

EMPAQUETAMENT DEL DNA EN ELS ESPERMATOZOIDES

LUIS DEL VALLE,¹ PEPITA GIMÉNEZ,¹ NÚRIA SAPERAS¹ I MANEL CHIVA^{1,2}

1. Departament d'Enginyeria Química, ETSEIB, UPC

Av. Diagonal, 647. Barcelona.

2. Departament de Ciències Fisiològiques II, Div. IV, UB, Campus de Bellvitge.

SUMMARY

There is not a single model to define nuclear sperm chromatin. This chapter is a review of different structures observed and studied in sperm nuclei (nucleohistone, nucleoprotamine, etc). Sperm DNA-interacting proteins (named here «specialized polypeptides») display also a high degree of interspecific diversity. We consider two main types: specialized-ends of histones, and specific proteins. These specialized polypeptides are constituted by different combinations of several DNA-interacting motives. We also revise the scarce available information about the genome architecture and organization in sperm cells, and we try to describe a generic framework to understand the enormous evolutionary diversity of the subject reviewed here.

RESUM

L'estructura de la cromatina del nucli espermàtic és molt diversa. En aquest capítol revisem els estudis efectuats sobre nucleohistones i nucleoprotamines espermàtiques i mencionem altres formes d'estructura que també es troben presents en alguns espermatozoides. Les proteïnes que condensen el DNA espermàtic (polipèptids especialitzats) també són molt diverses, però aquí les agrupem en dos tipus: extrems especialitzats d'histones i proteïnes específiques. Els polipèptids especialitzats estan formats per les diferents combinacions de quatre motius estructurals que són els responsables principals de la interacció amb el DNA. També repassem l'escassa informació disponible sobre l'arquitectura i l'organització del genoma en el nucli espermàtic, i intentem donar una visió general evolutiva de l'extraordinària diversitat interespecífica de l'estructura i la composició de la cromatina espermàtica.

INTRODUCCIÓ

Podem interpretar que hi ha dos factors determinants de l'empaquetament del DNA en el nucli cel·lular: 1) economitza l'espai de manera que la informació genètica es trobi com més compacta millor, i 2) organitzar aquest empaquetament de la manera més eficient, perquè es pugui seleccionar i utilitzar la informació específica entremig de l'immens dipòsit informacional que representa el DNA. El nucli de la cèl·lula espermàtica és un nucli inert que al llarg de l'evolució ha desenvolupat de diverses maneres el primer aspecte. En aquest capítol revisem la informació actual sobre l'estructura de la cromatina espermàtica i intentem posar de manifest algunes qüestions que mereixerien ser estudiades o aprofundides amb més detall.

LES ESTRUCTURES D'ORDRE SUPERIOR DE LA CROMATINA SOMÀTICA

Malgrat que aquest tema s'hagi desenrotllat en capítols anteriors del present volum, és interessant fer unes quantes consideracions bàsiques per poder comprendre la diversitat de l'organització de la cromatina en els espermatozoides.

Al llarg del cicle vital d'una cèl·lula somàtica, la cromatina presenta, parcialment o totalment, una sèrie de processos dinàmics d'empaquetament i desempaquetament que compleixen o es relacionen amb diferents funcions. Les fibres de nucleosomes (fibres «en rosari», de 10 nm aproximadament) poden replegar-se temporalment en estructures d'ordre superior i formen l'heterocromatina, els telòmers i els cromosomes mitòtics. La primera estructura d'ordre superior és la fibra de 30 nm (formada directament pel replegament més o menys

regular de la fibra de 10 nm). El posterior replegament organitzat d'aquesta fibra forma estructures d'ordre més elevat. Sense considerar de moment les raons termodinàmiques que determinen la mida de la fibra de 30 nm, d'una manera general es pot suposar que la dinàmica de la fibra de 30 nm (és a dir la seva formació i la seva descondensació) és deguda fonamentalment a les interaccions del DNA amb les histones *linker* (H1 i família) i amb els extrems d'histones del cor nucleosòmic (Van Holde i Zlatanova, 1996; Zlatanova, 1996; Moore i Ausió, 1996; Van Holde *et al.*, 1995; Santisteban, 1994; Zalenskaya *et al.*, 1985). Aquestes interaccions estarien regulades principalment per la presència o absència de la histona H1 i per les modificacions posttraduccionalment de totes les parts de les histones que interaccionen amb el DNA. El fet més important que cal destacar, orientat a la interpretació de la cromatina espermàtica, és el següent: tret de les histones i les seves modificacions químiques, no es necessiten proteïnes especials ni «factores específics» (seqüències concretes de DNA, estructures proteíniques específiques –«llocs en *cis*–», etc.) per a la formació o descondensació de la fibra de 30 nm. Per contra, la formació d'estructures d'ordre més superior (heterocromatina, cromosomes mitòtics, telòmers) requereixen proteïnes que reconeguin específicament seqüències de DNA o complexos proteínics, com per exemple les TBP en telòmers i la família SMC en els cromosomes mitòtics (Blackburn i Greider, 1995; De Lange, 1996; Greider, 1996; Peterson, 1994; Hirano, 1995; Hirano *et al.*, 1995; Saitoh *et al.*, 1995; Yanagida, 1995; Koshland i Strunnikov, 1996; Bedoyan *et al.*, 1996). Aquestes proteïnes compactarien ordenadament les fibres de 30 nm i les situarien en dominis concrets del nucli. Finalment, hem de ressaltar que tant l'estructura nucleosò-

mica com la de la fibra de 30 nm i la de les condensacions superiors s'han conservat molt invariables al llarg de l'evolució dels organismes eucariotes (Van Holde *et al.*, 1995).

ESTRUCTURA DE LA CROMATINA DE L'ESPERMATOZOIDE

Nucleohistona i nucleoprotamina

No hi ha un model únic, ni predominant, que sigui representatiu de l'estructura dels diferents nuclis dels espermatozoides animals. El principi més general és que el nucli espermàtic tendeix a presentar un volum mínim. Això és possible gràcies a dues raons: 1) el grau de compactació del DNA espermàtic és igual o major que el de les estructures d'ordre superior de la cromatina somàtica; 2) tot (o quasi tot) el DNA espermàtic es troba en estat compactat (en alguns casos tot el nucli es podrà considerar com una «estructura d'ordre superior»). Seguint el criteri d'economia de volum es poden descriure dues estructures «límit» per a la cromatina espermàtica: nuclis organitzats en **nucleohistona** (mínima reducció del volum nuclear) i nuclis organitzats en **nucleoprotamina** (màxima reducció del volum nuclear) (vegeu també Subirana, 1975, 1982; Clarke, 1992).

El punt de partida principal i més immediat que condueix a l'espermatozoide és l'espermàtida haploide temprana. L'estructura de la seva cromatina ha rebut molt poca atenció (malgrat que és un model molt interessant per estudiar la cromatina). Els escassos treballs sobre aquest tema indiquen que l'espermàtida temprana conté una cromatina laxa, homogènia, molt poc condensada i fàcilment digerible per les nucleases (Mezquita i Teng, 1977a, 1977b; Mezquita, 1985; Loir *et al.*, 1985). A falta d'un model concret,

podem suposar que el cromosoma d'aquesta cèl·lula es troba estructurat fonamentalment en forma de nucleosomes poc compactats.

En algunes espècies, la condensació de la cromatina de l'espermatozoide s'efectua sense que es produeixi una remodelació global de la cromatina de l'espermàtida haploide (figura 1A), és a dir, en el decurs de l'espermioïgènesi, i sense modificació (o amb lleugeres modificacions de l'estructura nucleosòmica) les fibres «en rosari» es van condensant en estructures d'ordre més elevat i produeixen la condensació nuclear. Direm que aquests nuclis es troben organitzats en forma de nucleohistona: el nucleosoma (més, menys o gens modificat) és la unitat estructural bàsica i les histones són el component proteínic principal o exclusiu (Subirana, 1975, 1982). Les estructures d'ordre superior que es troben en la nuclihistona espermàtica són anàlogues a la fibra de «30 nm» somàtica però no estan tan conservades evolutivament i el seu diàmetre varia segons les espècies entre 20 i 50 nm (Alegre i Subirana, 1989; Subirana, 1992; Casas *et al.*, 1993 i referències incloses). La condensació de la nucleohistona espermàtica es produeix diferentment segons les espècies: en *Carassius* sembla que la mateixa presència del complement normal d'histones és suficient per empaquetar la cromatina espermàtica (Muñoz Guerra *et al.*, 1982a); en el cas dels espàrids (una família de peixos ossis), la cromatina espermàtica conté una concentració superior d'histona H1 que la cromatina somàtica (Saperas *et al.*, 1993a, 1994); en molts altres exemples, la cromatina espermàtica conté la dotació normal d'histones més una proteïna addicional estructuralment relacionada amb la histona H1 (Saperas *et al.*, 1993a, 1994; Ausió 1986, 1995; Azorín *et al.* 1983, 1985); altres espècies han substituït la histona H1 somàtica per una histona similar però més bàsica

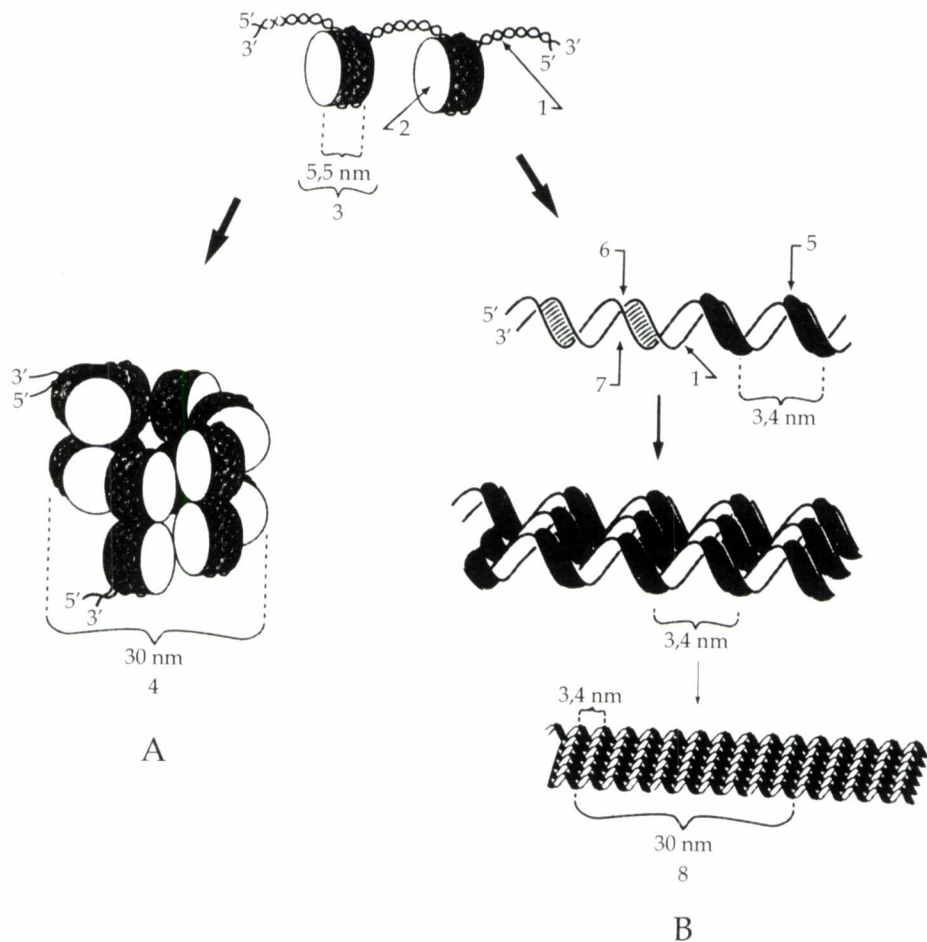


FIGURA 1. Esquema de la formació de nucleohistona (A) i nucleoprotamina (B) en l'espermioigènesi a partir de la cromatina de l'espermàtida haploide. La nucleohistona espermàtica es basa fonamentalment en un replegament dels nucleosomes, mentre que per arribar a la nucleoprotamina ha de produir-se una remodelació total de l'empaquetament del DNA. S'aconsegueix així una estructura molt més compacta. 1. DNA; 2. octàmer d'histones; 3. nucleosoma (cor); 4. fibra solenoide de nucleosomes; 5. protamina; 6 i 7 solcs estret i ample del DNA; 8. complex nucleoprotamínic.

(Giannasca *et al.*, 1993; Massey i Wats, 1992; Vodicka *et al.*, 1990; Zalenskaya *et al.*, 1981); i finalment és interessant el cas d'alguns equinoderms, els quals posseeixen modificacions específiques dels extrems de les histones H1 i d'algunes de les histones del cor nucleosòmic (Strickland, M. *et al.*, 1977, 1978; Strickland, W. *et al.*, 1977, 1980; Von Holt *et al.*, 1984; Poccia, 1995). A partir dels casos estudiats, sembla que les nucleohisto-

nes espermàtiques posseeixen un grau de compactació similar al dels cromosomes mitòtics (de 5 a 10 vegades el cromosoma interfàsic).

En síntesi, la nucleohistona espermàtica és una estructura basada en els mateixos principis químics que la fibra de 30 nm somàtica però amb més permissivitat quant a la variació de les histones *linker*.

