

# TESI DOCTORAL

Pepita Giménez Bonafé

*Proteïnes que estructurèn i remodelen  
la cromatina espermàtica.  
Alguns casos especials*

Novembre, 1999

*Proteïnes que structuren i remodelen  
la cromatina espermàtica.  
Alguns casos especials*

Memòria presentada per PEPITA GIMÉNEZ BONAFÉ per accedir al Grau de Doctor en Ciències Biològiques. El treball ha estat realitzat sota la direcció del Doctors MANEL CHIVA ROYO, i PHILIPPE CHEVAILLIER, al Departament d'Enginyeria Química de l'ETSEIB (UPC). Part del treball s'ha dut a terme a l'Institut Pasteur de Lille (FRANÇA), i a la Universitat de Victoria (British Columbia, CANADA).

L'autor:

Pepita Giménez

Vist-i-plau:

Manel Chiva  
(Director)

Philippe Chevaillier  
(Co-Director)

Albert Boronat  
(Tutor)

*" Si algun día Tu me dejaras,  
no podría vivir.  
Se me iría algo muy importante,  
la razón de mi existir.  
Te quiero".*

San Juan de Dios

*Aquest treball no hagués estat possible sense la participació de moltes persones que, d'una manera o altra, m'han ajudat a realitzar-lo. Els hi dedico doncs aquests agraïments que quedaran escrits tant en el paper com en el cor.*

*Què dir del Dr. Manel Chiva? Vull agrair al Manel, primer de tot, el haver-me escollit com a la seva doctoranda i segon, el haver fet que aquests quatre anys s'hagin passat d'una manera tant agradable, fent que el treball no sigui un deure sinó un hobby. Mil gràcies pels bons moments i per guiar-me en el món de la ciència (i de la vida). Sense tu no seria el que sóc. Gràcies per ser el meu amic.*

*També voldria agrair al Dr. J.A. Subirana l'haver-me acollit en el seu laboratori i haver depositat la seva confiança en mi en tot moment.*

*Els meus companys de laboratori han estat molts i de molts llocs: no em voldria oblidar del Jie, George i Luzimar, que encara que físicament ja no hi són, continuen estant presents via e-mail. Amb especial carinyo, vull agrair a la Núria Saperas la seva amistat i els consells que m'ha donat sempre que he tingut algun problema; la parella "Chiva-Saperas" ha estat el "Materials i Mètodes" indispensable per la realització d'aquesta tesi. També amb molt de carinyo, vull agrair al Lucho tot el que m'ha ajudat en qualsevol moment, a qualsevol hora i en qualsevol situació, sempre d'una manera amable i desinteressada, i com no, re-gràcies per la seva amistat. L'ambient fa que tot surti millor, i en ell han participat els dos últims "fitxatges": Cèlia i Carme. A totes dues, un petonet.*

*El laboratori està dintre d'un departament, i en concret, en el DEQ hi ha qualitat. Dono les gràcies a la Lourdes Urpi per haver estat el meu "diccionari català" i aconsellar-me en el moment de fer qualsevol viatge. A la M<sup>a</sup> Teresa Casas gràcies per treballar amb mi amb els "famosos" nuclis d'Eledone. No em vull oblidar de la Lourdes Campos (sempre tant amable), i de la Franzina (atenta en tot). Vull agrair a la Montse Solé el seu suport tant informàtic com humà. I no m'oblido dels xics: el simpàtic del Nicola, l'Angel, el Pep, el Juanje, l'Alfonso, ...*

*A la Pilar Fernández, Maria Reixac, Isidre Casals, Núria Cortadellas i Almudena, dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona els hi vull agrair l'ajut que m'han prestat i la seva simpatia.*

*Al llarg d'aquest treball hem fet força col·laboracions. Vull agrair al Carlos Buesa la seva dedicació tant eficient. No m'oblido d'en Francesc Piferrer i en Johny Asturiano (de l'Institut del CSIC de Torre de la Sal, Castelló), així com del suport bibliogràfic desinteressat del Dr. Boletzky, de Banyuls-sur-Mer.*

*Durant la meua estada a Lille (França) vaig tenir la oportunitat de conèixer amb una meravellosa i extraordinària persona: en Pierre Sautière. Merci beaucoup pour être si gentil et avoir un coeur tellement grande; notre amitié est pour toujours. També a l'Institut Pasteur vaig tenir el plaer de conèixer i treballar amb l'Arlette Martinage: merci pour toute la force que tu m'as transmis et pour être si douce avec moi. I com no, agrair la meua co-directora, la Dra. Danielle Wouters-Tyrou la seva simpatia que m'ha mostrat sempre que hem parlat.*

*A l'Eric Sautière, des remerciements pour l'aide physique et moral que m'a offert: tu as hérité la qualité humaine de ton papa. No m'oblído dels meus estimats Denis-Agnes, Michaela i Bruno. Bruno, avec mon coeur je te remercie ton amitié si spécial à travers la distance et le temps (à toi, je dédie une partie de ma thèse).*

*Pel suport à distance, et tous les mots gentils, també voldria agrair al meu amic Mostafa Kouachi la seva participació en aquesta tesi, i com no, el seu recolçament. Merci, mon très fidèle ami.*

*Dos han estat els fotògrafs de part d'aquest treball: en Joaquim, i en Jean Marc Merchez. Gràcies per la paciència i carinyo.*

*Voldria agrair també al Dr. Joan Ausió el fet d'haver-me acollit en el seu laboratori, a la Universitat de Victoria (Canadà), i tenir així la oportunitat de conèixer Canadà i als canadencs. Entre els canadencs destaca, com no, en Harold Kasinsky, una bellíssima persona que m'ha ajudat i aconsellat, i amb qui he tingut xerrades molt interessants.*

*A la Miriam de Jong i Susan Moore, amb molt carinyo les desitjo el millor. Sense l'Albert Laboissier i l'Scott no m'hagués ensortit dels petits problemes tècnics que sempre apareixen. Un altre canadenc, molt simpàtic (i del Barça) al qui vull recordar és al John Morrison. També de Canadà, però mexicanes, me gustaria agrader a las dos chamas que me han hecho la vida agradable durante mi estancia: ándale!*

*Una altra ajuda "a distància" ha estat la del David. El nostre "oceà Pacífic" (l'Avda. Diagonal) no ha fet que s'oblídi de mi i m'hagi donat ànims en forma de poesia. Gràcies guapo.*

*Voldria agrair al Dr. Lluís Cornudella, Jaume Palau i Enric Ribes, el haver volgut acceptar formar part del meu tribunal, juntament amb el Dr. J.A. Subirana i Dr. Pierre Sautière. A l'Enric, doble agraïment per haver col·laborat amb el nostre equip tot al llarg d'aquest treball.*

*No m'oblído de la meua Luna: entre totes dues hem pogut escriure la tesi, jo pensant i ella fent-me companyia. Dono gràcies a ma mare per haver-se preocupat de mi i haver-me recolçat amb el seu amor. I com no, i d'una manera més que especial, vull agrair tot el carinyo i amor que he rebut amb la distància d'en James: thank you for being you.*

*Gràcies.*

# Abreviatures

aa	Aminoàcid
AA	Àcid acètic
ACN	Acetonitril
AE	Aminoetilació
aprox.	Aproximadament
Bis	N,N'-metilen bisacrilamida
BSA	Albúmina sèrum boví
CM	Carboximetilació
CM-cys	Carboximetil cisteïna
CTAB	Bromur de cetiltrimetil-amoni
C-t	Carboxi-terminal
Da	Dalton
DTT	Ditiotreitòl
EDTA	Àcid etilendiamintetraacètic
AE-cys	Aminoetil cisteïna
EtOH	Etanol
GPAU	Gel poliacrilamida/acètic/urea
GPTU	Gel poliacrilamida/tritó/urea
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
MEA	2-mercaptoetilamina
MMNA	Monomaleimido-nanogold
MW	<i>Molecular weigh</i> (pes molecular)
N-t	Amino-terminal
OPA	Ortoftaldehid
ODF	<i>Outer dense fibers</i> (fibres denses)
pb	Parells de bases
PITC	Fenilisotiocianat
PM	Pes molecular
PMSF	Fenilmetil-sulfonil fluoridre
PSA	Persulfat amònic
PTH	Feniltiohidantoïna

SDS	Dodecil sulfat sòdic
-SH	Grup tiol
SNBP's	Proteïnes bàsiques nuclears espermàtiques
STEM	Microscopia electrònica rastreig-transmissió
TCA	Àcid ticloracètic
TEMED	N,N,N'N'-tetrametiletildiamina
TFA	Àcid trifluoroacètic
TLCK	<i>Tosyllysine chloromethyl ketone</i>
Tris	Tris (hidroximetil) aminoetà
UV	Ultraviolat
V	Volts
v.	Veure

