

PROTAMINES DE GASTERÒPODES I LLUR CORRELACIÓ AMB LA CONDEN-
SACIÓ DE LA CROMATINA, TIPUS D'ESPERMA I BIOLOGIA DE LA
FERTILITZACIÓ

Montserrat Daban, Manel Chiva, Harold E. Kasinsky* i Joan
Antoni Subirana.

Departament d'Enginyeria Química, ETSEIB, UPC, Diagonal
647, 08028 Barcelona.

* Department of Zoology of the UBC, Vancouver, Canadà.

Abstract

The pattern of nuclear sperm basic proteins (SBP) in externally fertilizing Archaeogastropods is a very simple one. It mainly consists in one major protamine, which contains from 80 to 110 amino acids in almost all the families of the group, and from 210 to 230 amino acids in one particular case, namely Fam. Patellacea. The pattern in Mesogastropods and Neogastropods, which present internal fertilization, is more complex, and the sizes of the protamines range from 40 to 50 amino acids.

The capacity for DNA compactation of these protamines is quite similar, being slightly superior in the case of Meso and Neogastropods.

We also discuss the possible correlation between the changes in the SBP pattern and the ones observed in the spermiogenesis and the biology of fertilization.

Key words: Gastropods, spermiogenesis, sperm basic proteins, protamines, fertilization biology.

Introducció

El nucli dels espermatozoides sol contenir, associades amb el DNA, unes proteïnes bàsiques, les protamines, que presenten un grau molt elevat de variabilitat entre les diferents espècies animals (BLOCH, 1969; SUBIRANA
., 1983; KASINSKY, 1989). Un exemple d'aquesta varia-

bilitat es dóna en el filum dels Mol.luscs, les espècies del qual han estat estudiades fins al moment (SUBIRANA et al., 1973; BALHORN et al., 1979; ZALENSKY and ZALENSKAYA, 1980; AUSIÓ, 1986; AUSIÓ and VAN HOLDE, 1988; WOUTERS-TYROU et al., 1988; SUBIRANA and COLOM, 1987; COLOM and SUBIRANA, 1981) mostren clares diferències en el patró electroforètic de llurs proteïnes espermàtiques, composició d'aminoàcids i tamany de les molècules. Tot això fa que les relacions entre les proteïnes i els possibles mecanismes que han donat lloc a una tal diversitat dins del grup restin encara foscos.

Hem escollit per a estudiar les proteïnes nuclears dels espermatozoides el grup dels Gasteròpodes Prosobranquis, per ser una Subclasse bastant complexa pel què fa a hàbitats i estratègies reproductives. Dels tres Ordres que la formen, un d'ells, l'O. Arqueogasteròpodes, conté principalment espècies de fertilització externa, mentre que la resta d'ordres, Mesogasteròpodes i Neogasteròpodes, presenten fertilització interna.

Una altra característica en la qual es poden observar certes diferències entre els ordres és la forma de l'espermatozoide, essent en els Arqueogasteròpodes de tipus primitiu, segons la classificació de FRANZÉN (1955, 1956, 1970), i de tipus modificat en els dos ordres restants (WIRTH, 1984), amb l'ocurrència en alguns casos dels anomenats paraespermatozoides (FRANZÉN, 1955, 1970). Sembla que existeix una correlació entre la morfologia de l'espermatozoide i el tipus de reproducció de l'espècie.

D'altra banda, en estudis al Microscopi Electrònic sobre el procés de condensació de la cromatina espermàtica (AZEVEDO, 1981; MAXWELL, 1983; AZEVEDO et al, 1985; HODGSON and BERNARD, 1988; WALKER and MCGREGOR, 1968; JARAMILLO et al, 1988; BUCKLAND-NICKS et al, 1983; WEST, 1978; HEALY, 1983) s'observa que els Arqueogasteròpodes mostren un patró de condensació de la cromatina relativament simple, amb la formació de grànuls que es compacten per coalescència, mentre que en Meso i Neogasteròpodes el patró de condensació és més complex, amb l'aparició de fibres

i lamel·les en els darrers estadis de compactació (AMOR, 1987).

