

PRESÈNCIA D'UNA PROTEÏNA ALTAMENT ESPECÍFICA DEL TIPUS HISTONA H1 EN LA CROMATINA ESPERMÀTICA DELS MOL.LUSCS BIVALVES

Joan AUSIÓ

Unitat de Química Macromolecular. C.S.I.C. Diagonal, 647, 08028 Barcelona

ABSTRACT

Presence of a Highly Specific Histone H1-like Protein in the Chromatin of the Sperm from Bivalve Molluscs. Chromatin organization in the sperm of the bivalve molluscs results from the interaction between a discrete number of protamine-like proteins (PL) and DNA. A small variable amount of histones is also present. An extensive study carried out on a relatively large number of species, within the class Bivalvia, has shown that it is possible to arrange these mol.luscs into five major categories on the basis of their PL composition. In spite of the inter and intra-specific similarity of all PL proteins in their chemical composition, they exhibit however, different degrees of structural variability. Moreover one of this PL proteins which is found in all the species analyzed, bears an enormous resemblance to histones of the H1 family. The evolutive significance of this finding is discussed.

INTRODUCCIÓ

Les proteïnes bàsiques majoritàries i que es troben associades a l'ADN en l'esperma dels mol.luscs bivalvs poden considerar-se agrupades en quatre categories o grups, d'acord amb la seva mobilitat electroforètica: PL-I, PL-II, PL-III i PL-IV (on PL=protamine-like).

Un estudi exhaustiu portat a terme amb un gran nombre de gèneres i espècies representatius d'aquesta Classe ha permès demostrar que la variabilitat del component protèic de la cromatina espermàtica dins d'aquest grup taxonòmic és el resultat de les diferents combinacions que es poden formar amb aquests quatre grups fonamentals de proteïnes així com d'una quantitat petita d'histones amb característiques semblants a les histones d'origen somàtic i que es troba sempre present (Ausió, J. Comp. Biochem. Physiol. 85B, 439-449).

L'anàlisi detallada de les característiques estructurals i conformacionals dels diferents PL en diferents espècies ha fet palesa una gran diversitat estructural entre aquestes proteïnes, malgrat la seva enorme similitud composicional química (composició en aminoàcids). Més important però, es el fet que, en tots els gèneres o espècies analitzats un dels components PL presents (normalment el PL de menys mobilitat electroforètica) exhibeix les característiques típiques de la família de les histones H1. Es discuteix el possible significat de la presència d'aquesta histona H1 altament específica de l'esperma dins de tot el grup, així com també algunes de les possibles implicacions evolutives relacionades amb aquest fet.

MATERIAL I METODES

Material biològic

Els exemplars dels *mol. luscs bivalves* que s'esmenten a continuació: *Mytilus edulis*, (musclo); *Lithophaga lithophaga* (dàtil de mar); *Donax trunculus* (tellerina); *Cerastoderma edule* (berberetxo); *Ensis ensis* (nècora); *Callista chione* (lluenta); *Pecten maximus* (vano), han estat tots ells obtinguts de proveïdors comercials de Barcelona. Els exemplars de *Spisula solidissima* (surf clam) eren del Marine Biological Laboratory (Woods Hole MA (USA)) L'ostra *Crassostrea gigas* fou obtinguda de proveïdors comercials a Oregon (USA) i els de *Macoma nasuta* (bent-nose clam) van ésser recol·lectats per l'autor a les platges de Coos-Bay a l'Estat d'Oregon (USA).

Preparació dels extractes de proteïnes bàsiques nuclears de l'esperma

L'obtenció de l'esperma així com l'extracció de proteïnes bàsiques totals utilitzant àcid clorhídric es va portar a terme segons els mètodes ja descrits (Ausió, 1986).

Electroforesi

L'anàlisi de les proteïnes espermàtiques es va portar a terme mitjançant tècniques d'electroforesi emprant gels d'urea i àcid acètic, tot i seguint el mètode descrit per Panyim i Chalkley (1969) modificat en les condicions de polimerització del gel d'acord amb Hurley (1977). Bàsicament es parteix de dues dissolucions: dissolució A: (30% acrilamida, -0.2% bis-acrilamida) i dissolució B: (43.2% àcid acètic). Per un volum final de 80 ml cal barrejar 30.03 g. d'urea, 40 ml de dissolució A, 10 ml de dissolució B i 70 mg. de Tiourea tot ajustant el volum final a 79.5 ml amb aigua. Finalment s'afegeixen 0.45 ml d'aigua oxigenada (30%) i la dissolució així obtinguda s'aboca immediatament dins la cambra de polimerització del gel i que en el cas utilitzat ací tenia unes dimensions de 21x12x0.15 cm. S'obté així un gel de 6.25M Urea, 0.9N àcid acètic, i 15% acrilamida. En alguns casos i per tal d'augmentar el poder de resolució, els gels es van preparar en 2.5M urea i en les condicions publicades amb anterioritat (Ausió et al., 1986). Aquests gels es van córrer a temperatura ambient i a 10 V/cm.

Digestions amb tripsina.

Les digestions enzimàtiques amb tripsina dels extractes totals de proteïna es van fer en idèntiques condicions a les descrites amb anterioritat (Ausió et al., 1981)

Fraccionament de proteïnes amb àcid perclòric .

Les extraccions de proteïnes amb àcid perclòric (APC) del 5% es van fer de la següent manera: Els extractes de proteïnes totals dels nuclis espermàtics obtinguts tal com s'ha descrit prèviament, es van dissoldre en aigua destil·lada i desionitzada fins obtenir una concentració final de proteïna de l'ordre d'uns 4 mg/ml. Aleshores s'hi va afegir un volum d'àcid perclòric del 10% (v/v) tot agitant amb un Vortex. El precipitat que es produí com a resultat d'aquesta addició d'àcid, es va eliminar immediatament mitjançant centrifugació (10 min. a 12000xg). L'extracte proteic APC-soluble romanent va ésser portat a 0.4N àcid clorhídric per addició de 1/3 volum de HCl 1.2N i finalment les proteïnes així fraccionades van ésser precipitades per addició de sis volums d'acetona en fred. (-10°C tota la nit).

Fig 2

RESULTATS I DISCUSSIO

Grups fonamentals dels mol.luscs bivalves, en base a la composició protèica nuclear dels seus espermatozoides.

Des del punt de vista de la composició protèica dels espermatozoides, els mol.luscs bivalves es poden considerar agrupats en cinc grups fonamentals: Pectínids (grup-O), Venèrids (grup-I), Cardíids (grup-II), Tellínids (grup-III) i Mitílids (grup-IV) (Ausió, 1986).

La Taula I i la Figura 1 mostren uns exemples d'algunes de les espècies que han estat estudiades recentement dins de cadascun d'aquests grups.

El grup O ó dels Pectínids el formen aquells mol.luscs bivalves que en la composició protèica de l'esperma només hi tenen histones semblants a les que es troben a les cèl.lules somàtiques dels organismes superiors. Es diferencien, però, en la presència d'una histona H1 amb una mobilitat, en gels d'electroforesi, més petita de l'habitual i que normalment presenta microheterogeneïtat o polimorfisme (quasi sempre es poden distingir clarament dos components H1-1 i H1-2, vegeu Fig. 1.O.a,b). En alguns casos, no tots, associat a aquestes histones, s'hi troba un component protèic minoritari

Taula I. Algunes de les espècies de mol.luscs bivalves estudiades fins el moment actual i classificades taxonòmicament segons Kuhn-Schnyder i Rieber (1986) o bé d'acord amb el seu grup protamínic (Ausió, 1986).

