

NUCLEOPROTEÏNES BÀSIQUES ESPERMÀTIQUES D'INVERTEBRATS MARINS I LA SEVA ESTRUCTURA GÈNICA

EVA PRATS, ROSA DEBÓN, JAUME VAQUÉ I LLUÍS CORNUDELLA

Departament de Biologia Molecular i Cel·lular. Institut de Biologia Molecular de Barcelona del CSIC i Centre de Referència en Biotecnologia de la Generalitat de Catalunya.

Jordi Girona, 18-26. E-08034 Barcelona. Adreça electrònica: lcmbmc@cid.csic.es.

SUMMARY

Spermatogenesis requires the reversible packaging of DNA into an inert chromatin structure such that it can be unfolded rapidly following fertilization. DNA-bound somatic histones must be replaced during the developmental pathway leading to the quiescent spermatozoon. The chromosomal proteins of the sperm exhibit a vast structural variability in different organisms, ranging from histone variants to protamines. Sperm-specific nuclear proteins of most species are incorporated into the chromatin during the post-meiotic stages of morphological differentiation of spermiogenesis. A major problem in assessing the physiological function of sperm protein variation is that there is virtually no knowledge as to what effect such variation has at the molecular level. The study of nuclear protein transitions during spermiogenesis has been restricted to fishes and mammals and mostly performed at the protein level. The information available on these transitions in marine invertebrates is scanty, despite these organisms exhibit the largest number of sperm-specific protein types, and even less concerning the genes that encode them. This review presents what is known about the transformation of nucleoprotein types during spermatogenesis. It also outlines chromatin structural changes which accompany nucleoprotein transitions, as well as the potential functions of the unique nucleoproteins and histone variants associated with male gametes.

RESUM

L'espermatogènesi implica la compactació reversible del DNA en una estructura cromatínica inerta que li permeti desnuar-se ràpidament durant la fertilització. En general, les histones somàtiques associades al DNA esdevenen substituïdes durant el procés de desenvolupament que culmina en l'espermatozoide madur. Les nucleoproteïnes de l'esperma mostren una diversitat estructural sorprenent entre les espècies animals, ja que abasten des de variants de les histones fins a les protamines. Les nucleoproteïnes específiques dels espermatozoides de la majoria d'organismes s'incorporen a la cromatina durant les fases de diferenciació morfològica postmeiòtica de l'espermiogènesi. Un gran obstacle per establir la seva funció fisiològica és la manca de coneixement dels efectes que aquesta variabilitat comporta des del punt de vista molecular. En vertebrats, l'estudi de les transicions nucleoproteïques durant l'espermiogènesi s'ha limitat a la caracterització de les proteïnes en mamífers i peixos. La informació relativa a aquestes transicions en invertebrats marins, tot i que aquests últims mostren el major repertori de tipus de proteïnes específiques de l'esperma, és escassa, particularment pel que fa als gens que les codifiquen. Aquesta revisió ens presenta tot el que es coneix referent a la transformació de les diferents classes de nucleoproteïnes durant l'espermatogènesi. També es comenten els canvis estructurals de la cromatina que acompanyen les transicions nucleoproteïques, i les possibles funcions de les diverses nucleoproteïnes i variants d'histones associades als gàmetes.

INTRODUCCIÓ

La cromatina eucariota és un complex nucleoproteic macromolecular essencialment compost de DNA i proteïnes bàsiques. Les histones, que són unes proteïnes relativament conservades al llarg de l'evolució, són els components proteics genuïns de les cèl·lules no proliferants i intervenen en l'organització de la fibra de cromatina en les diverses jerarquies estructurals (per a revisió vegeu Wolffe, 1992). En contrast marcat, en els llinatges de les cèl·lules germinatives masculines, el DNA s'associa amb un ampli ventall de proteïnes bàsiques pel que fa a composició química i nombre. Això dona lloc a una sorprenent varietat de molècules proteïques entre els diferents grups zoològics (Poccia, 1986), que s'estén des d'aquelles espècies animals que retenen histones molt semblants als tipus somàtics, fins a aquelles en les quals les histones són total-

ment desplaçades per proteïnes més bàsiques, com les nucleoprotamines (Bloch, 1976). La informació química disponible comprèn una gran varietat d'espècies de vertebrats: peixos (Bretzel, 1972; Dixon i Smith, 1968), amfibis (Kasinsky *et al.*, 1985), aus (Nakano *et al.*, 1970) i mamífers (Kistler *et al.*, 1973). Entre els invertebrats, destaquen certes espècies de mol·luscs (Subirana *et al.*, 1973; Olivares *et al.*, 1986) i d'equinodermes (Palau *et al.*, 1969; Azorín *et al.*, 1983). Els trets distintius de l'esmentada variabilitat són: a) quan la dotació somàtica de les histones es manté, una majoria d'espècies afegeixen almenys un component addicional específic de l'esperma; b) les variants d'histones específiques d'esperma solen ser més bàsiques que les corresponents somàtiques; c) hi ha una correlació directa entre el grau de condensació de la cromatina de l'es-

perma i el caràcter de les proteïnes associades al DNA.

És aparent que un increment de la basicitat de les proteïnes espermatogèniques afavorirà un empaquetament més eficient del DNA. En els espermatozoides, aquesta situació sembla òbvia com a mitjà per protegir la dotació genòmica. Tanmateix, podria també tractar-se d'una adaptació evolutiva de l'esperma per suportar l'emmagatzematge i el transport del DNA en absència de mecanismes de reparació. Nogensmenys, la significació funcional de la diversitat de proteïnes bàsiques en l'esperma i la seva influència molecular encara estan mancades d'una adequada definició. L'empaquetament del DNA podria no ser la comesa exclusiva. L'existència de variants en la línia germinativa, com també de classes de proteïnes específiques de l'esperma, insinua funcions més discriminatives, com ara transicions estructurals de la cromatina relacionades amb la modulació de l'activitat gènica i la seva quiescència final durant l'espermogènesi (Coles *et al.*, 1987).

La causa de la diversitat de les nucleoproteïnes de l'esperma és desconeguda. Basant-se en la composició proteica de l'esperma d'alguns mol·luscs bivalves, s'ha proposat una hipotètica evolució d'algunes d'aquestes proteïnes que surt de la histona H1 (Ausió i Van Holde, 1988). La histona H1 i tots els seus subtipus constitueixen la més heterogènia d'entre les classes d'histones (Von Holt, 1986). La variabilitat evolutiva de les seqüències es concentra en les extensions terminals carboxíliques i en els grups amino de les molècules, mentre que el nucli globular central, de caràcter hidrofòbic, resta substancialment conservat (Cole, 1984). Aquesta organització asimètrica ha portat a suggerir que el terminal carboxílic intervé en la compactació d'ordre superior de la cromatina (Allan *et al.*, 1986). Els invertebrats marins, sobretot els equinoderms i els

mol·luscs, són un bon model per comprovar aquest supòsit, donat que les seves histones somàtiques aparentment coexisteixen tant amb variants específiques d'esperma com amb molècules semblants a protamines diferents de les dels peixos i mamífers (Ausió, 1986; Poccia, 1986; Zweidler, 1984).

Malgrat que les histones cel·lulars prevalents són codificades per famílies multigèniques marcadament reiterades, l'expressió de les quals està estretament acoblada a la fase de replicació del DNA, els gens de les variants d'histones tendeixen a estar presents en una o bé en unes poques còpies disperses no subjectes a la regulació del cicle cel·lular (Challoner *et al.*, 1989; Hecht, 1990). S'han proposat classificacions basades en consideracions regulatòries (Zweidler, 1984). Nogensmenys, se sap molt poc de l'organització dels gens de les variants d'histones específiques de teixit, i de l'origen evolutiu dels gens de les nucleoprotamines i dels de les molècules semblants a les protamines (Oliva i Dixon, 1991). El plantejament d'aquestes qüestions i l'obtenció d'una nova evidència referent a la transició histona-protamina, així com la caracterització de gens que les codifiquen, són l'objecte d'aquesta revisió i la via per esbrinar, des del punt de vista molecular, la seva funció diferencial i també la seva participació en l'organització estructural de la cromatina espermàtica.