Contràriament al cas de la nucleohisto-

<i>Dicentrarchus labrax</i>	PRRRRQASRPVRRRRRTRRSTAERRRRRVVRRRR
<i>Loligo pelaeii</i>	RRRRRSRRRRRRSRRRRSRPYRRRYRRRRRRRRRR SRRRRYRRRRYSRRRYRRRR
<i>Monodonta turbinata</i>	ARAVRRRRARSRSRSRKSRSRSAKRSASRRRSRS AGRRRRRRRTASRRRRRSASRRRSVSRRRRRRSRKSR GRRRRGRKVRRRRVKRAGRKGRRRTRRRRRRRARR

FIGURA 2. Estructura primària de tres proteïnes específiques del nucli espermàtic: protamina de *D. labrax* (un peix ossi), de *L. pelaeii* (un mol·lusc cefalòpode) i de *M. turbinata* (un mol·lusc prosobranqui). Observeu la gran acumulació de residus bàsics (arginina=R, lisina=K) i la seva agrupació. Les seqüències provenen respectivament de Saperas *et al.*, (1993b), Wouters-Tyrou *et al.*, (1991) i Daban *et al.*, (1995).

na, altres espècies experimenten al llarg de l'espermioogènesi una remodelació total de la cromatina haploide (figura 1B): les histones van sent desplaçades i substituïdes per proteïnes progressivament més bàsiques, els nucleosomes i la fibra de 10 nm desapareixen, el DNA canvia la seva topologia i va adquirint un elevadíssim grau de compactació. En la nucleoprotamina espermàtica no trobarem ni nucleosomes ni histones i, en canvi, hi formen part proteïnes específiques molt bàsiques i simples que clàssicament

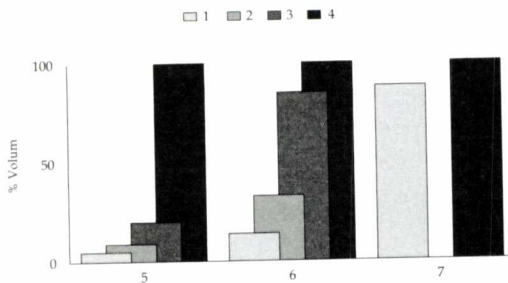


FIGURA 3. Empaquetament del DNA. 1. Proporció del volum que ocupa el DNA referit al volum total d'un nucli somàtic (5), d'un cromosoma mitòtic (6) i d'un nucli espermàtic estructurat en forma de nucleoprotamina (7). 2. Proporció del volum que ocupa la fibra de 10 nm en un nucli somàtic (5) i cromosoma mitòtic (6). 3. Volum que ocupa la fibra de 30 nm en un nucli somàtic (5) i cromosoma mitòtic (6). 4. Volum normalitzat de cada estructura (nucli somàtic, cromosoma mitòtic, nucli espermàtic). El DNA es considera un cilindre de 20 Å de diàmetre (modificat de Ward and Coffey, 1991).

han estat anomenades protamines (Miescher, 1874; Bloch, 1969, 1976). Les protamines han estat revisades diverses vegades (Poccia, 1986; Hecht, 1989a, 1989b; Kasinsky *et al.*, 1985a; Kasinsky, 1989; Meistrich, 1989; Oliva i Dixon, 1991; Chiva *et al.*, 1991, 1995; Daban *et al.*, 1991; Saperas *et al.*, 1994). Les característiques principals d'aquestes molècules queden reflectides en la figura 2. Tal com es discutirà més endavant, la nucleoprotamina és una estructura molt més simple que la nuclihistona espermàtica. Tot i així hem de tenir present que és el resultat d'un procés molt complex i elaborat de substitució de proteïnes que interaccionen amb el DNA, i de canvis importants en la topologia del mateix DNA (Risley *et al.*, 1986; Barone *et al.*, 1994). Hem de considerar, doncs, que la nucleoprotamina és una consecució evolutiva superior, molt més especialitzada que la nucleohistona. La figura 3 mostra que el nivell de condensació de la nucleoprotamina és molt més elevat que el de la cromatina somàtica i que el del cromosoma mitòtic (aquest últim equiparable a la nucleohistona espermàtica).

Exemples de nuclihistona espermàtica

La cromatina de l'espermatozoide dels eriçons de mar (equinoderms) representa un cas interessant de nucleohistona espermàtica.

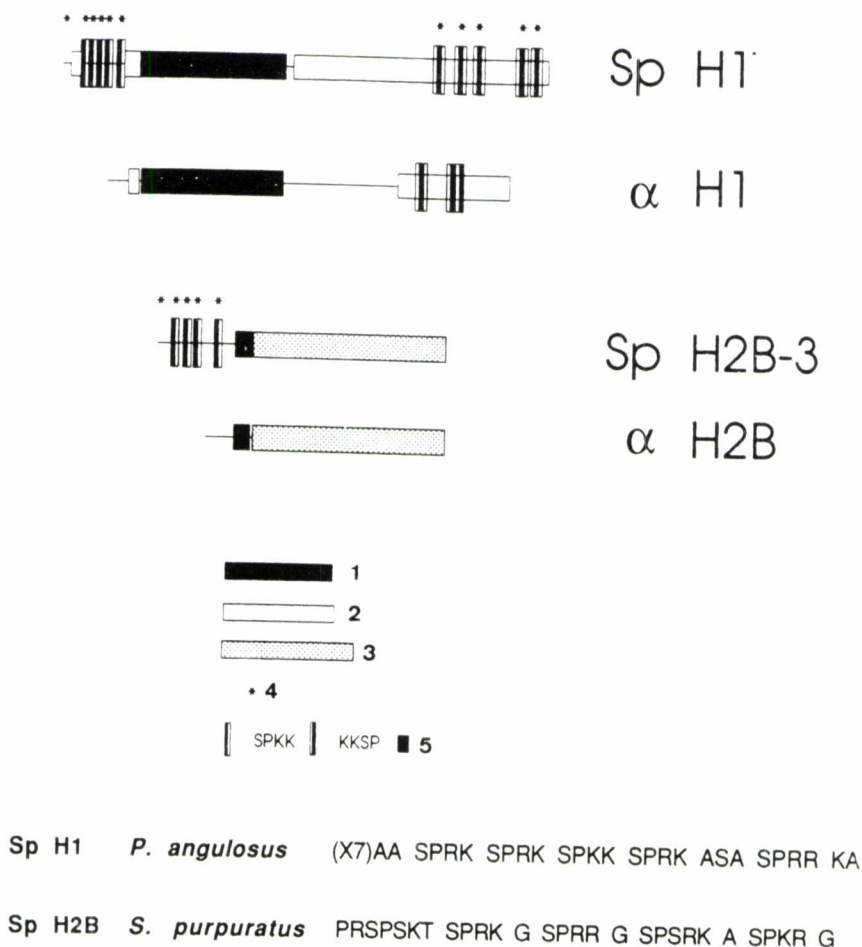


FIGURA 4. Esquema de l'estructura primària de les histones específiques SpH1 i SpH2B, comparades amb les seves anàlogues somàtiques (α en la figura) (modificat de Poccia, 1995). 1. Regió central (cor central) conservat entre les diferents H1. 2. Regió rica en lisina i alanina en els extrems C-terminals de les SpH1. 3. Regió conservada entre les diferents H2B somàtiques i SpH2B. 4. Llocs que es fosforilen i desfosforilen durant l'espermioogènesi. 5. Regió polibàsica de les histones H2B. A sota: Seqüències N-terminals de les SpH1 i SpH2B on es posa de manifest les repeticions SPKK (o les seves variants SPKR, SPRR).

màtica. Aquesta cromatina mostra propietats que la diferencien de la nucleohistona somàtica: és molt estable pel que fa a la desnaturalització tèrmica i iònica, és atacada lentament per les nucleases i posseeix un nivell de compactació similar al dels cromosomes mitòtics i superior al de la fibra de 30 nm somàtica (Green i Poccia, 1985, 1988). Una altra particularitat és la gran longitud

del seu nucleosoma (250 pb de DNA) (Spadafora *et al.*, 1976).

El seu component proteínic és constituït fonamentalment per les cinc histones (H3-H4, H2A-H2B, H1). Les histones H3, H4 i H2A són pràcticament idèntiques a les somàtiques, mentre que les H1 i H2B són diferents i reben la denominació SpH1 i SpH2B (vegeu Poccia, 1995). Aquestes dues

histones específiques són sintetitzades en els primers estadis de l'espermatogènesi, es van incorporant a la cromatina i substitueixen les H1 i les H2B somàtiques. Són més grosses que les seves anàlogues somàtiques gràcies al fet que posseeixen extensions addicionals en la regió N-terminal (la SpH1 també en C-terminal). Com mostra la figura 4, les SpH1 tenen quatre dominis: un domini globular característic de totes les histones H1 (aa 40-114), una regió llarga rica en al·lana i lisina (120-185) i les regions N- i C-terminals formades per la repetició de tetrapèptids del tipus SPKK (serina-prolina-lisina-lisina). Les histones SpH2B també contenen aquests tetrapèptids a l'extrem N-terminal. Els extrems que contenen els pèptids SPKK interaccionen amb el DNA *linker* gràcies a la seva basicitat i aquesta forta interacció sembla que és la responsable de les propietats particulars (resistència, compactació i longitud del DNA *linker*) de la nuclihistona espermàtica dels eriçons de mar. Ha estat clarament observat que la fosforilació i desfosforilació de les serines dels pèptids SPKK modula la seva interacció amb el DNA i provoca canvis en el grau de compactació de la cromatina, en la seva resistència i en la longitud del DNA *linker* (Green i Poccia, 1988). Donat que aquests motius SPKK es troben en altres proteïnes específiques espermàtiques, en una secció posterior es revisa més profundament la importància de les interaccions SPKK amb el DNA.

A part del component histònic, sembla que el nucli de l'espermatozoide dels eriçons de mar conté una petita proporció d'altres proteïnes (un 10% del contingut total). Kunkle (1984) ha mostrat que, després d'haver-ne extret les histones espermàtiques i d'haver-ne digerit quasi completament el DNA, queda una matriu fibril·lar en el nucli que es resol electroforèticament en diferents fraccions (bandes) de proteïna.

Aquests experiments suggereixen que pot existir una matriu nuclear específica que ancori i organitzi la nucleohistona espermàtica. La presència i el paper estructural-organitzador-funcional d'una matriu nuclear en els espermatozoides és un dels punts que ha rebut molt poca atenció fins al moment.

Els experiments de digestions amb nucleases (Spadafora *et al.*, 1976; Zalenskaya *et al.*, 1981; Arceci i Gross, 1980; Simpson i Bergman, 1980) demostren que la unitat bàsica estructural de la nuclihistona espermàtica dels eriçons de mar és el nucleosoma, el qual presenta una baixa freqüència (equival a una repetitivitat de 250 parells de bases de DNA, 110 dels quals corresponen al DNA *linker*) i una elevada estabilitat. Els estudis per tècniques de difracció de rajos X (Subirana *et al.*, 1977) i de microscòpia electrònica de la cromatina tractada amb tampons de baixa força iònica (Zentgraf *et al.*, 1980; Aboukarsh i Kunkle, 1985) demostren que els nucleosomes no es troben disposats d'una manera estrictament regular sinó que s'agruparien en grànuls de diàmetre lleugerament variable, els quals es disposarien més o menys «en rengla» (formarien una fibra). Cada un d'aquests grànuls té un diàmetre de 40 a 50 nm i conté de 20 a 26 nucleosomes (de 4,8 a 6,2 quilobases de DNA). El grau d'empaquetament lineal del DNA (longitud que ocupa el DNA estès/longitud que ocupa l'estructura) en aquestes fibres de «30» nm espermàtiques té un valor de 33 a 55, el qual és superior al valor 22-25 de la fibra de 30 nm somàtica.

No totes les nucleohistones espermàtiques són tan específiques com les dels eriçons de mar. Per exemple, en el peix ossi *Carassius auratus*, i en la carpa, les cinc histones del nucli espermàtic són iguals o molt similars a les homòlogues somàtiques (Muñoz Guerra *et al.*, 1982a), i també ho és la longitud del DNA nucleosòmic. Una altra nucleohistona espermàtica caracteritzada en detall és la de l'equinoderm *Holothuria*

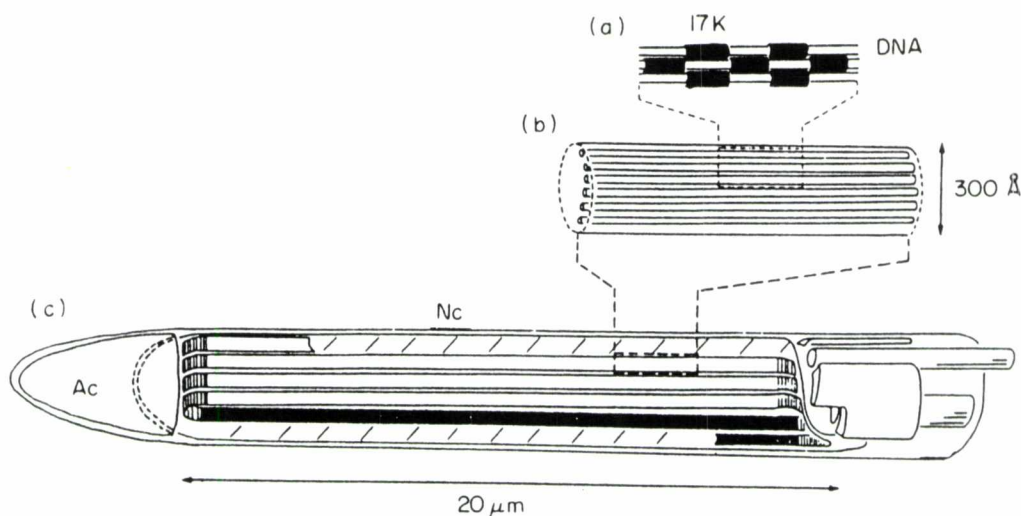


FIGURA 5. Estructura de la nucleoprotamina del grill (*Gryllus bimaculatus*) segons Suzuki i Wakakayashi (1988). Una proteïna específica de 17 kDa (en negre) seria la responsable d'unir els diferents filaments del DNA (a). Els complexos DNA-proteïna formarien fibres de 30 nm (b), i unes dues-centes fibres formarien el nucli (c).

tubulosa, que mostra una especialització intermèdia entre els eriçons de mar i la nucleohistona somàtica (Cornudella i Rocha, 1979; revisat a Prats i Cornudella, 1995).

Exemples de nucleoprotamina

La nucleoprotamina és una estructura que es va formant progressivament en el decurs de l'espermioïgènesi. En algunes ocasions implica la consecució d'estructures «unitàries» que, per coalescència (es «fonden» les unes amb les altres), formen aglomerats superiors en volum però idèntics en ordre estructural molecular; en altres ocasions, però, això no és estrictament cert. Com a conseqüència d'això, en l'estudi de la nucleoprotamina hauríem de diferenciar: a) les interaccions moleculars entre el DNA i la proteïna espermàtica (les quals són les responsables directes dels complexos); i b) com es disposen o són organitzats els complexos nucleoprotamínics en el nucli espermàtic (estructures d'ordre superior). Sovint, però,

aquests dos aspectes es confonen ja que hi ha certs nuclis espermàtics que es podrien considerar (anàlogament a un cristall de NaCl) un quasi cristall de protamina-DNA.