Espècie	Nom comú	Classificació				
		Subclasse	Ordre	Família	Subfamília	Grup protamínic
<i>Crassostrea gigas</i>	Ostra	Pteriomorfes	Pteriàcis	Ostrèids		Pectínids-O
<i>Pecten maximus</i>	Vano		Pteriàcis	Pectínids		
<i>Spisula solidissima</i>		Heterodontes	Veneràcis	Màctrids		Venèrids-I
<i>Callista chion</i>	Lluentà		Veneràcis	Venèrids	Pictaríns	
<i>Ensis ensis</i>	Nècora	Heterodontes	Veneràcis	Solenids		Cardíids-II
<i>Cerastoderma edule</i>	Berberetxo		Veneràcis	Càrdids	Cardíns	
<i>Macoma nasuta</i>		Heterodontes	Veneràcis	Tellínids	Macomíns	Tellínids-III
<i>Donax trunculus</i>	Tellerina		Veneràcis	Donàcids		
<i>Mytilus edulis</i>	Musclo	Isofilibrànquis	Mitilacis	Mitílids	Mitilíns	Mitílids-IV
<i>Lithophaga lithophaga</i>	Dàtil de mar		Mitilacis	Mitílids	Litofagíns	

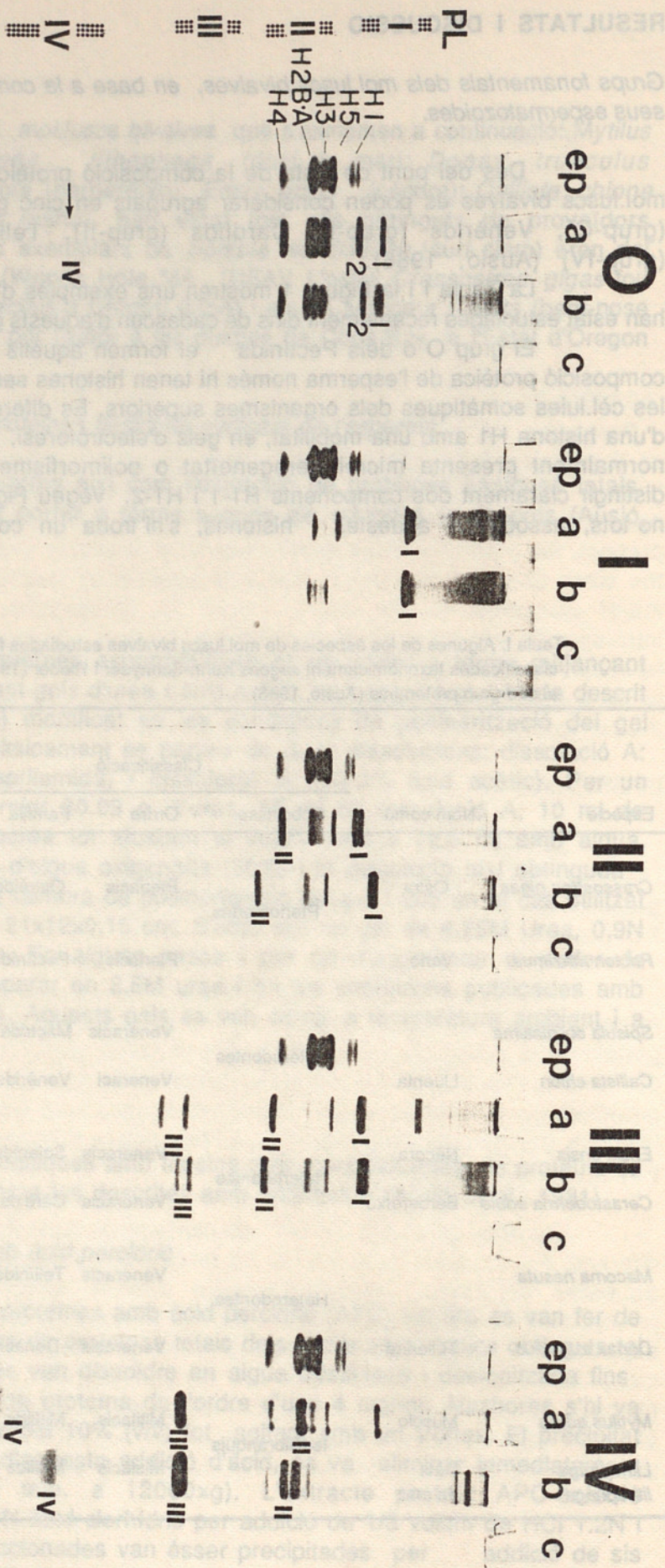


Fig. 1. Proteïnes bàsiques totals extreïdes amb àcid clorhídric 0.4 N a partir dels nuclis dels espermatozoïdes de diferents mol·luscs bivalves. Els números romans corresponen als diferents grups protamíncics descrits en el text. O a): *Pecten maximus*; O b): *Crassostrea gigas*; I a): *Callista chione*; I b): *Spisula solidissima*; II a): *Cardium edule*; II b): *Ensis ensis*; III a): *Macoma nasuta*; III b): *Donax trunculus*; IV a): *Lithophaga lithophaga*; IV b): *Mytilus edulis*; Els controls electrolorètics foren: ep): histones d'eritròcit de pollastre. c): clupeïna.

d'elevada mobilitat electroforètica (vegeu PL-IV en Figura 1.0,a i també Fig. C). Es tracta doncs, d'un grup en el que no hi ha hagut la substitució de les histones somàtiques per proteïnes altament especialitzades del tipus protamina. En el seu lloc han aparegut uns components histònics germinals específics però que mantenen una organització de la cromatina en nucleosomes semblant a la que existeix en les cèl.lules somàtiques (Zalenskaya et al., 1985) si bé la longitud de la unitat repetitiva és considerablement més gran. Altres espècies estudiades dins d'aquest grup, apart de les que es mencionen ací són: *Patinopecten yesonensis*, *Swiftipecten swifty*, (Zalensky i Zalenskaya, 1980) *Aequipecten irradians* (Ausió, 1986).

En els grups següents apareixen ja un tipus de proteïnes altament especialitzades i amb una composició en aminoàcids intermitja entre histones i proteïnes a les que s'els hi va donar el nom de "protamine-like" proteïnes (Subirana et al, 1973) i que d'ací en endavant abreviarem per tant amb les inicials PL. La resta de grups d'aquesta classificació resulten de la combinació d'aquests diferents components PL (PL-I, PL-II, PL-III i PL-IV) que coexisteixen amb un petit percentatge d'histones del tipus somàtic (Ausió, 1986). Normalment els components PL corresponen en la majoria dels casos estudiats a un 70-80% de les proteïnes bàsiques presents en els nuclis dels espermatozoides d'aquests grups.