# Índex de continguts

<b>Resum</b> .....	1
<b>I. Introducció</b> .....	3
<b>A. Empaquetament del DNA en els espermatozoides</b> .....	3
1. Les estructures d'ordre superior de la cromatina somàtica .....	3
2. Estructura de la cromatina de l'espermatozoide .....	4
a. Nuclihistona i nuclioprotamina .....	4
i) Exemples de nuclihistona espermàtica .....	8
ii) Exemples de nuclioprotamina .....	11
b. Altres estructures .....	16
3. Interaccions moleculars DNA-proteïnes espermàtiques .....	18
a. Definició del tipus de proteïnes considerades .....	18
b. Estructura primària .....	18
c. Estructures secundàries dels polipèptids especialitzats .....	19
d. La interacció polipèptid-DNA .....	21
e. Les estructures d'ordre superior específiques de la cromatina espermàtica .....	23
4. Organització del genoma en el nucli espermàtic .....	27
5. Evolució de l'estructura de la cromatina espermàtica .....	29
<b>B. Remodelació de la cromatina espermàtica</b> .....	34
<b>II. Materials i Mètodes</b> .....	37
<b>A. Material biològic</b> .....	37
1. Espècies estudiades .....	37
2. Possició filogenètica de les espècies estudiades .....	39
3. Descripció de l'aparell reproductor dels Cefalòpodes	
Octòpodes .....	41
<b>B. Mètodes preparatius</b> .....	45
1. Obtenció de nuclis d'espermatozoides .....	45
a. Obtenció de nuclis espermàtics d' <i>Eledone cirrhosa</i> ....	45
i) Proves preliminars per l'obtenció	



de nuclis espermàtics .....	45
ii) Obtenció de nuclis a partir d'epidídims	
i espermatòfors .....	46
iii) Purificació de nuclis amb finalitat analítica ....	48
b. Obtenció de nuclis espermàtics d' <i>Octopus vulgaris</i> ....	50
i) Obtenció de nuclis a partir d'epidídims	
i espermatòfors .....	50
- Mètode estàndard .....	50
- Obtenció en condicions reductores .....	52
- Mètode simplificat .....	52
ii) Obtenció de nuclis a partir de gònades .....	52
iii) Obtenció de nuclis d'espermàtides avançades	
i espermatozoides gonadals .....	53
c. Obtenció de nuclis espermàtics de <i>Murex brandaris</i> ...	56
d. Obtenció de nuclis espermàtics de <i>Dicentrarchus</i>	
<i>labrax</i> .....	56
2. Obtenció d'òvuls de <i>Dicentrarchus labrax</i> .....	57
a. Obtenció d'òcits activats <i>in vitro</i> .....	57
b. Obtenció d'òcits fecundats .....	58
3. Obtenció d'extractes d'òvuls de <i>Dicentrarchus labrax</i> .....	58
a. Obtenció del Termoestable .....	58
b. Obtenció d'extractes directes .....	59
4. Extracció de les SNBP's .....	60
a. Obtenció d'Histones .....	60
b. Obtenció de Protamines .....	60
c. Obtenció de les SNBP's de naturalesa desconeguda .....	62
5. Reducció dels ponts disulfur formats per les cisteïnes .....	63
a. Reducció i Alquilació amb $\beta$ -bromoetilaminaHBr (AE)	63
b. Reducció i Alquilació amb Iodacetamida (CM) .....	65
c. Doble Reducció i Alquilació amb Iodacetamida (CM) .	66
d. Reducció i Alquilació amb Acrilamida .....	67
6. Precipitació de les proteïnes .....	67
a. Precipitació amb acetona .....	67
b. Precipitació amb àcid tricloracètic (TCA) .....	68
c. Precipitació amb sulfat d'amoni .....	69
7. Assecat de proteïnes .....	70
8. Mètodes cromatogràfics per la purificació de proteïnes .....	71
a. Cromatografia de bescanvi iònic (CM-52) .....	71
b. Cromatografia de matriu d'agarosa amb	

protamina unida .....	74
c. Cromatografia d'Hidroxiapatita .....	76
d. Cromatografia DE-52 DEAE Cel.lulosa .....	77
e. Cromatografia d'Isoelectroenfoc ( <i>Cromatofocusing</i> ) ..	79
f. Cromatografia líquida d'alta resolució en fase reversa (HPLC) .....	80
9. Concentració de proteïnes en dissolució .....	80
a. Ús de centricons .....	82
b. Ús de centripresps .....	84
c. Liofilització .....	84
d. <i>Speedvac</i> .....	84
<b>C. Mètodes analítics .....</b>	<b>86</b>
1. Mètodes electroforètics .....	86
a. Gels de poliacrilamida/acètic/urea (GPAU) .....	86
i) Separació d'Histones i Protamines .....	87
ii) Separació de pèptids .....	90
b. Gels de poliacrilamida/tritó/urea (GPTU) .....	92
c. Gels d'SDS .....	93
d. Anàlisi de proteïnes en gels bidimensionals .....	96
e. Detecció de les bandes en els gels d'electroforèsi .....	97
i) Tinció amb blau de Coomassie .....	97
ii) Tinció amb plata .....	98
iii) Tinció amb àcid pícric .....	99
2. Determinació de la quantitat de proteïna en mostres en dissolució .....	99
a. Absorbància de les proteïnes a 230 nm .....	100
b. Detecció colorimètrica pel mètode de Bradford .....	100
3. Determinació de la composició aminoacídica d'una proteïna .....	101
a. Hidròlisi de la proteïna .....	101
b. Anàlisi d'aminoàcids .....	102
4. Digestions específiques de proteïnes .....	104
a. Termolisina de <i>Bacillus thermoproteolyticus</i> .....	105
b. Quimotripsina .....	105
c. Elastasa .....	106
d. <i>PE Biosystem CPP enzyme Kit</i> (PerSeptive Biosystems Inc.) .....	107
e. Proteïnasa d' <i>Astacus fluviatilis</i> .....	107

f. Bromur de cianògen (BrCN) .....	108
5. Seqüenciació de proteïnes .....	109
a. Procediment general .....	109
b. Identificació dels extrems amino i carboxil .....	110
c. Degradació recurrent d'Edman .....	110
d. Seqüenciació a partir de l'extrem C-terminal .....	113
6. Espectrometria de masses .....	114
7. Tècniques de Microscòpia .....	115
a. Estudi morfològic dels espermatozoides a nivell estructural i ultraestructural .....	115
i) Microacòpia Òptica .....	115
ii) Microscòpia Electrònica de Transmissió .....	117
iii) Microscòpia Electrònica de Rastreig .....	120
b. Localització microscòpica de ponts disulfur per marcatge directe amb monomaleimido-nanogold (MMNA) .....	121
c. Detecció de la cromatina nuclear amb tinció amb <i>Hoechst</i> .....	124
8. Microanàlisi de Raigs X .....	125
9. Incubacions d'extractes d'òvuls amb nuclis .....	126
10. Incubacions amb fosfatasa alcalina .....	126
11. Prediccions d'estructures secundàries .....	127
<b>III. Resultats</b> .....	129
<b>A. <i>Eledone cirrho</i></b> .....	129
<b>1. Espermiogènesi d'<i>Eledone cirrho</i></b> .....	129
a. Estudi a nivell de microscòpia òptica .....	131
i) Espermatogènesi .....	131
ii) Espermiogènesi .....	134
b. Estudi a nivell de microscòpia electrònica .....	141
i) Espermiogènesi .....	141
<b>2. Caracterització química de les cisteïnes de l'espermatozoide</b> .....	179
a. Composició de les proteïnes totals de l'espermatozoide .....	180
b. Localització cel.lular de les proteïnes riques en cisteïna .....	183
c. Estabilitat de l'espermatozoide d' <i>Eledone cirrho</i> ....	185
d. Localització microscòpica dels ponts disulfur en	