L'organització de la nucleoprotamina (el que es podria dir les estructures d'ordre superior) depèn tant de les interaccions entre DNA i protamina com de les relacions dels complexos nucleoprotamínics amb altres components del citoesquelet, com també dels processos espermioïgènics de substitució de les histones per protamines i altres factors extranuclears determinants de l'estructura del nucli. En aquest subapartat intentem descriure breument uns quants exemples d'estructures nucleoprotamíniques, mentre que en un apartat posterior analitzem amb més detall les interaccions moleculars entre DNA i proteïnes espermàtiques en general.

La nucleoprotamina del grill domèstic (*Gryllus bimaculatus*) representa un dels casos més simples d'organització molecular. Ha estat estudiada per microscòpia electrò-

nica, microscòpia de fluorescència i difracció d'electrons per Suzuki i Wakabayashi (1988). El nucli espermàtic del grill contindria DNA i una única proteïna bàsica de 17 KDa. L'estructura dels complexos d'aquestes dues molècules (DNA i proteïna) resumida en la figura 5 seria la següent: el DNA es troba orientat de manera que l'eix de la seva hèlix seria paral·lel a l'eix longitudinal nuclear; aproximadament 200 hèlixs de DNA s'associarien paral·lelament entre elles formant una fibra de 30 nm (que no s'ha de confondre amb la fibra de 30 nm de la nucleohistona); el nucli espermàtic estaria format per aproximadament 200 fibres de 30 nm agrupades també paral·lelament. En aquests nuclis la relació d'empaquetament lineal (definida abans) és d'unes quaranta vegades superior a la de la fibra de 30 nm somàtica, les fibres nucleoprotamíniques de 30 nm posseïrien una relació d'empaquetament global de valor aproximadament igual a 1 i el nucli, una relació d'1,35 (el valor 1,00 correspondria al volum que ocuparia el seu DNA considerat com un cilindre de 20 Å de diàmetre).

Si bé la nucleoprotamina del grill és un cas d'estructura simple formada per l'associació de molècules complexes, la nucleoprotamina dels cefalòpodes encara ho és més. Suau i Subirana (1977) han mostrat, per difracció de rajos X aplicada a nuclis i a complexos reconstituïts DNA-protamina, que el nucli espermàtic del calamar (*Loligo vulgaris*) es pot considerar pràcticament tot ell una estructura semicristalina composta per hèlixs de DNA que es mantenen paral·leles i pròximes (seguint també l'eix principal del nucli) gràcies a la seva interacció amb la proteïna específica espermàtica (protamina). En els primers estudis es va interpretar que la protamina estava ubicada en el solc estret del DNA, però aquesta interpretació es va corregir en estudis posteriors (Fita *et al.*, 1983).

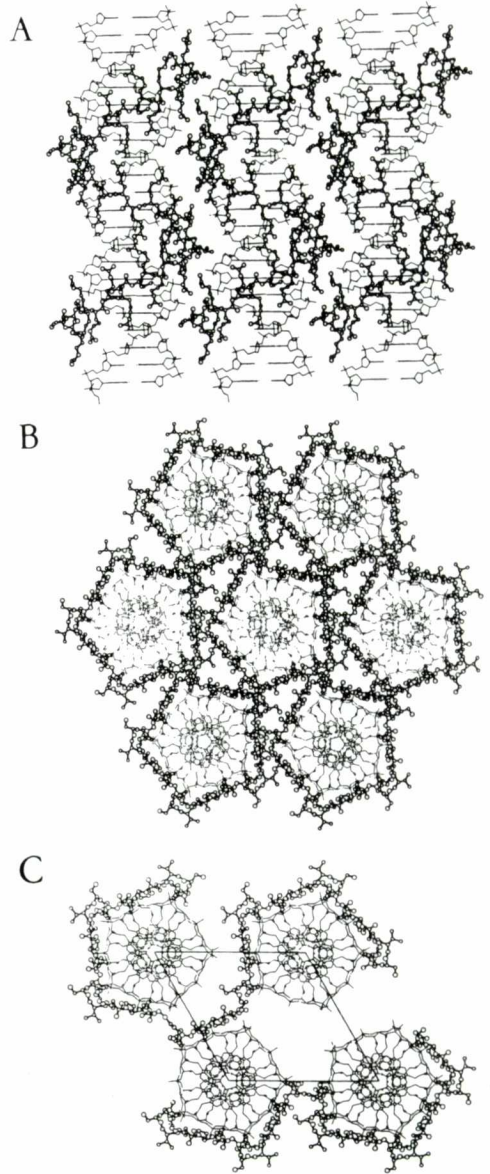


FIGURA 6. Projecció meridional (A) i equatorial (B) del complex protamina-DNA (traços gruixut i fi respectivament) en *G. divaricata* segons el model de Puigjaner *et al.* (1986). El complex DNA-protamina forma una estructura molt ben ordenada en el pla equatorial. La part C mostra la cel·la unitària ortoròmbica de l'empaquetament i la unió entre filaments paral·lels de DNA a través de les molècules de protamina.

L'anàlisi de les dades de microscòpia electrònica de la nucleoprotamina de *Gibbula divaricata* (un mol·lusc arqueogastròpode) i de la difracció de rajos X del complex del DNA amb un polipèptid molt similar (Puigjaner *et al.*, 1986) ens indica que el nucli espermàtic estaria format per una sèrie de grànuls grossos estretament adossats els uns als altres. Cada un d'aquests grànuls contindria fibres de DNA orientades paral·lelament amb una estructura similar a la descrita per al calamars. Les cadenes de la protamina es trobarien també associades al solc ample de la doble hèlix, amb les arginines unides per ponts d'hidrogen als fosfats del DNA i penetrant parcialment en els solcs menors de les cadenes de DNA adjacents. Aquesta disposició empaquetaria el DNA en una cel·la quasihexagonal. La figura 6 mostra una aproximació a l'estructura d'aquesta nucleoprotamina.

La nucleoprotamina dels mamífers constitueix, conjuntament amb la d'alguns mol·luscs i condroïctis, un cas diferent respecte a les esmentades fins ara. Les protamines d'aquestes espècies contenen una gran proporció d'aminoàcids bàsics però també són molt riques en cisteïna (Calvin i Bedford, 1971; Calvin, 1975; Bellvé *et al.*, 1988; Gusse i Chevaillier, 1978; Gusse *et al.*, 1983; Subirana *et al.*, 1973; Saperas *et al.*, 1993c). Això els permet unir-se amb el DNA (a través sobretot dels aminoàcids bàsics) però, addicionalment, formar enllaços interprotamínics forts (covalents) a través de ponts de disulfur establerts entre dues cisteïnes de diferents molècules. El resultat és un nucli extraordinàriament estable químicament i físicament. Els ponts de disulfur que forma la nucleoprotamina de mamífers han estat estudiats per Balhorn i col·laboradors (Balhorn, 1982, 1989; Balhorn *et al.*, 1991) tractant el nucli intacte amb agents reductors i seguint la modificació de cada residu de cisteïna marcat radioacti-

vament; en aquests estudis s'ha aplicat també una combinació de tècniques d'HPLC, mapes peptídics i seqüenciació de pèptids per tal d'analitzar amb exactitud la posició de les cisteïnes marcades. El model que suggereixen aquests autors és el representat a la figura 7: la protamina posseeix els extrems N- i C- terminals doblegats cap al centre de la molècula; aquest doblegament estaria estabilitzat per ponts de disulfur intramoleculars; addicionalment cada molècula de protamina formaria tres enllaços *cis*-S-S-*cis* intermoleculars (o sigui amb altres protamines). La «xarxa queratinosa» creada per les unions interprotamíniques atraparia les hèlixs del DNA de manera que la nucleoprotamina no pot ser dissociada per agents químics sense haver reduït prèviament els ponts de disulfur intermoleculars. En el model proposat en aquests estudis es considera que les molècules de protamina es troben col·locades en el solc estret del DNA, encara que hi ha proves que indiquen que les protamines dels mamífers també es trobarien encaixades, en bona part, en el solc ample. D'altra banda, l'organització dels complexos nucleoprotamínics dels mamífers no és homogènia. Allen *et al.* (1993) han observat a través de microscòpia de força atòmica la presència de nòduls de 50 a 100 nm que podrien representar el primer «ordre superior» d'empaquetament del complex protamina-DNA. En nuclis parcialment condensats sembla observar-se que els nòduls de 50-100 nm es formarien a partir de xarxes de «llaços» fibrosos. Contràriament, altres estudis de microscòpia indiquen que en els mamífers la nucleoprotamina espermàtica estaria organitzada en làmines paral·leles i adossades que seguirien la forma aplanada del nucli (Fawcett, 1975; Livolant, 1984). Encara és difícil harmonitzar els resultats obtinguts per microscòpia de força atòmica amb les observacions per microscòpia electrònica convencional de la condensació dels nuclis espermàtics de mamífers.

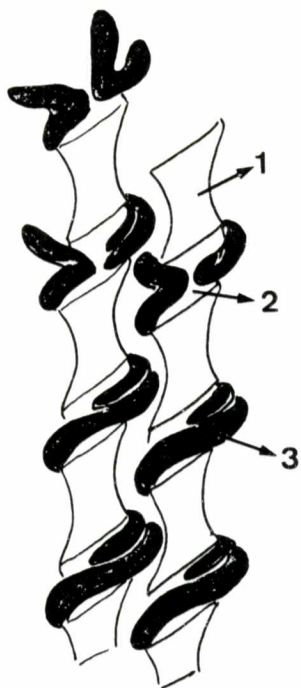


FIGURA 7. Model de Balhorn sobre les relacions entre protamina i DNA en els mamífers: les molècules de protamina (3) es troben ubicades en el solc estret del DNA (2). Entre les diferents molècules s'estableixen ponts covalents S-S que uneixen els complexos. Els filaments de DNA es troben molt pròxims i part de la protamina associada al solc estret d'un filament s'interpenetra parcialment en el solc ample (1) del veí.

Altres estructures

L'elecció de la nucleohistona i la nucleoprotamina com a casos generals d'empaquetament del DNA espermàtic respon al fet que una bona proporció dels espermatozoides animals estudiats presenten aquestes estructures. Molts altres grups zoològics tenen altres tipus d'organització. Aquí en resumim alguns exemples.

1. En certs crustacis, l'estructura del nucli espermàtic observada al microscopi electrònic té un aspecte no electrodens. En aquestes espècies no s'hi ha trobat pro-

teïnes bàsiques que interaccionin amb el DNA, encara que en alguns casos han estat descrites una petita proporció de proteïnes àcides nuclears (Bloch, 1976; Chevaillier, 1967; Vaughn i Hinsch, 1972; Chiva *et al.*, 1992). En molts d'aquests nuclis es desconeix totalment quin és el contraió del DNA i com es troba organitzat estructuralment. Es pot avançar la hipòtesi que les proteïnes àcides podrien constituir una matriu nuclear especial que organitzaria el genoma.

2. Alguns bivalves presenten una estructura «dual» de la cromatina espermàtica (Ausió i Van Holde, 1987): una proporció del DNA es troba organitzada en forma de nucleohistona i la resta en forma de nucleoprotamina. Les proporcions al·ludides variarien segons les espècies.

3. Els nuclis espermàtics d'unes quantes espècies d'anurs tenen una organització «intermèdia» entre la nucleohistona i la nucleoprotamina. Els nuclis espermàtics contenen histones H3 i H4 i diverses proteïnes de tipus *linker* específiques però no contenen les histones H2A ni H2B (Kasinsky *et al.*, 1978, 1985b). En aquests nuclis no s'hi troben nucleosomes pròpiament dits, però sí estructures repetitives organitzades per les histones H3 i H4 (Katagiri, comunicació personal).

4. Molts altres espermatozoides tenen el DNA espermàtic organitzat exclusivament (o quasi exclusivament) per una proteïna de tipus *linker* modificada. Aquestes proteïnes contenen una zona globular similar en composició, seqüència i estructures secundària i terciària a la zona globular conservada de les histones H1 (Rocchini *et al.*, 1996; Ausió, 1995; Saperas, 1992; Saperas *et al.*, 1993a, 1993b) i contenen addicionalment un o dos braços N- i C- terminals molt bàsics, de tipus protamina. Un model de l'estructura d'aquests nuclis s'analitza més endavant. Una característica significativa d'aquest tipus de proteïna/organització és que apa-

reix esporàdicament en certs grups zoològics que no tenen una situació filogenètica pròxima (Chiva *et al.*, 1995). Aquest fet presenta una repercussió interessant per comprendre l'evolució de l'estructura de la cromatina espermàtica.

INTERACCIONS MOLECULARS DNA-PROTEÏNES ESPERMÀTIQUES

Definició del tipus de proteïnes considerades

Malgrat que s'han proposat diverses classificacions de les proteïnes que es troben organitzant el DNA en el nucli espermàtic, en aquesta revisió considerem tres tipus:

- histones
- histones amb parts especialitzades (parts específiques que pràcticament només es troben en el nucli espermàtic) (un exemple és la SpH₁; vegeu figura 4)
- proteïnes especialitzades (un exemple serien les protamines típiques de la figura 2)

Ens limitarem a revisar les qüestions més generals de les interaccions que amb el DNA fan les parts especialitzades de les histones i les proteïnes especialitzades (les designarem genèricament com «polipèptids especialitzats»).

Estructura primària

El fet més característic de l'estructura primària dels polipèptids especialitzats és la seva acumulació i la distribució de càrrega bàsica. Aquí distingim quatre disposicions o «motius» principals:

1. «Clusters». En algunes ocasions presenten grups d'arginines i lisines separats per

un o pocs aminoàcids no carregats (Ando *et al.*, 1973; Dixon *et al.*, 1995; Kasinsky, 1989). Aquests grups serien una unitat d'interacció electrostàtica dels pèptids amb els fosfats del DNA. La interacció seria cooperativa, la unió d'un grup de residus bàsics al DNA facilitaria la unió dels altres grups de la molècula (Willmitzer i Wagner, 1980).

