

TESI DOCTORAL

Fina Martínez Soler

Nucleomorfogènesi espermàtica i condensació de la cromatina dels Cefalòpodes *Sepia officinalis* i *Octopus vulgaris*.
Altres models.

Juliol, 2007

PART II: LA PROTEÏNA ϕ_0
D'HOLOTHURIA TUBULOSA

I. INTRODUCCIÓ

PART II: LA PROTEÏNA PHI 0

I. INTRODUCCIÓ

I.1.- SNBPs: Grups principals

Durant els últims estadis de l'espermatogènesi la cromatina de la gran majoria d'organismes es condensa a mesura que les histones somàtiques de les espermàtides són reemplaçades per les SNBPs. (Sperm Nuclear Basic Proteins). Aquest reemplaçament pot ser total o parcial depenent de l'espècie.

Les SNBPs constitueixen un grup molt heterogeni de proteïnes que hi formen part desde les histones (tipus H) a les típiques protamines (tipus P). Les SNBPs de tipus H estan relacionades (en quan a composició i estructura) amb les histones somàtiques, i inclou variants específiques de l'espermatozoide, principalment de la histona H1 i H2B (spH1 i spH2B respectivament), com és el cas dels equinoderms (Zalenskaya, I.A. et al., 1980a; 1980b; Poccia, 1995). El grup de SNBP de tipus P, les protamines, consisteix en un grup de proteïnes molt bàsiques (riques en Arginina) i de poc pes molecular (entre 4.000 i 10.000Da aproximadament). Les protamines desplacen a la majoria de les histones somàtiques en el decurs de l'espermatogènesi, i són les principals proteïnes que interaccionen amb la cromatina de l'espermatozoide.

També hi ha un tercer grup d'SNBPs, les anomenades de "protamine-like" (tipus PL), que presenten una composició aminoacídica intermitja a la de les histones i les protamines: el seu contingut en Arginina + Lisina representa entre el 35-50%mol de la molècula (Ausió, 1995). Al igual que les protamines, les PL desplacen a histones somàtiques durant l'espermogènesi.

I.2.- Les PL són proteïnes relacionades amb la Histona H1

Totes les PL estudiades fins al moment, estan molt relacionades amb la família de la histona H1. La proteïna PL-I del molusc bivalve *Spisula solidissima* va ser primer estudiada per Bloch per a la classificació de les SNBPs (Bloch, 1969) i per Ausió, 2004: al igual que una histona H1, PL-1 d'*S.solidissima* conté un domini globular resistent a la

I.INTRODUCCIÓ

digestió amb tripsina i presenta similitud en la seqüència amb una histona H1. *Mytilus* sp. (també molusc bivalve) en l'espermatozoide presenta principalment tres PLs: PL-II, PL-III, i PL-IV; PL-II i PL-IV són el resultat d'una deleció post-transcripcional de PL-I on s'ha eliminat la part globular de la molècula (Fig.BI.1.A i B) (Carlos et al., 1993), mentre que PL-III prové d'un gen independent. Sembla doncs, que la tendència evolutiva de les SNBPs en els bivalves és generar proteïnes més petites i més bàsiques i riques en Arginina (PL-II i PL-IV) a partir d'una PL ancestral (PL-I) relacionada amb la histona H1.

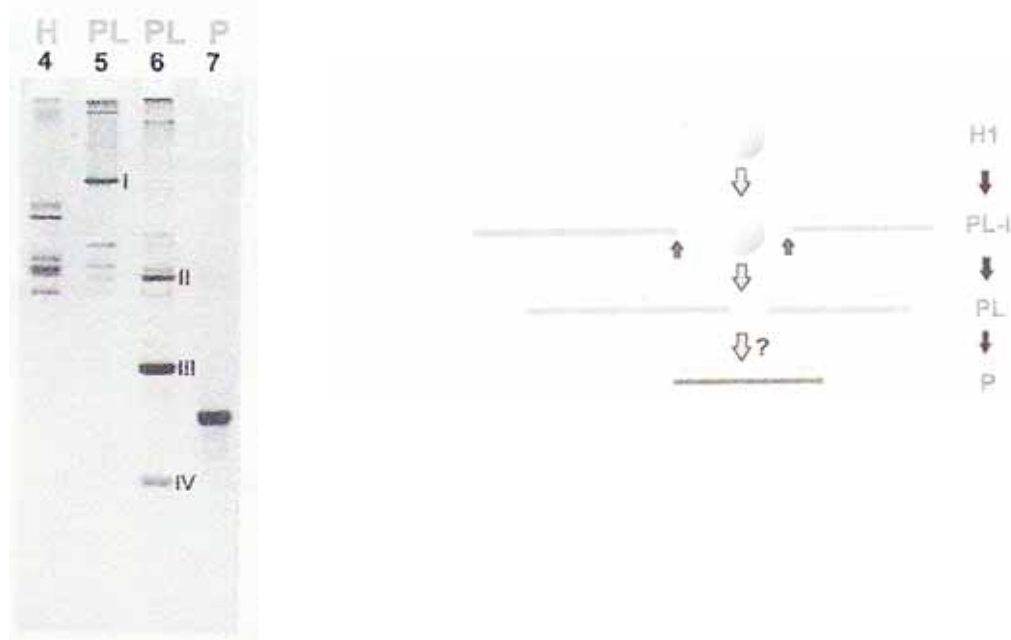


Fig.BI.1: Gel acètic (5%)-urea (2.5M) de les SNBPs d'alguns invertebrats. (Ausió, J. 1999). A; 4: *Crassostrea gigas* (Ostra, Filum: Mol.lusc Classe: Bivalve). 5: *Spisula solidissima* (Filum: Molusc classe: Bivalve). 6: *Mytilus californianus*.(Filum: Molusc, classe: Bivalve). 7: *Loligo pealei* (calamar, Filum: molusc, Classe Siphonopoda (Cefalòdpode). I, II,III, IV representen PL-i, PL-II, PL-III, PL-IV respectivament. B: Modificacions post-transcripcionals de la PL-I. Aquestes modificacions donen lloc a PLs més petites i més bàsiques, sense el domini globular característic de la histona H1. Potser també altres mecanismes (com *splicing* alternatiu.....) poden acabar donant lloc a les Protamines més riques encara en Arginina.