l'espermatozoide .....	188
<b>3. Contingut proteic de l'espermatozoide d'<i>Eledone cirrhosa</i>.</b>	
<b>Caracterització de la Protamina nuclear .....</b>	<b>193</b>
<b>4. Convergència parcial de l'espermatozoide d'<i>Eledone cirrhosa</i></b>	
<b>i dels Mamífers .....</b>	<b>216</b>
<b>B. <i>Octopus vulgaris</i> .....</b>	<b>217</b>
<b>1. Proteïnes nuclears en l'espermatogènesi .....</b>	<b>217</b>
a. Breu introducció a l'espermatozoide d' <i>O. vulgaris</i> .....	217
b. Proteïnes nuclears contingudes en els nuclis de cèl.lules	
gonadals totals, nuclis espermàtics gonadals i nuclis	
d'espermatozoides madurs en <i>O. vulgaris</i> .....	220
<b>2. Caracterització de les Protamines .....</b>	<b>226</b>
a. Purificació de les proteïnes del nucli espermàtic .....	226
b. Seqüència de les Protamines .....	235
<b>3. Estudi comparatiu de les protamines dels Cefalòpodes ....</b>	<b>252</b>
a. Comparació entre diferents ordres: <i>O. vulgaris</i> ( <i>Octopoda</i> )	
<i>versus</i> sèpies i calamars ( <i>Sepiida</i> i <i>Teuthida</i>	
respectivament) .....	252
b. Comparació dintre de la mateixa família ( <i>Octopodidae</i> ):	
<i>O. vulgaris versus E. cirrhosa</i> . .....	261
<b>C. <i>Murex brandaris</i> .....</b>	<b>263</b>
<b>1. Antecedents sobre el treball realitzat a <i>M. brandaris</i> .....</b>	<b>263</b>
<b>2. Obtenció, purificació i seqüenciació de les proteïnes nuclears</b>	
<b>espermàtiques de <i>M. brandaris</i> .....</b>	<b>266</b>
a. Purificació de les Protamines .....	266
i) Obtenció de nuclis espermàtics a partir de conductes	
deferents de gònades madures .....	266
ii) Obtenció de nuclis espermatogènics a partir de	
gònades .....	270
b. Caracterització de les Protamines .....	271
c. Reexaminació dels resultats obtinguts a Càceres (1995)	
considerant les dades aportades en el present treball .....	276

<b>3. Les protamines dintre del marc dels canvis evolutius en els Mol·luscs Prosobranquis (arqueogastròpodes → cenogastròpodes).</b>	
<b>Interpretacions alternatives .....</b>	<b>284</b>
a. Limitacions .....	284
b. Fets diferencials entre els arqueogastròpodes i els cenogastròpodes que fan referència a la biologia de la reproducció .....	285
i) Tipus de fertilització .....	285
ii) Morfologia espermàtica .....	286
iii) Cóm s'arriba a l'empaquetament i forma final del nucli espermàtic .....	288
iv) Les proteïnes que condensen el nucli .....	289
v) Comparació de les protamines dels arqueogastròpodes i dels cenogastròpodes .....	292
c. Resum de les dades disponibles .....	293
d. Interpretacions alternatives .....	293
<b>D. Gasterosteiformes .....</b>	<b>295</b>
<b>1. Interès que presenta l'estudi de les protamines dels Gasterosteiformes .....</b>	<b>295</b>
<b>2. Purificació i caracterització de les protamines dels Gasterosteiformes .....</b>	<b>299</b>
a. "Complex d'espècies" <i>Gasterosteus aculeatus</i> .....	299
i) Composició proteica dels nuclis espermàtics gonadals .....	299
ii) Caracterització de la protamina nuclear .....	304
iii) Comparació entre diferents poblacions de <i>G. aculeatus</i> .....	308
b. <i>Gasterosteus wheatlandi</i> .....	312
c. <i>Pungitius pungitius</i> .....	313
d. <i>Aulorhynchus flavidus</i> .....	314
e. Resum del subordre <i>Gasterosteoidei</i> .....	316
<b>3. Comparació entre les Protamines del subordre <i>Gasterosteoidei</i> .....</b>	<b>317</b>
a. La protamina de <i>G. aculeatus</i> .....	317
b. Les protamines de <i>G. aculeatus</i> i <i>G. wheatlandi</i> .....	317
c. La protamina de <i>P. pungitius</i> i les protamines dels <i>Gasterosteus</i> .....	319

d. La protamina d' <i>A. flavidus</i> i les protamines anteriors .	321
e. Resum i plantejament del següent pas .....	322
f. Les "protamines típiques" i la protamina d' <i>A. flavidus</i>	324
g. Conclusió general .....	326
<b>E. <i>Dicentrarchus labrax</i> .....</b>	<b>329</b>
<b>1. Búsqueda preliminar de l'activitat descondensadora en els òvuls de <i>D. labrax</i> .....</b>	<b>329</b>
a. Activació d'òocits de <i>D. labrax</i> .....	331
b. Aplicació dels mètodes estandaritzats per detectar una molècula "nucleoplasmina-like" .....	331
c. Alternatives utilitzades per manifestar l'activitat de l'òocit sobre la nuclioprotamina espermàtica .....	336
i) Obtenció d'extractes directes ( <i>low speed supernatant</i> , LSS) .....	336
ii) Obtenció del <i>high speed supernatant</i> (HSS) .....	337
iii) Suplementació de l'extracte per augmentar la seva activitat .....	339
- Efecte de l'ATP .....	340
- Efecte dels inhibidors proteolítics .....	340
<b>2. Fraccionament de l'extracte d'òocits de <i>D. labrax</i> .....</b>	<b>344</b>
a. Columna de matriu d'agarosa amb protamina unida ...	344
b. Columna d'Hidroxiapatita .....	346
c. Columna DE-52 DEAE Cel.lulosa .....	350
d. Columna d'Isoelectroenfoc .....	354
e. Conclusió preliminar .....	356
<b>IV. Discussió .....</b>	<b>359</b>
<b>A. Quina funció tenen totes les SNBP's? .....</b>	<b>360</b>
<b>B. Cóm es pot entendre l'evolució de les SNBP's? .....</b>	<b>360</b>
1. Delimitació dels nivells als quals actuen les SNBP's i als quals poden rebre l'efecte de la selecció natural .....	360
a. Interacció amb el DNA .....	360
b. El nucli espermàtic (complex nuclioprotamina) considerat com una unitat .....	361

c. L'espermatozoide considerat com un nivell d'organització unitari .....	362
2. Significació i sentit direccional dels tres nivells .....	363
3. El cas d' <i>Eledone</i> dins dels Cefalòpodes com a exemple representatiu dels diferents nivells .....	365
<b>C. De quines formes poden evolucionar les SNBP's?</b> .....	370
<b>D. Dos comentaris addicionals</b> .....	373
1. Protamines amb precursor. Limits de la basicitat química ....	373
2. Les protamines amb cisteïna: permeten més canvis en la molècula? .....	374
<b>V. Conclusions</b> .....	377
<b>VI. Annex</b> .....	379
Annex I: Aminoàcids I .....	379
Annex II: Aminoàcids II .....	380
Annex III: Aminoàcids III .....	381
Annex IV: Propietats dels inhibidors proteolítics més comuns .....	382
Annex V: Predicció de l'alineament de la protamina d' <i>Eledone</i> <i>cirrrosa</i> .....	383
Annex VI: Predicció de l'estructura secundària de la protamina d' <i>Eledone cirrhosa</i> .....	388
Annex VII: Seqüenciació de la protamina d' <i>Eledone cirrhosa</i> I .....	390
Annex VIII: Seqüenciació de la protamina d' <i>Eledone cirrhosa</i> II .....	395
Annex IX: Seqüenciació de la protamina d' <i>Eledone cirrhosa</i> III .....	398
Annex X: Seqüenciació de la protamina P1 de <i>Murex brandaris</i> .....	401
Annex XI: Seqüenciació de la protamina P2 de <i>Murex brandaris</i> .....	407
Annex XII: Seqüenciació de la protamina P3 de <i>Murex brandaris</i> .....	412
Annex XIII: Augments de les imatges de microscòpia òptica.....	417
<b>VII. Bibliografia</b> .....	419

# *Índex de Figures*

## I. INTRODUCCIÓ

Fig.I.A.1	.....	7
Fig.I.A.2	.....	8
Fig.I.A.3	.....	9
Fig.I.A.4	.....	11
Fig.I.A.5	.....	12
Fig.I.A.6	.....	15
Fig.I.A.7	.....	17
Fig.I.A.8	.....	21
Fig.I.A.9	.....	22
Fig.I.A.10	.....	26
Fig.I.A.11	.....	28
Fig.I.A.12	.....	31
Fig.I.B.1	.....	35

## II. MATERIALS I MÈTODES

Fig.II.A.1	.....	38
Fig.II.A.2	.....	41
Fig.II.A.3	.....	42
Fig.II.A.4	.....	43
Fig.II.B.1	.....	47
Fig.II.B.2	.....	49
Fig.II.B.3	.....	51
Fig.II.B.4	.....	54
Fig.II.B.5	.....	55
Fig.II.B.6	.....	61
Fig.II.B.7	.....	62
Fig.II.B.8	.....	64
Fig.II.B.9	.....	78



