

TESI DOCTORAL

Fina Martínez Soler

Nucleomorfogènesi espermàtica i condensació de la cromatina dels Cefalòpodes *Sepia officinalis* i *Octopus vulgaris*.
Altres models.

Juliol, 2007

Nucleomorfogènesi espermàtica i condensació de la cromatina
dels Cefalòpodes *Sepia officinalis* i *Octopus vulgaris*.
Altres models.

Memoria presentada per FINA MARTÍNEZ SOLER per accedir al Grau de Doctor en Ciències Biològiques. El treball ha estat realitzar sota la direcció dels Doctors MANEL CHIVA ROYO i PEPITA GIMÉNEZ BONAFÉ, al Departament de Ciències Fisiològiques II, de la Facultat de Medicina, Campus Bellvitge. Part del treball s'ha dut a terme a la Universitat de Victoria (British Columbia, CANADA).

L'autora:

Fina Martínez Soler

Vist-i-plau:

Dr. Manel Chiva Royo
(Director)

Pepita Giménez Bonafé
(Co-directora)

SÍMBOLS I ABREVIATURES

aa	amionàcid
AA	Àcid acètic
ACN	Acetonitril
BSA	Serumalbúmina bovina
EDTA	Àcid Etilendiamintetraacètic
AU-PAGE	Gel de Poliacrilamida/acètic/urea
AUT-PAGE	Gel de poliacrilamida/acètic/urea/Tritó
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
µg	microgram
µl	microlitre
nm	nanòmetres
cDNA	DNA complementari
mRNA	RNA missatger
RNA	Àcid ribonucleic
DNA	Àcid desoxiribonucleic
MET	Microscopia electrònica de Transmissió
pb	Parells de bases
PCA	Àcid perclòric
PSA	Persulfat ammoniac
rpm	Revolucions per minut
SDS	Dodecil sulfat sòdic
TCA	Àcid tricloracètic
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
UV	Llum ultraviolat
V	Veure

ÍNDEX DE CONTINGUTS

PART I: Espermatogènesi dels Cefalòpodes

RESUM.....	21
I. INTRODUCCIÓ.....	25
I.1.- Primers estudis sobre l'espermatogènesi dels Cefalòpodes per microscopia òptica.....	25
I.2.- Estudis posteriors a nivell d'ultraestructura amb el microscopi electrònic.....	32
I.2.1.- Decàpodes.....	32
I.2.2.- Octòpodes.....	42
I.2.3.- Nautiloideus.....	57
I.3.- Estudis de les proteïnes nuclears espermiogèniques i en l'espermatozoide dels cefalòpodes.....	60
I.3.1.- Decàpodes.....	61
I.3.2.- Octòpodes.....	67
II. OBJECTIUS DEL TREBALL.....	75
III. MATERIAL I MÈTODES.....	79
III.1 Material Biològic.....	79
III.1.a.- Descripció de les espècies estudiades.	79
<i>Comportament sexual.</i>	80
<i>Descripció de l'aparell reproductor masculí.</i>	81
<i>Recol·lecció de material i dissecció en el laboratori.</i>	81
III.1.b.- Posició filogenètica de les espècies estudiades.....	86
III.2 Obtenció de nuclis espermàtics i espermatozoides: preparació de les mostres	88
III.2.1.- Inflaments del nulci espermàtic d' <i>O. vulgaris</i>	93
III.3.- Anàlisi de proteïnes.....	94
III.3.1.- Extracció de proteïnes bàsiques dels nuclis espermàtics.....	94
III.3.1.1. Extracció de les histones amb àcid acètic 35%.....	94
III.3.1.2. Extracció de les protamines amb HCl 0.4N.....	96
III.3.2.- Precipitació de proteïnes.....	97
III.3.2.1. . Precipitació amb acetona.....	97
III.3.2.2. . Precipitació amb TCA.....	98
III.3.3.- Assecat de proteïnes	99
III.3.4.- Concentració de proteïnes en dissolució.....	99
III.3.4.1.- Speedvac.....	99
III.3.4.2.- Liofilització.....	99
III.3.5.- Purificació de proteïnes mètodes cromatogràfics	100

