

ÍNDEX GENERAL

RESUM	1
I-INTRODUCCIÓ	3
1. LES HISTONES I EL NUCLEOSOMA	5
2. PROTEÏNES ESPERMÀTIQUES BÀSIQUES	11
2.1 Les protamines	11
2.1.1 La protamina de <i>Dicentrarchus labrax</i>	12
2.2 Proteïnes espermàtiques bàsiques d'amfibis (<i>Rana, Xenopus i Bufo</i>)	12
2.3 Proteïnes espermàtiques bàsiques d'equinoderms	13
2.3.1 PEB a asteroïdeus, equinoïdeus i holoturoïdeus	13
2.3.2 La proteïna ϕ_0 d' <i>Holothuria tubulosa</i>	14
3. LA REMODELACIÓ DE LA CROMATINA ESPERMÀTICA DESPRÉS DE LA FECUNDACIÓ	16
3.1 Remodelació de la cromatina espermàtica en amfibis	17
3.2 Remodelació de la cromatina espermàtica en equinoderms	19
4. LA NUCLEOPLASMINA DE <i>Xenopus laevis</i>	20
4.1 Seqüència de la nucleoplasmina	21
4.2 Conformació de la nucleoplasmina	23
5. FUNCIONS DE LA NUCLEOPLASMINA	26
5.1 Xaperones moleculars	26
5.2 Organització de la cromatina	29
5.2.1 Acoblament de nucleosomes	29
5.2.2 Remodelació de la cromatina espermàtica	31
5.3 Transport nuclear	31
5.4 Activació de la transcripció	33
6. PROTEÏNES NUCLEOPLASMIN-LIKE	35
6.1 Proteïnes <i>NP-like</i> a vertebrats	35
6.2 Proteïnes <i>NP-like</i> a invertebrats	37
7. PLANTEJAMENT I OBJECTIUS DE LA TESI	39

II-MATERIALS I MÈTODES	41
1. OBTENCIÓ DE PROTEÏNES	43
1.1 Obtenció de nucleoplasmina nativa de <i>Xenopus laevis</i>	43
1.2 Obtenció de nucleoplasmina recombinant	45
1.2.1 Plasmidis d'expressió pET	45
1.2.2 Expressió de nucleoplasmina recombinant en <i>E. coli</i>	47
1.3 Obtenció de proteïnes d'oòcits i espermatozoides d' <i>Echinaster sepositus</i>	50
1.4 Obtenció de protamina de <i>Dicentrarchus labrax</i>	52
1.5 Obtenció de proteïna ϕ_0 d' <i>Holothuria tubulosa</i>	52
1.6 Obtenció d'histones d'eritròcits de pollastre	52
1.6.1 Obtenció de nucleosomes	52
1.6.2 Obtenció d'octàmers d'histones nucleosòmiques	55
1.6.3 Obtenció d'octàmers d'histones nucleosòmiques tripsinitzades	55
2. TÈCNiques CROMATOGRÀFIQUES PER PURIFICAR PROTEÏNES	56
2.1 Cromatografia d'hidroxiapatita	57
2.2 Cromatografia de fenil sefarosa (interaccions hidrofòbiques)	58
2.3 Cromatografia d'intercanvi iònic	58
2.4 Cromatografia de quelació amb níquel	59
2.5 Cromatografia de filtració en gel	63
2.6 Cromatografia líquida d'alta resolució	64
3. MÈTODES GENERALS PER L'ESTUDI DE PROTEÏNES	64
3.1 Electroforesis en gels de poliàcrilamida (PAGE)	64
3.1.1 Electroforesi d' SDS-poliàcrilamida (SDS-PAGE)	65
3.1.2 Electroforesi nativa (PAGE nativa)	67
3.1.3 Tinció amb blau de Coomassie	69
3.1.4 Tinció amb plata	70
3.1.5 Electroforesi preparativa	71
3.2 Precipitació de proteïnes	73
3.2.1 Precipitació amb àcid tricloroacètic (TCA)	73
3.2.2 Precipitació amb sulfat amònic	74
3.3 Quantificació de proteïnes	76
3.3.1 Mètode de Bradford	76
3.3.2 Mètode de Lowry	77
3.3.3 Quantificació mitjançant l'absorbància a 276 nm	78
3.3.4 Quantificació mitjançant l'absorbància a 230 nm	80
3.3.5 Quantificació de proteïnes mitjançant SDS-PAGE	80
3.4 Altres mètodes	81