Podem establir, doncs, una correlació entre el patró de condensació de la cromatina, la morfologia de l'espermatozoide i la biologia de la fertilització d'una espècie. És per això que considerem aquest grup molt adequat per a estudiar les característiques de les protamines, les quals participen de forma important en el procés de compactació del nucli (FAWCETT, 1971).

Materials i Mètodes

Les espècies usades en aquest treball són les següents: Scl. Prosobranquis, O. Arqueogasteròpodes, Fam. Patellacis: Acmaea mitra, Notoacmaea persona, N. scutum, Collisella digitalis, C. pelta; Fam. Fissurellacis: Diodora sp., Fissurella picta; Fam. Trocacis: Astraea gibberosa, Tegula funebris, Calliostoma ligatum, Gibbula divaricata; O. Mesogasteròpodes, Fam. Littorinacis: Littorina scutulata; Fam. Naticacis: Polynices lewisii; O. Neogasteròpodes, Fam. Muricacis: Murex brandaris, Nucella canaliculata, N. marginata.

Es van usar gònades madures i espermatozoides per a obtenir nuclis segons SUBIRANA et al. (1973), homogeneïtzant el material en els següents tampons: Sacarosa 0.25 M/CaCl₂ 3 mM/Tris 10 mM pH 7.0 amb Clorur de Benzamidina com a inhibidor de les proteases, Tris 10 mM/ EDTA 20 mM pH 7.0 i Tris 10 mM, centrifugant entre cada pas a 2000xg durant 5 minuts. Totes les operacions es van dur a terme per duplicat i en fred. Les proteïnes nuclears van ser extretes a partir del darrer sediment, que contenia els nuclis dels espermatozoides i espermàtides avançades, amb àcid acètic al 5% (en el cas de M. brandaris), 35% (amb l'excepció de la Fam. Patellacis, a causa de la petita quantitat de material disponible) i HCl 0.4 N, successivament. Els extractes van ser precipitats amb 6 volums d'acetona, i les proteïnes van ser rentades successivament amb acetona acidificada i acetona pura.

Amb les proteïnes seques es van dur a terme electroforesis segons el mètode de PANYIM & CHALKLEY (1969).

L'estimació dels pesos moleculars de les principals bandes de cada espècie es va dur a terme amb gels d'Acrilamida/Urea (COLOM and SUBIRANA, 1979), usant com a estàndars protamines de pes molecular conegut i una histona somàtica.

Les bandes electroforètiques dels diferents extractes van ser quantificades mitjançant microdensitometria.

Resultats

I. Proteïnes bàsiques presents en els espermatozoides de Prosobranquis de fertilització externa:

a) Trocacis i Fissurel.lacis: Els patrons electroforètics que presenten les espècies pertanyents a aquestes dues famílies són relativament simples i bastant similars entre ells (Fig. 1). Les característiques principals són la presència d'unes bandes minoritàries de baixa mobilitat electroforètica que, per córrer en la zona de les histones anomenarem Ph, i que són en part extretes amb àcid acètic 35%. En alguns casos (A. gibberosa, pou h; C. ligatum, pou j), a causa de la no completa maduresa de les gònades, en l'extracte d'acètic apareixen també restes d'histones somàtiques. Un altre tret comú en la família dels Tròquids, si bé no en la dels Fissurel.lacis, és la presència d'unes bandes de mobilitat intermitja, que poden oscil.lar en nombre d'ú a tres, i que anomenarem Pi. Són també bastant minoritàries i extretes en part amb acètic 35%. El que sí és un tret comú en totes les espècies d'aquestes dues famílies és l'existència d'una banda majoritària (més del 80% del total) d'elevada mobilitat, i que representa la protamina principal, P, només present en l'extracte HCl 0.4 N. Llurs característiques electroforètiques revelen un elevat contingut en aminoàcids bàsics. Les mobilitats electroforètiques de les espècies estudiades en aquest treball i llur pes molecular estimat són presents a la Taula I.

