

CARACTERIZACION ELECTROFORETICA DE LAS PROTEINAS NUCLEARES BASICAS AISLADAS DE TESTICULOS MADUROS DE *Murex Brandaris*.

M.J. Amor

Departament de Bioquímica i Fisiologia. Unitat de Biologia Cel.lular. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.

Abstract

Electrophoretic characterization of basic nuclear proteins isolated from mature testis of *Murex brandaris*

Electrophoretic analysis and peptide maps of acid-soluble nuclear proteins isolated from mature testes of *Murex brandaris* and rooster revealed that the electrophoretic mobilities of H3 and H4 obtained from *M. brandaris* were very similar to the corresponding mobilities of histones from rooster. A higher mobility of H2A and H2B was observed in *M. brandaris* in relation to the mobilities of the same histones in rooster. The electrophoretic patterns and V8 protease peptide maps of histone H1 were very different in both tissues. Basic proteins of higher mobility than histones observed in *M. brandaris* might correspond to the protamines present in the mature testis of chicken and many other species.

Key words: histones, protamine, *Murex brandaris*, rooster, spermatogenesis.

Introducción

Los drásticos cambios de estructura de la cromatina que tienen lugar durante la espermatogénesis, van acompañados de importantes modificaciones en la composición de las proteínas nucleares básicas (SUBIRANA 1983; MEZQUITA 1985 a; MEZQUITA 1985b).

En los Invertebrados, que constituyen el 95% de todos los animales conocidos, sólo se han estudiado las proteínas nucleares básicas de células espermatogénicas en algunos Moluscos, Anélidos y Equinodermos (KASINSKY, 1986).

En los espermatozoides de los Moluscos se ha observado una gran diversidad de proteínas básicas. Los Polyplacophora muestran proteínas de movilidad intermedia entre las histonas y las protaminas en las electroforesis en geles de P.A acético/tritón/urea (COLOM y SUBIRANA, 1979) en el Cryptochiton stellari se han observado dos proteínas, X e Y, ricas en arginina y que contienen además, una cierta cantidad de lisina. Otra proteína, la Z, contiene lisina, alanina, prolina y arginina y es semejante a la histona H1 somática o a la fracción 3 de Mytilus edulis (COLOM y SUBIRANA, 1979). La proteína X migra en la región de las histonas somáticas. Estas últimas proteínas no se encuentran presentes en el núcleo de los espermatozoides de C. stellari (COLOM y SUBIRANA, 1979).

También en los Gasterópodos se han observado proteínas nucleares básicas de movilidad electroforética intermedia entre las histonas y las protaminas. En Haliotis tuberculata y Haliotis crackeroidii dichas proteínas contienen un 50% de arginina y un 10% de lisina. Proteínas semejantes han sido caracterizadas en Patella coeruela, Patella vulgata, Patella granatina y Gibula divaricata (HULTIN and HERNE, 1949; SUBIRANA et al., 1973; VAN ELDEN et al., 1979). Algunos de estos Gasterópodos contienen además, en los espermatozoides una histona semejante a la H2B.

Los métodos citoquímicos sugieren que las especies Nucella

lapilus y Conus stimpsoni podrían contener protaminas ricas en arginina o cisteína (WALKER y MC GREGOR, 1968; WEST, 1978). También por métodos citoquímicos se ha observado que en la subclase Pulmonata, Helix aspersa, contiene una protamina rica en arginina (BLOCH and HEW, 1960).

Entre los Moluscos de la Clase Bivalvia, Mytilus edulis muestra proteínas intermedias con la lisina y arginina (SUBIRANA et al., 1973). Otros miembros de la misma familia presentan un patrón semejante (OLIVARES, et al., 1986). Una de las proteínas tiene movilidad electroforética semejante a la H2B, si bien guarda un mayor parecido inmunológico con la histona H1 (PUIGDOMENECH et al., 1975).

El Bivalvo de agua dulce Anodonta piscinalis contiene en los espermatozoides una proteína semejante a la histona H1 y otra que puede haber derivado de ella en el curso de la evolución (ROZOV et al., 1984).