REMODELATGE DE LA CROMATINA DURANT L'ESPERMATOGÈNESI

L'espermogènesi té per objecte l'empaquetament del DNA en una estructura cromatínica inerta tal que el DNA pugui ser desembolcat ràpidament a l'inici de la fertilització. Les histones només representen una manera d'empaquetar el DNA a fi d'acomodar-lo en el reduït volum del nucli cel·lular. Hi ha moltes altres maneres de

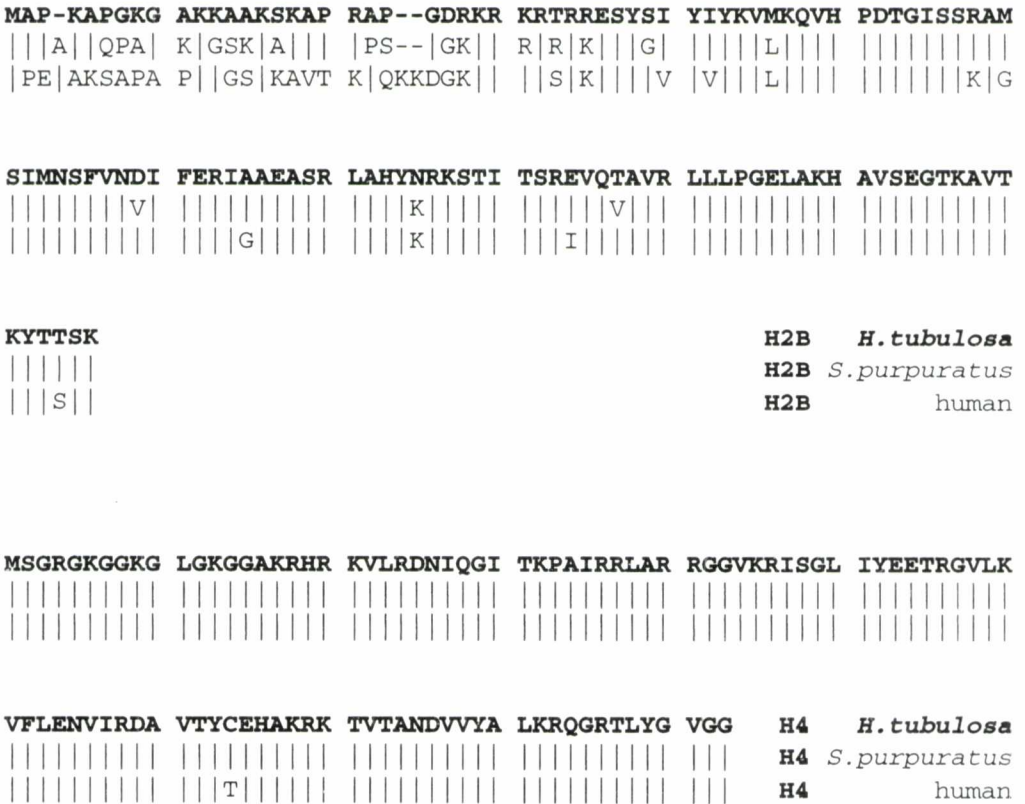


FIGURA 1. Comparació de les estructures primàries de les histones H2B (gràfic superior) i H4 (gràfic inferior) d'holotúria, eriç de mar i humanes, inclosa la metionina d'iniciació.

compactar el DNA de forma reversible. La substancial conservació de les histones al llarg de l'evolució és una mesura de la influència preponderant d'aquestes proteïnes en molts processos nuclears. Possiblement el paradigma de la compactació reversible del DNA per procediments diversos sigui la seva condensació en el nucli espermatòic durant l'espermatogènesi. Aquesta última forneix un bon exemple de la participació de les variants de les histones i les seves modificacions posttraduccional, i de les proteïnes no-histones, en la regulació de l'estructura i la funció cromosòmiques.

L'accessibilitat a poblacions pures d'espermatozoides aviat va permetre descobrir

l'existència d'una àmplia varietat de tipus de proteïnes en els nuclis de l'esperma de moltes espècies animals. Aquestes proteïnes han estat distribuïdes en diverses classes (Bloch, 1976). Una d'elles, les protamines, es troba en dos tipus: un de ric en trams de poliarginina puntuats per prolina i per residus de serina i treonina potencialment fosforilables; l'altre tipus és ric en cisteïna. Ambdues classes de protamines són de mida reduïda i fortament bàsiques. Els complexos de DNA-protamina solen representar l'estat final de la cromatina dels nuclis espermatòics tant dels peixos com dels mamífers. Nogensmenys, durant el desenvolupament espermatogènic altres proteï-

nes poden substituir les histones de manera transitòria (Poccia, 1986).

Les proteïnes de transició reemplacen les histones durant les etapes inicials de la condensació cromatínica en l'espermioogènesi i més tard són alhora substituïdes per les protamines. Les protamines són les nucleoproteïnes bàsiques exclusives de l'esperma de la majoria de mamífers. Les proteïnes de transició previsiblement faciliten el recanvi de les histones per les protamines, malgrat que se sap poc de la seva funció específica. La seqüència aminoacídica d'una de les proteïnes de transició en el ratolí suggereix la presència de dos dominis estructurals. Un d'ells, el terminal del grup amino, és ric en cisteïna, prolina i residus de serina i treonina fosforilables, semblantment a les protamines. L'altre correspon a la terminació carboxílica, que és rica en arginina (Kleene i Flynn, 1987; Luerssen *et al.*, 1989). Les proteïnes de transició presenten un interès particular ja que són les úniques proteïnes, juntament amb les protamines, capaces de dissociar del DNA les histones en un context fisiològic. S'han proposat diversos mecanismes per explicar aquest reemplaçament. En primer lloc, la interacció electrostàtica de les proteïnes de transició amb el DNA hauria de ser intermèdia entre les histones i les protamines, atès que la concentració d'aminoàcids bàsics prop del terminal carboxílic és superior a la de les histones però inferior a la de les protamines. En segon lloc, el putatiu domini d'unió al DNA conté aminoàcids aromàtics com fenilalanina i tirosina. Els residus de tirosina en les proteïnes de transició es troben intercalats entre les bases del DNA i provoquen una disminució de l'estabilitat tèrmica (Singh i Rao, 1987). La intercalació de residus aromàtics pot introduir curvatures en el DNA, i aquestes inflexions de retruc poden alterar la trajectòria del DNA entorn del nucli de les histones i, per tant, desestabilitzar potencialment el nucleosoma.

Quant a les variants d'histones específiques de l'esperma, l'eriçó de mar conté una variant de la histona H2B i una altra de la H1. Ambdues molècules són considerablement més voluminoses, majoritàriament pel que fa al terminal del grup amino, i més riques en arginina que les corresponents somàtiques. Els aminoàcids addicionals incrementen la interacció de les dues histones amb el tram d'unió del DNA (Bavykin *et al.*, 1990; Hill i Thomas, 1990). També seria possible que facilitessin l'estabilització i la condensació de la cromatina mitjançant la creació d'unions entre cadenes de DNA de les fibres. La fosforilació de les cues de la histona H1 regula la interacció amb el DNA (Hill *et al.*, 1991). A mesura que la cromatina és compactada, les cues esdevenen desfosforilades. En els mamífers, durant la profase meiótica s'acumulen variants espermatogèniques de les histones H1, H2A i H2B. Atès que totes aquestes transicions estructurals de la cromatina ocorren després de la replicació, el desplaçament al llarg del dúplex de DNA d'un complex enzimàtic de processament no és un requisit per al remodelatge de l'estructura cromosòmica. En la rata, les variants de les histones del nucli esdevenen fortament acetilades abans de ser dissociades del DNA per l'acumulació de les proteïnes de transició. Finalment, l'acumulació de protamines, la unió de les quals és també regulada pel seu estat de fosforilació, provoca el desplaçament progressiu de les proteïnes de transició, i el nucli cel·lular esdevé totalment condensat.

Per què la cromatina espermàtica és condensada per mitjà d'un mecanisme tan especial? Entre les explicacions s'inclou el requeriment de protecció i estabilitat del material genètic en l'estructuració cromatínica. El DNA en el nucli de l'espermatozoide és molt menys accessible a les nucleases que el de la cèl·lula somàtica. Ensenms, és molt més estable i resistent a perturbacions

