



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas  
Area Biología Celular y Molecular

## **Relación entre la estructura de la cromatina paterna y el inicio de la replicación de ADN en erizos de mar.**



CLAUDIO ANDRES IRIBARREN PAREDES  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2012

Profesor Guía: Marcia Puchi Thiele  
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

# Resumen

En la formación del pronúcleo masculino erizos de mar, uno de los cambios estructurales a nivel de la cromatina espermática involucra la degradación de las histonas específicas del espermatozoide (SpH) y su reemplazo por histonas maternas en estado de clivaje (CS). Este proceso de degradación es catalizado por una cistein proteasa denominada SpH-proteasa. En este contexto, un hecho sin resolver era si SpH-proteasa puede degradar las histonas paternas mientras forman parte de las estructuras nucleosomales o requiere una previa desorganización de los nucleosomas espermáticos para que las histonas sean degradadas, además de identificar que factor media el desplazamiento de las SpH.

En la presente tesis, se determinó que la proteína MP62 posee las características estructurales básicas tipo nucleoplasmina (core nucleoplasmina, segmentos aminoácidos ácidos, sitios fosforilables por CDKs) y es la responsable de la desorganización de nucleosomas espermáticos.

Anticuerpos policlonales específicos dirigidos contra his-MP62 generados en nuestro laboratorio, reconocen una sola proteína en huevos no fecundados (HNF) y cigotos obtenidos a distintos tiempos post fecundación. Mediante inmunolocalización, MP62 evidenció estar presente en el núcleo de HNF y post fecundación, movilizarse inmediatamente hacia el pronúcleo masculino colocalizando con la cromatina espermática y posteriormente con el material genético de los embriones tempranos.

Mediante experimentos de desorganización de nucleosomas espermáticos y formación del pronúcleo masculino *in vitro* e inmunodepleción de MP62, se determinó que la falta de esta proteína impide la desorganización de los nucleosomas y la descondensación de los nucleos espermáticos. Además se determinó que las histonas espermáticas no son

desplazadas desde la cromatina. Esto se puede explicar debido a que MP62 puede, efectivamente interaccionar selectivamente con el core de histonas espermáticas. *In vivo*, se demostró que la microinyección de anticuerpos policlonales anti MP62 enlentece la descondensación de núcleo espermático y retarda la primera división celular.

Con respecto a la regulación de esta chaperona, mediante el uso de inhibidores de CDKs, se demostró que la descondensación del núcleo espermático depende de la actividad quinasa de complejos CDK, se impide la fosforilación de MP62 *in vivo*, no produciéndose la descondensación de la cromatina ni el recambio de las histonas espermáticas.

Junto con la remodelación de la cromatina paterna, se deben reclutar los complejos de pre replicación de ADN (pre RC) a la cromatina tal de marcarla como competente a la replicación. En este contexto se determinó que *cdc6*, *cdt1*, *cdc6*, *geminine*, *MCM3* y *RPA70* están ensamblados en la cromatina materna pre fecundación, manteniéndose unidos en la cromatina del cigoto post fecundación. Mediante ensayos *in vitro* de formación del pronúcleo masculino se determinó que es necesario que la cromatina paterna esté descondensada para la deposición de *cdt1*, uno de los componentes fundamentales de los pre-RC.

Nuestros resultados demostraron por primera vez la presencia de una proteína con características estructurales y funcionales como nucleoplasmina en la especie de erizo de mar *Tetrapygus niger*. Esta proteína participa en la descondensación de la cromatina paterna que ocurre inmediatamente post fecundación, desplaza las histonas espermáticas para un apropiado desarrollo embrionario y su actividad es dependiente de la actividad CDK1 y 2 post fecundación.