

PROTEÏNES ESPERMÀTIQUES BÀSIQUES I PATRÓ DE CONDENSACIÓ DE LA CROMATINA DE L'ESPERMATOZOIDE BIFLAGEL·LAT DELS PEIXOS MICTÒFIDS

Núria Saperas¹, Joan Ausió², Enric Ribes³

¹D1Departament d'Enginyeria Química, EEBE, Universitat Politècnica de Catalunya, Eduard Maristany, 10-14, 08019 Barcelona, Spain - nuria.saperas@upc.edu

²Department of Biochemistry and Microbiology, University of Victoria, Victoria, BC V8W 3P6, Canada

³Unitat de Biologia Cel·lular, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain - eribes@ub.edu

Resumen

Les proteïnes espermàtiques bàsiques (PEB) associades al nucli de les espermàtides madures i espermatozoides de *Lampanyctus crocodilus* presenten un patró complex on coexisteixen histones juntament amb dos grups de proteïnes més bàsiques: un primer grup amb mobilitat electroforètica similar a les histones i un segon grup majoritari de proteïnes (P1, P2 i P3) amb una mobilitat que es troba entre la de les histones i l'habitual en protamines de peixos. La caracterització parcial de les proteïnes d'aquest segon grup mostra un contingut d'aminoàcids bàsics propers al 50%, corresponent majoritàriament a arginina, com és habitual en protamines. No obstant això, les masses moleculars determinades per espectrometria de masses (9484, 9770 i 10211 per P1, P2 i P3, respectivament) són molt més grans del que és habitual en les protamines dels peixos, essent les més grans descrites fins al moment. El patró general de PEB trobat en dues espècies més de mictòfids (*Symbolophorus veranyi* i *Notoscopelus elongatus*) es correspon amb el de *L. crocodilus*. La morfologia general de l'espermatozoide i la condensació de la cromatina de *S. veranyi* es corresponen amb les descrites per *L. crocodilus*. La cromatina es condensa progressivament en forma d'estructures fibrogranulars amb grànuls de mida creixent (25, 50, 150 nm) que finalment es fusionen donant lloc a una cromatina altament electrodensa.

Palabras clave: proteïnes nuclears espermàtiques bàsiques, protamines, espermiogènesi, cromatina espermàtica, Myctophiformes.

Abstract

The sperm nuclear basic proteins (SNBPs) of *Lampanyctus crocodilus* present a complex pattern where histones coexist with two groups of more basic proteins: one formed by proteins with an electrophoretic mobility in the same region as histones, and a second major group of proteins (P1, P2 and P3) with a mobility intermediate between histones and that of the canonical fish protamines. The partial characterization of the proteins of this second group shows that they have a high content of basic amino acids (~50%) mainly constituted by arginine, as it is usual in protamines. However, mass spectrometry analyses show that their molecular weights (9484, 9770 and 10211 for P1, P2 and P3, respectively) are much higher than usual in fish, making them the largest protamines found in this group. This SNBP pattern has also been found in two more Myctophidae species (*Symbolophorus veranyi* and *Notoscopelus elongatus*). Also, both the general morphology of the spermatozoon and the chromatin condensation in *S. veranyi* are very similar to those of *L. crocodilus*. Chromatin condenses from a fibrogranular structure with granules that grow progressively in diameter (25, 50, 150 nm) and which finally coalesce to give a very electron-dense chromatin.

Key words: sperm nuclear basic proteins (SNBPs), protamines, spermiogenesis, sperm chromatin, Myctophiformes.

INTRODUCCIÓ

Els mictòfids són un grup de peixos marins de fondària capaços de produir bioluminiscència degut als fotòfors que presenten distribuïts al llarg del cos (Hulley, 1984).

L'any 1976, Mattei i Mattei van descriure per primer cop l'espermatozoide d'un mictòfid a partir d'un exem-

plar de *Lampanyctus* sp. conservat en formol. Aquest estudi mostrava que es tractava d'un espermatozoide biflagel·lat i amb un patró axonemal atípica (9+0). Aquestes dues característiques van ser trobades també per Hara (2007) a *Notoscopelus* sp. i a *Symbolophorus californiensis*. En canvi, Hara i Okiyama (1989) descriuen un espermatozoide uniflagel·lat i amb un patró axonemal 9+2 a *Lampanyctus jordani*.