3.4.1 Diàlisi de proteïnes	81
3.4.2 Concentració de proteïnes per ultrafiltració	81
3.4.3 Determinació de la composició aminoacídica de proteïnes	83
3.4.4 Gradients de sacarosa	84
4. MÈTODES D'OBTENCIÓ I MANIPULACIÓ DE DNA	85
4.1 Preparació de DNA plasmídic	85
4.1.1 Preparació de DNA plasmídic (<i>miniprep</i>)	85
4.1.2 Preparació de DNA plasmídic (<i>midiprep</i>)	85
4.2 Electroforesi de DNA en gels d'agarosa.....	85
4.3 Mutagènesi dirigida	87
4.4 Seqüenciació de DNA.....	88
5. MÈTODES PER A L'ESTUDI DE LES CISTEÏNES	90
5.1 Agents reductors	90
5.2 Alquilació amb iodoacetamida	91
5.3 Quantificació de grups tiol lliures.....	91
6. TÈCNiques IMMUNOLÒGIQUES	94
6.1 Obtenció d'anticossos policlonals anti-NP	94
6.1.1 Preparació de l'antigen i immunització	94
6.1.2 Extracció d'anticossos	95
6.1.3 Purificació d'anticossos per immunoafinitat.....	96
6.2 Transferència de proteïnes (<i>western-blot</i>) i immunodetecció	98
6.3 Quantificació d'anticossos (ELISA).....	103
7. TÈCNiques BIOFÍSiques.....	104
7.1 Dicroisme circular (DC)	104
7.2 Ultracentrifugació analítica (UA)	106
7.2.1 Velocitat de sedimentació.....	107
7.2.2 Equilibri de sedimentació	109
7.3 Ressonància magnètica nuclear (RMN).....	110
8. ANÀLISI DE LA CAPACITAT DESCONDENSADORA DE CROMATINA ESPERMÀTICA.....	111
9. MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA	111
9.1 Tècniques de tinció negativa.....	112
9.2 Obtenció de cristalls bidimensionals	113
10. TÈCNiques CRISTAL·LOGRÀFIQUES	114
10.1 Cristal·lització per difusió de vapor	114

10.2 Sembra de cristalls	116
10.3 Tinció de cristalls de proteïna	116
10.4 Congelació de cristalls	116
10.5 Difracció de raigs X	117
III. RESULTATS	119
1. OBTENCIÓ DE NUCLEOPLASMINA DE <i>Xenopus laevis</i>	121
2. OBTENCIÓ DE NUCLEOPLASMINA RECOMBINANT EXPRESSADA EN <i>Escherichia coli</i>	122
2.1 Fomes recombinants de nucleoplasmina	122
2.1.1 Expressió de proteïnes	125
2.1.2 Formes truncades	125
2.2 Purificació de formes sense etiqueta d'histidines	127
2.2.1 Purificació de r-NP	127
2.2.2 Purificació de r-NP142	129
2.2.3 Purificació de r-NP121	131
2.3 Purificació de formes amb etiqueta d'histidines	132
2.3.1 Formes amb histidines a l'extrem amino terminal	132
2.3.2 Formes amb histidines a l'extrem carboxil terminal	133
2.3.2.1 Purificació per elució amb imidazole	133
2.3.2.2 Estratègies de purificació de pentàmers i monòmers de r-NP142+His C-t	137
2.3.2.3 Purificació per elució per canvi de pH	138
3. OBTENCIÓ DE PROTEÏNES D'<i>Echinaster sepositus</i>	140
3.1 Obtenció de proteïnes espermàtiques bàsiques	140
3.2 Obtenció de proteïnes de l'òocit	140
3.3 Anàlisi funcional de la proteïna majoritària d' <i>E. sepositus</i>	142
4. OBTENCIÓ D'ANTICOSSOS ANTINUCLEOPLASMINA	144
4.1 Obtenció i purificació d'anticossos	144
4.2 Immunodetecció de proteïnes <i>nucleoplasmin-like</i>	149
5. ESTUDI DE LES CISTEÏNES DE LA NUCLEOPLASMINA	152
5.1 Mutagènesi dirigida de les cisteïnes	152
5.2 Estudis del mutant r-NP142 C45S	155
5.2.1 Estudis d'estabilitat tèrmica en diferents tampons	155
5.2.2 Proves de reducció	155