El grup I o dels Venèrids, es caracteritza per la presència majoritària d'un sol component PL-I de molt baixa mobilitat electroforètica (Figura 1.1, a,b). L'organització de la cromatina espermàtica, és en aquest cas, de tipus segregat. (Ausió i van Holde, 1987). Bocinets petits de cromatina amb organització oligonucleosomal estan dispersats enmig de llargs fragments de nucleoprotamina formada per l'associació entre l'ADN i el component PL-I. Entre les espècies analitzades fins ara conformant aquest tipus d'organització protèica s'hi troben, amés de les presentades ací: *Mactra coralina* (Colom i Subirana, 1979) *Callista brevisiphonata*, *Mercenaria simpsoni*, *Spisula sachalinensis*, *Saxidomus purpuratus* (Zalensky i Zalenskaya, 1980), *Tapes japonica*, *Saxidomus giganteus*, *Tresus capax*, *Pamope generosa* (Ausió, 1986) *Protothaca thaca* (Olivares et al., 1986), *Dreissena polymorpha* (Subirana i Colom, 1987) i *Venus verrucosa* (Ausió, no publicat)

Pel que fa al grup II o dels Cardíids, en aquest cas, el nombre de components PL augmenta a dos: un d'ells de baixa mobilitat electroforètica (PL-I) i l'altre amb una mobilitat lleugerament superior a la de la histona H4 (PL-II) (vegeu Fig. 1.11). En l'organització de la cromatina d'aquest grup també s'hi troben estructures nucleosomals que coexisteixen amb els components PL en una organització no establerta encara (Giancotti et al, 1983) D'altres espècies estudiades dins d'aquest grup són: *Clinocardium nuttallii* i *Mya arenaria* (Ausió, 1986).

En el cas del grup III, apareix un component PL adicional (PL-III) als que ja hi havíen en el grup II. Es tracta d'un component de mobilitat electroforètica superior al de les histones i que en tots els casos analitzats fins ara presenta microheterogeneïtat o polimorfisme (Fig 1.111, PL-III, 1,2). Aquest component adicional representa de l'ordre del 20% del contingut protèic total del nucli de l'esperma (Ausió, 1988). Pel que fa a l'organització de la cromatina, en aquest cas no es té cap tipus d'informació al respecte.

El darrer grup d'aquesta classificació el constitueixen els Mitílids o grup IV. (Fig 1.1V). En aquest grup, el component PL-I sembla estar absent, però en canvi apareix un nou component amb una mobilitat electroforètica molt elevada i que hem anomenat PL-IV. Es tracta doncs d'un altre grup amb tres components del tipus "protamine-like" i que coexisteixen en el nucli de l'esperma amb un 20-25% d'histones. L'estructura cromatínica resultant d'aquest conglomerat protèic sembla ésser molt similar al que s'ha descrit pel grup I. Es a dir, hi hauria unes regions de nucleosomes (Zalensky i Avramova, 1984) que coexistirien amb uns feixos paral.lels de filaments d'ADN en la

forma B (Ausió i Subirana, 1982,c) i que segurament deuen aquest tipus d'arrangament a la presència dels components PL. Entre altres espècies analitzades, amb el mateix tipus de composició protèica s'hi troben: *Crenomytilus grayanus*, (Zalensky i Zalenskaya, 1980) *Modiolus difficilis* (Odintsova et al., 1981), *Mytilus galloprovincialis* (Zalensky i Avramova, 1984), *Mytilus californianus* (Ausió, 1986), *Mytilus edulis chilensis*, *Aulacomia ater* (Olivares et al., 1986a) (Olivares et al., 1986b).

En acabar aquest capítol, cal dir que totes les espècies de mol.luscs bivalves analitzades fins a l'actualitat ecaixen dins d'un o altre dels grups ací esmentats, àdhuc tenint en compte l'heterogeneïtat de la seva procedència :Mar del Japó (espècies obtingudes per Zalensky i Zalenskaia, 1980; Oceà Pacífic Nord i Oceà Atlàntic (Ausió, 1986); Oceà Pacífic Sud (Olivares et al., 1986a) i Mar Mediterrani i Mar Cantàbric (aquest treball). Només hi ha una sola excepció a això i és pel que fa a la espècie *Glycimeris yessoensis*, dins de l'ordre dels Arcacis, descrita per Zalensky i Zalenskaya (1980) i que apart del contingut en histones només té un sol PL, que en aquest cas, i per la seva mobilitat, correspondria a un PL-III. Aquest fet no es d'estranyar, però, doncs malgrat l'important nombre d'espècies estudiades fins el moment actual, no cal oblidar que els bivalves formen una de les classes més extenses dins del phylum dels mol.luscs. D'altra banda, només han estat estudiades aquelles espècies generalment residents en hàbitats més fàcilment assequibles.

Es difícil, doncs, preveure fins on caldrà augmentar el nombre d'aquests grups fonamentals que s'acaben de descriure una vegada tinguem un espectre més ampli de mostres analitzades. Es obvi, però, que el tipus de composició protèica de l'esperma dels bivalves es distribueix dins d'un número discret de possibilitats, representades fins al moment present, pels grups que s'acaben de descriure.

Presència d'una proteïna del tipus histona H1 altament específica dins de totes les espècies de Bivalves.

La classificació que s'acaba de presentar ha estat feta en base a uns criteris de mobilitat electroforètica emprant un tipus molt concret d'electroforèsi en urea i àcid acètic. Malgrat tot, aquesta propietat tan fàcilment observable reflecteix diferències estructurals importants existents entre els diferents components, tal i com es fa palès, per exemple, en el cas de *Macoma nasuta*.

Així, mentre tots o gairebé tots els components PL exhibeixen una composició química en aminoàcids molt semblant i relativament simple: 20-30% Arginina, 20-30% Lisina, 30-40% Serina + Alanina, alguns d'ells, com en el cas del component PL-I de *M. nasuta* o de *Spisula solidissima*, presenten un elevat contingut en estructura secundària amb uns dominis estructurals molt ben definits a nivell d'estructura terciària (Ausió et al., 1981; Ausió, 1986), de manera semblant al que passa en el cas de les histones H1 somàtiques (Allan et al., 1980).

Aquest criteri estructural juntament amb la riquesa en Lisina d'aquests components i la seva corresponent solubilitat en 5% àcid perclòric són els que ens han permès assignar alguns d'aquests components PL a la família d'histones del tipus H1.