L'estudi ultraestructural de l'espermatozoide i l'espermioigènesi de l'espècie *Lampanyctus crocodilus* dut a terme recentment pel nostre grup (Ribes *et al.*, 2015; Saperas i Ribes, 2015) concorda amb la descripció de Mattei i Mattei (1976) i Hara (2007) i mostra com durant l'espermioigènesi d'aquesta espècie es desenvolupen dos flagels 9+0.

En el present treball es descriu a nivell ultraestructural el patró de condensació de la cromatina espermàtica d'una altra espècie de mictòfid (*Symbolophorus veranyi*) així com la caracterització parcial de les proteïnes espermàtiques bàsiques (PEB) de *Lampanyctus crocodilus*, *Symbolophorus veranyi* i *Notoscopelus elongatus*.

MATERIALS I MÈTODES

Material biològic

S'ha treballat amb tres espècies de peixos mictòfids (Myctophidae, Myctophiformes) pertanyents a dues subfamílies: *Lampanyctus crocodilus*, *Notoscopelus elongatus* (Lampanyctinae) i *Symbolophorus veranyi* (Myctophinae). Tots els exemplars van ser capturats al Mediterrani. Les mostres destinades a l'estudi de la ultraestructura van ser fixades seguint el protocol descrit a Saperas i Ribes (2015) mentre que les destinades a l'estudi bioquímic van ser preservades en etanol 90% a -20°C fins al seu processament.

Microscòpia electrònica

Tant les mostres destinades a microscòpia electrònica de transmissió (TEM) com de rastreig (SEM) van ser processades i observades com es descriu a Saperas i Ribes (2015).

Extracció i purificació de les PEB

Els nuclis es van preparar com a Saperas *et al.* (1993) amb lleugeres modificacions. Breument, les gònades madures es van homogeneïtzar en tampó A (0.25 M sacarosa, 5 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) continent 50 mM de clorur de benzamidina, es van filtrar i centrifugar (2300g, 10 min, 4°C), i a continuació es van homogeneïtzar i centrifugar dos vegades més en tampó A continent 0.1% Tritó-X100, una vegada en tampó B (20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) i una última vegada en tampó C (50 mM Tris-HCl, pH 7.4). En aquells casos on es va processar un únic exemplar, els passos amb els tampons B i C es van ometre i tot el procés es va realitzar en un tub Eppendorf.

Les PEB es van extreure a partir dels nuclis amb HCl 0.4 M o bé, mitjançant una extracció fraccionada, utilit-

zant primer àcid acètic al 35 % i després HCl 0.4 M. Les proteïnes extretes es van precipitar amb 6 volums d'acetona a -20°C tota la nit, es van rentar amb acetona freda i finalment es van assecar.

Pel fraccionament i purificació de les PEB es va usar HPLC de fase reversa amb una columna Vydac C₁₈ 4.6x250 mm utilitzant un gradient creixent d'acetonitril en presència de 0.1% àcid trifluoroacètic (Ausió, 1988) així com cromatografia d'intercanvi catiònic. En el darrer cas es va utilitzar un ÄKTA Purifier 10 FPLC, una columna HiTrap SP FF (GE Healthcare) i un gradient creixent de NaCl en 50 mM acetat de sodi, pH 6.0.

Anàlisis electroforètiques, anàlisis aminoacídiques i espectrometria de masses

Les electroforesis en gels de poliacrilamida-acètic-urea (AU-PAGE) s'han realitzat com a Saperas *et al.* (1992). Per a les electroforesis bidimensionals s'ha utilitzat AU-PAGE per a la primera dimensió i electroforesi en poliacrilamida-dodecil sulfat sòdic (SDS-PAGE) per a la segona.

Les anàlisis d'aminoàcids van realitzades com a Karsinsky *et al.* (2005), i la desorció/ionització làser assistida per matriu (MALDI) com a Hunt *et al.* (1996).

