

TRANSICIÓ DE PROTEÏNES NUCLEARS I CONDENSACIÓ DE LA CROMATINA ESPERMIOGÈNICA. PROPOSTA D'UN MODEL ANCESTRAL DE L'ESPERMIOGÈNESI NUCLEAR

KATHRYN KURTZ,¹ NÚRIA SAPERAS,² JOAN AUSIÓ³ I MANEL CHIVA¹

¹ *Departament de Ciències Fisiològiques II, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona.*

² *Departament d'Enginyeria Química, ETSEIB, Universitat Politècnica de Catalunya.*

³ *Department of Biochemistry and Microbiology, University of Victoria, BC, Canadà.*

Adreça per a la correspondència: Manel Chiva. Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona. Campus de Bellvitge, Pavelló de Govern, 4a planta. Feixa Llarga, s/n. L'Hospitalet de Llobregat. Adreça electrònica: mchiva@ub.edu.

RESUM

Revisem la correlació entre tres processos que es donen en l'espermioquèsi: a) el recanvi de proteïnes nuclears, b) el patró de condensació de la cromatina i c) l'acetilació de les histones. L'estudi s'aplica a quatre espècies que presenten transicions de proteïnes nuclears de complexitat creixent: *Sparus aurata*, que reté les histones en els nuclis espermàtics madurs, *Dicentrarchus labrax* i *Monodonta turbinata*, en les quals les histones són substituïdes per una proteïna molt més bàsica, i *Sepia officinalis*, en la qual les histones són desplaçades per una proteïna precursora que es transforma en protamina en les últimes fases de l'espermioquèsi. Els resultats indiquen que en la primera fase de l'espermioquèsi de les quatre espècies, es dona un procés idèntic, en el qual: a) la cromatina perd l'organització de tipus somàtic i queda estructurada en grànuls de 20 nm de diàmetre i b) les histones experimenten una acetilació moderada. A partir de l'estructura granular de 20 nm, cada tipus d'espermioquèsi segueix camins diferents. En les espermàtides de *S. aurata* les histones es desacetilen i la cromatina es condensa definitivament. En canvi, en les altres espermioquèsis es produeixen transicions estructurals més complexes que són analitzades en el text.

Paraules clau: espermioquèsi, cromatina, proteïnes nuclears, acetilació, evolució.

SPERMIOGENIC PROTEIN TRANSITIONS AND CHROMATIN CONDENSATION. PROPOSAL FOR AN ANCESTRAL MODEL OF NUCLEAR SPERMIOGENESIS

SUMMARY

We study the correlation between: i) nuclear protein exchange in spermiogenic nuclei, ii) the chromatin condensation pattern, and iii) the acetylation of histones. The study is applied to four species which demonstrate an increasing complexity in nuclear protein transitions. In *Sparus aurata* histones remain in sperm nuclei. In *Dicentrarchus labrax* and *Monodonta turbinata* the histones are substituted by a much more basic molecules. In spermiogenesis of *Sepia officinalis* histones are replaced by a precursor protamine, which is transformed into the protamine in the last phases of spermiogenesis. The results indicate that in the first phase of spermiogenesis of all four species an identical process is involved, in which: i) the chromatin loses typical somatic structure and ends up organized into granules measuring 20 nm in diameter, and ii) the histones undergo a moderate acetylation.

Key words: spermiogenesis, chromatin, nuclear proteins, acetylation, evolution.

INTRODUCCIÓ

En les espermiogènesis dels animals, el nucli de les espermatides experimenta una important transformació, amb la qual esdevé el nucli de l'espermatozoide. El procés de diferenciació nuclear es produeix en molts casos a través de l'expressió seqüencial de proteïnes específiques (anomenades genèricament *proteïnes bàsiques del nucli espermàtic* (SNBP), però que en alguns casos concrets s'anomenen *protamines*). Aquestes proteïnes penetren en el nucli i van desplaçant les histones i altres proteïnes nuclears. La substitució de les histones per les SNBP provoca la condensació progressiva de la cromatina. Així, el nucli final de l'espermatozoide conté una cromatina molt compactada, un volum reduït i una composició en proteïnes molt simplificada.

La transformació del nucli de l'espermàtida en el nucli espermàtic és un procés complex que varia segons el grup taxonò-

mic estudiat. En alguns peixos ossis i aus, la histona H4 de les espermatides presenta hiperacetilació en les etapes intermèdies de l'espermiogènesi, i a partir d'aquí les histones són reemplaçades per una proteïna molt bàsica (protamina) que es troba fosforilada (Sung i Dixon, 1970; Christensen i Dixon, 1982; Christensen *et al.*, 1984; revisat a Oliva i Dixon, 1991). La substitució de les histones per la protamina produeix una desestructuració i desaparició dels nucleosomes (Oliva *et al.*, 1987) i organitza el DNA en una estructura molt més compacta (nucleoprotamina). La substitució de proteïnes esmentada es dona en els estadis intermedis de l'espermiogènesi, els quals coincideixen amb la progressió de la condensació de la cromatina. En els estadis finals de l'espermiogènesi té lloc la desfosforilació de la protamina i l'últim pas de la condensació de la cromatina. Una altra de les espermiogènesis més estudiades és la dels mamífers. Aquí es dona una seqüència més comple-

xa en les substitucions de les proteïnes que interaccionen amb el DNA. Les histones es veuen parcialment reemplaçades per altres histones específiques del testicle, les quals són desplaçades més endavant per proteïnes de transició. Les proteïnes de transició seran reemplaçades posteriorment per protamines (una de les quals es troba en forma de precursor) (Meistrich, 1989; Courtens *et al.*, 1995; Meistrich *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004; Churikov *et al.*, 2004). En el decurs d'aquests canvis del tipus de proteïnes que s'uneixen al DNA també es produeixen una sèrie de modificacions posttraduccionals que permeten que el recanvi de proteïnes s'efectuï organitzadament. Entre aquestes modificacions cal destacar la hiperacetilació de la histona H4 i altres histones específiques del testicle, i la ubiquitinització de H3, H2B i TH3 (Grimes i Henderson, 1983; Chen *et al.*, 1998; Hazzouri *et al.*, 2000; Lahn *et al.*, 2002). En el nucli espermàtic madur es troben protamines i també una certa proporció d'histones acetilades, les quals en l'espermatozoide humà organitzen un 15 % del genoma (Gusse *et al.*, 1986; Gatewood *et al.*, 1987, 1990). Evidentment, aquests canvis de proteïnes comporten canvis en l'estructura i la condensació de la cromatina, que es poden mostrar parcialment a través de l'observació mitjançant microscòpia electrònica.

