

PROTEÏNES ASSOCIADES A L'ADN EN L'ESPERMA I ELS SEUS CANVIS EN L'ESPERMIOGÈNESI *

Comunicació presentada el dia 16 d'abril de 1970 pels senyors

J. A. SUBIRANA

Director de la Secció de Biopolímers

J. PALAU

Investigador de la Secció de Biopolímers

M. PLADELLORENS

Becari de la Secció de Biopolímers

C. COZCOLLUELA

Becari de la Secció de Biopolímers

i

A. RUIZ-CARRILLO

Becari de la Secció de Biopolímers

* Treball efectuat en el Centre de Genètica Animal i Humana, C.S.I.C. de Barcelona.

INTRODUCCIÓ

En el nucli de les cèl·lules somàtiques hi ha un grup de proteïnes bàsiques, les histones, que hom pot agrupar en cinc tipus principals, tots ells presents en cadascun dels organismes eucariotes estudiats. Una de les característiques més peculiars d'aquest grup de proteïnes és la poca especificitat que presenten. La demostració més clara d'aquesta inespecificitat s'ha obtingut en comparar la seqüència d'aminoàcids del component F2a1, ric en arginina, que presenta una seqüència pràcticament idèntica en el pèsol i en la vedella. Aquesta estabilitat evolutiva constitueix una indicació que la funció de les histones, encara no clarament determinada, té lloc d'una manera molt definida en la cèl·lula, car aquestes proteïnes no toleren canvis en llur composició d'aminoàcids.

Per contra, en l'esperma hi ha diferències molt notables en la composició de les proteïnes bàsiques associades amb l'àcid desoxiribonucleic (ADN), segons l'espècie que hom estudiï. L'objecte d'aquest treball és precisament de descriure la variabilitat de la composició de les proteïnes de l'esperma dins dos grups d'invertebrats fonamentalment marins: els equinoderms i els molluscs.

MATERIAL I MÈTODES

Els invertebrats estudiats procedeixen de la Costa Brava, amb excepció dels musclos, d'origen gallec, i dels cefalòpodes, obtinguts dels pescadors del port de Barcelona.

L'esperma fou obtinguda a partir de les gònades madures i, una vegada neta amb aigua de mar, fou tractada amb àcid clorhídric 0.25N per tal d'extreure'n les proteïnes totals, les quals foren precipitades amb sis volums d'acetona.

A fi de fraccionar aquestes proteïnes en els seus components foren aplicats mètodes d'extracció i de precipitació selectiva, introduïts per JOHNS⁵, i descrits amb detall en altres publicacions^{3, 7, 8}. En el cas dels

molluscs resultà molt útil el tractament selectiu amb àcids acètic i clorhídric.

Les proteïnes obtingudes foren estudiades per electroforesi en gels de poliacrilamida i de midó. L'ur composició fou determinada per hidròlisi en medi àcid i cromatografia en un analitzador automàtic «Unichrom-Beckman».

RESULTATS

Molluscs

Entre els molluscs ha estat estudiat amb especial detall el musclo, *Mytilus edulis*, com a bivalve típic. A la figura 1 es mostra l'electroforesi obtinguda a partir de les proteïnes de l'esperma i de les seves fraccions. La composició de les fraccions és donada a la taula núm. I. En aquest cas hom pot observar en l'esperma la presència de dos components minoritaris anàlegs a dos dels somàtics ($\varphi 2a$ i $\varphi 2b$), juntament amb dos

TAULA I

Composició en aminoàcids de les fraccions de les proteïnes nuclears del musclo (*Mytilus edulis*)

