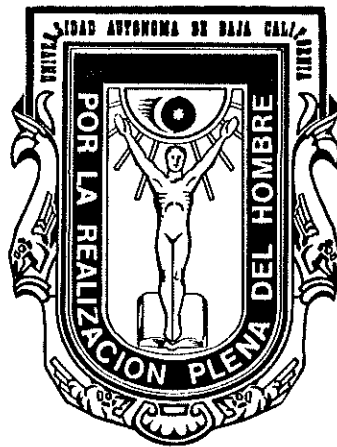


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS



**PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA
LISINA ACROSOMAL DEL CARACOL**
Norrisia norrisi (Gasterópoda).

TESIS PROFESIONAL
Que como requisito parcial para
obtener el Título de
B I O L O G O
Presenta
LUIS FERNANDO PLENGE TELLECHEA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS

**PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA LISINA ACROSOMAL
DEL CARACOL *Norrisia norrisi* (gasterópoda).**

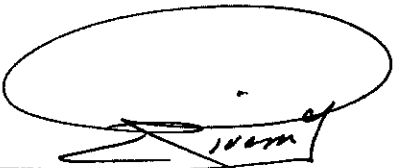
TESIS PROFESIONAL
QUE PRESENTA

LUIS FERNANDO PLENGE TELLECHEA

APROBADO POR


DRA. MEREDITH GOULD CH.

Presidente


M. C. IRMA RIVERA G.

1er. Vocal


M. C. JOSE LUIS STEPHANO

Secretario

A G R A D E C I M I E N T O S

* A mis maestros José Luis Stephano y Meredith Gould por el apoyo moral y la gran participación que tuvieron para mi formación como profesionista y persona.

* A los maestros: Irma Rivera., Ernesto Campos., Gorgonio Ruiz., Marcelo Rodríguez., Carlos Márquez., Eusebio Barreto., Nahara Ayala., Miguel Carrilo., Pedro Ruiz., Evarista Arellano ., Carlos Márquez., Cesar Migoni., José Delgadillo., Elías Torres., Olivia Tapia, por los conocimientos y el apoyo que me brindaron.

* Y a todos los que de alguna manera participaron en mi formación.

* A mi padrino de generación, M.C. Alejandro Martínez por su apoyo durante mi carrera.

* A las secretarías de la Facultad por todo su apoyo: Blanquita, Lulú, Noemí, Bertha y Mayra.

* A todo el personal que labora en la Facultad de Ciencias.

* A mi almamater, la Universidad Autónoma de Baja California.

DEDICATORIA

- * A DIOS NUESTRO SEÑOR POR TODO.

- * A MIS PADRES, ENRIQUE PLENCE Y MAGALI TELLECHEA POR TODO EL AMOR, EDUCACION Y APOYO QUE ME BRINDARON.

- * A MIS HERMANOS CON MUCHO AMOR, ELSA, PATY Y ENRIQUE.

- * A MIS ABUELITAS, MARIA Y GULLERMINA POR SU AMOR Y CONFIANZA.

- * A MI ADORADA TIA CHILOLITA, POR TODO SU AMOR Y DEDICACION HACIA NOSOTROS.

- * A MI CUÑADO JOAQUIN, POR SU GRAN APOYO, CARIÑO Y CONFIANZA.

- * A MIS AMIGOS, JOAQUIN (KIN), DENNY, RAY, ENRIQUE (GORDO), JANDO, MARCOS, JUDITH, JERRY, ROLANDO, GERARDO.

- * A MI JUDIH ACEVES, POR TODO SU APOYO Y AMOR DURANTE MI CARRERA.

- * A TODA MI FAMILIA Y AMIGOS.

GRACIAS

RESUMEN

Los óvulos de muchos animales están rodeados de una ó más capas por las que tiene que penetrar el espermatozoide para poder fertilizar al ovocito, los cuales tienen que estar provistos de algún mecanismo para poder atravesar dichas capas. En este trabajo se elaboró la purificación y la caracterización de (los) componente (s) que posee el espermatozoide del caracol Norrissi norrisi en su acrosoma para penetrar la capa vitelina de sus ovocitos. Se obtuvo un extracto con lisina acrosomal por congelado (-70°C) y descongelado de una suspensión de espermatozoides, los cuales fueron centrifugados y posteriormente recobrado el sobrenadante que contiene la lisina acrosomal. Dicho extracto presentó una actividad in vitro de disolución de las capas vitelinas de sus ovocitos en un 100 % dentro de 4-10 seg. El extracto crudo fue purificado en una columna de cromatografía por filtración, utilizando Sephadex G-100. Se obtuvieron fracciones de lisina con actividad in vitro detectadas por espectrofotometría a 280 nm. Se determinó el patrón de bandas protéicas y la pureza de la lisina purificada por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y sin SDS, obteniendose tres bandas de 12.9, 16.6 y 20.4 kD. Se determinó que la lisina disuelve las capas vitelinas por un mecanismo no-enzimático, corriendo mezclas de lisina purificada con capas vitelinas disueltas en geles de electroforesis con SDS: las capas disueltas presentaron las mismas bandas que las capas intactas. Se realizó el ensayo de Schiff (PAS) para determinar la presencia de carbohidratos en la lisina, los resultados indicaron que la lisina no contiene carbohidratos detectables por el método.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	3
METODOLOGIA	6
RESULTADOS	12
DISCUSION	26
CONCLUSIONES	30
RECOMENDACIONES	31
BIBLIOGRAFIA	32

I N T R O D U C C I O N

Los óvulos de muchos animales están rodeados por una o más capas a través de las cuales tiene que pasar el espermatozoide para llevar a cabo la fecundación. Las capas de los óvulos de los cefalópodos, insectos y peces (excluyendo a lampreas) poseen pequeños orificios preformados llamados micrópilos, por los cuales los espermatozoides pueden fecundar al ovocito una vez que han encontrado dicha estructura (Austin, 1968). Pero en general los moluscos, anélidos, crustáceos, equinodermos, hemicordados, tunicados, anfibios, reptiles y mamíferos carecen de dichas estructuras especializadas y sus espermatozoides tienen que abrirse camino a través de las capas que rodean al ovocito (Austin, 1968). Generalmente se ha pensado que el camino es ayudado por un agente lítico que porta el espermatozoide conocido como lisina (Hoshi, 1985).

La lisina se encuentra en la vesícula acrosomal en la parte anterior del espermatozoide. Cuando este tiene contacto con la capa externa del ovocito dicha vesícula se abre por exocitosis, liberando una porción suficiente de lisina que disuelve una senda a través de las capas permitiendo así la penetración del espermatozoide hacia la membrana plasmática del óvulo (Hoshi, 1985).

La lisina puede ser simplemente definida como un agente lítico que porta el espermatozoide que le permite abrirse camino a través de las capas que rodean al ovocito sin considerar su mecanismo de acción, localización o almacenamiento (Hoshi, 1985).

Entre los invertebrados marinos que poseen capa vitelina en sus óvulos se encuentran los moluscos, en los cuales sus

espermatozoides poseen una lisina muy potente (revisado por Hoshi, 1985, ver Antecedentes). En general poco se conoce sobre el componente (o componentes) de las lisinas, así como de su mecanismo de acción. En este trabajo se realizó un estudio para lograr identificar los componentes y determinar el mecanismo de acción de la lisina acrosomal de un molusco gasterópodo: Norrisia norrisi.

