

L'ESPERMIOGÈNESI COM A MODEL DE DIFERENCIACIÓ CEL·LULAR.

Activitat proteolítica en els extractes acrosòmics dels
espermatozoides del gall.

V. Ustrell i C. Mezquita

Departament de Fisiologia i Bioquímica.

Laboratori de Fisiologia del Nucli Cel·lular i Diferenciació.

Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona.

-Pedralbes- Av. Diagonal s/n 08028 Barcelona.

Abstract

THE SPERMIOGENESIS AS A MODEL OF CELL DIFFERENTIATION.

Proteolytic activity of acrosomal extracts of rooster
spermatozoa.

Spermatids, through an extraordinary process of metamorphosis called spermiogenesis, develop into a highly specialized motile vector for transportation of genetic information: the spermatozoa. The acrosome formation is one of the essential phenomena occurring during spermiogenesis. Besides the interest of the study of acrosomal proteases as a model to investigate gene expression during the differentiation process, we have studied the proteolytic activity of acrosomal extracts has been detected on acetic acid/triton/urea gels and the effectiveness of benzamidine as an inhibitor has been demonstrated. Acid and basic acrosomal extracts showed different electrophoretic patterns of proteolytic activity corresponding essentially to high or low molecular weight components respectively.

Introducció

A les espermàtides primitives no es produeixen divisions cel·lulars i s'inicia el procés de diferenciació i maduració (espermiogènesi) que conduirà a la formació dels

espermatozoides, cèl.lules altament especialitzades per vehiculitzar el missatge genètic. A la majoria d'espècies un fet característic d'aquest procés es la formació de l'acrosoma, estructura citoplasmàtica molt elaborada que persisteix fins al final de l'espermioquèsi, després de l'alliberació dels restes citoplasmàtics o cossos residuals. L'acrosoma es troba adossat al nucli formant part del cap dels espermatozoides.

Mitjançant tècniques de tinció amb PAS i de microscòpia electrònica es descriuen diverses fases en la formació de l'acrosoma, fases que s'utilitzen com a criteri per la classificació dels diferents estadis de l'espermioquèsi.

Inicialment a l'espermàtida primitiva, cèl.lula de petit tamany i nucli esfèric, s'hi observa situat al costat mateix del nucli un aparell de Golgi amb vesícules i grànuls PAS intensament positius. Aquestes vesícules i grànuls anomenats proacrosòmics es fusionen donant lloc a una sola vesícula, la vesícula acrosòmica, formada per un grànul únic. La vesícula acrosòmica augmenta el seu volum i contínuament a mida que avança la diferenciació fins a situar-se sobre el terç anterior del nucli de l'espermàtida adoptant una forma hemiesfèrica (semblant a una caputxa). Al mateix temps, l'aparell de Golgi en aquest estadi migra cap a l'extrem oposat de la cèl.lula. A la fase següent, s'observa la formació de l'acrosoma, s'observa que el nucli gradualment adquireix la morfologia típica de cada espècie i a la vegada la cromatina es condensa en grànuls irregulars que es fusionen fins a formar una massa homogeneament densa

(Courot et al., 1976):

Pel que fa al contingut de l'acrosoma, estudis que han utilitzat tècniques histoquímiques indiquen, com es descriu més endavant, que estaria format per glicoproteïnes i glicolípidis amb una dotació enzimàtica variable a llarg de l'espermiogènesi.

La membrana nuclear observada per microscopia electrònica presenta característiques diferencials d'un estadi a l'altre de l'espermiogènesi. En els crustacis s'ha vist que la distribució dels poros nuclears es manté uniforme fins a l'estadi de les espermatides primitives, en les quals ja es comencen a observar diferències a la zona de la membrana adjacent a l'aparell de Golgi que formarà l'acrosoma. Contràriament a la resta de membrana que és de superfície rugosa, aquesta és llisa, presenta extensions i un ampli espai perinuclears, així com una quantitat de poros notablement superior (Arsenault, A.L. 1984). Una vegada està format l'acrosoma, els poros presenten diferent distribució. Aquests fets suggereixen que el trànsit de material nuclear per la formació de l'acrosoma (RNAm) seria l'explicació de la localització preferent dels poros nuclears.

