

Caracterització de les proteïnes bàsiques majoritàries de les espermatides i espermatozoides del gall

V. Ustrell i C. Mezquita

Grup de Genètica Molecular. Fisiologia. Facultat de Medicina
Departament de Ciències Fisiològiques Humanes i de la Nutrició.

Divisió de Ciències de la Salut. Universitat de Barcelona
Avd. Diagonal s/n. 08028 Barcelona

Abstract

Characterization of major basic proteins present in spermatids and spermatozoa of chicken testis

During spermiogenesis the spermatid undergoes complex morphological and biochemical transformations to produce functionally mature spermatozoa. This differentiation process requires a considerable synthesis of new structural as well as enzymatic proteins. In order to characterize the more abundant acid-soluble proteins present in chicken spermatids and spermatozoa, these cells were separated by counterflow centrifugation. Mature spermatozoa were obtained from the vas deferens. Acid-soluble proteins were characterized by electrophoresis in Triton/acetic acid/urea and in SDS. Two major acid soluble proteins, with apparent molecular weights of 17.000 and 20.000, were obtained from spermatids. One of these proteins was also present in spermatozoa. Both proteins showed very similar patterns of degradation after treatment with *S. Aureus* V8 protease, indicating that they are closely related. Without addition of V8 protease the isolated proteins still generate a heterogeneous electrophoretic pattern, suggesting the interesting possibility that these proteins are proteases.

Introducció

El procés de la espermiogènesi comporta una transformació o metamorfosis total de les espermatides, per la qual esdevenen espermatozoides. La formació de noves i altament específiques estructures cel·lulars: l'acrosoma i el flagel, la progressiva condensació de la cromatina i el seu

empaquetament ulterior al cap de l'espermatozoide així com la reorganització de la estructura global de la cèl.lula són les característiques més destacables de l'espermioogènesi. En aquest estadi s'ha trobat una activa síntesi de proteïnes específiques, estructurals i enzimàtiques, implicades en la diferenciació (Nicotra et al., 1984), (Stern et al., 1983).

L'estudi d'aquestes proteïnes i d'altres de les espermàtides ha estat dificultat per la purificació parcial dels nuclis o cèl.lules emprades i per proteolisi important. Cal tenir en compte en aquest tipus cel.lular l'existència de l'acrosoma, estructura citoplàsmica rica en enzims hidrolítics que conté el sistema de serín proteases proacrosina-acrosina, proteases sintetitzades al llarg de l'espermioogènesi (Mansouri et al., 1983) junt amb d'altres, entre les que podrien trobar-se les proteases responsables de la conversió de la pro-opiomelanocortina, pro-dinorfina i pro-encefalina (Kilpatrick i Millette, 1986), components del flagel com la tubulina (Cherry et al., 1984) i l'actina (Camatini et al., 1986) abundants en les espermàtides de diferents espècies. Per aquets motiu, nosaltres varem procedir a la caracterització electroforètica dels extractes acrosòmics i a la detecció de la seva activitat proteolítica en els gels àcids (Ustrell i Mezquita, 1985). L'assaig de diferents inhibidors, l'utilització d'acurats mètodes de purificació i separació tan de nuclis com de cèl.lules ens permeteren d'abordar l'estudi de les proteïnes majoritàries bàsiques de les espermàtides, en el nostre model de l'espermatogènesi del

gall.

Material i Mètodes

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

Per a l'obtenció d'una suspensió de nuclis, el teixit fresc, previa dissecció de la albugïna, es trosseja i s'homogeneïtza en sacarosa 2M -acetat càlcic 3.3mM, tritó X-100 0,01% pH 5.8 a 0-4 °C. Després de filtrar amb Miracloth es centrifuga amb la Beckman L-2, rotor SW-27 a 22.000 r.p.m (52.800g) durant 60' a 0 °C. Per control al microscopi de contrast de fases s'observa que els nuclis mantenen la seva morfologia, el grau d'agregació es mínim i el material particulat hi es troba en quantitat discreta. Els nuclis es resuspenen en el medi 12% sacarosa-acetat càlcic 3.3mM, tritó X-100 0,01% pH 5.8 i es dilueixen fins a una densitat òptica a 600nm de 1.4.