SUBIRANA et al. (1973) van estimar el pes molecular de la protamina P de G. divaricata i van analitzar la seva

composició d'amino-acids. Amb un tamany aproximat d'uns 100 aminoàcids, conté sobre un 56% d'arginina i un 5.8% de lisina. Considerant tots aquests resultats podria ser adequat pensar que les protamines principals dels Arqueogasteròpodes de fertilització externa pertanyents a les famílies Trocacis i Fissurellacis són unes proteïnes d'un tamany entre 80 i 110 aminoàcids, la major part d'ells de tipus bàsic, i que coexisteixen en l'espermatozoide amb petites quantitats d'altres proteïnes (Ph), que podrien ser similars a les histones somàtiques com l'H2b (COLOM and SUBIRANA, 1981).

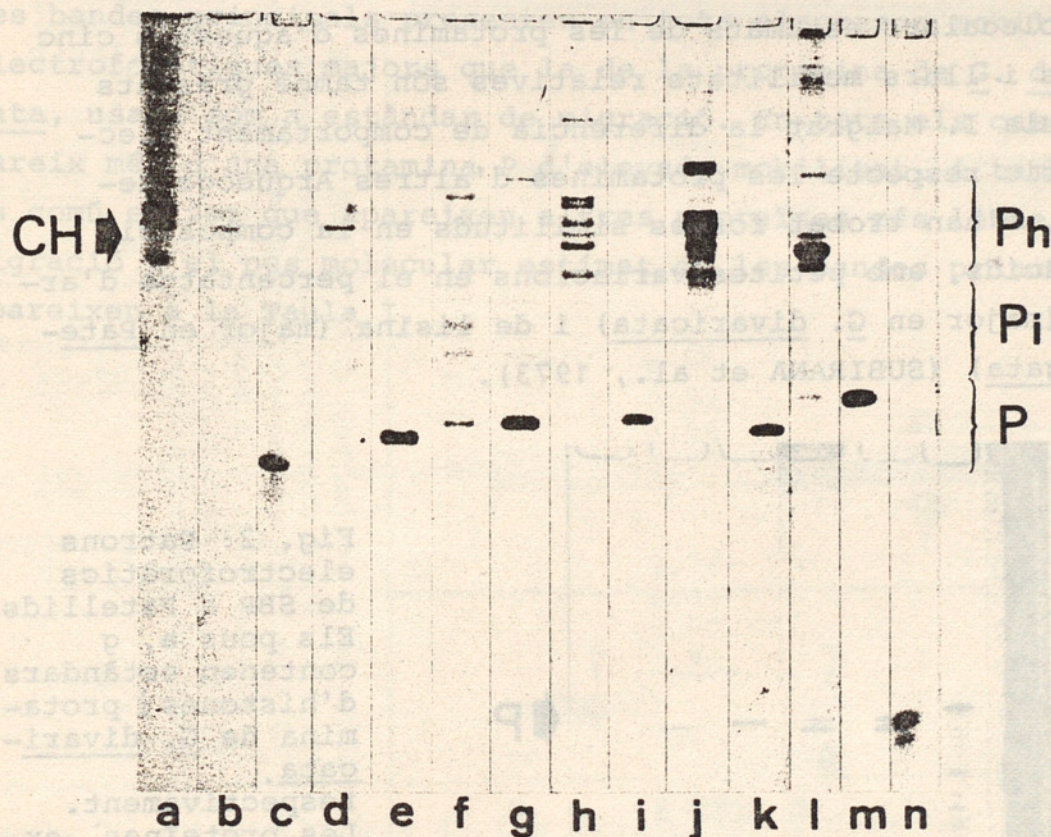


Fig.1: Patr6 electrofor6tic de les proteïnes nuclears dels espermatozoides de 6 esp6cies de Trocacis i Fissurellacis. Els pous b, d, f, h, j i l contenen les proteïnes extretes amb àcid ac6tic 35%; els pous c, e, g, i, k contenen les proteïnes extretes amb HCl 0.4 N; els pous a i n mostren respectivament un estàndar d'histones somàtiques i salmينا. Les esp6cies són: *Diodora sp.* (b, c); *F. picta* (d, e); *T. funebris* (f, g); *A. gibberosa* (h, i); *C. ligatum* (j, k) i *G. divaricata* (l, m).

