrilamida/acètic/urea.

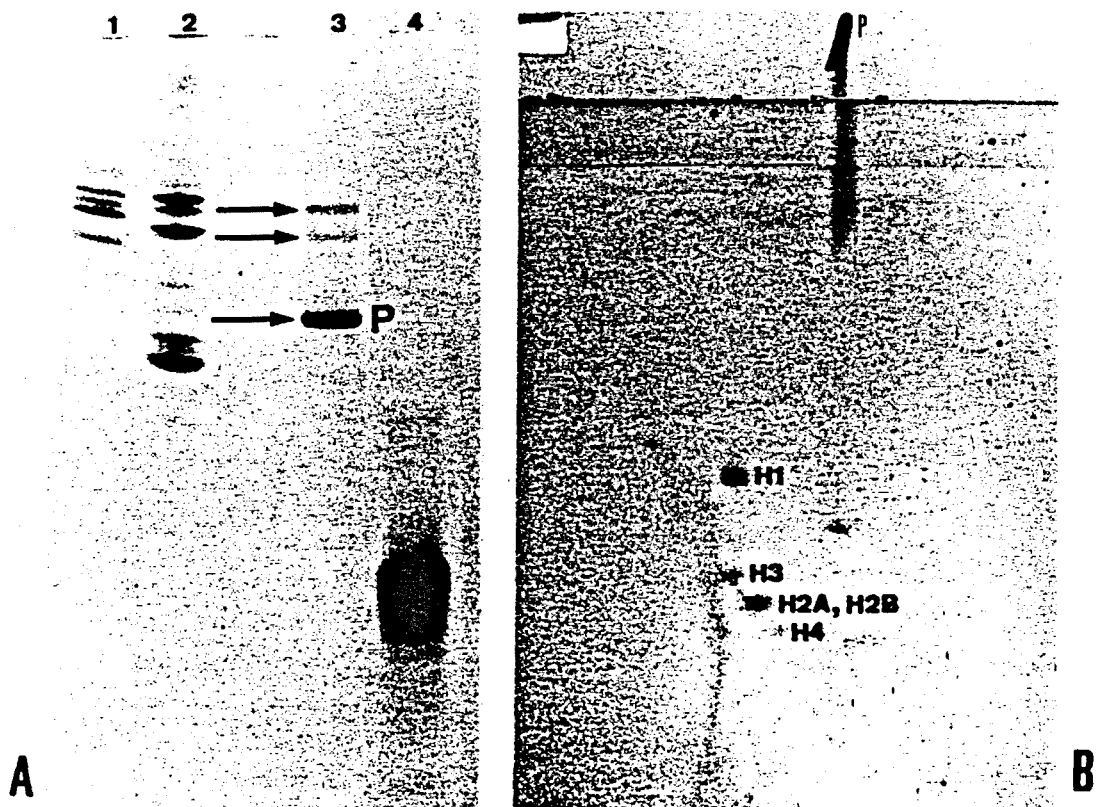
A la figura III-23 (A) s'observa el patró electroforètic obtingut. Com es pot apreciar, la dotació protèica de l'espermatozoide de *B. floridae* és molt senzilla, consistint bàsicament en 3 bandes principals una de les quals domina clarament (v. fletxes). Dues d'aquestes bandes electroforètiques migren a la zona de les histones mentre que la tercera i més abundant (P) migra per sota d'elles (amb una mobilitat intermitja entre les proteïnes d'*Styela* que hem anomenat P1 i P2; v. pou 2 de la mateixa figura).

En una anàlisi bidimensional amb primera dimensió amb GPAU i segona dimensió amb un gel contenint SDS, s'observa com totes les proteïnes

de *B. floridae* penetren en la segona dimensió, excepte la proteïna majoritària de major mobilitat (P), que es mostra quasi totalment insoluble en SDS (figura III-23, B). Aquest fet va fer-nos sospitar que devia de tractar-se d'una proteïna enriquida en Arg. D'altra banda, l'anàlisi bidimensional va permetre'ns comprovar que les bandes de menor mobilitat eren histones remanents (figura III-23, B). D'entre elles destaquen la quantitat d'H1 i el conjunt H2A-H2B.

Les proporcions relatives d'aquests dos grups de proteïnes van ser calculades per densitometria. Els resultats indiquen que la proteïna P es troba en una proporció d'un 80%, mentre que les restes d'histones constitueixen aproximadament el 20% del total de proteïnes bàsiques de l'espermatozoide.

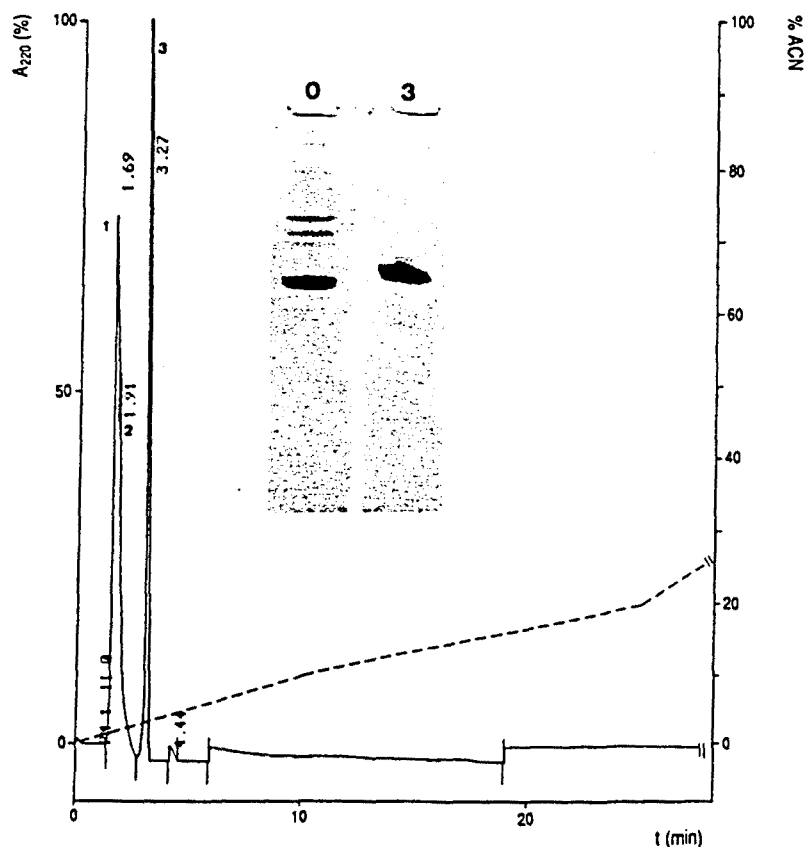
Figura III-23. PEB del cefalocordat *Branchiostoma floridae*. A. Desenvolupament en GPAU de les PEB globals de *B. floridae* extretes amb HCl 0.4 N (3) comparada amb un estàndard d'histones d'eritròcit de pollastre (1), amb la protamina salmuna (4) i amb les PEB de *Styela plicata* (tunicat) de l'extracte HCl post AA (2) (v. també apartat 1.3.). B. Desenvolupament bidimensional de les PEB de *B. floridae*. Primera dimensió com a A i segona dimensió en SDS.



Per poder determinar amb exactitud la naturalesa de la proteïna majoritària de *B. floridae*, es va procedir a la seva purificació per HPLC en fase reversa. La columna utilitzada va ser una Spherisorb C18, ODS2, 4.6 x 150 mm, 5 µm, i les proteïnes es van eluir aplicant un gradient d'acetonitril contenint TFA 0.05%. Aquesta separació es va realitzar als Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

El perfil obtingut es mostra a la figura III-24 juntament amb el control electroforètic on es presenta la proteïna purificada. A partir d'aquesta proteïna així com del conjunt de les proteïnes extretes amb HCl 0.4 N es van dur a terme les anàlisis d'aminoàcids corresponents. Els resultats d'aquestes anàlisis es mostra a la taula III-7.

Figura III-24. Separació per HPLC de les PEB de *B. floridae*. 0. Proteïnes globals extretes amb HCl 0.4 N; 3. Proteïna corresponent al pic 3. Als pics 1 i 2 no va aparèixer cap proteïna en proporcions detectables.



De l'anàlisi de la taula III-7 es dedueix que la principal proteïna del cefalocordat *B. floridae* és d'una naturalesa molt particular. Es tracta d'una molècula amb molt poca diversitat de residus aminoacídics (només 6 tipus de residus) dels quals la meitat corresponen a aminoàcids bàsics repartits en proporcions equivalents entre l'Arg (25.3%) i la Lys (24.7%). Destaquen també en quantitat l'aminoàcid fosforilable Ser (16.5%) i l'Ala (21.7%), mentre que hi ha quantitats moderades de Pro (5.6%) i de Gly (6.1%). Segons aquestes característiques, i seguint el criteri de Subirana (1983), aquesta proteïna pot ser classificada com a protamina. D'altra banda, considerant la seva mobilitat electroforètica i la seva càrrega es pot deduir que es tracta d'una molècula força més gran que les protamines típiques. Finalment, és curiós destacar el fet que la composició d'aquesta molècula (taula III-7, b) recorda molt la de les PEB anomenades PL-III d'alguns bivalves (taula III-7, c, d).

Taula III-7. Anàlisi composicional (mols %) de les PEB de *B. floridae*. (a) PEB globals (extracte HCl 0.4 N); (b) proteïna majoritària de major migració (figura III-24, 3). Aquestes anàlisis recorden molt les de les PL-III d'alguns bivalves: (c) PL-III de *Crenomytilus grayanus*; (d) PL-III de *Macoma* sp.

Aminoàcid	(a)	(b)	(c)	(d)
Lys	27.6	24.7	25.4	25.2
His	0.4	--	--	0.2
Arg	18.0	25.3	26.5	27.9
Asx	1.4	--	0.9	3.5
Thr	0.9	--	3.4	--
Ser	9.6	16.5	15.6	28.7
Glx	2.4	--	0.9	0.9
Pro	5.1	5.6	5.1	0.6
Gly	5.6	6.1	6.5	1.8
Ala	23.4	21.7	12.9	9.5
Cys	--	--	--	--
Val	1.5	--	1.5	0.4
Met	0.4	--	--	0.1
Ile	1.0	--	0.4	0.5
Leu	1.7	--	0.6	0.5
Tyr	0.6	--	0.1	0.1
Phe	0.5	--	0.1	0.2

(c) Tret d'Odintsova et al., 1981.

(d) Tret d'Ausió, 1989.

Malgrat la mostra de partida era molt minça i per tant ens era impossible efectuar un estudi global de la seqüència, vam voler seqüenciar l'extrem N-terminal de la proteïna P amb el propòsit de comparar aquesta part de la molècula amb la corresponent de les protamines dels peixos ossis ja que, *a priori*, podria haver una relació evolutiva entre unes i altres (v. també figura III-1). Ja hem vist a la introducció que les protamines dels peixos poseeixen un extrem N-terminal del tipus P(A)-R₍₄₋₅₎-S(A)-S, és a dir, el primer residu és una Pro (o una Ala de vegades), seguida per un grup de 4 o 5 arginines i, generalment, un dímer (o trímer) de serines (v. figura I-7).

La seqüència dels primers aminoàcids de la proteïna P de l'amfiox es va obtenir mitjançant la utilització d'un seqüenciador automàtic en fase gasosa Applied Biosystems 470A (v. II-3.8.) i va mostrar posseir una organització ben diferent de la present als teleostis (figura III-25, A): Encara que la molècula sembla començar pel mateix aminoàcid, immediàtament apareix una zona d'alternància Arg-Ser. Aquest fet és molt interessant ja que aquests motius alternants Arg-Ser han estat constatats a l'extrem N-terminal d'un considerable número de protamines (o PEB) de grups zoològics molt dispers i allunyats filogenèticament (però mai formant part de les protamines típiques dels peixos ossis). Així, per exemple, els estudis de Daban (1991) amb la P2 de *Monodonta turbinata* (mol·lusc gastròpode) i Carlos et al. (1993b, en premsa) amb la PL-II de *Mytilus californianus* (mol·lusc bivalve) van evidenciar la presència d'aquesta alternància a l'extrem N-terminal de les esmentades proteïnes (v. figura III-25, B); també es pot trobar aquest motiu, entre d'altres exemples, en la protamina Z3 del tauró *Scyliorhinus canicula* (Sautière et al., 1981) (v. figura III-34) o en les protamines d'aus (*Gallus domesticus*, Oliva i Dixon, 1989; *Coturnix japonica*, Oliva et al., 1989) (v. figures I-13-A i III-25-B), sempre a la part N-terminal. La presència d'aquest motiu alternant en grups filogenèticament tan diversos, i en "protamines" tan diferents, ha de considerar-se, doncs, com una convergència evolutiva i apunta cap a la possibilitat que aquesta repetició a l'extrem amino terminal posseeixi alguna significació funcional especial (aquestes repeticions possiblement adoptin una configuració en colzes beta; Daban, 1991).

-
- (A) 1 5
 G/P R S R S R S A S
- (B) a) 9 aa - R-S-R-S-R-S-R-K-S-R-S-R-S-R-S-(...)
 b) P-S-P-S-R-R-S-R-S-R-S-R-S-R-S-K-S-(...)
 c) 4 aa - R-S-R-T-R-S-R-S-P-R-S-(...)
-

Figura III-25. A. Seqüència N-terminal de la proteïna P de l'amfiox *Branchiostoma floridae*. B. Alguns exemples d'extrems N-terminals de PEB posseïdores de l'alternància Arg-Ser. a) P2 de *Monodonta turbinata* (Daban, 1991); b) PL-II de *Mytilus californianus* (Carlos et al., 1993); c) Protamina de *Gallus domesticus* (Oliva i Dixon, 1989). aa, aminoàcids.

En resum, al nucli de l'espermatozoide de *B. floridae* hi trobem, bàsicament, una proteïna majoritària incapaç de penetrar en gels de SDS i de mobilitat entre les histones i la salmina (encara que molt més pròxima a aquelles), i, en segon lloc, restes d'histones remanents. La proteïna majoritària de *B. floridae* comparteix algunes característiques amb les protamines típiques dels peixos teleostis, com és la baixa diversitat de residus aminoacídics, la gran basicitat i la riquesa en Ser. No obstant, es diferencia d'aquelles en altres aspectes: En primer lloc hi ha una diferència molt important en la distribució de la basicitat de la molècula; mentre que en les protamines típiques la basicitat es deu fonamentalment a l'Arg, aquí es troba repartida en parts iguals entre l'Arg i la Lys. D'altra banda, la protamina de l'amfiox presenta una riquesa en Ala atípica en protamines de teleostis, i una mida molt superior a la d'aquestes. Finalment, l'alternància R-S que apareix en el seu extrem N-terminal no s'ha descrit en les protamines típiques dels teleostis.

3. Proteïnes espermàtiques bàsiques als agnats

Aquest és un altre gran grup d'animals dels quals no s'havia estudiat abans les proteïnes bàsiques associades a la cromatina del nucli de l'espermatozoide. Els agnats són el grup més primitiu d'entre els vertebrats (els primers representants d'aquest grup foren animals bentònics d'aigua dolça del Silúric; Parker et al., 1987). Per tant, la caracterització de les seves PEB ens resultava particularment atraient.

Dins dels agnats es distingeixen dues classes, cada una d'elles contenint un sol ordre representat a l'actualitat (Nelson, 1984):

Superclasse Agnatha

Classe Myxini

Ordre Myxiniformes

Classe Cephalaspidomorphi

Ordre Petromyzontiformes

Nosaltres vam poder accedir a exemplars representants d'un d'aquests ordres, els Petromyzontiformes. Concretament, es van aconseguir mostres d'esperma i testicle de *Petromyzon marinus*. L'aspecte dels espermatozoides d'aquesta espècie es pot apreciar a la figura III-26.

Contingut protèic

Els nuclis espermàtics d'aquesta espècie van ser aïllats com es descriu a II-2.2. i es va procedir seguidament a una extracció de les proteïnes nuclears bàsiques globals amb HCl 0.4 N (v. II-2.3.). El control electroforètic de les proteïnes solubilitzades per aquest sistema es mostra a la figura III-27(A). Com no existia cap informació referent a si en aquest grup es presentaven o no

proteïnes queratinoses (amb Cys) que poguessin resistir-se a l'extracció àcida, es va procedir a reduir i alquilar la mostra després de la primera extracció (v. II-2.6.2.1., mètode 1) i a continuació es va reextreure altre cop amb HCl 0.4 N. Aquest procediment no va evidenciar noves bandes protèiques.

Figura III-26. Espermatozoides vius de la llampresa *Petromyzon marinus* observats al microscopi de contrast de fases. La fletxa assenyala un eritròcit. (100x). Fotografia cedida per la Dra. E. Rosenberg.



Als GPAU convencionals (15% d'acrilamida, urea 6 M; v. II-3.1.1.1.) s'observa com es mantenen les histones als espermatozoides però com, ademés, apareix una banda addicional de menor mobilitat (fletxa a la figura III-27, A).

En un primer moment es va pensar que aquesta banda de baixa migració podria correspondre a una proteïna especial específica del nucli espermàtic. No obstant, un experiment posterior va revelar que aquest no era el cas. Així, si la mostra de proteïnes totals obtinguda era reduïda amb 2-mercaptoetanol en condicions desnaturalitzants (v. protocol II-2.6.1.), aquesta banda desapareixia tant a la mostra provinent de gònada com la d'esperma (figura III-27, B). Per tant, vam suposar que en realitat no es tractava de cap

nova proteïna específica sinó possiblement d'una forma agregada d'alguna histona.

Figura III-27. PEB de la llampresa *Petromyzon marinus*. A. Extracte global amb HCl 0.4 N (GPAU, 6 M urea). B i C. Efecte de la reducció mostrat en GPAU amb urea 6 M i 2.5 M, respectivament. E, esperma; Er, esperma reduït; G, gònada; Gr, gònada reduïda. Estàndards: h, histones d'eritròcit de pollastre; p, protamina (salmina).



El pas següent va consistir en averiguar quina era la histona implicada en aquest procés. D'aquesta manera vam provar de desenvolupar les mateixes mostres que a la figura III-27 (B) en un GPAU però aquest cop contenint urea 2.5 M, condicions en les que es resolen millor les histones (Panyim i Chalkley, 1969; Hardison i Chalkley, 1978). Com s'observa a la figura III-27 (C), efectivament la resolució és millor (comparar, per exemple, el pou h amb el de la figura A). No obstant, tot i que es veu al pou Er (esperma reduït) que a la zona de les histones apareix una banda que no s'observa al pou E (esperma sense reduir) (v. fletxes), no queda clar si aquesta banda correspon a l'H3 o l'H2B.

Per aquesta raó es va realitzar un experiment anàleg però aquest cop utilitzant gels amb tritó. En aquest tipus de gel es va poder veure finalment amb certesa que la histona en qüestió era l'H3. A la figura III-28 (A) s'observa com en condicions reductores apareixen només les 5 histones canòniques mentre que, quan no es redueix l'H3, aquesta origina l'aparició de la banda de baixa mobilitat que observàvem als gels d'acètic/urea així com d'altres en menor quantitat (v. fletxes). A la part B1 de la mateixa figura es mostra el desenvolupament bidimensional de la fracció corresponent a la mostra d'esperma reduït.

Fraccionament cromatogràfic

En algunes espècies d'equinoderms s'ha descrit el manteniment d'histones al nucli de l'espermatozoide però, sovint, amb la presència de variants de l'H2B i H1 específiques de l'esperma (Subirana, 1970; Zalenskaya i Zalensky, 1980; Zalenskaya et al., 1980). Aquestes proteïnes, més bàsiques, assolirien una major neutralització de les càrregues negatives del DNA que les seves homòlogues somàtiques, fet que ajuda a aconseguir una major compactació del nucli. Per descobrir si les histones presents a l'esperma de la llamprena eren de tipus somàtic o bé variants específiques, es va procedir a la seva separació per HPLC en fase reversa i a l'anàlisi de la seva composició aminoacídica.

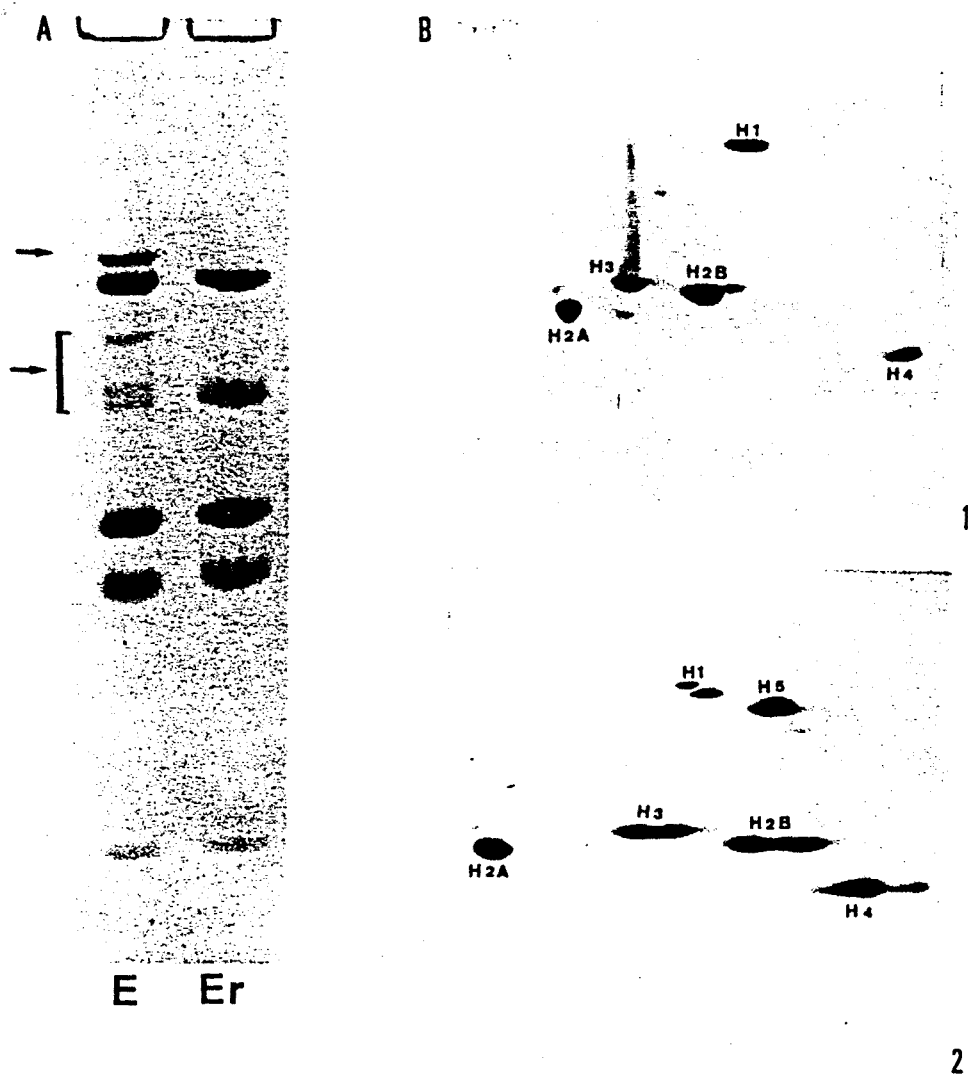


Figura III-28. A. GPTU de les PEB de *Petromyzon marinus* amb i sense tractament reductor amb 2-mercaptoetanol (E, esperma; Er, esperma reduït). B. Bidimensional de la mostra Er (1) comparada amb la d'histones d'eritròcit (2) utilitzada com a patró. Primera dimensió en tritro/urea, segona dimensió en SDS.

Per la purificació de les histones es va utilitzar una columna Vydac C4, 4.6 x 250 mm, 5 μ m, 300 Å. La mostra es va injectar dissolta en acetonitril al 25% i, per la seva elució, es va aplicar un gradient d'acetonitril contenint TFA 0.1%. A la figura III-29 es mostra el gradient aplicat (Gatewood et al., 1990) així com el perfil cromatogràfic obtingut i el control electroforètic de les proteïnes corresponents a cada pic.

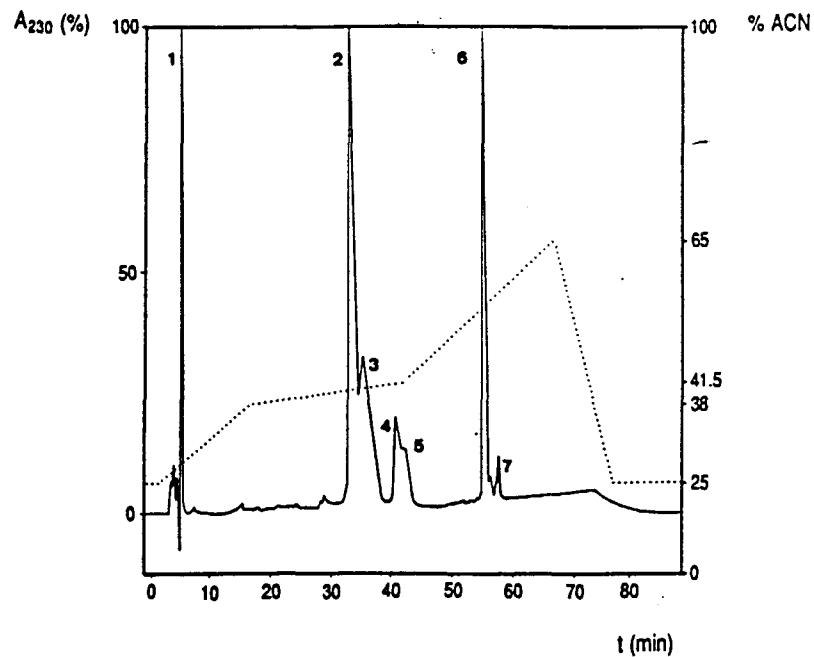


Figura III-29. Perfil cromatogràfic obtingut per HPLC en fase reversa a partir de la dotació global de PEB de *P. marinus*, i control electroforètic de les histones separades d'aquesta manera. 0, mostra de partida; M, monòmer; D, dímer.

Les histones purificades d'aquesta manera van ser seguidament analitzades composicionalment. Els resultats d'aquestes anàlisis es mostren a la taula III-8. Com es pot apreciar, no s'observa cap diferència notable amb les histones somàtiques estàndard que permeti identificar alguna de les histones de *P. marinus* com a una variant específica de l'esperma.

En resum podem dir, doncs, que a *Petromyzon marinus*, tot i pertànyer ja al grup dels vertebrats, no es detecta l'aparició de protamines ni de variants específiques de l'esperma sinó que es manté una dotació d'histones de tipus canònic.

Taula III-8. Composicions aminoacídiques de la dotació d'histones del nucli espermàtic de la llampresa *Petromyzon marinus* (L) comparades amb les histones de timus de vedella (T) (Mayes i Johns, 1982).