Separació dels nuclis pel mètode d'elutriació (centrifugació en contra d'un fluxe) amb la Beckman J2-21, rotor JE-6B. La concentració de nuclis totals en suspensió que s'introdueixen dins de la càmera d'elutriació es de 6×10^7 . Les condicions de separació per elutriació dels nuclis són: a 5.000 r.p.m (0-4 °C) i amb fluxes regulats per una bomba peristàltica de:

8 cc/min. -s'elueixen els nuclis d'espermàtides allargades.

16 cc/min. -" " " " " " " " "en elongació i rodones.

24 cc/min. -" " " " " " " " "pre i postmeiòtics.

32 cc/min. -" " " " " " " " "meiòtics i la resta (agregats, etc...)

Amb aquestes condicions es consegueix minimitzar l'agregació, la principal dificultat que impedeix la separació de nuclis per elutriació, i separar dues poblacions d'espermàtides amb un percentatge de contaminació per altres tipus nucleals despreciable.

Extractes de les poblacions nucleals separades en els medis, àcid (HCl 0,3M i PCA 0,74N) i en el tampó de mostres d'SDS (62,5mM tris-2% SDS, glicerol 10% - β mercaptoetanol pH 6.8).

Per a l'obtenció de les suspensions cel.lulars, el teixit fresc, lliure d'albugïnea i trossejat, es resuspen en M.E.M ("Minimum Essential Medium") amb tripsina 0,25g -DNasa I 0,5mg i s'incuba durant 30' a 31 °C amb agitació manual suau intermitent. Després de centrifuga 20' a 2.000 r.p.m a temperatura ambient es resuspen en el M.E.M contenin Inhibidor de la tripsina 10mg -BSA 50mg i es mantè 10' a temperatura ambient. Filtració amb sis capes de gasa per eliminar agregats. Dilució amb PBS-G (amb glucosa 0,1%) fins a obtenir una concentració de cèlules totals aproximada de $2,4 \times 10^7$

.Separació en el mateix medi per elutriació segons procediment descrit per Boix i Roca, (1984). Els extractes de les diferents poblacions cel.lulars es realitzen amb Hcl 0,3M en presència de bisulfit sòdic 50mM i en Hcl 0,3M amb PMSF 1mM -5% Isopropanol, N-Etilmaleimida 5mM, 100U/ml Aprotinina.

Electroforesis dels extractes nucleals en gels de P.A tritó/urea 7,5M i 3M (Zweidler,A), i gels de P.A SDS 18% (Laemmli, 1970). Tinció amb Coomassie Blue R-250 (Lennox et al., 1982) i tinció argèntica segons procediment de Giancotti i Goodwin, (1986). Electroforesis dels extractes cel.lulars en gels de P.A tritó/urea 7,5M, de P.A 18% -SDS i bidimensionals en aquets sistemes.

Detecció de l'activitat proteolítica "trypsin-like" dels extractes en gels de P.A 12,5% -SDS 0,1% -Gelatina 0,1% seguint el procediment (Siegel et al., 1986):

. després de l'electroforesi, el gel sense fixar ni tenyir es sumergeix en 2,5% v/v tritó X-100 i es mantè durant 1 hora amb agitació suau.

. es renta tres o quatre vegades amb aigua destil.lada.

. s'incuba en tris 50mM pH 8.0 durant 2-3 hores a 37°C.

. fixació i tinció del gel amb Amido Black 0,1% dissolt en metanol/acètic/aigua destil.lada (30:10:60).

. destinció amb metanol/acètic/aigua destil.lada (30:10:60).

Per aquest mètode, durant l'incubació del gel a pH bàsic

les proteases existents a l'extracte poden actuar sobre el seu substracte incorporat al propi gel, la gelatina, degradant la zona o banda de migració corresponent. De tal manera que, a més de detectar l'activitat proteolítica el mètode permet coneixer el pes molecular aproximat de les proteases contaminants.