A N T E C E D E N T E S

Los primeros estudios realizados con lisinas fueron hechos por Schenk (1875, citado por Hoshi, 1985), donde observó la dispersión de las células foliculares circundando a los óvulos de mamíferos en una suspensión de espermatozoides. La actividad proteolítica en el espermatozoide fue demostrada por vez primera en mamíferos por Yamane (1930, citado por Hoshi, 1985). Él fué también el primero en obtener un extracto de espermatozoides que pudo dispersar las envolturas de los óvulos (Yamane, 1935 a, b, citado por Hoshi, 1985). El acrosoma de los espermatozoides de mamífero contiene varias enzimas hidrolíticas, como la mezcla de hialuronidasa y la acrosina, esta última es una proteasa con actividad similar a la tripsina, presentando una marcada preferencia por los residuos de lisina y arginina. Se ha pensado que la hialuronidasa dispersa las células foliculares y la acrosina disuelve la zona pelúcida (revisado por Hoshi, 1985). Sin embargo, se ha demostrado que espermatozoides sin hialuronidasa fácilmente pueden penetrar las células foliculares (Talbot y col., 1985), y el papel de la acrosina en la penetración de la zona pelúcida todavía no está claro (Hoshi, 1985). Enzimas hidrolíticas han sido encontradas en espermatozoides de otros grupos, principalmente en las ascidias (Hoshi, 1985). Posiblemente funcionan en la penetración de las capas externas de los ovocitos (Hoshi, 1985; Lambert y Koch, 1988), pero el mecanismo puede no involucrar la hidrólisis. Por ejemplo, en Ascidia parece que una glucosidasa en la superficie del espermatozoide forma un complejo estable (sin catálisis) con

el espermatozoide unido con la capa mientras su penetración está producida por la transformación de la membrana en donde está anclada la enzima (Lambert, 1989).

En moluscos, Tyler (1939), obtuvo el agente lítico de los espermatozoides que pudo disolver las capas vitelinas de los óvulos de la lapa gigante Megathura crenulata. El encontró que el agente lítico era protéico y lo llamó "lisina de membrana del ovocito". El detectó también una lisina en extractos de espermatozoides del abulón Haliotis cracherodii. Posteriormente Heller y Raftery (1973) identificaron tres componentes proteínicos diferentes de 42, 53 y 49 kD, en la preparación de Megathura crenulata, en las cuales se presentó actividad lítica en las tres por separado sobre la capa vitelina de sus ovocitos, no se sabe de que manera específica actúa cada una por separado. También se encontró una lisina acrosomal en espermatozoides del bivalvo Mytilus (Berg, 1950; Dan, 1962; Hauschka, 1963).

En H. rufescens, extractos de lisina purificada corridos en geles de poliacrilamida con de SDS (dodecil sulfato de sodio) y 5 M de urea, han demostrado componentes protéicos de masas moleculares de 13 y 15 kD (Lewis y col., 1982), en donde la actividad lítica en la capa vitelina se presentó en la banda de 13 kD y la banda de 15 kD no presentó actividad lítica, se desconoce el papel de dicha molécula. En la caracterización de la lisina del caracol Tegula pfeifferi, se encontró que es un solo polipéptido que consta de 118 aminoácidos con una masa molecular de 13.8 kD (Haino-Fukushima y col., 1986). En la caracterización del la lisina del caracol Turbo cornutus se obtuvo una masa molecular de 18.5 kD, determinada por electroforesis en geles de

poliacrilamida con SDS (Ogawa y Haino-Fukushima, 1984). Usui y Haino-Fukushima (1991) aislaron dos componentes del acrosoma del abulón Haliotis discus, en los cuales se demostró que ninguno podía disolver la capa solo. Recientemente se encontró actividad lítica en extractos de espermatozoides de tres moluscos gasterópodos Norrisia norrisi, Astrea undosa y Haliotis rufescens y se demostró su utilidad en facilitar la microinyección de los ovocitos, encontrando también que la lisina de N. norrisi disuelve en un tiempo muy corto a las capas vitelinas de sus ovocitos en comparación con las otras dos especies (Solano-Estrada, 1991).

Se llegó a suponer que las lisinas actuaban de manera enzimática, hasta que Haino-Fukushima (1974), demostró que la acción de la lisina en el caracol Tegula pfeifferi es un mecanismo no-enzimático, siendo éste estequiométrico, en el cual solo se solubiliza a las capas vitelinas habiendo solo una interacción química entre la lisina y la capa vitelina sin romper enlaces covalentes en sus componentes. Posteriormente se encontró que las lisinas de Haliotis rufescens (Lewis y col., 1982) y Turbo cornutus (Ogawa y Haino -Fukushima, 1984) trabajan de la misma manera.

A la fecha, no hay evidencia concluyente de lisinas en invertebrados que actúen bajo un mecanismo enzimático, así como de otras biomoléculas (carbohidrato, lípido, etc.) que acompañen a los componentes protéicos de las lisinas estudiadas.

M E T O D O L O G I A

1) OBTENCION DE ORGANISMOS.

Se colectarón especímenes de N. norrisi sexualmente maduros en la playa del Punta Morro, kilómetro 103 carretera Tijuana-Ensenada, posteriormente fueron transportados en cubetas de plástico al laboratorio de reproducción animal de la Facultad de Ciencias y puestos en un acuario con filtro biológico con temperatura de 15 - 18° C.

2) LAVADO DE MATERIAL.

Toda la cristalería que se utilizó fue lavada con Alconox (Alconox Inc., New York), Cloralex 1:10 por una hora, ácido clorhídrico 1:60 por una hora, y enjuagada con agua de la llave en cada cambio, dándose una última enjuagada con agua destilada.

3) OBTENCION Y LAVADO DE GAMETOS.

Los organismos fueron sexados quebrando una pequeña parte de la concha con un desarmador y un martillo. El color verde de la gónada indica que es hembra mientras que el color blanco lechoso indica que es macho. Para obtener los gametos la gónada se cortó con un bisturí y con una pipeta Pasteur se extrajeron los gametos, cuidando de no extraer parte del tracto digestivo. Los ovocitos fueron lavados de tres a cinco veces con agua de mar fresca, filtrada y pasada por luz UV para esterilizar. Una alícuota de los espermatozoides fue revisada en el microscopio para verificar su motilidad y posteriormente fueron filtrados una o dos veces por una malla con una luz de 120 μ m y tres veces con

una luz de 60 μm , después se centrifugaron durante 5 minutos a 3,000 X g tirando el sobrenadante para eliminar restos orgánicos.

4) OBTENCION DEL EXTRACTO CON LISINA.

Una vez filtrados y lavados los espermatozoides se tomó una alícuota y se observó al microscopio de contraste de fases (American Optical) con el objetivo 100 X para verificar que no hubiesen disparado su reacción acrosomal. Nuevamente los espermatozoides fueron centrifugados a 3,000 X g durante 5 minutos para formar un paquete que luego fue resuspendido en 300 μl de agua de mar fresca y filtrada. Posteriormente se sometieron a un proceso de congelación (-70°C) y descongelación (temperatura ambiente) por tres veces, moviendo el paquete con una espátula después de cada descongelada. Posterior a ello se tomó una alícuota para verificar al microscopio de contraste de fases en objetivo 100 X que todos los espermatozoides tuvieran su reacción acrosomal. Una vez hecha la revisión (siendo esta positiva) se centrifugaron durante 30 minutos a 5.900 X g para obtener el sobrenadante que contiene al extracto con lisina. Luego se hicieron ensayos in vitro aplicando el extracto a ovocitos intactos para probar la presencia de actividad de la lisina.

5) CROMATOGRAFIA POR FILTRACION EN COLUMNA CON SEPHADEX G-100.