En els cordats, l'origen de les protamines es troba a partir d'una histona H1 específica de l'espermatozoide rica en l'aminoàcid lisina: *Ciona intestinalis* i *Styela montereyensis* són dues espècies de tunicats. *Styela montereyensis* en l'espermatozoide madur presenten dues proteïnes relacionades amb la PL-I: P1 i P2 (Fig.BI.2A). La seqüència aminoacídica d'aquestes proteïnes (Fig. I.2B i C) indica que P2 és exactament l'extrem C-terminal de P1. Addicionalment P2 presenta un elevat contingut en Arginina (58%mol.) característic d'una protamina. *Ciona intestinalis* en canvi, només té en el nucli de l'espermatozoide la forma no processada de la SNBP: P1 (Lewis et al., 2004).

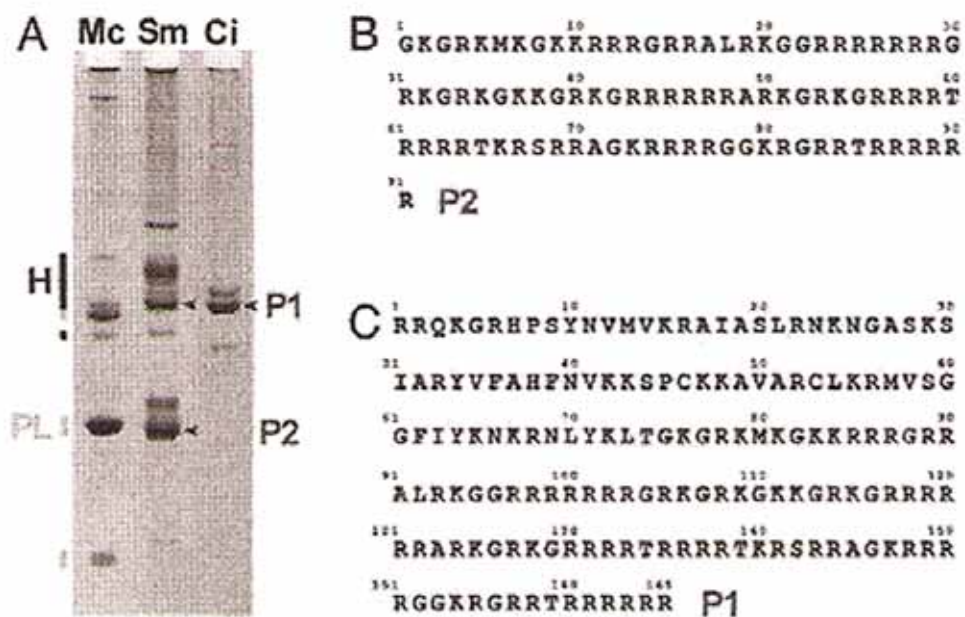


Fig.BI.2: A: Gel acètic (5%) Urea (2.5M). Les SNBPs dels tunicats *Styela montereyensis* (Sm), *Ciona intestinalis* (Ci) i *Mytilus californianus* (Mc) com a marcador d'histones i PL. Fletxes: Indiques les SNBPs estudiades dels tunicats. **B:** Seqüència de la Ps de *S. plicata*. **C:** Seqüència de P1 de *S. plicata*.

I.INTRODUCCIÓ

La comparació dels gens de la SNBP P1 d'aquestes dues espècies de tunicats (*Ciona intestinalis* i *Styela montereyensis*) indica que la P1 de *Ciona intestinalis* presenta una seqüència aminoacídica similar a la de *Styela montereyensis* excepte que en l'extrem C-terminal, en lloc de ser rica en Arginina és rica en Lisina (Fig.BI.3)

L'anàlisi acurat de nucleòtids indica com la transició de la PL rica en Lisina a una PL rica en Arginina és resultat d'un canvi de pauta de lectura en el domini C-terminal d'aquestes molècules. (Fig.BI.3) (Lewis et al., 2004). D'aquesta manera la transició d'una PL-I rica en Lisina a una PL-I rica en Arginina hauria tingut lloc molt ràpidament, possiblement en el moment de la modificació post-transcripcional (FigBI.3).

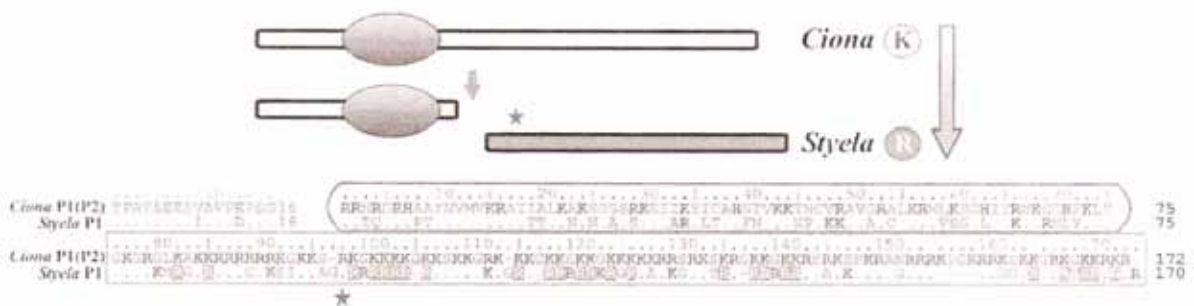


Fig.BI.3: Diferenciació de la P1 rica en Lisina de *C.intestinalis* com a conseqüència d'una mutació en la pauta de lectura. La mutació vatenir lloc en el punt que indica l'estrella de l'extrem C-terminal de P1 precursora de *Ciona intestinalis*. Els alineaments es mostren a sota. La fletxa indica el lloc de tall en la modificació post-transcripcional.