2. *Unitats SPKK*. En altres ocasions els residus bàsics es poden trobar distribuïts en unitats repetitives SPBB (B significa lisina o arginina) (Von Holt *et al.*, 1984) que també representarien una unitat d'interacció amb el DNA.

3. *Distribució quasiuniforme com a unitat d'interacció*. En molts altres casos els residus bàsics es troben distribuïts de manera aparentment a l'atzar, però confereixen una densitat de càrrega quasi constant al llarg de la molècula (Subirana, 1990a).

4. *Zones alternants*. També ens podem trobar zones on els aminoàcids bàsics alternin amb un altre aminoàcid neutre, o fosforilable (per exemple R-S-R-S-R-S etc o G-K-G-K-G-K etc.); les zones (R-S)_n acostumen a estar col·locades en els extrems N-terminals (Daban *et al.*, 1995; Cáceres, 1995; Saperas *et al.*, 1997).

Els polipèptids especialitzats poden contenir simultàniament qualsevol de les combinacions d'aquests elements de distribució de càrrega bàsica. La densitat de càrrega bàsica sempre és superior a la de les histones somàtiques.

Un segon fet característic és que els polipèptids especialitzats posseeixen residus serina (o treonina amb menor freqüència), els quals en ser fosforilats/desfosforilats regulen la interacció del polipèptid bàsic amb el DNA (Willmitzer i Wagner, 1980; Oliva i Dixon, 1991). Els aminoàcids fosforilables es poden trobar aïllats o formant grups de dos.

En resum, l'anàlisi de l'estructura primà-

ria d'aquestes molècules mostra que el seu efecte principal és la neutralització de les càrregues negatives dels fosfats del DNA i que les càrregues bàsiques no es troben repartides a l'atzar sinó que hi ha uns «motius» que es repeteixen en diferents polipèptids. En els nuclis espermàtics la relació global aminoàcid bàsic/fosfat és pròxima al valor 1. De tota manera, com es comenta més endavant, en les unions polipèptids-DNA també intervenen altres tipus d'interaccions moleculars.

Estructura secundària dels polipèptids especialitzats

Verdaguer *et al.* (1993) han mostrat recentment a través de dicroisme circular que els pèptids rics en lisina i arginina posseeixen tots una proporció important d'estructura en alfa-hèlix, malgrat el potencial teòricament baix de l'arginina per formar alfa-hèlix en les proteïnes (Chou i Fasman, 1978). Aquests autors conclouen que (almenys en els polipèptids espermàtics) és necessari modificar els mètodes de predicció estructural de proteïnes i adjudicar a l'arginina una major helicogenicitat, punt que harmonitza amb estudis de Toniolo (Toniolo, 1980; Toniolo *et al.*, 1979) en què troben un 51% d'alfa-hèlix en les protamines típiques de peixos (les quals estan constituïdes en un 70% per residus d'arginina). Hill *et al.* (1989) també observen per dicroisme circular que almenys una part de l'extrem C-terminal de la histona SpH1 d'equinoderm (concretament els residus 121-248 que no contenen prolina) posseeix un alt contingut en alfa-hèlix. En el mateix treball mostren, per mitjà de digestions tríptiques de la cromatina espermàtica, que el segment esmentat també es troba estructurat en alfa-hèlix quan està unit al DNA. Els estudis del complex protamina-RNA per cristal·lografia de rajos X (Warrant i Kim, 1978)

conduïx a mapes de densitat electrònica que donen suport a la idea que les protamines s'unirien al DNA en la conformació d'alfa-hèlix. En resum, sembla que certs motius (principalment els que tenen arginines en *clusters* i els que tenen una distribució quasiconstant de càrrega) posseeixen un contingut apreciable d'alfa-hèlix. Hem de dir, però, que no tots els estudis estan d'acord amb la interpretació anterior: per tècniques de bescanvi de deuteri, Herskovits i Brahms (1976) no varen trobar presència d'alfa-hèlix ni làmina beta en protamines típiques, i Hud *et al.* (1994) tampoc no troben per mitjà d'espectroscòpia Raman conformacions alfa o beta en la protamina unida al DNA.

Les repeticions SPKK es troben en diversos polipèptids espermàtics independents (per exemple en la SpH1 d'equinoderms i en les PL de bivalves, etc.), i també poden ser presents en les regions C-terminal de les histones H1 no espermàtiques. De fet, segons Suzuki (Suzuki, 1989; Suzuki *et al.*, 1990a, 1990b) els tetrapèptids SPKK serien un cas especial d'un motiu genèric SPXX (X pot ser addicionalment serina, treonina, alanina o leucina) trobat en factors de transcripció i altres proteïnes que s'uneixen al DNA. Seria un motiu d'unió al DNA que forma un «gir-beta» especial, es col·loca en el solc menor del DNA i interacciona a través de ponts d'hidrogen. La conformació en «gir-beta» dels motius SPKK estaria estabilitzada per ponts d'hidrogen entre els grups OH i CO de la serina i els grups amida NH del tercer i quart aminoàcid del tetrapèptid (figura 8) (per a una discussió més àmplia d'aquestes estructures vegeu Poccia, 1995). La importància d'aquestes estructures queda evidenciada per la demostració que existeixen quinases i fosfatases específiques per a la seva serina (Suzuki *et al.*, 1990a, 1990b).

No hi ha de moment cap informació sobre

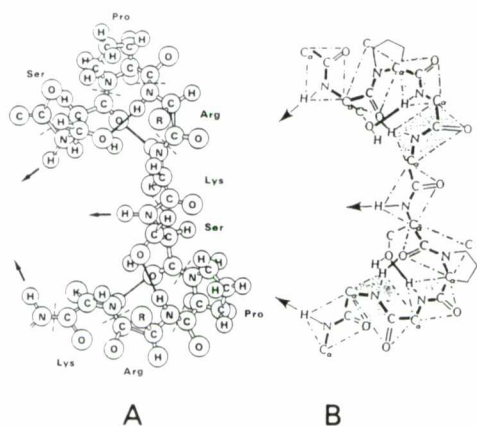


FIGURA 8. Estructura molecular secundària dels motius SPRK on es poden apreciar els enllaços que estableixen el «gir-beta» i els punts d'interacció amb el DNA (fletxes).

l'estructura secundària de les zones que hem definit com a alternances (R-S)n o (G-K)n.

La interacció polipèptid-DNA

L'aspecte principal d'aquestes interaccions es basa en la neutralització de les càrregues dels fosfats del DNA per part dels residus aminoacídics bàsics. Els grups bàsics de les arginines, les lisines i també de les histidines formarien ponts d'hidrogen amb els grups fosfats de les cadenes laterals del DNA. Suposat aquest fet, els estudis següents es varen centrar en la ubicació del polipèptid en el DNA. Malgrat que en els primers estudis per difracció de raigs X s'interpretava que la molècula estava ubicada en el solc estret del DNA (Feughelman *et al.*, 1955; Wilkins, 1956; Herskovits i Brahms, 1976; Suau i Subirana, 1977), actualment es pensa que les protamines, cadenes amb càrrega quasi constant, i els motius SPKK es troben en gran part col·locats en el solc ample del DNA (Mirzabekov *et al.*, 1976; Fita *et al.*, 1983). Subirana (1990b, 1991) ha proposat més recentment un model teòric diferent per a la interacció concreta DNA-pro-

tamina. Com es pot veure en la figura 9, es donaria una disposició paral·lela entre els polipèptids i les molècules de DNA; els polipèptids (protamina) s'acomodarien entre les molècules de DNA de manera que cada protamina (parcialment en conformació alfa) establiria unions amb tres diferents molècules de DNA i a la vegada cada molècula de DNA estaria envoltada per sis molècules de protamina. Les molècules de la protamina, en interaccionar amb diferents dobles cadenes de DNA, mantindrien unida tota l'estructura nuclear. Malgrat que aquest model es refereix a les protamines típiques, representa un marc teòric unificador de les interaccions que poden establir amb el DNA tant les protamines (proteïnes especialitzades) com les parts especialitzades de les histones espermàtiques, i addicionalment s'harmonitza parcialment amb la hipòtesi que algunes proteïnes especialitzades poden provenir evolutivament de la histona H1 a través de les parts especialitzades. Una variant d'aquest model és la que presenten Mi-

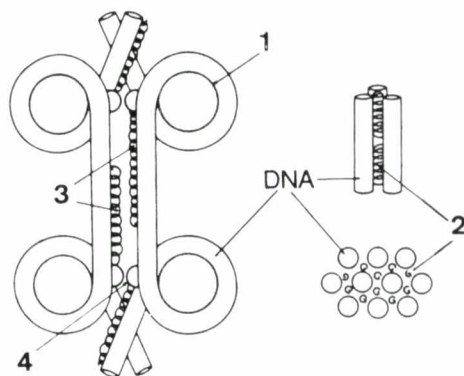


FIGURA 9. Esquerra: model de com es compactaria la nucleohistona espermàtica a través d'una histona linker amb extrems bàsics en alfa-hèlix (part especialitzada=3). Dreta: model de com una proteïna especialitzada (2) (anàloga a la part especialitzada=3) podria empaquetar el DNA en forma de nucleoprotamina. És factible imaginar una transició evolutiva de nucleohistona a nucleoprotamina tot mantenint la interacció DNA-parts especialitzades (2 i 3) i eliminant l'estructura nucleosòmica (1) i el cor hidrofòbic (4) de les histones linker (a partir de Subirana, 1991).

kelsaar i Raukas (comunicació personal a J. Subirana). Segons aquests autors, les zones en alfa-hèlix de la protamina ocuparien el solc major del DNA, mentre que altres regions de la protamina estarien ubicades en els espais intercatenaris; les arginines, en les regions alfa, neutralitzarien les càrregues negatives dels fosfats i podrien també formar ponts d'hidrogen amb guanines del DNA; els residus serina/ treonina completarien les hèlixs alfa i també formarien ponts d'hidrogen amb àtoms d'oxigen dels fosfats; els residus hidrofòbics estarien localitzats fonamentalment en els espais intercatenaris i podrien establir interaccions de Van der Waals amb residus similars d'altres protamines veïnes. Seria en aquesta regió que la protamina de mamífers formaria enllaços covalents *cis*-S-S-*cis* interprotamínics. Addicionalment a aquestes interaccions «horitzontals» entre protamines, es podrien establir interaccions verticals en el sentit que els extrems N-terminals d'una molècula es podrien unir amb els C-terminals de la protamina següent.

Pel que fa a les interaccions del DNA espermàtic amb els tetrapèptids SPKK, les principals característiques serien les següents: 1) en cada tetrapèptid, les dues càrregues positives dels residus bàsics formarien forts enllaços iònics amb el DNA; 2) la serina d'aquests motius pot ser fosforilada o desfosforilada per enzims específics, la fosforilació d'una serina implica l'adquisició de dues càrregues negatives que neutralitzarien la càrrega efectiva del tetrapèptid; 3) en l'espermatozoide, els pèptids amb SPKK repetitius s'unirien amb el DNA *linker*, cosa que optimitzaria l'eficàcia de l'empaquetament del DNA en el nucli.

Les estructures d'ordre superior específiques de la cromatina espermàtica

Com ja s'ha esmentat abans, de manera semblant al que passa amb les cèl·lules so-

màtiques, els espermatozoides que contenen histones en el seu nucli també formen fibres de 30 nm. Els gruixos d'aquestes fibres de «30» nm en els espermatozoides no són tan constants com els que presenten les cèl·lules somàtiques, sinó que oscil·len segons les espècies entre 20 i 50 nm. S'han observat en equinoderms (Kunkle, 1984), mol·luscs (Casas *et al.*, 1993), i peixos (Muñoz Guerra *et al.*, 1982a).

Un tipus d'estructura en fibra de «30» nm també es troba sovint en nuclis d'espermatozoides que no contenen histones (Suzuki i Wakakayashi, 1988; Casas *et al.*, 1993). És a dir, en molts casos la nucleoprotamina també forma fibres d'un diàmetre variable, però sempre al voltant dels 30 nm. És evident que aquestes fibres no són conseqüència d'una disposició més o menys regular de nucleosomes, ja que no existeixen histones en aquests complexos. Subirana (1992) suggereix que la formació de fibres d'aproximadament 30 nm és una conseqüència pràcticament obligada quan es consideren els paràmetres termodinàmics de les interaccions del DNA i el contraió. L'efecte del contraió no és el principal determinant de la forma (fibril·lar) dels complexos sinó que en tot cas podria ser el responsable de les petites variacions del diàmetre de les fibres.