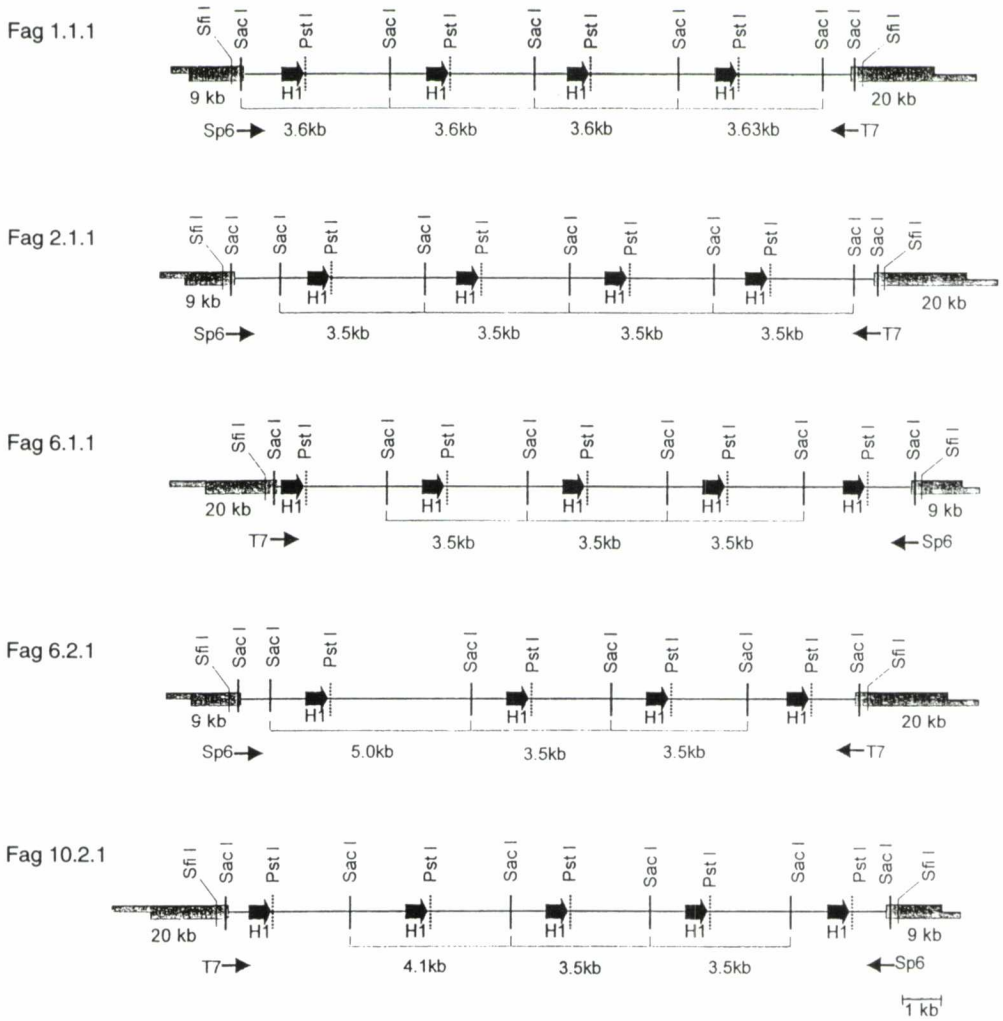


FIGURA 2. Mapes de restricció dels bacteriòfags recombinants que contenen els cinc gens d'H1 diferents. Els clons recombinants van aïllar-se d'una genoteca de DNA d'esperma de *Mytilus edulis*. Els inserts van ser cartografiats amb les endonucleases *SacI* i *PstI*. Les fletxes gruixudes indiquen la regió codificant dels gens de la H1.

fisicoquímiques. Un efecte concomitant de la compactació de la cromatina, a mesura que les histones somàtiques són desplaçades dels cromosomes, és la supressió de l'activitat gènica. És factible que la compactació en el nucli espermàtic no sols generi una inaccessibilitat del DNA a les RNA polimerases sinó que també esborri els episodis del desenvolupament dels cromosomes.

Particularment, els factors *trans*-actuants responsables de dirigir i coordinar els esdeveniments específics en el nucli podrien ser desplaçats. L'evidència en favor d'aquest supòsit és fornida per les anàlisis dels llocs de la cromatina hipersensibles a la DNasaI, que perden tots els gens en l'esperma. Aquests llocs sorgeixen on els factors *trans*-actuants ocasionen distorsions en la fibra de

cromatina. Nogensmenys, aquells gens que són expressats constitutivament són assenyalats durant l'espermatogènesi per mitjà de la hipometilació de les futures dianes d'hipersensibilitat (Groudine i Conkin, 1985).

ESTRUCTURA DELS GENS DE LES HISTONES

Com ja s'ha dit, les histones són els constituents proteics majoritaris de la cromatina de les cèl·lules eucariotes. El seu substancial grau de conservació va permetre l'aïllament de gens d'histones d'espècies animals molt llunyanes entre elles, així com la identificació dins d'un mateix genoma d'un ampli ventall d'isoformes gèniques per a cadascuna de les cinc classes d'histones (Wells i McBride, 1989). Els estudis inicials referents a l'arranjament dels gens de les histones en el genoma d'ericons marins i altres eucariotes inferiors (Hentschel i Birnstiel, 1981; Maxson *et al.*, 1983a) van revelar l'existència d'una distribució uniforme de quintets gènics repetits en tàndem que codifiquen les cinc classes d'histones. En els ericons, aquesta agrupació de tàndems repetitius es troba restringida als gens que s'expressen a l'inici de l'embriogènesi, mentre que els gens tardans es troben distribuïts en agrupacions irregulars o també en solitari (Maxson *et al.*, 1983b).

Dins el filum dels equinoderms, la recerca dels gens de les histones s'ha realitzat amb genomes pertanyents a classes diferents d'ericons (equinoïdeus), com *Psammochinus miliaris* (Buslinger *et al.*, 1980), *Strongylocentrotus purpuratus* (Overton i Weinberg, 1978) o *Litechinus pictus* (Cohn i Kedes, 1979), i també de diverses espècies d'estrelles de mar (Howell *et al.*, 1987; Cool *et al.*, 1988). En el darrer cas, s'han detectat tàndems repetitius de quartets de les histones del nucli, però no s'han observat gens en solitari o agrupacions parcials.

Els gens de les histones H2B i H4 en el genoma haploide de l'*Holothuria tubulosa*

En el mateix embrancament dels equinoderms i dins la classe dels holoturiòideus, s'han trobat recentment en el genoma del cogombre de mar (*Holothuria tubulosa*) dos gens de les histones H2B i H4 que no estan constituint agrupacions repetitives en tàndem (Drabent *et al.*, 1995a). El crivellatge d'una genoteca construïda amb DNA d'esperma d'*H. tubulosa* emprant sondes de gens d'histones de procedència humana permeté l'aïllament d'un bacteriòfag recombinant portador d'un insert de 20 kb amb una còpia del gen de la H4. La subsegüent anàlisi d'hibridació amb sondes dels gens de les restants histones va esdevenir negativa excepte per a la histona H2B. Per tant, dos gens d'histones van ser trobats en l'insert d'un fag recombinant aïllat d'una genoteca d'holotúria. Un cop subclonats els fragments positius de DNA genòmic, la seva seqüenciació va revelar que les regions flanquejants dels dos gens contenien els elements reguladors considerats específics dels gens de les histones, com són els llocs d'unió de factors de transcripció: la caixa CCAAT en la regió promotora de la H4 i el mateix element invertit (ATTGG) en el promotor de la H2B. Així mateix, en la regió flanquejant 3' dels dos gens s'hi trobaven hexanucleòtids-senyal de poliadenilació. Curiosament, no s'han descrit encara en els equinoderms missatgers d'histones poliadenilats.

Els dos gens de l'holotúria han estat detectats utilitzant sondes de DNA de procedència humana. Això és demostratiu de l'elevat grau de conservació dels esmentats gens. La semblança amb els homòlegs humans és del 66% per al gen de la H2B i del 76% per al de la H4. Comparant el gen de la H2B de l'eríç *Strongylocentrotus purpuratus* amb el de l'holotúria, la semblança de seqüència és del 79%. Les variacions en el gen d'aquesta histona es