b) Patellacis: En aquesta família el patró electroforètic de les proteïnes presents en l'espermatozoide és bastant diferent al de les dues famílies descrites anteriorment. Els resultats mostren l'existència d'una única protamina, de migració molt lenta, però de composició molt similar a la protamina principal de G. divaricata (SUBIRANA et al., 1973). Nosaltres hem estudiat la migració electroforètica dels extractes totals de cinc espècies de Patellacis (Fig. 2). En tots els casos la protamina principal correspon a una banda de mobilitat molt baixa, i que en alguns casos (N. persona, pou c; N. scutum, pou d) pot ser representada per dues bandes de migració similar. Els pesos moleculars estimats de les protamines d'aquestes cinc espècies i llurs mobilitats relatives són també presents a la Taula I. Malgrat la diferència de comportament electroforètic respecte les protamines d'altres Arqueogasteròpodes, s'han trobat fortes similituds en la composició d'aminoàcids, amb petites variacions en el percentatge d'arginina (major en G. divaricata) i de lisina (major en Patella vulgata) (SUBIRANA et al., 1973).

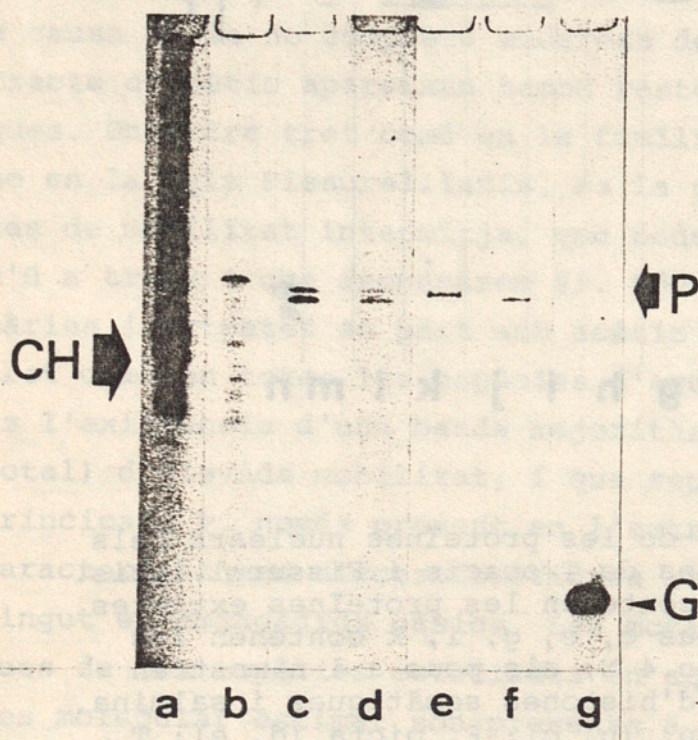


Fig. 2: Patrons electroforètics de SBP a Patellids. Els pous a, g contenen estàndars d'histones i protamina de G. divaricata, respectivament. Les proteïnes, extretes amb HCl 0.4 N, pertanyen a les següents espècies: A. mitra (b), N. persona (c), N. scutum (d), C. digitalis (e), i C. pelta (f).

II. Proteïnes bàsiques presents en els espermatozoides de Prosobranquis de fertilització interna: La Fig. 3 A mostra les mobilitats electroforètiques de les proteïnes procedents de nuclis testiculars madurs de dues espècies de Mesogasteròpodes (*L. scutulata*, pous b, c; *P. lewisii*, pous d, e), i les Fig. 3 B i C mostren el mateix en tres espècies de Neogasteròpodes, totes elles pertanyents a la família dels Murícids (*N. canaliculata*, pous h, i; *N. marginata*, pous j, k; *M. brandaris*, pou l). Malgrat s'observen certes variacions entre espècies, alguns trets comuns són bastant evidents. Un d'ells és que les histones, si apareixen, ho fan en una proporció molt minsa en els nuclis testiculars madurs. Ademés, les bandes principals presenten en tots els casos mobilitats electroforètiques majors que la de la protamina de *G. divaricata*, usada com a estàndar de migració. En tots els casos apareix més d'una protamina P d'elevada mobilitat, i també és comú el fet que apareixen altres proteïnes més lentes. La migració i el pes molecular estimat de les bandes principals apareixen a la Taula I.