En la familia Tridacnidae la Spisula solidissima y la S. sachalinensis muestran proteínas de menor movilidad electroforética que la histona H1 (AUSIO and SUBIRANA, 1982). La proteína contiene arginina y lisina en proporciones semejantes. En muchas otras especies se ha detectado también proteínas básicas de elevado peso molecular.

Los espermatozoides de Ensis minor contienen histonas somáticas y una proteína similar las protaminas (GIACOTTI et al., 1983). La composición de la cromatina de los espermatozoides de estas especies es compatible con la estructura nucleosómica.

En los Cefalópodos los espermatozoides de Loligo pealeii poseen una protamina típica con un 78% de arginina y que contienen además, entre otros aminoácidos, serina y tirosina (SUBIRANA et a., 1983). La protamina de los espermatozoides de Eledone cirrosa contiene además, cisteína (KUALOVA and PECK, 1973).

Materiales y métodos

A fin de estudiar las proteínas nucleares, se han purificado núcleos y obtenido extractos proteicos de los mismos. Las proteínas extraídas han sido caracterizadas mediante técnicas de electroforesis. Para ello, la metodología empleada es la siguiente:

- 1.- Las gónadas, aisladas de posibles restos de hepatopáncreas, son finamente troceadas en un vaso de precipitados de 50ml con tijeras curvas bien afiladas.
- 2.- Homogenización en 5 volúmenes del medio conteniendo sacarosa 2M, acetato cálcico 3,3mM, bisulfito sódico 50mM, Tritón X-100 0,01% a pH 5.8, con un homogenizador vidrio-vidrio tipo Dounce, 20 pases.
- 3.- Rehomogenización en 5 volúmenes del mismo medio anterior utilizando un homogenizador vidrio-teflón de "clearance" ancho conectado a un taladrador a baja velocidad a 75V, 15 pases.
- 4.- Filtración con 6 capas de gasa
- 5.- Ultracentrifugación a 58.600 g (22.000 r.p.m con un rotor Beckman SW 27), a 4 °C durante 60 minutos.
- 6.- Se desecha el sobrenadante y se efectúa un control de los núcleos sedimentados en microscopio de contraste de fases

apareciendo morfológicamente limpios.

7.- Extracción de los núcleos en SO_4H_2 0,4N, mediante homogenización alternativa durante 2 horas, empleando un homogenizador vidrio-vidrio tipo Dounce.

8.- Separación del extracto por centrifugación con una centrifuga Beckman J2-21, rotor JA-20 en tubos de vidrio Corex a 15.000 r.p.m durante 30 minutos a 4 C.

9.- El sobrenadante se precipita añadiéndole 6 volúmenes de etanol y manteniéndolo a -20 C durante toda la noche.

10.- Se recoge el precipitado por centrifugación con la Beckman J2-21 rotor JA-20 en tubos de vidrio Corex a 8.000 r.p.m durante 30 minutos.

11.- Lavado del sedimento con etanol 3 veces centrifugando en las mismas condiciones 10 minutos cada vez.

12.- Secado de la muestra mediante una trompa de vacío 10 minutos.

13.- Una alícuota de la muestra se solubiliza en ClH 1mM.

14.- Se añade ácido perclórico (PCA) hasta una concentración final de 0,74N. Se precipita en este medio durante 2 horas a 4°C.

15.- Centrifugación con la Beckman J2-21 rotor JA-20 a 15.000 r.p.m durante 10 minutos. Se recoge el sobrenadante conteniendo las proteínas solubles en ácido perclórico .

16.- Precipitación de las proteínas con una concentración final de ácido tricloroacético (TCA) al 20%.

17.- Lavado del sedimento con acetona acidificada una vez, y con acetona dos veces.

18.- Electroforesis del material soluble en ácido (SO_4H_2 0,4N

y PCA 0,74N) y del material insoluble en PCA 0,74N en geles de P.A 12% acético/tritón/urea 7,5M , de P.A 15% urea 2,5M de P.A 15% y 18% -SDS 0,1%.

19.- Tinción con C.B.B R-250 al 0,1% y destinción en metanol/ácido acético/agua 5:1:16.