	$\varphi 1$	$\varphi 3$	$\varphi 2a$	$\varphi 2b$
Lys	23,5	27,6	11,1	12,9
His	0,4	1,6	1,8	2,2
Arg	24,5	9,2	11,6	9,2
Asp	1,3	3,3	6,7	7,2
Glu	1,3	5,2	8,1	8,1
Thr	4,0	4,0	4,5	6,1
Ser	16,3	8,1	3,4	7,7
Pro	5,1	7,1	2,6	4,1
Gly	5,7	4,4	12,5	6,9
Ala	13,5	15,4	10,1	10,7
Cys	T	T	T	0
Met	T	0,6	0,8	1,5
Val	1,7	3,3	6,7	6,2
Ileu	0,8	3,3	5,0	4,2
Leu	1,0	3,7	9,4	6,3
Tyr	0,3	1,3	3,3	3,4
Phe	0,3	1,5	2,1	1,7

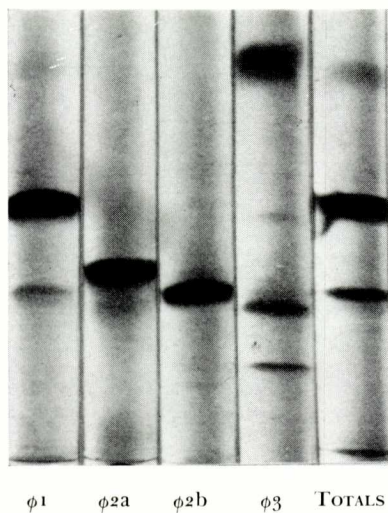


FIG. 1. — Electroforesi en gels de poliacrilamida de les proteïnes de l'esperma del musclo (*Mytilus edulis*)

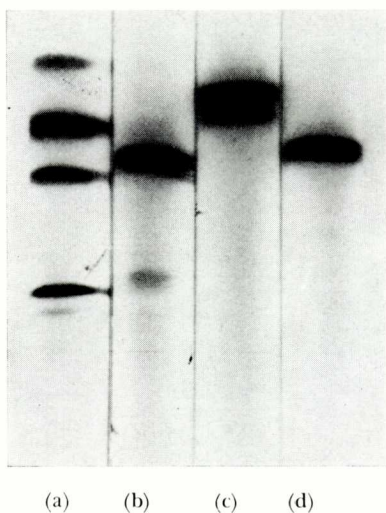


FIG. 2. — Electroforesi en gels de poliacrilamida de les proteïnes de l'esperma dels molluscs:

- a) *Chiton specialis*
- b) *Mytilus edulis*
- c) *Loligo forbesi*
- d) *Haliotis tuberculata*

components típics de l'esperma (φ_1 i φ_3). Aquests dos últims components tenen una gran basicitat i llur mobilitat electroforètica és elevada, la qual cosa indica un pes molecular baix. Podem considerar, doncs, que els components φ_1 i φ_3 tenen característiques intermèdies entre les protamines i les histones quant a llur composició d'aminoàcids. Quant al pes molecular, semblen acostar-se més a les protamines que no pas a les histones.

D'altra banda, la significació dels components de tipus somàtic φ_{2a} i φ_{2b} no és clara. Com veurem més endavant, en l'esperma dels equinoderms hi ha components anàlegs als somàtics en gran quantitat. En el músculo és possible que aquests components també representin un residu de les histones somàtiques que no són totalment eliminades durant l'espermioïgenesis. Aquesta interpretació donaria un pes addicional pel fet de considerar l'espermioïgenesis del músculo com un cas intermedi entre el primitiu dels equinoderms i el més avançat dels animals amb protamines en l'esperma. De tota manera no podem excloure definitivament que en l'ejaculat del músculo, ensems amb l'esperma madura, es trobin espermàtides avançades que serien responsables de la presència d'histones somàtiques en l'esperma. Malgrat tot, l'observació de l'ejaculat al microscopi electrònic no ha permès de detectar la presència d'un nombre suficient de cèl·lules immadures.

En estudiar les proteïnes de gònades immadures hom observa una desaparició gradual dels components somàtics i un augment simultani de la proporció relativa de φ_1 i φ_3 , a mesura que progressa la diferenciació de la gònada. No ha estat detectat cap component amb característiques intermèdies entre els components somàtics i els de l'esperma. Aquests resultats contrasten aparentment amb els presentats per BLOCH¹, que suposà que el component φ_3 és un precursor del φ_1 , ja que trobà que el φ_3 resultava marcat molt abans que el φ_1 quan la biosíntesi de l'esperma tenia lloc en presència de precursors radioactius. En la discussió donarem una possible interpretació d'aquests resultats.

