

## TRANSICIÓ DE PROTEÏNES, ACETILACIÓ DE LA HISTONA H4 I ESTRUCTURA DE LA CROMATINA EN L'ESPERMIOGÈNESI DE LA SÈPIA (*Sepia officinalis*)

Fina Martínez-Soler, Kathryn Kurtz, Manel Chiva

Dept. de Ciències Fisiològiques II, Facultat de Medicina, Campus de Bellvitge

Feixa Llarga, s/n. 08907 L'Hospitalet de Llobregat. Tel. 934 035 824. [finamartinez@ub.edu](mailto:finamartinez@ub.edu), [lauffykaffyl7@yahoo.com](mailto:lauffykaffyl7@yahoo.com), [mchiva@ub.edu](mailto:mchiva@ub.edu).

---

### Resum

En el decurs de l'espermioogènesi del cefalòpode *S. officinalis* les histones són primer desplaçades per una proteïna més bàsica, el precursor de la protamina, que després esdevé la protamina madura mitjançant la deleció dels primers 21 residus N-terminals. Aquesta doble transició proteica provoca una sèrie de remodelacions complexes en l'estructura de la cromatina espermioogènica: la cromatina de tipus somàtic es reorganitza primer en grànuls de 20 nm, posteriorment en fibres de 35 nm i finalment en fibres de 50 nm. En l'última etapa de l'espermioogènesi (fases de condensació) les fibres de 50 nm s'agrupen entre si, es fusionen i donen lloc a la cromatina altament compactada de l'espermatozoide madur. Utilitzant anticossos específics contra la histona H2A, el precursor de la protamina i contra formes hiperacetilades de la histona H4, demostrem que l'organització de la cromatina en grànuls de 20 nm té lloc alhora que la histona H4 es monoacetila (en lys 12), que la transició de grànuls a fibres de 35 nm és deguda a l'entrada del precursor en el nucli, i que la transició de fibres de 35 nm a fibres de 50 nm es produeix alhora que té lloc una hiperacetilació de la histona H4 i la desaparició de les histones romanents en el nucli.

**Paraules clau** Cefalòpode, espermioogènesi, condensació de la cromatina, acetilació.

### Abstract

During the spermiogenesis of the cephalopod *S. officinalis* histones are first replaced by a more basic protein called protamine precursor, which later will become the mature protamine by means of an N-terminal deletion of the first 21 aminoacid residues. This double transition of proteins provokes a complex pattern of chromatin remodeling during spermiogenesis: first the somatic-like chromatin is reorganized into 20 nm granules, later to 35 nm fibres and finally into 50 nm fibers. In the last stages of spermiogenesis (condensation phases) the 50 nm fibers coalesce together to become the highly packed chromatin found in the mature sperm nucleus. Using specific antibodies against histone H2A, protamine precursor molecule and hyperacetylated isoforms of histone H4, we demonstrate that reorganization of somatic-like chromatin into 20 nm granules takes place concomitantly with a monoacetylation of histone H4; that the transition from 20 nm granules to 35 nm fibers are due to the massive entrance of the protamine precursor in the nucleus; and that from 35 nm fibers to 50 nm fibers an hyperacetylation of histone H4 and the removal of the totality of histones occurs.

---

## INTRODUCCIÓ

Durant l'espermioogènesi de la gran majoria d'espècies animals, es donen una sèrie de canvis en les proteïnes que interaccionen amb el DNA i que provoquen remodelacions en la cromatina espermioogènica i un patró determinat de condensació que condueix progressivament a una cromatina molt compactada dins el nucli (reduït en volum) de l'espermatozoide madur.

La variabilitat en els tipus de proteïnes que remo-

delen la cromatina espermioogènica és molt elevada i, per tant, també ho són els patrons en què es condensa la cromatina. Les proteïnes que organitzen la cromatina en l'espermatozoide s'agrupen sota el terme *sperm nuclear basic proteins* (SNBP) i es caracteritzen per ser proteïnes de poc pes molecular i molt bàsiques, fet que els aporta una major afinitat d'interacció pel DNA, cosa que permet una compactació de la cromatina més eficaç. La protamina n'és una d'aquestes.