De fet, tal com es pot veure a la figura 2, tots els components PL són solubles, o millor dit, no són insolubles, en 5% àcid perclòric, al contrari del que passa amb la resta de les histones acompanyants, exceptuant la histona H1, (compareu aquesta figura amb la Fig. 1). Tanmateix és important fer el matis de la no insolubilització, donada la forma en què han estat obtingudes ací les fraccions protèiques solubles en 5% àcid perclòric (vegeu la secció de materials i mètodes). Cal dir que, quan el fraccionament en àcid perclòric s'intenta fer a partir dels nuclis espermatícs o bé d'un extracte de proteïnes totals emprant directament una solució del 5% d'aquest àcid,

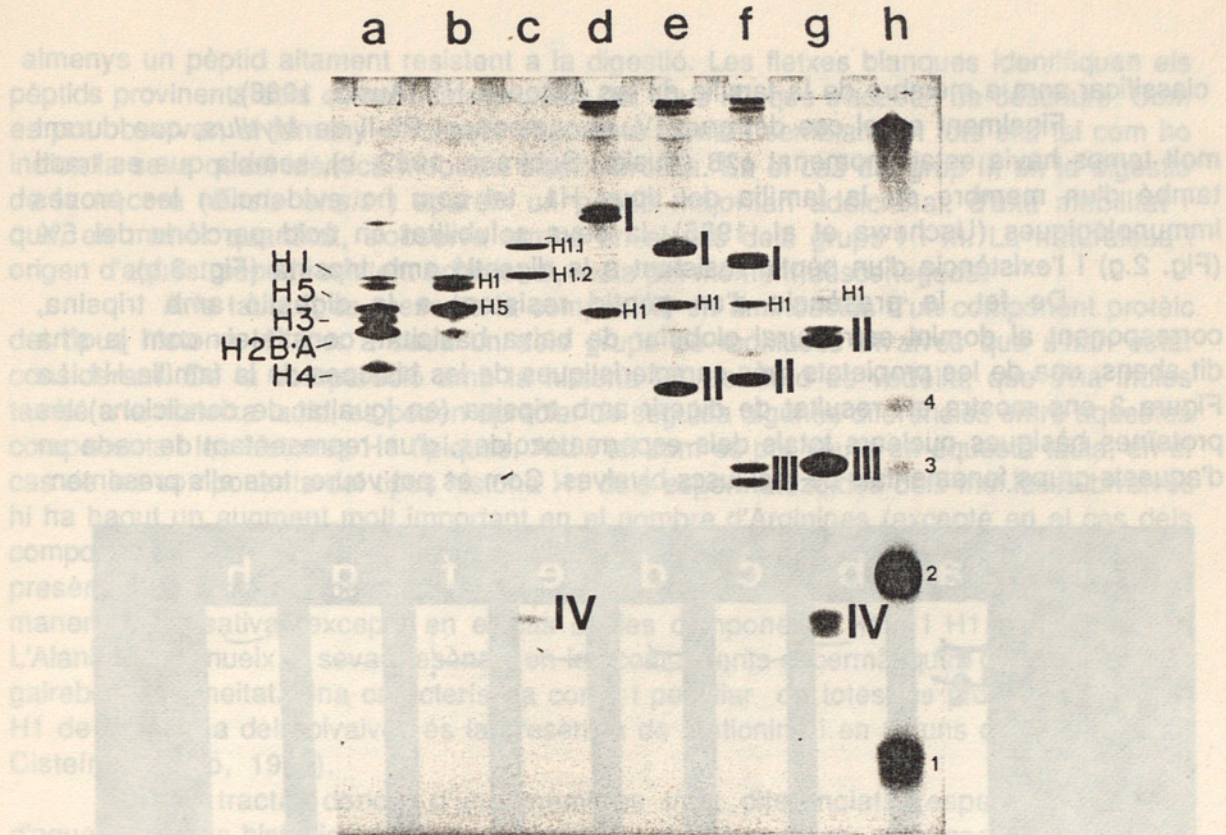


Fig.2. Proteïnes no-insolubles en àcid perclòric al 5% obtingudes, tal com es descriu en el text, a partir de les proteïnes nuclears totals de: b) eritròcit de pollastre (control); c) *Pecten maximus*; d) *Callista chione*; e) *Ensis ensis*; f) *Donax trunculus*; g) *Mytilus edulis*. Com a marcadors electroforetics es van utilitzar: a) histones totals d'eritròcit de pollastre i h) protamina iridina polimeritzada amb carbodiimida (poli-iridina) (Barfod i Larsen, 1976)

aleshores el component PL-I exhibeix una solubilitat molt baixa o pràcticament nul·la en aquestes condicions. En qualsevol cas, quan una dissolució contenint totes les proteïnes nuclears dels espermatozoides es porta al 5% en àcid perclòric, el component PL-I (vegeu Fig. 2) a l'igual que les histones H1 i H5 dels eritròcits de pollastre, roman en dissolució mentre la resta de les histones s'insolubilitza ràpidament i precipita.

El fet més significatiu, però, dins d'aquest capítol és que en tots els cinc grups fonamentals descrits abans, hi ha al menys un component protèic que és específic dels nuclis espermàtics i que presenta les característiques dels components histònics de la família de l'histona H1 a les que ens acabem de referir. Així, en el cas del grup O en què no hi ha substitució d'histones per protamines, sinó que es mantenen les histones fins i tot a l'espermatozoide madur, presenta, malgrat tot, unes variants d'histona H1 (histona H1.1 i H1.2, vegeu Fig. 1.O i Fig. 2,c.) altament específiques (Sellos, 1985).

En el cas del grup I, és el component PL-I el que gaudeix d'una enorme semblança amb els membres de la família del tipus histona H1 (Ausió et al., 1987).

Pel que fa el grup II, Giancotti et al (1983) fent servir espectroscopia NMR, arriben a la mateixa conclusió. Es a dir, que el component PL-I de *Ensis minor* i que ells anomenen EM-6, és una molècula de la família de l'histona H1.

Dins del grup III, en una anàlisi molt exhaustiva de l'espècie *Macoma nasuta*, es va veure també que el component PL-I gaudia de totes les atribucions que el permeten

classificar com a membre de la família de les histones H1 (Ausió, 1988).

Finalment en el cas del grup IV, el component PL-II de *Mytilus*, que durant molt temps havia estat anomenat ϕ 2B (Ausió i Subirana, 1982 c), sembla que es tracti també d'un membre de la família del tipus H1, tal com ho evidencien les proves immunològiques (Uschewa et al, 1985), la seva solubilitat en àcid perclòric del 5% (Fig. 2.g) i l'existència d'un pèptid resistent a la digestió amb tripsina (Fig. 3.b).

De fet, la presència d'un pèptid resistent a la digestió amb tripsina, corresponent al domini estructural globular de baixa basicitat, constitueix com ja s'ha dit abans, una de les propietats més característiques de les histones de la família H1. La Figura 3 ens mostra el resultat de digerir amb tripsina (en igualtat de condicions) les proteïnes bàsiques nuclears totals dels espermatozoides, d'un representant de cada un d'aquests grups fonamentals de mol.luscs bivalves. Com es pot veure, tots ells presenten