20.- Mapa peptídico del patrón electroforético en un gel de P.A 15% SDS 0,1% del extracto de PCA 0,74N. Lavado de las bandas del gel con tris 1mM/ClH pH 8 y SDS 0,1% durante 5 minutos con agitación suave, a temperatura ambiente. Decantación por aspiración. Se efectúan dos lavados más en idénticas condiciones

21.- Preparación de un gel de P.A 18% SDS 0.1%. Las bandas del gel lavadas se depositan en cada uno de los pozos y se le añade el cocktail proteolítico, conteniendo la proteasa V8 0.4 mg/ml en tris 1mM/HCl pH 8.0, SDS 0.1% glicerol 10% . 22.-

Electroforesis a voltaje constante 200 V hasta que las proteínas alcanzan el "stacking" del gel. Entonces se para la electroforesis durante una hora, para que tenga lugar la proteolisis "in situ".

23.- La electroforesis se conecta nuevamente a voltaje constante 200 V.

24.- Tinción y destinción del gel en las mismas condiciones del paso 19.

25.- Se secan los geles, y se efectúan las fotografías de los mismos.

NOTA: Salvo en los casos citados específicamente, todo el procedimiento se ha seguido a 0-4 °C.

Observaciones y resultados

Proteínas nucleares básicas solubles en ácido sulfúrico 0,4N extraídas de la gónada madura del molusco Murex brandaris.

Las proteínas nucleares básicas solubles en SO_4H_2 fueron extraídas de la gónada madura de Murex brandaris y analizadas en geles de poliacrilamida/ SDS y en geles de poliacrilamida /triton /acético /urea. La figura 1 muestra el patrón obtenido en geles de poliacrilamida/SDS a partir de las proteínas solubles en ácido sulfúrico. En esta imagen se compara el patrón obtenido a partir del extracto nuclear de las células espermatogénicas del molusco (pozos b,c,e,f,g) con el extracto nuclear de células espermatogénicas de gallo (pozo a). Se observan dos bandas principales en la zona de la histona H1 de mayor movilidad electroforética que la histona H1 del gallo. Inmediatamente por debajo de dichas bandas, se hallan otras dos que podrían corresponder a las proteínas no histonas HMG1 y HMG2. Las bandas correspondientes a las histonas H3 y H4 muestran la misma movilidad electroforética que las histonas H3 y H4 del gallo. Las bandas correspondientes a las histonas H2A y H2B se encuentran más solapadas entre sí al aumentar ligeramente la movilidad electroforética de la histona H2A.

La figura 2 muestra el patrón electroforético en geles de poliacrilamida/triton/acético/urea de las proteínas solubles en SO_4H_2 extraídas de la gónada madura de Murex brandaris (A: pozo d; B: pozos b,c,d,). El patrón electroforético se compara con las correspondientes proteínas obtenidas de testículo de gallo

(A: pozo e; B: pozo A). En la misma electroforesis se ha corrido una muestra de protamina de gallo como referencia (A: pozos a y b), el pozo c se cargó con una muestra de proteínas nucleares solubles en ácido perclórico 0,74N de Murex brandaris a fin de determinar qué componentes del extracto obtenido con ácido sulfúrico eran solubles en ácido perclórico.

Los patrones obtenidos muestran movilidades muy parecidas de las histonas H2A H2B, H3 y H4 en el molusco y en el gallo y una intensa hiperacetilación de la histona H4. Se observan además, componentes de elevada movilidad electroforética que migran en la zona de la protamina del gallo y que, a diferencia de ésta, son solubles en ácido perclórico 0,74N.