5.2.3 Estudis conformacionals	157
5.2.4 Estudis funcionals	157
5.3 Quantificació de grups sulfhidril lliures.....	158
6. ESTUDIS CONFORMACIONALS	158
6.1 Anàlisi de l'estructura secundària per dicroisme circular	158
6.1.1 Dicroisme circular de diferents formes de nucleoplasmina recombinant.....	158
6.1.2 Dicroisme circular de r-NP142 C45S	162
6.1.3 Dicroisme circular de complexos amb protamina.....	164
6.1.3.1 Dicroisme circular de r-NP+protamina.....	164
6.1.3.2 Dicroisme circular de r-NP121+protamina.....	166
6.2 Anàlisi de la capacitat de pentamerització	168
6.2.1 PAGE nativa.....	169
6.2.2 Velocitat de sedimentació (ultracentrifugació analítica)	170
7. INTERACCIÓ DE LA NUCLEOPLASMINA AMB HISTONES	174
7.1 Interacció de r-NP amb histones natives	174
7.1.1 Velocitat de sedimentació r-NP/histones natives.....	175
7.1.2 Gradients de sacarosa r-NP/histones natives	177
7.1.3 Equilibri de sedimentació r-NP/histones natives	179
7.2 Interacció de r-NP amb histones tripsinitzades	181
7.2.1 Velocitat de sedimentació r-NP/histones tripsinitzades.....	181
7.2.2 Gradients de sacarosa r-NP/histones tripsinitzades	183
7.2.3 Equilibri de sedimentació r-NP/histones tripsinitzades	185
7.3 Interacció de r-NP121 amb histones natives	185
7.3.1 Velocitat de sedimentació r-NP121/histones natives.....	185
8. MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA	187
8.1 Estudis de les proteïnes en solució.....	187
8.1.1 Estudis de r-NP121 i r-NP121+ His N-t	187
8.1.2 Estudis de la proteïna <i>NP-like</i> d' <i>Echinaster sepositus</i>	189
8.2 Obtenció de cristalls bidimensionals.....	190
9. CRISTAL·LITZACIÓ DE r-NP121	192
9.1 Condicions de cristal·lització	192
9.2 Determinació de l'origen proteic dels cristalls.....	195
9.3 Proves fetes amb els cristalls de r-NP121	197
9.3.1 Macrosembra de cristalls.....	197
9.3.2 Congelació de cristalls.....	198
9.3.3 Proves al sincrotró	198

10. ESTUDIS ESTRUCTURALS DE LA PROTEÏNA ϕ_0	
D' <i>Holothuria tubulosa</i>	199
10.1 Proves de cristal·lització de ϕ_0	199
10.2 Proves de cristal·lització de complexos de ϕ_0 i oligonucleòtids.....	202
10.3 Dicroisme circular de ϕ_0 en presència de TFE	204
10.4 Ressonància magnètica nuclear de ϕ_0	206
IV-DISCUSSIÓ	211
1. Caracterització de nucleoplasmines recombinants	213
1.1 Estabilitat de les diferents formes de NP	213
1.2 El paper de les cisteïnes en la pentamerització de la NP	214
1.3 Conformació de la nucleoplasmina.....	215
2. Interacció de la NP amb les histones del core nucleosòmic	217
2.1 Implicacions dels trams carregats de la NP i les histones.....	218
3. Què és una proteïna <i>nucleoplasmin-like</i> (NP-like) ?	220
4. Estudis estructurals sobre la proteïna ϕ_0.	222
V-CONCLUSIONS	225
APÈNDIX	229
A. Medis de cultiu i antibiòtics.....	231
B. Inhibidors de proteases.....	232
C. Nomenclatura dels aminoàcids.....	233
D Desplaçaments químics dels aminoàcids (RMN)	234
BIBLIOGRAFIA	235