Antecedents sobre els canvis en la composició

proteica de la cromatina espermiogènica del cefalòpode decàpode *Sepia officinalis* (Rosseau-Prévost *et al.*, 1988; Martin-Ponthieu *et al.*, 1991; Wouters-Tyrou *et al.*, 1991; Martin-Ponthieu *et al.*, 1994) demostren que les histones que organitzen la cromatina en nucleosomes en les espermatides primerenques són primer desplaçades per una molècula precursora de la protamina, que després esdevindrà mitjançant una deleció dels primers 21 residus N-terminal, la protamina madura que hi ha en l'espermatozoide. Tant la forma precursora de la protamina com la protamina madura tenen dues isoformes microheterogènies, T1 i T2, i Sp1 i Sp2, respectivament.

En un altre treball, Couppez *et al.* (1987) demostren que en la gònada de *Sepia officinalis*, la histona H4 presenta diferents isoformes d'acetilació, la no acetilada (41,4 %), mono, di, tri i tetraacetilades (32,3, 18, 6,5 i 2 %, respectivament), i que l'increment del grau d'acetilació té lloc de manera seqüencial en la gònada, on la lisina 12 és el lloc preferencial d'acetilació en la isoforma monoacetilada, les lisines 12 i 5 en la isoforma diacetilada, i les lisines 12, 5 i 16 són les que estan acetilades en la isoforma triacetilada de la histona H4.

Estudis previs des del punt de vista morfològic daten de l'any 1974, en què Maxwell estudia ultraestructuralment les característiques generals de l'espermiogènesi de tres espècies de cefalòpodes decàpodes diferents, entre les quals hi ha *Sepia officinalis* (anomenada en aquest treball *Eusepia officinalis*).

Amb aquests antecedents en ment, el propòsit d'aquest treball és, en primer lloc, fer una reexaminació del procés de condensació de la cromatina espermiogènica de *S. officinalis* i correlacionar cada estructura concreta que adopta la cromatina amb el corresponent canvi en la composició proteica. En segon lloc, per aprofundir més en les causes principals de les transicions estructurals de la cromatina, estudiem també com participa l'acetilació de la histona H4 en aquest procés.

## MATERIAL I MÈTODES

### Gènesi d'antisèrums

**Precursor de la protamina:** La molècula precursora de la protamina de *S. officinalis* (T1 i T2) va ser primer purificada amb HPLC i posteriorment digerida amb quimi tripsina; els pèptids resultants van ser repurificats de nou amb HPLC i el pèptid precursor va ser conjugat amb una proteïna portadora i posteriorment injectat en el conill. L'antisèrum obtingut

va ser testejat amb Western blot (resultats no mostrats aquí), però cal dir que l'anticòs presenta una reacció creuada amb la protamina madura.

**Histona H2A:** La histona H2A va ser primer extreta amb HCl 0,4 N i posteriorment repurificada per cromatografia CM52 (Càceres *et al.*, 1994) utilitzant un gradient de NaCl de 0,2 a 0,8 M i injectada a un conill. L'antisèrum obtingut es va testejar amb Western blot (resultats no mostrats aquí; vegeu Martínez-Soler *et al.*, 2007) i mostren que l'antisèrum és específic per a la histona H2A.

**Anticossos comercials:** Anti H4-ac.K12: Hem utilitzat també l'anticòs comercial contra la histona H4 acetilada específicament en lisina 12 (H4-acK12) (*upstate*) que correspon al pèptid N-terminal de la histona H4 acetilada en k12. També l'anticòs contra la histona H4 acetilada específicament en la lisina 16 (H4-ac.K16) (*upstate*), generat a partir del pèptid N-terminal acetilat en K16. En general, en les immunolocalitzacions el marcatge obtingut amb l'anticòs anti H4-ac.K16 ha estat sempre inferior al de l'anti-H4-ac.K12. Una possible explicació a aquest fet podria ser el fet que *in vivo* la lisina 16 ocupa una posició molt propera al cor de la histona H4, fet que podria suposar un epítot força inaccessible per al seu anticòs.

### Microscòpia electrònica

Es varen fixar petites porcions de gònada de *S. officinalis* i es van incloure en Spur per a l'observació d'ultraestructura, i amb Lowicryl per a les immunolocalitzacions.