Les molècules relacionades amb la biologia reproductiva (així com els altres nivells de complexitat biològica relacionats amb la reproducció) han experimentat una evolució excepcionalment ràpida (Swanson i Vacquier, 2002). Això comporta que les característiques bioquímiques i morfològiques de l'espermioïgenesis siguin molt variades entre les espècies. Des de fa temps, s'han fet classificacions molt interessants i acurades de les cèl·lules espermàtiques i de la seva possible evolució (vegeu, per exemple, Franzen, 1977), però encara no es coneix com

pot haver evolucionat el procés de l'espermioïgenesis per produir tota la varietat d'espermatozoides que existeixen. En el present treball enfoquem aquest tema centrant-nos en el nucli espermàtic. Analitzem diferents tipus de canvis nuclears en quatre espermioïgenesis escollides i intentem proposar un model ancestral del procés que segueix el nucli cel·lular en el decurs de la diferenciació espermàtica.

MODELS DE CANVIS NUCLEARS EN LES ESPERMIOGÈNESIS

Sparus aurata (model [H → H])

La figura 1 mostra en primer lloc (part superior) el canvi o transició de proteïnes nuclears en l'espermioïgenesis d'aquesta espècie. És una transició molt simple: les espermàtides més joves contenen histones (marcades d'H1 a H4 a la figura) en el seu nucli. En el decurs de l'espermioïgenesis, desapareixen les proteïnes *no-histones* (minoritàries a la figura 1, part superior esquerra), però en els nuclis espermàtics madurs romanen les histones (vegeu la figura 1, part superior dreta). Les digestions dels nuclis dels espermatozoides amb nucleasa micrococcal produeixen el patró típic de les cromatines organitzades en forma de nucleosomes (Kurtz *et al.*, 2008). Per tant, l'estructura nucleosòmica no es perd en els nuclis espermioïgenics.

En la segona part de la figura 1 apareixen les imatges, obtingudes per microscòpia electrònica, de la compactació dels nuclis espermioïgenics (fila I), així com del patró de la condensació de la cromatina (fila II) i del marcatge amb anticòs antiacetil·lisina (fila III) en cada un dels estadis de la condensació. El marcatge amb antiacetil·lisina dóna informació de l'acetilació de les

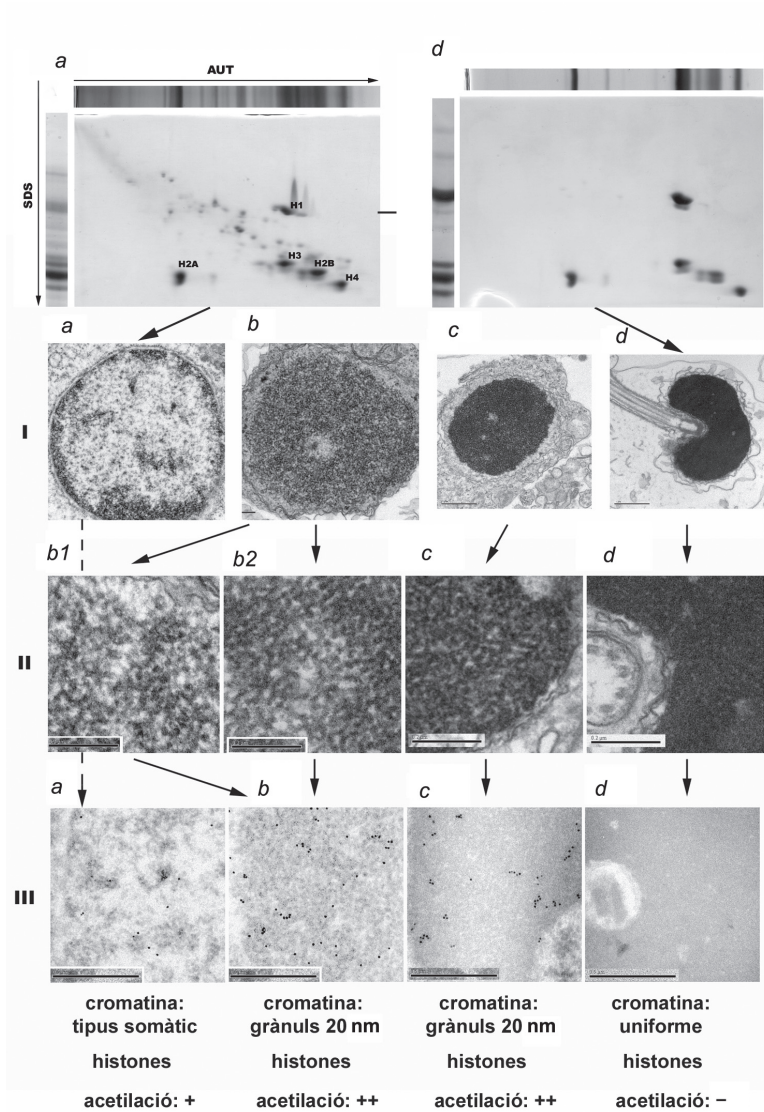


FIGURA 1. Característiques dels nuclis espermiogènics de *S. aurata*. Part superior: Electroforesi bidimensional (àcid acètic/urea/tritó i SDS) de les proteïnes extretes dels nuclis d'una gònada molt immadura (a) o dels nuclis d'espermatozoides (d). Fila I. Nucli d'una espermàtida molt jove (a) i d'espermàtides en diferenciació (b, c); nucli d'un espermatozoide testicular (espermàtida molt avançada) (d). Barra: 0,5 μm per a totes les imatges de la fila. Fila II. Patró de condensació de la cromatina espermiogènica. Cromatina en grànuls de 20 nm (b1, b2, c); cromatina condensada en les espermàtides molt avançades (d). Barra: 0,2 μm per a totes les imatges. Fila III. Marcatge amb anticòs anti-acetil-lisina en cada estadi de la condensació de la cromatina. Barra: 0,5 μm per a totes les imatges.

histones H3 i H4, tal i com ha estat comprovat amb transferència *western* (Kurtz *et al.*, 2008). L'espermàtida primerenca conté una cromatina organitzada de manera similar als nuclis somàtics, formats per eucromatina i per grumolls d'heterocromatina acumulats a la perifèria i en algunes zones interiors dels nuclis (vegeu *1a* a la figura 1). En aquests nuclis (els quals contenen histones i una certa proporció d'altres proteïnes) apareix un nivell basal relativament baix d'acetilació (*IIIa*). En els següents estadis de l'espermioïgenesis, la cromatina de l'espermàtida s'organitza homogèniament en grànuls. El diàmetre dels grànuls és de 20 nm, la qual cosa suggereix que poden estar compostos per 4-6 nucleosomes cada un (un nucleosoma és un cilindre d'aproximadament 5,5 nm de radi i 5,5 nm d'alçada). Els grànuls de 20 nm contenen histones en un estat significatiu d'acetilació (*IIIb*). De fet, l'acetilació en aquests estadis és la més intensa de tot el procés espermioïgènic d'aquesta espècie. A mesura que progressa l'espermioïgenesis de *S. aurata*, els grànuls de 20 nm es van concentrant en direcció al centre nuclear (*1b* → *c*) sense que se'n modifiqui la mida (*IIIc*). Aquest pas comporta finalment una reducció del volum nuclear, i possiblement una certa pèrdua de l'acetilació de les histones (*IIIC*). En els estadis finals, la cromatina adopta un aspecte més homogèniament compactat (*1d*), i l'organització en grànuls de 20 nm desapareix. És interessant observar que aquesta fase final coincideix amb la desacetilació completa de les histones (*IIId*).