FIGURES

Fig. I.1	El nucleosoma.....	6
Fig. I.2	Models d'empaquetament de la cromatina.....	7
Fig. I.3	Estructura secundària de les histones nucleosòmiques.....	8
Fig. I.4	Estructura cristal·logràfica del nucleosoma.....	9
Fig. I.5	Acoblament de nucleosomes mitjançant CAF-1.....	10
Fig. I.6	Les protamines de <i>D. labrax</i> i <i>B. japonicus</i>	13
Fig. I.7	Seqüència nucleotídica i aminoacídica de la proteïna ϕ_0	15
Fig. I.8	Remodelació de la cromatina espermàtica a <i>X. laevis</i>	18
Fig. I.9	Comparació de l'estructura primària de la NP dels clons de Bürglin i Dingwall.....	21
Fig. I.10	Seqüència nucleotídica i aminoacídica de la NP de Bürglin.....	22
Fig. I.11	Estructura cristal·logràfica de la nucleoplasmina <i>core</i>	24
Fig. I.12	Estructura secundària de la NP <i>core</i> i comparació de seqüències aminoacídiques similars a la NP.....	25
Fig. I.13	Xaperones nuclears.....	27
Fig. I.14	Acoblament de nucleosomes.....	30
Fig. I.15	Senyals de localització nuclear.....	33
Fig. I.16	Comparació de l'estructura dels pentàmers de la NP i la dNLP.....	38
Fig. II.1	Plasmidis pET per a l'expressió de proteïnes en <i>E. coli</i>	46
Fig. II.2	Expressió de proteïna recombinant en <i>E. coli</i>	49
Fig. II.3	Components d'un sistema cromatogràfic.....	56
Fig. II.4	Interacció de l'etiqueta d'histidines amb el níquel.....	60
Fig. II.5	Comparació de l'estructura de l'imidazole i la histidina.....	60
Fig. II.6	Electroforesi preparativa.....	72
Fig. II.7	Concentradors.....	82
Fig. II.8	Agents reductors.....	90
Fig. II.9	Iodoacetamida.....	91
Fig. II.10	Estructura del DTNB.....	92
Fig. II.11	Preparació de l'antigen.....	95
Fig. II.12	Electrotransferència (Western-blot).....	100
Fig. II.13	Ultracentrifugació analítica.....	107
Fig. II.14	Velocitat de sedimentació i equilibri de sedimentació.....	109
Fig. II.15	Tinció negativa: tècnica de la gota i tècnica de la mica.....	113
Fig. II.16	Obtenció de cristalls bidimensionals.....	114
Fig. II.17	Cristal·lització per difusió de vapor.....	115
Fig. III.1	Purificació de nucleoplasmina de <i>X. laevis</i>	121
Fig. III.2	Formes de nucleoplasmina recombinant.....	123
Fig. III.3	Expressió de nucleoplasmina a <i>E. coli</i> . Extractes obtinguts durant el processament dels pèl·lets bacterians.....	125
Fig. III.4	Formes truncades de nucleoplasmina.....	126