RESULTATS

Caracterització de les PEB de *Lampanyctus crocodilus*

L. crocodilus mostra un patró complex de PEB en gels AU-PAGE. Tant en les mostres d'esperma com en les procedents de gònada madura extretes amb HCl 0.4 M, les bandes proteïques apareixen distribuïdes en dos regions principals (Figura 1A): un primer grup de proteïnes amb mobilitat electroforètica a la zona de les histones, i un segon grup (P a la Figura 1) amb una mobilitat major, que es troba entre la de les histones i la de la salmina (protamina de salmó). Aquesta darrera fracció consisteix majoritàriament en tres proteïnes, P1, P2 i P3, que són quantitativament les més importants de l'extracte. Quan l'extracció de les PEB es fa de forma fraccionada, les histones s'extreuen típicament a l'utilitzar acètic 35% (fracció AC) (Subirana *et al.*, 1973; Saperas *et al.*, 1993), mentre que aquelles proteïnes amb una major relació arginina/lisina (com ara les protamines) s'extreuen posteriorment amb la fracció HCl 0.4 M post acètic (fracció PA). En el cas de *L. crocodilus* (Figura 1B), a la fracció AC apareixen majoritàriament histones però també algunes altres bandes minoritàries. D'altra banda, la fracció ràpida P, així com algunes de les proteïnes que migraven a la regió de les histones, apareixen a la fracció PA, fet que indica una

major basicitat d'aquestes proteïnes. El fet que les mateixes proteïnes que apareixen en la fracció PA es mostren també incapaces d'entrar en els gels SDS-PAGE durant les electroforesis bidimensionals (Figura 1C) apunta també clarament a què aquestes proteïnes són riques en arginina.

Tot i que les proteïnes de la fracció ràpida (P1, P2 i P3) no tenen una mobilitat tan ràpida com les protamines típiques de peixos, el seu comportament durant les extraccions àcides i en front de l'SDS apunten a què es tractaria de protamines.

nic (no mostrat) no van permetre obtenir les proteïnes P1, P2 i P3 com a tres pics perfectament separats. Tot i així, es va poder dur a terme una anàlisi aminoacídica preliminar de P1 i P3 (Figura 1G). L'anàlisi mostra, efectivament, una composició rica en arginina (42% i 46% molar, respectivament), essent la quantitat de lisina força menor (4.4% i 3.5%). Igualment presenten una representació important dels aminoàcids fosforilables Ser i Thr (11-12%).

Finalment, la massa molecular de les proteïnes P1, P2 i P3 va poder ser determinada per espectrometria de