Mesogasteròpodes			
<i>L. scutulata</i>	0.78	57 aa	
	0.82	52 aa	
	0.85		
<i>P. lewisii</i>	0.87		
Neogasteròpodes			
<i>M. brandaris</i>	0.77	59 aa	
	0.83	46 aa	
	0.90	41 aa	
<i>N. canaliculata</i>	0.93	54 aa	
(major component)			
<i>N. marginata</i>	0.79	54 aa	

Taula I: Mobilitats electroforètiques de les protamines P dels Mol. luscis Prosobranquis, referides a la mobilitat de la salmina, amb el pes molecular estimat a partir de la mobilitat electroforètica en gels de acrilamida.

Fig. 3 : Bscio electroforètica dels nuclis testiculars madurs de Prosobranquis de fertilització interna.

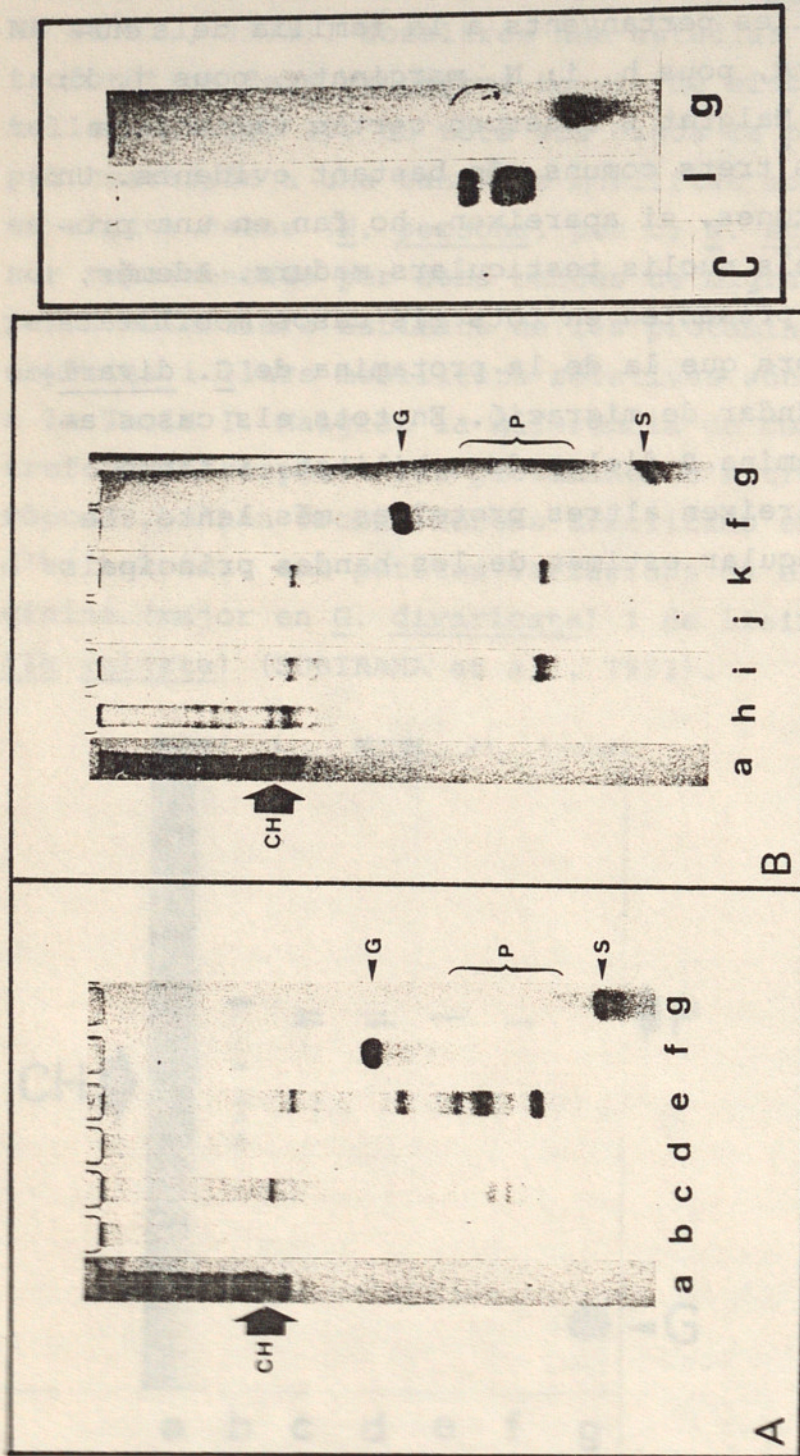


Fig. 3 : Patró electroforètic dels extractes d'àcid acètic 35% (pous b, d, h, j), HCl 0.4 N (pous c, e, i, k, l). Els pous a, f, g contenen, respectivament, estàndars d'histones somàtiques, gibbulina i salmina. La Fig. 3 A correspon a les espècies de Mesogasteròpodes L. scutulata (b, c) i P. lewisii (d, e). La Fig. 3 B mostra els extractes de les espècies de Neogasteròpodes N. canaliculata (h, i) i N. marginata (j, k). La Fig. 3 C mostra les protamines de M. brandaris, també una espècie de Neogasteròpode (l).