Aminoàcid	H1		H2A		H2B		H3		H4	
	L	T	L	T	L	T	L	T	L	T
Lys	27.6	26.8	9.7	10.2	14.1	14.1	8.3	10.0	10.4	11.4
His	—	—	1.6	3.1	3.3	2.3	1.7	1.7	1.8	2.2
Arg	2.2	1.8	9.8	9.4	8.2	6.9	13.8	13.0	13.4	12.8
Asp	3.9	2.5	6.3	6.2	4.8	5.0	4.2	4.2	4.8	5.2
Thr	3.6	5.6	3.2	3.9	6.6	6.4	7.5	6.8	6.7	6.3
Ser	7.3	5.6	5.2	3.4	10.3	10.4	4.5	3.6	2.0	2.2
Glu	4.7	3.7	9.4	9.8	6.4	8.7	12.0	11.6	6.5	6.9
Pro	9.7	9.2	4.1	4.1	6.2	4.9	4.5	4.6	1.4	1.5
Gly	4.0	7.2	11.4	10.8	5.9	5.4	5.6	5.4	16.8	14.9
Ala	21.8	24.3	13.1	12.9	11.6	10.8	13.3	13.3	7.9	7.7
Cys	—	—	—	—	—	—	0.6	1.0	—	—
Val	6.8	5.4	7.2	6.3	6.0	7.5	4.2	4.4	8.1	8.2
Met	—	—	0.5	—	2.1	1.5	0.8	1.1	0.2	1.0
Ile	1.1	1.5	3.7	3.9	5.8	5.1	4.7	5.3	5.5	5.7
Leu	5.3	4.5	11.9	12.4	4.5	4.9	8.9	9.1	8.6	8.2
Tyr	0.8	0.9	2.3	2.2	2.8	4.0	2.2	2.2	3.6	3.8
Phe	1.1	0.9	0.9	0.9	1.6	1.6	3.3	3.1	2.1	2.1

4. Proteïnes espermàtiques bàsiques als holocèfals (condrictis)

4.1. Justificació

Entre els condrictis s'han estudiat a nivell de tincions citoquímiques les espermiogènesis d'algunes, encara que poques, espècies (Bols i Kasinsky, 1974, 1976). No obstant, a nivell de caracterització bioquímica, el coneixement de les "protamines" dels condrictis es basa en els estudis efectuats sobre una única espècie: *Scyliorhinus canicula*.

Segons els resultats d'aquests estudis, els canvis en les proteïnes bàsiques nuclears durant l'espermiogènesi d'aquesta espècie són força diferents, com veurem, al que es dona als peixos ossis. Gusse i Chevaillier (1978, 1981) van mostrar com durant les primeres modificacions de l'estructura de la cromatina, en les espermàtides primerenques apareixien dues noves proteïnes nuclears bàsiques (S1 i S2) que substituïen parcialment les histones però que, en estadis més avançats de l'espermiogènesi, elles eren alhora substituïdes per altres proteïnes bàsiques ("protamines"). D'aquesta manera, al nucli de l'espermatozoide es presenten al final 4 protamines: Z1, Z2, Z3 i S4. D'aquestes, les Z1, Z2 i S4 contenen quantitats elevades de cisteïna i no poden ser extreïdes del nucli sense una reducció prèvia; en canvi, la Z3 no conté cisteïna i, a més, per les seves característiques (molècula curta i amb gran contingut d'arginina), s'ha intentat relacionar amb les protamines verdaderes dels peixos ossis. Així, s'ha suggerit que la Z3 i les protamines dels teleostis es van originar molt probablement a partir de la mateixa seqüència ancestral de DNA abans de la divergència entre condrictis i osteïctis durant el Devònic. En canvi, no s'han trobat identitats significatives entre les Z1, Z2 i S4, ni entre aquestes i les protamines dels teleostis. De fet, es creu que les proteïnes Z1, Z2 i S4 tindrien un origen independent entre sí a partir de diferents famílies de gens. Per la seva banda, la S1 i S2 no es troben relacionades estructuralment amb les protamines de l'esperma i no poden ser considerades com els seus precursors (Chauvière et al., 1989).

Malgrat la profunditat d'aquests estudis, el fet que *S. canicula* hagi estat l'única espècie estudiada dins dels condriactis no permet generalitzar els resultats per tot el grup. Nosaltres hem estudiat les PEB d'una altra espècie, *Hydrolagus colliei*. Aquesta espècie és un holocèfal (O. Chimaeriformes) i ha estat escollida perquè els holocèfals i els elasmobranquis (on s'inclou *S. canicula*) van divergir molt aviat (Nelson, 1984), sent considerats els holocèfals com a més primitius (Schaeffer, 1981). Per tant, la comparació de les proteïnes d'*H. colliei* i *S. canicula* pot donar una valuosa informació sobre els caràcters comuns d'aquestes molècules en les fases primerenques de l'evolució dels condriactis i permetre la comparació d'aquestes amb les protamines dels teleostis. Cal tenir en compte que el llarg temps d'evolució dels holocèfals i elasmobranquis per separat pot haver originat diferències importants entre ambdós grups.

4.2. Proteïnes nuclears espermàtiques i testiculars

Els estudis citoquímics previs (Bols i Kasinsky, 1976) apuntaven cap a una substitució de proteïnes durant l'espermioquèsi d'*Hydrolagus colliei*. En aquest treball es va intentar seguir els canvis globals en el contingut de proteïnes nuclears en diversos estadis espermioquènics, disseccionant diferents zones testiculars corresponents a progressius passos de la diferenciació gonadal (Stanley, 1963, 1966; Bols i Kasinsky, 1976), així com a partir d'esperma obtingut separatament de l'epidídim i part anterior i posterior de l'ampulla ductus deferentis (v. figura III-30). Els controls al microscopi òptic corresponents a les zones testiculars utilitzades per l'anàlisi de les proteïnes bàsiques nuclears van ser efectuats pels doctors Bols i Kasinsky i s'han inclòs a la figura III-31.

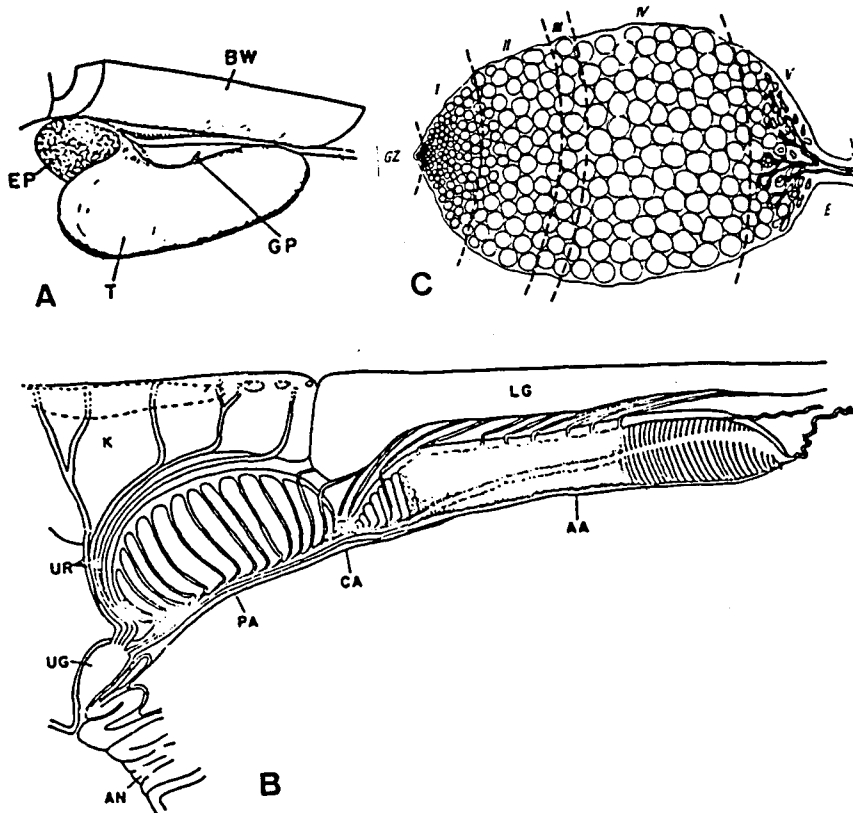


Figura III-30. Aparell reproductor masculí d'*Hydrolagus colliei*. A. Representació del testicle i l'epidídim d'*H. colliei*. B. Representació de l'ampulla ductus deferentis d'*H. colliei*. Els espermatozoides alliberats a l'epidídim seran conduïts a través de l'ampulla ductus deferentis fins al sinus urogenital. C. Zonació germinativa del testicle dels condriectis. En tots els condriectis es dona una zonació del testicle i la presència de fol·licles que contenen elements germinals en el mateix estadi de desenvolupament. Aquests es van produint continuament a la zona germinal i progressen en el seu desenvolupament a mida que s'acosten a l'epidídim: I, espermatogònies; II, espermatòcits primaris; III, espermatòcits secundaris; IV, espermàtides; V, zona d'alliberament d'espermatozoides i degeneració fol·licular.

AA, ampulla ductus deferentis anterior; AN, anus; BW, paret del cos; CA, constricció de l'ampulla ductus deferentis; E, ducte eferent; EP, epidídim; GP o GZ, projecció o zona germinal; K, ronyó; LG, glàndula de Leydig; PA, ampulla ductus deferentis posterior; T, testicle; UG, sinus urogenital; UR, urèters.

Figures A i B adaptades de Stanley (1961, tesi doctoral). Figura C segons Stanley (1966).

Les obtencions dels nuclis es van efectuar segons el procediment ja descrit a l'apartat II-2.2. i les proteïnes es van extreure utilitzant HCl 0.4 N (v. II-2.3.1.). En alguns casos que es detallen més endavant, es va procedir a reduir i alquilar la mostra abans (o entre) les extraccions. El mètode de reducció i alquilació aplicat va ser el mateix utilitzat per Gusse et al. (1983) en *S. canicula* a fi i efecte de permetre la comparació entre les protamines d'ambdues espècies. Breument, el mètode consistia en dispersar els nuclis en un tampó de Tris-HCl 50 mM (pH 8.8) / EDTA 2 mM / DTT 10 mM durant 1 h a 37°C i sota atmosfera de nitrogen i, a continuació, alquilació per addició de iodoacetamida fins a 12.5 mM (v. II-2.6.2.1.).

Les anàlisis electroforètiques de les proteïnes testiculars corresponents als diferents estadis espermiogènics es mostra a la figura III-31 (pous 2-6). L'anàlisi revela que les histones de tipus somàtic són les principals proteïnes contingudes en nuclis corresponents als primers estadis de l'espermiogènesi, però que, a mesura que aquesta avança, al nucli de les espermatides comencen a aparèixer una col·lecció de proteïnes de mobilitat intermitja entre les histones i les protamines típiques dels teleostis. D'entre aquestes en destaquen tres de majoritàries que hem anomenat R1, R2 i R3 (v. figura III-31).

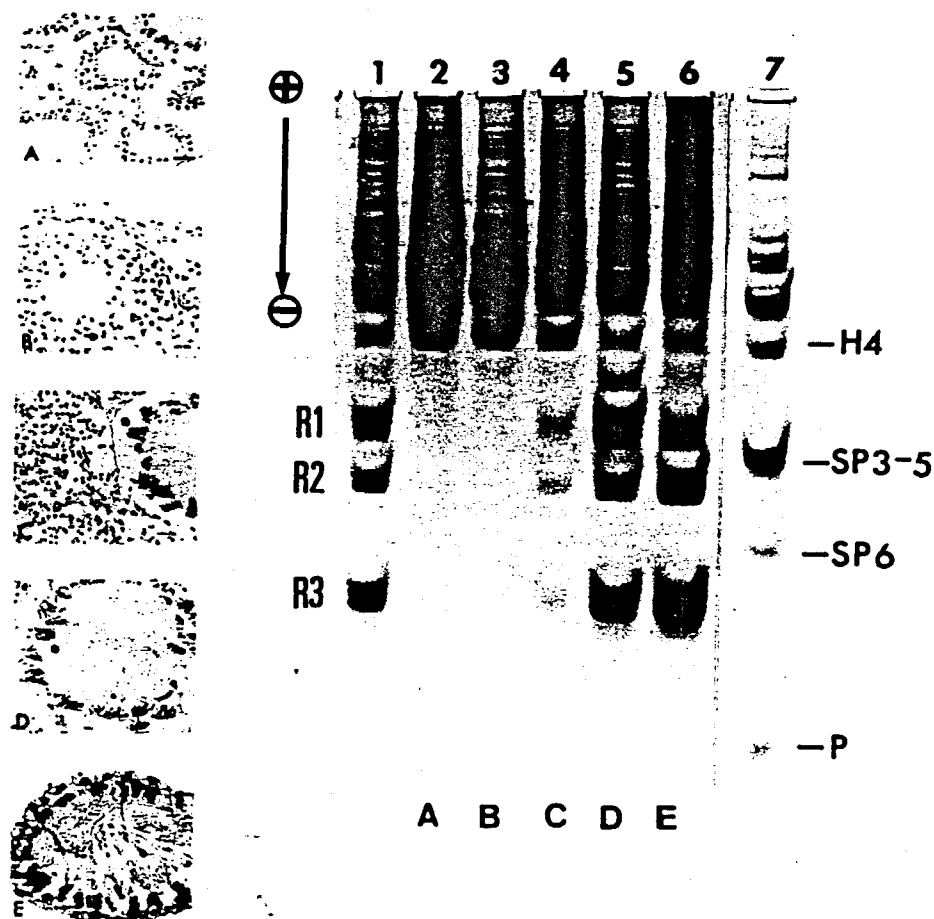
Les proteïnes que apareixen en aquesta figura van ser extretes amb HCl 0.4 N sense reducció-alquilació prèvia dels nuclis. Si, posteriorment, es realitzava aquesta reacció i a continuació s'extreia amb HCl, no es detectava la solubilització de cap proteïna addicional.

Els nuclis dels espermatozoides van ser aïllats separatament a partir de l'epidídim i part anterior i posterior de l'ampulla ductus deferentis. A la figura III-32 es mostren les proteïnes extretes d'aquests nuclis amb i sense condicions reductores: Quan els nuclis eren reduïts i alquilats es solubilitzava un grup complex de proteïnes (figura III-32, pous b, c, d). Les 3 proteïnes majoritàries coincideixen amb les R1, R2 i R3 observades als nuclis espermiogènics testiculars però, a més a més, apareixen tota una sèrie de bandes minoritàries addicionals (fletxes). Cal destacar també com, tant en l'epidídim com en la part anterior i posterior de l'ampulla ductus deferentis, el patró obtingut és el mateix, de manera que, en endavant, quan va caldre

obtenir les proteïnes a partir d'esperma, sovint es van emprar les 3 fraccions conjuntament.

Figura III-31. Esquerra: Seccions sagitals mitges del testicle d'*H. colliei* mostrant els fol·licles contenint diferents estadis de l'espermiogènesi. Tinció de Feulgen a les zones A-D i tinció hematoxilina-eosina a la zona E. Zona A: espermatides rodones; Zona B: espermatides iniciant l'elongació nuclear; Zona C: barreja d'espermatides en elongació i espermatides començant l'espiralització nuclear; Zona D: espermatides en fase d'espiralització del nucli; Zona E: espermatozoides organitzats en forma molt compacta als cists.

Dreta: Perfil electroforètic de les proteïnes extretes amb HCl 0.4 N (sense reducció) a partir de les diferents zones testiculars. Pou 1: proteïnes extretes del testicle sencer; Pous 2-6: proteïnes corresponents a les zones A-E, respectivament; Pou 7: estàndard de les PEB de *Xenopus* (histones i SP) i de la protamina d'arengada (clupeïna).



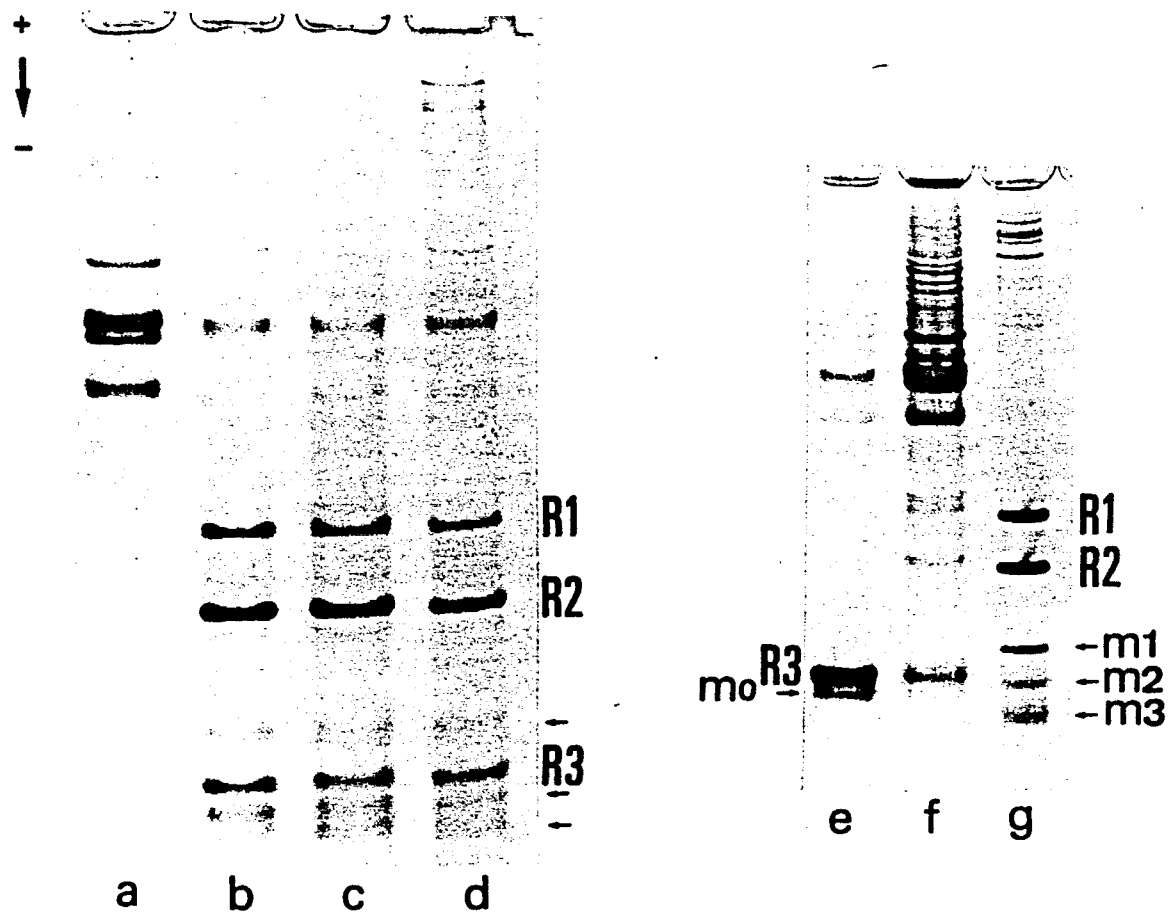


Figura III-32. Proteïnes bàsiques de l'esperma d'*H. collicii*: Efecte de la reducció en l'extracció. Proteïnes extretes amb HCl 0.4 N, prèvia reducció-alquilació, a partir dels nuclis d'espermatozoides procedents de: epidídim (b), part anterior de l'ampulla ductus deferentis (c); i part posterior de l'ampulla ductus deferentis (d). Pou e: Proteïnes extretes a partir d'espermatozoides de l'epidídim amb HCl 0.4 N sense reducció prèvia de la cromatina. Pou g: Proteïnes extretes d'espermatozoides de l'epidídim amb HCl 0.4 N prèvia reducció i alquilació després d'haver practicat l'extracció corresponent al pou e. Pou f: Proteïnes bàsiques globals extretes a partir de nuclis testiculars. Pou a: Estàndard d'histones.

Quan els nuclis eren extrets amb HCl 0.4 N sense reducció-alquilació prèvia, només es solubilitzava la proteïna R3 i una banda minoritària que corria immediatament per sota de la R3 (m0 a la figura III-32, pou e). Les pro-

teïnes R1 i R2, en canvi, necessitaven un tractament previ de reducció i alquilació per poder ser solubilitzades de forma efectiva (figura III-32, pou g). Juntament amb la R1 i R2 apareixen 3 proteïnes minoritàries addicionals que hem anomenat m1, m2 i m3 pel seu grau de mobilitat electroforètica (v. figura III-32, pou g).

Els patrons electroforètics mostrats a la figura III-32 han mostrat un elevat grau de reproductibilitat en un bon número de preparacions obtingudes a partir de nuclis d'espermatozoides.

Concluïm, així, que les proteïnes específiques de l'esperma d'*H. colliei* consisteixen en 3 proteïnes majoritàries (R1, R2 i R3) i 4 de minoritàries (m0, m1, m2 i m3). Només dos d'elles (R3 i m0) poden ser extreïdes dels nuclis dels espermatozoides sense una reducció prèvia.

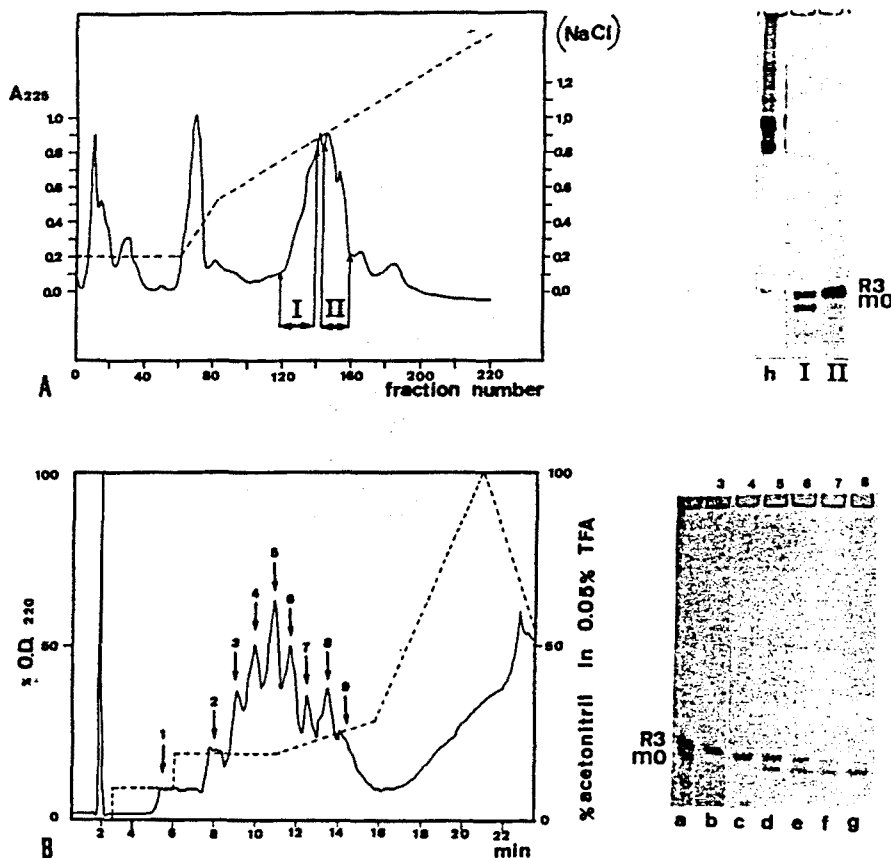
4.3. Purificació i anàlisi composicionals de les PEB extraïbles sense reducció prèvia (R3 i m0)

Es va utilitzar epidídim i part anterior i posterior de l'ampulla ductus deferentis per obtenir prou material per permetre la purificació de les PEB d'*H. colliei*. Els nuclis van ser extreïts primerament amb HCl 0.4 N i, posteriorment, es van reduir, alquilar i re-extreure altre cop amb HCl 0.4 N. Les dues fraccions proteïques obtingudes, és a dir la de les proteïnes solubilitzades sense reducció (R3, m0) i les solubilitzades després de reduir (R1, R2, m1, m2 i m3), van ser precipitades amb 6 volums d'acetona, rentades i secades (v. II-2.4.1.).

La primera fracció (R3, m0) va ser carregada en una columna de CM-cel·lulosa (CM-52 Whatman) després de dissoldre les proteïnes en tampó acetat 50 mM pH 6.00 contenint NaCl 0.2 M. Les proteïnes van ser eluïdes de la columna aplicant un gradient de NaCl i van ser col·lectades en dos fraccions (I i II, figura III-33, A). Mentre que el pic II contenia la proteïna R3 (pou II), el pic I contenia una barreja d'aquesta i de la m0 (pou I).

Per separar la proteïna m0, les proteïnes obtingudes a la fracció I es van aplicar a una columna Spherisorb, 5 µm, per la seva purificació en HPLC de fase reversa. Les proteïnes van ser eluïdes amb un gradient d'acetonitril contenint TFA 0.05%. En aquesta cromatografia es van obtenir una sèrie de pics, alguns d'ells contenint només les proteïnes R3 o m0 (figura III-33, B).

Figura III-33. Purificació de les proteïnes d'*H. colliei* extraïbles sense reducció prèvia (R3 i m0). A. Separació per bescanvi iònic (CM-52). h. Estàndard d'histones. B. Separació per HPLC en fase reversa de les proteïnes corresponents a la fracció I de la figura A. Pou a: mostra de partida; pous b-g: proteïnes corresponents als pics 3-8 respectivament.



A partir de les proteïnes R3 i m0 purificades amb aquestes dues columnes es va procedir a la seva anàlisi composicional. Els valors obtinguts es mostren a la taula III-9 juntament amb la composició aminoacídica de la protamina no queratinosa Z3 de *S. canicula*. Encara que el significat d'aquests valors serà discutit més endavant, és interessant notar com el contingut aminoacídic de la R3 d'*H. colliei* és remarcablement diferent del de la Z3 de *S. canicula*. A partir d'aquesta taula s'observa que aquestes proteïnes poden ser considerades com a protamines segons els criteris de Subirana (1983).

Taula III-9. Anàlisis composicionals (mols %) de les PEB d'*H. colliei* extraïbles sense reducció prèvia (R3 i m0) comparades amb la Z3 d'*S. canicula* i la protamina de salmó.

Aminoàcid	R3	m0	Z3 ⁽¹⁾	Salmina ⁽²⁾
Lys	20.7	23.8	--	--
His	4.3	5.6	--	--
Arg	27.6	23.7	64.5	65.6
Asx	4.6	1.0	--	--
Thr	2.6	4.9	--	--
Ser	7.4	9.3	9.7	12.5
Glx	5.7	7.4	--	--
Pro	6.9	3.5	--	9.4
Gly	4.0	3.5	19.4	6.2
Ala	3.4	2.7	3.2	--
Cys	--	--	--	--
Val	1.9	--	--	6.2
Met	1.6	3.4	--	--
Ile	--	1.8	--	--
Leu	3.8	6.1	--	--
Tyr	--	2.0	3.2	--
Phe	5.3	1.2	--	--

(1) i (2) a partir de la seqüència; (1) Sautière et al., 1981; (2) Ando i Watanabe, 1969.

Es va estimar el número d'aminoàcids de la R3 en uns 50 residus basant-se en la seva migració electroforètica en GPAU amb un 15% d'acrilamida (v. II-3.4.). Com es pot comprovar a la taula III-11, aquesta estimació s'aproxima a la feta a partir de la composició aminoacídica. Tenint en compte aquestes dues dades es va fer una aproximació conjunta fixant el número d'aminoàcids de la R3 en uns 45 ± 4 residus.

4.4. Seqüenciació de l'extrem N-terminal de la protamina R3

La gran diferència composicional mostrada entre la R3 estudiada per nosaltres i la Z3 descrita per Sautière et al. (1981) es pot considerar un resultat inesperat. Per tal d'assegurar-nos de la certesa d'aquesta diferència vam considerar necessari seqüenciar una part de la proteïna R3 per tal de poder comparar-la amb la seqüència primària de la Z3 de *S. canicula*. Amb aquesta finalitat, una alíquota de la R3 obtinguda va ser dialitzada extensivament enfront de bicarbonat amònic 50 mM, liofilitzada i repurificada per HPLC en fase reversa en una columna C18 Pharmacia de 250x4.0 mm Superpack ODS2, 5 µm, mitjançant un gradient d'acetonitril. La seva seqüència N-terminal va ser determinada per degradació recurrent d'Edman (v. II-3.8) utilitzant un seqüenciador automàtic en fase gasosa Applied Biosystems 470A i el programa estàndard 03rpth. Els derivats feniltiohidantoïna produïts a cada cicle van ser analitzats mitjançant un sistema d'HPLC Applied Biosystems 120A acoplat al seqüenciador. La columna utilitzada va ser una µbore C18 Brownlee (2.1 x 220 mm) i per l'elució es va utilitzar un gradient múltiple d'acetonitril. La tècnica descrita es va dur a terme al Servei de Seqüenciació de Proteïnes de la Universitat de Barcelona.