Se procedió a la purificación de la lisina del extracto mediante el sistema de cromatografía por filtración en columna con Sephadex G-100 (Pharmacia), la cual se colocó en una suspensión de agua de mar fresca y filtrada por el sistema

Millipore 0.22 μm (Fig.2). Las columnas utilizadas fueron de un volumen total de 25 ml (1 X 25 cm) y una de 77 ml (1.5 X 52.5 cm) (Figs. 1 A y B). El Sephadex se preparó a razón de 6 gr por cada 25 ml de volumen a ocupar. El procedimiento a seguir para la hidratación del Sephadex fue el siguiente: una vez pesado el Sephadex se colocó en un vaso de precipitado de 400 ml y se lavó 3 veces con agua de mar fresca y filtrada para eliminar partículas demasiado pequeñas, después se incubó el Sephadex en baño María durante cinco horas a 90°C , posteriormente se enjuagó con agua de mar fresca, filtrada y desgasificada por 2 veces, luego se procedió al llenado de la columna con un embudo teniendo mucho cuidado de no formar burbujas de gas, dado que estas impiden el corrido parejo de las moléculas en la columna. La columna fue calibrada con azul dextran (2,000 kD aprox.) y rojo fenol (376.4 D), se aplicó un volumen de 1.5 ml aproximadamente del extracto con lisina y 60 fracciones fueron recogidas cada una con un volumen de 2 ml aproximadamente en un colector de fracciones automático (Isco Cygnet, Lincoln, Nebraska). Una vez obtenidas las fracciones de la columna se procedió a identificar los picos de absorbancia para proteínas a 280 nm (absorbancia para aminoácidos con grupos aromáticos como tirosina y triptófano) en el espectrofotómetro.

Una vez obtenidas las fracciones del extracto con lisina de la columna se procedió a graficar los datos obtenidos en la absorbancia (eje Y) contra número de fracción (eje X), para así obtener los picos de absorbancia y poder identificar mediante el ensayo de alícuotas de los picos obtenidos con ovocitos intactos la presencia de la lisina purificada.

6) ENSAYO DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN LA COLUMNA.

Se probaron in vitro alícuotas de 2, 4, 5 y 10 μ l de las fracciones de los tres picos de absorción (no se hicieron ensayos con los valles) de la columna con una cantidad de 35 ovocitos en un volumen de 20 μ l y cada una se colocó en un portaobjetos para observar al microscopio (objetivo 10 X) la actividad lítica mediante su reacción con las capas vitelinas de los ovocitos. A ello se le tomó el tiempo desde que se agregaban las alícuotas de los picos hasta que disolvieran completamente a las capas vitelinas de los ovocitos. A todas las fracciones se les incubó desde un mínimo de 1.45 minutos.

7) DETERMINACION DE PROTEINA.

Se determinó la cantidad de proteína por el método de Lowry (Lowry y col., 1951) con el protocolo de Cooper (1977), usando albúmina de suero de bovino (BSA) como estandar.

8) ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

Se prepararon geles de poliacrilamida al 10 y 15 % de acrilamida con SDS (dodecil sulfato de sodio) y 2-mercaptoetanol por el método de Laemmli (1970). El corrido se llevó a cabo entre 50 y 70 voltios por 6 a 8 horas. Las bandas de proteína en los geles fueron teñidas con azul coomassie al 2 % en 40 % de metanol y 10 % de ácido acético. Los estándares utilizados para obtener las masas moleculares fueron: miosina (205 kD), α -galactosidasa (116 kD), fosforilasa B (97.4 kD), albúmina de suero de bovino (66 kD), albúmina de huevo (45 kD),

anhidrasa carbónica (29 kD) e insulina (5.5 kD). También se corrieron geles sin desnaturalizantes (SDS y 2 -mercaptoetanol) al 10 y 15 % de acrilamida.

9) ENSAYO DE SCHIFF (PAS) PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE CARBOHIDRATOS EN LA LISINA PURIFICADA.

Para determinar la posible presencia de carbohidratos en la lisina se utilizó la prueba del ácido peryódico de Schiff (PAS), utilizandose como soporte de la muestra papel filtro de fibra de vidrio (2.4 cm. diam., Whatman GF/A). El procedimiento a seguir fue el siguiente:

A) Las muestras se precipitaron en ácido tricloroacético (TCA) al 12 % y fueron retenidas al papel filtro por vacío utilizando el sistema Millipore.

B) Luego se dieron tres lavadas con TCA para lavar residuos en las paredes del sistema Millipore. Se sacaron los filtros con pinzas y se lavaron rápidamente tres veces en etanol al 95 %.

C) Se incubaron en el reactivo ácido peryódico por una hora (el reactivo contiene 1.2 gr de ácido peryódico, disueltos en 30 ml de agua destilada, adicionando luego 15 ml de 0.2 M de acetato de sodio, y 105 ml de etanol al 100 %).

D) Se lavaron 2 veces con etanol al 70 %, luego se colocó en el reactivo de Schiff por 30 minutos.

E) Se enjuagaron los filtros con muestra en solución para desteñir (0.5 gr de metabisulfito de sodio y 5 ml de ácido clorhídrico 1N en 95 ml de agua destilada).

F) Una vez desteñidos se lavaron con etanol al 95 % por

succión.

11

Se utilizaron como blancos filtro sin muestra, con albúmina de suero de bovino (BSA) (no contiene carbohidrato), ADN nucleasa (glucoproteína con menos del 5 % de carbihidrato) y glucógeno (carbohidrato).

10) FOTOGRAFIA.

Las fotografías fueron tomadas con una cámara de 35 mm OLYMPUS OM-100 con adaptador para el objetivo de un microscopio American Optical. La película fue T MAX 100 (blanco y negro), Kodacolor 100 ó Ektachrome 100 (transparencias).

R E S U L T A D O S .

1.- PURIFICACION DEL EXTRACTO CON LISINA.

A) CROMATOGRAFIA POR FILTRACION EN COLUMNA CON SEPHADEX G-100.

En los dos tamaños de columnas utilizados (Fig. 1 A y B) se obtuvieron tres picos de absorción (Fig. 3), pero la separación no fue muy buena en la columna chica debido a que los picos se sobrepusieron (ver Figs. 3 A y 7). Entonces se descartó la columna chica debido a que tiene menor poder de resolución para filtrar moléculas.

Los resultados de ensayos biológicos (Tabla 1) muestran que principalmente el pico número dos presentó actividad de lisina, donde se observa que al agregar mayor concentración, las capas de los ovocitos se disolvieron en menor tiempo. Observese también que la fracción 1 del pico número 1 no presenta actividad de lisina, aunque posee mayor concentración de proteína que la fracción 31, del pico número dos (Fig. 3 B), lo que demuestra que no es la concentración ni cualquier tipo de proteína la que tiene actividad de lisina.

Para corroborar este resultado se corrió otra columna grande (Fig. 3 C) y se obtuvo el mismo patrón de absorbancia, con actividad biológica principalmente en el pico número dos.

B) DETERMINACION DE PROTEINA.

La cantidad de proteína encontrada en las fracciones se puede observar en la Figura 4. La mayor cantidad de proteína se encuentra en las fracciones que corresponden al pico de absorbancia número dos. Se encontraron los mismos resultados en las tres columnas. Aunque los picos números uno y tres tienen

aproximadamente el doble y triple de absorbancia respectivamente, contienen menos cantidad de proteína (comparar Figs. 3 y 4).

C) ENSAYO DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS PICOS DE ABSORCIÓN CON OVOCITOS INTACTOS.

Los ensayos de actividad biológica fueron llevados a cabo con las fracciones obtenidas en la segunda columna corrida (Tabla I), los cuales demostraron que en el pico número dos es donde se presentó la actividad de lisina, y que cuando se agrega una mayor concentración de lisina, mayor es la rapidez con que se disuelven las capas vitelinas de los ovocitos. La lisina actúa aún a concentraciones muy bajas. Al haber una baja concentración de lisina, mayor es el tiempo de actividad de disolución de las capas vitelinas de los ovocitos. El extracto crudo con lisina que tenía una concentración más alta de proteína (10.9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, de la cual un alto porcentaje es la lisina, ver Fig. 6), alcanzando a disolver a la capa vitelina de los ovocitos solamente de 4-10 seg.

D) ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

El extracto crudo con lisina obtenido por congelado y descongelado de los espermatozoides corrido en geles de poliacrilamida al 10 % se muestra en la Figura 5. Se puede observar el gran número de proteínas presentes, además de que hay bastante proteína de baja masa molecular que corre en el frente (flecha). Para obtener una mejor resolución, se corrieron geles con 15 % de acrilamida. Los resultados se pueden ver en la Figura 6, donde se observa una mejor resolución de las bandas de

proteína con respecto al gel de 10 % de acrilamida.

El contenido protéico en los tres picos obtenidos en las columnas fue visualizado por geles de poliacrilamida con SDS. Algunas fracciones obtenidas del extracto con lisina obtenidas en la columna chica, sometidas al 10 % de acrilamida, se muestran en la Fig. 7. El pico número uno la columna chica (ver Fig. 3 A), presenta bandas de alta masa molecular (fracción 6), mientras en el pico número dos se observan bandas de alta y baja masa molecular (fracciones 18, 21 y 16) en donde las bandas de alta masa molecular son las mismas que presenta el pico número uno, evidenciando un traslape del pico número uno con el número dos. En el pico número tres (fracción 30) se observan las mismas bandas presentes en el pico número dos, pero en más baja, concentración reafirmando una superposición con el pico número dos.

Fracciones de los tres picos obtenidas utilizando la columna grande sometidas a electroforesis al 15 % de acrilamida son mostrados en la Figura 6. El pico número uno contiene proteínas de alta masa molecular (Fig. 6, fracc, 1). En el pico dos (fracciones 27 y 30), se pueden observar tres bandas principales, observese que son de baja masa molecular: 12.9, 16.6 y 20.4 kD aproximadamente. Estas fracciones presentan actividad de lisina (ver Tabla I), pero no se sabe si todas tienen actividad lítica. El pico número tres no presenta nada de bandas proteínicas, lo cual reafirma los resultados del ensayo de Lowry, donde no detectó proteína (Fig. 4). Estos resultados electroforéticos utilizando la columna grande muestran que hay una mejor purificación dado que hay un menor traslape de picos.

En los geles anteriores se utilizarón detergentes para romper enlaces débiles, y 2-mercaptoetanol para romper enlaces disulfuro, así separando a las cadenas polipeptídicas. Para determinar si la lisina existió en forma de agregado se corrieron unos geles sin desnaturalizantes. El resultado se presenta en la Figura 8 A, donde se observa que la lisina no penetró al gel (flecha a). Algunas proteínas en el extracto crudo entraron al gel presentandose una banda principal (b, Fig. 8 A) y otras fueron excluidas (c, Fig. 8 A).

Para corroborar lo anterior se corrió otro gel al 10 % de acrilamida (se aumentó el tamaño del poro) también sin desnaturalizantes (Fig. 8 B), observandose que las fracciones de lisina tampoco penetraron (flechas). Se corrió un estandar de albúmina de bovino (66 kD) el cual penetró perfectamente (Fig. 8 B). Estos resultados nos dicen que la lisina estaba en forma agregada o precipitada en la solución.

2.-CARACTERIZACION DE LA LISINA PURIFICADA.

De acuerdo a los ensayos biológicos y de purificación se sabe que la lisina es un agregado de proteína que presenta tres bandas en geles de poliacrilamida con SDS de 12.9, 16.6 y 20.4 kD (aprox.). Se hizo un ensayo para ver si contenía carbohidratos por el método del reactivo de Schiff. Los resultados que se obtuvieron son los mostrados en la Figura 9. La lisina tuvo resultado negativo, mientras que la ADN nucleasa (DNasa) que contiene menos del 5 % de carbohidratos (Moore y Stein, 1973) fue positivo. Este resultado descarta que la lisina contenga

carbohidratos.

3.-MECANISMO DE ACCION DE LA LISINA SOBRE LAS CAPAS VITELINAS DE LOS OVOCITOS.

Se preguntó si la lisina actuaba de manera enzimática o si lo hacía por otro mecanismo. Para probar lo anterior se corrió una mezcla de capas con lisina en geles de electroforesis al 15 % de acrilamida con SDS (Fig. 10). Si la lisina fuera una enzima rompería los enlaces covalentes de las proteínas de las capas vitelinas quedando convertidas en pequeños fragmentos (péptidos de baja masa molecular), los cuales aparecerían bajo las bandas originales de capas (sin lisina).

Los resultados de ambos geles con extracto crudo de lisina y lisina purificada indican que el mecanismo de acción sobre la capa vitelina de los ovocitos es no-enzimático, ya que no aparecieron bandas de péptidos de baja masa molecular abajo de las bandas de proteína originales. Se comprobó observando al microscopio que las capas vitelinas fueron disueltas por la lisina antes de agregar el amortiguador con desnaturalizantes y correr las muestras en el gel.

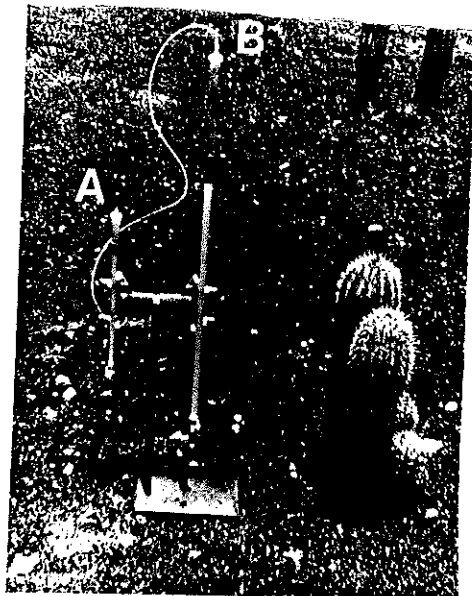


FIG. 1. COLUMNAS PARA CROMATOGRAFIA POR FILTRACION.
(A) COLUMNA CHICA. (B) COLUMNA GRANDE.