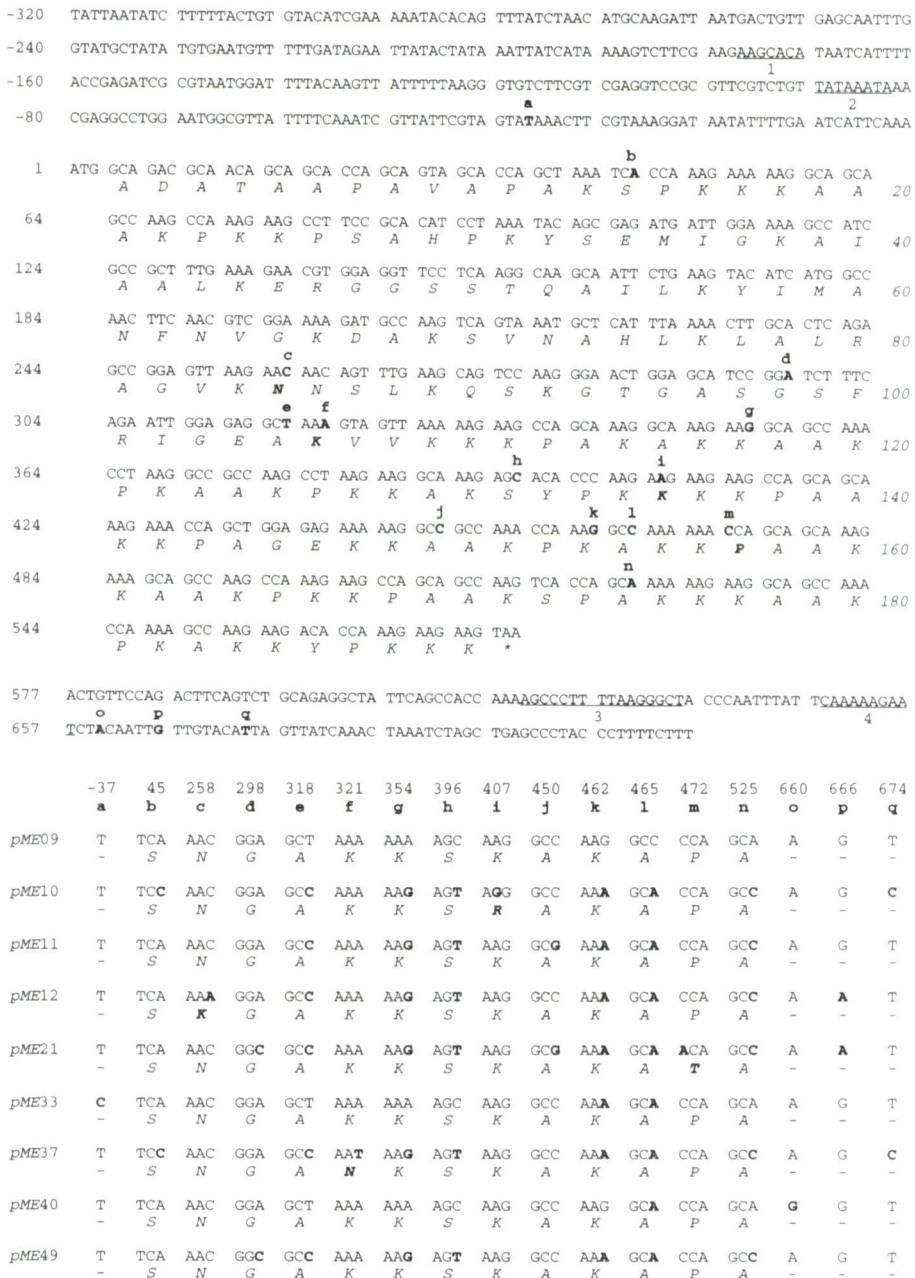


FIGURA 3. Seqüència del gen de la histona H1 de *Mytilus edulis*. Els fragments de restricció *SacI* dels diferents fags van ser subclonats a pBluescript i seqüenciats. Els números de l'esquerra corresponen a la seqüència nucleotídica i els de la dreta als residus d'aminoàcids. Els elements reguladors de seqüència conservats es mostren subratllats: (1) element semblant a la caixa-H1; (2) caixa TATA; (3) estructura de tija i bucle; (4) tram ric en purines. Les minúscules damunt la seqüència assenyalen els canvis de nucleòtids dins dels diferents gens d'H1. Taula de les permutes de nucleòtids i d'aminoàcids entre els nou gens d'H1 diferents. Els canvis de nucleòtids i les substitucions d'aminoàcids s'indiquen amb negretes.

concentren en l'extrem 5' que codifica el terminal no globular del grup amino de la molècula de la histona. Aquest domini proteic és el lloc de modificacions potencials i d'interaccions DNA-proteïna. Per contra, el domini globular de la molècula intervé en les interaccions proteïna-proteïna i la seva estructura primària és molt conservada, tant des del punt de vista proteic com del DNA.

Una situació diferent s'observa en els gens de la histona H4 de l'erició i de l'holotúria, la semblança dels quals és del 91% en la porció gènica codificadora. Ambdós codifiquen proteïnes d'estructura primària idèntica. La seqüència aminoacídica de la histona H4 dels dos equinoderms és fins i tot idèntica a la de la corresponent humana amb una única excepció donada per un residu de cisteïna en la posició 74 (figura 1). Aquest residu ha estat considerat com un element distintiu dels gens de la histona H4 en l'erició, com el gen tardà L1H4 (Maxson *et al.*, 1987). Aquest darrer gen es troba situat prop del gen tardà de la H2B, i ambdós constitueixen una parella solitària. Atès que aquest arranjamnt gènic difereix de l'organització en quintets gènics repetits en tàndem dels gens primerencs de les histones, els gens de la H2B i H4 trobats en l'holotúria es poden considerar una parella gènica tardana d'histones. Aquest supòsit ve refermat pel fet de la presència d'un residu d'alanina en la posició 73 semblantment al gen tardà de *Strongylocentrotus purpuratus*, mentre que l'homòleg primerenc d'aquest darrer erició conté una metionina en l'esmentada posició. Basant-se en la comparació dels gens primerencs i tardans de les histones H2B i H4 en l'erició (Maxson *et al.*, 1987), s'ha proposat que aquestes dues classes de gens van divergir com a mínim fa 200 milions d'anys i que les espècies actuals d'equinoderms van evolucionar a partir d'un progenitor comú entorn d'aquella època. Fins ara aquestes consideracions es recolzaven

únicament en les distincions entre les dues classes d'histones de l'erició. La informació subministrada pels gens de l'holotúria proporciona una primera evidència en favor d'una repercussió més general d'aquests criteris.

Agrupacions gèniques exclusives de gens d'histona H1 en el músculo

Entre les classes d'histones, la H1 és la proteïna menys conservada evolutivament. S'han aïllat i caracteritzat set subtipus diferents d'histona H1 en genomes humans i de ratolí (Albig *et al.*, 1997a; Drabent *et al.*, 1995b; Wang *et al.*, 1997). Com hem assenyalat, les agrupacions gèniques de les histones solen arranjar-se en tàndems repetitius que codifiquen les cinc classes d'histones, com en els genomes de diversos invertebrats (Maxson *et al.*, 1983a). Així, en el genoma de l'erició de mar s'hi troben diversos centenars de quintets de gens units en tàndem, que s'expressen en les fases embrionàries inicials (Hentschel i Birnstiel, 1981; Kedes, 1979; Sures *et al.*, 1978). Nogensmenys, els gens de les histones de l'erició que s'expressen tard durant l'embriogènesi, si bé es troben agrupats, ho fan sense una organització regular i fins i tot alguns gens estan dispersos pel genoma (Maxson *et al.*, 1983b). En els genomes del pollastre, murins i humà, els gens estan agrupats, però no repetits regularment en tàndem (Heintz *et al.*, 1981; d'Andrea *et al.*, 1985; Albig *et al.*, 1997b; Wang *et al.*, 1997). Els anèl·lids comparteixen agrupaments dels gens de les cinc histones amb agrupacions addicionals mancades del gen de la H1 (Sellos *et al.*, 1990; del Gaudio *et al.*, 1998). Aquests agrupaments gènics mancats d'H1 han estat també observats en els genomes del tritó (Stephenson *et al.*, 1981), de l'estrella de mar (Cool *et al.*, 1988) i en el corall (Miller *et al.*, 1993).

Per primera vegada s'han observat en el

musclo agrupacions gèniques constituïdes exclusivament per gens de la histona H1 (Drabent *et al.*, 1998). El sondatge d'una genoteca de DNA d'esperma de *Mytilus edulis* amb una sonda del gen humà d'H1 ha permès aïllar i analitzar cinc *fags* recombinants que contenen 22 fragments de restricció *SacI* i que cadascun d'ells porta una còpia del gen de la H1 (figura 2). El subclonatge i l'anàlisi de seqüència de tots els fragments *SacI* positius determinen la presència de 9 gens d'H1 que difereixen en diversos nucleòtids entre ells (figura 3a i b). Les seqüències aminoacídiques deduïdes dels 22 gens revelen l'existència de cinc molècules d'H1 diferents d'una llargària de 190 aminoàcids. Els cinc tipus d'H1 presenten l'organització canònica en tres dominis estructurals: un tram N-terminal curt, seguit d'un domini globular central, i un extrem carboxílic llarg. Aquest darrer domini es mostra enriquit en diferents motius peptídics repetits (figura 3a). L'heptapèptid KKAAPK hi és present quatre cops, l'hexapèptid KKPAAK, tres cops i dues vegades el pentapèptid TPKKK. Endemés, aquest darrer motiu es troba un cop en el domini globular central. Motius estructurals semblants han estat observats en la truita *Salmo gairdnerii* i, presumptivament, representen llocs de fosforilació (Mezquita *et al.*, 1985). Aquests conjunts de motius peptídics repetits probablement s'han originat per duplicació d'alguns pèptids durant l'evolució del gen de la H1. L'anàlisi comparativa de les seqüències codificants de diferents gens d'H1 de vertebrats i invertebrats revela semblances significatives entre el gen de la H1 de *M. edulis* i del seu homòleg tardà en l'eriçó de mar *S. purpuratus*. La millor correspondència es dona amb el gen de la histona H1 δ . Aquesta molècula és un bon exemple de subtipus d'H1 de recanvi, específic de diferenciació en l'eriçó de mar. La part globular d'aquesta histona presenta una substancial homologia amb les

corresponents de la H1 $^{\circ}$ i H5 dels vertebrats (Schulze i Schulze, 1995) i el seu mRNA és poliadenilat.

A diferència del gen de la H1 δ en l'eriçó, els gens en el musclo no contenen senyals de poliadenilació. Les regions flanquejants 3' dels gens d'H1 del musclo inclouen l'estructura de tija i bucle seguida de la seqüència ACCCA i el tram ric en purines CAAAAA-GAAT (figura 3a). Aquests elements de seqüència són els senyals de terminació genuïns dels mRNA missatgers dels gens d'H1 dependents de la replicació, que s'expressen durant la fase S del cicle cel·lular. Les regions flanquejants 5' dels gens de la H1 de musclo mostren motius estructurals característics del promotor canònic, incloent-hi una caixa TATA i la seqüència AAGCACA, molt semblant a la caixa AAACACA de la H1 (Dalton i Wells, 1988). En contrast amb els gens humà i de ratolí de la H1, els promotors del musclo no contenen la caixa CCAAT (Martinelli i Heintz, 1997) ni l'element GC (Coles i Wells, 1985). Els elements de seqüència identificats en les regions flanquejants indiquen que els gens d'H1 caracteritzats en el musclo són formes gèniques de la H1 dependents de replicació.