### Immunolocalitzacions

**H2A i precursor de la protamina:** Vegeu Martínez-Soler *et al.* (2007) per a les condicions experimentals de les immunolocalitzacions d'aquests dos anticossos.

**H4-ac.K12 i H4-ac.K16:** Les reixetes amb els talls ultrafins van ser primer bloquejats amb 0,1 M PBS pH 8,5 / 2 % llet desnatada / 2 % sèrum (*Normal goat serum*) i 20 mM de glicina. Els anticossos van ser incubats durant 2 h a temperatura ambient a una dilució 1:25 i 1:100 per a H4-ac.K12 i 1:100 per a H4-ac.K16 en la solució de bloqueig sense la glicina. L'anticòs secundari utilitzat per a ambdós anticossos ha estat un *goat anti-rabbit* conjugat amb una partícula d'or coloidal de 15 nm de diàmetre, diluït 1:25 en la mateixa solució de dilució que l'anticòs primari; la incubació va ser durant 1 h. Tot el procediment d'incubació va ser realitzat a temperatura ambient.

Amb aquestes condicions de treball els controls negatius (reixetes tractades exclusivament amb l'an-

ticòs secundari) tenien un marcatge nul o gairebé nul.

## RESULTATS

### *Patró de condensació de la cromatina espermiogènica en S. officinalis*

En l'espermioègesi de *S. officinalis*, la cromatina de l'espermàtida inicial experimenta una sèrie de remodelacions que condueixen a la cromatina altament compactada i electrodensa de l'espermatozoide madur. La primera columna de la figura mostra sis imatges que resumeixen el procés de condensació de la cromatina. El nucli de l'espermàtida inicial és rodó (de 4 µm de diàmetre, columna 1, figura A detall) amb una cromatina d'aspecte similar a una cèl·lula somàtica, on es poden apreciar les diferències entre unes zones més electrodenses (heterocromatina) i d'altres més laxes (eucromatina). La primera remodelació que experimenta aquesta cromatina de tipus somàtic consisteix en una homogeneïtzació global (i, per tant, també una homogeneïtzació en la seva composició proteica), en què l'eucromatina i heterocromatina desapareixen i es reorganitzen en grànuls de 20 nm de diàmetre distribuïts uniformement dins el nucli rodó de l'espermàtida, (columna 1, figura B i figura B detall). El següent pas de remodelació, conjuntament amb l'inici d'una lleugera elongació del nucli (columna 1, figura C detall), consisteix en la formació de fibres (columna 1, figura C) que inicialment mesuren 35 nm de diàmetre, i més endavant en l'espermioègesi de 50 nm (columna 1, figura D). Aquesta cromatina fibrillar es troba homogèniament orientada en paral·lel a l'eix d'elongació del nucli.