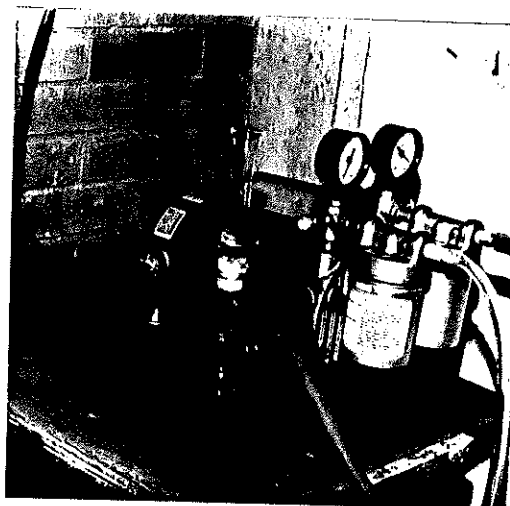
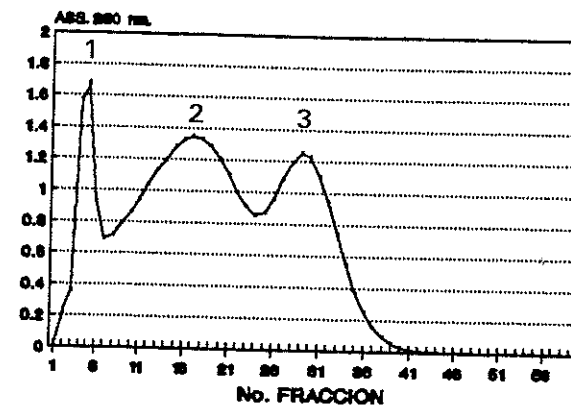
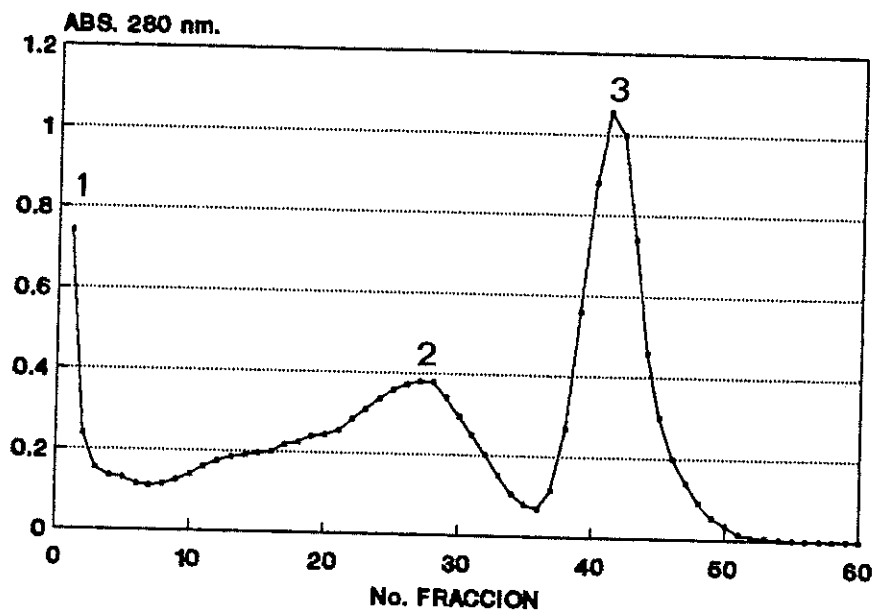


FIG. 2. SISTEMA DE FILTRACION POR VACIO "MILLIPORE"
UTILIZANDO UN FILTRO DE 0.22 μm .

A).- PRIMERA COLUMNA CORRIDA UTILIZANDO UNA COLUMNA CHICA (25 ml.)



B).- SEGUNDA COLUMNA CORRIDA, UTILIZANDO UNA COLUMNA GRANDE (115 ml.)



C).- TERCERA COLUMNA CORRIDA UTILIZANDO UNA COLUMNA GRANDE (115 ml.)

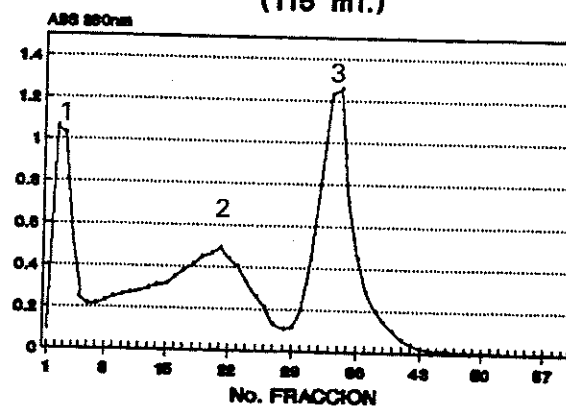


FIG.3. REPRESENTACION GRAFICA DE LAS ABSORBANCIAS DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN LAS CROMATOGRAFIAS POR FILTRACION EN COLUMNA CON SEPHADEX G-100

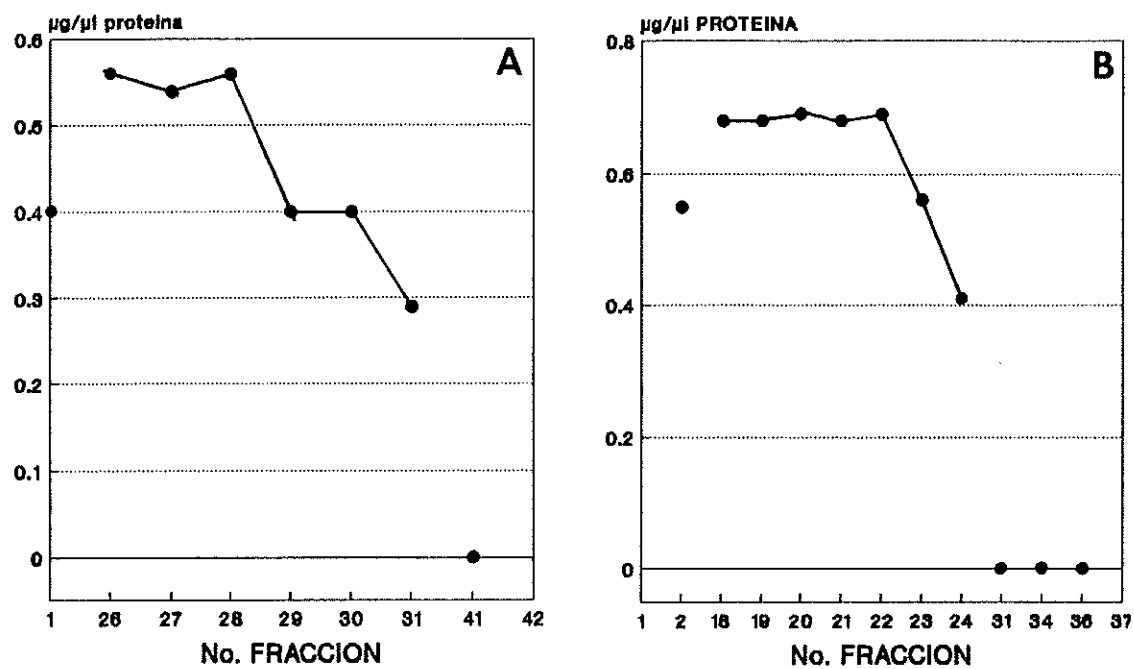


FIG. 4. REPRESENTACION GRAFICA DE LA DETERMINACION DE PROTEINA (LOWRY Y COL., 1951) DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN LA CROMATOGRAFIA POR FILTRACION: (A) SEGUNDA COLUMNA. (B) TERCERA COLUMNA.

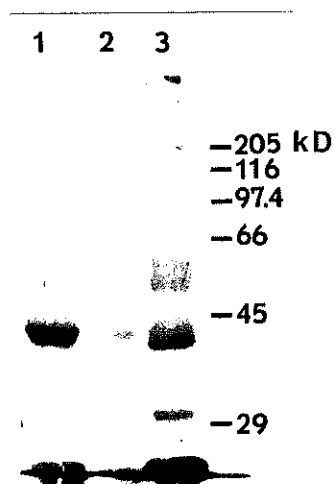


FIG. 5

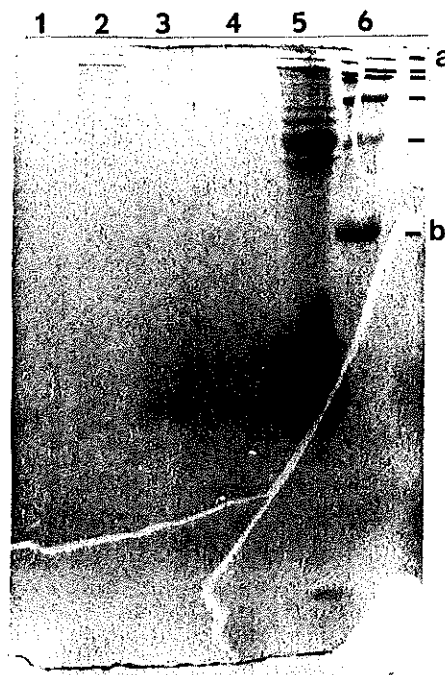


FIG. 6

FIG. 5 ELECTROFORESIS EN GEL AL 10 % DE ACRILAMIDA CON SDS. SE MUESTRA LA GRAN VARIEDAD DE PROTEINAS PRESENTES EN EL EXTRACTO CRUDO CON LISINA, ASI COMO LA GRAN CANTIDAD DE PROTEINA QUE CORRIO JUNTO CON EL FRENTE (FLECHA). LOS CARRILES 1, 2 Y 3 CONTIENEN DIFERENTES CANTIDADES DE EXTRACTO CRUDO CON LISINA.