Les unitats repetitives de restricció que contenen gens d'H1 del musclo mostren certes diferències de mida (figura 2). Els fragments *SacI* de 3,5 i 3,6 kb són els més nombrosos, però també se n'hi troben de 4,1 i 5 kb. Les seqüències espaiadores dels gens d'H1 en els cinc clons recombinants mostren un elevat contingut de parells de bases AT, prop del 65%, superior al corresponent a les seqüències gèniques codificadores (53%). Aquesta parella de nucleòtids forma agrupacions (AT)_n. Agrupaments equivalents de (CT)_n han estat observats en les regions espaiadores dels gens d'histones en l'eriçó de mar (Sures *et al.*, 1978). Aquests elements repetitius de seqüència, malgrat que no mostren cap funció en l'expressió gèn-

nica, podrien haver participat en l'evolució dels gens de les histones (Kedes, 1979). Atès que els gens d'H1 caracteritzats en el genoma de *M. edulis* estan organitzats de manera repetitiva i que les seves seqüències codificadores són molt conservades, es pot considerar que s'han generat al llarg de l'evolució per duplicació i recombinació. Els simples motius AT en les regions espaciadores dels gens podrien haver estat el substrat dels esdeveniments de recombinació (Childs *et al.*, 1981).

Agrupacions que contenen tots els gens de les histones, exceptuant els de la histona H1, han estat detectades en nematodes i certs equinoderms (Roberts *et al.*, 1987). En l'estrella de mar, aquest mode d'agrupament es troba en elevat nombre de còpies. Tots aquests conjunts estan mancats de seqüències codificadores de la histona H1, no es troben organitzats en tàndems repetitius i els gens són transcrits des de les dues cadenes del DNA. Els gens de les histones del nucli en l'anèl·lid *Platynereis dumerilli* es troben agrupats; dins de l'agrupament mostren una distribució en tàndem molt conservada i es transcriuen d'ambdues cadenes (Sellos *et al.*, 1990). En contrast, l'anèl·lid *Chaetopterus variopedatus* conté agrupaments de tots els gens de les histones, fins i tot el de la H1 (Del Gaudio *et al.*, 1988), i es contraposa als coralls, en els quals els conjunts gènics ometen el gen d'aquesta histona (Miller *et al.*, 1993).

El gen de la histona H1 en el genoma haploide de *Mytilus edulis* és singular en la mesura en què constitueix agrupaments en solitari de còpies gèniques arranjades en unitats repetides en tàndem (Drabent *et al.*, 1998). Aquest és el primer cas fins ara descrit de conjunts gènics constituïts per un únic gen de la histona H1. Totes les còpies del gen dins dels fragments genòmics analitzats mostren una mateixa orientació transcriptiva, és a dir, són transcrits de la

mateixa cadena de DNA. El nombre de còpies dels gens de la H1 en el músculo ha estat estimat entorn de les cent còpies per completament haploide. Atès que el càlcul està basat solament en les unitats gèniques presents en els fragments de restricció *SacI* de 3,5 kb, és probable que el nombre real de còpies del gen de la H1 sigui superior al centenar per genoma haploide. La comparació de les seqüències dels diferents gens d'H1 mostra que les còpies que es troben en un mateix insert són més semblants entre elles que les d'inserts diferents. Les seqüències codificadores dels gens de la histona H1 de *M. edulis* mostren una semblança significativa amb les dels gens d'H1 en l'eriçó de mar, les de la H1° de vertebrats i les del gen de la H5. Aquesta similitud afavoreix la hipòtesi que els gens de les histones H1° i H5 van divergir del grup troncal de gens de la H1 abans que ho fessin els gens homòlegs dels vertebrats (Schulze i Schulze, 1995).

NUCLEOPROTEÏNES BÀSIQUES ESPECÍFIQUES DE L'ESPERMA: EL GEN DE LA Φ_0 EN L'HOLOTÚRIA

És sabut que les cèl·lules espermàtiques madures presenten un ampli ventall de mides i formes i que els seus continguts nucleoproteics són, així mateix, molt diversos. Bloch (1976) va distribuir les nucleoproteïnes espermàtiques en cinc classes: 1) monoprotamines del tipus salmó, que contenen arginina i estan mancades de lisina; 2) semblants a protamina com en el ratolí, riques en arginina i amb cisteïna oxidada; 3) tipus-*Mytilus* o intermèdies, que comparteixen trets tant d'histones com de protamines; 4) histones somàtiques o de tipus-*Rana*; 5) proteïnes no bàsiques tipus cranc, diferents de les histones i de les protamines. La categoria de tipus intermedi probablement representa una transició entre les histones

somàtiques i les protamines. Alguns espermatozoides de tipus intermedi contenen variants d'histones específiques d'esperma i estan mancats de protamines, com en l'erició i l'estrella de mar. Altres, com en el cas dels mol·luscs i l'holotúria, aparentment retenen la dotació somàtica d'histones, però incorporen nucleoproteïnes bàsiques addicionals. En tots aquells casos en els quals l'esperma madur conté proteïnes nuclears específiques que substitueixen les histones somàtiques, aquestes últimes han de ser desplaçades en algun moment durant el procés de desenvolupament que condueix a l'espermatozoide. L'evidència acumulada fins al moment indica que la incorporació a la cromatina de les nucleoproteïnes específiques té lloc en fases postmeiòtiques de l'espermatogènesi, o sigui, durant la diferenciació espermiogènica.

L'espermatogènesi del cogombre de mar *Holothuria tubulosa* és un procés força simple. Morfològicament, el nucli de l'espermatozoide es manté esfèric i no és sotmès a cap canvi conformacional, tret de la formació de la cavitat que ha de contenir l'acrosoma. Durant la maduració de l'esperma no es produeix desplaçament ni substitució del complement d'histones. Les variacions de la dotació nucleoproteica al llarg de la maduració es limiten a l'addició d'una variant de la histona H1, específica de l'esperma i rica en arginina (Phelan *et al.*, 1972), com també a l'aparició d'una proteïna bàsica de reduït volum anomenada ϕ_0 que s'acumula en l'esperma madur (Subirana, 1970). Aquesta molècula conté 77 residus aminoacídics, trenta-quatre dels quals corresponen a lisines i arginines amb una relació K/R de 0,7, més vint-i-dos residus d'alanina. La seva composició en aminoàcids és molt semblant a la regió terminal carboxílica de la histona H1-S de l'erició de mar, si es considera l'arginina equivalent a la lisina. La incorporació de la proteïna ϕ_0 a la cromatina té lloc

en les últimes fases de l'espermiogènesi (Casas *et al.*, 1989) i representa entorn d'un 4% de la massa de la dotació d'histones en l'espermatozoide madur. L'organització nucleosòmica de la cromatina es manté invariable durant tota l'espermatogènesi amb un DNA espaiador de 227 bp de llargària (Cornudella i Rocha, 1979). Donades les característiques fisicoquímiques de la molècula, cal pensar que la seva comesa és semblant a la de la histona H1 i probablement col·labora amb ella per conferir una major estabilitat a determinades regions de la cromatina sense alterar la seva estructura típica.

La disponibilitat d'un clon portador d'un transcrit de ϕ_0 sencer, aïllat d'una biblioteca d'expressió de cDNA, preparada a partir de la fracció poliadenilada de RNA total extret de gònades immadures i crivellada amb anticossos polivalents anti- ϕ_0 (Prats *et al.*, 1989), ha permès abordar la caracterització del gen que codifica aquesta proteïna específica per tal d'esbrinar-ne l'organització i també amb el propòsit de determinar-ne la relació i les potencials interaccions amb els gens de les histones. El cDNA clonat, d'una llargària de 441 bp, inclou una pauta de lectura contínua per a un polipèptid de setanta-set residus, la seqüència del qual coincideix amb la seqüència parcial d'aminoàcids prèviament establerta. Així mateix, la fracció poliadenilada del RNA en assaigs de traducció *in vitro* en extractes acellulars de germen de blat, dóna un producte que electroforèticament comi-gra amb la proteïna ϕ_0 . Alhora, les anàlisis de transferència de Northern detecten un mRNA de ϕ_0 homòleg a la sonda del cDNA.