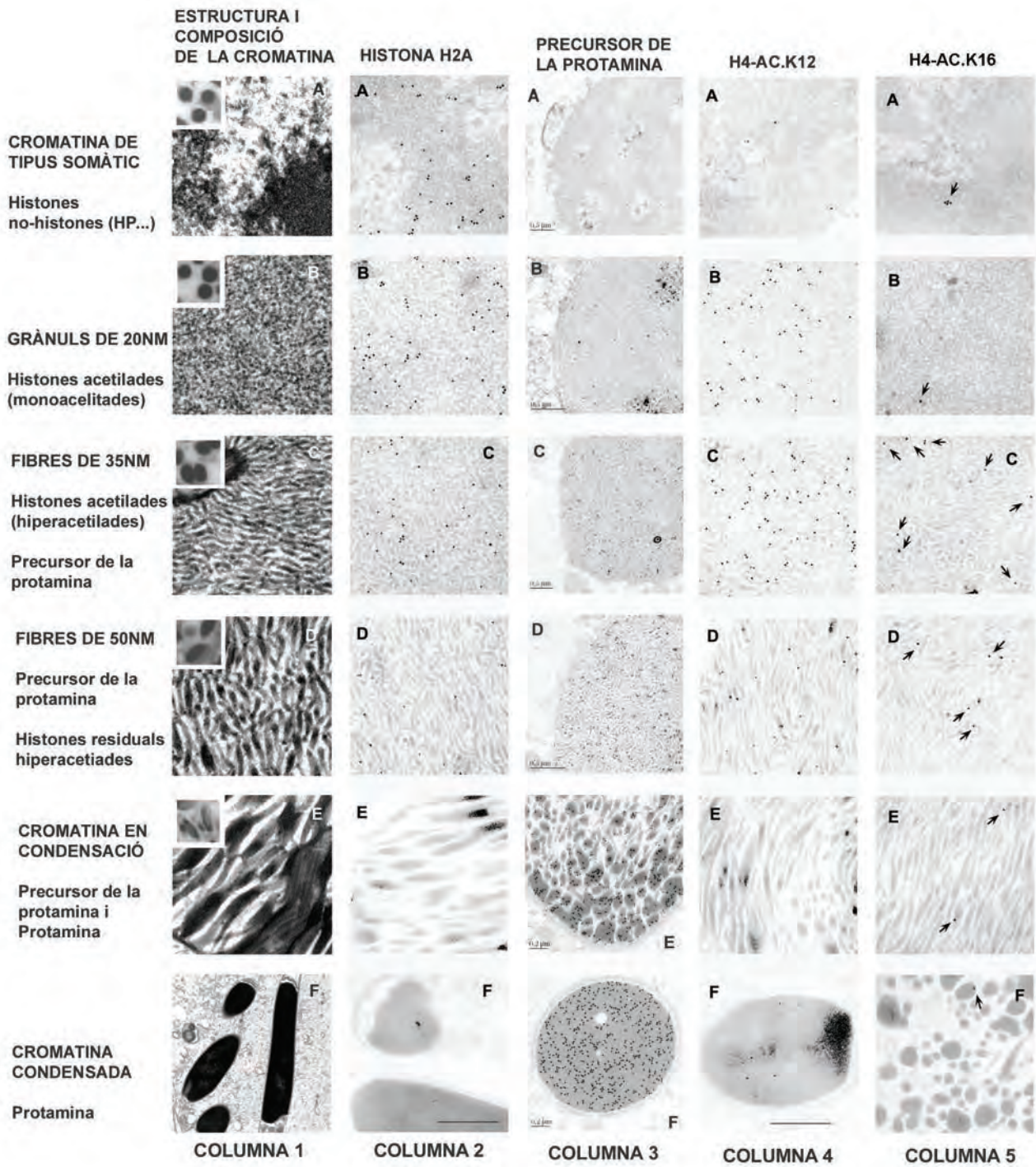
A partir d'aquest estadi en endavant, les fibres de 50 nm es van fusionant entre si i formen agregats de cromatina condensada cada vegada més grans, que es dipositen en un lateral de la membrana (columna 1, figura E detall) i provoca una compressió lateral del nucli, fins que en l'espermatozoide madur la totalitat de la cromatina es troba altament compactada en un nucli elongat i reduït en volum (columna 1 figura F). Agrupem les fases des de columna 1 figura A-D amb el nom de *fases de remodelació*, perquè en cada pas es dona una remodelació global de la cromatina, i *fases de condensació* en les etapes de la columna 1 figura E i F, ja que més que una remodelació es tracta d'una fusió de les fibres de cromatina preexistents.

### *Composició proteica de la cromatina espermiogènica de S. officinalis*

**Anti-histona H2A:** Per tal de saber en quin moment de l'espermioègesi comencen a desaparèixer les histones del nucli i són desplaçades pel precursor de la protamina, hem fet immunolocalitzacions amb l'antisèrum de la histona H2A interpretant el marcatge d'aquesta histona com a representatiu de la presència de la resta d'histones en el nucli, i de l'organització de la cromatina en nucleosomes. En la segona columna de la figura es mostren sis imatges en què es resumeixen els resultats obtinguts. En la cromatina de tipus somàtic de l'espermàtida inicial, l'immunomarcatge per a la histona H2A és significatiu i evident, i es localitza preferentment en l'heterocromatina (columna 2, figura A) pel fet que en aquest tipus de cromatina, la concentració de nucleosomes és major (Manochantr *et al.*, 2005; Suphamuntee *et al.*, 2005). La cromatina granular presenta la reacció màxima amb la histona H2A (columna 2, figura B) amb el marcatge homogeni i uniforme, cosa que indica una organització d'aquesta cromatina en nucleosomes, també uniforme. La cromatina fibrillar de 35 nm, (columna 2, figura C) presenta un marcatge lleugerament inferior, més similar a la de tipus somàtic, però continua sent un marcatge significatiu, cosa que indica la presència de la histona H2A (i de la resta d'histones). La figura D de la columna 2 mostra que en les fibres de 50 nm la presència d'histones en el nucli és clarament inferior, però no pas nulla o inexistent (vegeu Martínez-Soler *et al.*, 2006, per als controls de l'anticòs).