Dicentrarchus labrax (model [H → P])

La figura 2 és un recull de les transicions composicionals i estructurals del nucli i la cromatina del peix ossi *D. labrax* durant la seva espermioïgenesis. L'anomenem model

[H → P] perquè les histones de les espermàtides són substituïdes per una protamina en els nuclis espermàtics madurs. A la part superior de la figura 2 es presenta el canvi en proteïnes, així com l'estructura primària de la protamina de *D. labrax* (Saperas *et al.*, 1993). Es tracta d'una molècula molt petita (trenta-quatre residus aminoacídics) formada en un 61,8 % per residus d'arginina. Semblantment al cas anterior, l'espermàtida més primerenca presenta un nucli amb una organització de tipus somàtic (a la figura 2 *1a*, apareix un nucli d'una espermàtida no totalment primerenca on la cromatina de tipus somàtic comença a transformar-se). La cromatina d'aquests nuclis, a més de contenir DNA, conté histones com a principals proteïnes bàsiques associades (i *no-histones* en menor proporció) (vegeu la figura 2, part superior *a*). El marcatge amb antiacetil-lisina dona una reacció basal relativament dèbil (*IIIa*).

El pas següent és la reorganització de la cromatina en grànuls de 20 nm de diàmetre (*1b1, b2*) idèntics als que presenta *S. aurata*. En aquesta transició també s'ha produït una acumulació dels grànuls en direcció al centre nuclear, la qual cosa ha provocat una important reducció del volum nuclear (*1b*). En els grànuls de 20 nm les histones (concretament les H3 i H4, quan és comprovat amb transferència *western*) manifesten un grau significatiu d'acetilació (*IIIb*). En els estadis següents, la protamina penetra en els nuclis (electroforesi intermèdia, vegeu la part superior de la figura 2). Això provoca una remodelació de l'estructura de la cromatina: els grànuls de 20 nm passen a formar grànuls majors i més electrodensos que creixen fins a adoptar un diàmetre aproximat de 80 nm (*1c, d; 11c, d, e*). La formació dels grànuls de 80 nm no s'efectua per simple fusió dels grànuls de 20 nm, ja que els grànuls de 80 nm no contenen histones, només DNA i protamina, la qual empaqueta

el DNA d'una manera diferent de la nucleosòmica (Ward i Coffey, 1991; Daban, 2000). Les histones que apareixen en aquest estadi es troben en el seu grau màxim d'acetilació, la qual cosa està d'acord amb treballs

anteriors en els quals es mostra que quan la protamina desplaça les histones aquestes estan hiperacetilades (vegeu la revisió d'Oliva i Dixon, 1991). Aquesta transició o remodelació estructural provoca una sego-

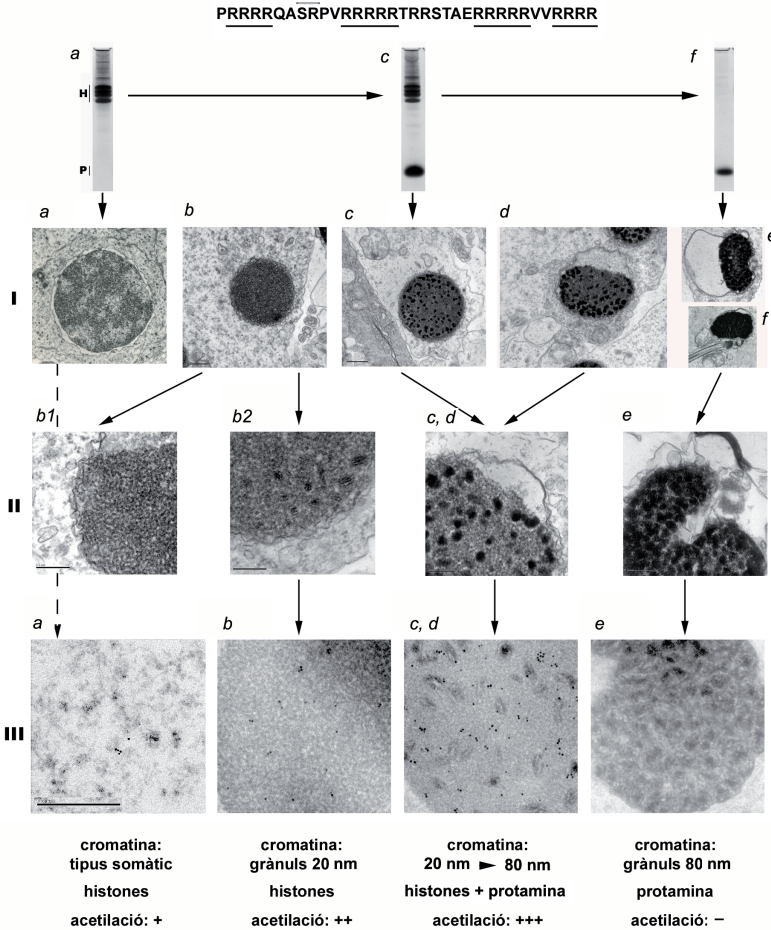


FIGURA 2. Característiques dels nuclis espermiogènics de *D. labrax*. Part superior: Electroforesi en àcid acètic/urea del canvi de proteïnes nuclears en l'espermiogènesi de *D. labrax* (H: histones; P: protamina). També es mostra la seqüència aminoacídica de la protamina d'aquesta espècie. Fila I: Estadis de la diferenciació nuclear, des d'una espermatida jove (a) a un espermatozoide testicular (f). Barra: 0,5 µm per a totes les imatges. Fila II. Patró de condensació de la cromatina. b1 i b2) grànuls de 20 nm; c, d) remodelació dels grànuls de 20 a 80 nm; e) cromatina d'una espermatida molt avançada. Barra: 0,2 µm per a totes les imatges. Fila III. Marcatge amb antiacetil-lisina de cada tipus de cromatina. Barra: 0,5 µm per a totes les imatges.

na reducció del volum del nucli espermàtic (*ic* → *f*). En les fases finals, el nucli ha reduït considerablement el seu volum (*if*), i la cromatina apareix organitzada en grànuls de 80 nm (*ie*). No hi ha histones en aquesta cromatina, només protamina (electroforesi, figura 2f).