I.3.- SNBPs de l'equinoderm *Holothúria tubulosa*. La proteïna phi0.

La composició i estructura de la cromatina espermàtica d' *Holothúria tubulosa*, ha estat extensament estudiada: les proteïnes de l'espermatozoide d'*Holothúria tubulosa* consisteixen en la dotació completa de les histones somàtiques més una proteïna específica de mobilitat electroforètica més ràpida anomenada proteïna phi 0 (Φ_0) (Subirana, 1970). Tampoc hi ha la presència de proteïnes del grup de HMGs en el nucli de l'espermatozoide (Azorín et al., 1983).

L'ADN en l'espermatozoide, manté l'organització en nucleosomes (Cornudella & Rocha, 1979; Azorín, F. et al., 1985). La proteïna phi0 s'incorpora al nucli de les espermàtides en les últimes fases de l'espermioogènesi, i s'acumula en l'espermatozoide madur; representa un 4% del total de les SNBPs presents en el nucli. (Subirana, 1970; Casas et al., 1989). La funció de Phi 0 en l'espermatozoide és similar a la funció de la histona H1, i la seva presència en el nucli sembla disminuir la solubilitat de la cromatina. (Azorín et al., 1983),

La proteïna específica de l'espermatozoide d'*holothúria tubulosa* (phi0), presenta unes característiques intermitjtes entre les histones somàtiques i les protamines. Es tracta d'una proteïna petita, de 78 aminoàcids (8640 Da, (Ausió & Subirana, 1982) bàsica, rica en els Arginina i Lisina (Arg+Lys= 34 residus). Aquesta composició aminoacídica presenta similituds amb l'extrem C-terminal d'una histona H1.

La seqüència de cDNA va ser determinada l'any 1989 (Prats, et al., 1989), a través d'una llibreria específica de la gònada (Fig.BI4). El transcrypt de phi0 és poliadenilat i la regió codificant codifica per 77 aminoàcids (8550Da) .

Prats & Cornudella, 1995, varen clonar i caracteritzar el gen que codifica per a la proteïna específica de l'espermatozoide d'*Holothúria tubulosa* (Fig.BIII.1 capítol de Resultats): en el genoma el gen es troba en una sola còpia, i presenta tres introns que separen els 4 exons que codifiquen per la proteïna. Els introns són inusualment llargs (6.8, 4 i 5.4Kb respectivament), interrompint la zona codificant en 16.2Kb en total, característiques que fan del gen de la phi 0 el més llarg descrit fins al moment per a una proteïna específica de l'espermatozoide.

I.INTRODUCCIÓ

```
tcccccttgtgtcggaattccaactacaatcaataatc ATG GTA GCC AGA CGA CAA ACA AAG 63
M V A R R Q T K
AAA GCT AGG AAG CCT GCA GCC AGG AGA CGC AGC GCA GCC AAA CGC GCA GCC CCA 117
K A R K P A A R R R S A A K R A A P
GCT GCG AAG AAA GCG GCG AGT CGC CGT CGT CCA AAG AGT GCT AAG AAG GCT AAG 171
A A K K A A S R R R P K S A K K A K
CCC GCA GCA AGG AGA CGC AGC AGC GTC AAA CCT AAA GCA GCA AAA GCA GCC GCC 225
P A A R R R S S V K P K A A K A A A
CAA GTC CGT CGC AGG AGC CGA CGA ATT CGC CGT GCG TCC GTG TCA AAG TAA tcc 279
Q V R R R S R R I R R A S V S K end
aatggaagactgatcattaaatcgtaacccttcaaaagactaaatttattaatttttagttttgtagaact 350
gtccaaattttctagaatattgcagaactgaacatttaaaacacatccaaattcgtaagcgaacaagcaag 421
caacgatgacctacaaaaaa 441
```

Fig.BI.4: Seqüència de cDNA de la phi 0. (Prats et al, 1989).

II.OBJECTIUS

OBJECTIUS DEL TREBALL

PART II:

Aquest treball consta d'una segona part on hem estudiat una proteïna específica de l'espermatozoide de l'Equinoderm *Holothúria tubulosa*. L'objectiu principal ha estat:

- I. Estudiar, amb propòsits evolutius, l'estructura del gen de la proteïna phi0 i comparar els resultats obtinguts amb estudis previs.

III. MATERIAL I MÈTODES

III. MATERIAL I MÈTODES

III.1.- Material biològic

III.1.1.- Descripció de les espècies estudiades

Una segona espècie estudiada en aquest treball és la *Holothúria tubulosa*, es tracta d'un Equinoderm, que pertany a la Classe dels Holoturoïdeus (*Holoturoidea*), anomenat també cogombre de mar.

Els Equinoderms

Els equinoderms són animals exclusivament marins, que formen part d'una important fauna bentònica de qualsevol tipus de fons i fondària. Són un grup d'animals sense capacitat de regulació osmòtica del seu medi intern, amb el qual la concentració salina interna depèn exclusivament del medi aquós que els envolta.

En el tegument, té una epidermis ciliada contínua per tot el cos. Els microcorrents que crea són per una banda per poder-se alimentar i per l'altre per respirar. Tots els equinoderms es caracteritzen per la presència d'un exoesquelet calcari més o menys desenvolupat.

El sistema digestiu és complet, amb boca, esòfag, estómac, intestí, recte i anus. El sistema nerviós està constituït per tres anells al voltant de l'eix oral-aboral. Els òrgans dels sentits estan poc desenvolupats, encara que es coneix bé la capacitat de resposta dels Equinoderms davant de senyals tàctils, químiques i lluminoses.

Holothúria tubulosa

La *Holothúria* té el cos allargat i cilíndric, on la boca ocupa l'extrem anterior, i l'anus el posterior. El seu cos, pot medir des de menys d'1 cm fins a més d'1 metre. El seu hàbitat sol ser prop de zones costeres entre 5-30metres de profunditat. Una característica particular de la classe Holothuroidea és l'absència de simetria radial (a diferència de les classes Asteroïdea (estrelles de mar) i Echinoidea (eriçons de mar)).