III.3.5.1.-Cromatografia líquida d'alta resolució en fase reversa. (HLPC).....	100
III.3.6.- Mètodes electroforètics.....	101
III.3.6.1.- Gels de poliacrilamida / àcid acètic / urea (GPAU).....	101
III.3.6.2.-Gels de poliacrimalida /àcid acètic /Tritó / Urea (GPTU).....	103
III.3.6.3.- Gels de poliacrilamida / SDS (SDS-PAGE).....	105
III.3.6.4.-Anàlisi de proteïnes per electroforesi bidimensional.....	108
III.3.7.- Detecció de bandes en un gel.....	111
III.3.7.1.Tinció de gels amb Blau de Commassie	112
III.3.8. Determinació de la quantitat de proteïnes de mostres en dissolució.....	112
III.3.8.1. Absorbància de la mostra a 320nm.....	112
III.3.9.- Gènesi de d'anticossos.....	113
III.3.9.1. Precursor de la protamina de <i>Sepia</i>	113
III.3.9.1.1.Obtenció i purificació del precursor de la protamina de <i>Sepia</i>	113
III.3.9.1.2.Digestió enzimàtica del precursor de la protamina amb quimotripsina i purificació del pèptid precursor.....	114
III.3.9.1.3. Conjugació de l'antígen amb KLH	117
III.3.9.1.4 Injecció al conill.....	117
III.3.9.2 Gènesi de l'anticòs contra la histona H2A de calf thymus.	118
III.3.10.Immunodetecció de proteïnes amb anitcossos. Western Blot.....	118
III.3.11.Determinació de la composició aminoacídica d'una proteïna.....	123
III.3.12. Espectrometria de masses.....	125
III.3.13. Mètodes de microscopia.....	126
III.3.13.1. Microscopia òptica.....	126
III.3.13.1.1.Observació dels nuclis espermàtics amb el flurocrom <i>Hoechst</i>	126
III.3.13.1.2. Fixació i incusió de mostres en parafina.....	127
III.3.13.1.3. Tinció Hematoxilina-Eosina a partir de mostres parafinades.....	128
III.3.13.2. Microscopia de fluorescència. Confocal.....	130
III.3.13.3. Microscopia electrònica.....	132
III.3.13.3.1.Fixació i inclusió de mostres per a ultraestructura.....	132
III.3.13.3.2.Fixació i inclusió de mostres per a immunolocalització.....	135

IV.RESULTATS

IV.1.- <i>SEPIA OFFICINALIS</i>	143
IV.1.1-Espermogènesi de <i>Sepia officinalis</i>	143

IV.1.2.-El nucli en l'espermioogènesi de <i>Sepia</i>	145
IV.1.2a).-Visió global de l'espermioogènesi de <i>Sepia</i>	145
Microscopia òptica.....	145
Microscopia electrònica.....	148
IV.1.2b) Visió en profunditat de la condensació de la cromatina	153
IV.1.2b.1) Microscopia electrònica: fases de condensació del nucli.....	153
IV.1.2b.2) Anàlisi morfològic de la relació dels microtúbuls amb la condensació-unió a la membrana Possible paper dels microtúbuls	188
IV.1.2b.3) Figura-resum de les estructures de la cromatina.....	191
IV.1.2b.4) Proteïnes que interaccionen amb la cromatina en el decurs de l'espermioogènesi de <i>Sepia</i>	194
IV.1.2b.4.1) Estudi de les proteïnes de la gònada de <i>S.officinalis</i> en diferents graus de maduresa sexual.....	195
<i>Estudi histològic i comtatge dels tipus cel.lulars</i> <i>espermioogènics en les gònades de <u>S.officinalis</u></i> <i>en diferent grau de maduresa</i>	198
IV.1.2b.4.2) Estudi per electroforesi bidimensional de les histones de la gònada versus histones somàtiques de <i>Sepia</i> . Comparació amb les histones gonadals de <i>Sepioloa</i>	202
IV.1.2b.4.3) Generació dels antiserums contra el precursor de la protamina i la histona H2A.	209
<i>Antiserum contra la molècula precursora de</i> <i>la protamina</i>	209
<i>Antiserum contra la histona H2A</i>	209
IV.1.2b.4.4) Westerns Blots	210
Precursor de la protamina.....	210
Histona H2A.....	211
IV.1.2b.4.5) Microscopia electrònica. anticossos anti-histona H2A i precursor de la protamina.....	213
Aparició del precursor de la protamina en el nucli espermàtic.....	213
Desaparició de la histona H2A del nucli espermàtic	220
IV.1.2b.4.6) Microscopia òptica	226
Precursor de la protamina.....	226
Histona H2A.....	228