Entre les glicoproteïnes de l'acrosoma ofereix un interès especial pel seu paper fisiològic el sistema proacrosina/acrosina. Aquest sistema proteolític està especialment estudiat en els mamífers. Els enzims que el constitueixen estan descrits com a proteases seríniques amb especificitat de substrate tripsin-like i alta afinitat pels

residus d'arginina. En general, formen el sistema, una proacrosina, precursor enzimàtic inactiu, i varies formes d'acrosina, productes de la seva degradació, majoritàriament, actives. Per immunofluorescència indirecta s'ha demostrat que aquestes glicoproteïnes són sintetitzades en iniciar-se la formació de l'acrosoma a les espermatides primitives (Mansouri et al., 1983).

La proacrosina a més d'esser activada per l'acrosina i la tripsina té la capacitat d'autoactivar-se al passar a pH neutra o per canvis estructurals de la membrana acrosòmica a la que es creu estaria unida. Una vegada s'ha format acrosina en el medi, es produeix una reacció en cadena, per la qual el procés s'autopotència seguint una corba d'activació sigmoidea i donant lloc a les diferents formes d'acrosina actives (Kennedy et al., 1981). En les diverses espècies s'ha estudiat l'afecte sobre la seva activitat proteolítica de tractaments tèrmics, així com d'agents reductors i desnaturalitzans. Els resultats, en general, indiquen una marcada resistència a tots ells. Són actives en un ampli marge de temperatura, fins i tot està descrit un cas en que incuban a 101°C durant 20 minuts l'enzim segueix actiu en un 40% (Polakoski et al., 1977). Per altre banda, les concentracions utilitzades normalment de β -mercaptoetanol i ditiotreitòl (DTT) no l'inactiven totalment, així també l'urea l'inhibeix pero de forma reversible (Mukerji, S.K 1984).

El sistema és inhibit al 100% i irreversiblement pel inhibidor de les serín-proteases Diisopropilfluorofosfat

(DFP) pero aquest gairebé no s'utilitza degut a la seva elevada toxicitat i es fan servir d'altres inhibidors que són reversibles, fonamentalment la Benzamidina que actua per un mecanisme d'inhibició competitiva.

En definitiva, la formació de l'acrosoma i l'existència de la proacrosina/acrosina junt al nucli des de l'inici de la diferenciació, constitueix quelcom a tenir molt en compte a l'hora d'abordar l'estudi de les proteïnes nucleals durant l'espermioogènesi. Per aquest motiu nosaltres ens proposarem de fer una caracterització electroforètica prèvia de les proteases acrosòmiques i detectar la presència d'activitat proteolítica en els extractes.

Materials i Mètodes

Galls "Hubbard White Mountain" de 25-30 setmanes d'edat foren utilitzats en aquestes investigacions.

A partir d'espermatozoides del conducte deferent rentats amb sacarosa 0,25 M i en presència de benzamidina 5 mM s'han obtingut extractes àcids amb àcid acètic al 2% més tres cicles de congelació/descongelació. Es practicà electroforesis en gels laminars de tritó/acètic/urea. Els gels foren tenyits uns amb Coomassie Blue i d'altres amb BANA/Fast Garnet per la detecció d'activitat proteolítica en el gel (Mukerji et al., 1979).

Per altre banda, igualment a partir d'espermatozoides del conducte deferent rentats en un medi isotònic i en presència de benzamidina 5 mM es va obtenir un extracte bàsic

amb tampó 25 mM Tris pH 8.0 i 0,1 M clorur càlcic. Després, l'extracte es va dialitzar dues vegades, la primera en front de Tris 25 mM pH 8.0 i benzamidina 5 mM per treure el calci que podria interferir en l'electroforesi i l'altre en front d'àcid acètic al 2% per treure la benzamidina que interferiria en el moment de detectar l'activitat proteolítica en el gel. Aquest extracte es va sotmetre a les mateixes condicions d'electroforesi que l'extracte àcid en gels de tritó/acètic/urea. I a continuació també es varen tenyir uns amb Coomassie Blue i els altres amb BANA/Fast Garnet.