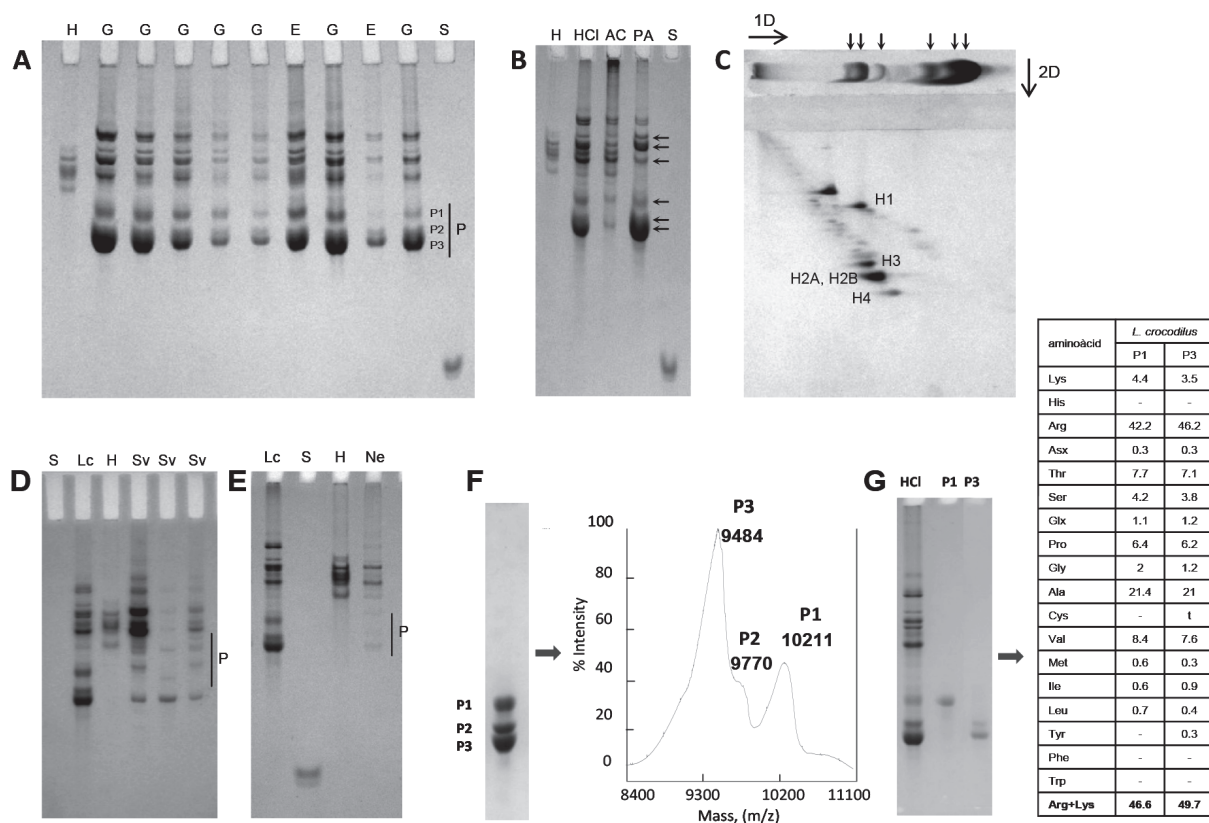


Figura 1. Caracterització de les proteïnes espermàtiques bàsiques (PEB). **A**, PEB obtingudes a partir de gònada madura (G) o esperma (E) de diferents individus de *L. crocodilus* (AU-PAGE). **B**, Extracció fraccionada de les PEB de *L. crocodilus* (AU-PAGE); HCl, AC i PA, segons es descriu al text. **C**, Electroforesi bidimensional de les PEB de *L. crocodilus* (1D, AU-PAGE; 2D, SDS-PAGE). **D** i **E**, PEB obtingudes a partir de gònada madura de diferents individus de *S. veranyi* (**D**) i *N. elongatus* (**E**). **F**, Espectrometria de masses de les proteïnes P1, P2 i P3 de *L. crocodilus*. **G**, Mostres utilitzades i resultat de la determinació de la composició aminoacídica de P1 i P3 de *L. crocodilus*. H, patró d'histones d'eritròcit de pollastre; S, patró de salmina (protamina de salmó); Lc, patró corresponent a les PEB de *L. crocodilus*; Sv, *S. veranyi*; Ne, *N. elongatus*.

Per poder caracteritzar-les millor es va procedir a la seva purificació. Les proves realitzades amb HPLC de fase reversa permetien separar la fracció ràpida P de la resta de proteïnes. No obstant això, els intents de refraccionament tant per fase reversa com per bescanvi catiò-

masses, resultant-ne uns valors de 10211, 9770 i 9494 Da, respectivament (Figura 1E), valors molt més elevats que els 4000-5000 Da habituals en altres protamines de peixos.

PEB de *Symbolophorus veranyi* i *Notoscopelus elongatus*

En el cas d'aquestes dues espècies, el baix nombre d'exemplars que es van poder aconseguir va limitar la caracterització de les seves proteïnes. Tot i així, es pot observar com el patró general de les PEB de les dues espècies (extracció global amb HCl 0.4 M) és comparable al de *L. crocodilus*: un grup de proteïnes amb mobilitat electroforètica a la regió de les histones i un altre grup de mobilitat intermitja entre les histones i la salmina (P a Figura 1D-E).