III.MATERIAL I MÈTODES

Comportament sexual de les *Holothúries*

Els sexes són separats, però no hi ha cap mena de dimorfisme sexual extern, així per saber el sexe de l'espècie fa falta la seva dissecció i identificar-ne el color de les gònades. Les femelles tenen les gònades d'un to taronja intens, mentre que els mascles presenten en un to més rosat.

L'època de l'any en què les *Holothúries* es troben madures sexualment s'inicia al mes de maig i arriba al màxim durant els mesos de Juliol-Agost, quan la temperatura de l'aigua de mar és més càlida. Els espermatozoides són expulsats al medi a través de descàrregues molt puntuals i concentrades. Els gàmetes (masculins i femenins) es dispersen pel medi gràcies a les corrents marines, la fecundació és per tant externa. A partir del moment en què els òvuls són fecundats, es crea una capa protectora a la membrana oocitària que inhibeix l'entrada d'un segon espermatozoide.

La fecundació de les *Holothúries* és externa i presenten un desenvolupament indirecte, és a dir que el seu desenvolupament passa per estadis larvaris abans d'esdevenir adult.

Recol·lecció de material i dissecció en el laboratori

Per a la recol·lecció d'*Holothúria tubulosa* ens vàrem desplaçar a Port de la Selva (Costa Brava) a finals del mes de Juliol, moment en què les gònades es troben en el seu punt màxim de maduresa, a punt d'alliberar els gàmetes al medi. Immediatament després de la recol·lecció es varen transportar els animals en aigua de mar al laboratori, per processar les mostres.

La gònada d'*Holothúria* està localitzada en la part anterior del celoma, constituïda per molts túbuls que s'uneixen entre ells formant un gonoducte que desemboca en el gonopor. Quan aquesta es troba madura ocupa la gran majoria de la cavitat celòmica de l'animal. La obtenció de gònades es va realitzar doncs, fent una fissura ventral en l'eix antero-posterior (boca-anus), i les gònades s'alliberaren immediatament. La Fig.BII.1 mostra una imatge on es pot veure la organització interna d'aquesta espècie.

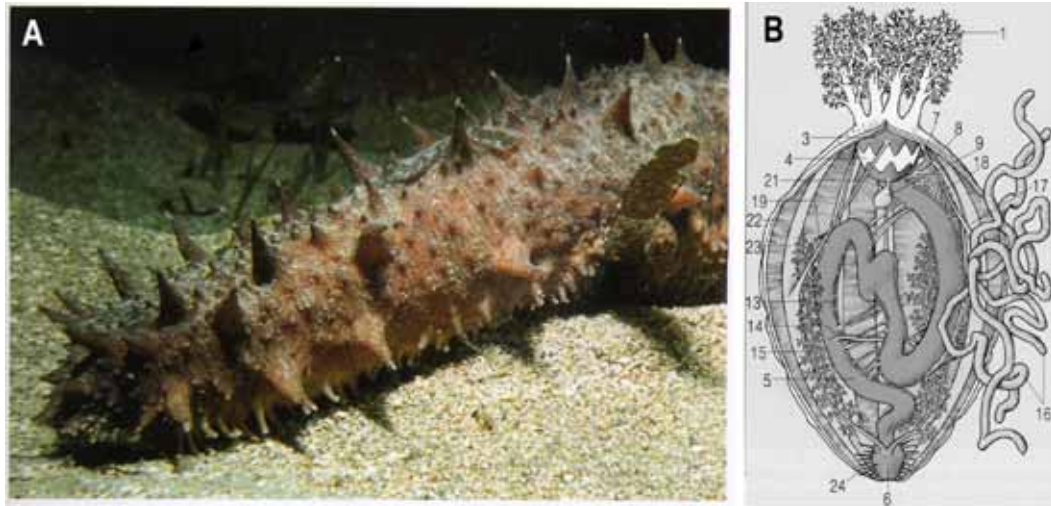


Fig.BII.1: **A:** Fotografia d'*Holothúria tubulosa*. **B:** Organització interna d' *Holothúria tubulosa*, en el dibuix la gònada es troba a la dreta de la imatge (nº6), i quan l'animal està sexualment madur, ocupa la major part del celoma.

Per a l'extracció d'RNA de les gònades es va treballar en tot moment amb material esterilitzat i es va disgregar i homogenitzar el teixit molt bé amb Trizol (Amersham Biosciences) i es varen guardar a -80°C fins a la seva utilització.

Per a l'estudi de proteïnes es va homogenitzar teixit gonadal en sacarosa 0.25M, TrisHCl 10mM pH 7.4, MgCl_2 3mM, CaCl_2 5mM i Clorur de benzamidina en fresc 50mM. i es va guardar a -20°C amb glicerol al 40% fins al seu processament.

Adicionalment, per la comparació en la composició de les proteïnes nuclears espermàtiques (SNBPs) de la *Holothúria tubulosa* amb altres Equinoderms, es van agafar dues espècies representatives de dues Classes diferents d'Equinoderms: *Pisaster ochraceus*, que pertany a la Classe dels equinoideus (Cl. Echinoidea)(eriçons de mar), i *Strongylocentrotus purpuratus* , una estrella de mar que pertany a la Classe dels Asteroideus (*Asteroidea*).

III.MATERIAL I MÈTODES

Per la purificació, obtenció de nuclis espermàtics i extracció de les SNBPs dels equinoderms: *Strongylocentrotus purpuratus* (Eriçó de mar), *Pisaster ochraceus* (estrella de mar) i *Holothúria tubulosa* (Holothúria) es varen seguir els mateixos passos descrits per a *Sepia officinalis*.

III.2.-Anàlisi d'RNA

III.2.1.-Extracció d'RNA a partir de teixit

Per l'estudi del gen de la phi0 d' *Holothúria tubulosa* es va partir de gònades madures i fresques, i immediatament després de la dissecció es va procedir a l'extracció de l'RNA del teixit.