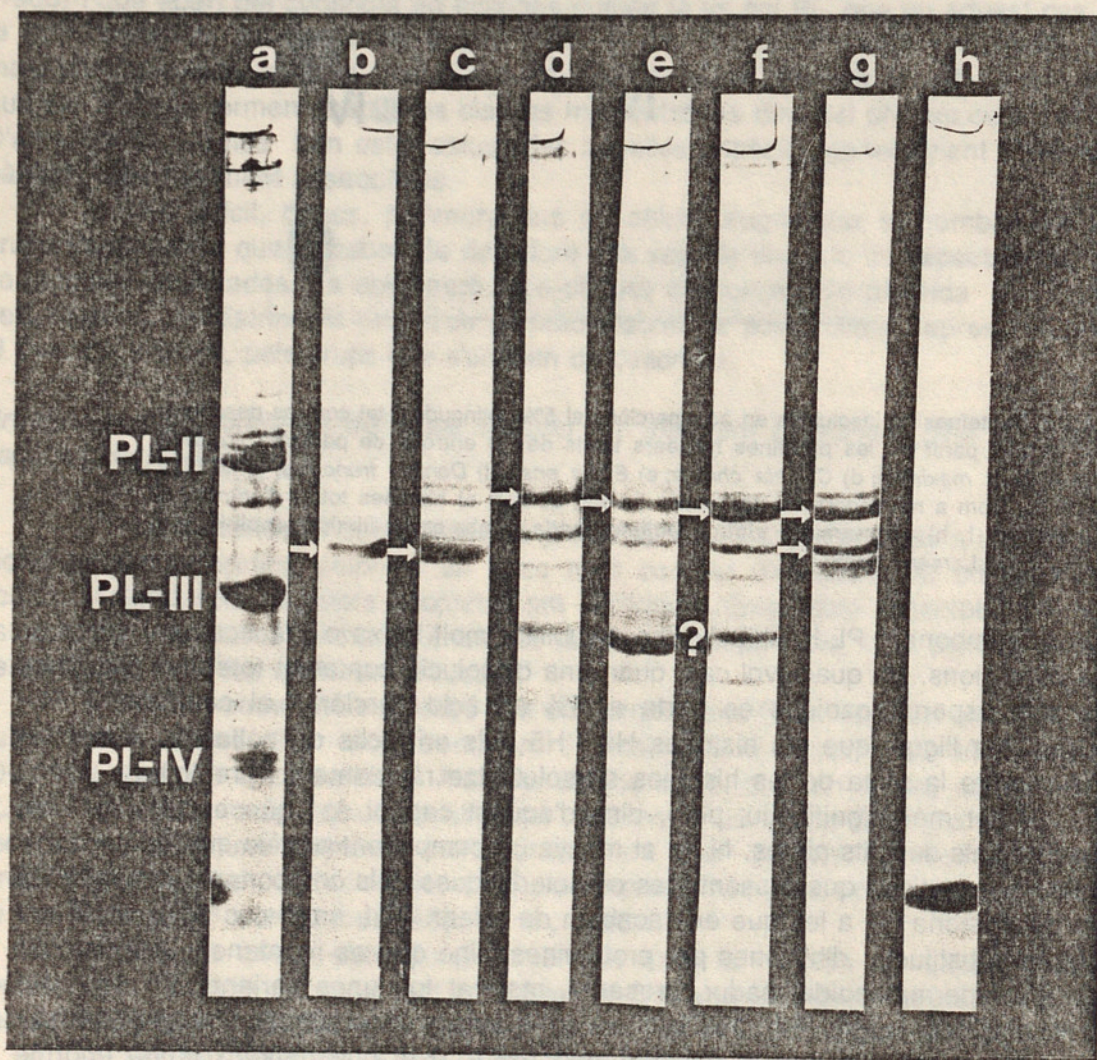


Fig. 3. Digestió amb tripsina de les proteïnes nuclears bàsiques totals dels espermatozoides de diferents mol.luscs bivalves: c): *Mytilus edulis*; d): *Donax trunculus*; e): *Ensis ensis*; f): *Callista chione* i g): *Pecten maximus*. Com a controls es mostren: a) proteïnes bàsiques totals de músculo (*M. edulis*) no digerides. b) component PL-II de *M. edulis* digerit en les mateixes condicions. h): protamina clupeïna. Les proteïnes dissoltes en aigua a una concentració de 6 mg/ml es van portar a 2M NaCl, 10mM TRIS-HCl pH 7.5 per addició d'un volum de ClNa 4M en 20 mM Tris-HCl pH 7.5 i van ésser digerides durant 120 min. a 23°C amb una relació E:S de 1:500.

almenys un pèptid altament resistent a la digestió. Les fletxes blanques identifiquen els pèptids provinents dels components protèics del tipus H1 que s'acaben de descriure. Com es pot observar, el tamany d'aquests fragments és molt semblant en tots ells tal com ho indica la seva quasi idèntica mobilitat electroforètica. En el cas del grup II, en la digestió de la nècora (*Ensis ensis*) apareix un pèptid majoritari addicional, d'alta mobilitat i que, en menor quantitat, s'observa també en el cas dels grups I i III. La naturalesa i origen d'aquest pèptid resistent addicional, resta pel moment desconeguda.

A la taula II es presenta la composició en aminoàcids d'un component protèic del tipus histona H1 per a cada un dels grups de mol.luscs bivalves que s'han estat considerant. De la comparació amb la histona H1 del lletó de vedella, que s'ha inclòs també a la mateixa taula, es poden apreciar de seguida algunes diferències entre aquestes components i les histones H1 típiques. Així i tal com es pot veure en aquesta taula, en el cas de les components del tipus histona H1 dels espermatozoides dels mol.luscs bivalves hi ha hagut un augment molt important en el nombre d'Arginines (excepte en el cas dels components H1.1 i H1.2 dels membres del grup O), la Serina també ha augmentat la seva presència considerablement (gairebé el doble) mentre els nivells de Prolina baixen de manera significativa (excepte en el cas de les components H1.1 i H1.2 del grup O). L'Alanina disminueix la seva presència en les components espermàtiques quedant reduïda gairebé a la meitat. Una característica comú i peculiar de totes les proteïnes del tipus H1 de l'esperma dels bivalves és la presència de Metionina i en alguns casos també de Cisteïna (Ausió, 1988).

Es tracta, doncs, d'uns membres molt diferenciats (especialitzats) dins d'aquesta família histònica, de manera semblant al que succeeix en el cas de l'histona H5 dels eritròcits de pollastre i en la qual també hi ha un augment de la Serina i l'Arginina, una disminució de l'Alanina i presència de Metionina.

Això, però, no és gens sorprenent si hom té en compte que en els dos casos es tracta de sistemes de diferenciació cel.lular-terminal. En el cas de l'esperma, els augments observats en els nivells d'Arginina i de Serina, en aquestes components del tipus H1, obeeixen clarament a l'adaptació funcional d'aquestes molècules. Així, l'aminoàcid Arginina, en addició a la seva interacció electrostàtica pot formar fins a cinc ponts d'hidrògen en comparació amb la Lisina que només pot formar-ne dos (vegeu referències en Ausió et al., 1984) i és, per tant, capaç d'interaccionar d'una manera molt més forta i efectiva amb els grups fosfat de l'ADN. Això permet a la molècula portar a terme la seva funció d'empaquetament i repressió de l'ADN d'una forma molt més eficaç. Els aminoàcids Serina, per un altre cantó, són els que serveixen de suport a les modificacions postranscripcionals de fosforilació i que juguen un paper importantíssim en els processos que permeten la condensació correcta de la cromatina durant l'espermogènesi i la posterior descondensació pronuclear de la mateixa en els primers estadis de la postfertilització (Poccia, 1986, 1987).

El component PL-I de Spisula a mig camí entre la histona H1 i les protamines.