Els estudis *in vitro* de la condensació del DNA per protamines mostren la formació de varetes i partícules toroïdals, el volum de les quals depèn de la força iònica de la solució emprada (García Ramírez i Subirana, 1994). En condicions «fisiològiques» (100 mM Na⁺), els complexos toroïdals presenten un gruix de 20 a 30 nm. Ward i Coffey (1991) proposen un model hipotètic de transició de nucleohistona (en les espermàtides) a nucleoprotamina (en els espermatozoides). Segons aquest model, sis nucleosomes (una volta de la fibra solenoide de 30 nm somàtica) es «desenredarien» tot mantenint, però,

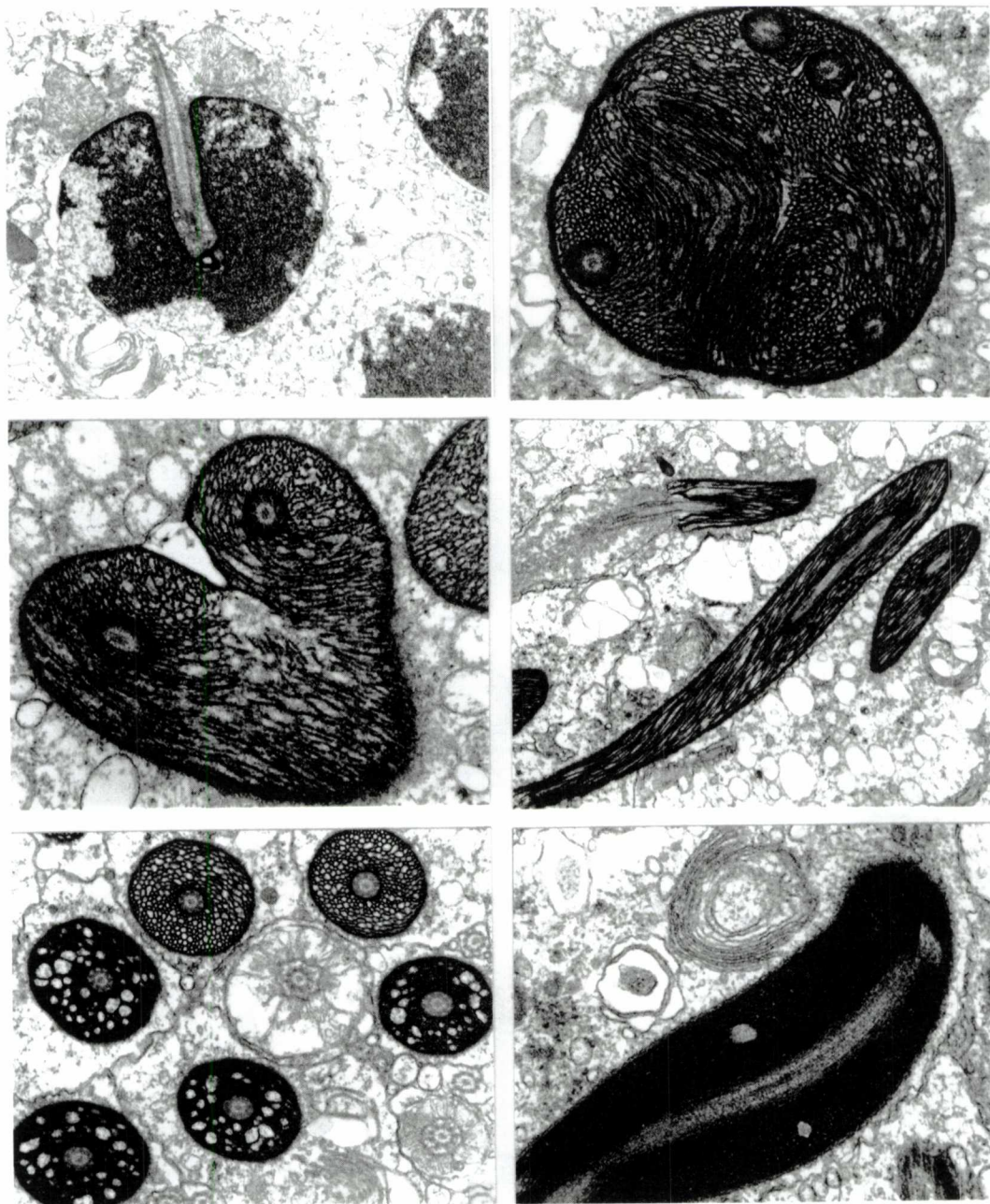


FIGURA 10. Exemple de les imatges que s'obtenen per microscòpia electrònica convencional de la compactació de la cromatina al llarg d'una selecció de diferents estadis de l'espermioquèsi del mol·lusc prosobranqui *Thais hemostoma* (d'esquerra a dreta, de dalt a baix). L'exemple demostra la relació entre la cromatina i altres estructures (l'axonema en aquest cas) i també mostra com en l'espermatozoide madur les diferents «superestructures» de la cromatina poden fondre's entre elles en l'espermatozoide (a sota, a la dreta) i emmascarar tot el procés de condensació (micrografies obtingudes per E. Ribes i M. Chiva en els Serveis Científicotècnics de la UB).

la configuració solenoide per a les proteïnes de transició i després per a les protamines.

Actualment es comença a utilitzar la microscòpia de força atòmica en l'estudi de la cromatina espermàtica. És destacable l'estudi d'Allen *et al.* (1993) sobre la cromatina de mamífers, on es posa de manifest la presència de nòduls de 50-100 nm (segurament correspondrien a partícules toroïdals). Independentment, Hud *et al.* (1993) proposen que la unitat fonamental d'empaquetament del DNA espermàtic és una estructura toroïdal de 90 nm de diàmetre extern, 15 nm de diàmetre intern i que conté unes 60 quilobases de DNA. Aquests autors suggereixen que aquesta seria la unitat fonamental d'empaquetament per a totes les espècies que utilitzen protamina.

L'organització a nivells més elevats de la nucleoprotamina és bastant difícil d'estudiar a causa dels artefactes originats pels procediments de descondensació i dispersió de la cromatina. Tot i així, els estudis per microscòpia electrònica de la cromatina espermàtica explotada (o simplement inflada) també han contribuït al coneixement de la subestructura de la cromatina. En el gall, el ratolí i el moltó (Kierszenbaum i Tres, 1978; McMaster Kaye i Kaye, 1980; Risley *et al.*, 1986; Loir *et al.*, 1985), s'ha mostrat que l'estructura nucleosòmica es perd a mesura que avança la diferenciació espermiogènica. Aquests experiments han mostrat la transformació de les fibres típiques en «collaret de perles» de la cromatina somàtica en fibres lliures de cromatina en els últims estadis espermiogènics. També les anàlisis de la topologia del DNA en *Rana catesbiana*, *Xenopus laevis* i *Bufo fowleri* suggereixen que els nucleosomes es perden quan les histones són reemplaçades: Risley *et al.* (1986) observen que en nuclis on s'han eliminat les proteïnes (nucleoides), el DNA presenta superhelicitat negativa en els nucleoides que contenen el complement total d'histones

(per exemple *Rana*) però no en els nucleoides dels espermatozoides de *Xenopus* i *Bufo*, on les histones han estat reemplaçades per protamines. El reemplaçament de les histones en aquestes espècies es veu, per tant, acompanyat d'un desplegament del DNA nucleosòmic i d'una eliminació activa de la superhelicitat negativa. Concretament en *Xenopus*, la transició del DNA amb superhelicitat negativa a l'estat relaxat té lloc durant els estadis finals de l'espermiogènesi.

Els estudis que probablement preserven més la morfologia global de les superestructures de la cromatina dels gàmetes són les observacions per microscòpia electrònica convencional de seccions de les diverses cèl·lules espermiogèniques. Un avantatge important d'aquesta tècnica és que es pot observar l'evolució de les superestructures en què es condensa la cromatina fins al grau assolit en l'espermatozoide (figura 10). Hi ha un nombre extraordinari de treballs per microscòpia electrònica aplicats a l'espermiogènesi. Aquests estudis han revelat també una extraordinària diversitat en els patrons de condensació utilitzats per aconseguir la compactació final del nucli espermàtic. Els diferents tipus d'estructures superiors de la cromatina espermàtica s'han classificat genèricament en tres tipus de patrons: patró de condensació granular, fibril·lar i lamel·lar. Sembla clar que la gran diversitat de patrons de condensació està relacionada amb la diversitat de les proteïnes específiques espermàtiques i amb la diversitat dels processos de reemplaçament de les histones durant les espermiogènesis.

ORGANITZACIÓ DEL GENOMA EN EL NUCLI ESPERMÀTIC

L'organització de la cromatina espermàtica en una arquitectura específica té sentit per diverses raons.

La precisió en la forma i les dimensions del nucli és extraordinàriament elevada (tret possiblement dels espermatozoides humans). En algunes soques de ratolí estudiades, el 95% dels nuclis espermàtics tenen exactament la mateixa forma i dimensions i els coeficients de variació són només del 4% (Wyrobeck *et al.*, 1976). La forma i el volum del nucli espermàtic ha d'estar sota control genètic, ja que els defectes en la morfogènesi nuclear (forma, volum i condensació de la cromatina) condueixen a una fertilitat disminuïda (Meistrich, 1993). La morfogènesi del nucli espermàtic es troba determinada per una sèrie de factors, entre els quals hi ha l'arquitectura de la condensació de la cromatina.

Una altra raó més important per a l'organització del genoma en el nucli espermàtic prové de la necessitat que es puguin transcriure els gens apropiats immediatament després de la fertilització. El mecanisme de metilació de certs gens del DNA espermàtic pot ser una de les premisses necessàries per a la regulació del genoma embrionari, i l'accessibilitat immediata d'aquests gens en pot ser una altra.

El desenvolupament de les diverses tècniques d'hibridació *in situ* i de la microscòpia confocal ha aportat informació interessant sobre la localització dels diferents dominis cromosòmics en els nuclis. Aquestes tècniques s'han aplicat fonamentalment als nuclis somàtics, on s'ha demostrat que els cromosomes ocupen diferents territoris, que les disposicions dels centròmers i dels telòmers varien organitzadament d'acord amb el cicle cel·lular, i també que la matriu nuclear organitza el cromosoma somàtic (vegeu Stroubolis i Wolfe, 1996; Hozák, 1996 i referències incloses). Els estudis sobre l'arquitectura del genoma en l'espermatozoide encara són escassos. Els estudis per microscòpia òptica ja han demostrat des de fa temps que la cromatina dels centròmers

ocupa llocs especials i reproduïbles en els nuclis de les espermatides i espermatozoides (Schmid i Krone, 1975; 1976; Dressler i Schmid, 1976). Més recentment Powell *et al.* (1991) han examinat la distribució de diferents seqüències de DNA repetitiu en l'espermatozoide boví a través de la hibridació amb sondes específiques. En aquests experiments s'observava que algunes sondes presentaven una distribució a l'atzar, mentre que d'altres (concretament les que hibridaven amb seqüències centromèriques i DNA ribosòmic) es col·locaven en una fina banda equatorial. Sembla clar que el DNA centromèric ocupa una posició predeterminada en el nucli espermàtic, la qual cosa podria estar relacionada amb la unió d'una histona especial a aquest DNA (Palmer *et al.*, 1991). Altres experiments han demostrat la preservació del centròmer com un domini cromosòmic en l'espermatozoide humà i també interaccions específiques entre centròmers de cromosomes no homòlegs i entre telòmers. En un estudi combinat de fluorescència d'hibridació *in situ*, microscòpia convencional d'epifluorescència i microscòpia confocal d'escandallatge per làser, Zalensky *et al.* (1995) defensen que el DNA de l'espermatozoide no està distribuït a l'atzar,

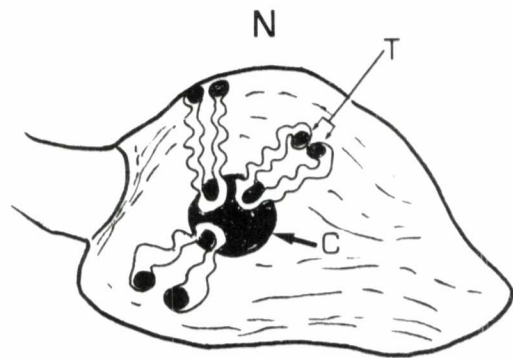


FIGURA 11. Organització dels cromosomes en l'interior del nucli espermàtic (N); C. Cromocentre (en l'interior); T. Telòmers disposats a la perifèria.

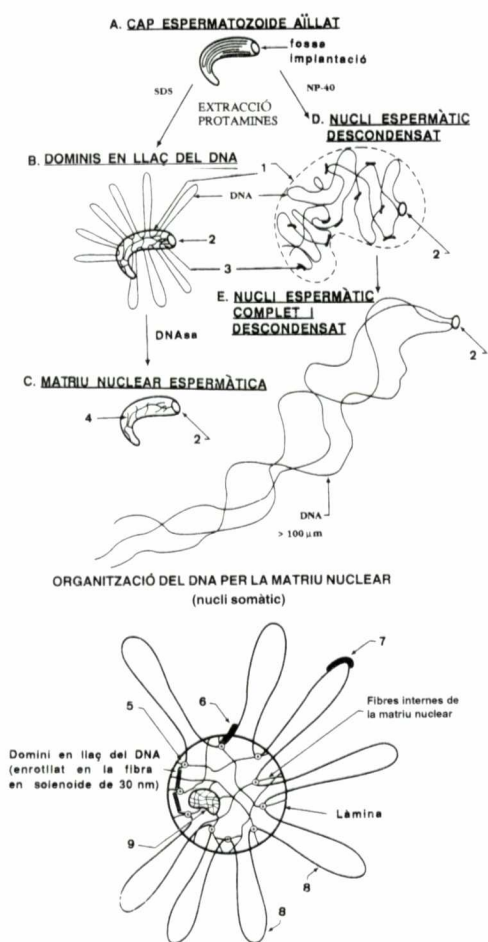


FIGURA 12. Model de Ward i Coffey que proposa una organització del nucli espermàtic similar en certs aspectes a l'arquitectura general dels nuclis somàtics. El genoma espermàtic (a dalt) es trobaria ancorat i organitzat per diverses estructures tals com la teca perinuclear (1), l'anell nuclear (2) i la matriu nuclear espermàtica (3 i 4). La matriu també organitzaria el DNA espermàtic en llaços (*loops*) de diferent mida. A sota: esquema de l'organització del nucli somàtic, llocs d'unió del DNA a la matriu (5); gen actiu (pròxim a la matriu) (6); gen inactiu (7); dominis en «loop» del DNA (8); nuclèol residual (forma part del complex de la matriu nuclear) (9).

seqüències poc repetitives de DNA en l'espermatozoide humà. En el seu treball varen obtenir separatament una fracció de DNA (un 15%) associat a histones i una fracció (85%) associat a protamines i varen demostrar que cada una d'aquestes fraccions contenien seqüències específiques i, per tant, uns gens concrets es trobarien associats a histones en l'espermatozoide, mentre que els altres es trobarien associats a la protamina.

La matriu nuclear espermàtica hauria de ser la base estructural per a l'organització de la cromatina espermàtica. Els estudis morfològics són contradictoris (Meistrich, 1993), però Bellvé (1982) descriu una matriu de material fibrós a l'interior del nucli espermàtic de ratolí. Altres investigadors defensen que, en cas d'existir, la matriu nuclear espermàtica no estaria formada per les laminines típiques que conformen la matriu somàtica (Moss *et al.*, 1987). Ward i col·legues, en una sèrie de treballs (Ward i Coffey 1989, 1990, 1991; Ward i Cummings, 1991; Ward *et al.*, 1989), han detectat la presència d'una matriu de composició desconeguda en l'espermatozoide d'hàmsster. Proposen un model d'arquitectura nuclear en alguns aspectes similar al somàtic (explicat en el peu de la figura 12). Malgrat que aquest model no hagi estat comprovat, serveix com a indicador de l'existència d'elements estructurals que poden organitzar la cromatina i donar suport estructural al nucli espermàtic.