***Monodonta turbinata* (model [H → P])**

En aquesta espècie de mollusc, les histones que es troben en les espermàtides primerenques són substituïdes per una proteïna de cent sis residus aminoacídics que formarà part del nucli espermàtic (vegeu la figura 3, electroforesi *a* → *e*). Aquesta proteïna no és una protamina típica, ni té un origen comú amb les protamines típiques (Chiva *et al.*, 1992; Lewis *et al.*, 2004). No obstant això, la seva estructura primària (resolta per Daban *et al.*, 1995) comparteix característiques força semblants amb les protamines típiques (entre aquestes una gran proporció de residus bàsics i la disposició de les arginines en grups de 4 a 6 residus, vegeu part superior de la figura 3).

En els primers estadis de la diferenciació espermiogènica, la cromatina de les espermàtides s'organitza de nou en grànuls de 20 nm (*ib*; *ib*, *c*), molt homogenis en el valor del seu diàmetre, que contenen histones en un estat significatiu d'acetilació (*ib*, *c*). En aquesta primera etapa de la diferenciació espermiogènica, el nucli també disminueix el seu volum sense que la cromatina perdi la seva estructura granular (*ib* → *c*; *ib*, *c*). A partir d'aquest estadi, els canvis en la cromatina segueixen també un patró similar al que hem trobat en *D. labrax*. Els grànuls de 20 nm es remodelen en grànuls de 60 nm quan la «protamina» de *M. turbinata* substitueix les histones (*ic*, *d*; *id1*). En els estadis en què la protamina comença a substituir les histones, aquestes es troben en el

seu màxim estat d'acetilació (*id1*). Posteriorment, la cromatina completa la seva remodelació i els complexos DNA-«protamina» adopten la forma de grànuls densos d'aproximadament 60 nm de diàmetre (*id2*; *id2*). En el pas final, els grànuls de 60 nm es fusionen parcialment i la cromatina del nucli espermàtic presenta un estat relativament homogeni (*ie*).

***Sepia officinalis* (model [H → Pp → P])**

La transició de proteïnes en aquesta espècie és un grau més complexa que en els casos anteriors. A les figures 4 i 5 es presenta un resum dels estudis efectuats en aquesta espermiogènesi. Aquí, les histones són substituïdes per una molècula precursora de la protamina (vegeu, a la figura 4, les electroforesis de la part dreta), la qual es transforma en protamina per escissió del seu extrem aminoterminal (Martin-Ponthieu *et al.*, 1991; Wouters-Tyrou *et al.*, 1991; vegeu la figura 6). En aquest cas, doncs, les histones no són substituïdes directament per la protamina que trobarem al nucli espermàtic madur, sinó per una proteïna menys bàsica (el precursor). La transició estructural de la cromatina és més complicada del que esperariem basant-nos en la transició de proteïnes (vegeu la figura 4). Es produeixen quatre transformacions (remodelacions) en l'estructura de la cromatina espermiogènica. El nucli de l'espermàtida primerenca conté cromatina de tipus somàtic que es reconverteix (com en els casos anteriors) en cromatina granular de 20 nm (vegeu la figura 4b). A diferència del que passava en les altres espermiogènesis, el nucli no pateix un decrement de volum (vegeu la figura 4 *a* → *b*). En estadis posteriors, la cromatina es remodela a una configuració fibrillar (30-35 nm de diàmetre), i simultàniament el nucli adopta una forma

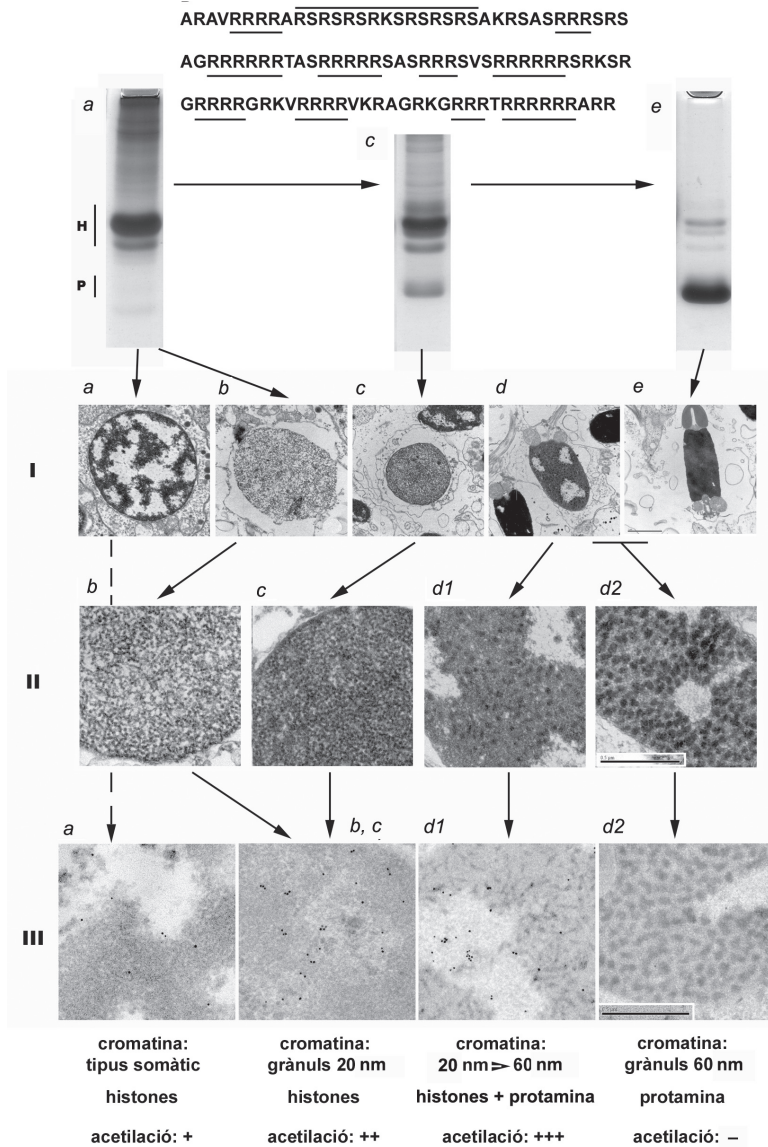


FIGURA 3. Característiques dels nuclis espermiogènics de *M. turbinata*. Part superior: Electroforesi en àcid acètic/urea de la transició de proteïnes nuclears espermiogèniques (H: histones; P: protamina). També apareix l'estructura primària de la molècula de «protamina» de *M. turbinata*. Fila i. Diferenciació del nucli en l'espermatogènesi (el nucli en *a* correspon a un espermatogoni que representa l'organització de tipus somàtic de la cromatina). Barra: 1 µm per a totes les imatges de la fila. Fila ii. Patró de condensació de la cromatina espermiogènica. *b, c*) grànuls de 20 nm; *d1*) remodelació dels grànuls de 20 a 60 nm. *d2*) cromatina d'una espermàtida avançada. Barra: 0,5 µm per a totes les imatges de la fila. Fila iii. Marcatge amb antiacetil-lisina de la cromatina en les diferents fases de la condensació. Barra: 0,5 µm per a tota la fila.