La seqüència de 16 residus obtinguda d'aquesta manera es mostra a la figura III-34. En ella s'observa la presència de dos agrupacions heterogènies de residus bàsics: (RRRH) i (KKKRK). La comparació d'aquesta part de la molècula R3 amb la seqüència completa de la Z3 de *S. canicula* sosté la idea

emergida arran de la composició aminoacídica sobre la gran diferència existent entre aquestes dues proteïnes.

Figura III-34. Seqüència N-terminal de la protamina R3 d'*H. colliei* (a) comparada amb la seqüència de la Z3 de *S. canicula* (Sautière et al., 1981) (b).

	1	5	10	15	20	25	30
(a)	A	R R R H S M	K K K R K S V R R				
(b)	A R S R S R R	S Y G R G R R R G G R R R R R R R R R R G G R					

Si ens fixem en les dades disponibles (anàlisi composicional i seqüència parcial) queda ben de manifest com la R3 presenta una major variabilitat de residus aminoacídics que la Z3 (14/5). Un altre fet important és que, mentre que l'Arg és l'únic residu bàsic present a la Z3 (64.5%), a la R3 hi ha casi tanta Lys (20.7%) com Arg (27.6%) i, a més, també es presenta la His (4.3%). Pel que fa a la basicitat global de les molècules, aquesta és major a la Z3 (64.5%) que a la R3 (52.6%); aquest fet, juntament amb la major mida, determina la menor mobilitat electroforètica de la R3 respecte a la Z3. D'altra banda, la R3 no conté tanta Gly com la Z3 (4.0% *versus* 19.4%).

Pel que fa a la distribució d'aquests residus a la molècula, ja hem comentat la presència d'agrupacions heterogènies d'aminoàcids bàsics a l'extrem N-terminal de la R3, al final dels quals es situa una Ser. Aquestes agrupacions no s'han trobat a la Z3 ni a les protamines dels peixos ossis. La Z3 presenta a l'extrem N-terminal una certa alternància Arg-Ser finalitzada per una Tyr i seguida ja només per arginines interrompudes puntualment per glicines. Al final de la molècula es troba una gran agrupació d'11 Arg seguides.

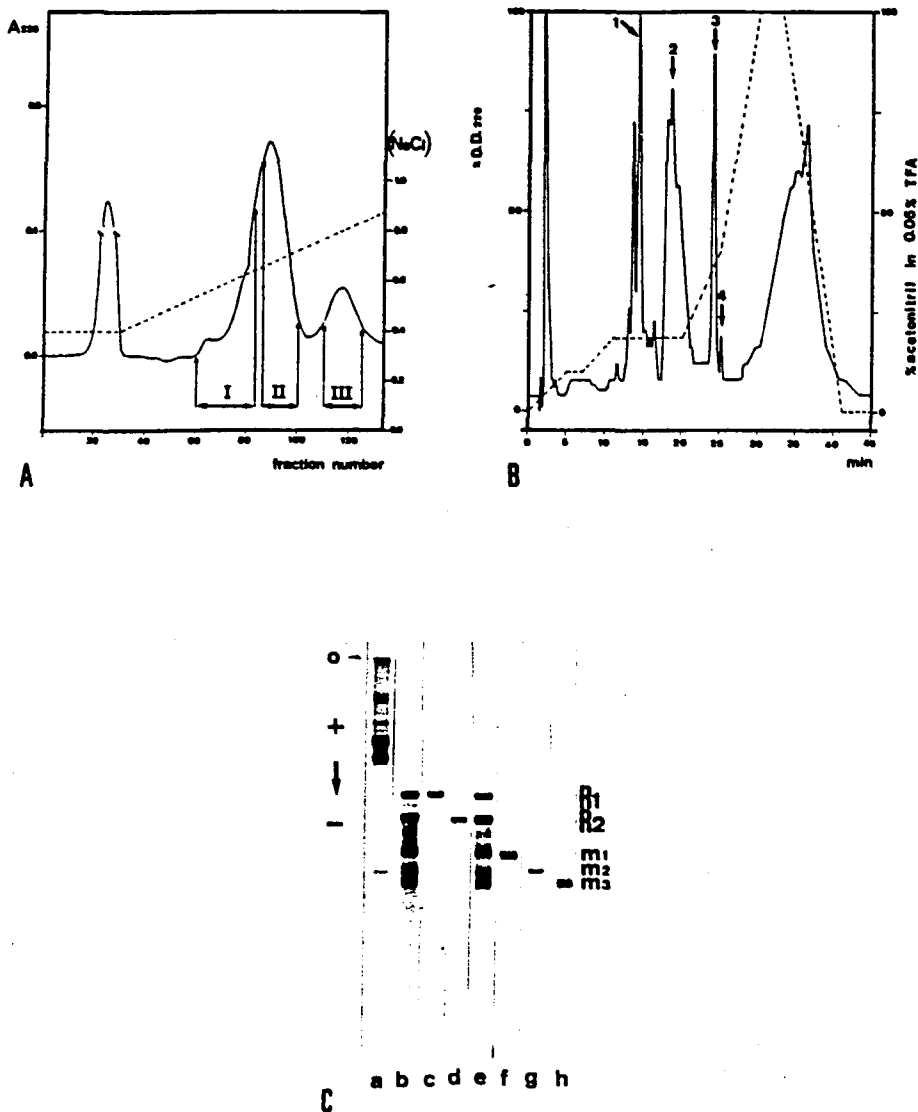
4.5. Purificació i anàlisi composicional de les PEB extraïbles només amb reducció prèvia (R1, R2, m1, m2 i m3)

A l'apartat 4.3. s'explicava com a partir dels nuclis obtinguts dels espermatozoides d'*H. coliei* es van obtenir 2 fraccions proteïques, una per extracció directa amb HCl 0.4 N que va permetre la separació de la R3 i la m0, i una altra obtinguda per una posterior reducció, alquilació i nova extracció amb HCl, que va rendir l'altre grup de PEB (R1, R2, m1, m2 i m3).

Per separar cada una d'aquestes proteïnes es va procedir igual que abans al fraccionament mitjançant cromatografia de bescanvi iònic (CM-52 Whatman) (v. II-2.7.1.1.). Abans de carregar la mostra, però, les proteïnes es van tornar a sotmetre a un tractament de reducció (DTT 20 mM, urea 8 M, NaCl 0.5 M) i alquilació (addició de iodoacetamida fins a 50 mM) (Gusse et al., 1983, v. II-2.6.2.1.), i es van dialitzar enfront del tampó acetat/NaCl utilitzat per la columna (alternativament, en ocasions no es va dialitzar sinó que es va dissoldre la mostra en un volum d'aquest tampó). Les proteïnes van ser eluïdes mitjançant un gradient de NaCl obtenint-se el perfil que es mostra a la figura III-35 (A). Les proteïnes es van recollir en tres fraccions (I, II i III); les fraccions II i III contenien, respectivament, les proteïnes R1 i R2 (pous c i d, figura III-35, C) mentre que la fracció I contenia una barreja de la proteïna R1 i les proteïnes minoritàries m1, m2 i m3 (no mostrat).

Les proteïnes de la fracció I van ser purificades per HPLC en fase reversa utilitzant el mateix tipus de columna i eluents que s'especificaven a l'apartat 4.3. El cromatograma obtingut i les fraccions recollides es presenten a la figura III-35 (B) i les proteïnes minoritàries purificades es mostren als pous f-h de la figura III-35 (C).

Figura III-35. Separació de les PEB d'*H. collieti* no extraïbles sense reducció prèvia (R1, R2, m1, m2 i m3). A. Separació amb CM-cel·lulosa del conjunt de proteïnes. B. Purificació per HPLC en fase reversa de les proteïnes corresponents a la fracció I de la figura A. C. Control electroforètic de les proteïnes purificades: pou c (R1) a partir de II (A); pou d (R2) a partir de III (A); pou f (m1) a partir de 3 (B); pou g (m2) a partir de 4 (B) i pou h (m3) a partir d'1 (B). Els pous b i e contenen el total de proteïnes extretes amb HCl després d'una prèvia extracció amb HCl, reducció i alquilació. Pou a: Estàndard d'histones i de proteïna R3 d'*H. collieti*.



Cada una de les proteïnes purificades va ser analitzada composicionalment. A la taula III-10 es mostren aquestes composicions juntament amb les de les protamines amb Cys de *S. canicula* (Z1, Z2 i S4). Malgrat que pels valors trobats podrien ser considerades parcialment similars entre elles, i entre elles i les protamines Z1 i Z2, aquest fet no demostra que es tracti de proteïnes homòlogues provinents d'una mateixa família de proteïnes (s'ha de considerar, per exemple, que les proteïnes Z1 i Z2 no tenen seqüències similars malgrat posseir uns percentatges d'aminoàcids parcialment comparables).

Taula III-10. Composicions aminoacídiques (mols %) de les PEB amb Cys d'*H. collii* (R1, R2, m1, m2 i m3) comparades amb les PEB amb Cys de *S. canicula* (Z1, Z2 i S4, composicions a partir de les seqüències).

Aminoàcid	R1	R2	m1	m2	m3	Z1(1)	Z2(2)	S4(3)
Lys	12.2	9.9	20.1	21.0	15.6	16.0	13.0	43.7
His	6.9	1.2	6.5	7.7	5.4	4.0	6.5	--
Arg	30.1	39.3	35.4	30.0	29.2	32.0	37.0	21.9
Asx	4.3	1.7	1.5	2.8	1.2	4.0	--	--
Thr	2.8	4.6	--	1.8	4.8	4.0	2.2	--
Ser	4.0	9.7	10.5	4.0	8.7	4.0	4.3	--
Glx	6.0	1.5	6.7	4.9	5.1	2.0	2.2	--
Pro	6.9	3.8	--	4.8	--	6.0	2.2	6.2
Gly	6.4	21.1	7.6	5.2	7.7	2.0	2.2	3.1
Ala	2.7	3.8	--	3.6	9.3	2.0	10.9	9.4
Cys(4)	1.2	1.4	2.0	1.3	1.9	8.0	8.7	12.5
Val	3.5	--	5.1	2.3	7.8	4.0	4.3	3.1
Met	1.2	--	--	1.9	--	--	2.2	--
Ile	3.9	1.7	--	1.1	--	--	2.2	--
Leu	4.5	1.8	2.3	3.3	3.3	8.0	2.2	--
Tyr	2.2	--	1.8	1.0	--	2.0	--	--
Phe	1.2	2.3	--	3.3	--	2.0	--	--

(1) Chevaillier et al., 1987;

(2) Martinage et al., 1985;

(3) Sautière et al., 1984;

(4) Cys determinada com a CM-Cys.

D'altra banda, existeixen importants desviacions entre les composicions de la R1 i R2 respecte a la Z1 i Z2, com pot ser la més gran proporció de Gly a la R2 (21.1%). No obstant, potser el fet més significatiu sigui la diferència en el contingut en Cys: mentre que les 3 proteïnes de *S. canicula* posseeixen una elevada quantitat de Cys, tant les proteïnes majoritàries com les minoritàries d'*H. colliei* en presenten un contingut molt pobre.

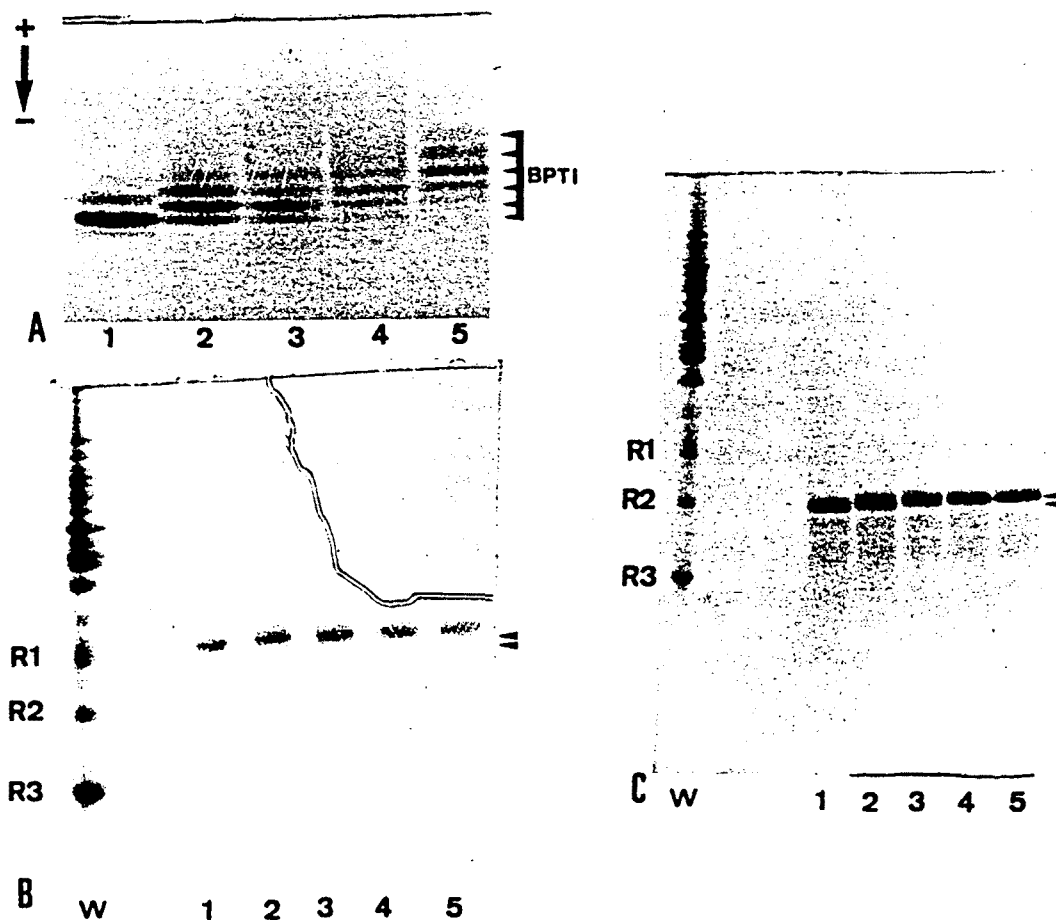
Com a prova per reforçar aquest resultat, és a dir el baix contingut en Cys que presentaven les PEB d'*H. colliei*, es va dur a terme un experiment independent per la determinació del número de cisteïnes. L'experiment realitzat es fonamenta en el mètode de Creighton (1980) basat en la introducció de modificacions de la càrrega elèctrica per reacció de l'àcid iodoacètic amb les cisteïnes. A l'introduir un grup acídic extra, la proteïna experimenta una reducció en la seva mobilitat electroforètica (mentre que si el grup tiol es fa reaccionar amb iodoacetamida no canvia la càrrega neta de la proteïna ni, per tant, la seva mobilitat). Breument, doncs, el mètode consistia en afegir a la proteïna proporcions variables de iodoacetamida / iodoacetat per generar un espectre complet de proteïnes amb 0, 1, 2, ..., N grups carboximetil acídics, on N correspon al número integral de cisteïnes de la molècula (v. II-3.6.).

Així doncs, partint de R1 i R2 purificades a partir del testicle (per no haver de reduir ni alquilar i evitar així interferències en l'experiment per la determinació del número de cisteïnes), es va procedir a tractar-les amb iodoacetamida, iodoacètic i proporcions iodoacetamida:iodoacètic d'1:1, 1:3 i 1:9 segons es descriu a l'apartat II-3.6. Paral·lelament es va dur a terme el mateix experiment amb BPTI, la mateixa proteïna que es va utilitzar en l'experiment original de Creighton (1980), suministrada per Boehringer Mannheim.

La figura III-36 mostra com, així com al patró utilitzat van apareixent bandes de menor mobilitat corresponents al diferent número de cisteïnes modificades, en el cas de la R1 i R2 no es pot deduir més que la presència d'una Cys a cada molècula, fet que confirma els resultats obtinguts en les anàlisis aminoacídiques (v. taules III-10 i III-11).

Pel que fa a l'estimació del número d'aminoàcids totals de les proteïnes R1 i R2, a la taula III-11 es mostren els valors trobats a partir de l'anàlisi composicional i de la seva migració electroforètica en GPAU amb 15% d'acrilamida. Tenint en compte aquests dos valors es pot estimar el número de residus en 79 ± 4 per la R1 i 66 ± 2 per la R2.

Figura III-36. Determinació del número de cisteïnes segons el mètode de Creighton (1980). A. Estàndard de BPTI (Boehringer Mannheim); B. R1 d'*H. colliei*; C. R2 d'*H. colliei*. Reacció amb: iodoacetamida (1), iodoacetamida-iodoacètic en proporcions 1:1 (2), 1:3 (3) i 1:9 (4), i amb iodoacètic (5). W: Proteïnes bàsiques globals extretes a partir del testicle.



Taula III-11. Estimació del número d'aminoàcids de les PEB majoritàries d'*H. collicii*. A. Estimació a partir de la composició aminoacídica. B. Estimació segons la mobilitat electroforètica en GPAU amb 15% d'acrilamida. C. Estimació final a partir d'A i B.

Aminoàcid	R1	R2	R3
Lys	10	6	8
His	6	1	2
Arg	25	25	11
Asx	3-4	1	2
Thr	2	3	1
Ser	3	6	3
Glx	5	1	2
Pro	6	2-3	3
Gly	5	13-14	2
Ala	2	2-3	1
Cys	1	1	--
Val	3	--	1
Met	1	--	1
Ile	3	1	--
Leu	4	1	2
Tyr	2	--	--
Phe	1	1-2	2
Total residus: A:	82-83	64-68	41
B:	75	64	50
C:	79±4	66±2	45±4

En resum, doncs, sembla que globalment *H. collicii* presenta un model de PEB similar al d'*S. canicula*, presentant proteïnes queratinoses i no queratinoses. La comparació entre els patrons de les dues espècies i el seu possible significat es tractarà més endavant (v. IV-1.4.) però val la pena destacar ara el fet que les proteïnes Z3 i R3 siguin tan diferents ja que s'havia suggerit una relació evolutiva entre la Z3 i les protamines típiques dels teleostis.

5. Proteïnes espermàtiques bàsiques als teleostis (osteïctis)

S'han estudiat 32 espècies corresponents a 24 famílies representants de 9 ordres diferents de teleostis. La procedència i data de captura de cada una d'aquestes espècies s'especifica a la taula II-1, fet pel qual no es tornarà a incidir en endavant en aquest tema.

En la presentació dels resultats corresponents a aquesta secció s'ha mantingut la mateixa tònica seguida fins al moment, és a dir que els estudis realitzats sobre les diferents espècies es presentaran seguint un ordre filogenètic. Cal aclarir en aquest punt que no existeix una classificació dels peixos acceptada universalment. Nosaltres hem decidit utilitzar com a eina de treball la classificació adoptada per Nelson (1984) per ser una de les més completes. La nomenclatura utilitzada per la designació de les espècies és la de Lloris et al. (1984) i Lloris (1986). A la figura III-37 es presenta la classificació corresponent als teleostis destacant la posició dels ordres estudiats.

Al final del capítol i per facilitar una visualització global del problema de les proteïnes espermàtiques bàsiques als teleostis, es fa un resum dels resultats obtinguts agrupats, en aquest cas, no per grups taxonòmics sinó per afinitat en el model de PEB presentat (v. apartat III-5.10.).

Figura III-37. Classificació dels teleostis (segons Nelson, 1984) destacant la posició dels ordres estudiats en aquest treball (en majúscules).

<i>Subdivisió</i>	<i>Infradivisió</i>	<i>Superordre</i>	<i>Ordre</i>
Teleostei	Osteoglossomorpha		Osteoglossiformes
	Elopomorpha		Elopiiformes NOTACANTHIFORMES Anguilliformes
	Clupeomorpha		CLUPEIFORMES
	Euteleostei	Ostariophysii	Gonorynchiformes Cypriniformes Characiformes Siluriformes Gymnotiformes
		Protacanthopterygii	SALMONIFORMES
		Stenopterygii	Stomiiformes
		Scopelomorpha	Aulopiiformes MYCTOPHIFORMES
		Paracanthopterygii	Percopsiformes GADIFORMES OPHIDIIFORMES Batrachoidiformes LOPHIIFORMES Gobiesociformes
		Acanthopterygii	Cyprinodontiformes Atheriniformes Lampriformes Beryciformes Zeiformes Gasterosteiformes Indostomiformes Pegasiformes Syngnathiformes Dactylopteriformes Synbranchiformes SCORPAENIFORMES PERCIFORMES Pleuronectiformes Tetraodontiformes

5.1. Ordre Notacanthiformes

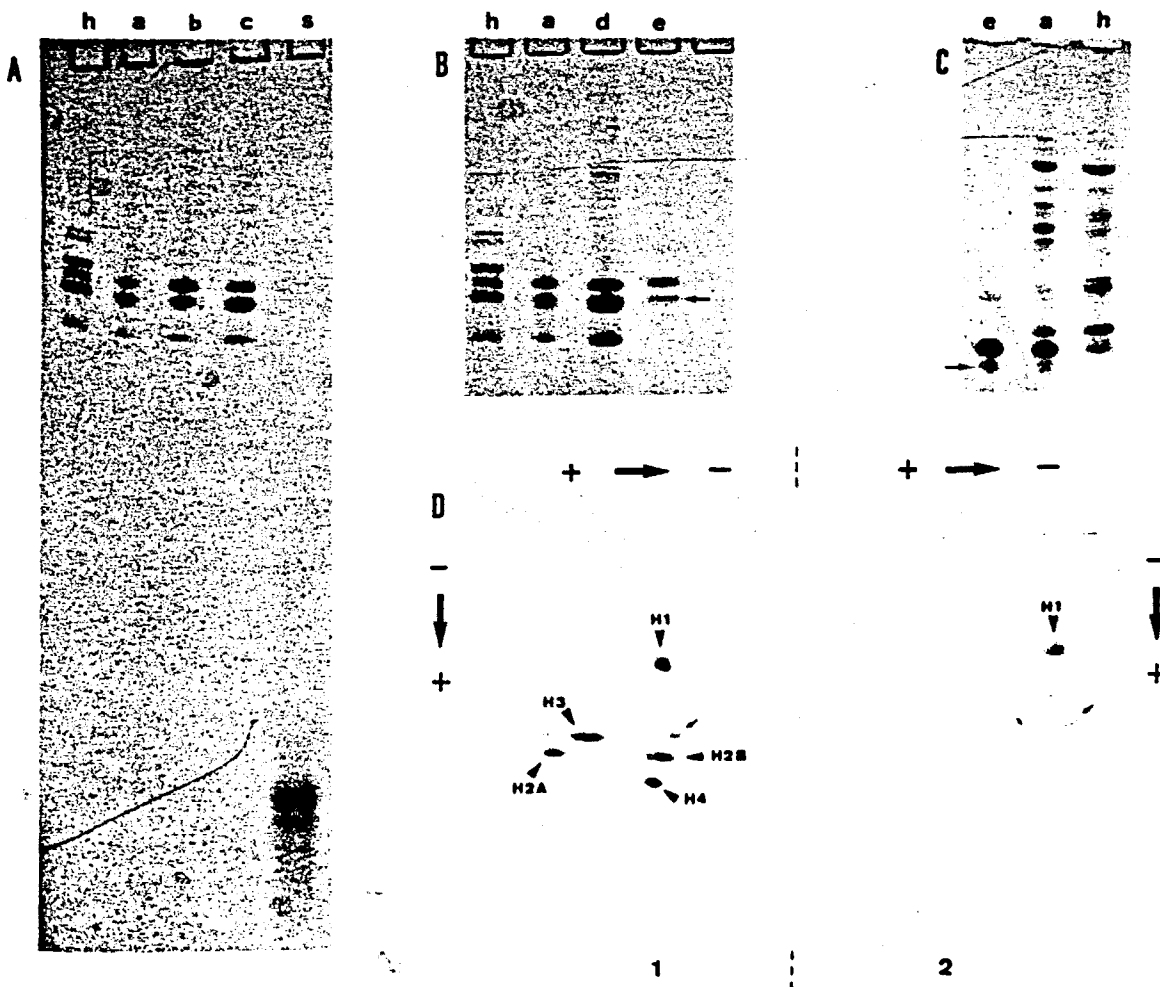
Es va estudiar una sola espècie, *Notacanthus sexspinis*, pertanyent a la família Notacanthidae. A partir de l'esperma d'aquesta espècie es va procedir a l'obtenció dels nuclis dels espermatozoides (v. II-2.2.) i, com *a priori* no es coneixia la naturalesa de les seves PEB (no hi ha cap altre estudi sobre les proteïnes espermàtiques en aquest ordre), es va decidir fer una extracció global amb HCl 0.4 N i, paral·lelament, una extracció seqüencial amb AA 35% i HCl 0.4 N (v. II-2.3.3.).

El comportament en gels d'acrilamida 15%/acètic/urea de les proteïnes corresponents a cada una d'aquestes fraccions es mostra a la figura III-38 (A). S'observa com no hi ha pràcticament cap variació en el patró presentat pels 3 extractes (a excepció d'una major proporció de proteïnes de baixa mobilitat en l'extracte amb AA 35%). Si es compara aquest patró amb l'estàndard d'histones present a la mateixa figura, s'observa que la histona H1 presenta una mobilitat electroforètica més elevada del que és comú, migrant a la zona de les histones de la partícula nucli del nucleosoma. Per poder identificar exactament l'H1, es va procedir a un aïllament de la mateixa per solubilització amb PCA al 5% a partir de la pols protèica obtinguda de l'extracte global amb HCl (v. II-2.3.1.). A la figura III-38 (B) es mostra l'H1 i les histones del cor nucleosòmic separades, comparant-les amb l'extracte global amb HCl.

Degut a la poca resolució que obteníem per les PEB d'aquesta espècie en gels d'acrilamida/acètic/urea, vam decidir utilitzar també gels de tritó/urea. Els patrons desenvolupats en aquest tipus de gel, tant per l'extracte global com per l'extracte amb PCA després del HCl, es mostren a la figura III-38 (C). S'observa com, també en els gels amb tritó, l'H1 presenta una mobilitat electroforètica major del que és habitual. Per identificar inequívocament les diferents bandes, aquests gels es van utilitzar a continuació com a origen d'un gel bidimensional amb segona dimensió contenint SDS. A la figura III-38 (D) s'observa com a l'electroforesi bidimensional obtinguda a partir de les PEB globals de *N. sexspinis* apareix, a més de les histones canòniques, una proteïna addicional minoritària (assenyalada amb una fletxa a la figura), amb un pes molecular similar al de la histona H3 (com s'estima per la mobilitat en el gel amb SDS). Aquesta banda específica apareix també en l'extracte amb

PCA (figura III-38, D-2), indicant que possiblement té una riquesa en lisina considerable.