Fig. III.5	Purificació de r-NP	128
Fig. III.6	Purificació de r-NP142	130
Fig. III.7	Purificació de r-NP121	131
Fig. III.8	Purificació de r-NP142+His N-t	132
Fig. III.9	Purificació de r-NP142+His C-t	134
Fig. III.10	Inestabilitat de r-NP142+ His C-t. Purificació en columna de níquel per elució amb imidazole	135
Fig. III.11	Influència de l'imidazole en la monomerització	136
Fig. III.12	Electroforesi preparativa	138
Fig. III.13	Cromatografia de níquel (elució per canvis de pH)	139
Fig. III.14	PEB d' <i>E. sepositus</i>	140
Fig. III.15	Proteïnes de l'òocit d' <i>E. sepositus</i>	141
Fig. III.16	Assaig de descondensació de nuclis espermàtics de <i>D. labrax</i> amb la proteïna majoritària d'òocits d' <i>E. sepositus</i>	143
Fig. III.17	Purificació d'anticossos anti-r-NP121 en ous de gallina	144
Fig. III.18	Transferència Western (utilitzant l'extracte cru d'anticossos de gallina)	145
Fig. III.19	Precipitació d'anticossos amb sulfat amònic	147
Fig. III.20	Purificació d'anticossos per columna d'afinitat	148
Fig. III.21	Anticòs secundari antigallina	149
Fig. III.22	Transferència Western (variants de NP)	150
Fig. III.23	Transferència Western de diferents extractes termoestables d'òocits	151
Fig. III.24	Mutagènesi dirigida de Cys	153
Fig. III.25	Posició de les Cys en l'estructura cristal·logràfica de la NP	154
Fig. III.26	Influència del DTT en la pentamerització	156
Fig. III.27	Influència del DTT en els agregats de NP	156
Fig. III.28	Incubacions de r-NP142 C45S amb nuclis espermàtics de <i>D. labrax</i>	157
Fig. III.29	Espectres de dicroisme circular	160
Fig. III.30	Descomposició d'espectres de DC de r-NP142 i r-NP121 amb presència d'etiquetes d'histidines	161
Fig. III.31	Dicroisme circular de r-NP142 C45S	162
Fig. III.32	Dicroisme circular de r-NP142 C45S (descomposició d'espectres)	163
Fig. III.33	Dicroisme circular de complexos r-NP/protamina	166
Fig. III.34	Dicroisme circular de complexos r-NP121/protamina	168
Fig. III.35	Pentamerització (PAGE nativa)	169
Fig. III.36	Velocitat de sedimentació (ultracentrifugació analítica)	171
Fig. III.37	Pentamerització (velocitat de sedimentació)	173
Fig. III.38	Models conformacionals	174
Fig. III.39	Estequiometria d'histones natives/nucleoplasmina	176
Fig. III.40	Velocitat de sedimentació d'histones natives i tripsinitzades	177
Fig. III.41	Gradients de sacarosa d'histones natives (HN) + r-NP	179
Fig. III.42	Equilibri de sedimentació	181
Fig. III.43	Estequiometria d'histones tripsinitzades/nucleoplasmina	182
Fig. III.44	Gradients de sacaraosa d'histones tripsinitzades (HT) + r-NP	184
Fig. III.45	Estequiometria d'histones natives/r-NP121	186
Fig. III.46	r-NP121 vista al microscopi electrònic de transmissió	188

Fig. III.47 Proteïna majoritària dels oòcits d' <i>E. sepositus</i> vista al microscopi electrònic de transmissió.....	190
Fig. III.48 Cristalls bidimensionals.....	191
Fig. III.49 Cristalls de r-NP121	194
Fig. III.50 Tinció de cristalls de lisozim	196
Fig. III.51 Fotografia de raigs X de cristalls de r-NP121	197
Fig. III.52 Proteïna ϕ_0	200
Fig. III.53 Tinció de gelatines de ϕ_0	201
Fig. III.54 Complexos de ϕ_0 i oligonucleòtids	203
Fig. III.55 Dicroisme circular de ϕ_0 en TFE.....	205
Fig. III.56 RMN de ϕ_0 (espectres monodimensionals).....	207
Fig. III.57 RMN de ϕ_0 (espectres bidimensionals).....	209
Fig. IV.1 Models d'interacció de la nucleoplasmina amb les histones del nucli del nucleosoma	219

PROTOCOLS

Protocol 1. Obtenció de nucleoplasmina de <i>Xenopus laevis</i>	44
Protocol 2. Obtenció de bacteris competents	47
Protocol 3. Transformació d' <i>E. coli</i>	48
Protocol 4. Processament de pèl·lets bacterians i obtenció d'extractes enriquits en nucleoplasmina	50
Protocol 5. Extracció de proteïnes espermàtiques bàsiques.....	51
Protocol 6. Obtenció de nucleosomes d'eritròcits de pollastre.....	53
Protocol 7. Purificació d'octàmers d'histones nucleosòmiques	55
Protocol 8. Digestió d'histones nucleosòmiques amb tripsina immobilitzada	56
Protocol 9. Cromatografia d'hidroxipatita.....	57
Protocol 10. Cromatografia de fenilsefarsa.....	58
Protocol 11. Cromatografia d'intercanvi aniònic	59
Protocol 12. Cromatografia de quelació amb níquel en condicions natives (columna).....	61
Protocol 13. Cromatografia de quelació amb níquel en condicions natives (tub).....	61
Protocol 14. Cromatografia de quelació amb níquel (elució per canvis de pH)	62
Protocol 15. Cromatografia de quelació amb níquel en condicions desnaturalitzants i reductores	63
Protocol 16. Estocs PAGE	67
Protocol 17. Tinció amb plata	71
Protocol 18. Precipitació amb TCA	74
Protocol 19. Precipitació amb sulfat amònic	75