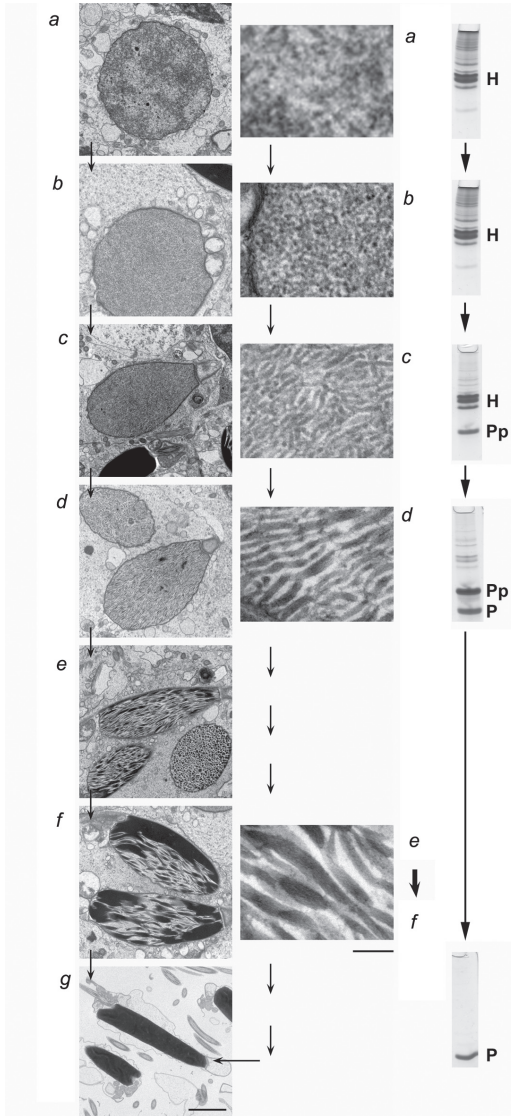


FIGURA 4. Nucli i cromatina espermiogènica de *S. officinalis*. Columna esquerra: Modificació de la forma nuclear al llarg de l'espermioïgenesis. Barra: 2 μm per a tota la columna. Columna central: Patró de condensació. Cromatina granular de 20 nm (b); cromatina en fibres de 30-35 nm (c); en fibres de 40-50 nm (d); unió progressiva de les fibres de 40-50 nm (e \rightarrow f). Barra: 200 nm per a tota la columna. Columna dreta: Composició proteïmica de cada tipus de cromatina. (H: histones; Pp: precursor de la protamina; P: protamina).

fusiforme (4c). En un estadi següent, tota la cromatina es reconverteix en fibres de 40-50 nm sense que es modifiqui la forma nuclear (4d). En els últims estadis d'aquesta espermiogènesi, les fibres de 40-50 nm es van ajuntant progressivament per formar fibres majors i finalment la cromatina uniforme i compactada del nucli espermiàtic (vegeu la figura 4 e \rightarrow g). Els canvis de forma del nucli espermiogènica i les seves principals causes van ser descrits en un treball anterior (Martínez-Soler *et al.*, 2007b), però no es consideren aquí en detall.

Atesa la complexitat de les transicions estructurals, vam estudiar la composició de proteïnes (Martínez-Soler *et al.*, 2007a) i l'estat d'acetilació de la histona H4 (Kurtz *et al.*, 2007) en cada tipus de cromatina. Els resultats globals d'aquests estudis es presenten resumidament a la figura 5: la cromatina de tipus somàtic de l'espermàtida més jove conté histones (més altres proteïnes minoritàries) que presenten un estat d'acetilació baix. En la primera remodelació, els grànuls de 20 nm es troben formats per histones de les quals la H4 està en forma monoacetilada. En el pas immediatament posterior, la molècula precursora de la protamina penetra en el nucli i coexisteix amb les histones i el DNA. Aquest complex (histones-DNA-precursor) adopta la forma de fibres de 30-35 nm. En aquestes estructures la histona H4 es troba hiperacetilada (fins a tres acetilacions per molècula de H4). En l'estadi següent, les histones han abandonat el nucli i només el precursor de la protamina es troba interaccionant amb el DNA. La cromatina s'organitza ara en fibres de 40-50 nm (vegeu la figura 5). Finalment, el processament del precursor (i possiblement la desfosforilació de la protamina) provoquen que les fibres de 40-50 nm es vagin fusionant entre si fins a formar el nucli espermiàtic de *Sepia*, que conté només DNA i protamina i que presenta la cromatina molt electrodensa.

