

USO DE NANOPARTÍCULAS DE ORO COMO SONDAS PARA LA LOCALIZACION DE PROTEINAS EN ESPERMATOZOIDES POR MICROSCOPIA ELECTRONICA

Berberián, M.V.^[1,2], Pocognoni C.A.^[2] y Mayorga L.S.^[2]

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Cuyo (FCEN-UNCuyo)^[1] e Instituto de Histología y Embriología Mendoza (IHEM-CONICET/UNCuyo)^[2], Mendoza, Argentina
Email: victoria.berberian@gmail.com

La localización celular de proteínas suele determinarse mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando anticuerpos. Lamentablemente, IFI tiene limitaciones técnicas que impiden establecer la ubicación exacta de proteínas en estructuras intracelulares próximas entre sí, tales como las que se observan en la cabeza del espermatozoide humano. En este caso, IFI no permite determinar si una proteína está asociada a la membrana acrosomal externa, a la membrana plasmática del espermatozoide, o a ambas [1]. Recientemente nuestro grupo de trabajo ha comenzado a desarrollar una estrategia alternativa para localizar proteínas en espermatozoides. La técnica involucra el marcado de proteínas recombinantes con nanopartículas (NPs) de oro, desnudas (i) o acopladas a ácido nitrilotriacético y níquel (ii, Ni-NTA-Nanogold). Las NPs, con diámetros de 5 a 20 nm, son detectadas posteriormente por microscopía electrónica de transmisión (TEM). En comparación con IFI, el marcaje de proteínas con NPs de oro permite alcanzar una resolución espacial precisa, ya que las NPs utilizadas son mucho más pequeñas que un anticuerpo y cuando se unen a una proteína lo hacen a una distancia corta, del orden de los 1,5 nm. La nueva técnica ofrece además una alternativa simple a la compleja técnica de inmunomarcado con oro coloidal, que se utiliza tradicionalmente para localizar proteínas por TEM.

En el presente trabajo reportamos resultados obtenidos bajo las siguientes condiciones:

- i) Uso de NPs de oro desnudas para marcar proteínas recombinantes. En este caso NPs de oro de 20 nm de diámetro fueron incubadas con la proteína permeable metalotioneina (CPP-MT). Esta proteína es rica en cisteínas y se une a las NPs mediante enlaces de tipo tiol. La CPP-MT marcada fue puesta en contacto con espermatozoides humanos a 37 °C durante 3h. La interacción del complejo CPP-MT-NP con las células se monitoreó por TEM, así como también por IFI y por ensayos funcionales. En la figura 1 se presentan dos micrografías TEM que muestran la localización de las NPs en las células. Como puede observarse CPP-MT se ubica en la cola y pieza media del espermatozoide, y en menor medida en el acrosoma y en el núcleo celular.
- ii) Empleo de NPs de oro de 5nm de diámetro acopladas a Ni-NTA para ubicar proteínas recombinantes. Estas NPs contienen iones níquel y muestran gran afinidad por proteínas que posean un *tag* de His-6. La proteína recombinante VPS4B^{E235Q}-His6 fue inicialmente incubada con espermatozoides humanos a 37°C, permeabilizados con SLO y estimulados con 10 μM de calcio por 30 min. Posteriormente las células fueron incubadas en presencia de las NPs y observadas por TEM. En la figura 2 se muestra una micrografía TEM en la que es evidente la localización de las NPs sobre las distintas membranas del espermatozoide. La técnica propuesta resultó satisfactoria y es claramente visible que la proteína VPS4B^{E235Q}-His6 se localiza en el citosol y en las regiones con invaginaciones de la membrana acrosomal. También se destaca la ausencia de proteína en el núcleo celular.

REFERENCIAS

[1] Rodríguez J.F., Bustos M. A., Zanetti M. N., Mayorga L.S., Tomes C. N., (2011) “alpha-SNAP prevents docking of the acrosome during sperm exocytosis because it sequesters monomeric syntaxin” *PLOS ONE*, 6. 1 – 17.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONICET, ANPCYT, SECyT y al Personal de apoyo de CONICET de microscopía del IHEM: Marcelo Furlan, Norberto Domizio, Elisa Bocanegra, Jorge Ibáñez.

FIGURAS

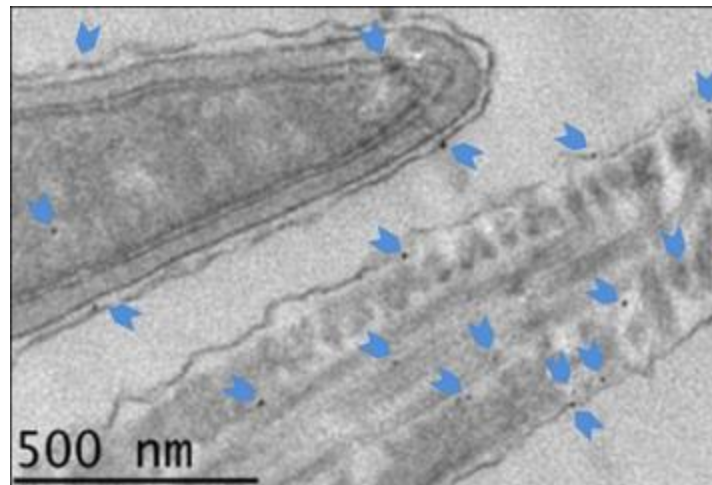


Figura 1: Micrografía TEM de espermatozoides humanos donde se muestra la localización de la proteína CPP-MT marcada con NPs de oro de 20 nm. CPP-MT se localiza en la cola y en menor medida en el acrosoma y núcleo celular.

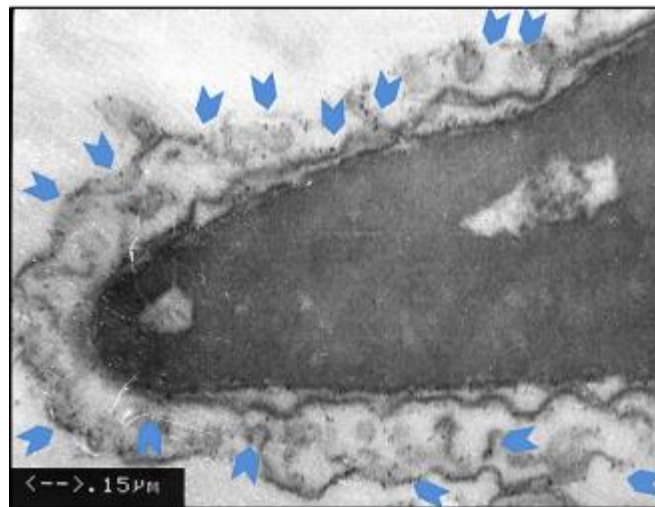


Figura 2: Micrografía TEM de un espermatozoide humano donde se muestra la ubicación de la proteína VPS4B^{E235Q}-His-6 que se localizó con NPs de oro de 5nm (Ni-NTA-Nanogold). VPS4B^{E235Q}-His-6 se localiza en el citosol y en las regiones con invaginaciones de la membrana acrosomal.