En tot moment es va treballar amb material esterilitzat i amb guants.

1.- Primer vàrem homogenitzar uns 100mg de teixit i disgregar molt bé en 1 ml de TRIzol (Invitrogen), utilitzant una ganvieta esterilitzada.

2.- Després es va afegir 200µl de cloroform i sacsejar molt fortament la mescla. Es deix reposar la mostra entre 5 i 10 min. damunt la poiata, i centrifuguem,

3.- a 12.000rpm a 4°C durant 15min. Després de la centrifugació, tenim dues fases, la superior, blanca i transparent amb l'ARN dissolt, i la capa inferior rojenca de fenol/cloroform separades per una interfase. Amb molta cura de no tocar la interfase, traslladem amb una pipeta la fase superior a un eppendorf net i procedim amb la precipitació de l'ARN.

4.- Afegim al sobrenedant 1ml d'isopropanol. Sovint al afegir l'isopropanol la solució adopta una textura gelatinosa indicant la presència de l'RNA. Deixem la mostra que precipiti a -80°C durant 2 hores aproximadament.

Nota: En aquest pas de l'extracció es pot deixar la mostra a -80°C fins l'endemà i proseguir en un altre moment.

5.- Després centrifuguem a 12.000 rpm. Durant 10 min. a 4°C. El sediment que obtenim és l'ARN.

6.- Eliminem el sobrenedant i fem un rentat del sediment amb 1ml d'etanol al 75% .

Nota: L'etanol s'ha diluït amb aigua lliure d'RNAses: DEPC (Dietilpirocarbonat). Per preparar-la, afegim 1ml de dietilpirocarbonat (DEPC) al 0.1% a 1000ml d'aigua destil·lada, mesquem bé i ho deixem 1h a temperatura ambient. Després autoclavem la solució i ho deixem atemperar abans d'utilitzar.

7.- Centrifuguem a 7.500rpm durant 5 min. a 4°C.

8.- Finalment, eliminem el sobrenedant i resuspenem l'ARN amb 50-100µl d'aigua DEPC.

III.2.2.-Purificació d'mRNA poliadenilat.

Seguidament, a partir de l'ARN extret de la gònada vàrem purificar l'mARN amb el Kit de purificació d'mARN (Amersham Pharmacia Biotech), seguint el protocol de la casa comercial.

III.3.- RACE: *Rapid Amplification of cDNA Ends.*

Per estudiar l'ARNm de la proteïna específica de l'espermatozoide d'*Holothúria tubulosa* phi0, vàrem utilitzar la tècnica de RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*). (Clontech). Aquesta tècnica permet obtenir la seqüència sencera de l'ARNm a partir d'un sol primer específic per al gen d'interès. La Fig. II.--- mostra esquemàticament els passos d'aquesta tècnica.

Es tracta de dues reaccions de PCR, una on s'amplia el cDNA des del primer específic del nostre gen (anomenat en l'esquema GSP1 *Gene Specific Primer 1*) cap a l'extrem 5' de la molècula d'mARN, anomenada reacció 5' RACE; i una segona reacció, 3' RACE on a partir d'un segon primer específic (GSP2 *Gene Specific Primer 2*) s'amplific el cDNA cap a l'extrem 3' de la molècula. Per al disseny de primers específics GSP1 i GSP2, (apt. 4.7), s'ha de tenir en compte que per tal d'obtenir la

III.MATERIAL I MÈTODES

seqüència sencera de l'ARNm, és necessari que els dos productes de les reaccions 5' RACE i 3' RACE presentin una zona de solapament en la seqüència sencera de l'ARNm de tal manera que la combinació de les dues reaccions ens donen la seqüència sencera del nostre mRNA d'interès.

Per tal que les reaccions de 5' RACE i 3'RACE puguin dur-se a terme amb un sol primer específic, és necessari primer obtenir el que en l'esquema anomenem *5'RACE Ready cDNA* i *3'RACE Ready cDNA*, que consisteix en insertar en els extrems 5' i 3' de la molècula d'mRNA respectivament una seqüència d'oligonucleòtids coneguda, proveïda per al mateix kit, que després en les reaccions 5' i 3' RACE mitjançant un primer complementari a aquesta seqüència de nucleòtids insertada (també proveït pel kit) permet l'amplificació completa del cDNA incloent els extrems 5' i 3' de la molècula. (v. esquemes en la Fig. BII.2)

