

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI)**

Tesis en Co-tutela presentada para obtener el grado de
Doctor de la Universidad de Concepción y
Doctor de la Universidad Paris VI

Presentada y defendida por

María Carolina Concha Menéndez

el 17 de diciembre, 2004

Estudio del rol de SpH proteasa en la remodelación del pronúcleo masculino y el inicio de los ciclos celulares embrionarios del erizo de mar

Etude du rôle de la SpH protéase dans la restructuration de la chromatine mâle post-fécondation et dans l'initiation des cycles cellulaires embryonnaires chez l'oursin

Directora de Tesis en Chile: **María Imschenetzky**

Directora de Tesis en Francia: **Anne-Marie Genevière**

Resumen

Una vez que el óvulo de erizo de mar ha sido fecundado, la cromatina del espermatozoide es remodelada para formar el pronúcleo masculino, un paso esencial en el establecimiento exitoso de la diploidía del genoma embrionario. Durante este proceso, las histonas específicas de espermatozoide (SpH) son removidas y remplazadas por variantes de histonas específicas de las etapas de clivaje (CS), que son reclutadas desde reservas maternas. En este contexto, una cisteín proteasa responsable de la degradación selectiva de las histonas SpH ha sido identificada y llamada SpH proteasa. Esta enzima está presente en óvulos como pro-enzima y es activada post-fecundación. Presenta un máximo de actividad en un rango de pH 7.0-8.0 y es eficientemente inhibida por los inhibidores de cisteín proteasas, E64d y cistatin, y no por inhibidores de serino proteasas. En la presente Tesis se estudió la función de SpH proteasa en la remodelación del pronúcleo masculino y en el inicio de los ciclo celulares embrionarios en erizos de mar. Con este objetivo se obtuvo anticuerpos específicos dirigidos contra el dominio N-terminal de SpH proteasa y los que fueron utilizados para localizar esta enzima en óvulos no fertilizados y para determinar su destino post-fecundación. Se observó que esta proteasa se localiza en el núcleo de óvulos no fecundados, transloca al pronúcleo masculino post-fecundación, permanece en el núcleo del cigoto durante la fase S y se posiciona en la región del huso mitótico durante la mitosis. Hemos demostrado también que la inhibición de la actividad cistein proteasa impide la degradación de las histonas SpH en cigotos de erizo de mar. Estos hallazgos son consistentes con la función de SpH proteasa en la remodelación del pronúcleo masculino post-fecundación.

Estudios funcionales realizados mediante inhibición *in vivo* con E64d o mediante la microinyección de anticuerpos específicos en óvulos no fertilizados mostraron que la actividad SpH proteasa es requerida para el progreso a través del primer ciclo celular embrionario del erizo de mar. Los cigotos tratados con E64d o microinyectados con anticuerpos anti-SpH proteasa no replican su ADN y la cromatina permanece condensada. Puesto que la inhibición de cisteín proteasas no bloquea la replicación de ADN materno en óvulos activados con ionoforo de calcio, estos hallazgos sugieren que el boqueo es causado por la permanencia de las histoinas SpH en la cromatina del cigoto. Consecuentemente, postulamos que la actividad SpH proteasa es requerida para la replicación de ADN del cigoto de erizo de mar. Experimentos complementarios muestran que el mecanismo involucrado es independiente de la actividad y localización de complejos Cdk/ciclina de fase S.

Puesto que la replicación de ADN y los eventos citoplasmáticos de la mitosis no están fuertemente acoplados en las etapas iniciales de segmentación embrionaria del erizo de mar, esta

peculiaridad nos permitió estudiar el efecto de la inhibición de cisteín proteasas sobre el progreso a través de la mitosis. Se demostró que la organización de los centrosomas y del huso mitótico es severamente alterada en cigotos tratados con E64d. La localización intracelular y la actividad del regulador del ciclo celular Cdk1/ciclina B también fue fuertemente alterada. Estos resultados sugieren que la actividad de cisteín proteasas es requerida para la entrada a mitosis y que el mecanismo involucrado es diferente del que provoca el boqueo en la replicación de ADN.

Finalmente, hemos identificado el gen que codifica para esta proteasa y hemos encontrado que esta enzima pertenece a la familia de proteasas de Catepsina L. Esta familia de cisteín proteasas son enzimas lisosomales que presentan una actividad máxima a pH ácido. En vista que SpH proteasa es una enzima que degrada las histonas espermáticas de manera selectiva a pH neutro, este hallazgo abre nuevas perspectivas respecto al rol potencial de las Catepsinas en la formación del pronúcleo masculino y en el control del ciclo celular embrionario.