Fig.II.C.1 .....	104
Fig.II.C.2 .....	121

### III. RESULTATS

Fig.III.A.1 .....	132
Fig.III.A.2 .....	133
Fig.III.A.3 .....	135
Fig.III.A.4 .....	137
Fig.III.A.5 .....	138
Fig.III.A.6 .....	140
Fig.III.A.7 .....	142
Fig.III.A.8 .....	143
Fig.III.A.9 .....	146
Fig.III.A.10 .....	149
Fig.III.A.11 .....	150
Fig.III.A.12 .....	151
Fig.III.A.13 .....	153
Fig.III.A.14 .....	155
Fig.III.A.15 .....	157
Fig.III.A.16 .....	158
Fig.III.A.17 .....	160
Fig.III.A.18 .....	162
Fig.III.A.19 .....	163
Fig.III.A.20 .....	165
Fig.III.A.21 .....	166
Fig.III.A.22 .....	168
Fig.III.A.23 .....	169
Fig.III.A.24 .....	171
Fig.III.A.25 .....	172
Fig.III.A.26 .....	174
Fig.III.A.27 .....	175
Fig.III.A.28 .....	176
Fig.III.A.29 .....	177
Fig.III.A.30 .....	178
Fig.III.A.31 .....	184
Fig.III.A.32 .....	187
Fig.III.A.33 .....	189
Fig.III.A.34 .....	190

Fig.III.A.35 .....	191
Fig.III.A.36 .....	192
Fig.III.A.37 .....	193
Fig.III.A.38 .....	195
Fig.III.A.39 .....	197
Fig.III.A.40 .....	199
Fig.III.A.41 .....	203
Fig.III.A.42 .....	204
Fig.III.A.43 .....	205
Fig.III.A.44 .....	207
Fig.III.A.45 .....	209
Fig.III.A.46 .....	210
Fig.III.A.47 .....	212
Fig.III.A.48 .....	213
Fig.III.B.1 .....	278
Fig.III.B.2 .....	220
Fig.III.B.3 .....	222
Fig.III.B.4 .....	224
Fig.III.B.5 .....	227
Fig.III.B.6 .....	230
Fig.III.B.7 .....	231
Fig.III.B.8 .....	232
Fig.III.B.9 .....	236
Fig.III.B.10 .....	237
Fig.III.B.11 .....	239
Fig.III.B.12 .....	240
Fig.III.B.13 .....	241
Fig.III.B.14 .....	243
Fig.III.B.15 .....	244
Fig.III.B.16 .....	246
Fig.III.B.17 .....	248
Fig.III.B.18 .....	250
Fig.III.B.19 .....	250
Fig.III.B.20 .....	251
Fig.III.B.21 .....	253
Fig.III.B.22 .....	254
Fig.III.B.23 .....	256
Fig.III.B.24 .....	258

Fig.III.B.25 .....	260
Fig.III.C.1 .....	264
Fig.III.C.2 .....	267
Fig.III.C.3 .....	269
Fig.III.C.4 .....	271
Fig.III.C.5 .....	274
Fig.III.C.6 .....	278
Fig.III.C.7 .....	280
Fig.III.C.8 .....	282
Fig.III.C.9 .....	283
Fig.III.C.10 .....	285
Fig.III.C.11 .....	287
Fig.III.C.12 .....	288
Fig.III.C.13 .....	290
Fig.III.C.14 .....	291
Fig.III.D.1 .....	296
Fig.III.D.2 .....	297
Fig.III.D.3 .....	298
Fig.III.D.4 .....	300
Fig.III.D.5 .....	302
Fig.III.D.6 .....	303
Fig.III.D.7 .....	304
Fig.III.D.8 .....	306
Fig.III.D.9 .....	307
Fig.III.D.10 .....	307
Fig.III.D.11 .....	308
Fig.III.D.12 .....	309
Fig.III.D.13 .....	310
Fig.III.D.14 .....	311
Fig.III.D.15 .....	312
Fig.III.D.16 .....	313
Fig.III.D.17 .....	313
Fig.III.D.18 .....	314
Fig.III.D.19 .....	315
Fig.III.D.20 .....	315
Fig.III.D.21 .....	316
Fig.III.D.22 .....	318

Fig.III.D.23 .....	319
Fig.III.D.24 .....	320
Fig.III.D.25 .....	322
Fig.III.D.26 .....	325
Fig.III.D.27 .....	326
Fig.III.D.28 .....	327
Fig.III.E.1 .....	332
Fig.III.E.2 .....	333
Fig.III.E.3 .....	335
Fig.III.E.4 .....	336
Fig.III.E.5 .....	338
Fig.III.E.6 .....	341
Fig.III.E.7 .....	345
Fig.III.E.8 .....	347
Fig.III.E.9 .....	349
Fig.III.E.10 .....	350
Fig.III.E.11 .....	351
Fig.III.E.12 .....	352
Fig.III.E.13 .....	353
Fig.III.E.14 .....	356

#### IV. DISCUSSIÓ

Fig.IV.B.1 .....	363
Fig.IV.B.2 .....	366
Fig.IV.B.3 .....	369
Fig.IV.C.1 .....	372





# Índex de Taules

## II. MATERIALS I MÈTODES

Taula II.B.I	69
Taula II.B.II	72
Taula II.C.I	88
Taula II.C.II	89
Taula II.C.III	90
Taula II.C.IV	91
Taula II.C.V	93
Taula II.C.VI	95
Taula II.C.VII	101
Taula II.C.VIII	119

## III. RESULTATS

Taula III.A.I	182
Taula III.A.II	201
Taula III.A.III	206
Taula III.A.IV	208
Taula III.A.V	209
Taula III.A.VI	211
Taula III.B.I	228
Taula III.B.II	233
Taula III.B.III	238
Taula III.B.IV	245
Taula III.B.V	248
Taula III.B.VI	259
Taula III.C.I	272
Taula III.C.II	275
Taula III.C.III	277
Taula III.C.IV	278

Taula III.D.I	.....	305
Taula III.D.II	.....	323
Taula III.E.I	.....	354

# Resum

L'objectiu principal d'aquest treball ha estat examinar alguns casos de protamines especialment interessants, per tal de poder entendre una mica més la química i els mecanismes pels quals han evolucionat les proteïnes nuclears espermàtiques.

L'estudi de l'espermiogènesi i la protamina d'*Eledone cirrhosa* (cefalòpode, octòpode) ens ha permès comprendre alguns processos cel·lulars que intervenen en la nucleomorfogènesi, i la necessitat de l'aparició d'una protamina rica en cisteïnes (apartat III.A). També s'han estudiat les protamines d'un altre octòpode, *Octopus vulgaris*, i hem pogut posar de manifest les principals característiques dels canvis evolutius en el model de protamines en els Mol·luscs cefalòpodes (apartat III.B).

Hem acabat de seqüenciar les protamines del cenogastròpode *Murex brandaris*, i per tant s'ha pogut identificar sense ambigüitat el processament intranuclear d'una d'aquestes protamines. La comparació de les protamines de *M. brandaris* amb la protamina d'una espècie ancestral ens ha permès observar de nou l'aparició de canvis repentins en l'evolució de les protamines associats a canvis en la biologia de la reproducció (apartat III.C).

Per altra banda, hem obtingut i estudiat les estructures primàries dels peixos Gasterosteiformes. En aquest cas es mostra que els canvis evolutius es donen sobretot a través de variacions importants en l'extrem C-terminal de la molècula, i també a partir de mutacions puntuals en els dos primers terços N-terminals (apartat III.D). Aquests resultats adquireixen un gran interès quan són analitzats en el marc general dels canvis que han sofert les protamines (proteïnes bàsiques nuclears espermàtiques, SNBP's) al llarg de la història evolutiva.

Per últim, en aquest treball també hem iniciat experiments preliminars per estudiar el recanvi de la composició del nucli espermàtic en l'espècie *Dicentrarchus labrax* (llobarro), mitjançant incubacions que mimetitzen parcialment el procés de fertilització. Els resultats no es poden generalitzar, però a



mesura que s'estudiïn els processos de recanvi es podrà comprendre millor el fenòmen de la gran diversitat composicional i morfològica exhibida per les gàmetes masculines, concretament en la seva cromatina (apartat III.E).

Degut a la variació de temes estudiats, al final de cada apartat de Resultats s'ha fet un breu apartat de Discussió (III.A.4, III.B.3, III.C.3, i III.D.3), a més d'un resum en la Discussió general (IV. Discussió). D'aquesta manera hem pogut aprofundir més en els temes enfocats.

# *I. Introducció*



L'anisogàmia ha conduït a l'aparició de gàmetes molt diferents en quan a tamany i funció. La major part de la Introducció està destinada a revisar la composició i estructura del nucli espermàtic. Al final es revisa molt breument l'activitat que posseeixen els òvuls de modificar la composició i estructura del nucli de l'espermatozoide que els fertilitza.

## A. Empaquetament del DNA en els espermatozoides

Podem interpretar que hi ha dos factors determinants de l'empaquetament del DNA en el nucli cel.lular: per una banda, economitza l'espai de manera que la informació genètica es trobi com més compacta millor, i per altra banda, organitzar aquest empaquetament de la manera més eficient, perquè es pugui seleccionar i utilitzar la informació específica entremig de l'immens dipòsit d'informació que representa el DNA.