A la figura 2 i a la taula II presentem els resultats obtinguts amb espècies corresponents a d'altres grups de molluscs. Hom pot veure que el quitó *Cryptochiton stelleri* presenta un aspecte molt semblant al del músculo, amb alguns components de tipus somàtic i altres de migració molt més ràpida. Per contra, els cargols estudiats i el calamars contenen proteïnes molt semblants a les protamines dels peixos, amb un contingut molt elevat d'arginina.

El cas de l'*Eledone cirrosa*, un pop molt evolucionat, se separa notablement dels altres cefalòpodes. En aquest animal l'esperma té una morfologia molt especial, en forma d'hèlix. Els nuclis són insensibles a l'acció de l'àcid clorhídric. De tota manera, és possible de fer l'anàlisi d'aminoàcids amb nuclis aïllats sencers, i aleshores hom detecta una proteïna de

TAULA II

Composició en aminoàcids de les proteïnes nuclears de l'esperma de mol·luscs. Donem la composició de les proteïnes totals de l'esperma, llevat en el cas dels gasteròpodes, en el qual, per *G. divaricata* donem el component típic de l'esperma, i per *H. tuberculata*, les proteïnes totals de gònada

	Placòfor <i>Cryptochiton stelleri</i>	Bivalve <i>Mytilus edulis</i>	Gasteròpode <i>Gibbula divaricata</i> <i>Haliotis tuberculata</i>		Cefalòpode <i>Loligo forbesi</i> <i>Eledone cirrosa</i>		Peix <i>Clupeina</i>
Lys	15,5	21,3	7,2	10,7	2,6	5,1	—
His	2,8	0,6	0,2	1,2	1,8	7,0	—
Arg	34,4	19,3	53,6	25,0	61,7	5,3	67,0
Asp	3,2	2,8	0,7	5,7	2,4	4,4	—
Glu	2,0	2,8	0,9	5,6	2,9	6,2	—
Thr	4,1	4,7	2,2	4,2	1,3	3,6	—
Ser	4,2	15,0	15,0	10,5	9,9	4,9	10,6
Pro	4,4	5,7	0,2	3,2	3,1	23,6	8,2
Gly	5,0	6,2	5,5	5,4	2,0	7,3	6,7
Ala	10,3	12,8	9,9	8,8	1,7	4,7	1,6
Cys	ND	T	0,1	0	0,5	16,5	—
Met	ND	0,5	0,2	1,7	0,2	0,2	—
Val	6,8	2,6	2,6	5,7	1,2	4,0	5,5
Ileu		1,5	0,5	3,2	1,0	2,6	—
Leu	4,5	2,4	0,7	4,3	1,4	3,0	—
Tyr	1,2	0,6	0,3	2,8	5,8	1,0	—
Phe	1,5	0,7	0,2	1,6	0,7	0,8	—

la composició donada a la taula I. L'elevat contingut en cisteïna recorda les protamines dels mamífers, però la baixa basicitat, el contingut en histidina i la forta quantitat de prolina indiquen característiques úniques en l'esperma d'aquest organisme. Podem dir provisionalment que una morfologia particular de l'esperma indica una composició també particular.

Equinoderms

En el cas dels equinoderms, tal com ha estat descrit en publicacions anteriors ^{7, 8, 9}, les proteïnes de l'esperma són molt semblants a les que es troben en els teixits somàtics. En els equinoideus, asteroideus i ofiü-

roideus estudiats, únicament els components més bàsics són reemplaçats per altres, típics de l'esperma. Així, en el cas de l'erició de mar *Arbacia lixula*, els components φ_3 , φ_{2a1} i φ_{2a2} són pràcticament idèntics als que es troben en teixits somàtics, tal com el timus de vedella. Per contra, els components φ_1 i φ_{2b} , bé que són semblants als somàtics, tenen un contingut total d'aminoàcids bàsics, sobretot d'arginina, sensiblement més elevat. Durant l'espermioïgènesi, aquests components substitueixen llurs equivalents somàtics. És interessant d'observar que en les primeres fases d'aquesta substitució el component φ_1 de l'espermàtide conté grups de serina fosforilats. Aquest comportament és semblant al detectat per Dixon i col·laboradors en l'espermioïgènesi del salmó⁶, analogia que pot tenir una significació filogenètica.