Figura III-38. PEB de *Notacanthus sexspinis*. A. Proteïnes globals extretes amb HCl 0.4 N (a) i amb extraccions successives amb AA 35% (b) i HCl 0.4 N després d'AA (c). B. Separació de les histones de la partícula nucli del nucleosoma (d) de les de tipus H1 (e) utilitzant PCA 5% sobre l'extracte global (a); gel d'acrilamida/acètic/urea. C. Electroforesi en gel de poliacrilamida/tritó/urea de l'extracte global (a) i l'H1 solubilitzada amb PCA 5% (e). D. Desenvolupament bidimensional a partir de les fraccions dels pous a (1) i e (2) de la figura C (primera dimensió en tritó-urea, segona dimensió en SDS). Les fletxes assenyalen la PEB específica addicional. Estàndards: (h) Histones d'eritròcit de pollastre; (s) Protamina salmina.



Les anàlisis composicionals de la dotació global de PEB de *N. sexspinis* (taula III-13) mostren un resultat típic d'histones canòniques. El mateix passa amb l'anàlisi de la fracció solubilitzada amb PCA 5% (v. figura III-38, Be i Ce) que revela una composició aminoacídica típica d'histona H1 (v. taula III-15).

En resum, al nucli dels espermatozoides de *Notacanthus sexspinis* apareix el conjunt d'histones canòniques però amb una H1 de migració electroforètica superior al que és habitual i una proteïna addicional específica, extraïble amb PCA i amb una mobilitat similar a l'H3. L'anòmala mobilitat que presenta l'H1, tot i mostrar una composició comparable a la d'altres H1s, fa pensar que possiblement es tracti d'una H1 de mida més petita.

5.2. Ordre Clupeiformes

Ja fa vora un centenar d'anys que es va estudiar la primera espècie pertanyent a aquest ordre (*Clupea harengus*, Kossel, 1898). Des de llavors s'han estudiat altres espècies pertanyents a la família Clupeidae així com algun membre de la família Engraulidae. En tots els casos, s'observa la presència de protamina al nucli espermàtic.

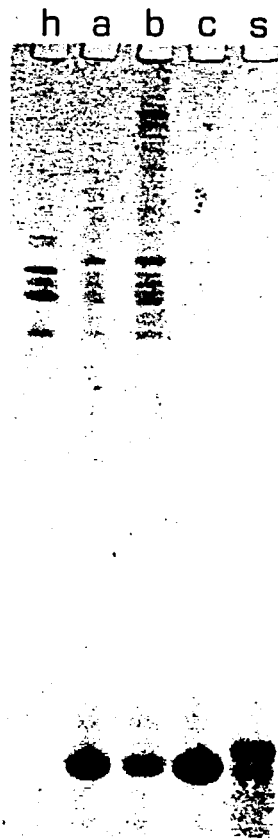
Nosaltres hem estudiat una nova espècie pertanyent a la família Clupeidae, *Sardina pilchardus*. Els nuclis espermàtics d'aquesta espècie van ser aïllats pel procés habitual a partir de gònada masculina madura. Aquests nuclis van ser separats en dos alíquotes practicant-se sobre una d'elles una extracció amb HCl 0.4 N per obtenir les proteïnes bàsiques totals contingudes als nuclis espermàtics, i, sobre l'altra, dues extraccions successives amb AA 35% i HCl 0.4 N respectivament.

El desenvolupament en GPAU de les proteïnes corresponents es presenta a la figura III-39. Com ja feien suposar els resultats d'altres autors, *S. pilchardus* presenta al seu nucli espermàtic un protamina que migra a la mateixa zona que la salmina. A l'extracte global, no obstant, es veu com encara queden restes d'histones; aquestes podrien realment estar presents als espermatozoides (substitució incompleta de les histones per part de les pro-

tamines) o bé provenir de l'aport de cèl·lules espermàtiques no totalment madures o de contaminació amb cèl·lules somàtiques. En qualsevol cas, en les extraccions successives AA-HCl s'observa com aquesta porció s'extreu casi totalment amb l'àcid acètic, quedant en el HCl post AA la protamina relativament pura.

La protamina procedent de l'extracte HCl post AA va ser analitzada composicionalment. Els resultats d'aquestes anàlisis s'indiquen a la taula III-14. Com és típic en les protamines, s'observa poca diversitat de residus aminoacídics, un elevat percentatge d'aminoàcids bàsics (destacant l'arginina, 59.1%) i presència d'aminoàcids fosforilables (Ser, 5.5%, Thr, 2.4%).

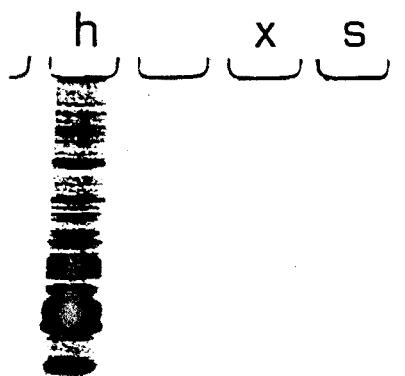
Figura III-39. PEB de *Sardina pilchardus*. a. Extracte global amb HCl 0.4 N; b. Extracte amb AA 35%; c. Extracte amb HCl 0.4 N després d'AA. Estàndards: h. Histones d'eritròcit de pollastre; s. Protamina de salmó (salmina).



5.3. Ordre Salmoniformes

Com ja s'ha comentat a la introducció del present treball, va ser precisament en una espècie d'aquest ordre, *Salmo salar*, on a finals del segle passat es va descobrir la primera protamina (Miescher, 1874). Des de llavors, els coneixements sobre aquest grup s'han multiplicat, tant a nivell de proteïnes com de DNA. De totes maneres, a excepció del cas d'*Esox lucius* (Esocidae), totes les espècies estudiades pertanyen a la família dels Salmonidae. Nosaltres aportem els resultats obtinguts a partir d'una espècie pertanyent a una família encara no estudiada en aquest sentit: *Alepocephalus rostratus* (Alepocephalidae).

Figura III-40. Protamina d'*Alepocephalus rostratus* (x) comparada amb un estàndard d'histes (h) i de protamina (salmina, s).



L'obtenció de les PEB d'aquesta espècie es va fer a partir de gònada masculina madura. Com disposàvem de molt poca quantitat de mostra, i com suposàvem pels resultats en altres salmònids que *Alepocephalus rostratus* també presentaria protamina al seu espermatozoide, vam decidir aïllar els nuclis espermàtics pel mètode habitual (v. II-2.2.) però extreure'n les proteïnes bàsiques per insolubilització en SDS (v. II-2.3.2.2.). D'aquesta manera ens asseguràvem que la poca proteïna que obtinguéssim fos pura. Malauradament, com s'aprecia a la figura III-40, la quantitat de proteïna va ser tan minça que no se'n va poder obtenir més que el desenvolupament electroforètic.

A l'esmentada figura es compara la protamina obtinguda (fletxa) amb la protamina de salmó (salmina). Efectivament, com ja suposàvem, s'observa que la proteïna extreta es mou al gel de forma similar a la salmina. Per tant, pel seu comportament electroforètic, juntament amb el fet de mostrar-se insoluble en SDS, podem calificar aquesta proteïna de protamina típica tot i no disposar de l'anàlisi composicional.

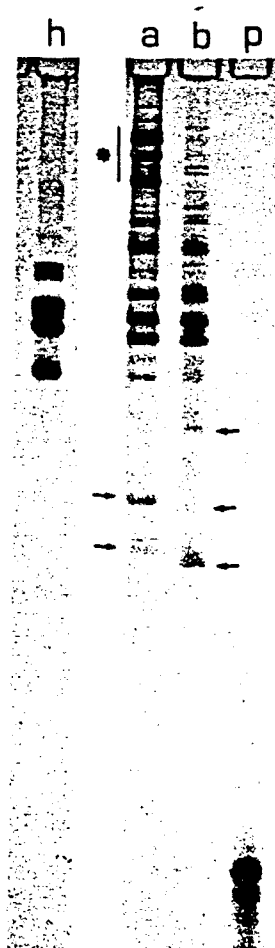
5.4. Ordre Myctophiformes

No existeix cap coneixement previ sobre les proteïnes espermàtiques bàsiques d'aquest ordre. Nosaltres hem pogut estudiar dues espècies pertanyents a la família Myctophidae: *Lampanyctus crocodilus* i *Symbolophorus veranyi*. En ambdós casos es va treballar amb una barreja d'esperma i gònada masculina madura.

Els mictòfids presenten un espermatozoide molt peculiar en forces aspectes. S'han descrit espermatozoides biflagelats en només 8 espècies de peixos (Jamieson, 1991) i flagels de tipus 9+0 només als espermatozoides uniflagelats d'elopomorfs (teleostis) (Mattei i Mattei, 1975). Doncs bé, als mictòfids, o almenys al gènere *Lampanyctus*, s'ha trobat que els espermatozoides posseeixen aquestes dues particularitats (espermatozoides biflagelats amb flagels 9+0) (Mattei i Mattei, 1976); a més, el seu nucli, d'uns 6 µm de longitud, presenta forma de S.

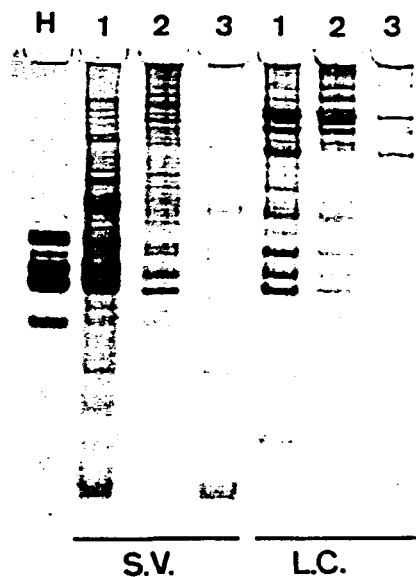
Per la seva banda, el patró de proteïnes espermàtiques bàsiques presents a l'espermatozoide també es mostra força atípic. A la figura III-41 es mostren les proteïnes bàsiques globals extretes amb HCl 0.4 N a partir dels nuclis espermàtics aïllats de *L. crocodilus* i *S. veranyi*. Els patrons electroforètics respectius mostren en ambdós casos, juntament amb histones, l'aparició d'una sèrie de bandes específiques (indicades amb fletxes) amb mobilitat intermitja entre les histones i les protamines típiques. Addicionalment, a diferència del que s'observa a *S. veranyi*, a *L. crocodilus* apareixen en proporció important unes bandes protèiques de molt baixa mobilitat (indicat amb un asterisc). Aquestes proteïnes d'alt pes molecular no desapareixen sota l'acció de tractaments reductors.

Figura III-41. PEB globals (extracte amb HCl 0.4 N) de dues espècies de mictòfids: *Lampanyctus crocodilus* (a) i *Symbolophorus veranyi* (b). Estàndards d'histones (h) i de protamina (p).



El comportament de les proteïnes d'aquestes dues espècies enfront d'extraccions successives amb AA 35% i HCl 0.4 N es mostra a la figura III-42 comparat amb el patró electroforètic de les PEB globals de cada espècie. En el cas de *S. veranyi* s'observa com l'acètic extreu les proteïnes de tipus histones i les de mobilitat similar o inferior, no extreient cap proteïna de mobilitat superior a l'H4. Per contra, en l'extracció següent amb HCl s'extreuen les proteïnes de mobilitat superior a l'H4 així com alguns restes de proteïnes que migren a la zona de les histones o una mica per sobre.

Figura III-42. Proteïnes corresponents als extractes amb HCl 0.4 N (1), AA 35% (2) i HCl post AA (3) de *Symbolophorus veranyi* (S.V.) i *Lampanyctus crocodilus* (L.C.). Estàndard d'histones (H).



Pel que fa a *L. crocodilus*, les histones són extretes bàsicament pel AA 35%, mentre que les proteïnes específiques de mobilitat intermèdia entre histones i protamines apareixen en l'extracte amb HCl després d'AA. Respecte a les proteïnes de baixa migració mencionades amb anterioritat, s'observa com algunes d'elles s'extreuen parcialment amb l'acètic mentre que d'altres apareixen majoritàriament en l'extracte amb HCl posterior.

Degut a la complexitat dels patrons observats en aquestes dues espècies, es van dur a terme els corresponents desenvolupaments bidimensionals (primera dimensió amb acètic/urea, segona dimensió amb SDS) (figura III-43). Aquests patrons permeten observar alguns trets comuns per les dues espècies i altres de diferencials:

i) Ambdues espècies presenten el complement d'histones nucleosòmiques i el seu patró és gairebé idèntic.

ii) També presenten una sèrie complexa de proteïnes no histones que comparteixen en general (als esquemes que acompanyen la figura III-43 es mostren les zones no comunes de les bidimensionals d'ambdues espècies).

iii) Presenten també en comú la presència de bandes de major mobilitat que les histones que no penetren en gels de SDS (comportament que presenten les protamines i totes les proteïnes específiques de l'espermatozoide que siguin molt bàsiques).

iv) *L. crocodilus*, però no *S. veranyi*, conté proteïnes majoritàries de baixa mobilitat electroforètica. Com ja s'intuïa a les electroforesis unidimensionals, el desenvolupament bidimensional mostra una extraordinària complexitat en components per aquestes proteïnes (figura III-43, B). Hem de destacar que almenys dues d'elles no són solubles en SDS i romanen en la primera dimensió del gel. L'heterogeneïtat enfront del comportament en SDS també era palesa en la seva extractabilitat a partir de la cromatina: recordem com varies d'aquestes proteïnes eren extraïbles amb AA 35% mentre que d'altres només ho eren amb HCl 0.4 N (figura III-42).

La composició aminoacídica de l'extracte amb HCl post AA de *L. crocodilus*, es mostra a la taula III-15. D'aquesta anàlisi destaca una notable característica: el conjunt d'aquestes proteïnes mostra pràcticament el mateix contingut en aminoàcids àcids que en bàsics (al voltant del 20% en cada cas). Aquests valors no semblen similars a cap de les PEB estudiades fins al moment, però hem de tenir present que corresponen a una mescla heterogènia de proteïnes.

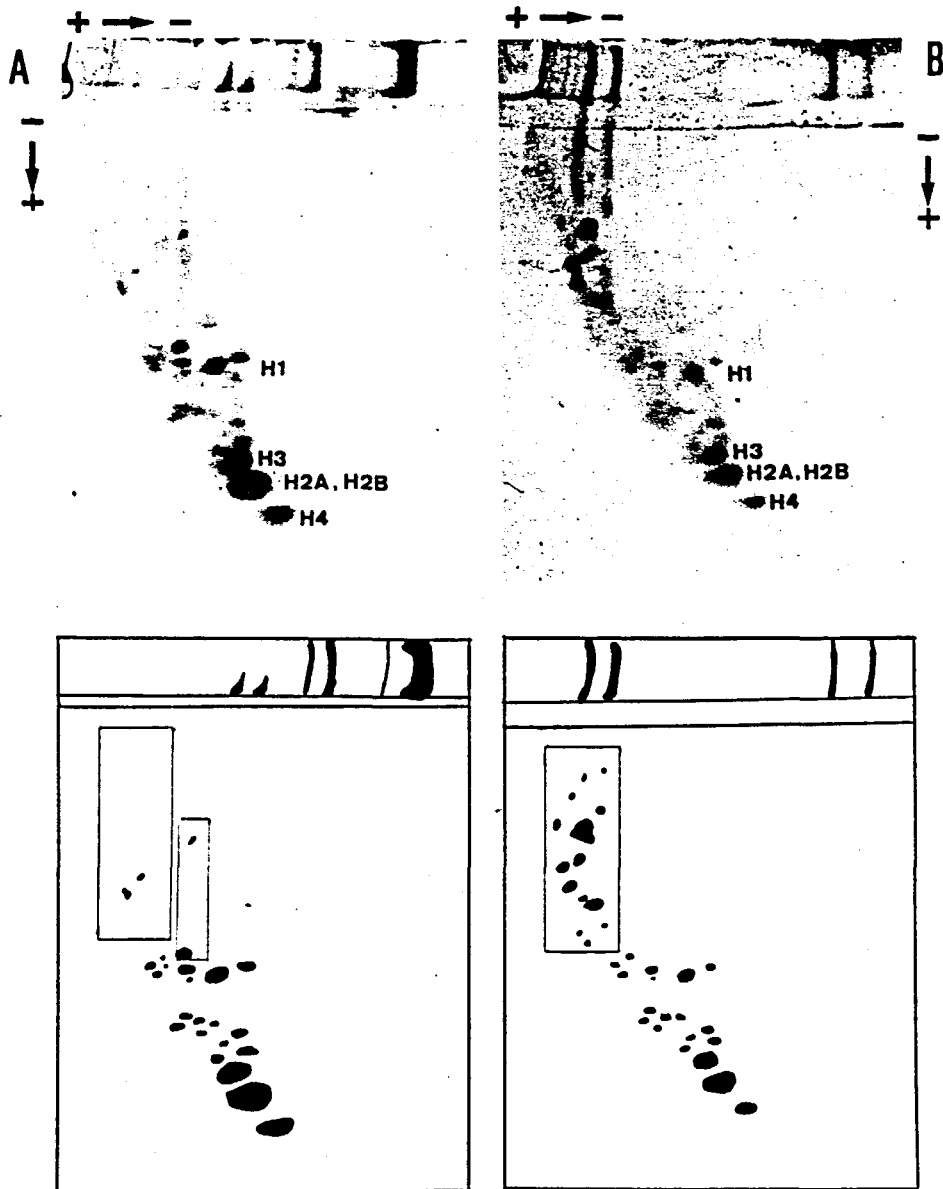


Figura III-43. Gels bidimensionals de les PEB de *S. veranyi* (A) i *L. crocodilus* (B) i esquema ressaltant les zones no comuns entre les dues espècies. Primera dimensió en acètic/urea i segona dimensió en SDS.

La interpretació dels resultats obtinguts als mictòfids és complexa. D'una banda sembla un tret comú de la família, o almenys d'aquests dos gèneres, l'aparició de proteïnes de mobilitat intermitja entre histones i protamines típiques. Presumiblement, aquestes proteïnes estarien enriquides en arginina, com fa suposar el seu comportament enfront dels àcids i dels gels de

SDS. D'altra banda, la presència de proteïnes específiques d'alt pes molecular sembla característic de *Lampanyctus crocodilus*, no podent-se considerar, amb les dades disponibles fins al moment, com un tret representatiu de la família. Es podria pensar que aquestes proteïnes fossin precursors de les proteïnes de mobilitat intermitja i que la considerable proporció d'aminoàcids àcids presents ajudés a regular la unió de les proteïnes definitives amb el DNA. No obstant, ara per ara aquestes suposicions només s'han de considerar com a especulacions ja que no es disposa de proves conclusives. Possibles vies per intentar aclarir aquesta situació serien l'estudi i comparació de les seqüències dels presumptes "precursors" i "productes finals" o bé realitzar un seguiment acurat del cicle sexual d'aquesta espècie.

5.5. Ordre Gadiformes

S'ha treballat sobre exemplars pertanyents a tres famílies de gadiforms:

- a) Família Moridae: *Mora moro*
- b) Família Gadidae: *Phycis blennoides*
 Micromesistius poutassou
- c) Família Merlucciidae: *Merluccius merluccius*
 Merluccius capensis

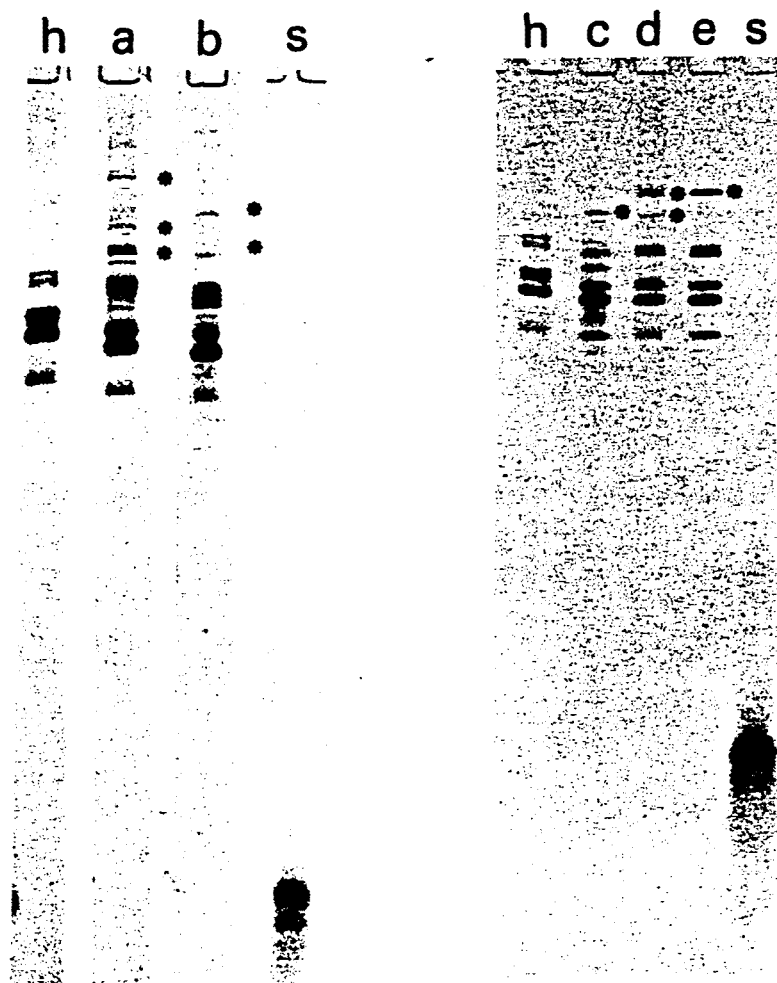
En totes les espècies es va treballar sobre gònada madura excepte en *M. capensis*, del qual es va disposar d'esperma fluent. Les obtencions dels nuclis espermàtics i les extraccions de les proteïnes bàsiques associades es van efectuar seguint l'esquema acostumat (v. II-2.2. i II-2.3.3.).

A la figura III-44 es mostren les PEB globals corresponents a cada una de les espècies treballades, i a la taula III-13 les anàlisis composicionals corresponents a algunes d'aquestes espècies. Totes elles presenten histones al nucli dels seus espermatozoides però, a més, apareixen una sèrie de bandes addicionals (asteriscs) que migren per sobre de la histona H1. Aquestes bandes protèiques són minoritàries i difícils d'interpretar excepte en el cas de *Merluccius*

capensis, on es presenta, junt amb una dotació d'histones de tipus canònic (encara que l'H1 mostra dues subfraccions), una proteïna específica de l'esperma (Hsp) en proporció similar a la de les histones (v. asterisc a figura III-44, e).

En vistes d'aquests resultats ens vam plantejar si aquesta banda era una histona modificada o bé algun tipus especial de protamina (recordem que les protamines típiques, al ser proteïnes petites i molt carregades, tenen una gran mobilitat electroforètica).

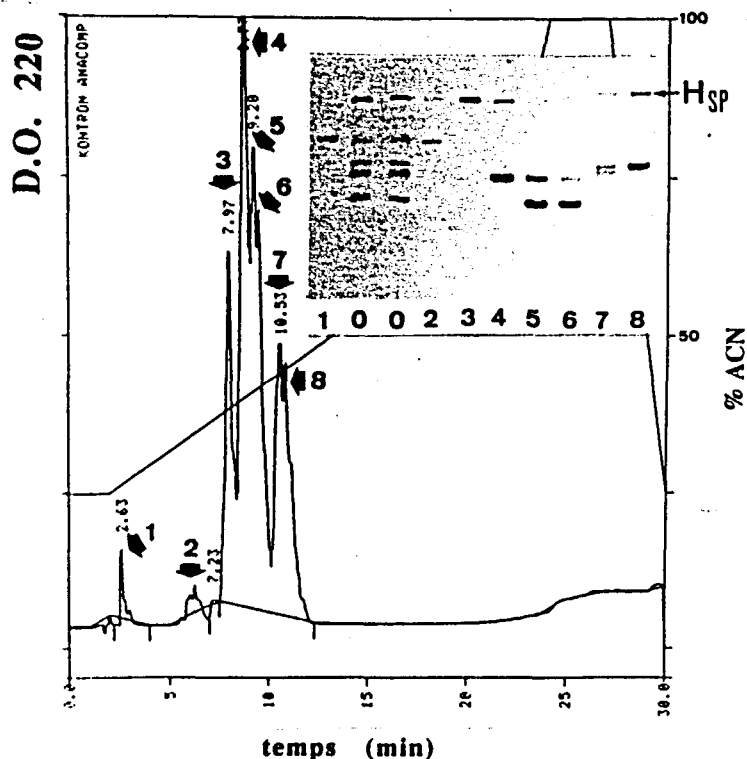
Figura III-44. PEB als gadiformes (extracte global amb HCl 0.4 N). Moridae: a. *Mora moro*; Gadidae: b. *Phycis blennoides*; c. *Micromesistius poutassou*; Merlucciidae: d. *Merluccius merluccius*; e. *Merluccius capensis*. Estàndard d'histones d'eritròcit de pollastre (h) i de protamina de salmó (salmina, s).



En disposar de suficient mostra i donat l'interès que oferia, es va decidir estudiar la proteïna Hsp amb més detall. Amb aquesta finalitat es va procedir a la seva purificació per HPLC en fase reversa: Es van dissoldre 2 mg del conjunt proteïc del nucli espermàtic en 350 µl d'aigua i es van carregar en alíquotes en una columna Waters Delta-Pak C4, 0.39 x 15 cm, 5 µm, 300 Å. Per l'elució de les proteïnes es va aplicar un gradient d'acetonitril (del 25 al 70%) contenint TFA 0.05%. Les fraccions obtingudes van ser assecades i analitzades.

A la figura III-45 es mostra el perfil cromatogràfic de les proteïnes espermàtiques de *M. capensis* i el contingut proteïc eluït en cada pic. Al pic 1 s'elueix pura la fracció de migració lenta de l'H1 mentre que al pic 2 trobem la fracció de l'H1 de migració més ràpida (encara que amb alguna proporció de la proteïna específica de l'esperma Hsp). Hsp és eluïda pura al pic 3 mentre que la resta d'histones s'elueixen progressivament als pics següents.

Figura III-45. Separació de les PEB de *Merluccius capensis* per HPLC de fase reversa i electroforesi en GPAU dels pics obtinguts en la cromatografia. La numeració dels carrils de l'electroforesi correspon a la numeració dels pics cromatogràfics. Els carrils 0 contenen el conjunt de proteïnes presents al nucli espermàtic d'aquesta espècie.



Les anàlisis d'aminoàcids de les proteïnes contingudes als pics 1, 2 i 3 es mostren a la taula III-15 juntament amb la de les histones H1 i H5 d'eritròcit d'una carpa (*Ctenopharyngodon idella*) (Miki i Neelin, 1976). Els resultats d'aquestes anàlisis van mostrar que les dues subfraccions de què es parlava anteriorment (pics 1 i 2), efectivament presentaven una composició típica de les H1 (elevat contingut en Lys i continguts importants en Pro i Ala) però amb una major proporció d'Arg. La banda superior específica (Hsp) presenta aquests trets però amb una riquesa molt major en Arg, característica no típica de les H1 canòniques i que l'atança més a les histones de tipus H5. La proporció d'Arg de l'Hsp (19.2%) és inclús major que la de Lys (17.9%). Aquest enriquiment en Arg en detriment de la Lys podria influir en què en les separacions d'histones H1 i afins de les histones del cor nucleosòmic utilitzant PCA al 5% (v. II-2.3.1.), l'Hsp sigui només dèbilment solubilitzada pel PCA (figura III-546, A).