A partir de l'entrada a les fases de condensació de la cromatina en endavant, (columna 2, figura E-F), el marcatge per a la histona H2A és inexistent.

**Antiprecursor de la protamina:** La tercera columna resumeix els resultats de la immunolocalització del precursor de la protamina en cada una de les fases de condensació de la cromatina. Les figures A i B de la columna 3 representen la cromatina de tipus somàtic i granular, respectivament; en ambdós estadis el marcatge per al precursor és inexistent, especialment si tenim present que la immunoreactivitat d'aquest anticòs és molt elevada. Per tant, la primera remodelació de la cromatina (cromatina de tipus somàtic a granular) té lloc sense la presència del precursor de la protamina en el nucli. En la següent fase (cromatina fibrillar de 30 nm, columna 3, figura C) el marcatge per a la molècula precursora de la protamina incrementa sobtadament, cosa que indica que la remodelació de grànuls a fibres de cromatina és deguda a la presència massiva del precursor de la protamina dins el nucli.



**Figura Columna 1:** Resum de la condensació de la cromatina i proteïnes que interaccionen amb el DNA durant l'espermioogènesi de *S. officinalis*. En A els nuclis de les espermatides primerenques són cèl·lules rodones (detall) i presenten una cromatina de tipus somàtic (amb eucromatina i heterocromatina). La composició d'aquesta cromatina consisteix en histones (no acetilades) i proteïnes de l'heterocromatina (HP). La primera remodelació de la cromatina consisteix en una reorganització de la cromatina de tipus somàtic a grànuls de 20 nm de diàmetre (B); aquesta cromatina presenta una monoacetilació en la histona H4 i la molècula precursora de la protamina encara no ha entrat en el nucli. En les fibres de 35 nm el nucli ha iniciat l'elongació (C i detall), i es produeix una entrada del precursor de la protamina en el nucli i una hiperacetilació de les histones. La tercera remodelació de la cromatina condueix a la formació de fibres de 50 nm (D): en aquesta cromatina es dona la desaparició de les histones del nucli; les restes de la histona H4 que queda es troba hiperacetilada. A partir de les fibres de 50 nm (E) la cromatina entra en les fases finals de l'espermioogènesi, en què aquestes fibres s'uneixen progressivament entre si, s'acumulen en un lateral de la membrana nuclear (E detall) i provoquen una compressió lateral del nucli. Les causes que responen a aquest procés han de ser la