Protocol 20. Mètode de Bradford.....	77
Protocol 21. Mètode de Lowry	78
Protocol 22. Hidròlisi de proteïnes	83
Protocol 23. Disseny d'oligonucleòtids.....	87
Protocol 24. Mutagènesi dirigida.....	88
Protocol 25. Seqüenciació de DNA per fluorescència.....	89
Protocol 26. Alquilació de proteïnes amb iodoacetamida.....	91
Protocol 27. Quantificació de Cys (mètode 1).....	93
Protocol 28. Quantificació de Cys (mètode 2).....	93
Protocol 29. Extracció d'anticossos d'ous de gallina.....	96
Protocol 30. Preparació de la matriu d'immunoafinitat.....	97
Protocol 31. Purificació d'anticossos per immunoafinitat.....	98
Protocol 32. Electrotransferència (Western-blot)	99
Protocol 33. Immunodetecció	101
Protocol 34. Detecció per quimioluminiscència	102
Protocol 35. Tinció de membranes	103
Protocol 36. ELISA.....	103

TAULES

Taula I.1	Xaperones moleculars.....	26
Taula II.1	Tampons usats en l'obtenció de nucleoplasmina de <i>X. laevis</i>	44
Taula II.2	Tampons per l'obtenció de nucleosomes	54
Taula II.3	Percentatges d'acrilamida	65
Taula II.4	SDS-PAGE.....	68
Taula II.5	PAGE nativa.....	68
Taula II.6	Tampó de cubeta	68
Taula II.7	Tampó de mostres.....	69
Taula II.8	Condicions d'electroforesi	69
Taula II.9	Tenyidor i destenyidor	70
Taula II.10	Percentatge de saturació de sulfat amònic a 0 °C	75
Taula II.11	Concentradors per ultrafiltració.....	82
Taula II.12	Percentatges d'agarosa	86
Taula II.13	Electroforesi en gels d'agarosa	86
Taula II.14	Tampons per a incubació de membrana (Western-blot).....	100
Taula II.15	Mètodes per descomposició d'espectre de DC	106
Taula II.16	Volums de referència per UA.....	109
Taula III.1	Paràmetres fisicoquímics de diferents formes de nucleoplasmina recombinant.....	124
Taula III.2	Codons de baixa freqüència d'ús a <i>E. coli</i>	127
Taula III.3	Rendiments de purificació de nucleoplasmina	131

Taula III.4	Anàlisi d'aminoàcids.....	142
Taula III.5	Paràmetres utilitzats per als assajos de dicroisme circular	159
Taula III.6	Descomposició d'espectres de DC.....	161
Taula III.7	Dicroisme circular de r-NP/protamina	165
Taula III.8	Dicroisme circular de r-NP121/protamina	167
Taula III.9	Paràmetres utilitzats en els experiments de velocitat de sedimentació.....	170
Taula III.10	Coeficients de sedimentació	173
Taula III.11	Condicions utilitzades en els gradients de sacarosa	178
Taula III.12	Condicions d'equilibri de sedimentació.....	180
Taula III.13	Condicions de cristal·lització de r-NP121	194
Taula III.14	Reactius per a la cristal·lització de la proteïna ϕ_0	201
Taula III.15	Condicions d'obtenció de gelatines de proteïna ϕ_0	202
Taula III.16	Oligonucleòtids utilitzats per als complexos amb ϕ_0	203
Taula III.17	Desplaçaments químics per alguns dels protons l·ligats a carboni alfa de la ϕ_0	210
Taula A.1	Medis de cultiu per a <i>E. coli</i>	231
Taula A.2	Preparació d'estocs d'antibiòtics	232
Taula A.3	Preparació d'estocs d'inhibidors de proteases	232
Taula A.4	Nomenclatura dels aminoàcids.....	233
Taula A.5	Desplaçaments químics per ^1H	234