El crivellatge d'una genoteca de DNA d'esperma d'*H. tubulosa* construïda emprant com a vector el bacteriòfag λ Charon 35, amb el cDNA clonat de la ϕ_0 , va produir quatre clons positius sobre 250.000 calves, de 16,5, 14,4, 13 i 14,5 kb respectivament. Els quatre

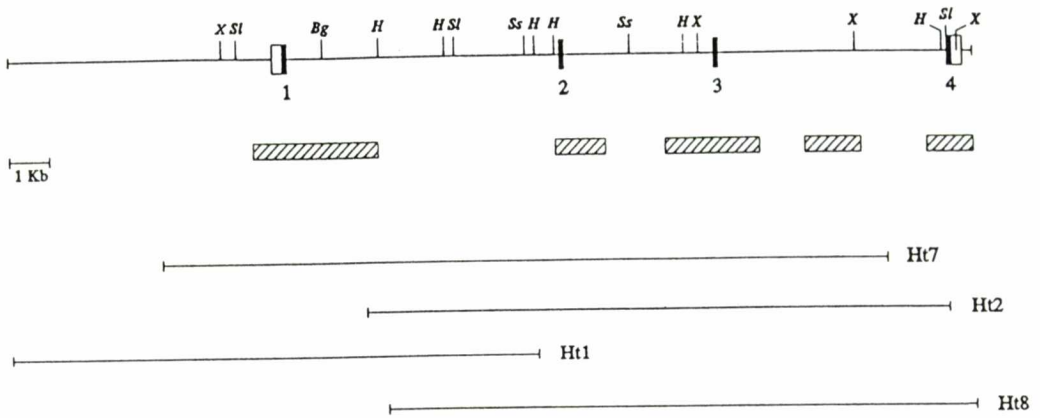


FIGURA 4. Mapa de restricció i organització del gen de la ϕ_0 d'*Holothuria tubulosa*. Els fragments de restricció portadors de seqüències del cDNA de la ϕ_0 , identificats per hibridació, van subclonar-se en el fagèmid Bluescript i van seqüenciar-se. Les caixes negres, numerades, assenyalen les posicions relatives dels exons que contenen les seqüències codificants i les caixes blanques, els trams 5' i 3' flanquejants homòlegs a les extensions no codificadores del cDNA clonat de la ϕ_0 . Les barres ratllades marquen les regions gèniques que van seqüenciar-se íntegrament. Les majúscules B, D, E, H, P, SI, Ss i X denoten les dianes de restricció *Bgl*I, *Dde*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, *Sal*I, *Sst*I i *Xba*I, respectivament. Les línies horitzontals fines marquen les posicions dels quatre clons genòmics (λ Ht 1-8) utilitzats per cartografiar el gen de la ϕ_0 .

recombinants van ser sotmesos a anàlisi de restricció i transferències de Southern utilitzant sis sondes derivades del cDNA. Els fragments de restricció portadors de seqüències corresponents a la ϕ_0 van ser subclonats i seqüenciats (Prats i Cornudella, 1995). Els resultats es mostren en la figura 4 i es poden resumir tal com s'explica tot seguit: el gen sencer de la ϕ_0 està partit en quatre seqüències exòniques distribuïdes al llarg dels inserts genòmics clonats. La superposició parcial dels quatre recombinants va permetre el seu ordenament i es va poder deduir que la seqüència codificadora del gen de la ϕ_0 de l'holotúria es troba interrompuda per tres llargues seqüències intròniques, que abasten fins a 16,2 kb. Aquests introns tan llargs determinen que el gen de la ϕ_0 sigui el de major longitud descrit fins avui per a una proteïna específica d'esperma. Aquesta organització global difereix significativament de la dels gens de les histones mancats d'introns (Maxson *et al.*, 1983a) i

també de l'arranjament dels gens de les protamines de mamífer, caracteritzats per una única seqüència intrònica (Oliva i Dixon, 1991).

La seqüència nucleotídica del gen de la ϕ_0 es mostra en la figura 5. La seqüència codificadora és discontinua i conté una pauta de lectura oberta per a una proteïna de setanta-set residus, interrompuda per tres introns amb extrems d'empalmament canònics (Jackson, 1991), específicament els comuns d'invertebrats (Fichant, 1992). Els dos primers introns, de 6,8 i 4 kb de llargària, es troben inserits dins dels codons 9 i 15 respectivament. El tercer intró, de 5,4 kb, es troba posicionat contigu al codó 41. La seqüència codificant completa del gen de la ϕ_0 és idèntica a la del clon de cDNA (Prats *et al.*, 1989), tret de sis substitucions de nucleòtids (97,9% d'homologia). D'aquestes, cinc canvis són conservatius, ja que es deuen a degeneracions de la tercera base sense alterar l'aminoàcid corresponent. L'única substitució



FIGURA 5. Seqüència del DNA de la ϕ_0 d'holotúria i els seus trams flanquejants. Es mostra la seqüència nucleotídica 5' → 3' de la cadena no transcrita (homòloga al mRNA) juntament amb la d'aminoàcids derivada de la regió codificant de la ϕ_0 . L'abreviatura *ini* i l'asterisc assenyalen les posicions respectives dels codons d'iniciació i de parada. Les extensions líder i de cua no codificadores estan numerades amb numerals negatius i positius respectivament. Els triplets codificadors es denoten amb números en cursiva. Les ratlles obliques marquen les posicions d'empalmament exó-intró. Les posicions dels elements putatius CRE, CAAT i TATA, així com els senyals de poliadenilació, es mostren amb doble subratllat.

rellevant ocorre en el codó 61 i implica el canvi d'una G per una A en la primera posició del triplet, la qual cosa causa un canvi en l'assignació d'aminoàcid: alanina en el cDNA i treonina en l'equivalent gènic. Així, l'estructura primària deduïda de la proteïna es correspon exactament amb la seqüència de la ϕ_0 especificada pel clon de cDNA, tret de l'esmentada alteració del codó 61 (98,7% d'homologia). Molt probablement aquesta diferència és deguda a polimorfismes del DNA observats en els equinoderms (Childs *et al.*, 1981) i es reflecteix en la microheterogeneïtat intraespecífica observada en moltes variants proteïques d'esperma dels invertebrats marins (Mogensen *et al.*, 1991).

La comparació de les seqüències dels trams no codificants del gen de la ϕ_0 amb les corresponents dels gens de les histones dependents de la replicació revela que el tram de la ϕ_0 no conté els motius conservats que defineixen l'estructura gènica de les histones regulades per la fase S. Així, la seqüència en forma de bucle i el tram proximal ric en purines necessaris per al processament de les extensions 3' dels transcrits de les histones (Birnstiel *et al.*, 1985) són absents. En canvi, la regió líder i la cua terminal que envolten el gen de la ϕ_0 combinen diversos elements estructurals propis de les variants de les histones independents de la replicació així com dels gens de les protamines (figura 5). La regió capdavantera del codó d'iniciació conté un motiu TATA atípic idèntic a la caixa TTCAAA identificada en el gen de la histona independent del cicle cel·lular H2A_F que codifica una variant extrema d'H2A en el pollastre, el transcrit de la qual és poliadenilat (Dalton *et al.*, 1989). Tanmateix, hi ha un altre motiu potencial TATA homòleg a l'element no-canònic TTAAAT present en els gens de la H5 de pollastre i ànec (Doenecke i Tönjes, 1984; Ruiz-Carrillo *et al.*, 1983). Un altre requeriment essencial de la transcripció per a la RNA po-

limerasa II és la seqüència CAAT, sovint posicionada entre 70 i 90 bp per davant de l'element TATA (Breathnach i Chambon, 1981). Pel que fa al cas, la regió líder del gen de la ϕ_0 mostra un potencial motiu CAAT 73 nucleòtids per davant de la caixa TTCAAA semblant a la de la H2A_F. Un altre motiu compartit amb les regions líder dels gens de les protamines és la seqüència TGACGTCA en l'extrem 5' distal del gen. Aquest element *cis*-actuant és considerat un regulador de cAMP (CRE), es troba estrictament conservat en tots els gens de les protamines i és essencial per a l'activitat biològica dels elements potenciadors regulats per cAMP (Oliva i Dixon, 1990). Atès que l'espermatogènesi en els equinoderms es troba sota control hormonal amb la implicació del cAMP (Shirai, 1986), aquest senyal regulador podria representar un nexa entre els senyals hormonaals i l'expressió de gens específics d'esperma, com és el de la proteïna ϕ_0 .

L'extensió 3' de la seqüència codificadora de la ϕ_0 està mancada dels elements estructurals conservats dels gens de les histones dependents de replicació, indispensables per a la formació dels terminals 3' dels transcrits de les histones. En canvi, s'hi troben semblances amb les regions equivalents dels gens de les protamines. Així, hi ha presents tres senyals potencials de poliadenilació. Els dos elements darrers consisteixen en dos heptàmers AAATAAA adjacents i superposats en tres nucleòtids. Aquesta seqüència heptamèrica presenta una marcada homologia amb el senyal conservat de poliadenilació que es troba en els gens de les protamines del salmó i la truita (Oliva i Dixon, 1990). Nogensmenys, la significació de les coincidències trobades entre l'organització del gen de la ϕ_0 de l'holotúria i la dels gens que codifiquen variants extremes d'histones i protamines no està encara definida.

L'arranjament estructural del gen de la ϕ_0 reproduceix amb fidelitat les característi-

ques comunes d'un bon nombre de gens d'expressió postmeiòtica. Aquests gens vénen tipificats pels que codifiquen la majoria de les proteïnes de transició histona-protamina, i pels gens de les protamines (Erickson, 1990; Hecht, 1990). Aquests gens, a més d'expressar-se deslligats de la replicació, usualment generen transcrits poliadenilats, i la majoria, encara que no tots, es troben presents en còpies úniques i contenen regions codificants sovint interrompudes per seqüències intròniques. La seva organització general esdevé divergent de la dels gens de les histones somàtiques. Les implicacions funcionals d'aquesta divergència en l'estructuració gènica resten inexplicades. Amb tot, les correlacions amb les transicions de la cromatina que acompanyen la modulació i el cessament final de l'activitat gènica durant el procés espermiogènic semblen escaients i rellevants. Per substanciar aquestes correlacions i esbrinar-ne la funcionalitat caldran nous estudis referents a la caracterització de més gens codificants de variants proteïques específiques d'esperma.