conversió del precursor a la protamina madura i la completa desfosforilació d'ambdues molècules, que ja l'espermatozoide madur (figura F) presenta una cromatina compacta i electrodensa, en què la protamina desfosforilada és l'única proteïna que interacciona amb el DNA. El nucli mesura 1 µm de diàmetre per 6 µm de llarg, aproximadament. **Columna 2:** Immunomarcatge de la histona H2A en la cromatina espermioègica de *S. officinalis*. A) La cromatina de tipus somàtic reacciona amb la histona H2A, principalment en l'heterocromatina, que és on hi ha una densitat major de nucleosomes. B) La cromatina granular presenta un marcatge homogeni i elevat per a la histona H2A. C) En les fibres de 35 nm es redueix lleugerament el marcatge, però la presència d'histones en el nucli és encara significativa. Les fibres de 50 nm (D) presenten una clara disminució de la reacció amb l'antisèrum, però el marcatge no és nul, cosa que indica una presència d'histones romanents en el nucli. A partir de les fases de condensació de la cromatina (E-F), el marcatge per a la histona H2A desapareix. **Columna 3:** Immunolocalització del precursor de la protamina en la cromatina de *S. officinalis*. Tant la cromatina de tipus somàtic (A) com la de tipus granular (B), no presenten marcatge evident per a la molècula precursora de la protamina. És en les fibres de 35 nm on la cromatina reacciona intensament amb el precursor de la protamina (C); en les fibres de 50 nm el marcatge es manté (D). A partir de les fases de condensació de la cromatina, o bé el precursor o bé la protamina madura interaccionen amb la cromatina espermioègica (E-F). *Nota: Aquestes imatges es troben a un augment inferior que la resta, fet que dificulta veure tan clarament el marcatge de l'anticòs.* **Columna 4:** Marcatge de la histona H4-acK12 en l'espermioègesi de *S. officinalis*. A) La cromatina somàtica no reacciona amb l'anti-ac-H4K12. B) La cromatina granular de 20 nm reacciona fortament amb l'anticòs, i això indica que aquesta cromatina presenta una monoacetilació de la histona H4. Les fibres de 35 nm (C) es troben també monoacetilades, i les fibres de 50 nm (D) presenten una reacció disminuïda però significativa si tenim present que en aquesta cromatina han desaparegut la majoria d'histones. A partir de les fibres de 50 nm fins al final de l'espermioègesi el marcatge desapareix (E-F). **Columna 5:** Immunomarcatge de la histona H4-acK16 en la cromatina espermioègica de *S. officinalis*. Tant la cromatina de tipus somàtic (A) com la granular (B) no presenten marcatge per a l'anticòs, però en les fibres de 35 nm (C) la reacció de la cromatina és la més elevada de tots els estadis espermioègics, cosa que indica una hiperacetilació de la histona H4. Les fibres de 50 nm (D) presenten marcatge significatiu de la histona H4 residual que es troba també hiperacetilada. En les fases de condensació de la cromatina (E-F) el marcatge desapareix.

En les fibres de 50 nm (columna 3, figura D), el marcatge segueix elevat, cosa que indica encara la presència del precursor en el nucli. Com hem comentat en l'apartat de «Material i mètodes», l'antisèrum generat per al precursor de la protamina presenta també una reacció creuada amb la protamina madura (Martínez-Soler *et al.*, 2007); aquest fet implica que en les fases de condensació de la cromatina no podem distingir entre el marcatge del precursor o de la protamina i, per tant, el marcatge es manté elevat fins als últims estadis de l'espermioègesi (columna 3, figura E-F).

**Anti-histona H4 ac.K12:** El marcatge d'aquest anticòs en les diferents fases de la remodelació de la cromatina es mostra resumit en la columna 4. En la cromatina de tipus somàtic, la presència d'histona H4 acetilada en K12 és inexistent (columna 4, figura A), mentre que en la cromatina granular (columna 4, figura B) el marcatge augmenta sobtadament, fet que atribueix el pas de cromatina somàtica a granular a la presència d'H4 acetilada en K12 (vegeu la discussió). La intensitat de marcatge es manté en les fibres de 30 nm (columna 4, figura C), i fins i tot és lleugerament superior. Quan les fibres de cromatina mesuren 50 nm (columna 4, figura D), el marcatge es troba fortament reduït. En les últimes fases de l'espermioègesi, el marcatge és inexistent o equivalent al *background*. (Columna 4, figures E-F.)

**Anti-histona H4 ac.K16:** En general, la reacció

de la cromatina espermioègica amb aquest anticòs és inferior a l'obtingut per a la histona H4ac.K12 (columna 5). És per aquest motiu que hem assenyalat la reacció de l'anticòs amb fletxes. Tant en la cromatina de tipus somàtic (columna 5, figura A) com granular (columna 5, figura B) presenten un marcatge nul. És en les fibres de 30 nm on la cromatina reacciona més intensament amb l'anticòs anti-H4 ac.K12 (columna 5, figura C). En les fibres de 50 nm el marcatge es redueix significativament (columna 5, figura D), i a partir de les fases de condensació de la cromatina (columna 5, figures E-F), el marcatge desapareix.

## DISCUSSIÓ

El procés de compactació i reorganització de la cromatina durant l'espermioègesi és extremadament variable entre les diferents espècies animals. Entre d'altres factors, un dels condicionants més importants d'aquest procés és el tipus de transició proteica que té lloc en el nucli durant l'espermioègesi.