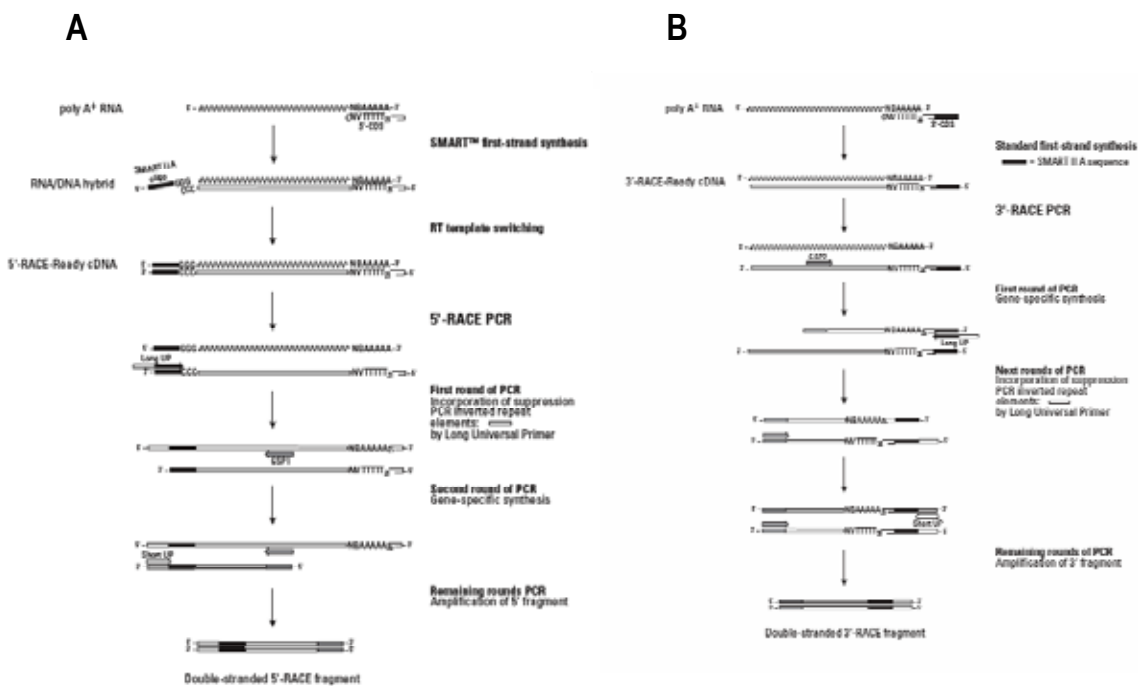


Fig.BII.2: A: Esquema de la reacció 5' RACE. **B:** Esquema de la reacció 3'RACE.

III.3.1.-Obtenció cDNA "RACE ready"

La reacció per obtenir el cDNA 5' i 3' RACE Ready, està catalitzada per una Transcriptassa Reversa on a partir de l'mRNA purificat, i els oligonucleòtids proveïts per al kit, se sintetitza el cDNA que utilitzarem en les reaccions de 5'RACE i 3'RACE.

Nosaltres a partir de l'mRNA poliadenilat (PoliA) purificat de la gònada madura d'*Holothúria tubulosa* vàrem procedir a la obtenció del cDNA de la manera següent: En dos eppendorfs per separat vàrem posar:

<u>5'RACE Ready cDNA</u>	<u>3'RACE Ready cDNA</u>
3µl mRNA (0,9µg)	3µl mRNA
1µl 5'-CDS primer	1µl 3'-CDS primer A
1 µl SMART II A oligo	

Seguidament vàrem incubar els tubs a 70°C durant 2min., i després posar immediatament en gel. Varem fer un pols de centrifugació per recollir els components de la reacció i seguidament vàrem afegir els dNTPs i la Transcriptassa Revesa a les dues reaccions:

2µl 5X *First Strand Buffer*
1µl DTT (20mM)
1µl dNTPs 10mM
1µl *Power Script Reverse Transcriptase*.

Es van vortejar les reaccions i incubar a 42°C durant una 1h 30min. Seguidament es va afegir 250µl del tampó *tricine-EDTA* (proporcionat per el kit), escalfar els tubs a 72°C durant 7 min. i guardar la reacció a -20°C fins la seva utilització.

III.3.2.- Reaccions de PCR RACE.

Les reaccions de PCR de 5' i 3' RACE es varen dur a terme en tubs de reacció de PCR amb 50µl finals de reacció. Es varen preparar les següents reaccions:

III.MATERIAL I MÈTODES

	<u>5'-RACE</u>	<u>controls de 5'RACE</u>	
5'cDNA RACE Ready	2.5µl	2.5µl	2.5µl
UPM 10X (<i>Universal primer Mix</i>)(conté els primers proveïts per el Kit).	5µl		5µl
HTR1 (GSP1)	1µl	1µl	
<i>Master Mix</i>	1.5µl	41.5µl	41.5µl
H ₂ O ds		5µl	1µl

Taula II.III.1: Composició de la reacció 5'RACE

	<u>3'-RACE₁</u>	<u>3'RACE₂</u>	<u>controls - de 3'RACE</u>	
3'cDNA RACE Ready	2.5µl	2.5µl	2.5µl	2.5µl
UPM 10X (<i>Universal primer Mix</i>)(conté els primers proveïts per el Kit).	5µl	5µl		5µl
HTF2 (GSP2)		1µl		
HTF3 (GSP2)	1µl		1µl	
<i>Master Mix</i>	41.5µl	41.5µl	41.5µl	41.5µl
H ₂ O ds			5µl	1µl

Taula II.III.2: Composició de la reacció 3'RACE.

La mescla *master mix* conté uns components comuns per a totes les reaccions que es varem mesclar a part per tal de facilitar el pipeteig de les reaccions i evitar errors de volum. Components de *Master Mix* per 1 reacció de 50µl:

- H₂O ds 34.5µl
- 10X *Adv 2 PCR buffer* 5µl
- dNTP Mescla (10mM) 1µl
- 50X *Adv 2 Polimerase Mix* 1µl

El programa de PCR utilitzat va ser:

- 5 cicles
94°C 5 segons
72°C 3 min.
 - 5 cicles
94°C 5 segons.
70°C 10 segons
72°C 3 min.
 - 20 cicles
94°C 5 segons
68°C 10 segons
72°C 3 min.
- 72°C 10 min.
4°C ∞

III.4.-Mètodes electroforètics

Per l'estudi de l'ARN hem utilitzat principalment gels d'agarosa convencionals, i en algunes ocasions els gels de formaldehid, que permeten una millor resolució de les bandes.

III.4.1.-Gels d'agarosa

El poder de separació dels gels d'agarosa, està en funció de la concentració d'agarosa dissolta. La migració dels àcids nucleics a través del gel d'agarosa, és també dependent del pes molecular de les bandes.

La següent taula mostra la relació aproximada de separació de les bandes segons el percentatge d'agarosa utilitzat. Nosaltres hem utilitzat gels a l'1% d'agarosa.