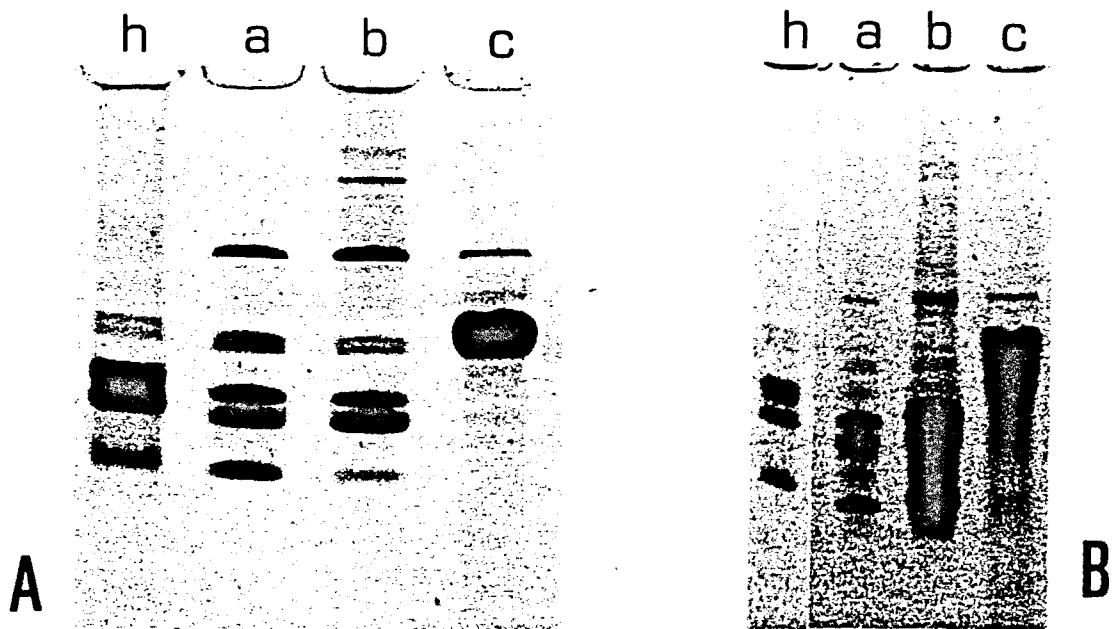
La unió de l'Arg al DNA, a més de suposar enllaços de tipus iònic, implica la formació de 5 ponts d'hidrogen, mentre que la Lys només en pot formar 2. Segons Ausió et al. (1984), les diferències en la interacció entre la Lys i l'Arg i el DNA, podrien ser les responsables del reemplaçament de les histones, riques en Lys, per les protamines, riques en Arg, durant l'espermioïgenesis. Així doncs, en el cas del lluç, l'aparició d'una nova proteïna específica de l'esperma, i el fet que aquesta presenti un enriquiment atípic en un aminoàcid d'interacció més forta, pot afavorir la compactació del nucli espermàtic del lluç. De fet, l'enriquiment en Arg és una característica compartida per la major part de proteïnes nuclears específiques de l'espermatozoide conegudes (v. Kasinsky 1989 per una revisió).

Els gels de poliacrilamida/acètic/urea separen les proteïnes segons la relació càrrega/massa. Així doncs, el fet que, malgrat presentar aquesta proteïna una major càrrega positiva que les H1 (37.1% *versus* 30.2% i 34.9%) migri per sobre d'aquestes, indica que es tracta d'una proteïna d'un pes molecular considerablement superior al de les H1 típiques.

D'altra banda, es va estimar la relació H1/Hsp a partir d'anàlisis densitomètriques. Els resultats d'aquestes anàlisis revelen una relació H1/Hsp de

0.93. Malgrat tractar-se d'una prova no concloent, aquest valor pot ser interpretat com indicador d'un ratio de deposició d'Hsp al nucli de, aproximadament, una molècula per nucleosoma.

Figura III-46. Separació de les H1 i proteïnes afins de *Merluccius capensis* (A) i *Micromesistius poutassou* (B) per solubilització en PCA 5%. (a) Dotació global de PEB; (b) Fracció insolubilitzada en PCA 5%; (c) Fracció solubilitzada en PCA 5%. Estàndard d'histones d'eritròcit de pollastre: h.



Una altra qüestió interessant dins de l'ordre dels Gadiformes és el fet que els seus membres semblen presentar sempre una H1 heterogènia consistent en dues o més fraccions electroforètiques. Ja hem vist com *Merluccius capensis* presenta dues bandes electroforètiques clarament corresponents a formes de la histona H1, però hi ha altres espècies d'aquest grup (v. figura III-44) on sembla que encara es presenten un major número de fraccions de tipus H1. Per comprovar-ho vam escollir un dels casos on aquest fet es feia més aparent: la maire (*Micromesistius poutassou*), on l'H1 té una apariència realment "difusa".

Sobre la pols obtinguda amb l'extracció global amb HCl es va procedir a la separació de les proteïnes de la família de l'H1 per solubilització amb PCA 5%, com s'explica a l'apartat II-2.3.1. Efectivament, s'observa a la figura III-46 (B) que hi ha un bon nombre de bandes que es solubilitzen amb aquest àcid. L'anàlisi composicional del conjunt d'aquestes bandes es presenta a la taula III-15; s'observa una bona proporció d'Ala i Pro i sobretot una gran riquesa en Lys (35.6%), no obstant, no es dóna cap enriquiment en Arg com succeïa en el cas de l'Hsp del lluç.

5.6. Ordre Ophidiiformes

Dins d'aquest ordre s'ha estudiat el cas de *Cataetys laticeps* (Bythitidae). Cal dir que aquesta és l'única espècie de fertilització interna d'entre les estudiades per nosaltres.

Partint de la gònada d'un sol individu mascle madur sexualment, es van aïllar els nuclis espermàtics i es van obtenir les proteïnes bàsiques que contenien segons el procediment habitual (v. II-2.2. i II-2.3.3.).

En el patró electroforètic en GPAU s'observa com l'espermatozoide conté histones al seu nucli, però també una banda addicional específica que migra per sota de l'H1 (figura III-47, fletxa). Aquesta proteïna específica pot ser parcialment purificada amb una extracció amb HCl 0.4 N després d'AA 35% (pou c), rendint un 70% de la proteïna específica i un 30% d'histona H1 (percentatges calculats per densitometria).

El contingut aminoacídic d'aquesta proteïna específica (taula III-15) serà doncs aproximat, però és interessant notar la similitud amb la histona H5 (a la mateixa taula) excepte pel contingut en Ala i His. Aquest cas recorda, doncs, el que passava en *M. capensis* (tret de la seva mobilitat electroforètica).

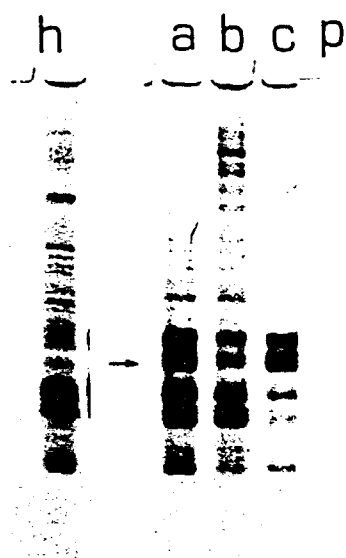


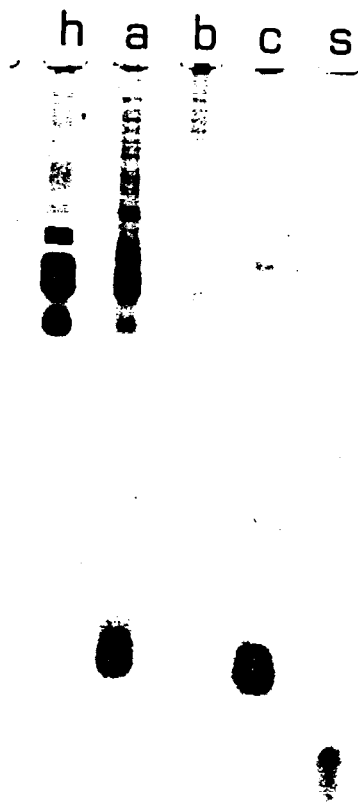
Figura III-47. PEB de *Cataetyx laticeps* (Ophidiiformes). a) Extracte global amb HCl 0.4 N; b) Extracte amb AA 35%; c) Extracte amb HCl després d'AA. Estàndards d'histones (h) i protamina (p). La fletxa assenyala la proteïna addicional específica de l'espermatozoide.

5.7. Ordre Lophiiformes

D'aquest ordre també es va aconseguir una sola espècie, el rap *Lophius budegassa* (Lophiidae). Les gònades d'un mascle sexualment madur van ser tractades com de costum amb el fi d'obtenir els nuclis dels espermatozoides i les PEB que contenen (v. II-2.2. i II-2.3.3.).

L'extracte global amb HCl 0.4 N mostra la presència d'una proteïna majoritària de mobilitat una mica menor que la de la salmina, així com una certa quantitat de restes d'histones (figura III-48). A la mateixa figura s'aprecia com els extractes successius amb AA 35% i HCl post AA extreuen preferencialment aquests restes d'histones i la proteïna majoritària, respectivament.

Figura III-48. PEB de *Lophius budegassa* (Lophiiformes). a) Extracte global amb HCl 0.4 N; b) Extracte amb AA 35%; c) Extracte amb HCl post AA; h) Estàndard d'histones; s) Estàndard de salmina (protamina).



Així doncs, tant en funció de la seva mobilitat electroforètica com del seu comportament enfront de les extraccions successives amb AA-HCl, es pot afirmar que la proteïna majoritària present a *L. budegassa* és una protamina típica.

5.8. Ordre Scorpaeniformes

Es va realitzar l'estudi de les PEB presents a dos representants d'aquest ordre corresponents a dues famílies diferents:

Família Scorpaenidae: *Helicolenus dactylopterus dactylopterus*

Família Triglidae: *Trigla lucerna*

Aquest és un cas molt interessant ja que, com veurem, les PEB d'aquestes espècies presenten patrons electroforètics molt diferents tot i pertànyer al mateix ordre.

5.8.1. Família Scorpaenidae

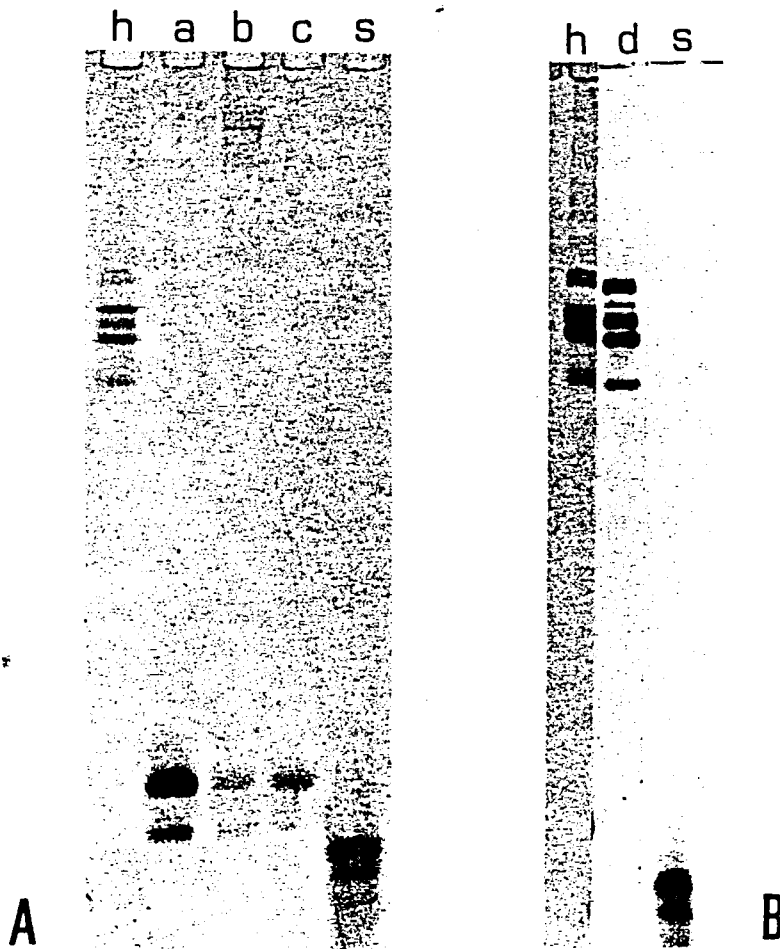
A partir d'una barreja de testicle madur i esperma fluent d'*H. dactylopterus dactylopterus*, es va procedir a l'aïllament dels nuclis espermàtics (v. II-2.2.). Aquests nuclis es van separar en dues alíquotes: en una d'elles es va practicar una extracció global amb HCl 0.4 N, mentre que amb l'altra es van dur a terme extraccions seqüencials amb AA 35 % i HCl 0.4 N tal i com s'explica a l'apartat II-2.3.3.

Les proteïnes obtingudes es van desenvolupar en GPAU amb un 15% d'acrilamida. Els resultats de l'anàlisi electroforètica mostren com a l'espermatozoide d'aquesta espècie les proteïnes principals són les corresponents a dues bandes que migren de forma similar a la salmina (figura III-49, A). Concretament, n'hi ha una de més majoritària que presenta una mobilitat una mica inferior a la de la salmina, mentre que l'altra es mou com la banda superior de la salmina. A part d'aquestes dues proteïnes, apareixen també

restes d'histones i altres proteïnes de baix pes molecular en proporcions poc importants respecte a les proteïnes principals. D'altra banda, s'observa com les dues proteïnes que migren com la salmina són molt poc extretes per l'AA 35% que, en canvi, extreu preferencialment les proteïnes tipus histones.

Així doncs, tant el comportament electroforètic com el comportament enfront de les extraccions àcides fan suposar que les proteïnes majoritàries d'*Helicolenus* són protamines. L'anàlisi aminoacídica realitzada sobre l'extracte HCl post AA confirma aquesta suposició (v. taula III-14).

Figura III-49. PEB dels Scorpaeniformes. A. Scorpaenidae: *Helicolenus dactylopterus dactylopterus*, (a) Extracte HCl 0.4 N; (b) Extracte AA 35%; (c) Extracte HCl post AA. B. Triglidae: *Trigla lucerna*, (d) Extracte global amb HCl 0.4 N. Estàndards d'histones (h) i de salmina (s).



5.8.2. Família Triglidae

Es va aconseguir esperma fluent de *Trigla lucerna* i es va procedir anàlogament al cas anterior (*H. dactylopterus*) per l'obtenció dels nuclis espermàtics i proteïnes associades. Els resultats obtinguts van posar en evidència el manteniment d'histones de tipus canònic a l'espermatozoide, sense que s'observés la presència de cap proteïna addicional específica (v. figura III-49, B). L'anàlisi de la composició aminoacídica (taula III-13) concorda, igualment, amb la d'una dotació d'histones canòniques.

5.9. Ordre Perciformes

El cas dels Perciformes és també molt curiós ja que, igual que passava als Scorpaeniformes, hem trobat dins del mateix ordre tant espècies amb histones com espècies amb protamines al nucli de l'espermatozoide; a més, i a diferència d'aquells, hem trobat també, com ja veurem, espècies amb dotacions protèiques molt especials no descrites fins al moment. De fet, la monofília d'aquest grup no està ben establerta sinó que més aviat es pensa que és un grup polifilètic. No s'ha d'oblidar que els Perciformes és l'ordre de peixos més diversificat i que és, també, el major ordre de vertebrats existent (almenys conté 6.900 espècies).

Nosaltres hem pogut estudiar 19 espècies repartides en 13 famílies i 6 subordres de Perciformes. Els resultats obtinguts per cada una d'aquestes famílies s'exposen en els pròxims apartats. En primer lloc, no obstant, es detallen les espècies estudiades:

ORDRE PERCIFORMES**Subordre Percoidei**

Família Percichthyidae	<i>Dicentrarchus labrax</i>
Família Sparidae	<i>Diplodus annularis</i>
	<i>Diplodus sargus</i>
	<i>Lithognathus mormyrus</i>
	<i>Pagellus acarne</i>
	<i>Sparus aurata</i>
Família Mullidae	<i>Mullus barbatus</i>
	<i>Mullus surmuletus</i>

Subordre Labroidei

Família Labridae	<i>Symphodus (Crenilabrus) ocellatus ocellatus</i>
------------------	--

Subordre Notothenioidei

Família Nototheniidae	<i>Eleginops maclovinus</i>
Família Harpagiferidae	<i>Harpagifer</i> sp.
Família Channichthyidae	<i>Champscephalus esox</i>

Subordre Trachinoidei

Família Trachinidae	<i>Trachinus draco</i>
Família Uranoscopidae	<i>Uranoscopus scaber</i>

Subordre Blennioidei

Família Blenniidae	<i>Lipophrys trigloides</i>
--------------------	-----------------------------

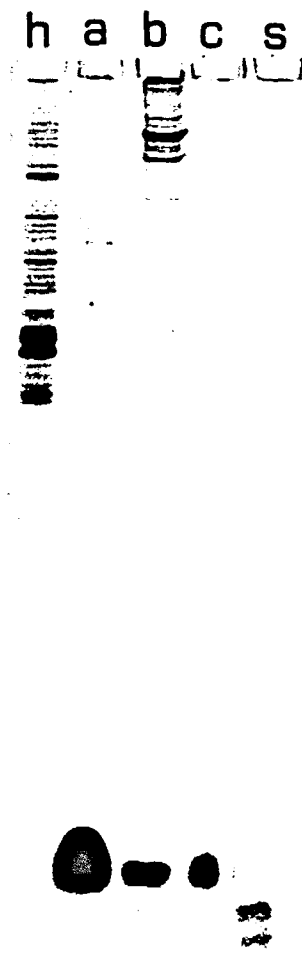
Subordre Scombroidei

Família Trichiuridae	<i>Lepidopus caudatus</i>
Família Gempylidae	<i>Thyrsites atun</i>
Família Scombridae	<i>Scomber</i> sp.

5.9.1. Família Percichthyidae

Es va aconseguir esperma de llobarro (*Dicentrarchus labrax*) a partir d'exemplars cultivats a l'Institut d'Aqüicultura de Torre de la Sal (CSIC). Les mostres d'esperma van ser enviades en etanol al 90% i conservades en fred fins al moment de la seva utilització. D'aquest esperma se'n va separar els nuclis dels espermatozoides (v. II-2.2.) i a partir d'aquests es van obtenir les proteïnes bàsiques associades a la cromatina per extraccions amb àcids diluïts (v. II-2.3.3.).

Figura III-50. PEB de *Dicentrarchus labrax*. Extracció amb HCl 0.4 N (a) i extraccions successives amb AA 35% (b) i HCl 0.4 N (c). Estàndards: histones (h) i salmina (s).



El contingut en proteïnes bàsiques dels nuclis dels espermatozoides de *D. labrax* és molt simple (figura III-50). Només apareix una banda majoritària a l'extracte global amb HCl 0.4 N, de mobilitat similar a la de la salmina. La minúscula proporció de proteïnes d'alt pes molecular que apareixen junt amb la proteïna principal, són separades en l'extracte amb AA 35%, quedant a l'extracte HCl post AA la proteïna principal pura.

Tant la mobilitat electroforètica com el comportament enfront dels àcids utilitzats feien suposar que es tractava d'una protamina típica. No obstant, ja que podíem disposar de més material i donat que, paral·lelament, s'estaven realitzant estudis de microscopia electrònica sobre l'espermioogènesi d'aquesta espècie (Dr. E. Ribes, UB), es va decidir aprofundir en la caracterització d'aquesta molècula obtenint-ne no només l'anàlisi composicional sinó també la seva seqüència aminoacídica total (v. III-5.11.). D'aquesta manera vam aconseguir la caracterització completa d'un dels models bàsics més freqüents de PEB als peixos.

Amb aquesta finalitat es va partir de nou material d'igual procedència i conservat de la mateixa manera. En aquest cas, però, donat que es volia fer una purificació per columna, donat que partíem d'esperma fluent i donada la gran predominància al nucli espermàtic de la proteïna principal, vam decidir fer l'extracció de proteïnes bàsiques directament a partir de l'esperma sense previ aïllament dels nuclis espermàtics: L'esperma va ser centrifugat per tal d'eliminar l'etanol en el que era conservat i sobre el sediment obtingut es van realitzar dues extraccions succesives amb HCl 0.4 N. Les proteïnes obtingudes, un cop precipitades, rentades i secades, es van dissoldre amb tampó acetat sòdic 0.05 N / NaCl 0.2 M pH 6.00 contenint clorur de benzamidina 10 mM i es van centrifugar a 15.000 g durant 10 minuts per tal d'eliminar el material no solubilitzat. Per l'elució de les proteïnes es va realitzar un primer rentat amb el mateix tampó però sense la benzamidina, un rentat amb tampó contenint NaCl 0.8 M i finalment es va aplicar un gradient des de NaCl 0.8 M fins a 1.6 M en acetat sòdic 0.05 N, pH 6.00.

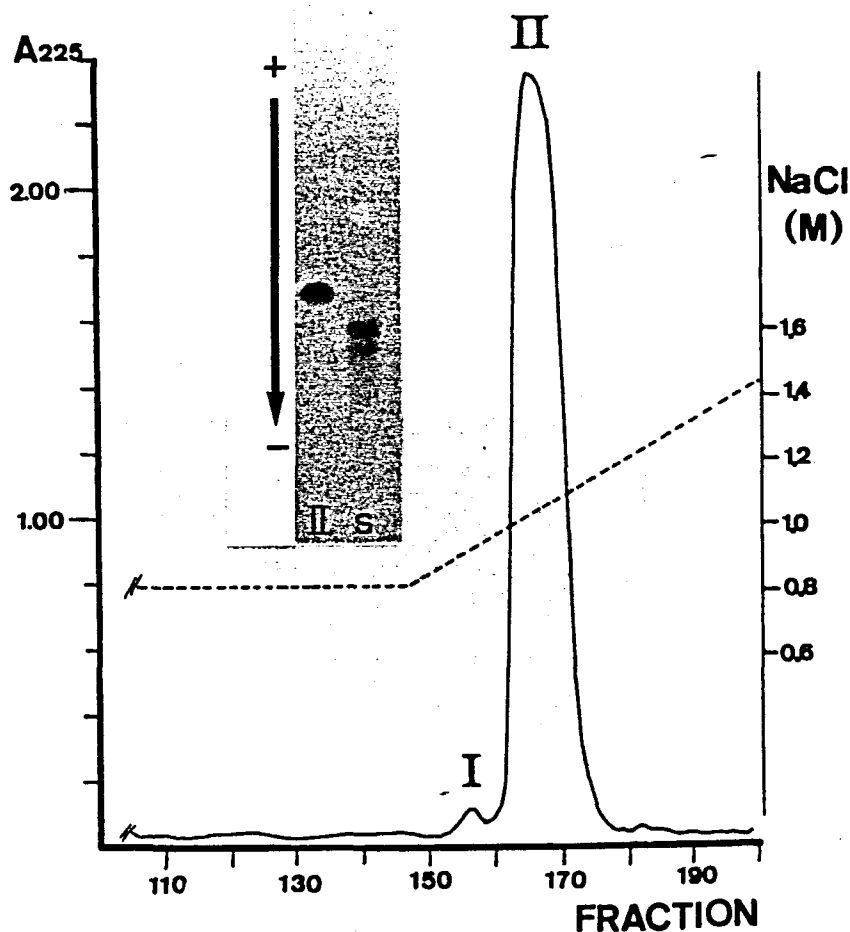


Figura III-51. Cromatografia de bescanvi iònic (cel·lulosa CM-52) de les PEB de *D. labrax*. i control electroforètic de la protamina purificada.

A la figura 51 es presenta el perfil cromatogràfic corresponent a la zona on s'elueix la protamina del llobarro. S'observa com al pic II s'elueix aquesta proteïna en forma pura. Aquesta fracció va ser dialitzada enfront de bicarbonat amònic 50 mM i liofilitzada en alíquotes. Una de les alíquotes va ser utilitzada per efectuar l'anàlisi d'aminoàcids i la resta per la determinació de la seqüència. El resultat de l'anàlisi composicional es mostra a la taula III-14 i reflexa, com ja suposàvem, que es tracta d'una protamina típica; així, presenta poca varietat de residus aminoacídics (7), gran quantitat d'arginina (62.8%) i una considerable proporció d'aminoàcids fosforilables (10.6%), tot això en una molècula de mida petita: es va estimar per la seva mobilitat en gels d'acril-

amida al 15% (v. II-3.4.) que es tractava d'una molècula amb 37 residus (encara que en realitat en té 34, v. 5.11.). Una peculiaritat de la protamina de *D. labrax* és que el 50% de residus fosforilables són Thr, mentre que la Ser és el residu fosforilable predominant a les protamines típiques dels peixos (v. Oliva i Dixon, 1991, per un llistat complet de seqüències de protamines de peixos). L'obtenció de la seqüència d'aquesta espècie s'explica a l'apartat III-5.11; com veurem, el resultat concorda amb el d'una protamina típica.

En resum, l'espermatozoide de *Dicentrarchus labrax* presenta al seu nucli una protamina típica que substitueix completament les histones al llarg de l'espermioogènesi, sent la principal responsable de la compactació de la cromatina en aquesta espècie.

5.9.2. Família Sparidae

Es van estudiar 5 espècies pertanyents a aquesta família: *Diplodus annularis*, *Diplodus sargus*, *Lithognathus mormyrus*, *Pagellus acarne* i *Sparus aurata*. En alguns casos la mostra de partida va ser esperma fluent mentre que en els altres es va treballar amb gònada madura. En tot cas, a partir d'aquestes mostres es van aïllar els nuclis espermàtics i se'n van obtenir les proteïnes bàsiques pels procediments habituals (v. II-2.2. i II-2.3.3.).