Mapes peptídics amb la proteasa de Stafilococcus Aureus V8 de bandes retallades tan dels gels àcids com bàsics segons el mètode descrit (Rizzo et al., 1985):

. les bandes s'equilibren en tris/Hcl pH 8 -SDS 0,1% . S'efectuen tres rentats de 5 minuts en aquets medi, a temperatura ambient amb agitació suau.

. Per la digestió "in situ" seguida d'electroforesis, les bandes equilibrades es col.loquen en els pous del gel de P.A 18% -SDS i s'els hi afageix el tampó amb la proteasa V8 0,4mg/ml en tris 1mM/Hcl pH 8 -SDS 0,1%, glicerol 10% .

. s'inicia la electroforesi a voltatge constant (200V) fins a concentrar la mostra a l "stacking". La electroforesi s'atura durant una hora, temps en el que tèn lloc la digestió, i, es reanuda fins el final. Tinció i destinció del gel segons el procediment habitual i observació dels peptits resultans de la degradació.

Resultats

Patrons electroforètics obtinguts dels extractes d'espermàtides allargades en comparació a la resta de tipus nucleals :

- proteïnes solubles en àcid. Electroforesis en gels de P.A tritó/urea 7,5M i 3M. Mostren

. una disminució quantitativa de les proteïnes histones i no histones en relació a la protamina que apareix majoritària en aquest nuclis.

. No s'observen altres bandes majoritàries, addicionals o no, a excepció de la corresponent a l'H2B la qual es tenyeix més intensament.

- proteïnes solubles en 62,5 mM tris -2% SDS, glicerol 10% - β -mercaptoetanol pH 6.8 . Electroforesis en gels de P.A 18% SDS. S'observa

. una disminució quantitativa de les histones i no histones amb absència de bandes addicionals.

Patrons electroforètics d'extractes àcids d'espermàtides (cèl.lula total) comparativament a la resta de tipus cel.lulars

- en gels de P.A tritó/urea 7,5M

. disminució quantitativa de les histones i no histones.

. presència de protamina i bandes de poca menor movilitat, probables formes químicament modificades de la mateixa.

. s'observan dues bandes majoritàries que apareixen o destaquen específicament a les espermatides i no als estadis cel.lulars previs. La seva movilitat relativa en aquest gels es de 0,34 (en la zona corresponent a l'HMG2) i 0,56 (solapada amb les formes acetil.lades de l'H4). Fig 1.

- per electroforesis bidimensionals en gels de P.A 18% -SDS

. les bandes majoritàries de les espermatides donen components de pes molecular aproximat de 17.000 i 20.000 d respectivament.

. les bandes de poca menor movilitat a la protamina en la primera dimensió (gel de P.A tritò/urea) resulten esser insolubles en SDS al igual que ho es la protamina. Fig 2.

El patró electroforètic en gels de P.A 18% SDS dels extractes àcids d'espermatides allargades mostren en comparació a la resta :

. dues bandes majoritàries, una d'elles amb la mateixa movilitat que l'H2B i l'altre d'un pes molecular aproximat de 20.000 d.

No s'ha detectat activitat proteolítica "trypsin-like" sobre els gels en aquest extractes.

De la comparació dels patrons electroforètics de degradació amb la proteasa V8 de les proteïnes majoritàries de les espermatides abans esmentades, resulta:

- mapa peptídic amb la V8 de la Rf 0,34 dels gels àcids, la qual anomenem T1, presenta:

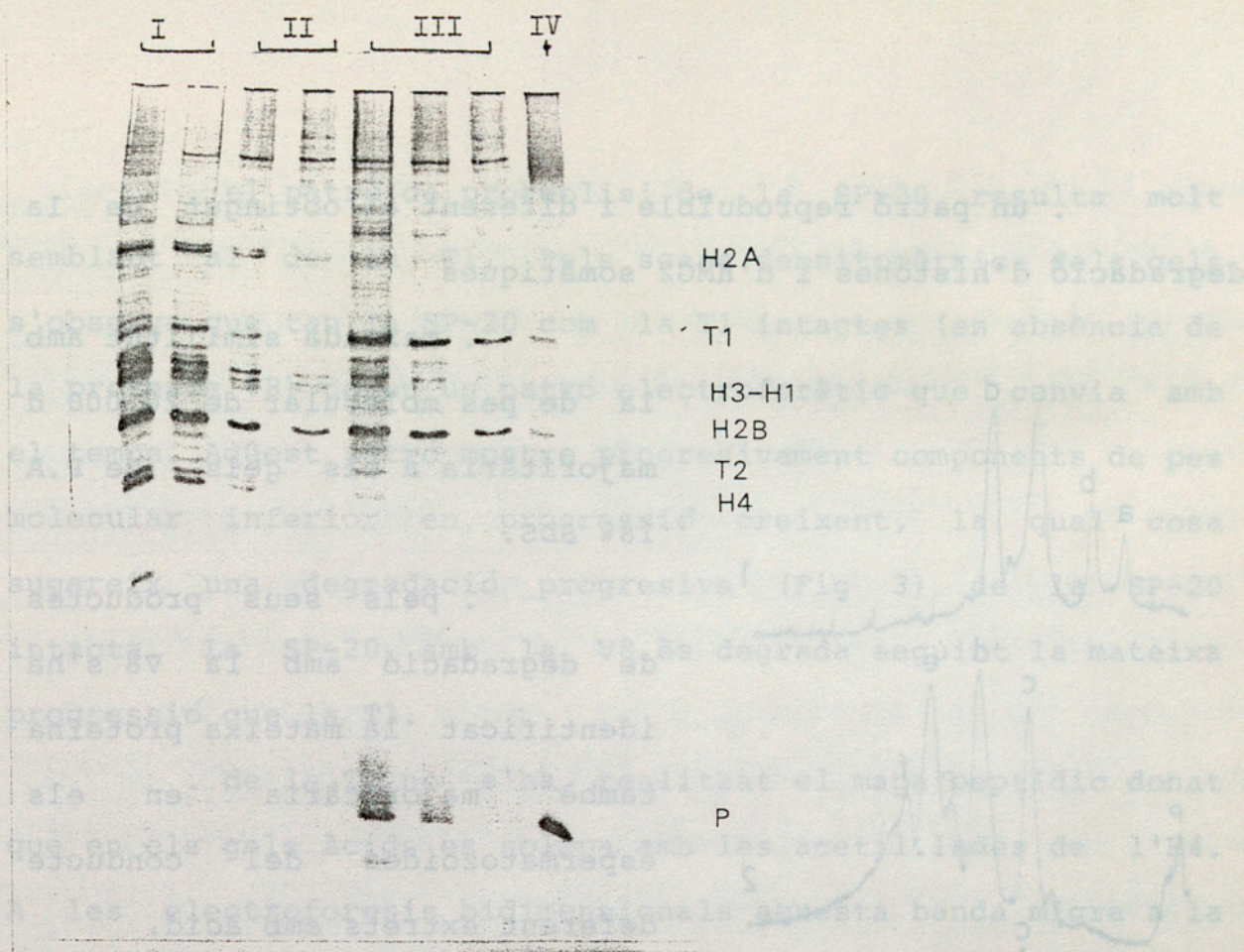


Fig. 1 : Electroforesis en P.A tritò/acètic/urea 7,5M dels extractes amb Hcl 0,3M-Bisulfit sòdic 50mM de les poblacions cel.lulars: I- premeiòtiques-meiotiques. II- espermatides rodones. III- espermatides allargades. IV- espermatzoïdes testiculars.



Fig.2 : Electroforesi bidimensional en P.A.18% SDS del patró de espermatides allargades (carril nº5 fig. 1). 1: H2A; 2: 17.000 d; 3: H1; 4: H3; 5: H2B; 6: 20.000 d; 7: H4.

. un patró reproduïble i diferent al obtingut de la degradació d'histones i d'HMG2 somàtiques

. marcada similitud amb la de pes molecular de 20.000 d majoritària a els gels de P.A 18% SDS.