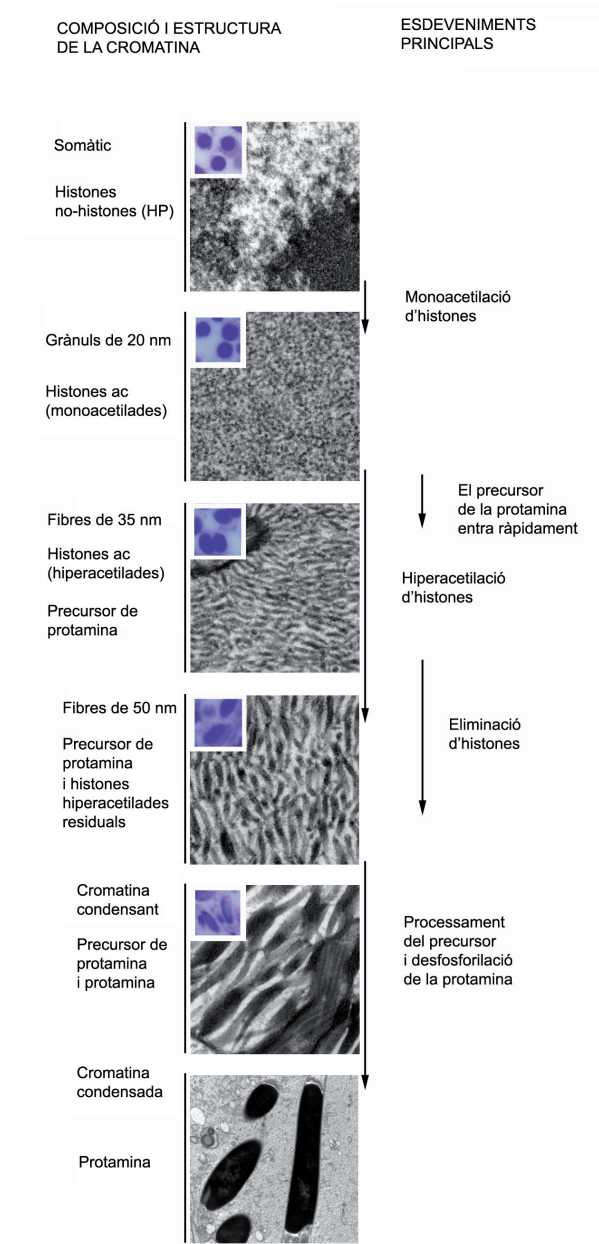


FIGURA 5. Resum del patró de condensació, composició i acetilació de proteïnes en l'espermioogènesi de *S. officinalis* (Martínez-Soler *et al.*, 2007b). Columna esquerra: Composició i estat d'acetilació de les histones. Columna central: Patró complet de condensació de la cromatina espermioogènica. Barra: 300 nm per a totes les figures excepte per a l'última (3 µm). Columna dreta: Principals esdeveniments causants dels canvis en la condensació de la cromatina.

DISCUSSIÓ

En aquest treball definim tres tipus de transicions de proteïnes nuclears en l'espermioogènesi. En el tipus més simple de transició ([H → H]) només les proteïnes no-histones abandonen els nuclis espermioogènics. El nucli espermàtic conserva les histones i l'organització nucleosòmica. En el següent nivell de complexitat (transició [H → P]) es produeix un desplaçament directe de les histones per part d'una proteïna molt bàsica, que posteriorment serà la principal (o l'única) proteïna present en els nuclis de les cèl·lules espermàtiques. L'altra transició espermioogènica presenta una complexitat superior. Les histones de les espermàtides són desplaçades per una molècula precursora de la protamina, que posteriorment es transformarà en protamina a través d'una escissió i eliminació de la seva part aminoterminal (Martin-Ponthieu *et al.*, 1991; Wouters-Tyrou *et al.*, 1991). Aquest tipus de transició l'anomenem [H → Pp → P] (Kurtz *et al.*, 2007).

Una anàlisi comparativa de l'espermioogènesi de les quatre espècies (*S. aurata*, *D. labrax*, *M. turbinata* i *S. officinalis*) ens permet establir algunes correlacions interessants entre canvis químics i canvis estructurals/morfològics de la cromatina espermioogènica. Apareix una característica que és compartida per totes aquestes espermioogènesis: en les primeres etapes del procés, les diferències estructurals entre eucromatina i heterocromatina desapareixen i tot el material nuclear s'organitza homogèniament en grànuls de 20 nm. La mida d'aquests grànuls és idèntica en totes les espècies. Els grànuls de 20 nm contenen en tots els casos histones i, en conseqüència, han d'estar constituïts per 4-6 nucleosomes. També en tots els casos les histones de la cromatina es troben parcialment acetilades. En *S. officinalis* hem demostrat que la histona H4 es

troba monoacetilada en la lisina 12 en els grànuls de 20 nm (Kurtz *et al.*, 2007). Sembla molt probable que l'acetilació parcial de la histona H4 (i possiblement la histona H3) impedeixi la formació d'estructures d'ordre elevat d'empaquetament dels nucleosomes (García-Ramírez *et al.*, 1995; revisat per Bulger, 2005; Calestagne-Morelli i Ausió, 2006), però d'altra banda pot afavorir l'agregació de petits grups de nucleosomes per formar els grànuls de 20 nm. De fet, un repàs de la literatura sobre el desenvolupament morfològic de l'espermioogènesi de diferents animals indica que la formació dels grànuls de 20 nm en les fases inicials de la condensació de la cromatina és un fenomen que es produeix en la majoria de les espècies (no en totes) (Ribes *et al.*, 2001).

D'altra banda, la formació de grànuls de 20 nm també permet que el nucli espermioogènica experimenti una reducció important en el seu volum (vegeu les figures 1, 2 i 3). No sembla que això sigui una propietat intrínseca de la cromatina de 20 nm, ja que en *S. officinalis* (i en altres espècies) la reorganització de la cromatina en grànuls de 20 nm no es produeix simultàniament a la reducció del volum nuclear (vegeu les figures 4 i 5). Aquesta disminució hauria de ser deguda a altres components (com per exemple les seves interaccions amb la matriu nuclear, etc.) relacionats amb la nucleomorfoogènesi, però que han de ser estudiats encara en la major part de les espècies.

En el cas de *S. aurata* (transició [H → H]), els grànuls de 20 nm experimenten una coalescència parcial en les darreres fases de l'espermioogènesi, i es produeix una cromatina espermàtica, d'aspecte quasi homogeni quan és observada per microscòpia electrònica. La coalescència d'aquests grànuls es produeix conjuntament amb la desaparició de l'acetilació de les histones (vegeu la figura 1). Aquest pas final és anàleg a la desfosforilació de la protamina en els altres

tipus de transicions proteiques. La desacetilació de les histones augmenta la interacció electrostàtica entre proteïnes i DNA, i permet una major aproximació i redistribució dels nucleosomes. Això provoca la «disgregació» dels grànuls de 20 nm.

En els restants casos analitzats en aquest treball, la cromatina prossegueix el procés de compactació. En *D. labrax* i *M. turbinata* els grànuls desapareixen per donar lloc a estructures més grans i més electrodenesses de 80 i 60 nm de diàmetre, respectivament (vegeu les figures 2 i 3). La desaparició dels grànuls de 20 nm és precedit per una hiperacetilació de les histones, les quals ja no es trobaran presents en els grànuls de 80 i 60 nm (formats exclusivament per DNA i protamina probablement fosforilada). Malgrat que les protamines de *D. labrax* i *M. turbinata* són diferents, el procés general de la condensació és molt similar i només es diferencia en la mida dels grànuls majors. La fusió d'aquests grànuls majors al final de les espermiogènesis coincideix amb la desfosforilació de la protamina descrita per altres autors.

La condensació de la cromatina en *S. officinalis* és més complicada. En una primera fase es formen grànuls de 20 nm compostos per DNA i histones (amb la H4 monoacetilada). En una etapa immediatament posterior la molècula precursora de la protamina entra en el nucli, on coexisteix amb les histones (fibres de 35 nm). En etapes més avançades, la histona H4 és hiperacetilada i totes les histones són desplaçades de la cromatina (fibres de 40-50 nm). En les etapes finals, el precursor es converteix en protamina i les fibres es van ajuntant entre si.