En moltes espècies les histones de les espermàtides primerenques s'hiperacetilen i són directament desplaçades per la protamina (Christensen *et al.*, 1984; Oliva i Dixon, 1991). En aquest tipus de transició proteica, el patró de condensació de la cromatina és relativament simple: a partir d'una cromatina

de tipus somàtic, es remodela a cromatina granular i, finalment, per unió d'aquests grànuls, la cromatina és altament condensada a causa de la presència de la protamina en el nucli.

El model de *Sepia officinalis* representa un grau superior de complexitat en aquesta transició, en què primer les histones són desplaçades pel precursor de la protamina i posteriorment per la protamina madura. Aquest pas addicional produeix un increment en la complexitat del patró de condensació de la cromatina: la doble transició proteica que té lloc en el nucli al llarg de l'espermioogènesi provoca tres remodelacions estructurals en la cromatina: cromatina de tipus somàtic a grànuls de 20 nm, després a fibres de 35 nm i finalment a fibres de 50 nm.

En el present treball hem volgut entendre millor cada pas en la transició proteica i mitjançant anticossos específics (histona H2A, precursor de la protamina i formes hiperacetilades de la histona H4) hem estudiat la composició de proteïnes de les diferents estructures de la cromatina espermioogènica de *S. officinalis*.

En la primera remodelació de la cromatina espermioogènica de *S. officinalis*, l'hetero i eucromatina es reorganitzen en grànuls de 20 nm de diàmetre distribuïts homogèniament dins el nucli. El fet que en aquesta primera transició la cromatina granular manté la totalitat de les histones (columna 2, figura B) i el precursor de la protamina encara no hagi entrat en el nucli (columna 3, figura B), suggereix en primer lloc que els grànuls estan constituïts per nucleosomes i, en segon lloc, que aquesta reorganització de la cromatina de tipus somàtic pot ser deguda a modificacions posttranscripcionals de les histones o a la pèrdua de proteïnes que constitueixen l'heterocromatina. En aquesta cromatina de tipus granular, el marcatge amb l'anticòs anti-H4-ac.K12 augmenta sobtadament respecte a la de tipus somàtic (columna 4, figura A). En canvi, no reacciona amb l'anticòs anti-H4-ac.K16. Considerant que en *S. officinalis* aquests anticossos reaccionen amb les formes mono i triacetilades de la histona H4, respectivament (Couppez *et al.*, 1987), podem atribuir la remodelació de la cromatina en grànuls a una monoacetilació massiva de la histona H4. La segona remodelació de la cromatina de grànuls a fibres de 35 nm és una reacció complexa i interessant, ja que respon a diversos processos: en primer lloc, les fibres de 35 nm tenen una quantitat d'histones similar a la de la cromatina de tipus somàtic (columna 2, figura C), en segon lloc, aquestes histones coexisteixen amb la totalitat (o gairebé la totalitat) del precursor de la protamina en el nucli (columna 3., figura C) i, en tercer lloc, la histona H4 en aquestes fibres es troba hiperacetilada, ja que la reacció d'aquesta cromatina amb

els anticòs anti H4-ac.K12 i K16 és la més elevada de tots els estadis espermioogènics (columna 4, figura C i columna 5, figura C). Així doncs, les fibres de 35 nm respondrien a un estadi d'equilibri de la següent reacció:

$Pp + DNA-Hist.ac \leftrightarrow Pp-DNA-Hist.ac \leftrightarrow Pp-DNA + Hist.ac$ , en què *Pp* indica precursor de la cromatina (en què aquestes fibres passen a mesurar 50 nm de diàmetre), i respondria a un desplaçament cap a la dreta de la reacció, de manera que gradualment el DNA quedaria unit al precursor de la protamina i desplaçaria les histones hiperacetilades. Aquest fet respon en primer lloc al fet que el marcatge de les histones en aquestes fibres sigui clarament inferior però no nul (columna 2, figura D); en segon lloc, que aquestes histones residuals es trobin hiperacetilades (columna 4, figura D i columna 5, figura D) i, finalment, que la reacció amb la molècula precursora de la protamina sigui elevada (columna 3, figura D).

Una vegada la cromatina espermioogènica ha entrat en les fases de condensació, les histones han desaparegut del nucli i les úniques proteïnes que interaccionen amb el DNA són el precursor de la protamina, la protamina madura i les seves formes fosforilades (Wouters-Tyrou *et al.*, 1991).