. pels seus productes de degradació amb la V8 s'ha identificat la mateixa proteïna també majoritària en els espermatozoides del conducte deferent extrets amb àcid.

- mapa peptídica amb la V8 de la banda majoritària de les espermàtides en gels de P.A 18% SDS de 20.000d, anomenada SP-20

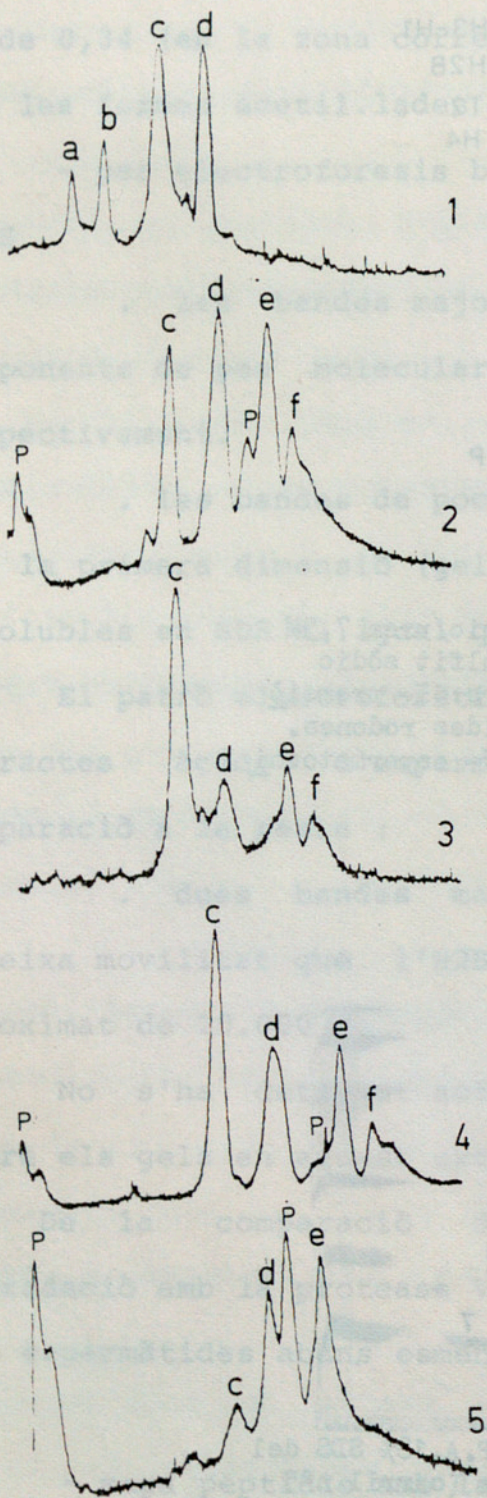


Fig. 3 : Scans densitomètrics dels patrons electroforètics en P.A.18% SDS de:

- 1- T1 intacta
- 2- T1 parcialment degradada amb la proteasa estafilocòcica V8.
- 3- SP-20 intacta
- 4- SP-20 parcialment degradada amb la proteasa estafilocòcica V8.
- 5- SP-20 parcialment més degradada amb la mateixa V8.

. el patró de proteolisi de la SP-20 resulta molt semblant al de la T1. Pels scans densitomètrics dels gels s'observa que tan la SP-20 com la T1 intactes (en absència de la proteasa V8) donen un patró electroforètic que canvia amb el temps. Aquest patró mostra progressivament components de pes molecular inferior en progressió creixent, la qual cosa suggereix una degradació progressiva (Fig 3) de la SP-20 intacta. La SP-20 amb la V8 és degradada seguint la mateixa progressió que la T1.

. de la T2 no s'ha realitzat el mapa peptídic donat que en els gels àcids es solapa amb les acetil.lades de l'H4. A les electroforesis bidimensionals aquesta banda migra a la zona de la SP-20, s'assumeix que es tracta de la mateixa proteïna.