<u>Resum del significat dels resultats obtinguts en aquest apartat IV.1.2b.4)</u>	231
IV.2.- OCTOPUS VULGARIS	235
<i>IV.2.1.- Plantejament</i>	235
IV.2.2.- El nucli en l'espermioènesi d'<i>O. vulgaris</i>	236
IV.2.2a) Microscopia electrònica.....	236
IV.2.2b) Figura-resum de les estructures que adopta la cromatina espermioègica d' <i>Octopus vulgaris</i>	260
IV.2.2c) Relació amb els microtúbuls i amb la membrana nuclear.....	262
IV.2.2d) Evidència de l'existència de la MNP: Inflaments al microscopi òptic i observació dels nuclis inflats al Microscopi electrònic.	265
IV.2.2e) Proposta d'un model de com esta organitzada la cromatina en el nucli espermàtic d' <i>Octopus</i>	277
<u>Resum de les observacions i resultats obtinguts en aquest apartat IV.2.2</u>	278
 V.- DISCUSSIÓ	
V.1. El Nucli espermàtic dels Decàpodes— <i>Octopus</i> —Eledone	283
V.2. Com s'arriba en el decurs de l'espermioènesi a aquestes estructures en l'espermatozoide madur?	286
V.2a) Condensació de la cromatina.....	287
V.2b) Disposició de microtúbuls perinuclears.....	289
V.2c) Relació entre cromatina condensant i microtúbuls perinuclears	290
V.2d) Altres relacions cromatina-membrana	291
V.3. Condensació de la cromatina i transicions de proteïnes associades al DNA en el decurs de l'espermioènesi	292
V.4. Models en el tipus de transició de proteïnes associades a l'ADN durant l'espermioènesi.	297
 VI.-CONCLUSIONS	
	305

ÍNDEX DE CONTINGUTS

PART II: LA PROTEÏNA PHI 0.

<u>I.INTRODUCCIÓ</u>	311
I.1.- SNBPs: Grups principals.....	311
I.2.- Les PLs són proteïnes relacionades amb la histona H1.....	311
I.3.- SNBPs de l'equinoderm <i>Holothuria tubulosa</i> . La proteïna phi0.....	315
<u>II. OBJECTIUS</u>	319
<u>III.MATERIAL I MÈTODES</u>	
III.1.- Material Biològic.....	323
III.1.1.- Descripció de les espècies estudiades.....	323
III.2.-Anàlisi d'ARN.....	326
III.2.1.- Extracció d'ARN a partir de teixit.....	326
III.2.2.-Purificació d'mARN.....	327
III.3.- RACE: <i>Rapid Amplificatiion of cDNA Ends</i>	327
III.3.1.- Obtenció de cDNA <i>RACE ready</i>	329
III.3.2.- Reacció de <i>RACE-PCR</i>	329
III.4.- Mètodes electroforètics.....	331
III.4.1.-Gels d'agarosa.....	331
III.4.2.-Gels de formaldehid.....	333
<u>IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ</u>	
IV.1.ANTECEDENTS.....	337
Proteïnes nuclears de l'espermatozoide d' <i>Holothúria tubulosa</i>	337
IV.2. HIPÒTESI DE TREBALL.....	339
IV.3. RESULTATS.....	340
IV.3a) cDNA de la phi0. RACE.	341
<u>V.CONCLUSIONS</u>	347
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	351