Proteínas nucleares básicas solubles en ácido perclórico 0,74N extraídas de la gónada madura del molusco Murex brandaris

Las proteínas nucleares básicas solubles en ácido perclórico 0,74N fueron extraídas de los núcleos purificados de la gónada madura de Murex brandaris. La figura 3 muestra el patrón electroforético obtenido en geles de poliacrilamida SDS de las proteínas solubles en ácido perclórico de Murex brandaris (pozo a) en comparación con las correspondientes proteínas obtenidas de núcleos purificados de células germinales de gallo (pozos c y d). Tal como se había comentado anteriormente, la histona H1 muestra una mayor movilidad electroforética que la correspondiente histona H1 del gallo. Aparte de una banda tenue a la altura de las H2A y H2B no se aprecian bandas adicionales en

estos geles aunque sea mayor la longitud de los mismos o disminuya el tiempo de recorrido. Esto último indica que las proteínas de alta movilidad electroforética no son solubles en SDS a semejanza de lo que se observa en las protaminas.

Mapas peptídicos de la histona H1 del gallo de Murex brandaris obtenidos con la proteasa V8

Las dos bandas de histona H1 resueltas en geles de poliacrilamida SDS fueron eluidas y utilizadas para obtener el mapa peptídico con la proteína V8. La figura 4 muestra el mapa peptídico obtenido (pozos a y b) a partir de las dos bandas (de menor y mayor movilidad electroforética respectivamente). Los péptidos obtenidos a partir de las bandas correspondientes de la H1 de Murex brandaris difieren poco en tamaño mientras que son muy diferentes respecto a los péptidos obtenidos en la histona H1 del gallo.

Discusión

Las proteínas nucleares básicas obtenidas de la gónada madura del molusco Murex brandaris muestran propiedades de solubilidad y movilidad electroforética en parte idénticas a las histonas obtenidas de los núcleos de las células espermatoogénicas del gallo. Este es el caso de las histonas ricas en arginina la H3 y la H4, las más conservadas al lo largo de la evolución. Las diferencias observadas son mínimas en el caso de las histonas H2A y H2B. Tal como se observa en el patrón obtenido a partir de las células

espermatogénicas del gallo y de otras especies, la histona H4 muestra una notable hiperacetilación

Las mayores diferencias observadas en el grupo de las histonas corresponden a la histona H1. El mapa peptídico obtenido con la proteasa V8 confirma la distancia evolutiva puesto que los residuos de glutámico, por donde corta la proteasa, V8 estarían en posiciones muy distintas en las histonas H1 del molusco y del pollo.

Tal como se mencionó en la introducción, se ha observado en la espermiogénesis de los moluscos la existencia de proteínas básicas nucleares adicionales. Las más abundantes son un grupo de tres componentes de elevada movilidad electroforética (mayor que la correspondiente a la protamina del gallo). Dichas proteínas son solubles en perclórico a diferencia de lo que se observa en las protaminas ricas en arginina, como la protamina del gallo, que es sólo parcialmente soluble en perclórico. Las proteínas de alta movilidad electroforética no son solubles en SDS, propiedad que comparten con las protaminas ricas en arginina.

Las bandas de alta movilidad electroforética obtenidas a partir de los extractos de núcleos purificados de gónada madura del molusco Murex brandaris, corresponden probablemente a proteínas ricas en arginina y lisina de menor movilidad electroforética que las protaminas típicas de los peces, y de mayor movilidad que la protamina del gallo. La existencia de hiperacetilación de la histona H4 junto a la presencia de proteínas semejantes a las protaminas sugiere la posibilidad de una

transición nucleohistona-nucleoprotamina semejante a la observada en otras especies (MEZQUITA, 1985).