AGRAÏMENTS

Una part del treball que es descriu ha estat finançat per ajuts de la DGE (PB97-1136) i de la CIRIT de suport a grups de recerca consolidats de Catalunya (SGR97-062).

BIBLIOGRAFIA

- ALBIG, W.; MEERGANS, T.; DOENECKE, D. (1997a). «Characterization of the H1.5 gene completes the set of human H1 subtype genes». *Gene*, núm. 184, pàg. 141-148.
- ALBIG, W.; KIOSCHIS, P.; POUSTKA, A.; MEERGANS, K.; DOENECKE, D. (1997b). «Human histone gene organization: nonregular arrangement within a large cluster». *Genomics*, núm. 40, pàg. 314-322.
- ALLAN, J.; MITCHELL, T.; HARBORNE, N.; BOHM, L.; CRANE-
- ROBINSON, C. (1986). «Roles of H1 domains in determining higher order chromatin structure and H1 location». *J. Mol. Biol.*, núm. 187, pàg. 591-601.
- AUSIÓ, J. (1986). «Structural variability and compositional homology of the protamine-like components of the sperm from the bivalve molluscs». *Comp. Biochem. Physiol.*, núm. 85B, pàg. 439-449.
- AUSIÓ, J.; VAN HOLDE, K. E. (1988). «The histones of the sperm from *Spissula solidissima* include a novel cysteine-containing H1 histone». *Cell Differentiation*, núm. 23, pàg. 175-190.
- AZORIN, F.; OLIVARES, C.; JORDAN, A.; PÉREZ-GRAU, L.; CORNUDELLA, LL.; SUBIRANA, J.A. (1983). «Heterogeneity of the histone-containing chromatin in the sea cucumber spermatozoa». *Exptl. Cell Res.*, núm. 148, pàg. 331-344.
- BAVYKIN, S. G.; USACHENKO, S. I.; ZALENSKY, A. O.; MIRZABEKOV, A. D. (1990). «Structure of nucleosomes and organization of internucleosomal DNA in chromatin». *J. Mol. Biol.*, núm. 212, pàg. 495-511.
- BIRNSTIEL, M. L.; BUSSLINGER, M.; STRUB, K. (1985). «Transcription termination and 3' processing: the end is in site». *Cell*, núm. 41, pàg. 349-359.
- BLOCH, D. P. (1976). «Histones of Sperm». A: King, R. C. (ed.). *Handbook of Genetics*. Nova York, Plenum Press, pàg. 137-167.
- BREATHNACH, R.; CHAMBON, P. (1981). «Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins». *Annu. Rev. Biochem.*, núm. 50, pàg. 349-383.
- BRETZEL, G. (1972). «Über Thynnin, das Protamin des Thunfisches». *Hoppe Seyler's-Zentralblatt Physiologische Chemie*, núm. 353, pàg. 933-943.
- BUSSLINGER, M.; PORTMANN, R.; IRMINGER J. C.; BIRNSTIEL, M. L. (1980). «Ubiquitous and gene specific regulatory 5' sequences in a sea urchin histone DNA clone coding for histone protein variants». *Nucleic Acids Res.*, núm. 8, pàg. 957-977.
- CASAS, M. T.; MURA, C. V.; SUBIRANA, J. A.; CORNUDELLA, LL. (1989). «Purification and immunocytolocalization of protein ϕ_0 from sperm cells of the echinoderm *Holothuria tubulosa*». *Exptl. Cell Res.*, núm. 182, pàg. 14-25.
- COHN, R. H.; KEDES, L. H. (1979). «Nonallelic histone gene clusters of individual sea urchins (*Lytechinus pictus*): mapping of homologies in coding and spacer DNA». *Cell*, núm. 18, pàg. 855-864.
- COLE, R.D. (1984). «A minireview of microheterogeneity in H1 histone and its possible significance». *Anal. Biochem.*, núm. 136, pàg. 24-30.
- COLES, L. S.; WELLS, J. R. E. (1985). «An H1 histone gene-specific 5' element and evolution of H1 and H5 genes». *Nucleic Acids Res.*, núm. 13, pàg. 585-594.
- COLES, L. S.; ROBINS, A. J.; MADLEY, L. K.; WELLS, J. R. E. (1987). «Characterization of the chicken histone H1 gene complement». *J. Biol. Chem.*, núm. 262, pàg. 9656-9663.
- COOL, D.; BANFIELD, D.; HONDA, B. M.; SMITH, M. J. (1988).

- «Histone genes in three sea star species: cluster arrangement, transcriptional polarity and analyses of the flanking regions of H3 and H4 genes». *J. Mol. Evol.*, núm. 27, pàg. 36-44.
- CHALLONER, P. B.; MOSS, S. B.; GROUDINE, M. (1989). «Expression of replication-dependent histone genes in avian spermatids involves an alternate pathway of mRNA 3'-end formation». *Mol. Cell Biol.*, núm. 9, pàg. 902-913.
- CHILDS, G.; MAXSON, R.; COHN, R.; KEDES, L. (1981). «Orphans: dispersed genetic elements derived from tandem repetitive genes of eukaryotes». *Cell*, núm. 23, pàg. 651-663.
- D'ANDREA, R.; COLES, L. S.; LESNIKOWSKI, C.; TABE, L.; WELLS, J. R. E. (1985). «Chromosomal organization of chicken histone genes: preferred association and inverted duplications». *Mol. Cell Biol.*, núm. 5, pàg. 3108-3115.
- DALTON, S.; WELLS, J. R. (1988). «A gene-specific promoter element is required for optimal expression of the histone H1 gene in S-phase». *EMBO J.*, núm. 7, pàg. 49-56.
- DALTON, S.; ROBINS, A. J.; HARVEY, R. P.; WELLS, J. R. E. (1989). «Transcription from the intron-containing chicken histone H2A_F gene is not S-phase regulated». *Nucleic Acids Res.*, núm. 17, pàg. 1745-1756.
- DEL GAUDIO, R.; POTENZA, N.; STEFANONI, P.; CHIUSANO, M. L.; GERACI, G. (1998). «Organization and nucleotide sequence of the cluster of five histone genes in the polychaete worm *Chaetopterus variopedatus*: first record of a H1 histone gene in the phylum annelida». *J. Mol. Evol.*, núm. 46, pàg. 64-73.
- DIXON, G. H.; SMITH, M. (1968). «Nucleic acids and protamine in salmon testes». *Prog. Nucleic Acids Res.*, núm. 8, pàg. 9-34.
- DOENECKE, D.; TÖNJES, R. (1984). «Conserved dyad symmetry structures at the 3' end of the H5 histone genes». *J. Mol. Biol.*, núm. 178, pàg. 121-135.
- DRABENT, B.; LOUROUTZIATIS, A.; PRATS, E.; CORNUDELLA, L.L.; DOENECKE, D. (1995a). «Structure of histone H2B and H4 genes of the sea cucumber *Holothuria tubulosa*». *DNA Sequence*, núm. 6, pàg. 41-45.
- DRABENT, B.; FRANKE, K.; BODE, C.; KOSCISSA, U.; BOUTERFA, H.; HAMEISTER, H.; DOENECKE, D. (1995b). «Isolation of two murine H1 histone genes and chromosomal mapping of the H1 gene complement». *Mamm. Genome*, núm. 6, pàg. 505-511.
- DRABENT, B.; KIM, J. S.; ALBIG, W.; PRATS, E.; CORNUDELLA, L.L.; DOENECKE, D. «*Mytilus edulis* histone gene clusters containing only H1 genes». *J. Mol. Evol.* [En premsa]
- ERICKSON, R. P. (1990). «Postmeiotic gene expression». *Trends Genet.*, núm. 6, pàg. 264-269.
- FICHANT, G. A. (1992). «Constraints acting on the exon positions of the splice site sequences and local amino acid composition of the protein». *Hum. Mol. Genet.*, núm. 1, pàg. 259-267.
- GROUDINE, M.; CONKIN, K. F. (1985). «Chromatin structure and *de novo* methylation of sperm DNA: implications for activation of the paternal genome». *Science*, núm. 228, pàg. 1061-1068.
- HECHT, N. B. (1990). «Regulation of haploid expressed genes in male germ cells». *J. Reprod. Fertility*, núm. 88, pàg. 679-693.
- HEINTZ, N.; ZERNIK, M.; ROEDER, R. G. (1981). «The structure of the human histone genes: clustered but not tandemly repeated». *Cell*, núm. 24, pàg. 661-668.
- HENTSCHEL, C. C.; BIRNSTIEL, M. L. (1981). «The organization and expression of histone gene families». *Cell*, núm. 25, pàg. 301-313.
- HILL, C. S.; THOMAS, J. O. (1990). «Core histone-DNA interactions in sea urchin sperm chromatin. The N-terminal tail of H2B interacts with linker DNA». *Eur. J. Biochem.*, núm. 187, pàg. 145-153.
- HILL, C. S.; RIMMER, J. M.; GREEN, B. N.; FINCH, J. T.; THOMAS, J. O. (1991). «Histone-DNA interactions and their modulation by phosphorylation of Ser-Pro-X-Lys/Arg-motifs». *EMBO J.*, núm. 10, pàg. 1939-1948.
- HOWELL, A. M.; COOL, D.; HEWITT, J.; YDENBERG, B.; SMITH, M. J.; HONDA, B. M. (1987). «Organization and unusual expression of histone genes in the sea star *Pisaster ochraceus*». *J. Mol. Evol.*, núm. 25, pàg. 29-36.
- JACKSON, I. J. (1991). «A reappraisal of non-consensus mRNA splice sites». *Nucleic Acids Res.*, núm. 19, pàg. 3795-3798.
- KASINSKY, H. E.; HUANG, S. Y.; MANN, M.; ROCA, J.; SUBIRANA, J. A. (1985). «On the diversity of sperm histones in the vertebrates. IV. Cytochemical and amino acid analysis in Anura». *J. Exptl. Zool.*, núm. 234, pàg. 33-46.
- KEDES, L. H. (1979). «Histone genes and histone messengers». *Annu. Rev. Biochem.*, núm. 48, pàg. 837-870.
- KISTLER, W. S.; GEROCI, M. E.; WILLIAMS-ASHMAN, H. G. (1973). «Specific basic proteins from mammalian testes: isolation and properties of small, basic proteins from rat testes and epididymal spermatozoa». *J. Biol. Chem.*, núm. 248, pàg. 4532-4543.
- KLEENE, K. C.; FLYNN, J. F. (1987). «Characterization of a cDNA clone encoding the basic protein TP2, involved in chromatin condensation during spermiogenesis in the mouse». *J. Biol. Chem.*, núm. 262, pàg. 17272-17277.
- LUERSSSEN, H.; HOYER-FENDER, S.; ENGEL, W. (1989). «The nucleotide sequence of a rat transition protein 2 (TP2) cDNA». *Nucleic Acids Res.*, núm. 17, pàg. 3585.
- MARTINELLI, R.; HEINTZ, N. (1994). «HITF2A, the large subunit of a heterodimeric, glutamine-rich CCAAT-binding transcription factor involved in histone H1 cell cycle regulation». *Mol. Cell Biol.*, núm. 14, pàg. 8322-8332.
- MAXSON, R.; COHN, R.; KEDES, L.; MOHUN, T. (1983a). «Expression and organization of histone genes». *Annu. Rev. Genetics*, núm. 17, pàg. 239-277.