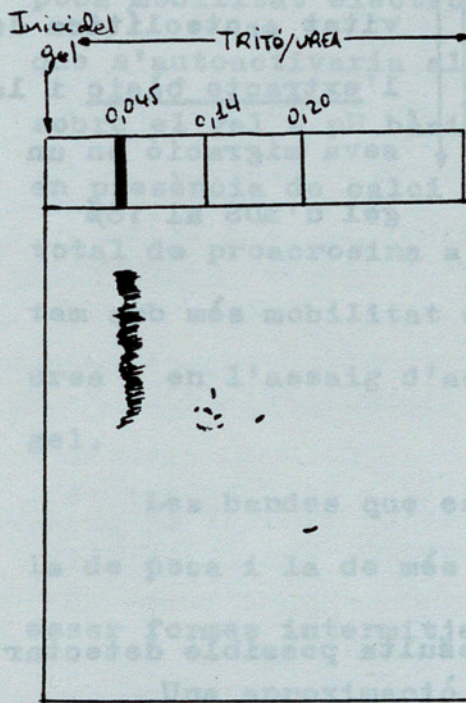
Ademés es practicà electroforesis bidimensionals dels extractes àcid i bàsic.

Resultats

Nosaltres ja habíem detectat activitat proteolítica sobre gels desnaturalitzans de tritó/urea corresponents al extracte d'espermatozoides en àcid acètic al 2% i de forma reproduïble obtenim un patró de bandes amb activitat proteolítica format per una banda majoritària de poca mobilitat electroforètica ($R_f \approx 0,045$) i dues de més mobilitat ($R_f \approx 0,14$ i $0,20$) menys intenses.

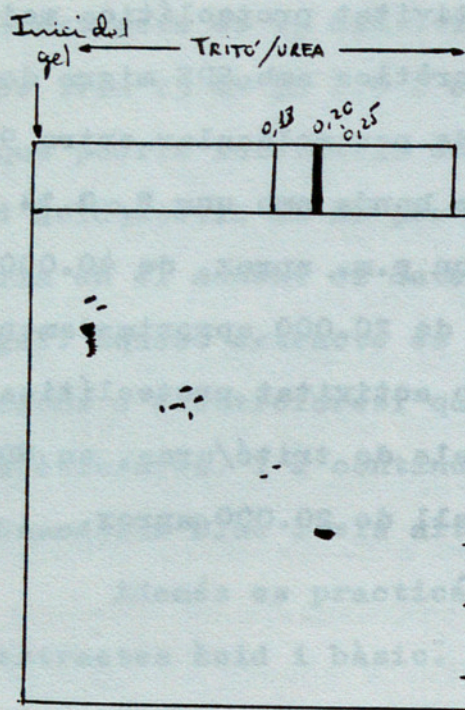
En canvi, practica la mateixa reacció sobre el gel corresponent al extracte bàsic, la banda majoritària d'activitat proteolítica resulta ser la de més mobilitat electroforètica ($R_f \approx 0,20$). En aquest cas, tret d'una banda tenue de R_f aproximadament 0,18 no es detecten bandes de menys mobilitat amb activitat proteolítica.

Practicada la segona dimensió en gels d' SDS al 18% en l'extracte àcid la banda amb activitat proteolítica majoritària i poca mobilitat electroforètica amb SDS migra donant diversos components en un rang de pes molecular entre 90.000 i 40.000 aproximadament. L'altre banda amb una $R_f \approx 0,14$ en els gels de tritó, en SDS dóna un p.m. aprox. de 40.000, i la de $R_f \approx 0,20$ migra amb un p.m. de 20.000 aproximadament. De l'extracte bàsic la banda amb activitat proteolítica majoritària de $R_f \approx 0,20$ en els gels de tritó/urea, en SDS dóna una taca més intensa a nivell de 20.000 aprox.