Morfologia general de l'espermatozoide i patró de condensació de la cromatina de *S. veranyi*

L'espermatozoide de *S. veranyi* presenta una morfologia molt similar a la de *L. crocodilus* (Ribes *et al.*, 2015; Saperas i Ribes 2015). A la Figura 2A-B es mostren les imatges de SEM dels dos espermatozoides. Es pot apreciar com en ambdós casos el cap presenta una morfologia força modificada, en forma de plàtan. Així, el cap és corbat i més estret en l'extrem anterior que en el posterior. Del costat convex del cap (que correspondria inicialment al pol basal de l'espermàtida), i lleu-

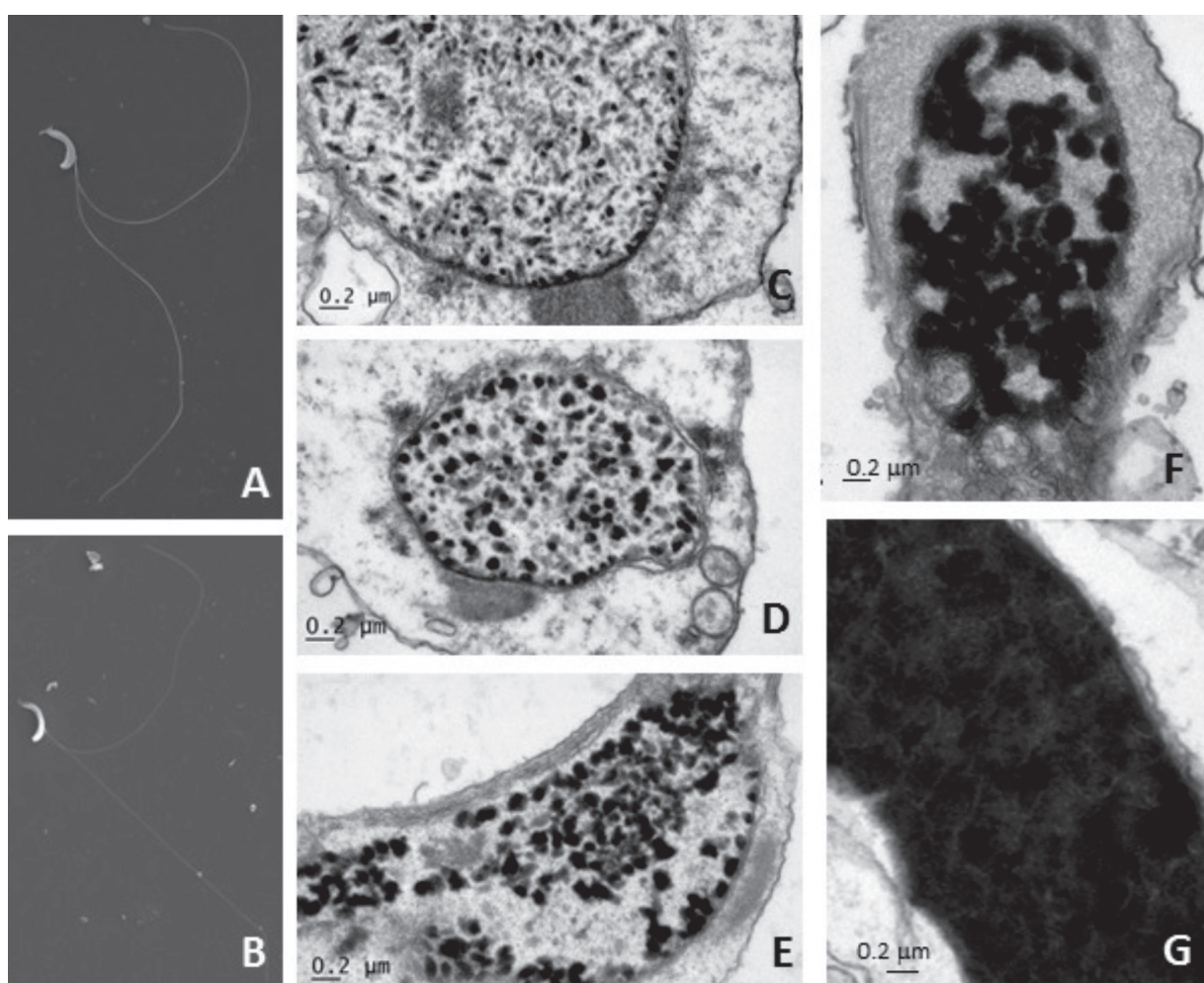


Figura 2. A i B, Imatges de microscòpia electrònica de rastreig (SEM) de l'espermatozoide de *Lampanyctus crocodilus* (A) i de *Symbolophorus veranyi* (B). C – F, Imatges de microscòpia electrònica de transmissió (TEM) d'espermàtides de *S. veranyi* en diverses etapes de desenvolupament: C, espermàtida jove, cromatina fibrogranular amb grànuls de 25 i de 50 ± 5 nm de diàmetre; D i E, espermàtida mitjana, cromatina granular de 150 ± 50 nm de diàmetre; F espermàtida avançada, els grànuls de 150 nm inicien un procés d'aglutinació. G, Nucli de l'espermatozoide de *S. veranyi*. La cromatina presenta un alt grau de compactació degut a la completa aglutinació dels grànuls. Escala: 0,2 μm.

gerament desplaçats del seu centre, en surten dos flagels d'uns 55 µm de longitud. Com a *L. crocodilus*, aquests flagels presenten un patró axonemal 9+0 (no mostrat).

Concomitantment a la transformació morfològica del cap de l'espermatozoide, el seu nucli i l'organització de la cromatina també es van modificant (Figura 2C-G). La cromatina del nucli arrodonit de l'espermàtida primerenca presenta una estructura fibrogranular amb grànuls de 25 i 50±5 nm de diàmetre. La condensació sembla iniciar-se preferentment a la perifèria i va progressant cap a l'interior. Els grànuls de cromatina van augmentant de mida de manera que a l'espermàtida mitjana (Figura 2D-E) s'hi troben estructures granulars de 150±50 nm de diàmetre. Finalment, en l'espermàtida avançada (Figura 2F), aquests grànuls ja no augmenten de mida sinó que es van aglutinant, donant lloc a una cromatina altament electrodensa a l'espermatozoide d'aquesta espècie (Figura 2G).

DISCUSSIÓ