En els holoturioides estudiats, *Holothuria tubulosa* i *Holothuria polii*, hom ha trobat el tipus d'espermioïgènesi més simple. Efectivament, en aquests organismes es conserven en l'esperma tots cinc components de les histones somàtiques. L'única diferència en les proteïnes bàsiques consisteix en el fet que en l'esperma es troba un component addicional, de mobilitat electroforètica elevada, que actualment tenim en estudi. El seu comportament indica que es tracta d'una proteïna de baix pes molecular, semblant al de les protamines. De tota manera és evident que la seva significació és molt diferent, ja que en aquest cas aquesta proteïna és un component menor que acompanya les histones de tipus somàtic, presents en l'esperma. Una altra particularitat d'aquest organisme consisteix en el fet que la quantitat de proteïnes àcides que es troben en el nucli és molt elevada, fins i tot en l'esperma, on es troben en quantitats del mateix ordre de magnitud que les histones, mentre que el corrent és que la quantitat de proteïnes àcides que hi ha en el nucli sigui molt més reduïda que la quantitat d'histones.

Aquestes característiques ens han impulsat a estudiar amb més detall l'espermioïgènesi d'aquest organisme, ja que aparentment ens trobem davant un dels casos més simples d'espermioïgènesi. Amb aquesta finalitat ha estat observat el desenvolupament de les gònades masculines utilitzant tècniques microscòpiques. A les figures 3 i 4 hom pot veure espermatides i una esperma madura. Hom pot veure que el desenvolupament de la cèl·lula va acompanyat per una disminució de la quantitat de citoplasma, típica del procés d'espermioïgènesi. En el nucli, la cromatina es va condensant, però sense arribar als graus de condensació elevats típics d'altres espècies. En aquest organisme la condensació en l'esperma madura s'atura en unes fibres granulars de 200 Å de diàmetre. Aquesta manca de condensació ens indica també una espermioïgènesi poc evolucionada.

DISCUSSIÓ

Els resultats presentats mostren clarament que hi ha una variabilitat considerable en les proteïnes de l'esperma. De fet, podem establir una gradació en el seu grau d'especialització. En un extrem podem posar el cas més simple d'*Holothuria*, organisme en què els canvis que tenen lloc en l'espermio gensi són limitats, ja que es conserven totes les histones somàtiques i únicament apareix un nou component menor en l'esperma. En un altre extrem podem situar els peixos i alguns altres vertebrats, juntament amb els molluscs cefalòpodes i possiblement gasteròpodes. En aquests animals desapareixen totalment les proteïnes somàtiques, alhora que apareixen les protamines típiques de l'esperma. Els altres equinoderms i molluscs presenten situacions intermèdies. És interessant de fer notar que la presència de protamines, en alguns peixos i molluscs, constitueix un cas de convergència evolutiva molt notable, i això porta a preguntar quina pot ésser la funció biològica de les proteïnes de l'esperma; és a dir, quina significació pot tenir l'augment de basicitat de les proteïnes de l'esperma, augment que sembla ésser afavorit per l'evolució. BLOCH² ha considerat aquesta qüestió, tot discutint les següents funcions possibles per a aquestes proteïnes:

- condensació del nucli per tal d'aconseguir una eficàcia hidrodinàmica més gran.
- inhibició de la transcripció.
- protecció, terme no gaire ben definit.
- manteniment dels nuclis de la línia germinal en un estat de totipotència a fi de permetre la diferenciació cel·lular.
- influència sobre el desenvolupament de l'embrió.