El nucli de la cèl.lula espermàtica és un nucli inert que al llarg de la evolució ha desenvolupat de diverses maneres el primer aspecte. En aquest capítol revisem la informació actual sobre l'estructura de la cromatina espermàtica i s'intenta posar de manifest algunes qüestions que mereixen ser estudiades o aprofundides.

### *1. Les estructures d'ordre superior de la cromatina somàtica*

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 formant l'heterocromatina, els telòmers i els cromosomes mitòtics.

La primera estructura d'ordre superior és la fibra de 30 nm (formada directament pel plegament 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 fibra

de 30 nm, d'una manera general es pot assumir 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 (v. per ex. 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 postraduccionals de totes les parts de les histones que interaccionen amb el DNA.

El fet més important a 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 "factors específics" (seqüències concretes del DNA, estructures proteíniques específiques, com els llocs en cis, etc) per a la formació o descondensació de la fibra de 30 nm. Per contra, la formació d'estructures d'ordre superior (heterocromatina, cromosomes mitòtics, telòmers) requereix 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; Yanahida, 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 cal destacar que tant l'estructura nucleosòmica, com la fibra de 30 nm i la de les seves condensacions superiors, s'han conservat molt invariables al llarg de l'evolució dels organismes eucariotes (van Holde et al., 1995).

## ***2. Estructura de la cromatina de l'espermatozoide***

### ***a. Nuclihistona i nucliprotamina***

Ni hi ha un model únic, ni predominant, que sigui representatiu de l'estructura dels diferents espermatozoides animals. El principi més general és que el nucli espermàtic tendeix a presentar un **volum mínim**. Això és possible 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, i 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 **nuclihistona** (mínima reducció del volum nuclear) i nuclis organitzats en **nucliprotamina** (màxima reducció del volum nuclear) (v. Subirana, 1975 i 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 ser un model molt interessant per estudiar la cromatina. Els escasos 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,b; Mezquita, 1985; Loir et al., 1985). A falta d'un model concret, podem assumir 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 (Fig.I.A.1), és a dir, en el decurs de l'espermioogènesi, i sense modificació (o amb lleugeres modificacions de l'estructura nucleosòmica) les fibres "en rosari" es van condensant en estructures d'ordre més elevat produint la condensació nuclear. Direm que aquests nuclis es troben organitzats en forma de nuclihistona: el nucleosoma (més, menys o gens modificat) és la unitat estructural bàsica, i les histones són el component proteínic principal o exclusiu (v. Subirana, 1975 i 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 ja que 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 nuclihistona** espermàtica es produeix diferent segons les espècies: en *Carassius* sembla que la pròpia 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

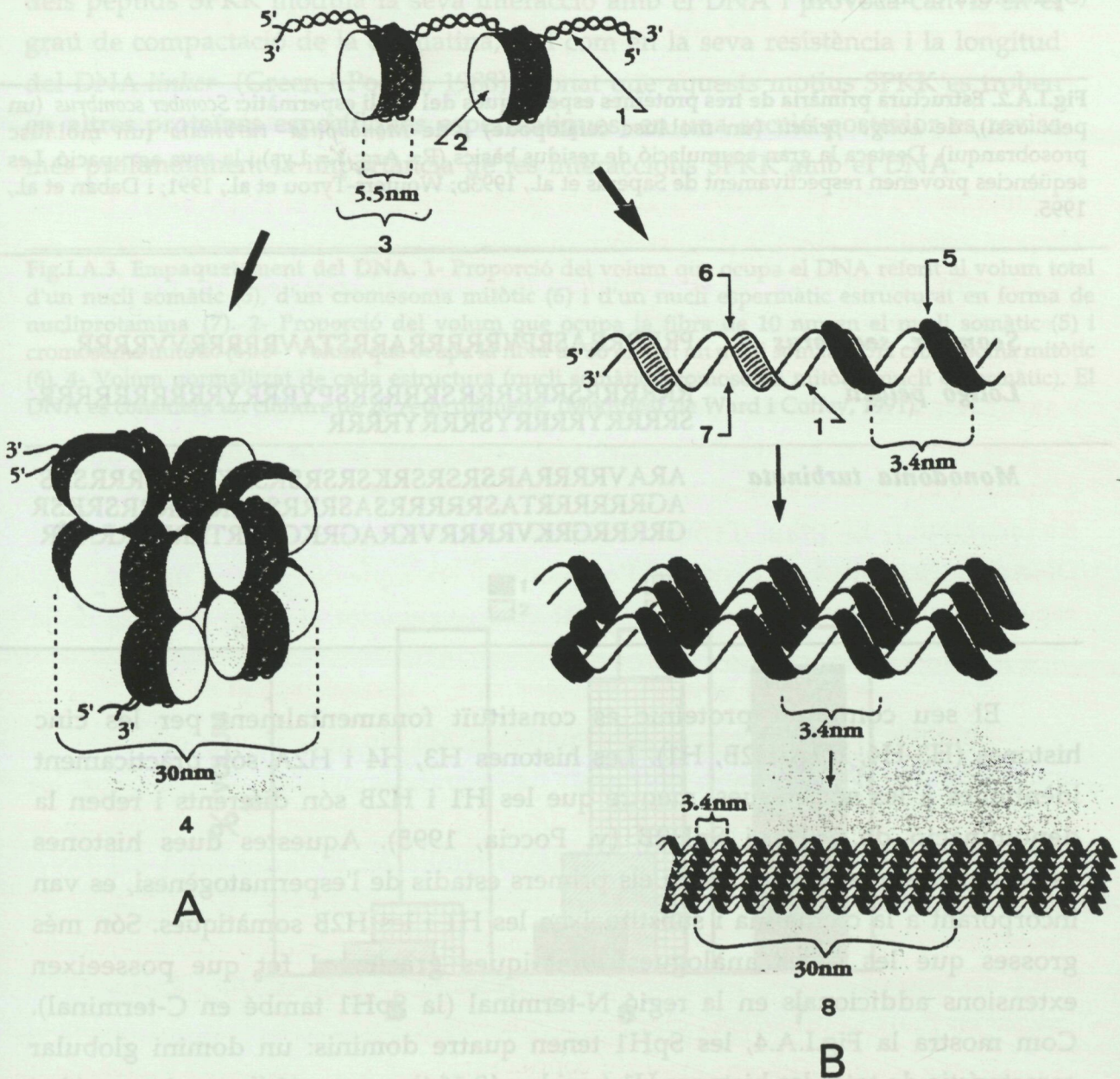
cromatina somàtica (Saperas et al., 1993a i 1994); en molts altres exemples, la cromatina espermàtica conté la dotació normal d'histones més una proteïna addicional estructuralment relacionada amb la histona H1 (Saperas et al., 1993a i 1994; Ausió 1986 i 1995; Azorín et al., 1983 i 1985); altres espècies han substituït la histona H1 somàtica per una histona similar però més bàsica (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 et al., 1977 i 1978; Strickland et al., 1977 i 1980; von Holt et al., 1984; Poccia, 1995). A partir dels casos estudiats, sembla que les nuclihistones espermàtiques posseeixen un grau de compactació similar al dels cromosomes mitòtics (de 5 a 10 vegades el cromosoma interfàsic).

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

Contràriament al cas de la nuclihistona, altres espècies experimenten al llarg de l'espermioogènesi una remodelació total de la cromatina haploide (Fig.I.A.1B): les histones van sent desplaçades i substituïdes per proteïnes progressivament més bàsiques, el nucleosoma i la fibra de 10 nm desapareixen, el DNA canvia la seva topologia i va adquirint un elevadíssim grau de compactació. En la **nucliprotamina espermàtica** no trobarem ni nucleosomes ni histones i, en canvi, hi formen part proteïnes específiques molt bàsiques i simples que clàssicament han estat anomenades **protamines** (Miescher, 1987; Bloch, 1969 i 1976). Les protamines han estat revisades diverses vegades (Poccia, 1986; Hecht, 1989a,b; Kasinsky et al., 1985a; Kasinsky, 1989; Meistrich, 1989; Oliva i Dixon, 1991; Chiva et al., 1991 i 1995; Daban et al., 1991; Saperas et al., 1994). Les característiques principals d'aquestes molècules queden reflectides i explicades a la Fig.I.A.2. Tal i com es discutirà més endavant, la nucliprotamina és una estructura 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 propi DNA (Risley et al., 1986; Barone et al., 1994). Hem de considerar, doncs, que la nucliprotamina és una consecució evolutiva superior, molt més especialitzada que la nuclihistona. La Fig.I.A.3 mostra que el nivell de condensació de la nucliprotamina és molt més

elevat que el de la cromatina somàtica i que el del cromosoma mitòtic (aquest últim equiparable a la nuclihistona espermàtica).