III.MATERIAL I MÈTODES

% d'agarosa del gel	Rang de Separació de DNA linear.(Kb)
0.3	60-5.0
0.6	20-1.0
0.7	10-0.8
0.9	7-0.5
1.2	6-0.4
1.5	4-0.2
2.0	3-0.1

Procediment:

- 1.- Per preparar un gel d'agarosa a l'1% es va pesar 4g d'agarosa i es van dissoldre en 40ml de tampó TAE1X.
- 2.- Es va escalfar la mescla al microones fins a la dissolució de l'agarosa, seguidament es va afegir 8µl de Bromur d'etidi 1mg/ml, i es va vertir la dissolució en el motlle de la cubeta per gels d'agarosa. Es va deixar polimeritzar i atemperar sota la campana d'extracció.
- 3.- Una vegada el gel polimeritzat, es van carregar les mostres amb el tampó de mostra 6XNDSB. El tampó de recorregut per als gels d'agarosa és TAE1X. Es va tirar el tampó de recorregut fins a cubrir el gel, i es va córrer l'electroforesi a 100V fins que el colorant més ràpid va arribar a 1 cm del final de gel.
- 4.- Una vegada corregut el gel es van visualitzar les bandes en un transiluminador amb raigs ultravioleta, i es va procedir a fer una fotografia del gel.

Stock 50X TAE

	<u>1L</u>	<u>500ml</u>
Tris-Base	242g	121g
Àcid acètic glacial	57.1ml	28.55ml
EDTA 0.5M pH 8.0	100ml	50ml

Tampó de mostres 6XNDSB:

- 30% sacarosa
- 0.25%(w/v) Xylene Cyanol FF
- 0.25% (w/v) Bromo Phenol Blue

III.4.2.-Gels de formaldehid

En algunes ocasions, per a l'anàlisi de les bandes d'ARN hem utilitzat gels de formaldehid, que permeten una millor resolució i visualització de les bandes, especialment si les bandes que vols estudiar presenten una mobilitat electroforètica similar.

El procediment per a preparar un gel de formaldehid és el següent:

Procediment:

Tampó de regorregut 10X (MOPS)

	<u>1L</u>	<u>concentració</u>
MOPS	41.86g	0,2M
Acetat sodi (trihidrat)	6.804g	0.05M
EDTA (Sal)	2.922g	0.01M

Ajustar el pH del tampó a 7.0 amb NaOH 2N.

Per estabilitzar la solució, no s'ha d'autoclavar, sinó que es filtra amb un filtre Millipore de 0.2µm

III. MATERIAL I MÈTODES

Stock 10X del colorant del tampó de mostres:

	<u>50ml</u>	<u>concentració</u>
Glicerol	25ml	50%
EDTA (sal)	0.015g	1mM
Blau de bromofenol	0.125g	0.25%
Xylen cyanol FF	0.125g	0.25%

Tampó de mostres:

10X MOPS (Tampó de recorregut)	10 μ l
Aigua DEPC	16.5 μ l
10X colorant	5 μ l
Formaldehid 37%	17.5 μ l
Formamida ultrapura	50 μ l

Preparació del gel de formaldehid:

Pesar 0.5g d'agarosa i dissoldre-la bé en 44ml d'aigua DEPC.

Afegir 5ml de 10X MOPS (tampó de recorregut)

Deixar atemperar a solució (a uns 60°C aproximadament), i afegir 1.4ml de formaldehid

Deixar que el gel solidifiqui sota la campana de gasos.

Per córrer el gel, carregar entre 1-5 μ g d'ARN amb 8 μ l de tampó de mostres, incubar a 65°C durant 15 min. i posar- ho immediatament en gel durant 1 o 2 min. més. Seguidament fem una beu centrifugada, i carreguem la mostra en el gel.

Es va cobrir el gel amb tampó de recorregut (MOPS 1X) i seguidament es va deixar córrer a 100V dins que el colorant més ràpid va arribar a 1cm del final.

Per visualitzar les bandes es va tenyir el gel durant 15min. en una solució amb Bromur d'Etidi ----- i després es va destenyit durant 10 min. en aigua de l'aixeta. Seguidament es va mirar a la llum ultraviolada i es va fer una fotografia del gel.

IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ

IV. RESULTATS

IV.-ANTECEDENTS

Proteïnes nuclears de l'espermatozoide d'*Holothúria tubulosa*

L'espermatogènesi de l'Equinoderm *Holothúria tubulosa* en quan a la transició proteica, és un procés relativament simple: l'espermatozoide madur conté les cinc histones somàtiques (en quantitats relatives normals) i una proteïna específica de la gònada i també específica d'*Holothúria tubulosa*; la Phi 0 que s'incorpora en el nucli durant els últims estadis de l'espermatogènesi. Phi 0 és una proteïna petita (77 residus; 8640Da), que per la seva composició aminoacídica, pot ser considerada una proteïna de la família de les histones H1, ja que la seva seqüència primària és molt similar a l'extrem C-terminal molt bàsic d'una histona H1. Degut a la seva basicitat també pot ser considerada una proteïna de tipus "protamine-like" o bé una proteïna de transició entre les histones i les protamines. En l'espermatozoide d'*Holothúria tubulosa*, la phi 0 representa aproximadament el 4% del total de les histones; se sap també que s'associa a les histones però el seu paper fisiològic en l'espermatozoide, encara és desconegut.

La Phi0 és una proteïna interessant per varis motius (similitud a una histona H1, presència exclusiva només en els Holothuroideus, condensació de la cromatina), i és des de ja fa anys, motiu d'estudi i investigació. A l'any 1989 Prats, E. et al. varen publicar la seqüència aminoacídica, i l'any 1995 els mateixos autors varen desxifrar el gen de la mateixa proteïna. La Fig.BIII.1 mostra la seqüència de nucleòtids del gen de la phi0.(Figura extreta de Prats i Cornudella, 1995). El més sorprenent del gen de la proteïna phi0 és que es tracta d'una seqüència discontinua de 4 exons, interrompida per tres introns; aquests introns tenen 6.8Kb, 4Kb i 5.4Kb de llargada respectivament; fet que fa del gen de la phi0 el gen més llarg descrit fins al moment per a una proteïna específica de l'espermatozoide.

Fig.II.IV.1. Seqüència del gen de la phi0 d'*Holothúria tubulosa* (Prats, E. and Cornudella Ll., 1995). Els exons codifiquen per a una proteïna de 77 residus, els introns degut a la seva llargada han estat parcialment eliminats per tal d'entendre amb més claredat la figura. Les regions no-codificants 5' han estat numerades negativament i les no codificants a 3' del gen positivament.