Espècie	a	b
Prosobranquis de fertilització externa		
Patellacis:		
<u>A. mitra</u>	0.22	224 aa
<u>N. persona</u>	0.24	219 aa
	0.25	214 aa
<u>N. scutum</u>	0.24	219 aa
	0.25	214 aa
<u>C. digitalis</u>	0.25	216 aa
<u>C. pelta</u>	0.25	214 aa
Trocaçis:		
<u>A. gibberosa</u>	0.54	94 aa
<u>T. funebris</u>	0.58	91 aa
<u>C. ligatum</u>	0.58	91 aa
<u>G. divaricata</u>	0.52	104 aa
Fissurellacis:		
<u>F. picta</u>	0.60	85 aa
<u>Diodora sp.</u>	0.64	77 aa
Prosobranquis de fertilització interna		
Mesogasteròpodes:		
<u>L. scutulata</u>	0.78	57 aa
	0.82	52 aa
	0.85	48 aa
<u>P. lewisii</u> (major component)	0.87	45 aa
Neogasteròpodes:		
<u>M. brandaris</u>	0.77	59 aa
	0.86	46 aa
	0.90	41 aa
<u>N. canaliculata</u>	0.79	54 aa
(major component)		
<u>N. marginata</u>	0.79	54 aa

Taula I: a) mobilitats de les protamines P dels Mol. luscs Prosobranquis estudiats, referides a la mobilitat de la salmina, presa com a mobilitat unitat.
 b) estimació del nombre d'aminoàcids d'aquestes protamines a partir de la seva mobilitat electroforètica en gels 15% acrilamida/acètic/urea (vegeu Materials i Mètodes)