**Fig.I.A.1. Formació de la nuclihistona (A) i nucliprotamina (B) en l'espermioquèsi a partir de la cromatina haploide.** La nuclihistona espermàtica es basa fonamentalment en un repliegament de nucleosomes, mentre que per arribar a la nucliprotamina 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 nucliprotamínic.

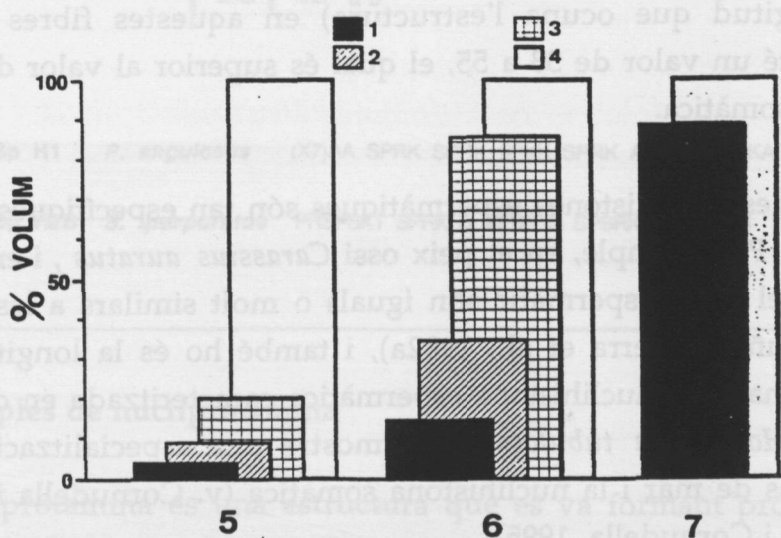




Lys (120-185) i les regions N- i C-terminals formades per la repetició de tetrapèptids del tipus SPKK (Ser-Pro-Lys-Lys). Les histones SpH2B també contenen aquests tetrapèptids en l'extrem N-terminal. Els extrems que contenen els pèptids SPKK interaccionen amb el DNA *linker* gràcies a la seva basicitat, 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 defosforilació de les Ser dels pèptids SPKK modula la seva interacció amb el DNA i provoca canvis en el grau de compactació de la cromatina, així com en la seva resistència i 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.

**Fig.I.A.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 nucliprotamina (7). 2- Proporció del volum que ocupa la fibra de 10 nm en el 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 i Coffey, 1991).

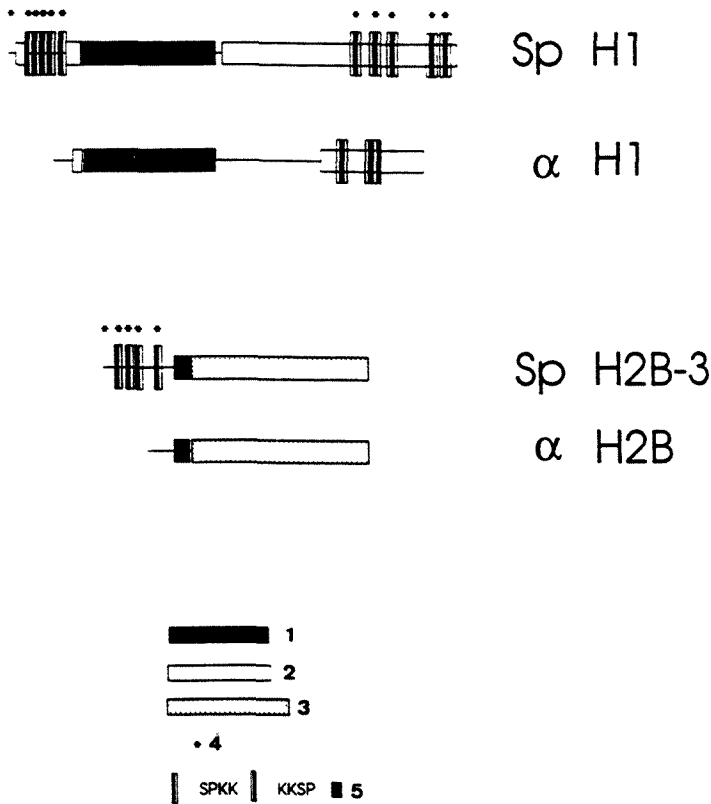


A part del component histònic, sembla que el nucli de l'espermatozoide dels eriçons de mar conté una petita proporció d'altres proteïnes (un 10% del contingut total). Kunkle (1984) ha mostrat que, després d'haver extret les histones espermàtiques i d'haver digerit quasi completament el DNA, queda una matriu fibrilar 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 nuclihistona 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; Arceli 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 pb de DNA, 110 dels quals corresponen al DNA *linker* ) i una elevada estabilitat. Els estudis per tècniques de raigs 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 regla" (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 Kb de DNA). El grau d'empaquetament 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 de 22-25 de la fibra de 30 nm somàtica.

No totes les nuclihistones 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 nuclihistona espermàtica caracteritzada en detall és la de l'equinoderm *Holothuria tubulosa* , que mostra una especialització intermèdia entre els eriçons de mar i la nuclihistona somàtica (v. Cornudella i Rocha, 1979; revisat en Prats i Cornudella, 1995).

**Fig.I.A.4. Estructura primària de les histones específiques SpH1 i SpH2B comparades en les seves anàlogues somàtiques (alfa en la figura) (modificat de Poccia, 1995).** 1- Regió central (cor central) conservat entre les diferents H1. 2- Regió rica en Lys i Ala en els extrems C-terminals de les SpH1. 3- Regió conservada entre les diferents H2B somàtiques i SpH2B. 4- Llocs que es fosforilen i defosforilen durant l'espermioquèsi. 5- Regió polibàstica 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).



**Sp H1** *P. angulosus* (X7)AA SPRK SPRK SPKK SPRK ASA SPRR KA

**Sp H2B** *S. purpuratus* PRSPSKT SPRK G SPRR G SPSRK A SPKR G

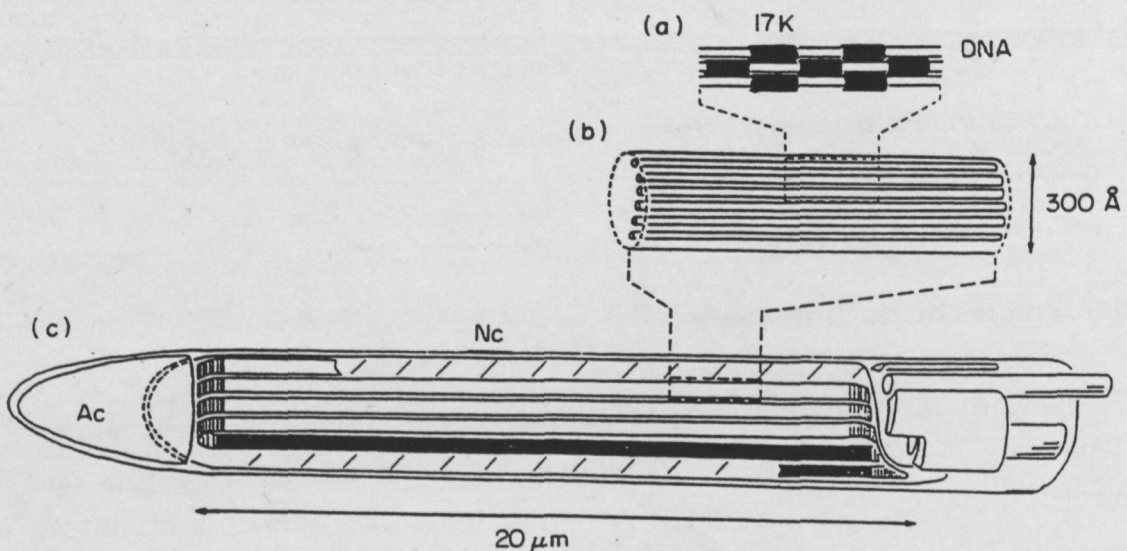
## ii. Exemples de nucliprotamina

La nucliprotamina és una estructura que es va formant progressivament en el decurs de l'espermioquèsi. En algunes ocasions implica la consecució d'estructures "unitàries" que, per coalescència (es "fonen" 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, en l'estudi de la nuclioprotamina hauríem de diferenciar: *i*) les interaccions moleculars entre el DNA i la proteïna espermàtica (les quals són les reponsables directes dels complexos), i *ii*) com es disposen o són organitzats els complexos nuclioprotamínics 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 nuclioprotamina (el que es podria dir les estructures d'ordre superior), depèn tant de les interaccions entre el DNA i protamina com de les relacions dels complexos nuclioprotamínics amb altres components del citoesquelet, així com dels processos espermiogènics 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 nuclioprotamíniques, mentre que en un apartat posterior analitzem amb més detall les interaccions moleculars entre DNA i proteïnes espermàtiques en general.