ÍNDEX DE FIGURES

PART I: ESPERMATOGÈNESI DELS CEFALÒPODES

I.INTRODUCCIÓ

Fig. I.1.....	25
Fig. I.2.....	27
Fig. I.3.....	29
Fig. I.4.....	30
Fig. I.5.....	31
Fig. I.6.....	33
Fig. I.7.....	35
Fig. I.8.....	36
Fig. I.9.....	38
Fig. I.10.....	41
Fig. I.11.....	43
Fig. I.12.....	44
Fig. I.13.....	45
Fig. I.14.....	47
Fig. I.15.....	48
Fig. I.16.....	50
Fig. I.17.....	51
Fig. I.18.....	52
Fig. I.19.....	53
Fig. I.20.....	55
Fig. I.21.....	56
Fig. I.22.....	59
Fig. I.23.....	63
Fig. I.24.....	63
Fig. I.25.....	65
Fig. I.26.....	66
Fig. I.27.....	68
Fig. I.28.....	69
Fig. I.29.....	71

III. MATERIAL I MÈTODES

Fig.III.1.....	82
Fig.III.2.....	84
Fig.III.3.....	86
Fig.III.4.....	87
Fig.III.5.....	91
Fig.III.6.....	92
Fig.III.7.....	95
Fig.III.8.....	96
Fig.III.9.....	110
Fig.III.10.....	115
Fig.III.11.....	116

IV. RESULTATS

Fig.IV.1.....	146
Fig.IV.2.....	147
Fig.IV.3.....	149
Fig.IV.4.....	150
Fig.IV.5.....	152
Fig.IV.6.....	155
Fig.IV.7.....	156
Fig.IV.8.....	158
Fig.IV.9.....	159
Fig.IV.10.....	161
Fig.IV.11.....	163
Fig.IV.12.....	164, 165
Fig.IV.13.....	166
Fig.IV.14.....	167
Fig.IV.15.....	168
Fig.IV.16.....	169, 170
Fig.IV.17.....	174
Fig.IV.18.....	175
Fig.IV.19.....	177
Fig.IV.20.....	179
Fig.IV.21.....	180
Fig.IV.22.....	182
Fig.IV.23.....	183
Fig.IV.24.....	184

Fig.IV.25.....	185
Fig.IV.26.....	186
Fig.IV.27.....	190
Fig.IV.28.....	192
Fig.IV.29.....	194
Fig.IV.30.....	196
Fig.IV.31.....	199
Fig.IV.32.....	200
Fig.IV.33.....	201
Fig.IV.34.....	203
Fig.IV.35.....	204
Fig.IV.36.....	205
Fig.IV.37.....	211
Fig.IV.38.....	212
Fig.IV.39.....	216
Fig.IV.40.....	218
Fig.IV.41.....	219
Fig.IV.42.....	222
Fig.IV.43.....	224
Fig.IV.44.....	225
Fig.IV.45.....	227
Fig.IV.46.....	228
Fig.IV.47.....	229
Fig.IV.48.....	232
Fig.IV.49.....	238
Fig.IV.50.....	240
Fig.IV.51.....	241
Fig.IV.52.....	242
Fig.IV.53.....	244
Fig.IV.54.....	246
Fig.IV.55.....	248
Fig.IV.56.....	249
Fig.IV.57.....	251
Fig.IV.58.....	252
Fig.IV.59.....	254
Fig.IV.60.....	256
Fig.IV.61.....	258
Fig.IV.62.....	258
Fig.IV.63.....	260
Fig.IV.64.....	263