En la seva discussió, BLOCH conclou que no hi ha prou dades per a permetre de decidir entre aquestes i d'altres possibilitats. De tota manera, aquesta enumeració permet de dissenyar alguns experiments per a poder resoldre aquest problema. En particular hom pot suposar que la protecció consisteix a dificultar la ruptura de la cadena d'ADN per hidròlisi. Aleshores el paper de les proteïnes de l'esperma seria d'impedir l'accés de molècules d'aigua, possibilitat que es pot determinar experimentalment per difracció de raigs X i altres tècniques experimentals. En aquest sentit considerem que l'estudi detallat de les proteïnes d'*Holothuria* ofereix un interès especial ja que en aquest cas les transformacions durant l'espermio gensi semblen mínimes i poden donar la clau de llur

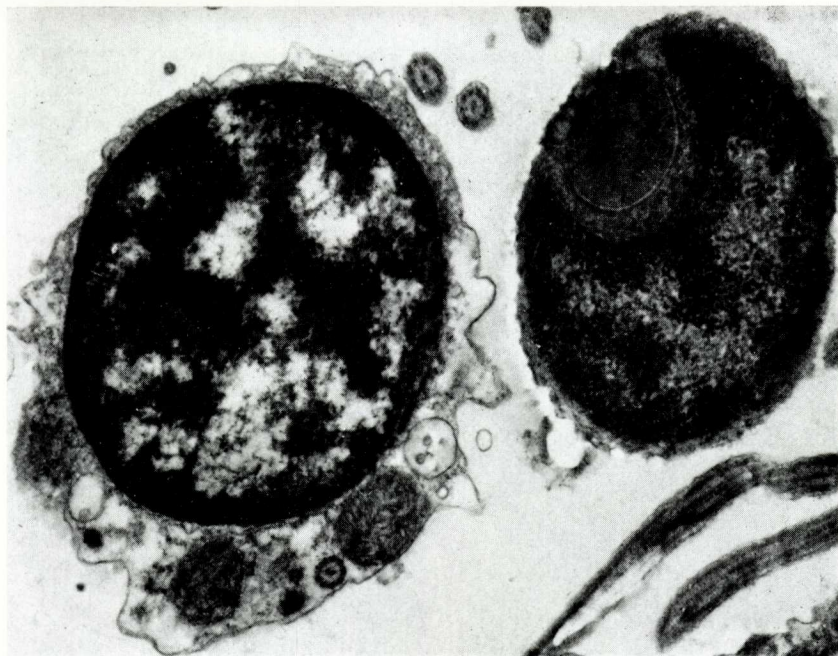


FIG. 3. — Espermatides d'*Holothuria tubulosa*. ($\times 25\ 000$)