En síntesi, els experiments són escassos però suggereixen que els diferents gens no es troben empaquetats i col·locats de qualsevol manera sinó que alguns d'ells ocuparien posicions especials i crítiques en el nucli espermàtic, mentre que d'altres es podrien trobar associats a subpoblacions específiques de proteïnes espermàtiques. De fet, la consideració de la precisió i la reproductibilitat en l'empaquetament de la cromatina espermàtica i dels seus processos durant

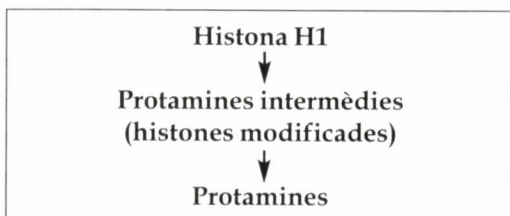
sinó que hi ha almenys unes certes regions distribuïdes específicament (vegeu la figura 11). En un altre tipus d'estudi, Gatewood *et al.* (1987) varen examinar la distribució de

l'espermioïgènesi ens condueix a comparar-la amb l'especificitat de la condensació del cromosoma mitòtic: «...és molt difícil imaginar com es pot produir una condensació reproduïble dels cromosomes (mitòtics) sense l'existència de llocs en *cis* que serveixin com a marcadors específics per a dirigir la condensació.» (Koshland i Strunnikov, 1996).

EVOLUCIÓ DE L'ESTRUCTURA DE LA CROMATINA ESPERMÀTICA

Un dels aspectes més sorprenents de l'estructura de la cromatina espermàtica és la manca d'un model representatiu i la gran variabilitat entre diferents espècies. Aquest fet es troba indiscutiblement associat, entre altres coses, a la també extraordinària variabilitat de les proteïnes específiques espermàtiques i dels processos de recanvi proteic durant l'espermioïgènesi.

Les idees sobre l'evolució de les proteïnes específiques del nucli espermàtic porten implícita una concepció de l'evolució de l'estructura de la cromatina. El concepte més repetit en la bibliografia és que les protamines provenen de les histones, possiblement de la histona H1, per mitjà d'una progressiva basificació dels seus extrems i finalment mitjançant una pèrdua de la zona globular (Subirana i Colom, 1987; Ausió, 1995).



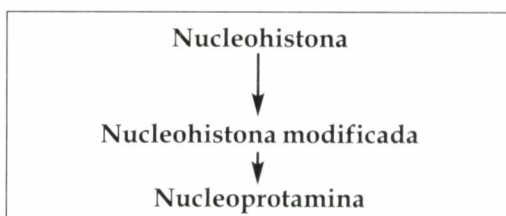
Per raó que en alguns espermatozoides es troben histones canòniques, en altres, histones *linker* modificades i en altres, simple-

ment protamines, la conseqüència immediata és que l'estructura de la cromatina espermàtica ha seguit un procés paral·lel.

Aquest model, malgrat que sigui simple i que pugui ser cert en casos particulars, no és en absolut aplicable de manera general (Chiva *et al.*, 1995; Saperas *et al.*, 1994, 1996 i la introducció de Kasinsky, 1995). És impossible harmonitzar-lo amb els fets següents:

1. La cromatina espermàtica de tipus nucleohistona «pura» es troba esporàdicament en animals que no es poden considerar d'ascendència «primitiva», sinó que varen aparèixer relativament tard en l'evolució: s'ha descrit nucleohistona pura en alguns peixos ossis (Saperas *et al.*, 1994), en algunes espècies aïllades de mol·luscs bivalves (Ausió, 1995) i en *Limulus polyphemus* (Muñoz Guerra *et al.*, 1982).

2. Els animals d'ascendència més primitiva (és a dir els que varen aparèixer primer) estudiats en aquest aspecte són els Cnidaris. Aquest grup no conté nucleohistona en el seu espermatozoide, sinó que el DNA es troba organitzat exclusivament per una proteïna intermèdia (una proteïna amb un cor globular de tipus histona H1 i uns extrems de tipus protamina). Els Cnidaris es varen separar molt tempranament de la resta d'animals, però ja presenten aquesta proteïna especialitzada (Rocchini *et al.*, 1996). Això indica que la nucleohistona espermàtica es va perdre en estadis molt antics de l'evolució



(si és que va existir alguna vegada com a model ancestral).

3. El seguiment de qualsevol línia filo-

genètica no indica que s'hagi respectat estrictament la tendència **nucleohistona->nucleoprotamina** en cadascuna d'elles, encara que es pot aplicar a casos particulars. Com a exemple, en revisar les proteïnes que estructuren la cromatina en diversos taxons de Deuteròstoms (Chiva *et al.*, 1995) s'observa que: els equinoderms posseeixen nucleohistona especialitzada; els tunicats i els cefalocordats, nucleoprotamina; els agnats, nucleohistona pura; els condroïctis tenen una nucleoprotamina molt especialitzada similar en certs aspectes a la dels mamífers; els peixos ossis contenen nucleohistona pura, nucleohistona especialitzada o nucleoprotamina, segons els diferents grups; els amfibis poden contenir nucleohistona especialitzada, una organització intermèdia entre nucleohistona, o nucleoprotamina i nucleoprotamina similar a alguns peixos ossis, etcètera.

A partir de les diferents revisions (i citades al llarg del present capítol, suggerim un marc hipotètic per interpretar les «evolucions» diverses de l'estructura de la cromatina en l'espermatozoide:

1. El nucli de les cèl·lules espermàtiques està sotmès contínuament a una pressió evolutiva que el condueix a adquirir un volum molt reduït. La condensació de la cromatina és una característica íntimament relacionada amb la reducció del volum nuclear.

2. En la història evolutiva dels animals, la nucleohistona va ser molt aviat reemplaçada en l'espermatozoide per una estructura diferent, més condensada.

3. Al llarg de l'evolució, moltes espècies han tendit a compactar el DNA espermàtic fins a un grau màxim (relació d'empaquetament tendint al valor 1 en les nucleoprotamines). Aquesta compactació s'ha assolit independentment en diverses línies i en diversos temps i ha produït diverses nucleoprotamines.

4. Contràriament, algunes altres espècies

poden haver perdut la funcionalitat de l'expressió dels gens de les proteïnes específiques i la seva cromatina ha revertit a la nucleohistona «pura». Aquest estadi pot ser un nou punt de partida d'una evolució cap a una progressiva reducció del nucli, on poden adquirir molta importància formes proteiques relacionades amb la histona H1.

Resumidament, sembla que hi ha hagut una gran independència entre les línies taxonòmiques i també un gran nombre de reversions a nucleohistona dins d'un marc general de tendència a la reducció del volum nuclear.

AGRAÏMENTS

Els autors agraeixen als Drs. Lluís Cornudella i Joan A. Subirana els seus consells i el seu ajut. M. Chiva també agraeix a la seva esposa Magda Blanch el seu suport humà. Aquest treball ha estat subvencionat per l'ajut PB 93-1067 (Ministeri d'Educació i Ciència), per la beca FI 963037 (Generalitat de Catalunya) (Pepita Gimenez-Bonafé) i per un ajut de l'ICI (Luis del Valle).

BIBLIOGRAFIA

- ABOUKARSH, N.; KUNKLE, M. (1985). «Ultrastructural organization of heterochromatin within sea sperm nuclei». *Gam. Res.*, núm. 12, pàg. 55-64.
- ALEGRE, C.; SUBIRANA, J. A. (1989). «The diameter of chromatin fibers depends on linker length». *Chromosoma*, núm. 98, pàg. 77-80.
- ALLEN, M. J.; LEE, C.; LEE, J. D.; POGANY, G. C.; BALOOCH, M.; SIEKHAUS, W. J.; BALHORN, R. (1993). «Atomic force microscopy of mammalian sperm chromatin». *Chromosoma*, núm. 102, pàg. 623-630.
- ANDO, T.; YAMASAKI, M.; SUZUKI, K. (1973). *Protamines*. Springer-Verlag, Berlín. Heidelberg. Nova York.
- ARCECI, R. J.; GROSS, P. R. (1980). «Sea urchin sperm chromatin structure as probed by pancreatic DNase I: evidence for a novel cutting periodicity». *Dev. Biol.*, núm. 80, pàg. 210-224.

- AUSIÓ, J. (1986). «Structural variability and compositional homology of the protamine-like components of the sperm from the bivalve molluscs». *Comp. Biochem. Physiol.*, núm. 85B, pàg. 439-449.
- AUSIÓ, J. (1995). «Histone H1 and the evolution of the nuclear sperm-specific proteins». A: Jamieson, BGM, Ausió, J. i Justine, J. L. (ed.). *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy. Mém. Mus. natn. Hist. nat.*, París, núm. 166, pàg. 447-462.
- AUSIÓ, J.; VAN HOLDE, K. E. (1987). «A dual chromatin organization in the sperm of the bivalve mollusc *Spisula solidissima*». *Eur. J. Biochem.*, núm. 165, pàg. 363-371.
- AZORIN, F.; OLIVARES, C.; JORDAN, A.; PÉREZ-GRAU, L.; CORNUDELLA, L.; SUBIRANA, J. A. (1983). «Heterogeneity of the histone-containing chromatin in the sea cucumber spermatozoa». *Exp. Cell Res.*, núm. 148, pàg. 331-344.
- AZORIN, F.; ROCHA, E.; CORNUDELLA, L.; SUBIRANA, J. A. (1985). «Anomalous nuclease digestion of *Holothuria* sperm chromatin containing histone H1 variants». *Eur. J. Biochem.*, núm. 148, pàg. 529-532.
- BALHORN, R. (1982). «Mammalian protamines: Structure and molecular interactions». Kenneth W. Adolph (ed.). *A: Molecular Biology of Chromosome Function*. Springer-Verlag, pàg. 366-420.
- BALHORN, R.; CORZETT, M.; MAZIRMAS, J.; WATKINS, B. (1991). «Identification of bull protamine disulphides». *Biochemistry.*, núm. 30, pàg. 175-181.
- BARONE, J. R.; DE LARA, J.; CUMMINGS, K. B.; WARD, W. S. (1994). «DNA organization in human spermatozoa». *J. Androl.*, núm. 15, pàg. 139-144.
- BEDOYAN, J. R.; LEJNINE, S.; MAKAROV, V.; LANGMORE, J. P. (1996). «Condensation of rat telomere-specific nucleosomal arrays containing unusually short DNA repeats and histone H1*». *J. Biol. Chem.*, núm. 271, pàg. 18485-18493.
- BELLVÉ, A. R. (1982). «Biogenesis of the mammalian spermatozoan». A: Prospects for sexing mammalian sperm. R.P. Amann and G.E. Seidel IV, eds. Colorado. Associated University. Boneder, pàg. 69-102.
- BELLVÉ, A. R.; MCKAY, D. J.; RENAUX, B. S.; DIXON, G. H. (1988). «Purification and characterization of mouse protamines P1 and P2. Amino acid sequence of P2». *Biochemistry.*, núm. 27, pàg. 2890-2897.
- BLACKBURN, E. H.; GREIDER, C. W.; (ed.) (1995). «Telomers». Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Harbor Lab. Press.
- BLOCH, D. P. (1969). «A catalog of sperm histones». *Genetics (Suppl.)*, núm. 61, pàg. 93-111.
- BLOCH, D. P. (1976). «Histones of sperm». A: R.C. KING, *Handbook of Genetics*, (ed.) Plenum Press, Nova York, núm. 5, pàg. 139-167.
- CÁCERES, C. (1995). «Estudi de les proteïnes que condensen el DNA al llarg de l'espermatogènesi del cargol *Murex brandaris*». Tesi Doctoral. Universitat Politècnica de Catalunya.
- CALVIN, H. I. (1975). «Keratinoid proteins in the heads and tails of mammalian spermatozoa». *Biol. J. Linn. Soc.*, núm. 7, pàg. 257-273.
- CALVIN, H. I.; BEDFORD, J. M. (1971). «Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturations in the epididymis». *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, núm. 13, pàg. 65-75.
- CASAS, M. T.; AUSIÓ, J.; SUBIRANA, J. A. (1993). «Chromatin fibers with different protamine and histone compositions». *Exp. Cell Res.*, núm. 204, pàg. 192-197.
- CHEVALLIER, P. (1967). «Mise en évidence et étude cytochimique d'une protéine basique extra-nucleaire dans les spermatozoïdes des crustacés décapodes». *J. Cell Biol.*, núm. 32, pàg. 547-556.
- CHIVA, M.; DABAN, M.; ROSENBERG, E.; KASINSKY, H. E. (1991). «Protamines in polyplacophors and gastropods as a model for evolutionary changes in Molluscan sperm basic proteins». A: Baccetti, B. (ed.) *Comparative Spermatology*, Academic Press. Nova York, núm. 4, pàg. 27-30.
- CHIVA, M.; KULAK, D.; ROSENBERG, E.; KASINSKY, H. E. (1992). «A protamine in crustacean, *Balanus nubilus* (Cirripedia, Thoracica) and its coexistence with acidic proteins in sperm nuclei». *Comp. Biochem. Physiol.*, núm. 102B, pàg. 935-939.
- CHIVA, M.; SAPERAS, N.; CÁCERES, C.; AUSIÓ, J. (1995). «Nuclear basic proteins from the sperm of Tunicates, Cephalochordates, Agnathans and Fish». A: Jamieson B. G. M., J. Ausió i J. L. Justine (ed.) *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy. Mém. Mus. natn. Hist. nat.*, París, núm. 166, pàg. 501-514.
- CHOU, P. Y.; FASMAN, G. D. (1978). «Empirical predictions of protein conformation». *Annu. Rev. Biochem.*, núm. 47, pàg. 251-276.
- CLARKE, H. (1992). «Nuclear and chromatin composition of mammalian gametes and early embryos». *Biochem. Cell. Biol.*, núm. 70, pàg. 856-866.
- CORNUDELLA, L.; ROCHA, E. (1979). «Nucleosome organization during germ cell development in the sea cucumber *Holothuria tubulosa*». *Biochemistry.*, núm. 18, pàg. 3724-3732.
- DABAN, M.; CÁCERES, C.; SAPERAS, N.; KESSRA, G.; CHIVA, M. (1991). «Les proteïnes dels espermatozoïdes en els molluscs». *Treb. Soc. Cat. Biol.*, núm. 42, pàg. 35-61.
- DABAN, M.; MARTINAGE, A.; KOUACH, M.; CHIVA, M.; SUBIRANA, J. A.; SAUTIERE, P. (1995). «Sequence analysis and structural features of the largest known protamine isolated from the sperm of the archaeogastropod *Monodonta turbinata*». *J. Molec. Evol.*, núm. 40, pàg. 663-670.
- DE LANGE, T. (1992). «Human telomers are attached to the nuclear matrix». *EMBO J.*, núm. 11, pàg. 717-724.
- DIXON, G. M.; AIKEN, J. M.; JANKOWSKY, J. M.; MCKENZIE, D. I.; MOIR, R.; STATES, J. C. (1985). «Organization and evolution of protamine genes of salmonid