FIG. 6. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDAMIDA AL 15 % DE ACRILAMIDA CON SDS. CARRIL 1, FRACC. 41, (PICO TRES); CARRIL 2, FRACC. 1 (PRIMER PICO, 8 μ g DE PROT.); CARRIL 3, FRACC. 30 (PICO DOS, 8 μ g DE PROT.); CARRIL 4, FRACC. 27 (PICO DOS, 10.8 μ g DE PROT.); CARRIL 5, EXTRACTO CRUDO CON LISINA, CARRIL 6, ESTANDARES DE ALTA MASA MOLECULAR, DE a HACIA b SON: MIOSINA (205 kD), β -GALACTOSIDASA (116 kD), FOSFORILASA B (97.4 kD), ALBUMINA DE SUERO DE BOVINO (66 kD), ALBUMINA DE HUEVO (45 kD) Y ANHIDRASA CARBONICA (29 kD).

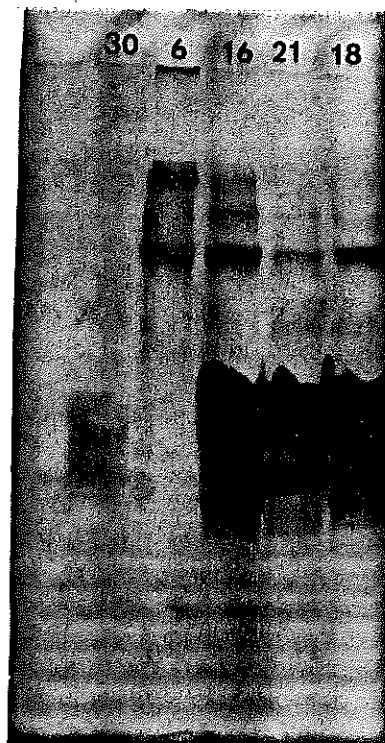


FIG. 7. ELECTROFORESIS EN GEL AL 10 % DE ACRILAMIDA CON SDS., SE MUESTRAN LA BANDAS DE PROTEINAS PRESENTES EN LAS FRACCIONES DE LA PRIMERA COLUMNA CORRIDA (CHICA). FRACC. 30 (PICO TRES, 11 μ g DE PROT.); FRACC. 6 (PICO UNO); FRACC. 16 (PICO DOS, 35 μ g DE PROT.); FRACC. 21 (PICO DOS); FRACC. 18 (PICO DOS, 38.4 μ g DE PROT.). SE PUEDE APRECIAR QUE HAY UNA SOBREPOSICION DE PICOS AL APARECER LAS MISMAS BANDAS DEL PICO UNO EN EL PICO DOS Y EN EL PICO TRES LAS MISMAS BANDAS DEL PICO DOS.

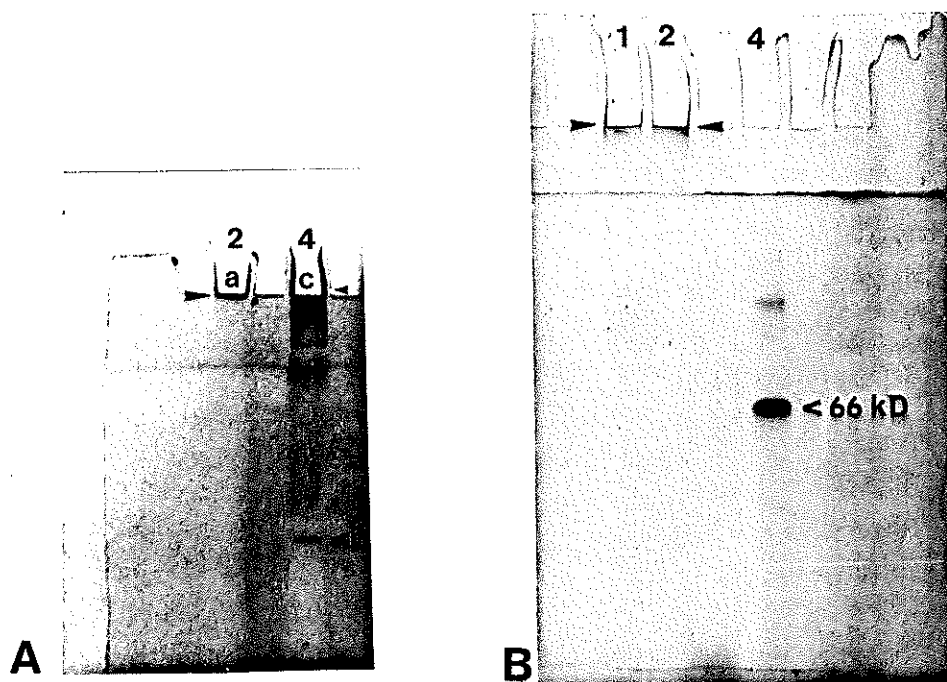


FIG. 8. (A) ELECTROFORESIS EN GEL AL 15 % DE ACRILAMIDA SIN DESNATURALIZANTES (SDS. Y 2-MERCAPTOETANOL). (A) CARRIL 4, EXTRACTO CON LISINA, (218 ug DE PROT.); SE PUEDE APRECIAR QUE PARTE DEL EXTRACTO NO PENETRO AL GEL (c), OTRA PARTE PENETRO CONFORMANDO UNA SOLA BANDA PRINCIPAL (b), EN DONDE SE PUEDE APRECIAR QUE LA LISINA PURA, CARRIL 2, FRACC. 27 (SEGUNDA COLUMNA, 34.45 DE PROT) NO PENETRO AL GEL (a), ; (B) GEL SIN DESNATURALIZANTES AL 10 % DE ACRILAMIDA. EL CARRIL 2, FRACC. 21 (24 ug DE PROT), CARRIL 4, FRACC. 20 (24 ug DE PROT.), AMBOS DE LA TERCERA COLUMNA; CARRIL 4, ESTANDAR DE ALBUMINA DE SUERO DE BOVINO (66 Kd), (35 ug). SE PUEDE PUEDE APRECIAR QUE LA ALBUMINA DE SUERO DE BOVINO (66 kD, 35 ug) PENETRO ALGEL PERFECTAMENTE (FLECHA).