A les cèl·lules somàtiques el DNA està associat a histones, en canvi la cromatina dels espermatozoides presenta una major variabilitat en el tipus de proteïna responsable de la seva organització. En general, les proteïnes espermàtiques bàsiques (PEB) solen classificar-se en tres grans grups: les proteïnes tipus histones (tipus H); el tipus protamina (tipus P), que engloba un conjunt variat de proteïnes petites i molt enriquides en arginina que solen reemplaçar les histones somàtiques assolint un grau de condensació de la cromatina molt més elevat; i el tipus PL (de "protamine-like"), que agruparia a un grup de proteïnes amb característiques composicionals i estructurals intermèdies entre histones i protamines. Malgrat que el tipus protamina hi predomina, a diferència d'altres grups de vertebrats, en els peixos hi podem trobar exemples de tots tres tipus de PEB (Saperas *et al.*, 1994).

A *L. crocodilus*, el comportament durant les extraccions àcides i enfront de l'SDS, i les anàlisis composicionals, indiquen que les PEB predominants poden ser considerades protamines. Són poc extretes amb àcid acètic 35% (apareixent majoritàriament a la fracció PA), i es mostren insolubles en SDS. A més presenten una gran riquesa en arginina i una presència considerable d'aminoàcids fosforilables (tret també característic en protamines). A diferència d'altres peixos, però, aquestes protamines coexisteixen amb histones i amb una notable proporció de proteïnes de mobilitat electroforètica similar a aquestes però de major basicitat. A més, la mida d'aquestes protamines és aproximadament el doble de l'habitual en peixos.

Les PEB de *S. veranyi* i *N. elongatus* mostren un patró electroforètic en AU-PAGE molt similar a les de *L. crocodilus*, apuntant a què aquest tipus de proteïnes podria ser característic dels mictòfids.

D'altra banda, tant el tipus d'espermatozoide com el patró de condensació de la cromatina observat durant l'espermioïgenesis de *S. veranyi* són també equiparables als descrits recentment per *L. crocodilus* (Ribes *et al.*, 2015, Saperas i Ribes, 2015). En totes dues espècies (representants de les dues subfamílies dels mictòfids), s'observa com al llarg de l'espermioïgenesis el cap i el nucli es van allargant i corbant, la cromatina inicialment fibrogranular va presentant grànuls de mida creixent, fins que a l'espermàtida avançada es dona una coalescència d'aquests grànuls assolint un grau de compactació de la cromatina molt elevat. Paral·lelament a les modificacions que experimenta el cap, l'espermàtida desenvolupa dos flagels, tots dos de tipus 9+0.