**Fig.I.A.5. Estructura de la nuclioprotamina del grill 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).



La **nucliprotamina del grill domèstic** (*Gryllus bimaculatus*) representa un dels casos més simples d'organització molecular. Ha estat estudiada per microcòpia electrònica, microscòpia de fluorescència i difracció d'electrons per Suzuki i Wakakayashi (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 Fig.I.A.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 nuclihistona); 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 fibra de 30 nm somàtica, les fibres nucliprotamíniques 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 nucliprotamina del grill és un cas d'estructura simple formada per l'associació de molècules complexes, la **nucliprotamina dels cefalòpodes** encara ho és més. Suau i Subirana (1977) han mostrat per difracció de raigs X aplicada a nuclis i a complexos reconstituïts de 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).

L'anàlisi de les dades de microscòpia electrònica de la **nucliprotamina *Gibbula divaricata*** (un mol·lusc arqueogastròpode) i de la difracció de raigs 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 pels calamars. Les cadenes de la protamina es trobarien també associades al solc ample de la doble hèlix, amb les arginines unides per ponts d'hidrògen als fosfats del DNA i penetrant parcialment en els solcs menors de les cadenes de DNA

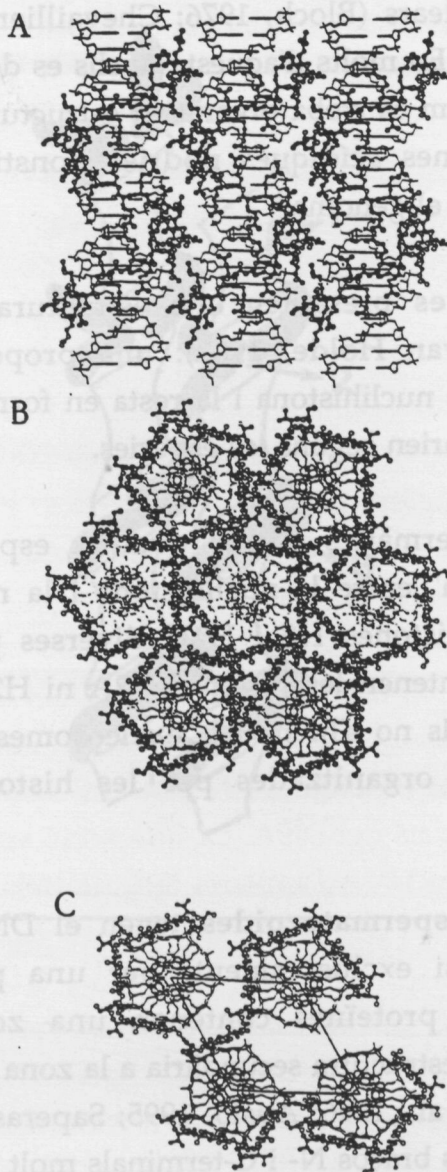
adjacents. Aquesta disposició empaquetaria el DNA en una cel·la quasihexagonal. La Fig.I.A.6 mostra una aproximació a l'estructura d'aquesta nuclioprotamina.

La **nuclioprotamina dels mamífers** constitueix, conjuntament amb la d'alguns mol·luscs i condrictis, 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 disulfur establerts entre dues cisteïnes de diferents molècules. El resultat és un nucli extraordinàriament estable químicament i físicament. Els ponts disulfur que forma la nuclioprotamina de mamífers han estat estudiats per Balhorn i col·laboradors (Balhorn, 1982 i 1989; Balhorn et al., 1991) tractant el nucli intacte amb agents reductors i seguint la modificació de cada residu de cisteïna marcat radioactivament; 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 Fig.I.A.7: la protamina posseeix els extrems N- i C-terminals doblegats cap al centre de la molècula; aquest doblegament estaria estabilitzat per ponts disulfur intramoleculars; addicionalment cada molècula de protamina formaria tres enllaços cys-S-S-cys intermoleculars (o sigui amb altres protamines). La "xarxa queratinosa" creada per les unions interprotamíniques atraparà les hèlixs de DNA de manera que la nuclioprotamina no pot ser dissociada per agents químics sense haver reduït prèviament els ponts 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 nuclioprotamínics 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 descondensats 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

nucli protamina 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.

**Fig.I.A.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.**



### **b. Altres estructures**

L'elecció de la nuclihistona i la nuclioprotamina 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 es resumeixen alguns exemples:

1. En certs **crustacis**, l'estructura del nucli espermàtic observada al microscopi electrònic té un aspecte completament transparent en els electrons. En aquestes espècies no s'hi ha trobat proteïnes bàsiques que interaccionin amb el DNA, encara que en alguns casos han estat descrites una petita proporció de proteïnes acídiques 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 acídiques 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 nuclihistona i la resta en forma de nuclioprotamina. Les proporcions al·ludides varien segons les espècies.

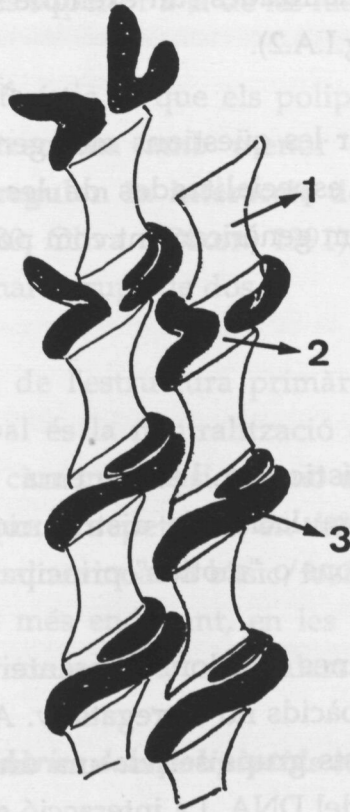
3. Els nuclis espermàtics d'unes quantes espècies d'**anurs** tenen una organització "intermèdia" entre la nuclihistona i la nuclioprotamina. Els nuclis espermàtics contenen histones H3 i H4 i diverses proteïnes de tipus *linker* específiques però no contenen les histones H2A ni H2B (Kasinsky et al., 1978 i 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 estructura secundària a la zona globular conservada de les histones H1 (Rochini et al., 1996; Ausió, 1995; Saperas et al. 1993a,b) i contenen addicionalment un o dos braços N- i C-terminal molt bàsics, de tipus protamina.



Un model d'estructura d'aquests nuclis s'analitza més endavant. Una característica significativa d'aquest tipus de proteïna/organització, és que apareix esporàdicament en certs grups zoològics que no tenen una situació filogenètica pròxima (Chiva et al., 1995). Aquest fet presenta una repercussió interessant per a comprendre l'evolució de l'estructura de la cromatina espermàtica.

**Fig.I.A.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.



### 3. *Interaccions moleculars DNA-proteïnes espermàtiques*

#### a. *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 aquest apartat considerem tres tipus:

- histones
- histones amb parts especialitzades (parts específiques que pràcticament només es troben en el nucli espermàtic) (un exemple és la SpH1, v. Fig.I.A.4)
- proteïnes especialitzades (un exemple serien les protamines típiques de la Fig.I.A.2).

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

#### b. *Estructura primària*

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

1. *Clusters* . En algunes ocasions presenten grups d'arginines i lisines separats per un o pocs aminoàcids no carregats (v. 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 Lys o Arg) (von Holt et al., 1984) que també representarien una unitat d'interacció amb el DNA.

3. **Distribució quasiuniforme com a unitat d'interacció.** En molta 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 (per ex. RSRRS etc, o GKGKKGK etc); les zones (RS)<sub>n</sub> acostumen a estar col·locades en els extrems N-terminals (Daban et al., 1995; Càceres, 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 de **serina** (o treonina amb menor freqüència), els quals en ser **fosforilats/defosforilats 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 primària 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.