- fishes». A: Reck G. R., Good-Win G. H. and Puigdomènech, P. (ed.) *Chromosomal proteins and gene expression*, Nova York, Plenum Press. pàg. 287-314.
- DRESSLER, B.; SCHMID, M. (1976). «Specific arrangement of chromosomes in the spermiogenesis of *Gallus domesticus*». *Chromosoma*, núm. 58, pàg. 387-391.
- FAWCETT, D. W. (1975). «The mammalian spermatozoa». *Develop. Biol.*, núm. 44, pàg. 394-436.
- FEUGHELMAN, M.; LAUGRIDGE, R.; SEEDS, W. E.; STOCKES, A. R.; WILSON, H. R.; HOOPER, C. W.; WILKINS, M. H. F.; BARCLAY, R. K.; HAMILTON, L. D. (1995). «Molecular structure of deoxyribonucleic acid and nucleoprotein». *Nature*, núm. 175, pàg. 834-838.
- FITA, I.; CAMPOS, J. L.; PUIGIANER, L. C.; SUBIRANA, J. A. (1983). «X-ray diffraction study of DNA complexes with arginine peptides and their relation to nucleoprotamine structure». *J. Mol. Biol.*, núm. 167, pàg. 157-177.
- GARCÍA-RAMÍREZ, M.; SUBIRANA, J. A. (1994). «Condensation of DNA by basic proteins does not depend on protein composition». *Biopolymers*, núm. 34, pàg. 285-292.
- GATEWOOD, J. M.; COOK, G. R.; BALHORN, R.; BRADBURY, E. M.; SCHMID, C. W. (1987). «Sequence specific packaging of DNA in human sperm chromatin». *Science*, núm. 236, pàg. 962-964.
- GIANASCA, P. J.; HOROWITZ, R. A.; WOODCOCK, C. L. (1993). «Transitions between *in situ* and isolated chromatin». *J. Cell Science*, núm. 105, pàg. 551-561.
- GREEN, G. R.; POCCIA, D. L. (1985). «Phosphorylation of sea urchin sperm H1 and H2B histones precedes chromatin decondensation and H1 exchange during pronuclear formation». *Dev. Biol.*, núm. 108, pàg. 235-245.
- GREEN, G. R.; POCCIA, D. L. (1988). «Interaction of sperm histone variants and linker DNA during spermiogenesis in the sea urchin». *Biochemistry*, núm. 27, pàg. 619-625.
- GREIDER, C. W. (1996). «Telomere length regulation». *Ann. Rev. Biochem.*, núm. 65, pàg. 337-365.
- GUSSE, M. P.; CHEVALLIER, P. (1978). «Étude ultrastructurale et chimique de la chromatine au cours de la spermatogenèse de la roussette *Scylliorhinus caniculus* (L)». *Cytobiologie*, núm. 16, pàg. 421-443.
- GUSSE, M. P.; SAUTIERE, P.; CHAUVIERE, M.; CHEVALLIER, P. (1983). «Extraction, purification and characterization of the sperm protamines of the dog-fish *Scylliorhinus caniculus*». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 748, pàg. 93-98.
- HECHT, N. B. (1989a). «Mammalian protamines and their expression». A: Hnilica, L.; Stein, G. i Stein J. (ed.), *Histones and other basic proteins*. CRC Press, Boca Ratón, Florida. pàg. 347-374.
- HECHT, N. B. (1989b). «Molecular biology of structural chromosomal proteins of the mammalian testis». A: *Molecular Biology of Chromosome Function*. R. W. Adolph (ed.), pàg. 396-420.
- HERSKOVITS, T. T.; BRAHMS, J. (1976). «Structural investigations on DNA-protamine complexes». *Biopolymers*, núm. 15, pàg. 687-706.
- HILL, C. S.; MARTIN, S. R.; THOMAS, J. O. (1989). «A stable α -helical element in the carboxi-terminal domain of free and chromatin-bound histone H1 from sea urchin sperm». *EMBO J.*, núm. 8, pàg. 2591-2599.
- HIRANO, T. (1995). «Biochemical and genetic dissection of mitotic chromosome condensation». *Trends Biol. Sci.*, núm. 20, pàg. 352-361.
- HIRANO, T.; MITCHISON, T. J.; SWEDLOW, J. R. (1995). «The SMC family: from chromosome condensation to dosage compensation». *Curr. Opin. Cell Biol.*, núm. 7, pàg. 329-336.
- HOZÁK, P. (1996). «The nucleoskeleton and attached activities». *Exp. Cell Res.*, núm. 229, pàg. 267-271.
- HUD, N. V.; ALLEN, M. J.; DOWNING, K. H.; LEE, J.; BALHORN, R. (1993). «Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy». *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, núm. 193, pàg. 1347-1354.
- HUD, N. V.; MILANOVICH, F. P.; BALHORN, R. (1994). «Evidence of novel secondary structure in DNA-bound protamine is revealed by Raman Spectrometry». *Biochemistry*, núm. 33, pàg. 7528-7535.
- KASINSKY, H. E. (1989). «Specificity and distribution of sperm basic proteins». A: Hnilica, L. S.; Stein, G. i Stein, J. (ed.), *Histones and other nuclear basic proteins*. CRC Press, Boca Ratón, Florida. pàg. 73-163.
- KASINSKY, H. E. (1995). «Evolution and origins of sperm nuclear basic proteins». A: Jamieson, B. G. M.; Ausiò, J. i Justine, J. L. (ed.), *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy*. *Mém. natn. Hist. nat.*, Paris, núm. 166, pàg. 463-473.
- KASINSKY, H. E.; HUANG, S. Y.; KWAUK, S.; MANN, M.; SWEENEY, M. A. J.; YEE, B. (1978). «On the diversity of sperm histones in the vertebrates: Electrophoretic variability of testis-specific histone patterns in Anura contrasts with relative constancy in Squamata». *J. Exp. Zool.*, núm. 203, pàg. 109-126.
- KASINSKY, H. E.; MANN, M.; LEMKE, M.; HUANG, S. Y. (1985a). «Diversity of sperm-basic chromosomal proteins in the vertebrates: A phylogenetic point of view». A: *Chromosomal proteins and gene expression*. G.R. Reeck; G.H. Goodwin and Puigdomènech P. (ed.) Nova York, Plenum Press. pàg. 337-359.
- KASINSKY, H. E.; HUANG, S. Y.; MANN, M.; ROCA, J.; SUBIRANA, J. A. (1985b). «On the diversity of sperm histones in the vertebrates: IV. Cytochemical and amino acid analysis in Anura». *J. Exp. Zool.*, núm. 234, pàg. 33-46.
- KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. (1978). «The packaging unit: A basic structural feature for the condensation of late cricket spermatid nuclei». *J. Cell Sci.*, núm. 33, pàg. 265-283.
- KOSHLAND, D.; STRUNNIKOV, A. (1996). «Mitotic chromo-

- some condensation». *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, núm. 12, pàg. 305-333.
- KUNKLE, M. (1984). «Structural components of sea urchin sperm nuclei». *Gam. Res.*, núm. 9, pàg. 469-479.
- LIVOLANT, F. (1984). «Cholesteric organization of DNA in the stallion sperm head». *Tissue and Cell.*, núm. 16, pàg. 535-555.
- LOIR, M.; BOUVIER, D.; FORNELLS, M.; LAUNEAU, M.; SUBIRANA, J. A. (1985). «Interactions of nuclear proteins with DNA, during sperm differentiation in the ram». *Chromosoma.*, núm. 92, pàg. 304-312.
- MASSEY, C. B.; WATTS, S. A. (1992). «Patterns of sperm-specific histone variations in sea stars and sea urchins: primary structural homologies in the N-terminal region of spermatogenic H1». *J. Exp. Zool.*, núm. 262, pàg. 9-15.
- MCMASTER-KAYE, R.; KAYE, J. S. (1980). «Organization of chromatin during spermiogenesis: Beaded fibers, partly beaded fibers, and loss of nucleosomal structure». *Chromosoma.*, núm. 77, pàg. 41-56.
- MEISTRICH, M. L. (1989). «Histone and nuclear protein transitions in mammalian spermatogenesis». A: Hnilica, L. S., Stein, G. i Stein, J. (ed.) *Histones and other nuclear basic proteins*. CRC Press. Boca Ratón. Florida. pàg. 165-182.
- MEISTRICH, M. L. (1993). «Nuclear morphogenesis during spermiogenesis». A: D. de Kretser (ed.) *Molecular Biology of the male reproductive system*. Academic Press. Inc. S. Diego. Nova York, pàg. 67-97.
- MEZQUITA, C. (1985). «Chromatin composition, structure and function in spermatogenesis». *Rev. Biol. Cell.* núm. 5.
- MEZQUITA, C.; TENG, C. S. (1977a). «Initiation of RNA synthesis *in vitro* during rooster spermatogenesis». *J. Cell Biol.* núm. 75, pàg. 164a.
- MEZQUITA, C.; TENG, C. S. (1977b). «Studies on sex-organ development. Changes in chromatin composition and genomic activity during spermatogenesis in the maturing rooster testis». *Biochem. J.*, núm. 164, pàg. 99-111.
- MEZQUITA, C.; TENG, C. S. (1977c). «Studies on sex-organ development. Changes in chromatin structure during spermatogenesis in the maturing rooster testis as demonstrated by the initiation pattern of RNA synthesis *in vitro*». *Biochem. J.*, núm. 170, pàg. 203-210.
- MIESCHER, F. (1874). «Das Protamin, eine neue organische Base aus den Samenfäden des Rheinlachs». *Ber.*, núm. 7, pàg. 376-379.
- MIRZABEKOW, A. D.; SANKO, D. F.; KOLCHINSKY, A. M.; MELNIKOVA, A. F. (1977). «Protein arrangement in the DNA grooves in chromatin and nucleoprotamine *in vitro* and *in vivo* revealed by methylation». *Eur. J. Biochem.*, núm. 75, pàg. 379-390.
- MOORE, S. C.; AUSIÓ, J. (1997). «Major role of the histones H3-H4 in the folding of the chromatin fiber». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, núm. 230, pàg. 136-139.
- MOSS, S. B.; DONOVAN, M. J.; BELLVÉ, A. R. (1987). «The occurrence and distribution of lamin proteins during mammalian spermatogenesis and early embryonic development». *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, núm. 513, pàg. 74-89.
- MUÑOZ-GUERRA, S.; AZORÍN, F.; CASAS, M. T.; MARCET, X.; MARISTANY, M. A.; ROCA, J.; SUBIRANA, J. A. (1982a). «Structural organization of sperm chromatin from the fish *Carassius auratus*». *Exp. Cell Res.*, núm. 137, pàg. 47-53.
- MUÑOZ-GUERRA, S.; COLOM, J.; AUSIÓ, J.; SUBIRANA, J. A. (1982b). «Histones from spermatozoa of the horseshoe crab». *Biochim. Biophys. Acta.*, núm. 697, pàg. 305-312.
- OLIVA, R.; DIXON, G. M. (1991). «Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction». *Prog. Nuc. Acid Res. Molec. Biol.*, núm. 40, pàg. 25-94.
- PALMER, D. K.; O'DAY, K.; TRONG, H. L.; CHARBONNEAU, H.; MARGOLIS, R. L. (1991). «Purification of the centromere-specific protein cENP-A and demonstration that is a distinctive histone». *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, núm. 88, pàg. 3734-3738.
- PETERSON, C. (1994). «The SMC family: novel motor proteins for chromosome condensation?». *Cell.*, núm. 79, pàg. 389-392.
- POCCIA, D. (1986). «Remodelling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization and early development». *Int. Rev. Cytol.*, núm. 105, pàg. 1-65.
- POCCIA, D. (1995). «Male germ line specific histones of sea urchin and sea stars». A: Jamieson, B. G. M.; Ausió, J. i Justine, J. L. (ed.) *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy*. *Mém. Mus. natn. Hist. nat.*, París, núm. 166, pàg. 475-489.
- POWELL, D.; CRAN, D. C.; JENNINGS, C.; JONES, R. (1991). «Spatial organization of repetitive DNA sequences in the bovine sperm nucleus». *J. Cell Sci.*, núm. 97, pàg. 185-191.
- PRATS, E.; CORNUDELLA, L. (1995). «The gene encoding the sperm-specific basic nuclear protein ϕ_0 from sea cucumber». A: Jamieson B. G. M., J. Ausió i J. L. Justine eds. *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy*. *Mém. Mus. natn. Hist. nat.*, París, núm. 166, pàg. 491-500.
- PUIGJANER, L. C.; FITA, I.; ARNOTT, S.; CHANDRASEKARAN, R.; SUBIRANA, J. A. (1986). «Modelling and refinement of the crystal structure of nucleoprotamine from *Gibbula divaricata*». *J. Biomolec. Struct. Dynamics.*, núm. 3, pàg. 1067-1078.
- RISLEY, M. S.; EINHEBER, S.; BRUNCROT, D. A. (1986). «Changes in DNA topology during spermatogenesis». *Chromosoma.*, núm. 94, pàg. 217-227.
- ROCCHINI, C.; MARX, M. R.; CAROSFIELD, J. S.; KASINSKY, H. E.; ROSENBERG, E.; SOMMER, F.; AUSIÓ, J. (1996). «Replacement of nucleosomal histones by histone H1-like proteins during spermiogenesis in Cnidaria».