Així doncs, als Myctophidae, a més de trobar-hi les dues singularitats ja apuntades per Mattei i Mattei (1976) de posseir un espermatozoide biflagel·lat i un patró axonemal 9+0, s'hi afegeix la de presentar les protamines més grans descrites fins al moment en peixos.

AGRAÏMENTS

Els autors volem agrair a J.A. Caparrós i a la tripulació dels vaixells de pesca *Nus* i *l'Òstia* l'haver-nos proporcionat els exemplars estudiats, i al Dr. D. Lloris el seu ajut en la identificació de les espècies. Les observacions de microscòpia electrònica han estat realitzades als Serveis Científic-Tècnics de la UB. Aquest treball ha estat parcialment finançat per la Fundació Bosch i Gimpera (UB) (E.R.), pel NSERC (46399-2012) (J.A.) i pel MINECO-FEDER (MAT2015-69547-R) i la Generalitat de Catalunya (2014SGR188) (N.S.).

BIBLIOGRAFIA

- HARA M (2007) Ultrastructure of spermatozoa of two species of Myctophidae; *Symbolophorus californiensis* and *Notoscopelus* sp. *Japan J Ichthyol* 54:41-46.
- HARA M, OKIYAMA M (1998) An ultrastructural review on the spermatozoa of Japanese fishes. *Bulletin of the Ocean Research Institute, University of Tokyo* 33:1-138.
- HULLEY PA (1984) Myctophidae. In: Whitehead PJP, Bauchot ML, Hureau JC, Nielsen J, Tortonese E (eds) *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean* (FNAM). UNESCO, Paris, vol I, p. 429-483.

- HUNT JG, KASINSKY HE, ELSEY RM, WRIGHT CL, RICE P, BELL JE, SHARP DJ, KISS AJ, HUNT DF, ARNOTT DP, RUSS MM, SHABANOWITZ J, AUSIÓ J (1996) Protamines of reptiles. *J Biol Chem* 271:23547-23557.
- KASINSKY HE, FREHLICK LJ, SU HW, AUSIÓ J (2005) Protamines in the internally fertilizing neobatrachian frog *Eleutherodactylus coqui*. *Mol Reprod Dev* 70:373-381.
- MATTEI X, MATTEI C (1976) Spermatozoïdes à deux flagelles de type 9+0 chez *Lampanyctus* sp. (poisson Myctophidae). *J Microsc Biol Cell* 25:187-188.
- RIBES E, CHEEMA M, GONZÁLEZ-ROMERO R, LLORIS D, AUSIÓ J, SAPERAS N (2015) Spermiogenesis and biflagellate spermatozoon of the teleost fish *Lampanyctus crocodilus* (Myctophiformes, Myctophidae): ultrastructure and characterisation of its sperm basic nuclear proteins. *Cell Tissue Res* 361:619-632.
- SAPERAS N, AUSIÓ J, LLORIS D, CHIVA M (1994) On the evolution of protamines in bony fish: alternatives to the “retroviral horizontal transmission” hypothesis. *J Mol Evol* 39:282-295.
- SAPERAS N, CHIVA M, AUSIÓ J (1992) Purification and characterization of the protamines and related proteins from the sperm of a tunicate, *Styela plicata*. *Comp Biochem Physiol B* 103:969-974.
- SAPERAS N, LLORIS D, CHIVA M (1993) Sporadic appearance of histones, histone-like proteins, and protamines in sperm chromatin of bony fish. *J Exp Zool* 265:575-586.
- SAPERAS N, RIBES E (2015) Anàlisi ultrastructural de l'espermioquèsi i l'espermatozoide biflagellat del peix *Lampanyctus crocodilus* (Myctophiformes, Myctophidae). *Societat Catalana de Biologia (SCB) Biol Reprod* 14:55-60.
- Subirana JA, Cozcolluela C, Palau J, Unzeta M (1973) Protamines and other basic proteins from spermatozoa of molluscs. *Biochim Biophys Acta* 317:364-379.