A la figura III-52 (A) es mostren les dotacions de PEB globals obtingudes per solubilització amb HCl 0.4 N segons es presenten en GPAU amb 15% d'acrilamida. S'observa com en tots els casos es mantenen histones al nucli espermàtic i que no apareix cap banda corresponent a proteïnes addicionals específiques. Comparant els patrons de les diferents espècies (pous 3-7) s'observa com són essencialment iguals excepte per petites variacions en l'H1. A la part B de la mateixa figura es mostra el desenvolupament de les mateixes espècies que a A (excepte *Diplodus sargus*) en GPTU; les concentracions triades per aquest gel van ser, com sempre, urea 6 M i tritó 6 mM, condicions amb les que s'obté una bona resolució de les histones H2A, H2B i H3, que són les més problemàtiques en gels amb acètic/urea. En aquesta figura s'observa

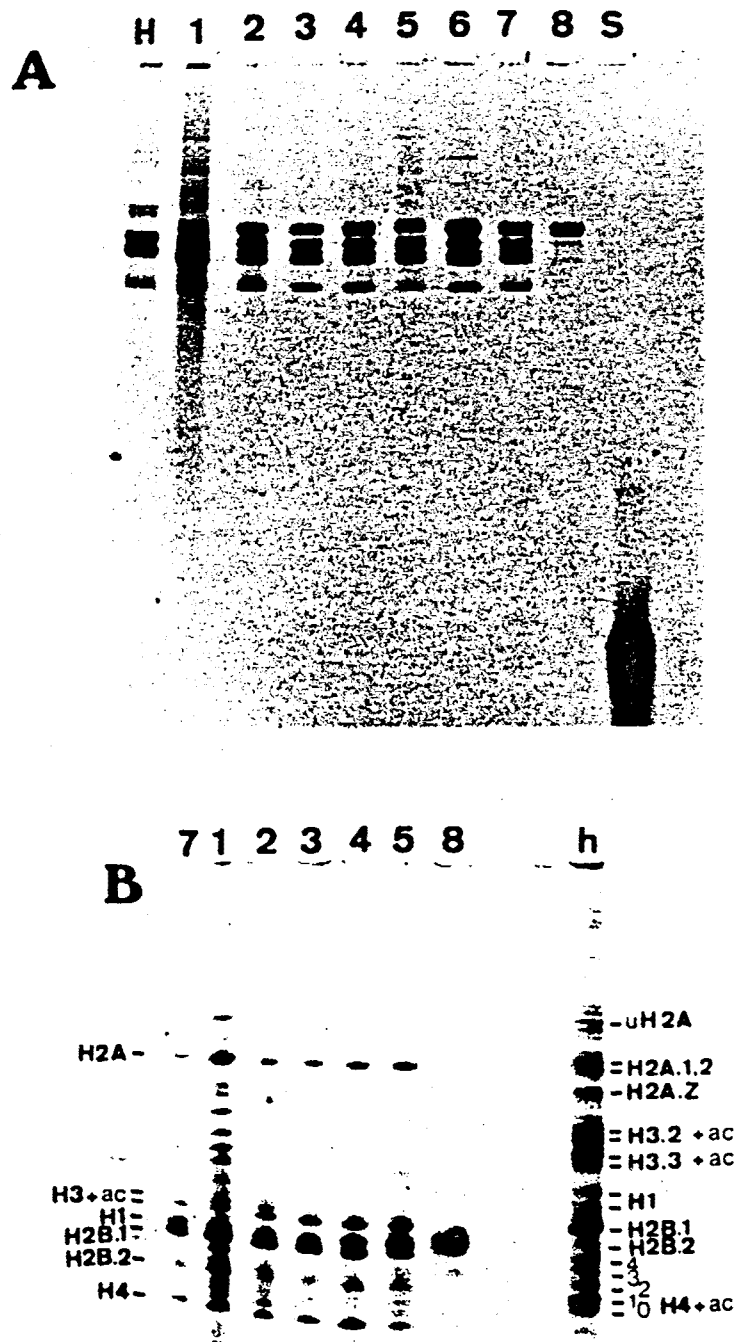
com, a les mostres procedents de gònada apareix una acetilació més o menys evident a les histones H3 i H4.

Per comprovar que realment es tractava d'histones de tipus somàtic, es va procedir a l'obtenció de nuclis somàtics i extracció de les seves histones per tal de poder comparar els patrons. L'espècie escollida per aquest experiment va ser *Pagellus acarne* (besuc) i el teixit el fetge; els nuclis hepàtics es van obtenir pel mateix procediment que els espermàtics i les histones van ser extretes per solubilització amb HCl 0.4 N. El mateix protocol es va realitzar a partir de gònada masculina i esperma de la mateixa espècie.

Els resultats obtinguts queden indicats a la figura III-52 (pous 1, 2 i 3). S'observa com, deixant de banda que l'extracte a partir de fetge no és tan net com els altres, apareixent al gel un gran número de bandes, les 5 histones presenten, efectivament, una mobilitat electroforètica similar als 3 casos (fetge-testicle-esperma). L'única diferència que sembla adivinar-se en les histones a partir d'aquests gels és un increment de la proporció d'H1 des de fetge fins a esperma. Aquest fet s'evidencia molt millor en els gels bidimensionals que es presenten a la figura III-53; s'aprecia aquí una simplificació en el model de proteïnes bàsiques (pèrdua de proteïnes no histones) i un increment de la quantitat d'H1 respecte les altres histones. Igualment, per suportar aquest resultat, es va recórrer a la densitometria: la quantificació per densitometria dels gels indica que, referida a les histones del cor del nucleosoma, es presenta aproximadament el doble d'H1 als nuclis espermàtics que als nuclis hepàtics.

L'H1 de *P. acarne* va ser aïllada per electroelució a partir d'un gel contenint SDS (v. II-2.7.2.), va ser dialitzada extensivament enfront d'HCl 5 mM i es va analitzar composicionalment (taula III-15). Aquesta composició no revela cap característica que la diferenciï clarament de la d'una H1 canònica i no s'observa cap enriquiment especial en aminoàcids bàsics. Així mateix, es va dur a terme l'anàlisi aminoacídica del complement proteïc global de l'esperma de *P. acarne*, que es presenta a la taula III-13.

Figura III-52. PEB dels Sparidae. A. GPAU (15% acrilamida). B. GPTU (urea 6 M, tritó 6 mM). H. Estàndard d'histones d'eritròcit de pollastre; h, Estàndard d'histones de guatlla; S. Estàndard de salmina; *Pagellus acarne*: 1. Fetge; 2. Testicle; 3. Esperma; 4. *Sparus aurata* (esperma); 5. *Diplodus annularis* (testicle); 6. *Diplodus sargus* (esperma); *Lithognathus mormyrus*: 7. Esperma; 8. H1 espermàtica. Identificació de les histones segons Wunsch i Lough (1990) i les bidimensionals de la figura III-53.



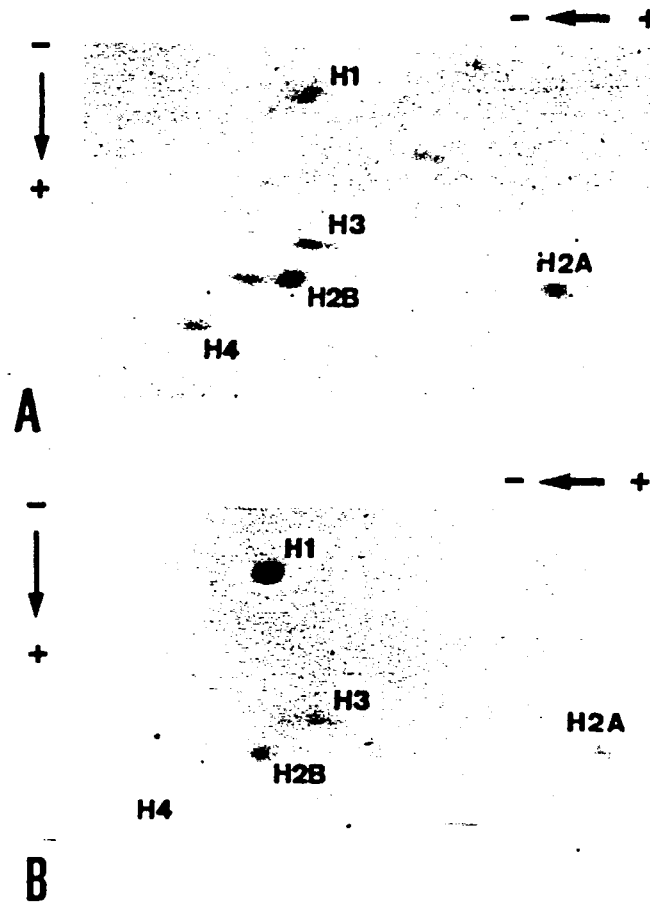


Figura III-53. Electroforesi bidimensional de les proteïnes extretes amb HCl 0.4 N a partir de nuclis de fetge (A) i testicle (B) de *Pagellus acarne*. Primera dimensió en tritó-urea i segona en SDS.

Es va comprovar també en una altra espècie de la família, *Lithognathus mormyrus* (mabre), que realment l'H1 espermàtica presentava una mobilitat electroforètica similar a l'H1 d'altres teixits. Així es va separar l'H1 espermàtica de les histones nucleosòmiques per solubilització amb PCA 5% a partir de la pols de proteïnes totals extretes amb HCl, i l'H1 de gònada femenina i fetge a partir d'extracció directa amb PCA 5% sobre el teixit. Tal i com esperàvem pels resultats obtinguts amb el besuc, l'H1 procedent dels diferents teixits de la mabre té una migració electroforètica molt similar (figura III-54).

1 2 3 4 5

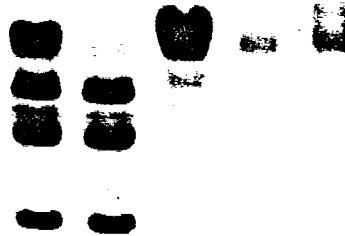


Figura III-54. Comparació de l'H1 procedent de diferents teixits de *Lithognathus mormyrus*: 1. Proteïnes espermàtiques bàsiques globals; 2. Histones del cor nucleosòmic (esperma); 3. H1 (esperma); 4. H1 (fetge); 5. H1 (gònada femenina).

En resum, doncs, podem dir que als espermatozoides dels membres de la família dels espàrids es manté la dotació completa d'histones sense aparició de cap proteïna específica addicional. Aquestes histones no semblen presentar cap diferència important respecte les histones somàtiques a excepció d'un acúmul de la histona H1 a l'esperma. És, doncs, interessant notar com en aquest grup l'absència de protamines coincideix amb aquest increment de l'H1; aquest fet suggereix un reemplaçament funcional de la protamina per l'H1 en la condensació de la cromatina dels nuclis dels espermatozoides d'aquesta família.

5.9.3. Família Mullidae

S'han estudiat dues espècies del gènere *Mullus*, *Mullus barbatus* i *Mullus surmuletus*, encara que on més s'ha aprofundit el treball ha estat sobre la segona espècie, el moll roquer. Els resultats obtinguts, com es veurà a continuació, han estat francament interessants ja que el model de PEB trobat

en aquest gènere no s'havia descrit fins al moment i a més no l'hem trobat representat en cap altre grup de peixos.

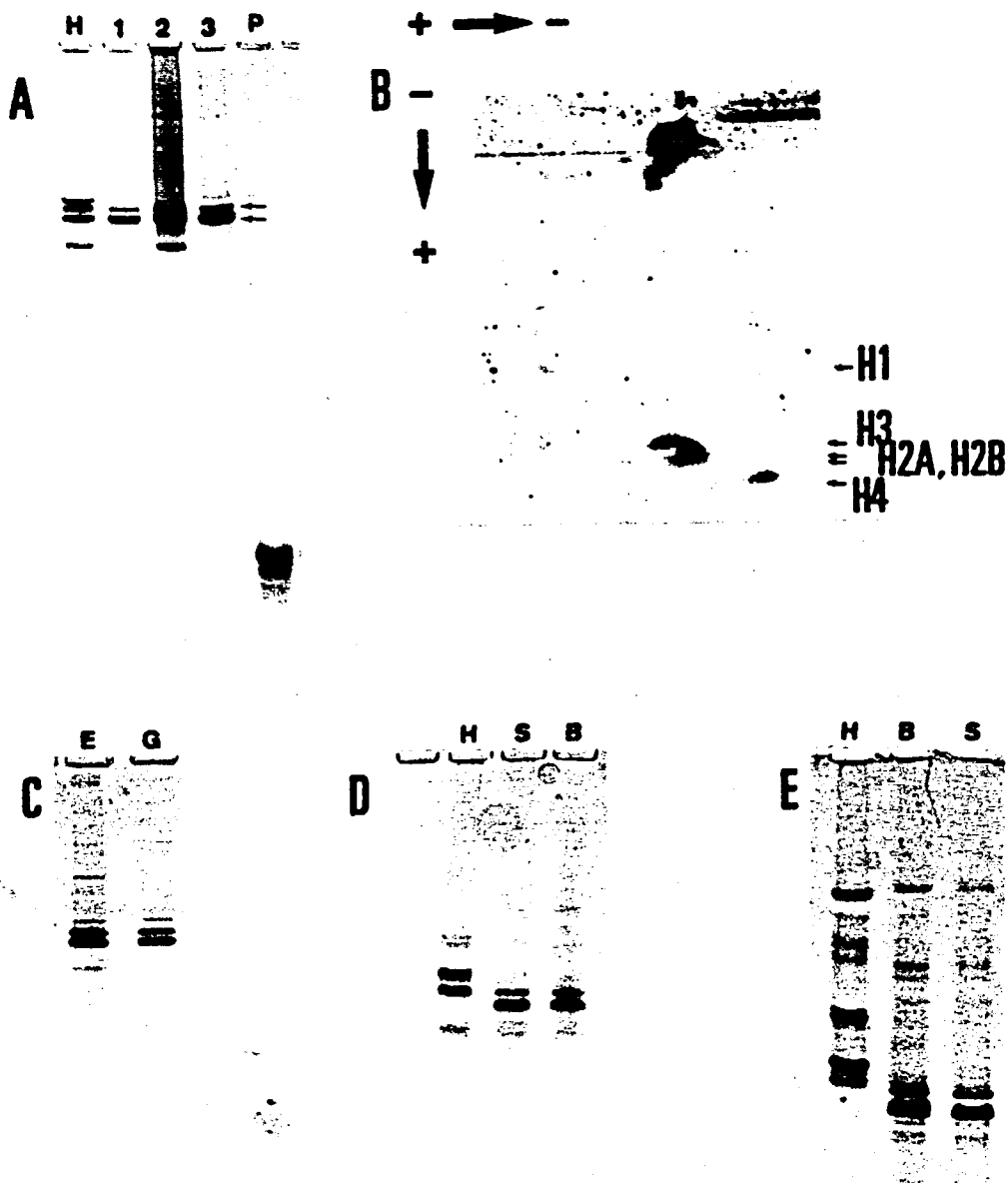
En un primer estadi es va dissecar un exemplar mascle de *M. surmuletus* en estat de maduresa i se'n va extreure la gònada, de la qual es van aïllar els nuclis espermàtics com ja s'ha descrit (v. II-2.2.). A continuació, al no tenir cap indicatiu sobre quin tipus de proteïna bàsica s'hi podria trobar, es va procedir a dues extraccions en paral·lel, d'una banda es va fer una extracció global amb HCl 0.4 N, i d'una altra banda una amb AA 35% i re-extracció amb HCl 0.4 N (v. II-2.3.3.).

En analitzar electroforèticament les proteïnes obtingudes en GPAU amb el 15% d'acrilamida, vam observar que el contingut de PEB consistia bàsicament en 2 proteïnes majoritàries que migraven, molt properes entre sí, a la zona de les histones (fletxes a la figura III-55, A). No obstant, com s'observa als pous 2 i 3 de l'esmentada figura, aquestes proteïnes s'extreuen preferencialment en la fracció HCl post AA i poc amb AA 35%, fet pel qual no es pot dir que es tracti d'histones, almenys del tipus canònic. Igualment, quan s'intenten desenvolupar aquestes proteïnes en gels bidimensionals contenint SDS, s'observa com aquestes proteïnes es mostren insolubles en aquest detergent i no penetren en la segona dimensió, al contrari que les histones (figura III-55, B, fletxes).

D'altra banda, aquestes dues proteïnes semblen substituir pràcticament la totalitat de les histones al nucli espermàtic. Així, encara que en l'extracte global provinent de gònada s'observen petits restes d'histones (v. figura III-55, B i figura III-55 C, pou G), quan es compara amb el mateix extracte procedent d'esperma fluent (figura III-55, C, pou E), aquest apareix molt més net de restes d'histones i altres proteïnes.

Més endavant es va poder aconseguir gònada masculina madura d'una altra espècie de moll, el moll de fang (*Mullus barbatus*). Les mateixes anàlisis realitzades sobre aquesta espècie van posar en evidència la presència del mateix tipus de proteïnes bàsiques als nuclis espermàtics de *M. barbatus*. La similitud entre el model de PEB de les dues espècies es reflexa tant en GPAU (figura III-55, D) com en GPTU (figura III-55, E).

Figura III-55. PEB del gènere *Mullus*. A. *M. surmuletus*: 1. Extracció global amb HCl 0.4 N; 2. Extracció amb AA 35%; 3. Extracció amb HCl post AA. B. Desenvolupament bidimensional de les proteïnes bàsiques extretes a partir de testicle de *M. surmuletus*. Primera dimensió en acètic-urea i segona amb SDS. C. Comparació de les proteïnes bàsiques extretes a partir de gònada (G) i esperma (E) de *M. surmuletus*. D. Comparació dels extractes globals de *M. barbatus* (B) i *M. surmuletus* (S) en GPAU. E. Mateixa comparació que a B però en GPTU. Estàndards: H. Histones d'eritròcit de pollastre; P. Protamina de salmó.



Degut a l'interès d'aquest model i la relativa accessibilitat del material, es va decidir aprofundir més en l'estudi d'aquestes proteïnes. La idea era caracteritzar-les no només a nivell composicional sinó intentar arribar inclús a averiguar la seva estructura primària. Així, en una segona fase es van obtenir més exemplars mascles madurs a partir de les gònades i esperma dels quals es van efectuar extraccions globals de les PEB utilitzant HCl 0.4 N.

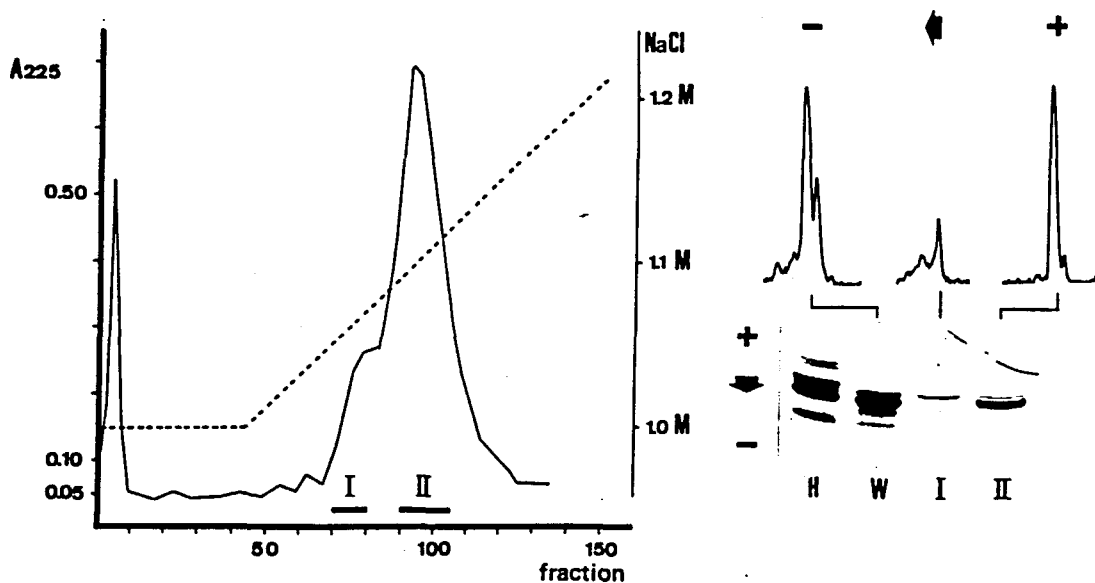
Els extractes obtinguts es van passar a través de columnes de bescanvi iònic per tal de poder separar les dues proteïnes majoritàries. En primer lloc, es va utilitzar una columna amb matriu de cel·lulosa CM-52 (Whatman) i es van eluir les proteïnes amb solucions d'acetat sòdic 50 mM contenint diverses concentracions de NaCl i ajustades a pH 6.00. Aquesta primera columna (no mostrada) va servir per eliminar les restes d'histones però no va separar les dues proteïnes corresponents a les dues bandes observades en les electroforesis, que s'eluien en un mateix pic corresponent a uns valors de NaCl entre 0.6 i 1 M. La part de baixada d'aquest pic, que es mostrava proporcionalment més enriquida en la banda de migració més ràpida, va ser precipitada amb TCA al 20% (v. II-2.4.2.) i utilitzada com a mostra de partida d'una segona cromatografia en columna.

En aquest cas es va utilitzar una matriu de CM-Sephadex C-25 (Pharmacia) i les solucions eluents van ser ajustades a pH 6.70. El perfil cromatogràfic obtingut es mostra a la figura III-56 juntament amb el desenvolupament electroforètic de les proteïnes corresponents als pics I i II. Altre cop, la separació de les dues proteïnes no és total, però és millor que l'obtinguda en la primera columna. Per donar una millor idea del grau de puresa de cada proteïna, s'adjunten les anàlisis densitomètriques corresponents a les proteïnes dels pics I i II comparades amb la de la barreja de proteïnes inicial (W).

A partir de les proteïnes dels pics I i II, un cop precipitades amb TCA 20%, rentades i assecades (v. II-2.4.2.), es van realitzar les anàlisis composicionals d'aquestes proteïnes. Tal i com esperàvem, tant pel seu comportament en les electroforesis com en les cromatografies en columna, els percentatges dels diferents aminoàcids en cada una de les proteïnes són molt similars entre sí (taula III-12). Veiem que es tracta de proteïnes enriquides en aminoàcids bàsics, presentant proporcions més o menys equivalents de Lys i

Arg (superiors al 20%) i quantitats considerables d'Ala (11.4%), Pro (7.3%) i Ser (9.1%). Aquestes proteïnes recorden, per la seva composició general, a les "protamine like" (PL) de l'esperma de mol·luscs bivalves, proteïnes relacionades amb la histona H1 (Subirana i Colom, 1987) (v. taula III-12, III i IV).

Figura III-56. Cromatograma en columna de CM-Sephadex C-25 (Pharmacia) de les PEB de *M. surmuletus* i control electroforètic de les proteïnes contingudes als pics I i II. Els pous H i W contenen un estàndard d'histones i l'extracte global de les PEB de *M. surmuletus*, respectivament. Les anàlisis densitomètriques donen una més precisa quantificació del grau de purificació de la proteïna.



Donada la similitud entre les dues bandes, es va decidir dur a terme els experiments ulteriors únicament sobre la proteïna de major mobilitat electroforètica que, a més de ser la més fàcilment separable, és la més abundant en el complement proteic de *M. surmuletus*. Aquesta banda va ser repurificada a través de cromatografia amb HPLC de fase reversa: Alíquotes d'uns 300 µg de la proteïna obtinguda al pic II de la cromatografia de la figura III-56 van ser dissolts en aigua i injectats en una columna Vydac C18, 5 µm, 4.6 x 250 mm. Per eluir el contingut proteic es va aplicar un gradient d'acetoneitril i les fraccions recollides van ser llegides a 230 nm. El cromatograma

obtingut es mostra a la figura III-57 juntament amb l'electroforegrama corresponent a cada un dels pics. La proteïna pura eluïda al pic 3 va ser utilitzada per la seva seqüenciació directa i per la seva fragmentació i posterior seqüenciació dels pèptids obtinguts (v. III-5.11.2.).

Taula III-12. *Mullus surmuletus*. Composicions aminoacídiques de les proteïnes corresponents als pics I (I) i II (II) de la cromatografia de la figura III-56, comparades amb les de les "protamine like" de dos mol·luscs bivalves: la PL-I de *Macra corallina* (III) i la PL-III de *Crenomytilus grayanus* (IV). t, traces.

	I	II	III(1)	IV(2)
Lys	22.7	24.2	21.3	25.4
His	—	—	0.8	--
Arg	21.3	22.1	20.6	26.5
Asx	4.5	5.1	2.9	0.9
Thr	4.0	4.5	2.8	3.4
Ser	9.1	9.2	21.8	15.6
Glx	1.0	t	3.4	0.9
Pro	7.3	6.8	3.0	5.1
Gly	6.2	5.4	3.8	6.5
Ala	11.4	11.9	13.1	12.9
Cys	—	—	—	--
Val	4.5	4.9	2.0	1.5
Met	1.4	t	0.2	--
Ile	1.4	t	1.4	0.4
Leu	5.3	5.8	2.2	0.6
Tyr	t	t	0.5	0.1
Phe	t	t	0.5	--

(1) Colom i Subirana, 1979.

(2) Odintsova et al., 1981.

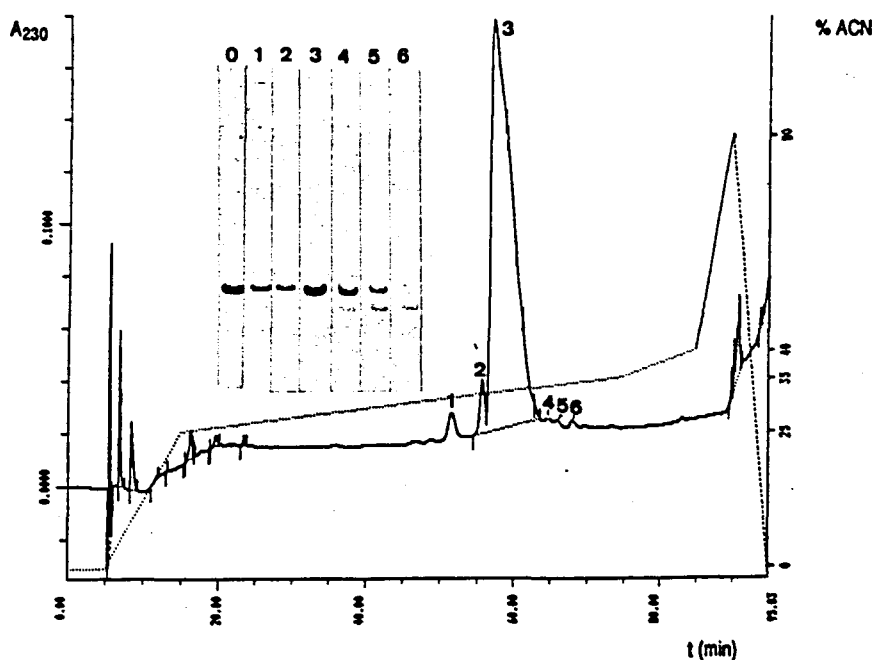


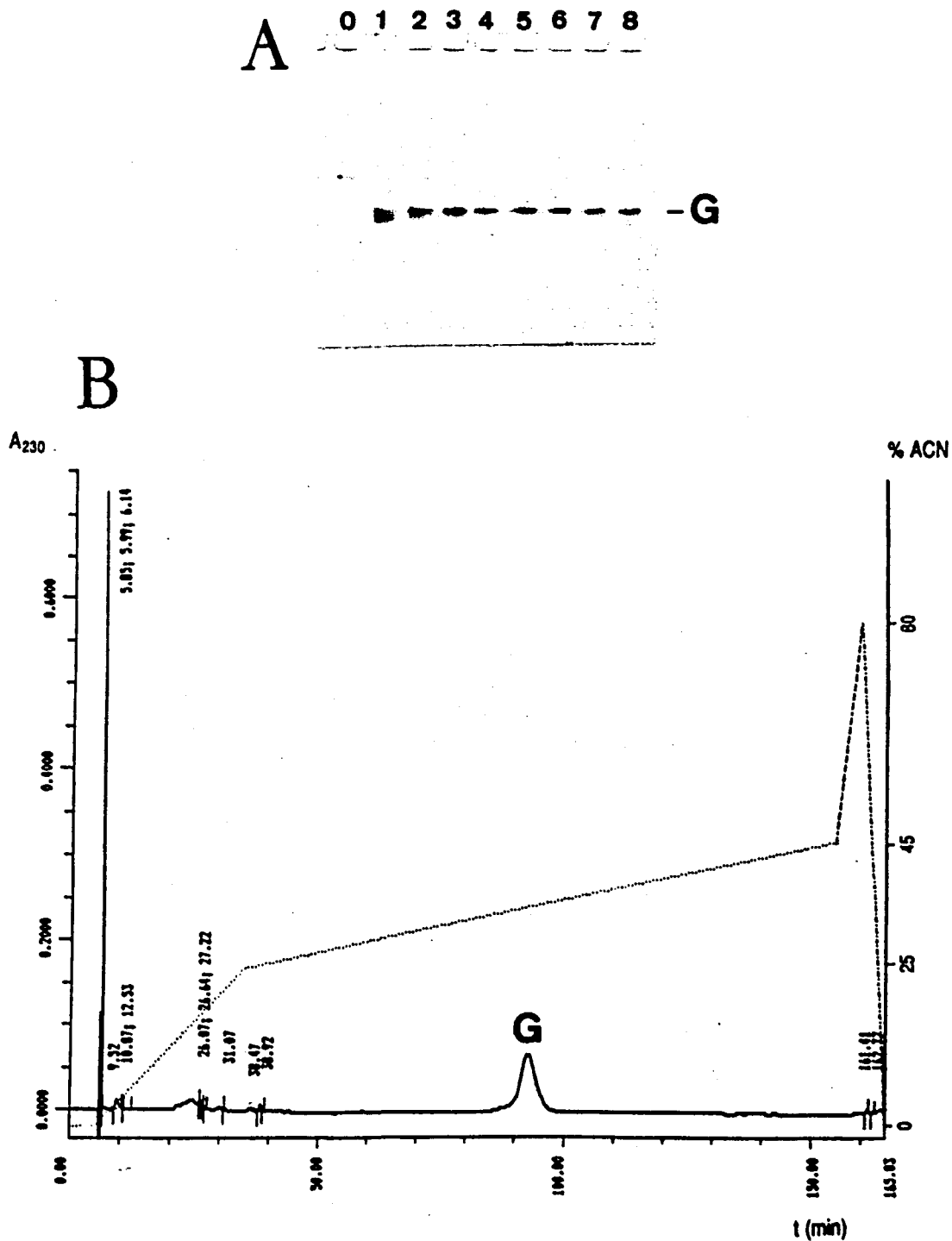
Figura III-57. Separació per HPLC en fase reversa de les proteïnes obtingudes al pic II de la figura III-520, i desenvolupament electroforètic de les proteïnes presents a cada pic.

