

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCION**



**SpH CISTEIN-PROTEASA DE CIGOTO DE ERIZO DE MAR:  
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y SELECTIVIDAD  
PROTEOLITICA**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA A LA ESCUELA DE GRADUADOS  
DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

POR

**VIOLETA MORIN MUÑOZ**

**Tutor: Dra. María Imschenetzky**

2002

## RESUMEN

En erizo de mar *Tetrapygus niger* se ha postulado que una cistein-proteasa cataliza la degradación del set completo de histonas espermatozoide – específicas (SpH) post-fecundación (SpH-proteasa). Esta enzima degrada en forma selectiva las histonas espermatozoide-específicas (SpH), dejando intactas las variantes de histonas presentes en óvulos (variantes CS). Esta proteasa se encuentra en forma inactiva en óvulos sin fecundar y es activada post-fecundación. Exhibe una actividad máxima a pH 8.0, lo que se correlaciona muy bien con el pH intracelular post-fecundación en este sistema. Su inhibición *in vivo* impide la degradación de SpH que ocurre normalmente asociada a la remodelación del pronúcleo masculino. En base a este conjunto de antecedentes se ha postulado que esta proteasa es responsable de la degradación de SpH, que ocurre durante la remodelación de cromatina espermática post-fecundación.

La presente Tesis fue dividida en tres partes. En la primera parte, se describe la purificación a homogeneidad de SpH-proteasa desde cigoto cinco minutos post-fecundación. La enzima purificada fue secuenciada, obteniéndose la secuencia parcial de 15 residuos de aminoácidos a partir de su extremo N-terminal. A partir de la secuencia N-terminal obtenida fue sintetizado un péptido acoplado a hemocianina, que fue utilizado para generar un anticuerpo policlonal contra la SpH-proteasa. Este anticuerpo demostró ser específico para SpH-proteasa e inhibir su actividad catalítica, permitió además detectar esta enzima por inmunolocalización. Los experimentos de inmunolocalización demostraron que la SpH-proteasa presentaba una ubicación nuclear en óvulo sin fecundar y en cigoto. Durante la mitosis se

localizaba en los centrómeros, retomando la ubicación intranuclear durante la fase S del segundo ciclo celular embrionario.

En una segunda etapa de la presente Tesis se investigó el mecanismo que confería la selectividad de acción catalítica a esta SpH-proteasa, que degradaba *in vitro* a las SpH, dejando las variantes CS intactas. Para ello, se tomó como base, los resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, que demostraban que las variantes de histonas CS se encontraban extensamente poli(ADPribosiladas) *in vitro*, mientras que las histonas SpH no lo estaban. Para determinar si los polímeros de ADP-ribosa unidos a las variantes CS las protegían de la degradación, éstos fueron hidrolizados desde las variantes CS por tratamiento con fosfodiesterasa unida covalentemente a Sepharosa 4B. Luego, las variantes CS libres del polímero, fueron utilizadas como sustrato de la SpH-proteasa, observándose que éstas fueron degradadas. Se demostró adicionalmente que la SpH-proteasa no fue inhibida por polímeros de ADP-ribosa aislados. Consecuentemente, solo las variantes CS unidas covalentemente a polímeros de ADP-ribosa fueron protegidas de la acción degradativa de la proteasa. Paralelamente a estos resultados, se investigó si la presencia de fosforilaciones en las histonas espermatozoide-específicas (SpH), constituye un mecanismo de protección contra la acción degradativa de la SpH-proteasa. Para ello SpH1 y SpH2B fueron fosforiladas *in vitro* con caseína quinasa II. Los resultados indican que solo las formas fosforiladas de SpH1 y SpH2B permanecen intactas después de su incubación en presencia de SpH-proteasa. Consecuentemente se concluyó que la fosforilación protegía a las histonas SpH de proteólisis. Este resultado es consistente con la existencia de nucleosomas híbridos en etapas intermedias de remodelación de cromatina

espermática, formados por variantes de histonas CS e histonas SpH2A y SpH2B que se encuentran fosforiladas.

En la tercera parte de esta Tesis se describen los experimentos realizados con el fin de clonar el gen que codifica para esta SpH-proteasa. La estrategia para este objetivo fue diseñada sobre la base de la secuencia parcial de 15 residuos de aminoácidos de la SpH-proteasa en su extremo N terminal. Se construyeron oligonucleótidos degenerados que permitieron generar una sonda de 150 p.b., obtenida a partir de ADN genómico de erizo de mar *Tetrapygus niger* y otra sonda de 400 p.b., obtenida a partir de ADN proveniente de una genoteca de ADNc de óvulo no fecundado del erizo de mar *Sphaerechinus granularis*. El análisis en la base de datos indicó que ambas sondas presentaban homología con cistein-proteasa de otros orígenes. Paralelamente fue construida una genoteca de ADNc a partir de los ARN mensajeros de óvulo sin fecundar y cigotos en estado de blástula y pluteus de erizo de mar *Tetrapygus niger*. Del análisis primario y secundario de la genoteca de ADNc, utilizando las sondas de 150 p.b. y 400 p.b, se obtuvieron clones positivos. Actualmente, está en curso la etapa final de esta parte de la tesis.