Bibliografía

- AUSIO, J. and SUBIRANA, J.A. (1982). "A high molecular weight nuclear basic proteins from the bivalve mollusc Spisula solidissima. J.Biol.Chem. 257:2802.
- COLOM, J. and SUBIRANA, J.A. (1979). "Protamines and related proteins from spermatozoa of molluscs: characterization and molecular weight determination by gel electrophoresis". Biochem.Biophys.Acta. 851:217.
- GIANCOTTI, V., RUSSO, E., GASPARINI, M., SERRANO, M., DELPEIRO, D., THOENE, A.W., CARY, P.D. and CRANE ROBINSON, G. "Proteins from the sperm of the bivalve mollusc Ensis minor. Coexistence of histones and proteine-like protamins". Eur.J.Biochem. 136:509.
- HULTIM, T. and HERME, R. (1949). "Aminoacid analysis of a basic protein fraction from sperm nuclei of some different Invertebrates". Arkiv.Kemi Min Geol. 26 A.1.
- KASINSKI, H.E. (1986). "Specificity and distribution of sperm basic proteins". V.I.L. Hinilina, G.Stein Eds. CREC Press Boca Ratón. (En prensa).
- MEZQUITA, C. (1985 a). "Chromatin proteins and chromatin structure in spermatogenesis". In "Chromosomal proteins and gene expression". Reeck GR. Goodwin G.H and Puigdomenech P. eds. Plenum Press. New York. pp: 315-332.
- MEZQUITA, C. (1985 b). "Chromatin composition structure and function in spermatogenesis". Rev.Biol.Cel. Bsken Guillem esd. Universidad País Vasco.
- OLIVARES, L., GANZ, H. and INOSTROZA, D. (1986). "A comparative study of the basic nuclear proteins from sperm bivalve mollusc". Comp.Biochem.Physiol. 838:185.
- PUIGDOMENECH, P., CABRE, L., PALAU, J., BRADBURY, E.M. and CRANE-ROBINSON, G. (1975). "Studies in the role and mode of operation of the lysine very rich histones in eukaryotic chromatin. The conformation of histones from marine invertebrate sperms". Eur.J.Biochem. 59:237.
- ROZOV, S., BERDMIKOV, V.A., GOREL, F.K., LAVRENTEVA, M.V., and SOLONENKO, L.P. (1984). "Structure of lysine-rich histones from sperms of Anodonta piscinallis. Mol.Biol. 18:1497. (Translated from Russian).

SUBIRANA, J.A., COZCOLLUELA, C., PALAU, J. and UMZETA, M (1973).
 "Protamines and other basic proteins from spermatozoa of
 Molluscs". *Biochem. Biophys. Acta* 317:364.

SUBIRANA, J.A. (1983). "Nuclear proteins in spermatozoon and their
 interactions with DNA". In "The sperm cell". J. andre ed. Martinus
 Noghro. The Hague, pp:197-213.

VAN ELDEN, P., STRIKLAND, W.N., BRANDT, W.F. and VON HOLT, C. (1979).
 "The complete amino acid sequence of the histone H2B from the
 mollusc Patella granitana. *Eur. J. Biochem.* 93:71

WALKER, M. and MC GREGOR, H.C. (1968). "Spermatogenesis and the
 structure of membrane sperm Nucella lapillus. *J. Cell Sci.* 3:95.