En diversos estudis ha estat suggerit que el tipus més primitiu d'espermatozoide conté histones en el seu nucli, i que a partir d'aquest model poden haver evolucionat diversos tipus de proteïnes nuclears espermàtiques anomenades genèricament SNBP (Ausió, 1995; Roccini *et al.*, 1996; Ausió *et al.*, 1997). El treball que presentem aquí està d'acord amb aquesta hipòtesi, i n'ofereix una explicació causal. És molt possible que l'acetilació limitada de les histones i la formació de grànuls de 20 nm siguin processos ancestrals en l'evolució de l'espermiogèn-

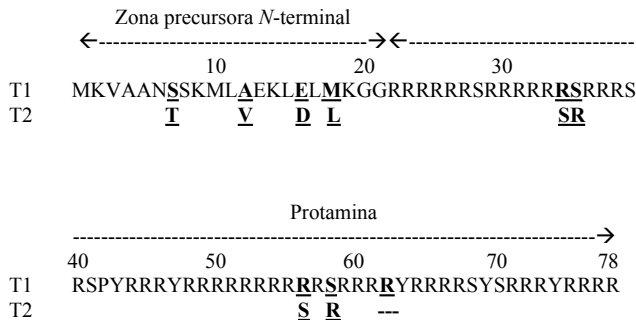


FIGURA 6. Precursor i protamina de *S. officinalis*. La protamina de *S. officinalis* és una proteïna microheterogènia que prové d'una proteïna major, o precursor. En aquesta figura es mostren les seqüències de les dues formes de la protamina de *S. officinalis* i dels seus precursors (T1 i T2, en la qual només apareixen els residus diferents). Els vint-i-un residus de l'extrem amino són eliminats de la molècula (i del nucli) en els estadis avançats de l'espermiogènesis. Les seqüències provenen de Martin-Ponthieu *et al.* (1991) i de Wouters-Tyrou *et al.* (1991).

nesi. D'una banda, la formació del grànuls en tot el volum nuclear provoca una homogeneïtat estructural, i anul·la les diferències zonals en l'organització (i possiblement en l'estat funcional) de la cromatina; d'altra banda, permet que el nucli espermatí experimenti una important disminució en el seu volum. Finalment, representa una estructura que permet fàcilment el desplaçament de les histones per part de les SNBP que puguin haver sorgit en l'evolució. Aquestes SNBP (entre les quals hi ha les protamines típiques) poden produir una condensació addicional del nucli espermatí.

Hem de manifestar que les transicions estudiades no representen totes les espècies animals. En altres espermiogènesis es produeixen transicions molt més complexes amb patrons de condensació de la cromatina més elaborats (Meistrich, 1989; Cáceres *et al.*, 1999; Ribes *et al.*, 2001). Els nuclis d'aquests espermatozoides poden presentar morfologies molt peculiars adaptades als detalls de la biologia de la fertilització de cada espècie.

AGRAÏMENTS

Agraïm a J. A. Subirana, F. Martínez-Soler, N. Cortadellas i E. Ribes el seu ajut i orientacions. Aquest treball ha estat finançat mitjançant dos ajuts del Ministeri d'Educació i Ciència (BFU2005-00123/BMC, BFU2006-04035/BMC) i del Natural Sciences and Engineering Research Council (Canadà) (OGP 0046399-02). Les observacions mitjançant microscòpia electrònica s'han efectuat als Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

BIBLIOGRAFIA

Ausió, J. (1995). «Histone H1 and the evolution of the

- nuclear sperm specific proteins». A: JAMIESON, B. G. M.; AUSIÓ, J.; JUSTINE, J. L. [ed.]. «Advances in spermatozoal taxonomy and phylogeny». *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle*, 166: 447-462.
- AUSIÓ, J.; VEGHEL, M. L. J. VAN; GÓMEZ, R.; BARREDA, D. (1997). «The sperm nuclear basic proteins (SNBPs) of the sponge *Neofibularia nolitangere*: Implications for the molecular evolution of SNBPs». *J. Mol. Evol.*, 45: 91-96.
- BULGER, M. (2005). «Hyperacetylated chromatin domains: Lessons from heterochromatin». *J. Biol. Chem.*, 280: 21689-21692.
- CÁCERES, C.; GIMÉNEZ-BONAFÉ, P.; RIBES, E.; WOUTERS-TYROU, D.; MARTINAGE, A.; KOUACH, M.; SAUTIÈRE, P.; MULLER, S.; PALAU, J.; SUBIRANA, J. A.; CORNUDELLA, L.; CHIVA, M. (1999). «DNA-interacting proteins in the spermiogenesis of the mollusc *Murex brandaris*». *J. Biol. Chem.*, 274: 649-656.
- CALESTAGNI-MORELLI, A.; AUSIÓ, J. (2006). «Long-range histone acetylation: biological significance, structural implications and mechanisms». *Biochem. Cell Biol.*, 84: 518-527.
- COURTENS, J. L.; KISTLER, W. S.; PLÖEN, L. (1995). «Ultrastructural immunolocalisation of histones (H2B, H3, H4), transition protein (TP1) and protamine in rabbit spermatids and spermatozoa nuclei. Relation to condensation of the chromatin». *Reprod. Nutr. Dev.*, 35: 569-582.
- CHEN-SUN, J. M. M.; ZANG, Y.; DAVIE, J. R.; MEISTRICH, M. L. (1998). «Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testis». *J. Biol. Chem.*, 273: 13165-13169.
- CHIVA, M.; DABAN, M.; ROSENBERG, E.; KASINSKY, H. E. (1992). «Protamines in polyplacophores and gastropods as a model for evolutionary changes in molluscan sperm basic proteins». A: BACCETTI, B. [ed.]. *Comparative spermatology*. Nova York: Raven Press: 77-82.
- CHRISTENSEN, M. E.; DIXON, G. H. (1982). «Hyperacetylation of histone H4 correlates with the terminal transcriptionally inactive stages of spermatogenesis in rainbow trout». *Develop. Biol.*, 93: 404-415.
- CHRISTENSEN, M. E.; RATTNER, J. B.; DIXON, G. H. (1984). «Hyperacetylation of histone H4 promotes chromatin decondensation prior to histone replacement by protamines during spermiogenesis in rainbow trout». *Nucleic Acid Res.*, 12: 4575-4592.
- CHURIKOV, D.; ZALENSKAYA, I. A.; ZALENSKY, A. O. (2004). «Male germ line-specific histones in mouse and man». *Cytogenet. Genome Res.*, 105: 203-214.
- DABAN, J. R. (2000). «Physical constraints in the condensation of eukaryotic chromosomes. Local concentration of DNA versus linear packing ratio