## AGRAÏMENTS

Aquest treball ha estat finançat pel projecte atorgat al Dr. Chiva: Ministeri d'Educació i Ciència, núm: BFU 2005-00123/BMC. Volem agrair a la Dra. Núria Cortadelles i Almudena Sotto els seus consells científics.

Totes les observacions de microscòpia electrònica s'han fet als Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona de l'Hospital Clínic, en un Hitachi 4-600 (Hitachi Ltd., Tòquio, Japó).

## BIBLIOGRAFIA

- CÀCERES, C.; RIBES, E.; MULLER, S.; CORNUDELLA, L.; CHIVA, M. (1999). «Characterization of chromatin-condensing proteins during spermiogenesis in a neogastropod mollusc (*Murex brandaris*)». *Mol. Reprod. Dev.*, 38: 440-452.
- CHRISTENSEN, M. E.; RATTNER, J. B.; DIXON, G. H. (1984). «Hyperacetylation of histone H4 promotes decondensation prior to histone replacement of protamines during spermatogenesis in rainbow trout». *Nucleic Acid Res.*, 12: 4575-4592.
- COUPEZ, M.; MARTIN-PONTHIEU, A.; SAUTIÈRE, P. (1987). «Histone H4 from cuttlefish testis is sequen-

- tially acetylated. Comparison with acetylation of calf thymus histone H4». *J. Biol. Chem.*, 262: 2854-2860.
- MANOCHANTR, S.; SRETARUGSA, P.; CHAVADEJ, P.; SOBHON, P. (2005). «Chromatin organization and basic nuclear proteins in the male germ cells of *Rana tigrina*». *Mol. Reprod. Dev.*, 70: 184-197.
- MARTIN-PONTHIEU, A.; WOUTERS-TYROU, D.; BÉLAI-CHE, D.; SAUTIÈRE, P.; SCHINDLER, P.; VAN DORSSELAER, A. (1991). «Cuttlefish sperm protamines. 1. Amino acid sequences of two distinct variants». *Eur. J. Biochem.*, 195: 611-619.
- MARTIN-PONTHIEU, A.; WOUTERS-TYROU, D.; PUDLO, B.; BUISINE, E.; SAUTIÈRE, P. (1994). «Isolation and characterization of a small putative zinc finger protein from cuttlefish epididymal sperm cells». *Eur. J. Biochem.*, 220: 463-468.
- MARTÍNEZ-SOLER, F.; KURTZ, K.; AUSIÓ, J.; CHIVA, M. (2007). «Transition of nuclear proteins and chromatin structure in spermiogenesis of *Sepia officinalis*». *Mol. Reprod. Dev.*, 74: 360-370.
- MAXWELL, W. L. (1975). «Spermiogenesis of *Eusepia officinalis* (L.), *Loligo forbesi* (Steenstrup) and *Allo-teuthis subulata* (L.) (Cephalopoda, Decapoda)». *Proc. R. Soc. London B.*, 191: 527-535.
- ROUSSEAUX-PRÉVOST, P.; ENGELHARDT, R. P.; ROUSSEAU, J.; WOUTERS-TYROU, D.; SAUTIÈRE, P. (1998). «Nuclear protein transitions in cuttlefish spermiogenesis: Immunocytochemical localization of a protein specific for the spermatid stage». *Gamete Res.*, 19: 277-290.
- SUPHAMUNGMEE, W.; APISAWETAKAN, S.; WEERACHATYANUKUL, W.; WANICHANON, C.; SRETARUGSA, P.; POOMTONG, T.; SOBHON, P. (2005). «Basic nuclear protein pattern and chromatin condensation in the male germ cells of a tropical abalone, *Haliotis asinina*». *Mol. Reprod. Dev.*, 70: 211-221.
- OLIVA, R.; DIXON, G. H. (1991). «Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement transition». *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 40: 25-94.
- WOUTERS-TYROU, D.; CHARTIER-HARLIN, M. C.; MARTIN-PONTHIEU, A. M.; BOUTILLON, C.; VAN DORSSELAER, A.; SAUTIÈRE, P. (1991). «Cuttlefish spermatid-specific protein T. Molecular characterization of two variants T1 and T2, putative precursor sperm protamine variants Sp1 and Sp2». *J. Biol. Chem.*, 266: 17388-17395