D'altra banda, per obtenir alguna informació sobre l'estructuració de la proteïna es va dur a terme una digestió enzimàtica amb tripsina. Amb aquest motiu, uns 75 µg de la proteïna corresponent al pic II de la figura III-56 van ser incubats amb tripsina (v. II-3.7.1.), amb una proporció d'enzim:proteïna d'1:375, en un medi de NaCl 2 M i Tris 25 mM pH 7.5. A diferents temps (2, 7, 15, 30, 60, 120, 150 i 180 minuts) es van agafar alíquotes de l'incubat i es van portar sobre tampó de mostres d'electroforesi per parar la reacció alhora que les mostres quedaven llestes per ser analitzades electroforèticament.

A la figura III-58 (A) s'observa l'aparició d'un pèptid resistent a la digestió amb tripsina que, presumiblement, com es descriu en altres treballs (Allan et al., 1980; Ausió et al., 1987), correspongui a un pèptid amb estructura globular.

Adicionalment, es va repetir la tripsinització d'aquesta proteïna amb la finalitat d'aïllar aquest pèptid globular i obtenir la seva estructura primària (v. III-5.11.2). Essencialment, les condicions de treball van ser les mateixes excepte per la quantitat de mostra de partida (500 µg) i la manera de parar la reacció de digestió: En aquest cas la incubació es va parar als 60 minuts utilitzant l'inhibidor de la tripsina provinent de la soja en proporcions 1:4 d'enzim:inhibidor, mantenint-ho sempre en gel fins al moment de la separació del pèptid resultant amb HPLC de fase reversa. Per recuperar el pèptid i eliminar les sals abans de carregar la mostra a la columna, es va procedir a una precipitació amb TCA 20% i posteriors rentats amb acetona (v. II-2.4.2.). Després d'assecar la mostra, aquesta va ser dissolta amb aigua i injectada a una columna Beckman C18, 5 µm, 4.6 x 250 mm. Les solucions eluents van ser TFA 0.1% (fase aquosa) i acetonitril (fase orgànica). El gradient aplicat i el resultat obtingut s'aprecien a la figura III-58 (B). Després de comprovar per electroforesi que el pic obtingut efectivament corresponia al pèptid globular es va procedir a l'anàlisi de la seva seqüència aminoacídica (v. III-5.11.2).

Figura III-58. A. Tripsinització de la PEB de major mobilitat de *M. surmuletus*. Els pous 1-8 corresponen als 2, 7, 15, 30, 60, 120, 150 i 180 minuts, de duració de la tripsinització, respectivament. Pou 0 = mostra de partida. B. Separació per HPLC en fase reversa del pèptid resultant de la tripsinització durant 60 minuts de la PEB de major mobilitat de *M. surmuletus*. G = pèptid resistent a la digestió.



5.9.4. Família Labridae

A partir de l'esperma de *Symphodus (Crenilabrus) ocellatus ocellatus* es van separar els nuclis dels espermatozoides i se'n van obtenir les PEB associades. Com es partia de molt poca mostra, es va decidir realitzar una extracció global de les proteïnes utilitzant HCl 0.4 N, sense realitzar paral·lèlament les extraccions amb AA i HCl post AA.

L'extracte obtingut, un cop desenvolupat en un gel d'acrilamida al 15%/acètic/urea, va mostrar la presència d'una protamina, de mobilitat lleugerament inferior a la salmina, que substitueix completament les histones durant l'espermioquènesi (figura III-59). Aquest cas, doncs, és molt similar al ja vist al llobarro (*D. labrax*).

Figura III-59. PEB de *Symphodus (Crenilabrus) ocellatus ocellatus* (extracte global amb HCl 0.4 N) (X). Estàndards d'histones (H) i de protamina de salmó (P).



5.9.5. Famílies Nototheniidae, Harpagiferidae i Channichthyidae

Fent una excepció a la línia seguida fins ara, on cada família corresponia a un apartat diferent, aquestes tres famílies seran tractades en un mateix apartat. La decisió obeeix no només a la seva proximitat filogenètica (les tres pertanyen al subordre dels Notothenioidei) sinó també a que les tres tenen el mateix origen i inclús van ser processades de la mateixa manera (excepte *C. esox*).

Es van rebre mostres d'esperma de 3 espècies procedents del SO de l'Atlàntic (Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina). Aquestes espècies i les famílies a què pertanyen es detallen a continuació:

Família Nototheniidae	<i>Eleginops maclovinus</i>
Família Harpagiferidae	<i>Harpagifer sp.</i>
Família Channichthyidae	<i>Champscephalus esox</i>

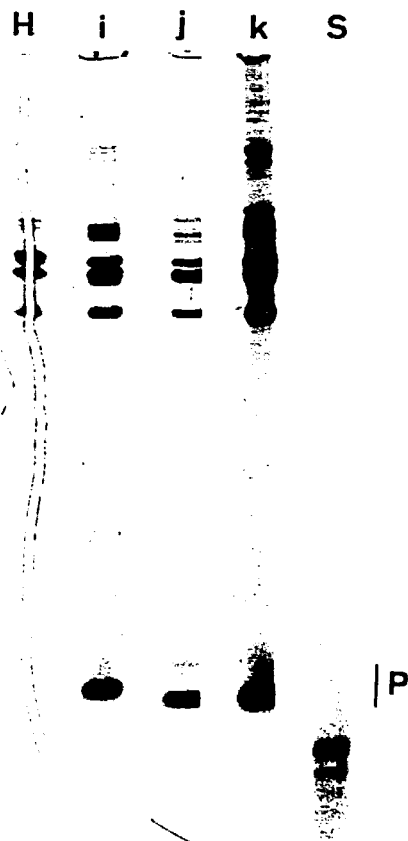
En tots els casos les mostres rebudes eren esperma en etanol al 90% excepte en el cas de *C. esox*, on la mostra era ja la proteïna seca procedent d'una extracció amb HCl sobre esperma d'aquesta espècie.

Degut a què en tots els casos la mostra era molt escassa, i ja que es tractava d'esperma, es va decidir fer una extracció global amb HCl directament (sense separació prèvia dels nuclis espermàtics). Les proteïnes obtingudes per aquest procediment, juntament amb les de *C. esox*, van ser analitzades electroforèticament (figura III-60).

A les 3 famílies s'observa l'aparició d'una proteïna que per la seva mobilitat electroforètica podem qualificar com a protamina (P a la figura); concretament, com s'observa a l'anterior figura, migra lleugerament per sobre la salmina. A més d'aquesta proteïna s'observa en tots els casos la presència d'histones, encara que a la família Harpagiferidae sembla que es presenta una menor proporció d'histona H1 respecte a les altres histones.

L'aparició de quantitats notables d'histones en aquestes espècies pot derivar del fet d'haver extret directament les proteïnes sense separació prèvia dels nuclis espermàtics, o també de possibles contaminacions de la mostra enviada per altres teixits.

Figura III-60. PEB del subordre Notothenioidei. Família Nototheniidae: i. *Eleginops maclovinus*. Família Harpagiferidae: j. *Harpagifer* sp. Família Channichthyidae: k. *Champsocephalus esox*. Estàndards d'histones (H) i de salmina (S). P, protamina.



5.9.6. Famílies Trachinidae i Uranoscopidae

A l'igual que hem fet en les famílies pertanyents al subordre Notothenioidei, aquestes dues famílies seran tractades en un mateix apartat

degut a la seva proximitat filogenètica (ambdues famílies pertanyen al subordre Trachinoidei) i a què les dues van ser obtingudes i processades alhora en tot moment; además, com ara veurem, els resultats obtinguts van ser equivalents.

A partir de gònada masculina madura de *Trachinus draco* (Trachinidae) i d'esperma fluent d'*Uranoscopus scaber* (Uranoscopidae), es van obtenir els nuclis espermàtics (v. II-2.2.). Una alíquota dels nuclis obtinguts de cada espècie es va utilitzar per fer una extracció global de les proteïnes bàsiques associades al nucli amb HCl 0.4 N, mentre que la resta es va utilitzar per fer-ne una extracció fraccionada amb AA 35% i HCl post AA (v. II-2.3.3.).

Figura III-61. PEB de *Trachinus draco* (Trachinidae) (pous 1-4) i *Uranoscopus scaber* (Uranoscopidae) (pous 5-8). Extraccions globals amb HCl 0.4 N (1, 5); extraccions fraccionades amb AA 35% (2, 6) i HCl post AA (3, 7); extractes resultants de la separació per insolubilitat en SDS (4, 8). Estàndards: H, histones; S, salmina.



Els resultats d'aquestes extraccions es mostren a la figura III-61. Als extractes globals amb HCl s'observa com pràcticament només hi és present una proteïna de mobilitat una mica inferior a la salmina en el cas d'*U. scaber*, mentre que a *T. draco*, a més d'una proteïna de les mateixes característiques, hi ha restes evidents d'histones i altres proteïnes d'elevat pes molecular. No obstant, segurament aquesta diferència es deu al fet que en *U. scaber* la mostra de partida era esperma fluïent mentre que en *T. draco* es partia de gònada. De qualsevol manera, en els dos casos aquests restes d'altres proteïnes s'extreuen majoritàriament amb l'AA, mentre que l'HCl post AA rendeix majoritàriament la proteïna principal. Tant per la mobilitat electroforètica com per la seva solubilització diferencial en àcids, com per proves posteriors que ho suportaven, vam qualificar aquesta proteïna com a protamina típica.

Per a millor purificació d'aquesta proteïna es va considerar adequat dur a terme una nova obtenció de nuclis espermàtics però, aquest cop, extraient les seves proteïnes bàsiques pel mètode descrit a II-2.3.2.2., basat en la insolubilització en solucions contenint SDS d'aquelles proteïnes molt riques en Arg (com suposàvem que es tractava en el nostre cas). Efectivament, la utilització d'aquest sistema va permetre d'obtenir les protamines lliures dels restes d'histones i altres proteïnes (v. figura III-61, pous 4 i 8).

A partir de les protamines obtingudes per aquest sistema es va procedir a la seva anàlisi composicional, la qual es reflexa a la taula III-14 i posa en evidència la naturalesa de protamina típica d'aquestes proteïnes.

Com a conclusió, doncs, podem dir que la cromatina del nucli dels espermatozoides de *T. draco* i *U. scaber* és condensada per protamines típiques de teleostis, tal i com demostra la seva migració en gels d'acrilamida, el seu comportament davant els àcids diluïts i l'SDS, i la seva composició.

5.9.7. Família Blenniidae

Es va partir de la gònada madura d'un sol mascle de l'espècie *Lipophrys trigloides*, d'on es van separar els nuclis espermàtics. Degut a la poca quantitat de mostra, es va procedir a solubilitzar les proteïnes d'aquestes nuclis només amb HCl 0.4 N (sense fer també les extraccions fraccionades amb AA i HCl post AA).

Al desenvolupar electroforèticament les proteïnes obtingudes (figura III-62) es va evidenciar la presència d'histones en aquests nuclis, sense que es detectés l'aparició de cap altre proteïna de tipus protamina.

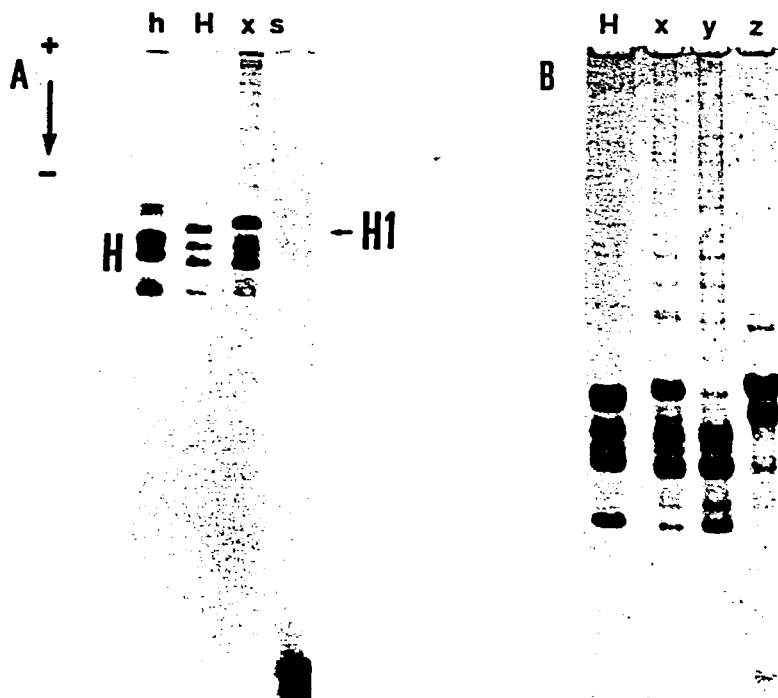
Figura III-62. PEB de *Lipophrys trigloides* (Blenniidae) (X) comparades amb estàndards d'histones (H) i protamines (P).



5.9.8. Família Trichiuridae

Es va partir d'una barreja d'esperma i gònada procedent d'un sol individu de l'espècie *Lepidopus caudatus* (sabre). Pel mètode descrit a II-2.2. se'n van obtenir els nuclis espermàtics i es va procedir a l'extracció global i fraccionada de les seves proteïnes bàsiques (v. II-2.3.3.).

Figura III-63. (A) PEB de *Lepidopus caudatus* (x) i (B) separació amb PCA 5% de les histones de la partícula nucli del nucleosoma (y) i de les histones de tipus H1 (z). H, estàndard d'histones de mabre (*Lithognathus mormyrus*, Sparidae); h, estàndard d'histones d'eritròcit de pollastre; s, estàndard de protamina (salmina).



Tant en l'extracte global amb HCl 0.4 N com en els extractes d'AA i HCl post AA, es presentava un patró d'histones, sense aparició de cap proteïna assimilable a una protamina. A la figura III-63 es mostra aquesta dotació protèica comparada amb un patró d'histones procedent d'un altre peix, l'es-

pàrid *Lithognathus mormyrus* (mabre). Igual que en aquest cas, al sabre l'H1 sembla presentar-se en major proporció que les altres histones nucleosòmiques (figura III-63, A). Al separar aquestes dues fraccions d'histones mitjançant PCA 5% (v. II-2.3.1.) s'observa com a la fracció corresponent a les proteïnes de tipus H1 apareixen 2 proteïnes (figura III-63, B). Malauradament, degut a la manca de més mostra, no es van poder caracteritzar aquestes proteïnes a cap altre nivell.

5.9.9. Família Gempylidae

Es va aconseguir esperma d'una espècie (*Thyrsites atun*) pertanyent a aquesta família. Seguint el mateix procediment que en els casos anteriors (v. II-2.2.), es van aïllar els nuclis espermàtics i, a partir d'aquests, es van obtenir les PEB totals per solubilització amb HCl 0.4 N i, paral·lelament, es van fer extraccions successives amb AA 35% i HCl post AA (v. II-2.3.3.).

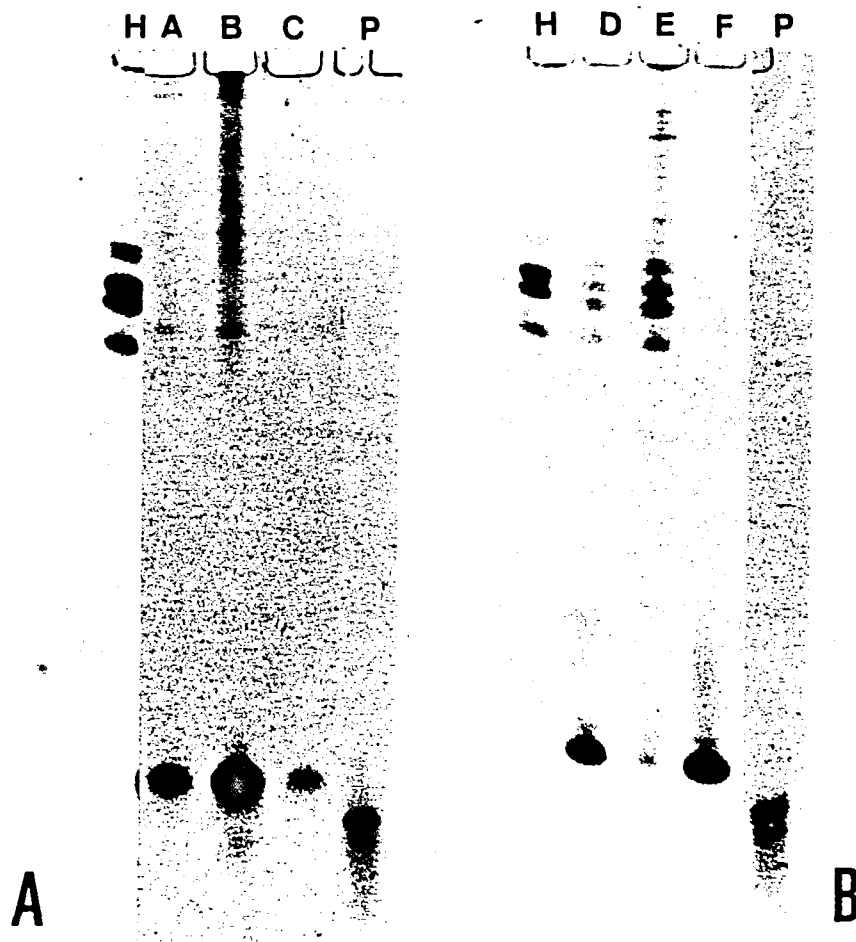
Les proteïnes solubilitzades en cada un dels extractes van ser analitzades electroforèticament en GPAU (figura III-64, A). Dels resultats d'aquesta electroforesi es pot deduir que *T. atun* presenta al nucli dels seus espermatozoides una protamina de mobilitat una mica inferior a la salmina, que substitueix a les histones durant el curs de l'espermioquèsi. Les restes d'histones que encara queden són extretes preferencialment amb l'AA, mentre que a l'extracte HCl post AA s'obté la protamina pràcticament pura.

5.9.10. Família Scombridae

En aquest cas es va partir de gònada masculina madura de *Scomber* sp., de la qual es van aïllar els nuclis espermàtics (v. II-2.2.). Les PEB presents es van obtenir tant directament (HCl 0.4 N) com per extraccions fraccionades (v. II-2.3.3.).

Els GPAU obtinguts a partir d'aquests extractes (figura III-64, B) mostren uns resultats molt similars als obtinguts en la família Gempylidae. Així, la proteïna majoritària present al nucli espermàtic d'aquesta espècie és una protamina de mobilitat lleugerament inferior a la salmina. Els restes d'histones s'extreuen preferencialment amb l'AA 35%. La protamina separada de les histones obtinguda a l'extracte HCl post AA va ser utilitzada per averiguar-ne la seva composició aminoacídica. Els resultats mostrats a la taula III-14 evidencien la seva naturalesa de protamina típica.

Figura III-64. A. PEB de *Thyrstites atun* (Gempylidae). B. PEB de *Scomber* sp. (Scombridae). Extracte global amb HCl 0.4 N (A, D); AA 35% (B, E) i HCl post AA (C, F). Estàndards d'histones (H) i de protamina (P).



Taula III-13. Composició aminoacídica (mols %) del contingut global de proteïnes bàsiques del nucli de l'espermatozoide d'espècies que no contenen protamines. (†: traces).

Aminoàcid	<i>Pagellus acarne</i>	<i>Trigla lucerna</i>	<i>Notacanthus sexspinis</i>	<i>Mora moro</i>	<i>Phycis blennioïdes</i>	<i>Merluccius capensis</i>	Histones (rang)(1)
Lys	20.9	16.7	16.3	16.0	18.5	11.6	9.7 - 29.9
His	†	1.6	1.8	0.7	†	1.2	0.8 - 2.4
Arg	6.5	7.9	10.1	8.5	7.5	11.1	1.0 - 13.6
Asx	3.2	3.3	1.4	5.9	4.6	5.4	1.6 - 7.3
Thr	4.6	4.9	4.4	4.9	6.5	5.7	2.0 - 7.2
Ser	9.7	5.0	7.7	9.0	8.4	4.7	2.2 - 7.6
Glx	6.3	6.2	6.5	8.3	7.9	6.9	2.0 - 12.0
Pro	7.0	5.7	7.3	5.6	6.9	6.6	1.5 - 11.3
Gly	5.4	9.3	10.6	4.0	6.0	8.8	4.4 - 15.0
Ala	18.0	13.4	12.0	10.5	14.5	15.2	7.8 - 27.8
Cys	†	†	-	†	†	†	0.0 - 0.4
Val	5.7	7.2	7.1	8.1	5.7	6.8	3.6 - 8.9
Met	†	†	†	1.9	1.6	2.2	0.8 - 2.4
Ile	3.0	5.5	3.0	4.3	3.2	3.3	0.5 - 5.8
Leu	7.0	9.7	8.2	8.5	6.1	7.0	2.0 - 9.1
Tyr	1.6	1.3	2.0	1.8	1.5	2.0	0.5 - 4.1
Phe	1.4	2.3	2.6	2.0	1.1	1.4	0.4 - 2.7

(1) Calculat a partir de Von Holt et al., 1979.

Taula III-14. Composició aminoacídica (mols %) de les protamines típiques d'alguns dels teleostis estudiats.

Aminoàcid	<i>Dicentrarchus labrax</i>	<i>Trachinus draco</i>	<i>Uranoscopus scaber</i>	<i>Scomber sp.</i>	<i>Sardina pilchardus</i>	<i>Helicolenus dactylopterus</i>	<i>Salmo irideus</i> (1)
Lys	-	-	1.5	-	4.7	9.9	-
His	-	-	-	-	-	-	-
Arg	62.8	66.8	70.3	51.2	59.1	52.2	65.6
Asp	-	-	-	-	-	-	-
Thr	5.0	-	-	-	2.4	4.2	-
Ser	5.6	7.6	4.4	7.6	5.5	7.4	12.5
Glu	5.6	-	-	-	-	-	-
Pro	5.3	12.8	9.7	10.2	7.0	5.6	9.4
Gly	-	-	-	-	6.5	7.2	6.2
Ala	6.8	1.3	-	13.9	10.0	5.5	-
Cys	-	-	-	-	-	-	-
Val	8.8	11.5	7.5	17.1	4.1	3.4	6.2
Met	-	-	-	-	-	-	-
Ile	-	-	4.2	-	-	-	-
Leu	-	-	-	-	-	-	-
Tyr	-	-	1.5	-	-	4.6	-
Phe	-	-	-	-	-	-	-

(1) Ando i Watanabe, 1969.

Taula III-15. Composició aminoàcida (moles %) de les histones H1 i proteïnes específiques de l'esperma diferents de les protamines típiques, de diverses espècies de teleostis. (E traces).

Aminoàcid	<i>Pagellus acarne</i> H1	Micromesistius poulsson "H1-(1)	<i>Merluccius capensis</i>			<i>Notemacheilus sessepinis</i> H1 i proteïna específica addicional(5)	<i>Lampanyctus crocodilus</i> HCl post AA(6)	<i>Mullus surmuletus</i> proteïnes específiques	<i>Clupea harengus</i> proteïna específica(7)	H1 d'arròsch <i>Ctenopharyngodon idella</i> (8)	H5 d'arròsch <i>Ctenopharyngodon idella</i> (8)
			H1(2)	H1(3)	Hsp(4)						
Lys	21,7	35,6	22,6	27,2	17,9	25,7	8,3	18,2	19,3	29,6	22,3
His	-	1,3	1	1,5	-	-	2,2	-	6,5	1	1
Arg	3,5	3,1	7,6	6,2	19,2	5,0	9,8	17,0	10,4	1,2	11,0
Asp	4,5	1	2,6	3,2	2,0	4,7	7,9	7,8	3,6	2,2	2,0
Thr	2,9	3,5	5,7	4,2	6,9	3,7	4,4	5,0	5,4	4,2	6,4
Ser	8,4	5,1	7,2	6,0	6,9	6,9	8,3	9,6	8,4	5,7	12,5
Glu	6,4	1	2,6	2,8	1,3	4,1	11,7	-	5,4	3,4	2,6
Pro	10,9	12,7	11,9	11,0	14,6	7,2	4,5	11,3	7,8	10,7	5,6
Gly	11,7	5,0	7,0	6,4	7,7	8,2	13,2	5,6	6,3	10,7	6,3
Ala	18,1	19,5	20,8	20,0	14,5	20,2	13,9	12,2	7,1	26,5	17,2
Val	5,4	7,1	4,6	5,3	3,0	7,9	4,9	4,7	4,2	-	4,5
Met	1	-	-	1,7	-	-	-	1,3	3,6	-	-
Ile	1,1	1,0	2,0	1,0	0,6	1,4	3,0	1,1	3,2	1,5	2,4
Leu	4,6	4,1	5,1	3,6	4,3	4,1	5,8	5,2	6,6	3,9	6,0
Tyr	-	0,9	-	1	1,0	-	1	1	1	0,7	0,4
Phe	0,9	1,2	1	1	-	0,9	2,0	1	1,9	0,7	0,7

- (1) Fracció solubilitzada amb PCA 5% a partir de l'extracte global (v. figura III-46, B, cartell c).
- (2) Fracció de menor mltgració (v. figura III-45, cartell 1).
- (3) Fracció de major mobilitat (v. figura III-45, cartell 2).
- (4) Proteïna específica de l'esperma (v. figura III-45, cartell 3).
- (5) Figura III-38 (B), cartell e.
- (6) Figura III-42, cartell 3 (L.C.).
- (7) Proteïna específica de l'esperma no completament pura (70%) amb un 30% d'H1 (v. figura III-47, cartell c).
- (8) Mikl i Neelin, 1976.

5.10. Resum dels tipus de PEB presents als teleostis

Fins ara hem vist quines eren les PEB presents a cada un dels grups estudiats tot seguint un ordre filogenètic. No obstant, hem observat que els resultats obtinguts (patró i característiques de les PEB a les diferents espècies, i grups, de peixos) són molt variables i a més no semblen correlacionar-se clarament amb aquest ordre filogenètic. Per aquestes raons, s'ha cregut convenient l'elaboració d'una taula resum que permeti recordar amb més facilitat els diversos models bàsics que ens hem anat trobant (taula III-16).