Representació esquemàtica de les bandes en tritó/urea amb activitat proteolítica de l'extracte àcid i la seva migració en un gel d' SDS al

18%



Representació esquemàtica de les bandes en tritó/urea amb activitat proteolítica de l'extracte bàsic i la seva migració en un gel d' SDS al 18%

Discussió

Donat que, en aquest cas, resulta possible detectar activitat proteolítica després de l'electroforesi en gels de tritó/urea hem continuat amb la caracterització electroforètica en aquest gels de les activitats proteolítiques presents a un extracte àcid i un altre bàsic d'espermatozoïdes. El motiu de fer aquets dos tipus d'extracció és el d'obtenir acrosina activa, doncs a les aus està descrit (Brown et al., 1976) que a diferència dels mamífers l'acrosina només s'extrauria activa a pH bàsic en presència de

cations divalents, mentre que la proacrosina s'extrau a pH àcid i s'autoactiva al passar a pH neutra. Si bé es descriu que l'acrosina de gall estaria inhibida a 2.7, aquesta inhibició és reversible.

Es d'assenyalar que els dos tipus d'extractes amb gels de tritó/urea, per tinció amb Coomassie Blue, donen patrons molt semblants, però segons l'extracte sigui àcid o bàsic el patró de bandes d'activitat proteolítica és diferent. Aixó podria interpretar-se com que en condicions àcides s'extrau majoritàriament proacrosina, que tindria poca mobilitat electroforética en gels de tritó/urea i que s'autoactivaria al assajar l'activitat proteolítica sobre el gel a pH bàsic. Mentre que al extraura a pH 8.0 i en presència de calci podria haver-hi una conversió gairebé total de proacrosina a acrosina i ser aquesta la que detectem amb més mobilitat electroforética en els gels de tritó/urea i en l'assaig d'activitat proteolítica damunt del gel.

Les bandes que es detecten d'intensitat variable entre la de poca i la de més mobilitat electroforética podrien esser formes intermitjes d'acrosina poc estables.

Una aproximació al pes molecular de les bandes amb activitat proteasa s'ha obtingut per electroforesis bidimensional. El patró és també semblant en un extracte i l'altre, només que clarament en la del extracte àcid predominan les taques d'alt pes molecular i en el bàsic predomina la de pes molecular aproximat 20.000.

Bibliografia

ARSENAULT, A.L. (1984). Changes in the nuclear envelope associated with spermatids differentiation in the shrimp "crangon septem spinosa". J. of Ultr. Res. 86, 294-308

BROWN, C.R. i HARTREE, L.F. (1976). Comparison of neutral proteinase activities in cock and ram spermatozoa and observation on a proacrosin in cock spermatozoa. J. Reprod. Fert. 46, 155-164

COUROT, M., HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T. i ORTOVANT, R. (1976) Spermatogenesis. Vol. I cap. & JOHNSON, A.D. "The Testis".

KENNEDY, W.P. i POLAKOSKI, K.L. (1981). Evidence for an intrazymogen mechanism in the conversion of proacrosin into acrosin. Biochemistry. 20, 2240-2245

MANSOURI, A., VAN, L.P., GEITHE, H.P i ENGEL, W. (1983). Proacrosin/acrosin activity during spermiogenesis of the bull. Differentiation. 24, 149-152

MUKERJI, S.K. i MEIZEL, S. (1979). Rabbit testis proacrosin. Purification, molecular weight estimation, and amino acid and carbohydrate composition of the molecule. J. of Biol. Chem. Vol. 254, 22 pp. 11721-11728

MUKERJI, S. (1984). Studies on the rabbit proacrosin-acrosin system. Arch. of Biochem. and Biophys. Vol. 230, 2, pp. 412-423

POLAKOSKI, K.L. i PARRISH, R.F. (1977). Boar proacrosin. Purification and preliminary activation studies of proacrosin isolated from ejaculated boar sperm. The J. of Bio. Chem. Vol. 252, 6, pp. 1888-1894