Un dels components al que ens acabem de referir en l'apartat anterior i que han estat més estudiats des d'el punt de vista estructural ha estat el component PL-I de *Spisula solidissima*. (Ausió et al., 1987). La seva composició en aminoàcids és la que es mostra a la Taula II. Es tracta d'una proteïna no insoluble en àcid perclòric al 5% i amb un pèptid resistent a la tripsina i que conté 75 aminoàcids. Les anàlisis hidrodinàmica i espectroscòpica d'aquest pèptid demostren que es tracta d'una estructura globular amb un 10% de α -hèlix, un 33% de plegament β antiparal.lel i un 18% de " β -turns" (Ausió et al, 1987) i que està col.locat entremig de dues regions protèiques ("cues") amb un nivell d'estructura secundària més baix, tal i com s'esquematitza a la Figura 4, on es

TAULA II. Composició d'aminoàcids (% mol) d'algunes de les proteïnes específiques de l'esperma més representatives del tipus histona H1 en els mol·luscs bivalves en comparació amb la histona H1 del lletó de vedella.

	Crassostrea a)		Spisula b)		Ensis c)		Donax d)		Mytilus e)		Lletó de vedella f)	
	H1-1	H1-2	PL-I	PL-I	PL-I (EM-6)	PL-I (X)	PL-II (Ø2B)	H1				
Lys	29.0	26.2	24.8	24.9	21.6	20.0	26.8					
His	10.4	8.9	-	4.0	2.4	0.8	-					
Arg	1.0	1.0	23.1	21.7	19.5	7.9	1.8					
Asp	2.3	1.7	0.6	2.4	2.5	5.3	2.5					
Thr	2.9	3.4	4.3	2.0	2.8	3.3	5.6					
Ser	12.0	13.6	21.7	18.9	19.7	12.2	5.6					
Glu	1.9	1.3	0.6	1.8	2.8	3.6	3.7					
Pro	7.3	7.4	2.4	tr.	1.2	6.7	9.2					
Gly	3.9	4.4	3.0	2.6	6.4	9.4	7.2					
Ala	18.6	21.4	14.2	12.7	9.8	13.9	24.3					
Cys	tr.	tr.	-	-	tr.	-	-					
Val	3.5	3.6	2.3	2.3	2.8	4.2	5.4					
Met	0.8	1.2	0.4	0.9	0.9	1.9	-					
Ile	1.6	1.6	0.5	1.2	1.8	3.0	1.5					
Leu	2.9	2.9	1.7	2.9	2.5	4.7	4.5					
Tyr	0.7	0.6	0.3	0.6	1.8	0.7	0.9					
Phe	1.1	0.9	0.3	1.0	1.4	1.6	0.9					
Try	-	-	0.3	-	-	-	-					

a) H1-1 and H1-2 de l'esperma de *C. gigas* (Sellos, 1985)
 b) PL-I de l'esperma de *S. solidissima* (Ausió i Subirana, 1982-a)
 c) PL-I (EM-6) de l'esperma de *E. minor* (Giancotti et al., 1983)
 d) PLI (x) de l'esperma de *D. trunculus* (Colom i Subirana, 1979)
 e) PLII* (Ø2B) de l'esperma de *M. edulis* (Ausió i Subirana, 1982-c)
 f) (Mayes i Johns, 1982).

tr: índicis

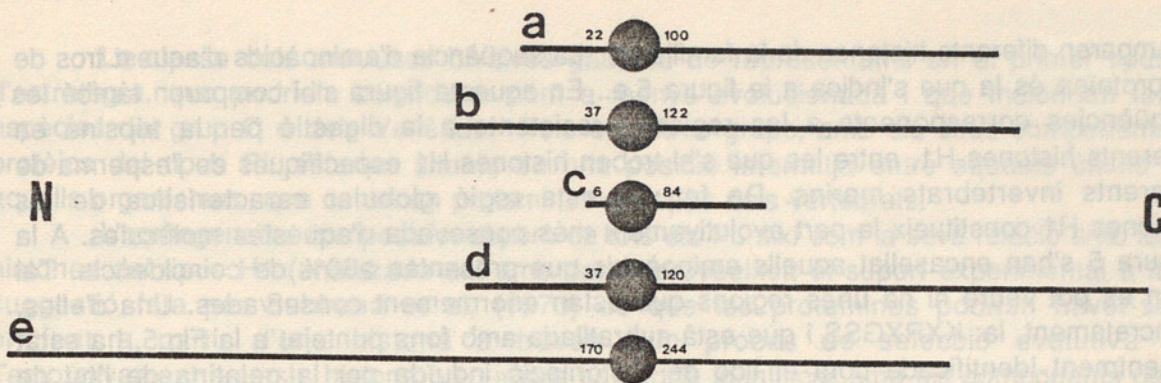


Fig. 4. Representació esquemàtica de l'estructura terciària de diferents histones de la família de l'histona H1. a) histona H5 dels eritròcits de pollastre. b) histona H1 de lletó de vedella. c) histona H1-a de l'esperma de l'annèlid marí *Platynereis durmerilii*. d) histona H1 de l'esperma de l'erioç de mar: *Parechinus angulosus*. e) component PL-I de l'esperma de *Spisula solidissima*. La informació sobre la llargària aproximada corresponent a les estructures adjacents a la regió globular del component PL-I de *S. solidissima* prové de les dades obtingudes a partir de la seqüència total (incompleta) de la proteïna i que no ha estat publicada encara. Els números indiquen l'aminoàcid en què comença o acaba el domini estructural globular i que és resistent a la digestió amb tripsina.

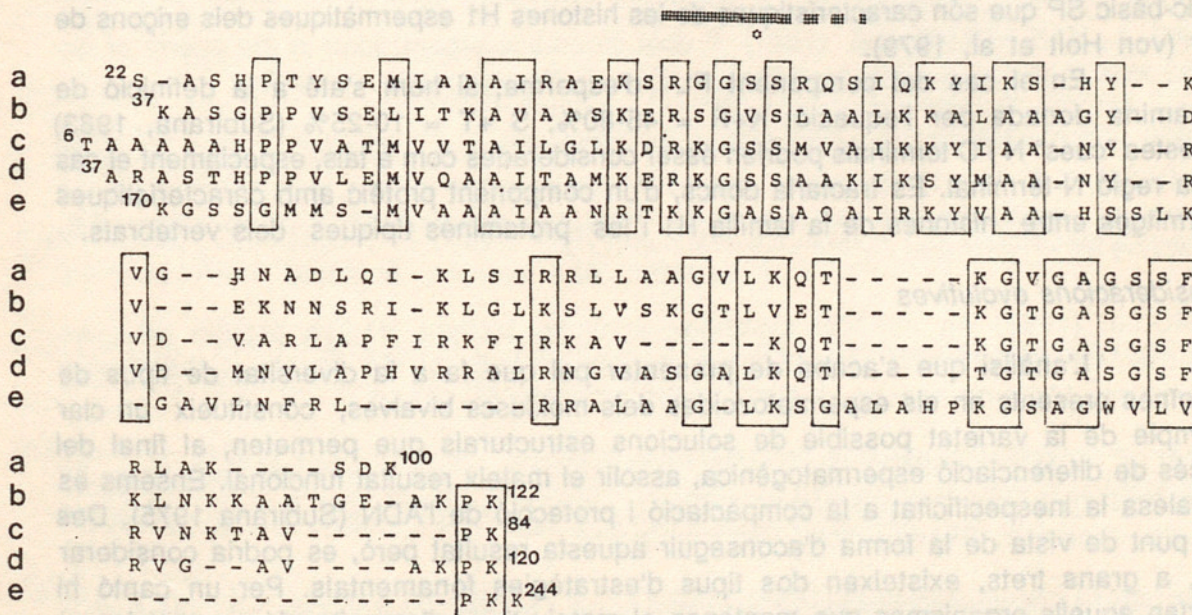


Fig. 5. Seqüències corresponents a la regió resistent a la digestió per la tripsina en diferents molècules de la família de l'histona H1. Les seqüències s'han alineat de manera que s'obtingués el màxim d'homologia. a), b), c), d) i e) es corresponen exactament amb els de l'enunciat de la figura 4.