Cal destacar, però, que com en tot intent d'esquematzació, es pot córrer el perill d'una simplificació excessiva. Així, s'ha de tenir en compte que no en tots els casos el que dues espècies estiguin representades sota una mateixa columna voldrà dir que presentin un mateix tipus de PEB. D'aquesta manera, mentre que totes les espècies que estan sota la columna "sense histones / protamines típiques" presenten unes proteïnes de característiques molt similars entre sí, hi ha casos com és el de "amb histones / proteïnes específiques addicionals" on hi ha una major variabilitat. Així podem recordar, dins d'aquest últim cas, com les proteïnes addicionals podien ser tant de mobilitat menor que les histones (figura III-65, pou 3), com de mobilitat a la zona de les histones (pou 4) o bé de migració intermitja entre les histones i protamines (pou 5). A la figura III-65 trobem representats alguns dels exponents dels principals models de PEB presents als diferents teleostis estudiats.

Taula III-16. Distribució de les PEB a les famílies de teleostis estudiades.

Ordre	Família	Amb histones			Sense histones	
		Noms histones canòniques	H1 modificada quantitativament	Proteïnes addicionals específiques de l'espermatozoide	Protamines típiques	Altres proteïnes
Notacanthiformes	Notacanthidae	-	-	+	-	-
	Clupeidae	-	-	-	+	-
	Alepocephalidae	-	-	-	+	-
	Myctophidae	-	-	+	-	-
	Moridae	-	-	+(?)	-	-
	Gadidae	-	-	+(?)	-	-
	Merlucciidae	-	-	+	-	-
	Bythiidae	-	-	+	-	-
	Lophidae	-	-	-	+	-
	Scorpaenidae	-	-	-	+	-
Ophidiiformes	Triglidae	+	-	-	-	-
	Perichthyidae	-	-	-	+	-
	Sparidae	-	+	-	-	-
	Mullidae	-	-	-	-	+
	Labridae	-	-	-	+	-
	Nototheniidae	-	-	-	+	-
	Harpagiferidae	-	-	-	+	-
	Channichthyidae	-	-	-	+	-
	Trachinidae	-	-	-	+	-
	Uranoscopidae	-	-	-	+	-
Lophiiformes	Blenniidae	+	-	-	-	-
	Trichiuridae	-	+	-	-	-
	Gempylidae	-	-	-	+	-
	Scorbridae	-	-	-	+	-
Scorpaeniformes						
Perciformes						

Figura III-65. GPAU dels principals patrons de PEB trobats als teleostis. A. Amb histones: Només canòniques, *Trigla lucerna* (Triglidae) (1); H1 modificada quantitativament, *Pagellus acarne* (Sparidae) (2); amb PEB específiques addicionals, *Merluccius capensis* (Merlucciidae) (3); *Cataetyx laticeps* (Bythitidae) (4); *Symbolophorus veranyi* (Myctophidae) (5). B. Sense histones: Amb protamines típiques, *Dicentrarchus labrax* (Percichthyidae) (6); amb altres proteïnes, *Mullus surmuletus* (Mullidae) (7). Estàndards d'histones (H) i de protamines (P). Les fletxes assenyalen les proteïnes bàsiques addicionals específiques de l'espermatozoide.



5.11. Determinació de l'estructura primària de les PEB de dos teleostis

Com a complement dels estudis realitzats en les PEB dels teleostis, es va abordar la seqüenciació de dos dels models trobats. En primer lloc es va decidir seqüenciar un dels models més freqüents, el de les protamines típiques que solen presentar una mobilitat lleugerament inferior a la de la salmina. L'espècie escollida va ser *Dicentrarchus labrax* (Percichthyidae).

L'altra espècie estudiada ha estat *Mullus surmuletus*, on es presenta un model molt atípic consistent en dues bandes de proteïnes de característiques que recorden l'H1 i que substitueixen el complement d'histones a l'espermatozoide.

5.11.1. Seqüenciació de la protamina de *Dicentrarchus labrax* (Percichthyidae)

A l'apartat 5.9.1. s'explicava com s'havia purificat la protamina del llobarro (*D. labrax*) a partir d'una columna de bescanvi iònic (v. figura III-51). Una alíquota d'aquesta proteïna va ser resuspesa en aigua fins a una concentració de 150 picomols/ μ l i es va comprovar mitjançant HPLC de fase reversa que el pic majoritari era gaussià. La columna emprada va ser una C18, Spherisorb ODS2, 5 μ m, 4 x 250 mm, LKB i la proteïna va ser eluïda mitjançant un gradient múltiple de 0 al 70% d'acetonitril contenint 0.1% de TFA. L'absorció òptica de l'efluent va ser monitoritzada a 214 nm i el pic principal va ser utilitzat per la seqüenciació.

La determinació de la seqüència es va dur a terme per degradació d'Edman amb un seqüenciador automàtic en fase gasosa Applied Biosystems 470A utilitzant el programa estàndard 03rpth. Els derivats PTH dels aminoàcids van ser analitzats en un HPLC Applied Biosystems 120A acoblat al seqüenciador. Es va utilitzar una columna μ bore C18 Brownlee (2.1 x 210 mm) i els aminoàcids van ser eluïts amb un gradient múltiple d'acetonitril. Aquestes determinacions van ser realitzades al Servei de Seqüenciació de Proteïnes de la Universitat de Barcelona.

Taula III-17. Degradació d'Edman de la protamina de *Dicentrarchus labrax*. Rendiments en picomols. A. Proteïna sencera; B. Seqüència a partir de la Thr-21; C. Seqüència N-terminal. NQ: Residus identificats inambiguament però no quantificats.

Cicle	Aminoàcid	A	B	C
1	Pro	477	--	733
2	Arg	83	--	1367
3	Arg	49	--	1431
4	Arg	61	--	1824
5	Arg	134	--	1415
6	Gln	250	--	533
7	Ala	274	--	971
8	Ser	261	--	331
9	Arg	169	--	610
10	Pro	121	--	85
11	Val	115	--	101
12	Arg	83	--	124
13	Arg	157	--	326
14	Arg	101	--	222
15	Arg	130	--	254
16	Arg	106	--	289
17	Thr	40	--	NQ
18	Arg	87	--	NQ
19	Arg	124	--	--
20	Ser	50	--	--
21	Thr	20	886	--
22	Ala	38	633	--
23	Glu	34	653	--
24	Arg	35	610	--
25	Arg	81	372	--
26	Arg	23	258	--
27	Arg	58	323	--
28	Arg	NQ	55	--
29	Val	20	152	--
30	Val	18	85	--
31	Arg	ND	50	--
32	Arg	27	32	--
33	Arg	53	21	--
34	Arg	15	NQ	--
35	--	--	--	--
36	--	--	--	--
	Rendiment repetitiu:	95.8%	90.4%	91.0%

La seqüenciació directa a partir d'1.5 nanomols de la proteïna intacta va permetre obtenir una seqüència clara amb un rendiment repetitiu del 95.8% (obtingut a partir de Val₁₁₋₃₀, Thr₁₇₋₂₁ i Arg₂₋₃₂). La taula III-17 conté els rendiments en picomols dels PTH-aa obtinguts en cada cicle de degradació. A partir d'un experiment independent es va produir un trencament espontani a la molècula. El pèptid produït va ser també purificat per HPLC i seqüenciat. Aquesta anàlisi va permetre la confirmació de la seqüència a partir de la Thr₂₁ fins al final de la seqüència amb un rendiment repetitiu del 90.4%. Una tercera anàlisi, aquest cop sobre la regió N-terminal, va confirmar la seqüència d'aquesta part de la proteïna (rendiment repetitiu del 91.0%) (v. taula III-17). L'anàlisi composicional realitzat sobre la protamina del llobarro és consistent amb la seqüència observada (taula III-18).

Taula III-18. Composició d'aminoàcids de la protamina de *D. labrax*. a) Percentatge a partir de l'anàlisi composicional; b) Número de residus estimats a partir de l'anàlisi composicional; c) Número de residus a partir de la seqüència.

	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>
R	62.8	21.4 (21)	21
T	5.0	1.7 (2)	2
S	5.6	1.9 (2)	2
E+Q	5.6	1.9 (2)	2 (1E, 1Q)
P	5.3	1.8 (2)	2
A	6.8	2.3 (2)	2
V	8.8	3.0 (3)	3

A la figura III-66 es compara la seqüència de la protamina del llobarro (a) amb la d'altres protamines típiques de teleostis (b-f); concretament, es presenten les seqüències de 4 protamines de tunyina (Bretzel, 1972, 1973) i una protamina de truita irisada (McKay et al., 1986). A partir d'aquesta

comparació queda clar que la PEB de *D. labrax* és una protamina típica. Es tracta d'una molècula curta (34 residus) amb les arginines reunides en 4 grups de 4-5 residus i un grup de 2, i amb una proporció important d'aminoàcids fosforilables (11.6%). Una peculiaritat ja comentada d'aquesta molècula (v. 5.9.1.) és que el 50% dels residus fosforilables són Thr, mentre que normalment és la Ser la que predomina a les protamines típiques dels teleostis.

Figura III-66. Seqüència de la protamina de *D. labrax* (a) comparada amb les seqüències de 4 protamines de tunyina (b-f) (Bretzel, 1972, 1973) i la protamina 2b de la truita irisada (f) (McKay et al., 1986).

	5	10	15	20	25	30	35
a)	P R R R R	Q A S R P	V R R R R	R T R R S	T A E R R R R	R R R R	V V R R R R
b)	P R R R R	E A S R P	V R R R R	R Y R R S	T A A R R R R	R R R R	V V R R R R
c)	P R R R R	Q A S R P	V R R R R	R Y R R S	T A A R R R R	R R R R	V V R R R R
d)	P R R R R	R S S R P	V R R R R	R Y R R S	T V A R R R R	R R R R	V V R R R R
e)	P R R R R	R S S R P	V R R R R	R Y R R S	T A A R R R R	R R R R	V V R R R R
f)	P R R R R	S S S R P	V R R R R	R R A R	V S R R R R R	R R R R	R G G R R R R

El grau de coincidència entre les protamines de la tunyina i la del llobarro és remarcablement alt (29/34, 30/34, 32/34 i 32/34 identitats, respectivament). D'altra banda, la protamina del llobarro conté menys identitats respecte a les 6 protamines de truita irisada seqüenciades per McKay et al. (1986) que respecte a les de tunyina. La protamina de truita que apareix a la figura III-66 (f) ha estat escollida per ser, d'entre les 6, la que contenia més identitats amb la protamina de *D. labrax*.

5.11.2. Seqüència parcial de la PEB de major mobilitat de *Mullus surmuletus* (Mullidae). Estructura primària, estructura secundària i hidrofilitat

El moll roquer (*Mullus surmuletus*) posseeix un complement de PEB molt atípic dins dels peixos ossis. Aquest complement consisteix en dues proteïnes que migren molt properes entre sí a la zona de les histones però que, a diferència d'aquestes no penetren als gels amb SDS (v. figura III-55). Hem vist com la composició aminoacídica d'aquestes proteïnes recorda a la de proteïnes afins a l'H1 (v. taula III-12); a més, igual que aquestes, presenten un pèptid resistent a l'atac amb tripsina que, presumiblement correspongui a una estructura de tipus globular (Allan et al., 1980; Ausió et al., 1987) (v. figura III-58).

Degut a l'interès que presentava aquest model tan inusual en peixos (és l'únic cas descrit fins al moment), i per obtenir més informació sobre la seva possible relació amb les histones H1 o proteïnes relacionades amb aquesta, es va considerar molt interessant d'obtenir la seqüència de la PEB del moll. En aquest treball s'ha conseguit seqüenciar la part N-terminal de la proteïna corresponent a la banda de major migració electroforètica, la part globular d'aquesta i una part de l'extrem C-terminal (v. figura III-68).

La seqüència N-terminal es va obtenir per seqüenciació directa de la proteïna purificada per HPLC (v. figura III-57); igualment es va procedir a la seqüenciació del pèptid obtingut després de la digestió de la proteïna amb tripsina (v. figura III-58). Altres fraccionaments efectuats van ser el tractament amb elastasa i amb bromur de cianogen sobre la proteïna sencera.

La digestió amb elastasa es va efectuar en condicions analítiques en primera instància partint de 15 µg de la proteïna, utilitzant elastasa (Sigma tipus IV) en una relació d'1:100 (enzim:substrat) i parant la digestió a diversos temps (15, 30, 60 i 120 minuts) per acidificació del medi (v. II-3.7.2.). A partir d'aquest experiment es va decidir escollir la mateixa relació 1:100 i un temps de digestió de 15 minuts en una nova digestió, aquest cop preparativa, a partir de 500 µg de proteïna. Passats els 15 minuts es va parar la reacció per congelació amb neu carbònica i acetona i subsegüent liofilització (v. apartat II-

3.7.2.). Els pèptids obtinguts van ser separats per HPLC amb una columna Beckman C18 (4.6x250 mm) mitjançant un gradient d'acetonitril i utilitzant TFA 0.1% com a fase aquosa. A la figura III-68 es mostra la seqüència corresponent al pic majoritari obtingut a partir d'aquesta separació.

D'altra banda, com el pèptid resistent a la tripsina purificat va mostrar contenir un reduït número de metionines ens vam plantejar realitzar un trencament químic amb BrCN sobre la proteïna. Les condicions utilitzades en aquest fraccionament són les especificades a l'apartat II-3.7.3. La separació dels pèptids obtinguts es va realitzar per HPLC utilitzant una columna Vydac C18, 4.6x250 mm, i les mateixes solucions eluents que abans. El cromatograma obtingut així com les proteïnes corresponents als diferents pics i el pèptid escollit per la seva seqüenciació es mostren a la figura III-67. La seqüència obtinguda a partir del mateix apareix a la figura III-68.

Figura III-67. Separació cromatogràfica i control electroforètic dels fragments obtinguts per trencament amb BrCN de la PEB de major mobilitat electroforètica de *Mullus surmuletus*. El fragment "a" va ser utilitzat per seqüenciar.

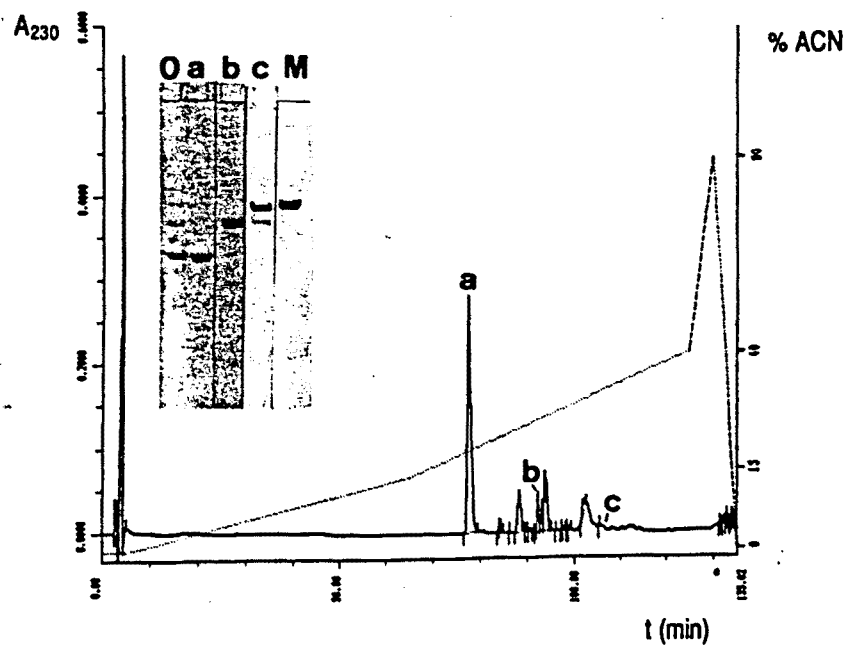




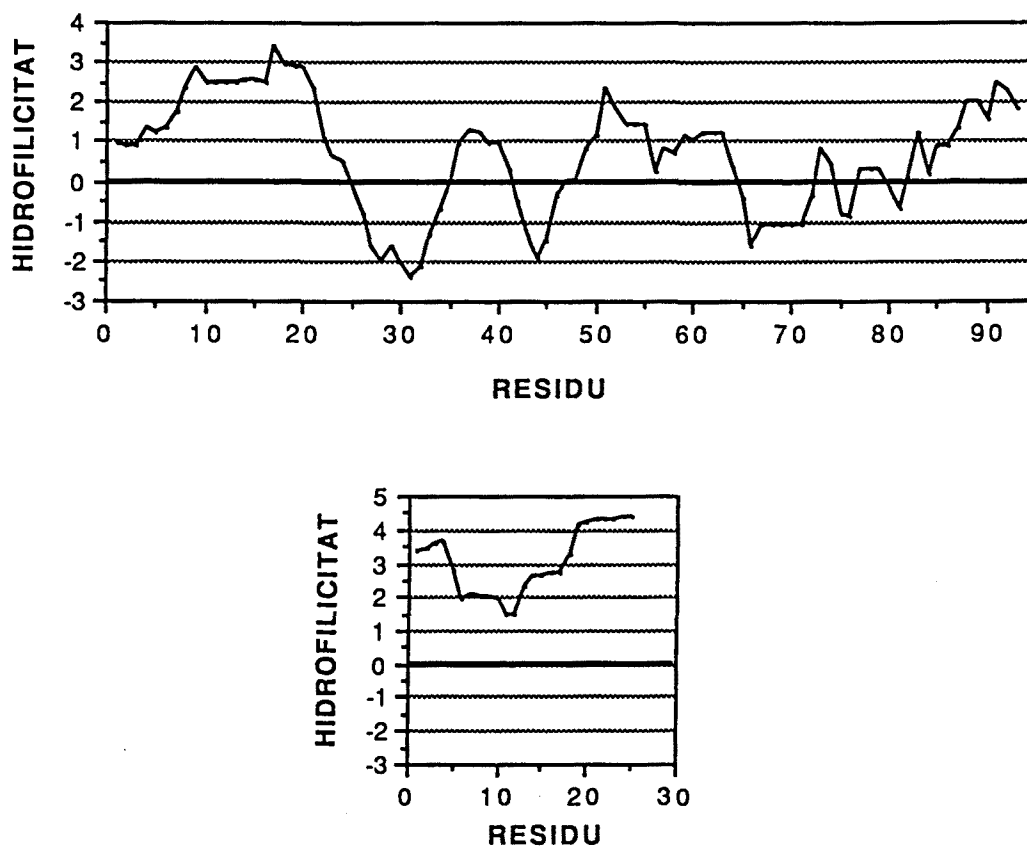
Figura III-68. Estructura primària parcial de la PEB de major mobilitat electroforètica de *Mullus surmuletus* (Mullidae, Perciformes) i estratègia seguida per la seva obtenció.

L'anàlisi de la seqüència parcial de la PEB del moll mostra algunes característiques interessants. Així, s'observa una agrupació important de residus fosforilables a l'inici de la molècula (posició 2-6) i l'aparició de dos motius del tipus "S-P-bàsic-bàsic" a l'extrem de la molècula (posicions 8-11 i 15-18) (v. figura III-68). Aquests motius apareixen també en altres PEB, entre les quals destaquen les histones espermàtiques dels equinoderms (v. figura I-

6). S'ha proposat que aquestes agrupacions juguin un paper molt important en la interacció reversible entre les molècules que les contenen i el DNA (v. final de l'apartat 2.1.3. de la introducció; per una discussió més àmplia sobre el tema es pot consultar Poccia i Green, 1992).

Pel que fa a la distribució dels diferents tipus d'aminoàcids, el gràfic d'hidrofilicitat (figura III-69) revela un acúmulo d'aminoàcids bàsics molt important a l'extrem N-terminal mentre que la part resistent a la tripsina (a partir del residu número 21) és més rica en aminoàcids hidrofòbics. L'extrem C-terminal (v. el pèptid obtingut amb l'elastasa; figura III-68) torna a estar enriquit en aminoàcids bàsics (figura III-69).

Figura III-69. Gràfic d'hidrofilicitat de la PEB del moll *Mullus surmuletus* segons Kyte i Doolittle (1982). Gràfic superior: extrem N-terminal i part globular; Gràfic inferior: pèptid de l'extrem C-terminal obtingut amb l'elastasa (v. figura III-68).



D'altra banda, la seqüència parcial obtinguda es va comparar amb les seqüències de tots els bancs de dades mitjançant el programa Blast. El llistat de les seqüències obtingudes com a més similars a la nostra proteïna es presenta a la figura III-70 juntament amb l'alineament amb la primera proteïna del llistat. S'observa com totes les proteïnes relacionades per l'ordinador són histones H1 (figura III-70, a) i que la semblança entre els dos tipus de proteïnes és molt elevat, presentant un 41% d'identitats i un 81% de similitud sobre 79 residus alineats amb la histona H1 de *Salmo gairdneri* (figura III-70, b). Les identitats trobades són molt més nombroses en la zona corresponent al pèptid resistent a la tripsina (a partir de la posició 21).

Figura III-70. Comparació de la seqüència parcial de la PEB de *Mullus surmuletus* amb els bancs de seqüències mitjançant el programa Blast. Llistat de les seqüències amb majors valors d'identitats (a) i alineament amb la primera proteïna del llistat (b).

a) Sequences producing High-scoring Segment Pairs:		High Score	Smallest Poisson Probability P(N)	N
SP:H1_SALGA	HISTONE H1. >GP:SMOHIS1_1 histone H1 [Sal...	172	2.9e-19	1
PIR:HSTR1R	Histone H1 - Rainbow trout 969.0 1.0 6....	172	2.9e-19	1
SP:H11_BOVIN	HISTONE H1.1.	168	1.8e-18	1
PIR:HSBO11	Histone H1.1 - Bovine (fragment) 969.0 ...	168	1.8e-18	1
PIR:HSBU1B	Histone H1b - Human 969.0 1.0 1.0 1.0 1...	166	4.1e-18	1
SP:H1B_HUMAN	HISTONE H1B (H1.4). >PIR:C40335 *Histone ...	166	4.1e-18	1
GPU:MUSHIST_1	histone H1 [Mus musculus]	165	6.3e-18	1
SP:H1D_RAT	HISTONE H1D. >PIR:JHO159 Histone H1d - Ra...	164	9.5e-18	1
SP:H1A_HUMAN	HISTONE H1A. >PIR:JX0087 Histone H1a - Human	162	2.1e-17	1
SP:H11_MOUSE	HISTONE H1.1. >PIR:A28470 Histone H1 - Mo...	161	3.2e-17	1
SP:H1D_HUMAN	HISTONE H1D. >PIR:JX0080 Histone H1d - Human	160	4.7e-17	1
PIR:JX0086	Histone H1c - Human >GP:S56862_1 histone ...	159	7.0e-17	1
SP:H13_RABIT	HISTONE H1.3. >PIR:HSRB13 Histone H1.3 - ...	159	7.0e-17	1
SP:H1C_HUMAN	HISTONE H1C (H1.3). >PIR:B40335 *Histone ...	159	7.0e-17	1

b) >SP:H1_SALGA HISTONE H1. >GP:SMOHIS1_1 histone H1 [Salmo gairdneri]
Length = 207

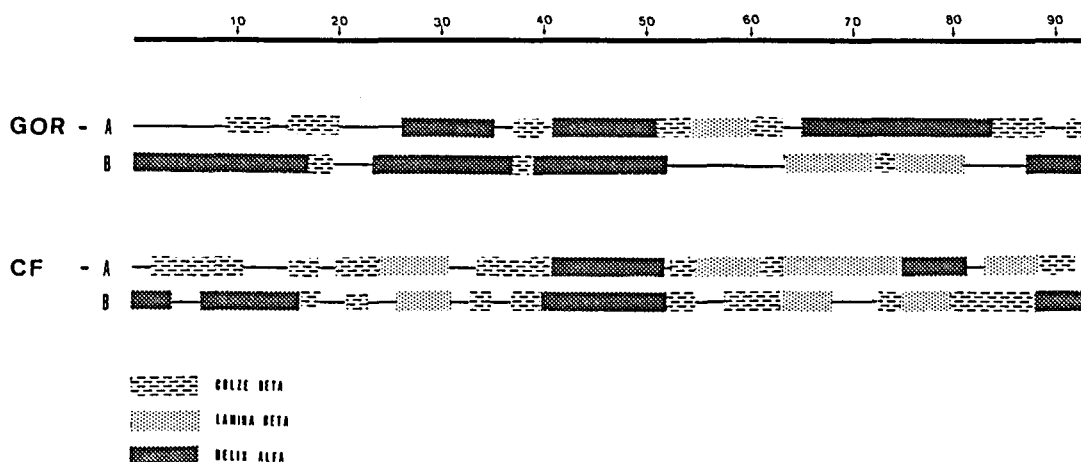
Score = 172 (85.2 bits), Expect = 2.9e-19, P = 2.9e-19
Identities = 33/79 (41%), Positives = 64/79 (81%)

Query: 1 PSTTSSKSPKRRAKSPRRKRTGPTVSDLILMAMSASSDRGGLSLAALKKDLKGRGYDVVR 60
P+++++ + ++ +++ K++GP+V++LI+ A+SAS +R+G+SLAALKK L + GYDV +
Sbjct: 8 PAAAAPAKAPKKKAAAKPKKAGPSVGLIVKAVSASKERSGVSLAALKKSLAAGGYDVEK 67

Query: 61 NKGRVLMIAIKRLVANKSVV 79
N++RV +A+K LV++ ++V
Sbjct: 68 NNSRVKIAVKSLVTKGTLV 86

La similitud estructural també es manté a nivell d'estructura secundària: Es van utilitzar els algorismes de Garnier et al. (1978) i Chou i Fasman (1978) per fer les prediccions de l'estructura secundària de la seqüència parcial de la PEB del moll i la de la histona H1 de *Salmo gairdneri* i es van comparar entre sí. A la figura III-71 es pot observar el resultat d'aquesta comparació: s'observa, dins de cada un dels algorismes, una gran semblança entre les estructures secundàries de les dues proteïnes, especialment en la part corresponent a la primera meitat de la regió de la molècula resistent a la tripsina. Respecte a la zona N-terminal, sembla ser que les dues zones S-P-bàsic-bàsic estarien estructurades en colzes β , com ja ha estat descrit per altres autors (Suzuki, 1989). D'altra banda, el pèptid corresponent a l'elastasa mostra una estructura en hèlix α (no mostrat).

Figura III-71. Comparació de les estructures secundàries predides pels algorismes de Garnier et al. (1978) (GOR) i Chou i Fasman (1978) (CF) per la PEB de *Mullus surmuletus* (A) i l'H1 de *Salmo gairdneri* (B). La PEB del moll està representada des de l'aminoàcid número 1 i l'H1 de *Salmo* a partir de l'aminoàcid número 8 segons l'alineament mostrat a la figura III-70-b. Les dues seqüències representen tot (moll) o part (truita) de l'extrem N-terminal i part de la regió globular central.



En resum, sembla que tots els resultats obtinguts apunten cap a una estreta relació entre la PEB del moll i la histona H1 i, per tant, pensem que aquesta histona podria estar en la base de la línia evolutiva que va originar aquesta PEB. Tant la seva estructura primària com secundària són molt similars a les de l'H1. Com aquesta presenta, a més, una zona central resistent a la tripsina on s'hi troben acumulats preferencialment els aminoàcids hidrofòbics, i que possiblement correspongui a una estructura de tipus globular, i dos extrems extesos molt rics en aminoàcids bàsics. La zona globular és la que presenta un major número d'identitats amb la histona H1; no en và les regions globulars de l'H1 són els dominis més conservats d'aquestes proteïnes al llarg de l'evolució.