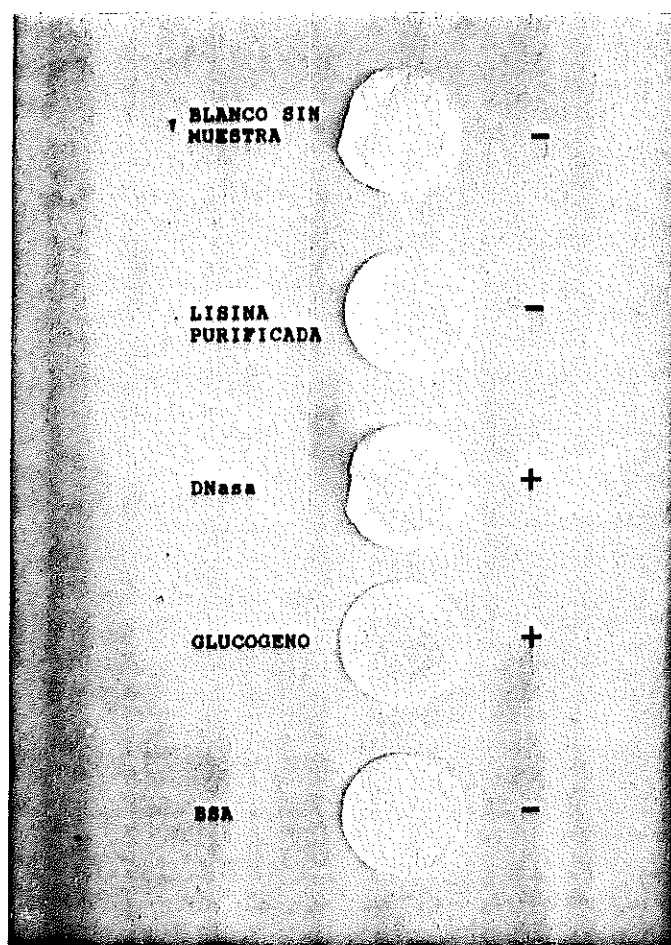


FIG. 9. DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE CARBOHIDRATOS EN LA LISINA PURA POR EL METODO DE SCHIFF (PAS), UTILIZANDO COMO SOPORTE DE LAS MUESTRAS PAPEL DE FIBRA DE VIDRIO. LOS BLANCOS CON CARBOHIDRATOS FUERON: ADN NUCLEASA (DNasa) (1250 ug), GLUCOGENO (1500 ug). Y SIN CARBOHIDRATO FUERON: BLANCO SIN MUESTRA: ALBUMINA DE SUERO DE BOVINO (500 ug). LA MUESTRA PROBLEMA FUE: LISINA PURA, FRACC. 21 (TERCERA COLUMNA) (1025 ug DE PROT.). LOS RESULTADOS SE INDICAN A UN LADO DE LOS FILTROS, EN DONDE SE APRECIA QUE LA LISINA NO MARCO PARA CARBOHIDRATOS.

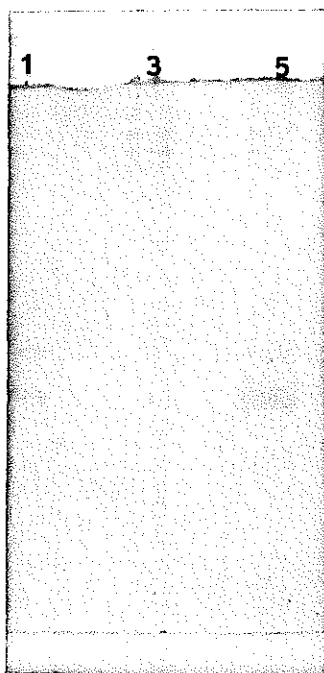


FIG. 10. ELECTROFORESIS EN GEL AL 15 % DE ACRILAMIDA CON SDS. SE VISUALIZA EL MECANISMO DE ACCION DE LA LISINA PURA SOBRE LA CAPA VITELINA DE LOS OVOCITOS. CARRIL 1, LISINA PURA (4.05 μ g DE PROT.), CARRIL 3, EXTRACTO DE CAPAS VITELINAS; CARRIL 5, MEZCLA DE LISINA PURA (4.05 μ g DE PROT.) CON CAPAS VITELINAS.

FRACCION	CONC. PROT EN $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	CANTIDAD μl AGREGADA	CANT. PROT. EN μg	TIEMPO EN MIN.	ACTIVIDAD	%	NUM. PICO DE ABS.
1	0.4	4	1.6	2	-	0	1
2		4		2	-	0	
13		2		2.30	-	0	2
17		2		2	-	0	
23		10		6	-	0	
24		5		6	+	20	
25		5		4	+	100	
26	0.56	5	2.8	2.30	+	100	
27	0.54	4	2.16	2.30	+	100	
28	0.56	5	2.8	1.45	+	100	
29	0.40	5	2.0	2.45	+	100	
30	0.40	5	2.0	>2.0	+	100	
31	0.29	5	1.45	2.30	+	100	
32		5		4.45	+	100	
33		5		7.0	-	0	3
38		5		4.45	-	0	
39		5		4.0	-	0	
40		5		4.45	-	0	
41	0.0	5	0.0	2.0	-	0	

TABLA I. ENSAYO DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN LA CROMATOGRAFÍA POR FILTRACIÓN CON SEPHADEX G-100, UTILIZANDO UNA COLUMNA GRANDE. DATOS DE LA SEGUNDA COLUMNA CORRIDA.

D I S C U S I O N

Al igual que en Norrisia, las lisinas de Haliotis rufescens (Lewis y col., 1982) y de Megathura crenulata (Heller y Raftery, 1973) disuelven completamente las capas vitelinas de sus ovocitos, mientras que la lisina de Tegula pfeifferi disuelve un máximo del 3 %, dejando reblandecida a la capa vitelina (Haino y Kigawa, 1969; Haino, 1971). En Turbo, la lisina reblandece a la capa vitelina sin liberar un producto soluble (Ogawa y Haino-Fukushima, 1984).

Cuando el extracto crudo de espermatozoides de Norrisia fue fraccionado en columnas de Sephadex G-100, se encontró la lisina en el pico número dos, donde había más concentración de proteína detectada por el ensayo de Lowry (Fig. 3 y Tabla I). Se puede explicar la alta absorbancia a 280 nm en los picos uno y tres por la presencia de contaminantes no protéicos. Las proteínas absorben luz a 280 nm debido a su contenido de aminoácidos aromáticos, como tirosina y triptófano, pero hay muchas otras moléculas que también absorben a 280 nm, como los nucleótidos por ejemplo. Probablemente el pico uno, donde estarían moléculas de alta masa molecular, contenía ácidos nucleicos, y el pico tres tenía nucleótidos y otros compuestos no protéicos de baja masa molecular que absorben a 280 nm. En cambio, el ensayo de Lowry es más específico para proteínas, aunque la fuerza de la reacción puede variar con la proporción de diferentes aminoácidos en las proteínas (Legler y col., 1985).

En el ensayo para proteína de las fracciones aparece en el pico número dos (Figs. 4 A, fracción 27 y B, fracción 21) una

cantidad escasamente menor de proteína con respecto a ambas fracciones vecinas. Esto sugiere al ver en las gráficas de las absorbancias (Figs. 3 B y C) que hay un contaminante no protéico que absorbe a 280 nm, o quizás diferencias en la composición de las proteínas en las diferentes fracciones (no se comparó detalladamente la proporción de las 3 bandas en cada fracción).

Cuando las fracciones con actividad de lisina fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, se detectaron tres bandas polipéptidicas con masas moleculares aproximadas de 12.9, 16.6 y 20.4 kD (Fig. 6). Se relacionan con la baja masa molecular de las lisinas estudiadas de otros moluscos gasterópodos: Tegula pfeifferi de 8.8 kD (Haino, 1971), Haliotis rufescens de 13 kD (Lewis y col., 1982), Haliotis discus de 15.5 y 20 kD (Usui y Haino-Fukushima, 1991), Turbo cornutus de 18.5 kD (Ogawa y Haino-Fukushima, 1984), excepto en Megathura crenulata donde las tres lisinas son de 54, 57 y 58 kD (Heller y Raftery, 1973). En Norrisia, la lisina probada fue una mezcla de 3 polipéptidos: falta purificar cada uno y determinar su actividad lítica. Presumiblemente la actividad se presenta entre las tres moléculas ya que son un agregado, sin embargo pudiera ser que alguna de las tres actúe como la lisina, y los otros dos tienen otra función. Alternativamente, es posible que las tres actúen en conjunto sobre diferentes partes de la capa vitelina para disolverla. En H. discus, se encontró que ninguno de los dos componentes de la lisina podía disolver la capa vitelina solo; los datos sugieren que el componente de 20 kD disolvió la porción externa y que el componente de 15.5 kD aflojó la porción interna de la capa vitelina (Usui y Haino-Fukushima, 1991). De

las lisinas encontradas en Megathura crenulata se presentó actividad lítica en las tres sobre la capa vitelina de sus ovocitos (Heller y Raftery, 1973), sin embargo, se desconoce el papel propio de cada una de ellas sobre la capa vitelina ya que solo trabajaron con nivel de turbidez analizado por espectrofotometría a 640 nm, esto es, que a mayor disolución de capas vitelinas por la lisina mayor es el paso de luz a través de la muestra. Entonces no se puede afirmar el papel específico de cada lisina sobre las capas vitelinas, ya que no hubo un análisis directo visualizando la reacción de cada lisina sobre las capas vitelinas al microscopio.