- MAXSON, R.; MOHUN, T.; GORMEZANO, G.; CHILDS, G.; KEDES, L. (1983b). «Distinct organization and pattern of expression of early and late histone gene sets in the sea urchin». *Nature*, núm. 301, pàg. 120-125.
- MAXSON, R.; MOHUN, T.; GORMEZANO, G.; KEDES, L. H. (1987). «Evolution of late H2A, H2B and H4 histone genes of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*». *Nucleic Acids Res.*, núm. 15, pàg. 10569-10582.
- MEZQUITA, J.; CONNOR, W.; WINKFEIN, R. J.; DIXON, G. H. (1985). «An H1 histone gene from rainbow trout (*Salmo gairdneri*)». *J. Mol. Evol.*, núm. 21, pàg. 209-219.
- MILLER, D. J.; HARRISON, P. L.; MAHONY, T. J.; McMILLAN, J. P.; MILES, A.; ODORICO, D. M.; LOHUIS, M. R. (1993). «Nucleotide sequence of the histone gene cluster in the coral *Acropora formosa* (Cnidaria, Scleractinia). Features of histone gene structure and organization are common to diploblastic and triploblastic metazoans». *J. Mol. Evol.*, núm. 37, pàg. 245-253.
- MOGENSEN, C.; CARLOS, S.; AUSIÓ, J. (1991). «Microheterogeneity and interspecific variability of the nuclear sperm proteins from *Mytilus*». *FEBS Lett.*, núm. 282, pàg. 273-276.
- NAKANO, M.; TOBITA, T.; ANDO, T. (1970). «Fractionation of galline, a protamine from fowl sperm, and some characterization of the components». *Biochem. Biophys. Acta*, núm. 207, pàg. 553-555.
- OLIVA, R.; DIXON, G. H. (1990). «Vertebrate protamine gene evolution. I. Sequence alignments and gene structure». *J. Mol. Evol.*, núm. 30, pàg. 333-346.
- OLIVA, R.; DIXON, G. H. (1991). «Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction». *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.*, núm. 40, pàg. 25-94.
- OLIVARES, C.; RUIZ, S.; CORNUDELLA, LL. (1986). «Characterization of histone and protamine variants in sperm of the bivalve mollusc *Aulacomya ater*». *FEBS Lett.*, núm. 205, pàg. 195-199.
- OVERTON, G. C.; WEINBERG, E. S. (1978). «Length and sequence heterogeneity of the histone gene repeat unit of sea urchin, *S. purpuratus*». *Cell*, núm. 14, pàg. 247-254.
- PALAU, J.; RUIZ-CARRILLO, A.; SUBIRANA, J. A. (1969). «Histones from the sperm of the sea urchin *A. lixula*». *Eur. J. Biochem.*, núm. 7, pàg. 209-213.
- PHELAN, J. J.; SUBIRANA, J. A.; COLE, R. D. (1972). «An unusual group of lysine-rich histones from gonads of the sea cucumber *Holothuria tubulosa*». *Eur. J. Biochem.*, núm. 31, pàg. 63-68.
- POCCIA, D. (1986). «Remodelling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization and early development». *Int. Rev. Cytol.*, núm. 105, pàg. 1-65.
- PRATS, E.; CORNUDELLA, LL. (1995). «The gene encoding the sperm-specific basic nuclear protein ϕ , from sea cucumber». *Mém. Mus. Natn. His. Nat.*, núm. 166, pàg. 491-500.
- PRATS, E.; CORNUDELLA, LL.; RUIZ-CARRILLO, A. (1989). «Nucleotide sequence of a cDNA for ϕ , a histone-to-protamine transition protein from sea cucumber spermatozoa». *Nucleic Acids Res.*, núm. 17, pàg. 10097.
- ROBERTS, S. B.; SANICOLA, M.; EMMONS, S. W.; CHILDS, G. (1987). «Molecular characterization of the histone gene family of *Caenorhabditis elegans*». *J. Mol. Biol.*, núm. 196, pàg. 27-38.
- RUIZ-CARRILLO, A.; AFFOLTER, M.; RENAUD, J. (1983). «Genomic organization of the genes coding for the six main histones of the chicken: complete sequence of the H5 gene». *J. Mol. Biol.*, núm. 170, pàg. 843-859.
- SCHULZE, E.; SCHULZE, B. (1995). «The vertebrate linker histones H1^o, H5, and H1M are descendants of invertebrate «orphon» histone H1 genes». *J. Mol. Evol.*, núm. 41, pàg. 833-840.
- SELLOS, D.; KRAWETZ, S. A.; DIXON, G. H. (1990). «Organization and complete nucleotide sequence of the core histone gene cluster of the annelid *Platynereis dumerilii*». *Eur. J. Biochem.*, núm. 190, pàg. 21-29.
- SHIRAI, H. (1986). «Gonad-stimulating and maturation-inducing substance». *Meth. Cell Biol.*, núm. 27, pàg. 73-88.
- SINGH, J.; RAO, M. R. S. (1987). «Interaction of rat testis protein, TP, with nucleic acids *in vitro*». *J. Biol. Chem.*, núm. 262, pàg. 734-740.
- STEPHENSON, E.; ERBA, H.; GALL, J. (1981). «Characterization of a cloned histone gene cluster of the newt *Notophthalmus viridescens*». *Nucleic Acids Res.*, núm. 9, pàg. 2281-2295.
- SUBIRANA, J. A. (1970). «Nuclear proteins from a somatic and a germinal tissue of the echinoderm *Holothuria tubulosa*». *Exptl. Cell Res.*, núm. 63, pàg. 253-260.
- SUBIRANA, J. A.; COZCOLLUELA, C.; PALAU, J.; UNZETA, M. (1973). «Protamines and other basic proteins from spermatozoa of molluscs». *Biochem. Biophys. Acta*, núm. 317, pàg. 364-379.
- SURES, I.; LOWRY, J.; KEDES, L. H. (1978). «The DNA sequence of sea urchin (*S. purpuratus*) H2A, H2B and H3 histone coding and spacer regions». *Cell*, núm. 15, pàg. 1033-1044.
- VON HOLT, C. (1986). «Histones in perspective». *BioEssays*, núm. 3, pàg. 120-124.
- WANG, Z. F.; SIROTKIN, A. M.; BUCHOLD, G. M.; MARZLUFF, W. F. (1997). «The mouse histone H1 genes: gene organization and differential regulation». *J. Mol. Biol.*, núm. 271, pàg. 124-138.
- WELLS, D.; MCBRIDE, C. (1989). «A comprehensive compilation and alignment of histones and histone genes». *Nucleic Acids Res.*, núm. 17, pàg. 311-346.
- WOLFFE, A. (1992). «Chromatin: Structure and Function». Londres, Academic Press, pàg. 1-213.
- ZWEIDLER, A. (1984). «Core histone variants of the mouse». A: G.S. Stein; Stein, J.L.; Marzluft, W.F. (ed.) *Histone Genes*. Nova York: Wiley & Sons, pàg. 339-372.