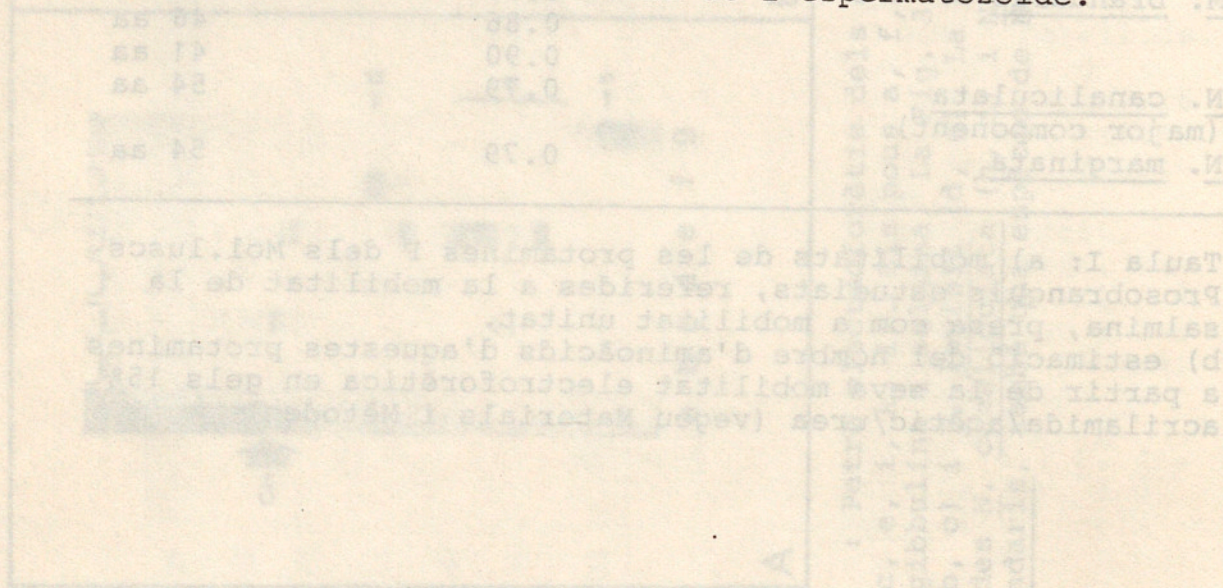
FRANZEN, A. (1970). Phylogenetic aspects of the morphology of spermatozoa and spermiogenesis. *Comparative Spermatology*. Baccetti ed. Academic Press, New York and London pp. 29-46.

Discussió

Els resultats exposats ens mostren que en els Prosobranquius de fertilització externa es donen dos patrons de proteïnes presents en els nuclis dels espermatozoides bastant diferenciats: un d'ells correspon a les Fam. Trocacis i Fissurellacis, i l'altre correspon a la Fam. Patellacis. D'altra banda, treballs anteriors (SUBIRANA et al, 1973; BALHORN et al, 1979) mostren que altres famílies d'Arqueogasteròpodes presenten un patró bastant similar al descrit per a les Fam. Trocacis i Fissurellacis. Sembla, per tant, que el contingut proteic dels nuclis dels espermatozoides en els Prosobranquius de fertilització externa és representat principalment per una proteïna molt bàsica, de 80 a 110 aa de longitud, amb l'excepció dels Patellacis, els quals expressen una proteïna bastant més llarga (210-230 aa). Encara és fosca la relació entre aquests dos tipus de proteïnes, malgrat ser bastant similars en composició d'aminoàcids.

D'altra banda, les proteïnes principals de les espècies de Meso i Neogasteròpodes són menors en tamany i majors en nombre.

Sembla, doncs, que amb el pas a la fertilització interna es dóna un increment paral·lel de la complexitat del patró electroforètic, així com del procés de condensació de la cromatina espermàtica i de la forma de l'espermatozoide.



Bibliografia

- AMOR, M.J. (1987). La espermatogénesis de Murex brandaris (L), (Gastropoda, Prosobranchia). Estudio ultraestructural. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. Facultad de Ciencias Biológicas.
- AUSIÓ, J. (1986). Structural variability and compositional homology of the protamine-like components of the sperm from the bivalve molluscs. Comp. Biochem. Physiol., 85 B, 429-449.
- AUSIÓ, J. and VAN HOLDE, K.E. (1988). The histones of the sperm from Spissula solidissima include a novel cysteine-containing H1-histone. Cell differentiation. 23, 175-190.
- AZEVEDO, C. (1981). The fine structure of the spermatozoon of Patella lusitanica (Gastropoda, Prosobranchia) with special reference to acrosomal formation. J. Submicroscop. Cytol. 13, 47-56.
- AZEVEDO, C., LOBO-DA-CUHNA, A. and OLIVEIRA, E. (1985). Ultrastructure of the sperm in Gibbula umbilicalis (Gastropoda, Prosobranchia), with special reference to acrosomal formation. J. Submicroscop. Cytol. 17, 609-614.
- BALHORN, R., LAKE, S. and GLEDHILL, B.L. (1979). Electrophoretic analysis of nuclear proteins isolated from the sperm of the black abalone Haliotis crackeroidii. Exp. Cell Res. 123, 414-417.
- BLOCH, D.P. (1969). A catalog of sperm histones. Genetics (Suppl.). 61, 93-111.
- BUCKLAND-NICKS, J., WILLIAMS, D., CHIA, F.S. and FONTAINE, A. (1983). Studies on the polymorphic spermatozoa of a marine snail. 2. Genesis of the eupyrene sperm. Gamete Res. 7, 19-37.
- COLOM, J. and SUBIRANA, J.A. (1981). Presence of the H2b histone in spermatozoa from marine gastropoda. Exp. Cell Res., 131, 462-465.
- FRANZEN, A. (1955). Comparative morphological investigations into the spermiogenesis among Mollusca. Zool. Bidr. Uppsala. 30, 339-456.
- FRANZEN, A. (1956). On spermiogenesis, morphology of spermatozoon and biology of fertilisation among invertebrates. Zool. Bidr. Uppsala. 31, 335-482.
- FRANZEN, A. (1970). Phylogenetic aspects of the morphology of spermatozoa and spermiogenesis. Comparative Spermatology. Baccetti ed. Academic Press. New York and London pp. 29-46.