Fig.IV.65.....	264
Fig.IV.66.....	266
Fig.IV.67.....	268
Fig.IV.68.....	269
Fig.IV.69.....	270
Fig.IV.70.....	271
Fig.IV.71.....	272
Fig.IV.72.....	275
Fig.IV.73.....	277

V. DISCUSSIÓ

Fig.V.1.....	284
Fig.V.2.....	285
Fig.V.3.....	286
Fig.V.4.....	295
Fig.V.5.....	298
Fig.V.6.....	299

PART II: LA PROTEÏNA PHI 0

I.INTRODUCCIÓ

Fig.II.I.1.....	312
Fig.II.I.2.....	313
Fig.II.I.3.....	314
Fig.II.I.4.....	316

III. MATERIAL I MÈTODES

Fig.II.III.1.....	325
Fig.II.III.2.....	328

IV.RESULTATS I DISCUSSIÓ

Fig.II.IV.1.....	338
Fig.II.IV.2.....	339
Fig.II.IV.3.....	341
Fig.II.IV.4.....	342
Fig.II.IV.5.....	343

ÍNDEX DE TAULES

PART I: ESPERMATOGÈNESI DELS CEFALÒPODES

I.INTRODUCCIÓ

Taula I.1.....	70
----------------	----

III. MATERIAL I MÈTODES

Taula III.1.....	103
Taula III.2.....	104
Taula III.3.....	107

IV.RESULTATS

Taula IV.1.....	208
-----------------	-----

PART II: LA PROTEÏNA PHI 0

III. MATERIAL I MÈTODES

Taula II.III.1.....	330
Taula II.III.2.....	330

RESUM DEL TREBALL

RESUM

Aquest treball consta de dues parts: en la primera, hem estudiat les causes o factors principals que intervenen en la nucleomorfogènesi espermàtica de dues espècies de Cefalòpodes: el Decàpode *Sepia officinalis* i l'Octòpode *Octopus vulgaris*. En la segona part, hem fet uns experiments concrets sobre l'anàlisi i estructura del gen la proteïna phi0, una proteïna específica de l'espermatozoide de l'Equinoderm *Holothuria tubulosa*.

Hem fet una reexaminació exhaustiva del procés de condensació de la cromatina i nucleomorfogènesi espermàtica de *Sepia officinalis* i *Octopus vulgaris* (Apts. IV.1.2 i IV.2.2 respectivament).

Hem estudiat i caracteritzat amb detall les proteïnes de la gònada de *Sepia officinalis* (Apt. IV.1.2b.4), i també mitjançant la generació d'anticossos específics contra dues d'aquestes proteïnes gonadals, hem dut a terme un estudi immunològic que ens ha permès saber quina és la composició de proteïnes de les diferents estructures que adopta la cromatina espermiofènica. Aquests estudis ens han ajudat a comprendre millor la transició proteica que experimenta el nucli de l'espermàtida durant l'espermiofènesi de *Sepia officinalis*.

Per altra banda amb l'objectiu principal de conèixer la naturalesa del tipus d'unió que hem observat en *Octopus vulgaris* entre la MNP (Matriu Nuclear Polar) i la cromatina, hem iniciat uns estudis preliminars per estudiar-ne les seves propietats fisico-químiques. (Apt. IV.2.2d)

Finalment, en la discussió d'aquesta primera part, fem un anàlisi de quina ha estat l'evolució del nucli espermàtic en els Cefalòpodes: *Sepia officinalis* → *Octopus vulgaris* → *Eledone*.

En la segona part del treball, amb l'objectiu de corroborar si la proteïna phi0 d'*Holothuria tubulosa* té el seu propi gen o bé és resultat d'una modificació post-traducciona del gen de la histona H1, hem analitzat l'ARNm de phi0 mitjançant la tècnica de RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*).