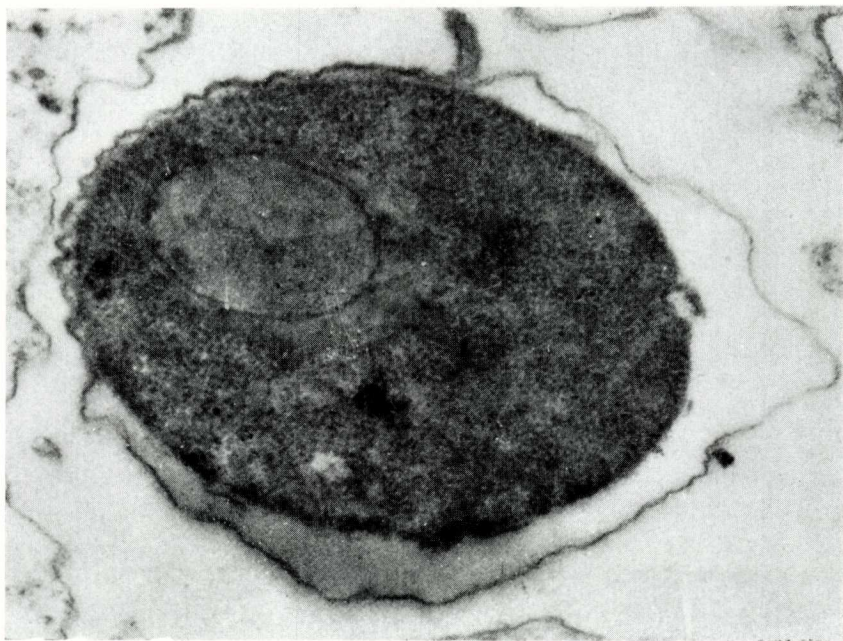


FIG. 4. — Esperma d'*Holothuria tubulosa*. ($\times 39\ 000$)

significació biològica. L'aparició d'un component addicional podria servir per a recobrir completament la cromatina i eliminar altres proteïnes (efectors, desrepressors, etc.), que es trobarien associades en el nucli somàtic per raó del procés de diferenciació, i aconseguirien així una protecció més perfecta de l'ADN davant els agents degradants.

Finalment, es pot plantejar el problema de l'origen genètic d'aquestes proteïnes de l'esperma. En una publicació anterior fou discutit el possible paper de la duplicació dels gens en aquest procés³. Actualment, en conèixer-se la seqüència d'aminoàcids del component F2b de les histones⁴, hom pot suggerir també un altre possible origen per a aquestes proteïnes. En efecte: la composició d'aminoàcids de la fracció ϕ_3 de *M. edulis* és molt semblant a la dels primers trenta-cinc aminoàcids de l'extrem N-terminal del component F2b. Això fa pensar en la possibilitat que algunes proteïnes de l'esperma s'originin per ruptura de components somàtics, la qual cosa podria tenir lloc al nivell del gen o podria ésser un procés de tipus metabòlic per acció d'un enzim específic. Aquestes possibilitats mereixen d'ésser estudiades i són un dels objectius actuals del nostre laboratori.

NOTA. — Ens plau agrair al doctor L. Otzet i a la senyoreta J. Colom llur valuosa col·laboració en les anàlisis d'aminoàcids. També agraïm al doctor L. Vallmitjana i als seus col·laboradors del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona la realització de les micrografies electròniques (figs. 3 i 4).

BIBLIOGRAFIA

1. BLOCH, D. P. — *Cytochemistry of the Histones*. «Protoplasmatologia», Springer-Verlag, Wien-New York, V-3d, 1: 56 (1966).
2. BLOCH, D. P. — *A Catalog of Sperm Histones*. «Genetics», Supl. 1: 61-93 (1969).
3. COZCOLLUELA, C. — Tesi doctoral, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona (1971).
4. IWAI, K., ISHIKAWA, K. i HAYASHI, T. — *Sequence and interaction sites of slightly lysine-rich histone*. «Nature», 226: 1056-58 (1970).
5. JOHNS, E. W. — *Studies on histone fractions from calf thymus*. «Biochem. J.», 92: 55-59 (1964).
6. MARUSHIGE, K., LING, V. i DIXON, G. H. — *Phosphorylation of Chromosomal Basic Proteins in Maturing Trout Testis*. «J. Biol. Chem.», 244: 5953-5958 (1969).
7. PALAU, J., RUIZ-CARRILLO, A. i SUBIRANA, J. A. — *Histones from Sperm of the Sea Urchin "Arbacia lixula"*. «Eur. J. Biochem.», 7: 209-213 (1969).
8. RUIZ-CARRILLO, A. — Tesi doctoral, Facultat de Ciències, Universitat de Barcelona (1970).
9. SUBIRANA, J. A. i PALAU, J. — *Histone-like Proteins from the Sperm of Echinoderms*. «Exptl. Cell. Res.», 53: 471-477 (1968).