- HEALY, J.M. (1983). Ultrastructure of Euspermiogenesis in the Mesogastropod Stenohyra sp. (Scl. Prosobranchia, Rissoacea, Stenothyridae). Zoologica Scripta. 12, 203-214.
- HODGSON, A.N. and BERNARD, R.T.F. (1988). A comparison of the structure of the spermatozoa and spermatogenesis of 16 species of Patellid limpets (Mollusca: Gastropoda: Archaeogastropoda). Journal of Morphology. 195, 205-223.
- JARAMILLO, R., GARRIDO, O. and JORQUERA, B. (1988). Ultrastructural analysis of spermiogenesis and sperm morphology in Chorus giganteus (Lesson, 1829) (Prosobranchia: Muricidae). The veliger 29, 217-225.
- KASINSKY, H.E. (1989). Specificity and distribution of sperm basic proteins. Histones and other basic nuclear proteins, vol. I, L. Hnilica, G. Stein, eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, in press.
- MAXWELL, W. (1983). Mollusca. Reproductive biology of Invertebrates. Adiyodi K.G. and Adiyodi R.G. eds., John Wiley & sons Ltd. Vol. II, pp. 275-319.
- PANYIM, S. and CHALKLEY, R. (1969). High resolution acrylamide gel electrophoresis in histones. Arch. Biochem. Biophys. 130, 337-346.
- SUBIRANA, J.A., COZCOLLUELA, C., PALAU, J. and UNZETA, M. (1973). Protamines and other basic proteins from spermatozoa of molluscs. Biochim. et Biophys. Acta. 317, 364-379.
- SUBIRANA, J.A. (1983). Nuclear proteins in spermatozoa and their interaction with DNA. in The Sperm Cell. J. André, ed. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, pp. 197-213.
- SUBIRANA, J.A. and COLOM, J. (1987). Comparison of protamines from freshwater and marine bivalve molluscs: evolutionary implications. FEBS Lett. 220, 193-196.
- WALKER, M. and MACGREGOR, H.C. (1968). Spermatogenesis and the structure of the mature sperm in Nucella lapillus (L). J. Cell. Sci. 3, 95-104.
- WEST, D.L. (1978). The reproductive biology of Colus stimpsoni. II. Spermiogenesis. The veliger, 21, 1-9.
- WIRTH, V. (1984). Die Struktur de Metazoen-Spermien und ihre Bedeutung für die Phylogenetik. Vehr. Naturwiss Ver. Hamburg, (N.F.) 27, 295-362.
- WOUTERS-TYROU, D., MARTIN-PONTHIEU, A., RICHARD, A. and SAUTIERE, P. (1988). Characterization of the nuclear basic proteins specific of spermiogenesis in cuttlefish, Sepia officinalis. Biochim. et Biophys. Acta. 953. 86-94.
- ZALENSKY, A.O. and ZALENSKAYA, I.A. (1980). Basic chromosomal proteins of marine invertebrates. II. The proteins from sperm of bivalvia molluscs. Comp. Biochem. Physiol. 66B, 415-419.