Discussió

En base als resultats de les electroforesis, les espermatides presenten dues proteïnes majoritàries, T1 i T2, solubles en àcid, les quals no s'observen en estadis previs. Aquestes proteïnes també es trobarien en els espermatozoides del conducte deferent. S'ha observat que quan la T1 es retalla del gel àcid i es passa a un gel d' SDS dona de forma reproduïble dues bandes de pes molecular superior a 17.000 d,

entre 20.000 i 30.000 d . En canvi, per electroforesis bidimensional s'observa un ùnic component de 17.000 d . La possibilitat de que els components de pes molecular superior fossin HMGs contaminants s'ha descartat fent una extracció prèvia amb PCA 0,74N d'aquets extractes. Tambè resulta sorprenen la seva absència en les electroforesis bidimensionals, i fa pensar que aquests components son inestables en les condicions d'aquesta electroforesis. Això, junt amb la similitud d'els mapes peptídics indicaria que aquestes proteïnes, T1 i T2, es troben relacionades de tal manera que podrien representar dos diferents estadis de processament d'una mateixa proteïna. No obstant, el coneixement de la relació entre elles requerirà ulterior estudi per seqüenciació.

Els resultats obtinguts sugereixen que les proteïnes bàsiques majoritàries aïllades de les espermàtides podrien tenir activitat preteolítica intrínseca, la qual cosa explicaria la generació espontànea de patrons electroforètics heterogenis.

Bibliografia

- BOIX, J., i ROCA, J. (1984). L'elutriació com a mètode de separació de cèl.lules aplicable a l'estudi de l'espermatogènesi del gall. Biol.Desen. 2, 77-84.
- CAMATINI, M., ANELLI, G, i CASALE, A. (1986). Identification of actin boar spermatids and spermatozoa by immunoelectron microscopy. Europ.J. of Cell Biol. 42, 311-318.

- CHERRY, L.M. i HSU, T.C. (1984). Antitubulin immunofluorescence studies of spermatogenesis in the mouse. Chromosoma 90, 265-274.
- GIANCOTTI, V., i GOODWIN, G.H. (1986). A method for silver staining HMG chromosomal proteins in polyacrylamide electrophoretic gels. J.Biochem.Biophys.Meth. 12, 265-269.
- KILPATRICK, D.L., i MILLETTE, C.F., (1986) Expression of proenkephalin messenger RNA by mouse spermatogenic cells. Proc.Nat.Acad. SCI USA. 83, 5015-5018.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.
- LENNOX, R.W., OSHIMA, R.G. i COHEN, L.H. (1982). The H1 histones and their interphase phosphorylated states in differentiated and undifferentiated cell lines derived from murine teratocarcinomes. J.Biol.Chem. 257, 5183-5189.
- MANSOURI, A., PHI-VAN, L., GEITHE, H.P., i ENGEL, W. (1983). Proacrosin/acrosin activity during spermiohistogenesis of the bull. Differentiation 24, 149-152.
- NICOTRA, A., ARIZZI, M., i GALLO, P.V. (1984). Protein synthetic activities during spermiogenesis in the sea urchin: an high resolution autoradiographic study of H-leucine incorporation. Develop.Growth.and Differ. 26, 273-280.
- RIZZO, P.J., BRADLEY, W., i MORRIS, L.H. (1985). Histones of the unicellular alga Olisthodiscus luteus. Biochemistry 24, 1727-1732.
- SIEGEL, M.S., BECHTOLD, S., KOPTA, C.I. i POLAKOSKI, K.L. (1986). Quantification and partial characterization of the hamster sperm Proacrosin-acrosin system. Biol. of Reprod. 35, 485-491.
- STERN, L., GOLD, B. i HECHT, B. (1983). Gene expression during mammalian spermatogenesis. Evidence for stage-specific synthesis of polypeptides "in vivo".
- USTRELL, V. i MEZQUITA, C. (1985). L'espermiogènesi com a model de diferenciació cel.lular. Activitat proteolítica en els extractes acrosòmics dels espermatozoides del gall. Biol.Desenv. 3, 157-167.
- ZWEIDLER, A. Resolution of histones by polyacrylamide gel electrophoresis in presence of nonionic detergents. Chapter 16. Methods in Cell Biol. Vol XVII