DISCUSSIÓ

Dr. R. MARGALEF

La fisiologia de l'esperma està en funció de la fisiologia de l'òvul; han evolucionat junts i, per tant, hom pot pensar que existeix una relació entre la proporció d'aquestes proteïnes específiques, diguem somàtiques, i la mida de l'òvul. Hom podria postular una certa relació entre la seqüència observada i una seqüència en la mida de l'òvul, és a dir en la massa de l'òvul que no és nucli. Això pressuposaria una hipòtesi més concreta de la funció que podrien tenir aquestes proteïnes.

Hi hauria una manera indirecta d'adonar-se'n estudiant comparativament espècies d'un mateix grup taxonòmic i que tinguin òvuls de mida molt diversa; per exemple, estrelles de mar o gasteròpodes.

Dr. J. A. SUBIRANA

Això no ho ha considerat, però a ell se li acut un exemple, i és que la granota, que té un ou força gros, té unes proteïnes de tipus histona en l'esperma, és a dir semblants a les dels eriçons, que tenen ous petits.

Un exemple més clar que no sembla haver-hi relació entre la mida dels ous i les proteïnes de l'esperma es troba en les estrelles de mar. *Echinaster sepositus* té uns ous de més d'un mil·límetre, i, per contrast, *Astropecten aurantiacus* els té força petits, i les histones de l'esperma són iguals, idèntiques en aquests dos animals.

Sr. R. BARGALLÓ

El que sembla interessant per part de l'espermatozoide és la possibilitat i la necessitat de condensar el nucli. La majoria dels microgàmets presenten nuclis allargassats d'acord amb les exigències hidrodinàmiques d'aquest tipus de cèl·lula. Per contra, en les imatges que han estat mostrades, corresponents a *Holothuria*, els nuclis són més aviat esfèrics i petits.

També ha pogut observar que durant la formació dels filaments cromosòmics el nucli és petit i la seva fibrilització és escassa. Això és el contrari del que passa en els molluscs, on, per exemple, els gasteròpodes disposen de filaments molt llargs, rectes i més o menys polaritzats pel

corpuscle basal o pel mateix axonema, la qual cosa es correspon amb una morfologia allargada del nucli. Potser per això la polarització de les fibres nucleals i el consegüent estirament del nucli podrien ésser les funcions de les proteïnes en qüestió.

Dr. J. A. SUBIRANA

És a dir que, amb altres paraules, l'esperma necessita moure's molt i, per tant, necessita un bon disseny hidrodinàmic. El seu nucli, molt petit, potser li dóna avantatges per a desplaçar-se. És una possibilitat que cal considerar.

Dr. J. PALAU

Evidentment, es fa difícil d'entendre la presència d'histones i de protamines tan diferents, si tenen, com sembla, una funció similar. Cal considerar, per exemple, la diversitat d'histones que es troben en l'esperma d'espècies molt relacionades dins la classe dels equinoideus. Una explicació, alternativa de la que aquí s'ha apuntat, seria de considerar l'existència d'un gran nombre de gens que codifiquin una gran varietat d'histones. En els teixits somàtics la major part d'aquests gens estarien reprimits, i només serien expressats els que corresponen a les histones tipus somàtic. D'altra banda, al llarg de l'espermioïgènesi, el procés de repressió d'aquests gens podria quedar modificat segons les peculiaritats específiques de cada espècie, i, com a conseqüència, se sintetitzarien histones germinals específiques de l'espècie. Naturalment, aquesta interpretació vindria afavorida si la funció de les histones i de les protamines dins l'esperma fos altament inespecífica, com seria el cas d'una funció d'empaquetament de l'ADN.

Dr. J. A. SUBIRANA

De tota manera, el que resta clar és que hi ha una tendència evolutiva a eliminar les histones de les cèl·lules germinals i acumular una proteïna molt més bàsica fins a l'extrem a què ha arribat l'evolució de les protamines amb un 70 % d'arginina. És a dir, ¿per què hi ha aquesta tendència, quin avantatge dóna a l'esperma?... Això no resta clar. Per exemple, des d'un punt de vista hidrodinàmic les holotúries tenen espermatozoides amb un nucli una mica més gros que altres espermes, però també és un nucli força petit, i, en aquest cas, sense massa canvis bioquímics.