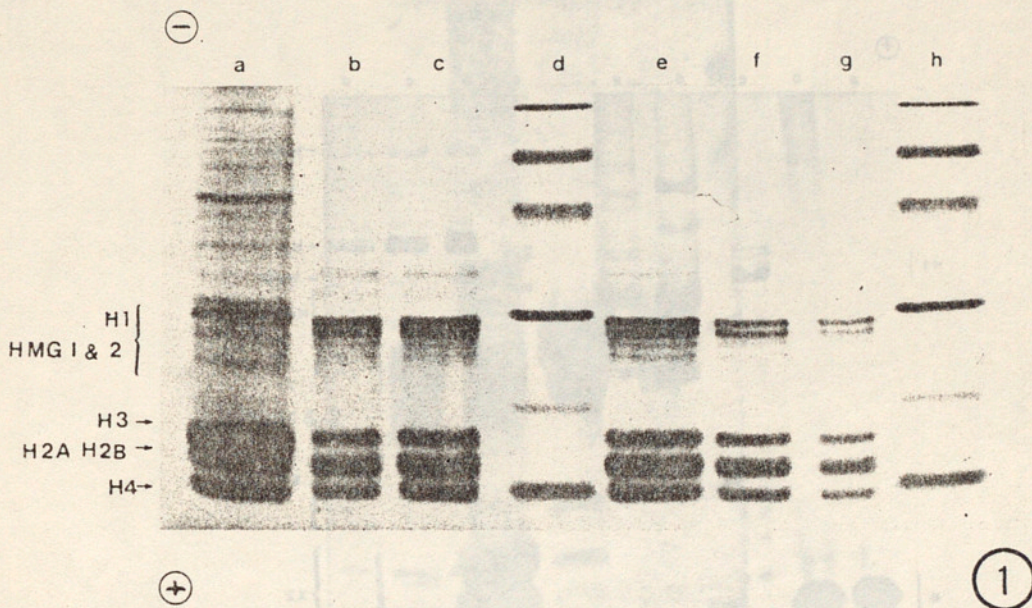


Fig. 1 : Patrón electroforético en un gel de P.A 18% de los extractos en SO_4H_2 de núcleos totales purificados de espermatozoides de Murex Brandaris. Comparación con el patrón de histonas de espermatozoides del gallo. a) Patrón de histonas de espermatozoides del gallo. b, c, d, e, f, g) Electroforesis de Murex Brandaris. d, h) Patrón de proteínas estándar (de menor a mayor movilidad electroforética).

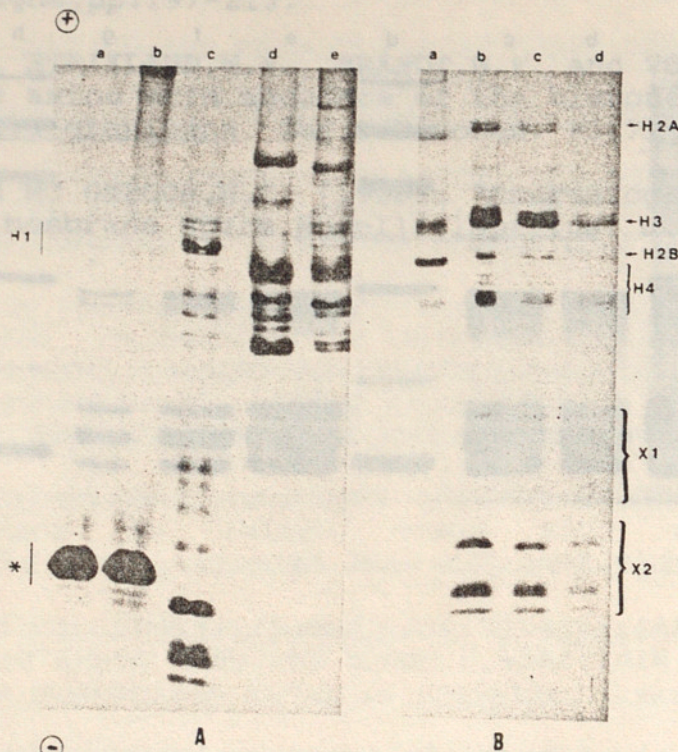


Fig.2 : Patrón electroforético en geles de P.A. ác. acético/tritón/urea 7,5M de los extractos en SO_4H_2 0,4N de núcleos totales purificados de los espermatozoides de Murex brandaris. Comparación con el patrón de histonas y de protamina del espermatozoide del gallo. A.- a, b: Protamina de gallo. c: Extracto en PCA de núcleos de Murex brandaris. d: Extracto en SO_4H_2 de núcleos del molusco. e: Extracto en SO_4H_2 de gallo. *: Protaminas de gallo B.- a: Extracto de histonas de espermatozoides del gallo SO_4H_2 b, c, d: Extractos en SO_4H_2 de Murex brandaris. x : Bandas de movilidad semejantes a protaminas. x : Bandas de movilidad intermedia entre histonas y protaminas.