### *c. Estructures secundàries dels polipèptids especialitzats*

Verdaguer et al. (1993) han mostrat recentment a través de dicromisme circular que els **pèptids rics en Lys i Arg** posseeixen tots una proporció important d'estructura en **alfa-hèlix**, malgrat el potencial teòricament baix de l'Arg per a formar alfa-hèlix en les proteïnes (Chou i Fasman, 1978). Aquesta autors conclouen que (almenys en els polipèptids espermàtics) és necessari modificar els mètodes de predicció estructural de proteïnes i adjudicar a l'Arg una major helicogeneïtat, punt que harmonitza amb estudis de Toniolo (Toniolo, 1980;

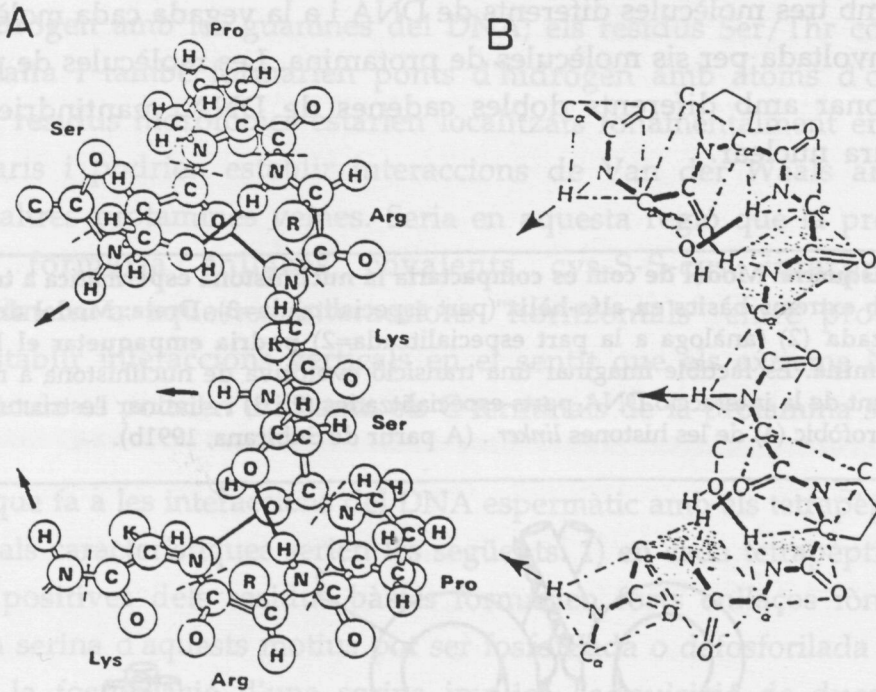
Toniolo et al., 1979) en què troben un 51% d'alfa hèlix en les protamines típiques de peixos (les quals estan constituïdes en un 70% per residus d'arginina). Hill et al. (1989) també observen per dicroisme circular que almenys una part de l'extrem C-terminal de la histona SpH1 d'equinoderm (concretament els residus 121-248 que no contenen prolina) posseeix un alt contingut en alfa-hèlix quan està unit al DNA. Els estudis del complex protamina-RNA per cristallografia de raigs X (Warrant i Kim, 1978) condueix 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) posseïrien un contingut apreciable d'alfa-hèlix. S'ha 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 troben per mitjà d'espectrometria 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 bivlaves, etc), i també poden ser presents en les reions C-terminals de les histones H1 no espermàtiques. De fet, segons Suzuki (Suzuki, 1989; Suzuki et al., 1990a,b) els tetrapèptids SPKK serien un cas especial d'un moriu genèric SPXX (X pot ser addicionalment Ser, Thr, Ala o Leu) 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 i es col·loca en el solc menor del DNA interaccionant a través de ponts d'hidrògen. La conformació en "gir-beta" dels motius SPKK estaria estabilitzada per ponts d'hidrògen entre els grups OH i CO de la Ser i els grups amida NH del tercer i quart aminoàcid del tetrapèptid (Fig.I.A.8) (per una discussió més àmplia d'aquestes estructures, v. 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,b).

No hi ha de moment cap informació sobre l'estructura secundària de les zones que hem definit com a alternàncies  $(RS)_n$  o  $(GK)_n$ .

Fig.I.A.8. Estructura molecular secundària dels motius SPKK on es poden apreciar els enllaços que estableixen el "gir-beta" i els punts d'interacció amb el DNA (fletxes).



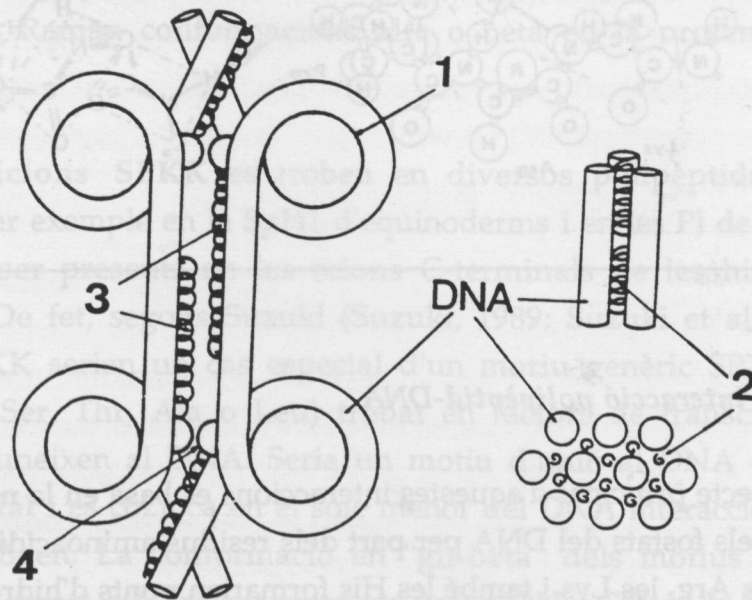
#### d. La interacció polipèptid-DNA

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 Arg, les Lys i també les His formarien punts d'hidrògen amb els grups fosfats de les cadenes laterals del DNA. Assumit 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 Brahm, 1976; Suau i Subirana, 1977), actualment es pensa que les **protamines**, cadenes amb càrrega quasiconstant i els motius SPKK, **es troben en gran part en el solc ample del DNA** (Mirzabekov et al., 1976; Fita et al., 1983). Subirana (1990b i 1991) ha proposat més recentment un model teòric

diferent per a la interacció concreta DNA-protamina. Com es pot veure a la Fig.I.A.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 molècules diferents de DNA i a la vegada cada molècula de DNA estaria envoltada per sis molècules de protamina. Les molècules de protamina, en interaccionar amb diferents dobles cadenes de DNA, mantindrien unida tota l'estructura nuclear.

**Fig.I.A.9. Esquerra: Model de com es compactaria la nuclihistona 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=2) podria empaquetar el DNA en forma de nucliprotamina. Es factible imaginar una transició evolutiva de nuclihistona a nucliprotamina fent manteniment de la interacció DNA-parts especialitzades (2 i 3) i eliminar l'estructura nucleosòmica (1) i el cor hidrofòbic (4) de les histones linker . (A partir de Subirana, 1991b).**



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 Mikelsaar i Raukas (comunicació personal a J. Subirana). Resumidament: les zones en alfa-hèlix de la protamina estarien ubicades en els espais intercatenaris; les Arg, en les regions alfa, neutralitzarien les càrregues negatives dels fosfats i podrien també formar ponts d'hidrògen amb les guanines del DNA; els residus Ser/Thr completarien les hèlixs alfa i també formarien ponts d'hidrògen 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 cys-S-S-cys 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 defosforilada per enzims específics, la fosforilació d'una serina implica l'adquisició de dues càrregues negatives que neutralitzaria la càrrega efectiva del tetrapèptid; 3) en l'espermatozoide, els pèptids amb SPKK repetitius, s'unirien amb el DNA *linker* optimitzant l'eficàcia de l'empaquetament del DNA en el nucli.

#### *e. 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 somàtiques, 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). Es a dir, en molts casos la **nucli protamina** també forma fibres d'un

diàmetre variable, però sempre al voltant dels 30 nm. Es 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 contraïó. L'efecte del contraïó 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 (Garcia Ramirez i Subirana, 1994). En condicions "fisiològiques" (100mM Na<sup>+</sup>) els complexos toroïdals presenten un gruix de 20 a 30 nm. Ward i Coffey (1991) proposen un model hipotètic de transició de nuclihistona (en les espermàtides), segons el qual sis nucleosomes (una volta de la fibra solenoide de 30 nm somàtica) es "desenredarien" però tot mantenint 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. Es 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 kb de DNA. Aquest 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 nuclioprotamina** 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 espermio-gènica. Aquests experiments han mostrat la

---



transformació de les fibres típiques en "collaret de perles" de la cromatina somàtica en fibres llises de la 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 (Fig.I.A.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.

**Fig.I.A.10.** Microscòpia electrònica convencional de la compactació de la cromatina al llarg d'una selecció de diferents estadis de l'espermiogènesi del mol.lusc prosobranaqui *Thais hemostoma* (d'A a F). Aquest exemple demostra, d'una banda, la relació entre la cromatina i altres estructures (l'axonema en aquest cas) i, d'altra banda, mostra com durant l'espermiogènesi les diferents "superestructures" de la cromatina es poden fondre entre elles i emascarar en el nucli espermàtic tot el procés de condensació. 1, 2- diferents graus de compactació; fletxes- divisió cel.lular. (Micrografies obtingudes per E. Ribes i M. Chiva en els Serveis Científico-Tècnics de la UB). A- 35,000x; B- 33,000x; C- 8000x; D- 47,000x; E- 20,000x; F- 65,000x