El ensayo de Schiff (PAS) para determinar carbohidratos en la lisina de N. norrisi dió resultados negativos (Fig. 9), lo cual significa que no tiene carbohidratos. La lisina de Haliotis rufescens presentó resultados negativos para la presencia de carbohidratos (Lewis y col., 1982). En las lisinas de otros moluscos gasterópodos (incluyendo a los antes mencionados) no se han realizado estudios para verificar la presencia de carbohidratos en sus lisinas.

En electroforesis en geles al 15 % de acrilamida con SDS se demostró que el mecanismo de acción de la lisina sobre la capa vitelina de los ovocitos de N. norrisi es no-enzimático (Fig. 10). Aunque las capas fueron completamente disueltas por la lisina las bandas de proteína de las capas aparecieron intactas. Resultados similares se obtuvieron bajo el mismo método en Turbo cornutus (Ogawa y Haino-Fukushima, 1984). Faltarían más trabajos sobre el mecanismo de acción de las lisinas en una gran mayoría

de moluscos gasterópodos para poder afirmar que el mecanismo es conservado en este grupo. Probablemente éste mecanismo proporcione ventajas al organismo ya que solo remueve el espacio por donde va a penetrar el espermatozoide. En cambio si actuara por acción enzimática quizás la actividad de la enzima alcanzaría a romper gran parte de la membrana, dejando al ovocito desnudo y este sería más vulnerable a ataques por microorganismos y a daños mecánicos, dado que su fecundación es externa.

C O N C L U S I O N E S

- 1.- La lisina de Norrisia norrisi purificada por la cromatografía en columna con Sephadex G-100 presentó actividad in vitro sobre la capa vitelina de sus ovocitos disolviendolas en su totalidad y dejando desnudos a los ovocitos.
- 2.- Al agregar una mayor concentración de lisina purificada sobre la capa vitelina de los ovocitos menor es el tiempo de disolución de las capas vitelinas.
- 3.- No se detectaron carbohidratos en la lisina por el metodo utilizado.
- 4.- Al correr lisina purificada en geles de electroforesis al 15 % de acrilamida con SDS, se obtuvieron tres bandas principales de 12.9, 16.6 y 20.4 kD.
- 5.- Los geles de electroforesis sin desnaturalizantes indicaron que la lisina purificada es un agregado molecular.
- 6.- Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS demostraron que el mecanismo por el cual actúa la lisina purificada sobre la capa vitelina de los ovocitos es no-enzimático.

R E C O M E N D A C I O N E S

Sería importante demostrar si las tres bandas de la lisina actúan de manera conjunta ó si solamente una presenta actividad de lisina sobre la capa vitelina de los ovocitos, así como la función de las otras dos moléculas.

El mecanismo de acción de la lisina es no-enzimático, sería necesario determinar la manera de como la lisina disuelve la capa vitelina de los ovocitos.

B I B L I O G R A F I A

- Austin, C R. (1968). "Ultrastructure of Fertilization". Holt, New York.
- Berg, W. E. (1950) Lytic Effects of Sperm Extracts on the Eggs of Mytilus edulis. Biol. Bull. 98:128-138.
- Cooper, T. (1977). The Tools of Biochemistry. Wiley-Interscience Publication. USA, pp. 423.
- Dan, J. C. (1962). The Vitelline Coat of the Mytilis Egg. I. Normal Structure and Effect of Acrosomal Lysin. Biol. Bull. 123:531-541.
- Dan, J. C. (1967). Acrosome Reaction and Lysins. In Fertilization (C. B. Metz and A. Monroy, Eds.), Vol. 1, pp. 237-293. Academic Prees. New York.
- Hauschka, S. D. (1963). Purification and Characterization of Mytilus Egg-Membrane Lysin From Sperm. Biol. Bull. 125, 363.
- Haino, K. (1971). Studies on the Egg-Membrane Lysin of Tegula pfeifferi Purification and Properties of the Egg-Membrane Lysin. Biochim. Biophys. Acta 229: 459-470.
- Haino-Fukushima, K. (1974). Studies on the Egg-Membrane Lysin of Tegula pfeifferi: the Reaction Mechanism of the Egg-Membrane Lysin. Biochim. Biophys. Acta 352: 179-191.
- Haino-Fukushima, K., Kasai, H., Isobe, T., Kimura, M. y Okuyama,

- T. (1986). The Complete Amino Acid Sequence of Vitelline Coat Lysin. *Eur. J. Biochem.* 154: 503-510.
- Hoshi, M. (1985). Lysins. In *Biol. of Fertilization*. C. Metz and A. Monroy (eds.) Academic Press, N. Y. Vol. 2:431-462.
- Heller, E. y Rafteri, A. (1973). Isolation and Purification of Three Egg-Membrane Lysins From Sperm of the Marine Invertebrate Megathura crenulata (Giant Keyhole Limpet). *Biochem.* 12 (21), 4106-1973.
- Lambert, C. y Koch, R. (1988). Sperm Binding and Fertilization During Ascidian Fertilization. *Develop. Growth and Differ.* 30 (4), 325-336.
- Lambert, C. (1989). Ascidian Sperm Penetration and the Translocation of a Cell Surface Glycosidase. *Journal of Experimental Zoology* 249:308-315.
- Laemmli, U. K. (1970). Clavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature (London)* 227, 680-685.
- Legler, G., Müller-Platz C., Mentges-Hettkamp, M., Pflieger, G. y Jülich, E. (1985). On the Chemical Basis of the Lowry Protein Determination. *Anal. Biochem.* 150, 278-287.
- Lewis, C., Talbot, C., y Vacquier, V. (1982). A Protein From Abalone Sperm Dissolves the Egg Vitelline Layer by a Nonenzymatic Mechanism. *Develop. Biol.* 92, 227-239.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Ogawa, A. y Hiano-Fukushima, K. (1984). Isolation and Purification of Vitelline-Coat Lysin from Testis of Turbo cornutus (Mollusca). *Develop. Growth and Differ.* 26 (4), 345-360.
- Moore S. y Stein W. (1973). Chemical Structures of Pancreatic Ribonuclease and Deoxyribonuclease. *Science* 180, 458-464.
- Solano-Estrada A. (1991). Comparacion de Lisinas Acrosomales de Moluscos y su aplicaci3n en Microinyecci3n. Tesis Profesional de Bi3logo, Facultad de Ciencias, UABC, 48 pp.
- Tyler, A. (1939). Extraction of an Egg Membrane-Lysin from Sperm of the Giant Keyhole Limpet (Megathura crenulata). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 25: 317-323.
- Talbot, P., DiCarlantonio G., Zao P., Penkala J., y Haimo L. (1985). Motile Cells Lacking Hyaluronidase Can Penetrate the Hamster Oocyte Cumulus Complex. *Develop. Biol.* 108, 387-398.
- Usui N. y Haino-Fukushima K. (1991). Two Major Acrosomal Proteins Act on Different Parts of the Oocyte Vitelline Coat in the Abalone, Haliotis discus. *Mol. Reprod. Develop.* 28:189-198.