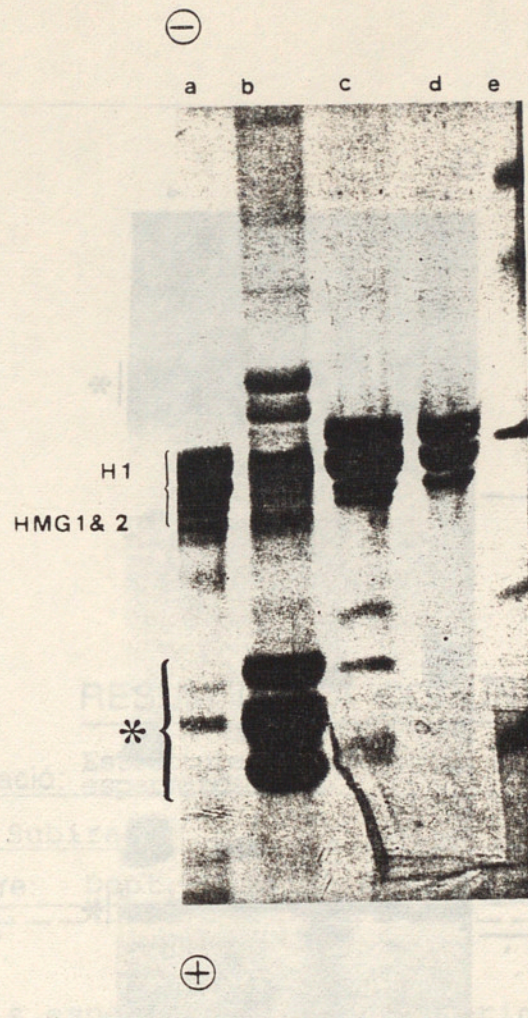


Fig.3 :Extractos en geles de P.A 18% SDS. a) Proteínas solubles en PCA. b) Proteínas solubles en HCl. c, d) Patrón de eritrocitos de pollo. e) Patrón estándar de P.M. *) Zona de migración de las histonas octaméricas.

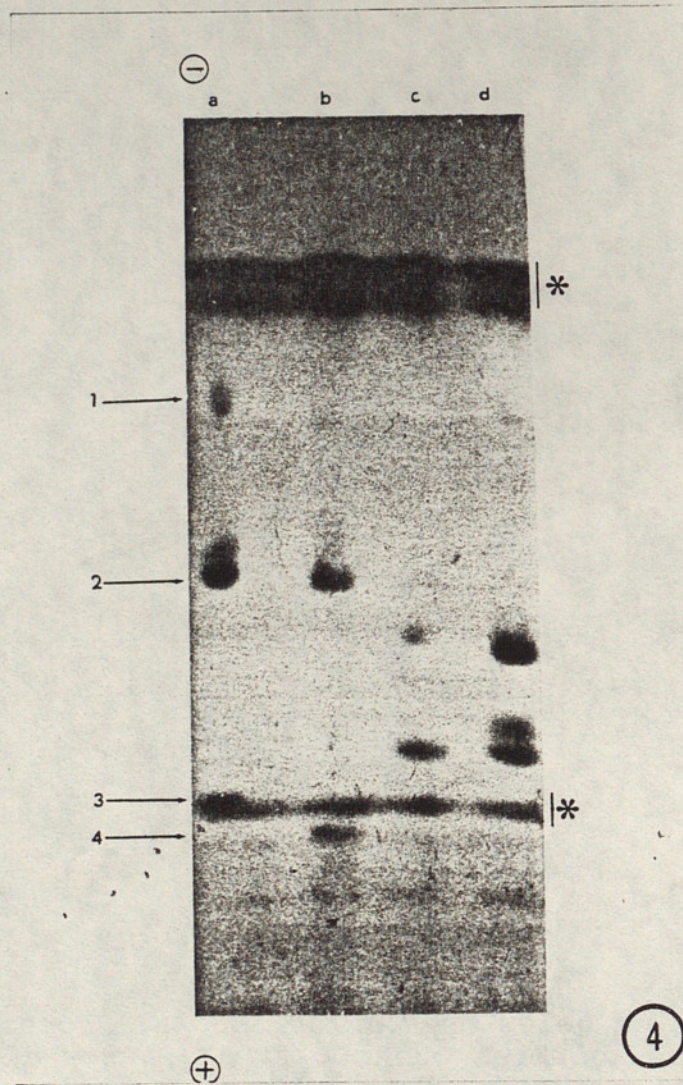


Fig.4 : Mapa peptídico 1: H1A no digerida. 2: Péptido común a ambos subtipos. 3: Péptido propio en H1A. 4: Péptido propio de H1B. *:Proteasa V8