- ria: evolutionary implications». *J. Mol. Evol.*, núm. 42, pàg. 240-246.
- SAITOH, N.; GOLDBERG, I. G.; EARNSHAW, W. C. (1995). «The SMC proteins and the coming of age of the chromosome scaffold hypothesis». *BioEssays*, núm. 17, pàg. 759-766.
- SANTISTEBAN, M. S. (1994). «La structure de la chromatine. 1ère partie: Niveaux d'organisation de l'ADN dans le noyau, nucléosome, fibres de chromatine». *Path. Biol.* núm 42, pàg. 868-883.
- SAPERAS, N. (1992). «Distribució i caracterització de les proteïnes espermàtiques en peixos, agnats i pro-cordats. Tesi Doctoral. Institut de Ciències del Mar. Barcelona.
- SAPERAS, N.; LLORIS, D.; CHIVA, M. (1993a). «Sporadic appearance of histones, histone-like proteins, and protamines in sperm chromatin of bony fish». *J. Exp. Zool.*, núm. 265, pàg. 575-586.
- SAPERAS, N.; RIBES, E.; BUESA, C.; GARCIA-HEGART, F.; CHIVA, M. (1993b). «Differences in chromatin condensation during spermiogenesis in two species of fish with distinct protamines». *J. Exp. Zool.*, núm. 265, pàg. 185-194.
- SAPERAS, N.; CHIVA, M.; BOLS, N. C.; KULAK, D.; KASINSKY, H. E. (1993c). «Sperm-specific proteins in the Holocephalan fish *Hydrolagus coliei* (Chondrichthyes, Chimaeriformes) and comparison with protamines from an elasmobranch». *Biol. Bull.*, núm. 185, pàg. 186-196.
- SAPERAS, N.; AUSIÓ, J.; LLORIS, D.; CHIVA, M. (1994). «On the evolution of protamines in bony fish: Alternatives to the "retroviral horizontal transmission" hypothesis». *J. Mol. Evol.*, núm. 39, pàg. 282-295.
- SAPERAS, N.; BUESA, C.; ABIAN, J.; VANDEKERCKHOVE, J.; KASINSKY, H. E.; CHIVA, M. (1996). «The primary structure of a chondrichthyan protamine: a new apparent contradiction in protamine evolution». *J. Mol. Evol.*, núm. 43, pàg. 528-535.
- SAPERAS, N.; CHIVA, M.; PFEIFFER, D. C.; KASINSKY, H. E.; AUSIÓ, J. (1997). «Sperm nuclear basic proteins (SNBPs) of Agnathans and Chondrichthyans: Variability and evolution of sperm proteins in fish». *J. Mol. Evol.* núm. 44, pàg. 422-431.
- SCHMID, M.; KRONE, W. (1975). «Acrosomal chromocentre in newt spermiogenesis». *Nature*, núm. 257, pàg. 795-797.
- SCHMID, M.; KRONE, W. (1976). «The relationship of a specific chromosomal region to the development of the acrosome». *Chromosoma*, núm. 56, pàg. 327-347.
- SIMPSON, R. T.; BERGMAN, L. W. (1980). «Structure of the sea urchin sperm chromatin core particle». *J. Biol. Chem.*, núm. 255, pàg. 10702-10709.
- SPADAFORA, C.; BELLARD, M.; COMPTON, J. L.; CHAMBON, P. (1976). «The DNA lengths in chromatins from sea urchin sperm and gastrula cells are markedly different». *FEBS Lett.*, núm. 69, pàg. 281-285.
- STRICKLAND, M.; STRICKLAND, W.; BRANDT, W.; VON HOLT, C. (1977). «The complete amino acid sequence of histone H2B1 from sperm of the sea urchin *Parechinus angulosus*». *Eur. J. Biochem.*, núm. 77, pàg. 263-275.
- STRICKLAND, M.; STRICKLAND, W.; BRANDT, W.; VON HOLT, C.; WITTMANN-LIEBOLD, B.; LEHMANN, A. (1978). «The complete amino-acid sequence of histone H2B3 from sperm of the sea urchin *Parechinus angulosus*». *Eur. J. Biochem.*, núm. 89, pàg. 443-452.
- STRICKLAND, W.; STRICKLAND, M.; BRANDT, W.; VON HOLT, C. (1977). «The complete amino-acid sequence of histone H2B2 from sperm of the sea urchin *Parechinus angulosus*». *Eur. J. Biochem.*, núm. 77, pàg. 277-286.
- STRICKLAND, W.; STRICKLAND, M.; BRANDT, W.; VON HOLT, C.; LEHMANN, A.; WITTMANN-LIEBOLD, B. (1980). «The primary structure of histone H1 from the sea urchin *Parechinus angulosus*. Sequence of the C-terminal CNBr peptide and the entire primary structure». *Eur. J. Biochem.*, núm. 104, pàg. 567-578.
- STROUBOULIS, J.; WOLFE, A. P. (1996). «Functional compartmentalization of the nucleus». *J. Cell Sci.*, núm. 109, pàg. 1991-2000.
- SUAU, P.; SUBIRANA, J. A. (1977). «X-ray diffraction studies of nucleoprotamine structure». *J. Mol. Biol.*, núm. 117, pàg. 909-926.
- SUBIRANA, J. A. (1975). «On the biological role of basic proteins in spermatozoa and during spermiogenesis». A: Duckett, J. G.; Racey, P. A. (ed.) *The Biology of the Male Gamete*. Supl., núm. 1 of the *Biol. J. Linn. Soc.*, núm. 7, pàg. 239-244.
- SUBIRANA, J. A. (1983). «Nuclear proteins in spermatozoa and their interactions with DNA». A: Nijhoff M. (ed.) *The Hague*, pàg. 197-213.
- SUBIRANA, J. A. (1990a). «Analysis of the charge distribution in the C-terminal region of histone H1 as related to its interactions with DNA». *Biopolymers*, núm. 29, pàg. 1351-1357.
- SUBIRANA, J. A. (1990b). «Proteins as a counterions of DNA: a new model of nucleoprotamine structure». A: Vasilescu (ed.) *Water and ions in biomolecular systems*. Birkhäuser, Verlag, Basel. pàg. 63-70.
- SUBIRANA, J. A. (1991). «Protein-DNA interactions in spermatozoa». A: Baccetti, B. (ed.) *Comparative spermatology*. Nova York. Raven Press: pàg. 89-92.
- SUBIRANA, J. A. (1992). «Order and disorder in 30 nm chromatin fibers». *FEBS Lett.*, núm. 302, pàg. 105-107.
- SUBIRANA, J. A.; COZCOLLUELA, C.; PALAU, J.; UNZETA, M. (1973). «Protamines and other basic proteins from spermatozoa of molluscs». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 317, pàg. 364-379.
- SUBIRANA, J. A.; AZORIN, F.; ROCA, J.; LLOVERAS, J.; LLOPIS, R.; CORTADAS, J. (1977). «The dual structure of concentrated nucleohistone gels from different sources: A quantitative analysis of X-ray diffraction patterns». A: Ts'o, P. (ed.) *The Molecular Biology of*

- the Mammalian Genetic Apparatus. Elsevier. North-Holland. Biomedical Press, pàg. 71-92.
- SUBIRANA, J. A.; COLOM, J. (1987). «Comparison of protamines from freshwater and marine bivalve molluscs: evolutionary implications». *FEBS Lett.*, núm. 220, pàg. 193-196.
- SUWALSKY, M.; TRAUB, W. (1972). «An X-ray diffraction study of poly-L-arginine hydrochloride». *Biopolymers.*, núm. 11, pàg. 2223-2232.
- SUZUKI, M. (1989). «SPKK, a new nuclei acid-binding unit of protein found in histone». *EMBO J.*, núm. 8, pàg. 797-804.
- SUZUKI, M.; WAKABAYASHI, T. (1988). «Packaging of DNA in cricket sperm. A compact mode of DNA packaging». *J. Mol. Biol.*, núm. 204, pàg. 653-661.
- SUZUKI, M.; SOHMA, H.; YAZAWA, M.; YAGI, K.; EBASHI, S. (1990a). «Histone H1 kinase specific to the SPKK motif». *J. Biochem.* núm.108, pàg. 356-364.
- SUZUKI, M.; SUGIURA, M.; EBASHI, S. (1990b). «Sea urchin protease specific to SPKK motif in histone». *J. Biochem.*, núm. 108, pàg. 347-355.
- TONIOLO, C. (1980). «Secondary structure prediction of fish protamines». *Biochim. Biophys. Acta.*, núm. 624, pàg. 420-427.
- TONIOLO, C.; BONORA, G. M.; MARCHIORI, F.; BORIN, G.; FILIPPI, B. (1979). «Protamines. II. Circular dichroism study of the three main components of clupeine». *Biochim. Biophys. Acta.*, núm. 576, pàg. 429-439.
- VAN HOLDE, K.; ZLATANOVA, J.; MOUDRIANAKIS, E. (1995). «Elements of chromatin structure: histones, nucleosomes and fibres». A: Elgin. S. E. (ed.). *Chromatin structure and gene expression*. IRL Press, pàg. 1-25.
- VAN HOLDE, K.; ZLATANOVA, J. (1996). «What determines the folding of the chromatine fibers?». *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, núm. 93, pàg. 10548-10555.
- VAUGHN, J. C.; HINSCH, G. W. (1972). «Isolation and characterization of chromatin and DNA from the sperm of the spider crab, *Libinia emarginata*». *J. Cell Sci.*, núm. 11, pàg. 131-152.
- VERDAGUER, N.; PERELLÓ, M.; PALAU, J.; SUBIRANA, J. A. (1993). «Helical structure of basic peptides from spermatozoa. Comparison with model peptides». *Eur. J. Biochem.*, núm. 214, pàg. 879-887.
- VON HOLT, C.; DEGROOT, P.; SCHWAGER, S.; BRANDT, W. F. (1984). «The structure of sea urchin histones and considerations of their function». A: Stein, G. S.; Stein, J. L. i Marzluff, W. F. (ed.). *Histone genes*. Nova York: John Wiley & Sons. pàg. 65-106.
- WARD, W. S.; PARTIU, A. W.; COFFEY, D. S. (1989). «DNA loop domains in mammalian spermatozoa». *Chromosoma.*, núm. 98, pàg. 153-159.
- WARD, W. S.; COFFEY, D. S. (1989). «Identification of a sperm nuclear annulus: A sperm DNA anchor». *Biol. Reprod.*, núm. 41, pàg. 361-370.
- WARD, W. S.; COFFEY, D. S. (1990). «Specific organization of gens in relation to the sperm nuclear matrix». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, núm. 173, pàg. 20-25.
- WARD, W. S.; COFFEY, D. S. (1991). «DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: Comparison with somatic cells». *Biol. Reprod.*, núm. 44, pàg. 569-574.
- WARD, W. S.; CUMMINGS, K. B. (1991). «DNA associated with the sperm annulus is specific for that structure: Repeated 5s RNA gene as a probe». *Surg. Forum.*, núm. 42, pàg. 677-679.
- WARRANT, R. W.; KIM, S. H. (1978). « α -Helix-double helix interaction shown in the structure of a protamine-transfer RNA complexe and a nucleoprotamine model». *Nature.*, núm. 271, pàg. 130-135.
- WILKINS, M. F. H. (1956). «Physical studies of the molecular structure of deoxyribonucleic acid and nucleoprotein». *Cold Spring Symp. Biol.*, núm. 21, pàg. 75-90.
- WILLMITZER, L.; WAGNER, R. G. (1980). «The binding of protamines to DNA; role of protamine phosphorylation». *Biophys. Struct. Mech.*, núm. 6, pàg. 95-110.
- WODICKA, M.; GREEN, G. R.; POCICA, D. L. (1990). «Sperm histones and chromatin structure of the «primitive» sea urchin *Eucladris tribuloides*». *J. Exp. Zool.*, núm. 256, pàg. 179-188.
- WOUTERS-TYROU, D.; CHARTIER-HARLIN, M. R.; MARTIN-PONTHIEU, A.; BOUTILLON, CH.; VAN DORSELAER, A.; SAUTIERE, P. (1991). «Cuttlefish spermatid-specific protein T». *J. Biol. Chem.*, núm. 266, pàg. 17388-17395.
- WYROBEK, A. J.; MEISTRICH, M. L.; FURRER, R.; BRUCE, W. R. (1976). «The physical characteristics of mouse sperm nuclei». *Biophys. J.*, núm. 16, pàg. 811-825.
- YANAGIDA, M. (1995). «Frontier questions about sister chromatid separation in anaphase». *BioEssays*, núm. 17, pàg. 519-526.
- ZALENSKAYA, I. A.; POSPELOV, V. A.; ZALENSKY, A. O.; VOROB'EV, V. I. (1981). «Nucleosome structure of sea urchin and starfish chromatin: Histone H2B is possibly involved in determining the length of linker DNA». *Nuc. Acid Res.*, núm. 9, pàg. 473-486.
- ZALENSKAYA, I. A.; ZALENSKY, A. O.; KOSTYLEVA, E. I.; IBRAGIMOV, R. KH.; VOROB'EV, V. I. (1985). «Involvement of histone H2B of sea urchin sperm in the formation of supranucleosomal structures». *Molekulyarnaya Biologiya*, núm. 19, pàg. 774-783. (Traducció anglesa de la revista)
- ZALENSKY, A. O.; ALLEN, M. J.; KOBAYASHI, A.; ZALENSKAYA, I. A.; BALHORN, R.; BRADBURY, E. M. (1995). «Well-defined genome architecture in the human sperm nucleus». *Chromosoma.*, núm. 103, pàg. 577-590.
- ZENTGRAF, H.; MÜLLER, V.; FRANKE, W. W. (1980). «Supranucleosomal organization of sea urchin sperm chromatin in regularly arranged 40 to 50 nm large granular subunits». *Eur. J. Cell Biol.*, núm. 20, pàg. 254-264.
- ZLATANOVA, J.; VAN HOLDE, K. (1996). «The linker histones and chromatin structure: New twists». *Prog. Nuc. Acid Res. Mol. Biol.*, núm. 52, pàg. 217-259.