comparen diferents histones de la família H1. La seqüència d'aminoàcids d'aquest tros de la proteïna és la que s'indica a la figura 5.e.. En aquesta figura s'hi comparen també les seqüències corresponents a les regions resistents a la digestió per la tripsina en diferents histones H1, entre les que s'hi troben histones H1 específiques de l'esperma de diferents invertebrats marins. De fet, aquesta regió globular característica de les histones H1 constitueix la part evolutivament més conservada d'aquestes molècules. A la Figura 5 s'han encasellat aquells aminoàcids que presenten $\geq 80\%$ de coincidència. Tal com es pot veure hi ha unes regions que estan enormement conservades. Una d'elles, concretament, la: KXRXGSS i que està subratllada amb fons puntejat a la Fig.5, ha estat recentment identificada com el lloc de fosforilació induïda per la gelatina de l'ou de l'histona H1 en l'esperma de l'erioç de mar (Porter et al., 1988).

Pel que fa a la resta de la molècula, cal tenir en compte que la histona o millor dit les histones de la família H1 representen, des del punt de vista evolutiu les menys conservades de totes les histones (Isenberg, 1978), així com també les més heterogènies (Cole, 1984). Això es fa palès especialment a les regions adjacents al domini globular tal i com es posa de manifest a la figura 4. Són aquestes regions les que confereixen a la molècula la seva capacitat de condensar la cromatina de maneres diferents i amb diferents graus de compactació.

En el cas del component PL-I de *Spisula* les dades que es tenen de la seva seqüència (incompleta) indiquen l'existència d'una regió N-terminal molt llarga d'uns 170 aminoàcids i en la que s'hi troben regions de seqüència altament repetitives del tipus $KRSX_n$ on normalment $n=3$ (i $X_3 = ASK$ en 8 ocasions), i que suposadament estarien implicades en l'elevada cooperativitat de la unió d'aquesta molècula a l'ADN. (Libertini et al., 1988). A la regió C-terminal s'hi poden trobar 3 seqüències del tipus $AXPK$ (on $X = H$ ó A) (Ausió, resultats no publicats). No s'ha trobat, en canvi, dins d'aquestes regions, cap de les seqüències repetitives del tipus: SP-bàsic-bàsic ó bàsic-bàsic SP que són característiques de les histones H1 espermàtiques dels erioços de mar (von Holt et al, 1979).

En el cas del component PL-I d'esperma, si hom s'até a la definició de protamina donada per l'equació: $K+R = 45-80\%$; $S + T = 10-25\%$ (Subirana, 1983) aquestes "cues" N i C terminals podrien ésser considerades com a tals, especialment el cas de la regió N-terminal. Es tractaria doncs, d'un component proteïc amb característiques intermitges entre histones de la família H1 i les protamines típiques dels vertebrats.

Consideracions evolutives

L'anàlisi que s'acaba de presentar pel que fa a la diversitat de tipus de proteïnes presents en els espermatozoides dels mol. lusc bivalves, constitueix un clar exemple de la varietat possible de solucions estructurals que permeten, al final del procés de diferenciació espermatogènica, assolir el mateix resultat funcional. Ensem es fa palesa la inespecificitat a la compactació i protecció de l'ADN (Subirana 1975). Des d'el punt de vista de la forma d'aconseguir aquesta resultat però, es podria considerar que, a grans trets, existeixen dos tipus d'estratègies fonamentals. Per un cantó hi haurien aquells organismes que mantenen el mateix tipus d'organització cromatínica al llarg de tot el procés i en els que les proteïnes involucrades són molt semblants o idèntiques a les histones somàtiques de les cèl.lules germinals de partida. Per un altre cantó tindriem aquells organismes en els quals l'organització cromatínica experimenta una enorme transformació al llarg del procés diferenciador i que va acompanyada d'un desplaçament de les histones que acaben éssent majoritàriament substituïdes per unes proteïnes altament específiques (protamines).

La classe dels mol·luscs bivalves gaudiria de representants en el primer tipus d'estratègia, que podríem considerar com a menys evolucionada i que inclourien les espècies del grup O o dels Venèrids. Tots els altres grups, amb els seus components protèics del tipus PL estarien situats en una posició intermitja entre aquests últims i aquells organismes que contenen protamines del tipus dels vertebrats.

L'homogeneïtat composicional però de tots els PL així com la seva relació amb les histones del tipus H1 (analitzada ací amb detall, proveeixen el suport experimental a la suggestió feta per Subirana et al, (1973) de que les protamines podrien haver-se originat a partir d'una histona a través d'un procés de selecció evolutiva. Temptativament aquesta histona precursora es podria identificar amb els components del tipus PL-I. Aquesta concepció estaria molt d'acord amb un dels esquemes acceptats actualment per a l'evolució dels Metazous (Bergström 1986) i segons el qual un mol·lusc primitiu hauria estat el precursor que donà origen a la branca dels Deuterostoms. D'ésser així, no resultaria tampoc ja tan sorprenent l'afinitat trobada a nivell de seqüència, entre la part globular del component PL-I de *Spisula* i la part globular de la histona H5 dels eritròcits de pollastre (Ausió et al, 1987).

AGRAIMENTS

Vull agrair a Neus Forcada la seva paciència i cura en l'elaboració d'aquest article i sobre tot pel seu treball en picar a màquina les múltiples formes que l'han precedit abans de la versió final. El meu agraïment també al Dr. Lluís Cornudella per la lectura i revisió del contingut científic de l'article. D'una manera especial vull finalment agrair el valuós ajut rebut en la correcció lingüística del text a càrrec de Francina Solé i Lourdes Urpí.