- in higher order chromatin structures». *Biochemistry*, 39: 3861-3866.
- DABAN, M.; MARTINAGE, A.; KOUACH, M.; CHIVA, M.; SUBIRANA, J. A.; SAUTIÈRE, P. (1995). «Sequence analysis and structural features of the largest known protamine isolated from the sperm of the archaeogastropod *Monodonta turbinata*». *J. Mol. Evol.*, 40: 663-670.
- FRÄNZEN, A. (1977). «Sperm structure with regards to fertilization biology and phylogenetics» *Vehr. Dtsch. Zool. Ges.*, 123-128.
- GARCÍA-RAMÍREZ, M.; ROCCHINI, C.; AUSIÓ, J. (1995). «Modulation of chromatin folding by histone acetylation». *J. Biol. Chem.*, 270: 17923-17928.
- 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*, 236: 962-964.
- GATEWOOD, J. M.; COOK, G. R.; BALHORN, R.; SCHMID, C. W.; BRADBURY, E. M. (1990). «Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones». *J. Biol. Chem.*, 265: 20662-20666.
- GRIMES, S. R. JR.; HENDERSON, N. (1983). «Acetylation of histones during spermatogenesis in the rat». *Arch. Biochem. Biophys.*, 221: 108-116.
- GUSSE, M.; SAUTIÈRE, P.; BÉLAICHE, D.; MARTINAGE, A.; ROUX, C.; DADOUNE, J. P.; CHEVAILLIER, P. H. (1986). «Purification and characterization of nuclear basic proteins of human sperm». *Biophys. Biochim. Acta*, 884: 124-134.
- HAZZOURI, M.; PIVOT-PAJOT, C.; FAURE, A. K.; USSON, Y.; PELLETIER, R.; SÈLE, B.; KHOCHBIN, S.; ROUSSEAU, S. (2000). «Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone-deacetylases». *Eur. J. Cell Biol.*, 79: 950-960.
- KURTZ, K.; MARTÍNEZ-SOLER, F.; AUSIÓ, J.; CHIVA, M. (2007). «Acetylation of histone H4 in complex structural transitions of spermiogenic chromatin». *J. Cell. Biochem.*, 102: 1432-1441.
- KURTZ, K.; SAPERAS, N.; AUSIÓ, J.; CHIVA, M. (2008). «Spermiogenic nuclear protein transitions and chromatin condensation. Proposal for an ancestral model of nuclear spermiogenesis». *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Eol.)*. [En prensa]
- LAHN, B. T.; TANG, Z. L.; ZHOU, J.; BARNDT, R. J.; PARVINEU, M.; ALLIS, C. D.; PAGE, D. (2002). «Previously uncharacterized histone acetyltransferases implicated in mammalian spermatogenesis». *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 99: 87007-87012.
- LEWIS, J. D.; SAPERAS, N.; SONG, Y.; ZAMORA, M. J.; CHIVA, M.; AUSIÓ, J. (2004). «Histone H1 and the origin of protamine». *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 101: 4148-4152.
- MARTIN-PONTHIEU, A.; WOUTERS-TYROU, D.; BELAICHE, D.; SAUTIÈRE, P.; SCHLINDER, P.; DORSSELAER, A. VAN (1991). «Cuttlefish sperm protamines. 1. Amino acid sequences of two variants». *Eur. J. Biochem.*, 195: 611-619.
- MARTÍNEZ-SOLER, F.; KURTZ, K.; AUSIÓ, J.; CHIVA, M. (2007a). «Transition of nuclear proteins and chromatin structure in spermiogenesis of *Sepia officinalis*». *Mol. Reprod. Develop.*, 74: 360-370.
- MARTÍNEZ-SOLER, F.; KURTZ, K.; CHIVA, M. (2007b). «Sperm nucleomorphogenesis in the cephalopod *Sepia officinalis*». *Tissue and Cell*, 39: 99-108.
- MEISTRICH, M. L. (1989). «Histone and basic nuclear protein transitions in mammalian spermatogenesis». A: HNILICA, L. S.; STEIN, G. S.; STEIN, J. L. [ed.]. *Histones and other basic nuclear proteins*. Orlando: CRC Press: 165-182.
- MEISTRICH, M. L.; MOHAPATRA, B.; SHIRLEY, C. R.; ZHAO, M. (2003). «Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis». *Chromosoma*, 111: 483-488.
- OLIVA, R.; BAZZET-JONES, D.; MEZQUITA, C.; DIXON, G. H. (1987). «Factors affecting nucleosomal disassembly by protamines *in vitro*». *J. Biol. Chem.*, 262: 17016-17025.
- OLIVA, R.; DIXON, G. M. (1991). «Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction». *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 40: 25-94.
- RIBES, E.; SÁNCHEZ DE ROMERO, L. D.; KASINSKY, H. E.; VALLE, L. DEL; GIMÉNEZ-BONAFÉ, P.; CHIVA, M. (2001). «Chromatin reorganization during spermiogenesis of the mollusc *Thais hemostoma* (Muricidae). Implications for sperm nuclear morphogenesis in cenogastropods». *J. Exp. Zool.*, 289: 304-316.
- ROCCHINI, C.; MARX, R. M.; CAROSFELD, 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: Evolutionary implications». *J. Mol. Evol.*, 42: 240-246.
- SAPERAS, N.; AUSIÓ, J.; LLORIS, D.; CHIVA, M. (1994). «On the evolution of protamines in bony fish: Alternatives to the retroviral horizontal transmission». *J. Mol. Evol.*, 39: 282-295.
- SAPERAS, N.; RIBES, E.; BUESA, C.; GARCÍA-HEGART, F.; CHIVA, M. (1993). «Differences in chromatin condensation during spermiogenesis in two species of bony fish with distinct protamines». *J. Exp. Zool.*, 265: 185-194.
- SUNG, M. T.; DIXON, G. M. (1970). «Modification of histones during spermiogenesis in trout: A molecular mechanism for altering histone binding to DNA». *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 67: 1616-1623.
- SWANSON, W. J.; VACQUIER, V. D. (2002). «Reproductive

- protein evolution». *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 33: 161-179.
- WARD, W. S.; COFFEY, D. S. (1991). «DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: Comparison with somatic cells». *Biol. Reprod.*, 44: 569-574.
- WOUTERS-TYROU, D.; CHARTIER-HARLIN, M. C.; MARTIN-PONTHIEU, A.; BOUTILLON, C.; DORSSELAER, A. VAN; SAUTIÈRE, P. (1991). «Cuttlefish spermatid-specific protein T. Molecular characterization of two variants T1 and T2, putative precursors of sperm protamine variants Sp1 and Sp2». *J. Biol. Chem.*, 266: 17388-17395.
- ZHAO, M.; SHIRLEY, C. R.; MOUNSEY, S.; MEISTRICH, M. L. (2004). «Nucleoprotein transitions during spermiogenesis in mice with transition nuclear protein Tnp1 and Tnp2 mutations» *Biol. Reprod.*, 71: 1016-1025.