BIBLIOGRAFIA

- ALLAN, J., HARTMAN, P.G., CRANE-ROBINSON, L. AVILES, F.X. (1980) The structure of histone H1 and its location in chromatin. *Nature*, **288**, 675-679.
- AUSIO, J., SUBIRANA, J.A. (1982-a) A high molecular weight nuclear basic protein from the bivalve mollusc *Spisula solidissima*. *J. Biol. Chem.* **257**, 2802-2805.
- AUSIO, J., SUBIRANA, J.A. (1982-b) Conformational study and determination of the molecular weight of highly charged basic proteins by sedimentation equilibrium and gel electrophoresis. *Biochemistry* **21**, 5910-5918.
- AUSIO, J., SUBIRANA, J.A. (1982-c) Nuclear proteins and the organization of chromatin in spermatozoa of *Mytilus edulis*. *Exp. Cell. Res.* **141**, 39-45.
- AUSIO, J. GREULICH, K.O. HAAS, E., WACHTEL, E. (1984). Characterization of the fluorescence of the protamine thynnine and studies of its binding to double stranded DNA. *Biopolymers*, **23**, 2559-2571.
- AUSIO, J. SASI, R., FASMAN, G.D. (1986) Biochemical and Physicochemical characterization of chromatin fractions with different (degrees of), solubility isolated from chicken erythrocyte nuclei. *Biochemistry*, **25**, 1981-1988.
- AUSIO, J. (1986) "Structural variability and compositional homology of the protamine-like components of the sperm from the bivalve molluscs". *Comp. Biochem. Physiol.* **85**, 439-449.
- AUSIO, J., VAN HOLDE, K.E. (1981). A dual chromatin organization in the sperm of the Bivalve mollusc: *Spisula solidissima*. *Eur. J. Biochem.* **165**, 363-371.
- AUSIO, J., TOUMADJE, A., McPARLAND, R. BECKER, R.R., JOHNSON, W.C. Jr., VAN HOLDE, K.E. (1981). Structural characterization of the trypsin resistant core in the nuclear sperm-specific protein from *Spisula solidissima*. *Biochemistry* **26**, 975-982.
- AUSIO, J. (1988) An unusual cysteine-containing histone H1-like protein and two protamine-like proteins are the major nuclear proteins of the Sperm of the bivalve mollusc: *Macoma nasuta*. *J. Biol. Chem.* **263**, 10141-10150.
- BARFOD, N.M., LARSEN, N. (1976) Polymerization of protamine sulphate by carbodiimide and interaction of isolated protamine polymers with human red blood cells. *Biochem. Biophys. Acta* **427**, 197-207.
- BERGSTROM, J. (1986) Metazoan evolution a new model. *Zool scripta*, **15**, 189-200.
- COLE, R.D. (1984) A minireview of microheterogeneity in H1 histone and its possible significance. *Anal. Biochem.* **136**, 24-30.
- COLOM, J., SUBIRANA, J.A. (1979). Protamines and related proteins from spermatozoa of molluscs characterization and molecular weight determination by gel electrophoresis. *Biochem. Biophys. Acta* **581**, 217-227.

- GIANCOTTI, V., RUSSO, E., GASPARINI, M., SERRANO, D., DEL PIERO, D., THORNE, A.W., CARY, P.D., CRANE-ROBINSON, C. (1983) Proteins from the sperm of the bivalve mollusc: *Ensis minor*. *Eur. J. Biochem.* **136**, 509-516.
- HURLEY, C.K. (1977) Electrophoresis of histones: a modified Pamyim and Chalkley system for slab gels. *Analyt. Biochem.* **80**, 624-626.
- ISENBERG, I. (1978) en *The Cell Nucleus* (Busch, H., ed) Vol. 4, Part A, pp. 135-154, Academic Press, N.Y.
- KUHN-SCHNYDER, E., RIEBER, H. (1986) *Handbook of Paleozoology*. The Johns Hopkins University Press. Baltimore and London.
- LIBERTINI, L., AUSIO, J., VAN HOLDE, K.E., SMALL, E (1988). Highly cooperative binding to DNA by a histone-like sperm-specific protein from *Spisula solidissima*. *Biopolymers*, **27**, 1459-1477.
- MAYES, E.L.V., JOHNS, E.W. (1982) en *The HMG Chromosomal Proteins* (Johns, E.W. editor) pp. 223-247, Academic Press. New York.
- ODINTSOVA, N.A., SUIRNARCHUK, ZALENSAKAYA, I.A., ZALENSKY, A.O. (1981) Partial fractionation and certain characteristics of the basic chromaton proteins of Bivalve mollusc sperm (traduït del Rus). *Biochemistry (Rus)* **46**, 404-410.
- OLIVARES, C., GANZ, H., INOSTROZA, D.C. (1986a) A comparative study of the basic nuclear proteins from sperm of Bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.* **83B**, 185-189.
- OLIVARES, C., RUIZ, S., CORNUDELLA, L. (1986b) Characterization of histone and protamine variants in sperm of the bivalve mollusc: *Aula-comya ater* *FEBS. Lett.* **205**, 195-199.
- PANYIM, S., CHALKLEY, R. (1969) High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. *Arch. Biochem. Biophys.* **130**, 337-346.
- POCCIA, D. (1986) Remodeling of Nucleoproteins during gametogenesis, fertilization and early development. *Int. Rev. Cytol.* **105**, 1-65.
- POCCIA, D. (1987) Regulation of chromatin condensation and decondensation in sea urchin pronuclei en: *Molecular Regulation of Nuclear Events in Mitosis and Meiosis* (R. Schlegel, M.S. Halleck i P.N. Rao, eds.) Academic Press Inc. pp.149-177.
- PORTER, D.C., MOY, G.W., VACQUIER, V.D. (1988) C-AMP-dependent protein Kinase of sea urchin sperm phosphorylates sperm histone H1 on a single site. *J. Biol. Chem.* **263**, 2750-2755.
- SELLOS, D. (1985) The histones isolated from the sperm of the oyster *Crassostrea gigas* *Cell. Diff.* **17**, 183-192.
- SUBIRANA, J.A., COZCULLUELA, C. PALAU, J., UNZETA, M. (1973). Protamines and other basic proteins from spermatozoa of molluscs. *Biochim. Biophys. Acta* **317**, 364-379.

- SUBIRANA, J.A. (1975) On the biological role of basic proteins in spermatozoa and during spermiogenesis, en *The Biology of the Male gamete* ed. J.G. Duckett and P.A. Racey (supplement n° 1 to the Biological Journal of the Linnean Society, vol. 7 p. 239-244.
- SUBIRANA, J.A. (1983) Nuclear proteins in spermatozoa and their interactions with DNA, en *The sperm cell*, Proceedings of the Fourth International Symposium on spermatology, Seillac, France. (ed. Jean André) Martinus Nij. hoff Pub. The Hague.
- SUBIRANA, J.A. COLOM, J. (1981) Comparison of protamines from freshwater and marine bivalve molluscs: evolutionary implications. *FEBS Lett.* **220**, 193-196.
- USCHEWA, A., PATRIOTIS, C., AVRAMOVA, J. (1985). An H1-like protein from the sperm chromatin of *Mytilus galloprovincialis*. *Cell Biol. Int. Rep.* **9**, 253-263.
- VON HOLT, C., STRICKLAND, W.N., BRANDT, W.F. STRICKLAND, M.S. (1979) More histone structures. *FEBS Lett.* **100**, 201-218.
- ZALENSKAYA, I.A., ODINTSOVA, N.A., VORB'EV, I.V. (1985) Chromatin from sperm of Bivalvia molluscs. *FEBS Lett.* **188**, 243-247.
- ZALENSKY, A.O., ZALENSKAYA, I.A. (1980) Basic chromosomal proteins of marine invertebrates III. The proteins from the sperm of Bivalvia molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.* **66b**, 415-419.
- ZALENSKY, A.O. AVRAMOVA, Z.V. (1984) Nucleosomal organization of a part of chromatin in molluscs sperm nuclei with a mixed basic protein composition. *Mol. Biol. Rep.* **10**, 69-74.