Exon 1

-700 -650

GACTGCTCAGGAGTGATAGCGCCCAAACAAGCGTCCAAGAGGCCGAACAGACGCTAAGGCTCGCTACGGCGCGTTAGCAT
-600

GTACAAAATTGCCTCGGCGTTTTCAGTACTAGTATACGCGTTTCTACGGCGATGGAATCGACTTGAGTAAGCTGACCTACATC
-550 -500

ACGCTGACCTTCCATGATGGCTTCCACAACAACACTGTGGGATGCGCCTTCTGTTATATAGTTCAGTGGAGCCGATGCTTA
-450

TGACGTCATAAATTGGTGTAGAAGTCTAGTCCACTGCATATTTCCAAACGTGAAGAAACGGTTTGAGACCGAATCAAATG
-400 -350

CATTTTTCTTACCAGCTTACCGCGCTCTGGAATACGATGAGTATGTATGCAATCCTCAGTTCAAAGCAAAGTGGACGCAC
-300 -250

TACGTTTGGACACTGTACCTAGCCTACATTATTTCATGTTCTTGTTCCTTTATGACGTAAGGACGCAACCCGATGCGAC
-200

GTTTCTGAAACGGGCACTTAGACGCGCGCAATTTGTAATCAGGTTTAAATCATAGTATTTGGTGGCGTAGCTATAGGTG
-150 -100

CGTTTATGCGCCTCACTTTGTAAAATTCAAAAAATAACAAATTTGTTTTTCAGTTTTTAAAGAACCCTTACTTGATCGC
-50

TTACAGCCGCAACTAAGACGTTGGTCTACGCACTGCCAGTTTGGATTCCCCCTTGTTGCGGAAATTTCAAATAACA
-1 5 6 7 8 9

TCAATAATC ATG GTA GCC AGA CGA CAA ACA AAG AAA G/GTAAATAAAGGGAACAATATATGCAAGGCGTT
 ini Val Ala Arg Arg Gln Thr Lys Lys A

Exon 2

9 10 11 12 13 14 15

TTTTATTCTTCTTCTCACTTCACAG CT AGG AAG CCT GCA GCC AG/GTGAAGTGAATACAATTTAAATTTTAT
 la Arg Lys Pro Ala Ala Ar

Exon 3

16 17 18 19 20 21 22 23 24 25

TAACTCAAGACTTTAAATGCTTTGTCCTTCTCCCCAG G AGA CGC AGC GCA GCC AAA CGC GCA GCC CCA
 g Arg Arg Ser Ala Ala Lys Arg Ala Ala Pro

26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41

GCC GCG AAG AAG GCT GCG AGT CGC CGT CGC CCA AAG AGT GCT AAG AAG/GTAGGTAATAAGATGT
 Ala Ala Lys Lys Ala Ala Ser Arg Arg Arg Pro Lys Ser Ala Lys Lys

Exon 4

42 43 44 45 46 47 48 49 50 51

AATTAATAAAGTCTGACAATATATTTTTCTTTTCAG GCT AAG CCC GCA GCA AGG AGG CGC AGC AGC
 Ala Lys Pro Ala Ala Arg Arg Arg Ser Ser

52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71

GTC AAA CCT AAA GCA GCA AAA GCA GCC ACC CAA GTC CGT CCG AGG AGC CGA CGA ATT CCG
 Val Lys Pro Lys Ala Ala Lys Ala Ala Thr Gln Val Arg Arg Arg Ser Arg Arg Ile Arg

72 73 74 75 76 77 +1 +50

CGT GCG TCC GTG TCA AAG TAA TTCAATGGAAGACTGATCATTAAATCGTAACCCCTTCGAAAGATTAACCTTA
 Arg Ala Ser Val Ser Lys **STOP**

+100

TCAAATTTTCAATTTGTAAGAACTGTCCAAATTTTCTAGAATATTGCAGAAGTGAACATTTAAACACATCCAAATTCGTAA
+150 +200

GCGAACAAGCAAGCAACGATGACCTACAATTTACAGTCGTTTCTTATTATTTCAAGTTTGCCTTTATTTCAGTTTCAGTTT
+250

CAGTTTATTTACTCTTTAATACCTCCTCGGAGGTGTGAGAGTCAAACATACAATTAGATACACAGAAATATACAAAAG
+300 +350

CAGCAAGATCAACAATAAACAAAAACAAAAACAAAAATCATGCAAGCAAATCAGTACAATCAAAAACTAACTTCAACC
+400 +450

TAGTCACCAGACCCAAATGAAATATAAATCCAGAACAGAAATGGATAGGCATGCATGAACTAGACGTAACACAAACA
+500

TACGCACAACAACAAGGCAACCTACGTATGCACTAATGCCTAGCTATACACACTACATCATCAAATCACTACGGCACT
+550 +600

CATTAACGATGATATACACTACAGAAGTGCCAGGTTTCTTTGCACCTCCTTATTTCTAGACGTTAAAAGCTGGGCCATT
+650

TTTAAAGTATTTGGACCCACCCTATAATAATGCTTCAAATAGTATTTCCGATCTGAGTTGAAAGCCTTACATTGAAAAAG
+700 +750

ATAATGAAATTACATCTCCTATCAGCCCACTAGTACAAAGTTCACAAAGTCTATCATTAAAGTCAATATTAAGAAATCGT

IV.2.-HIPÒTESI DE TREBALL

De les sis classes en què es divideixen el grup dels Equinoderms, trobem tres classes que contenen un nombre d'espècies molt superior a les altres: els Equinoideus (Eriçons de mar), els Asteroideus (Estrelles de mar) i els Holoturoideus (les Holotúries o també conegudes com a cogombres de mar).

A continuació comparem les SNBPs presents en els espermatozoides d'aquestes tres espècies. Es va fer primer una extracció amb HCl 0.4N de les proteïnes bàsiques de la gònada d'una espècie representativa de cada classe: *Strongylocentrotus purpuratus* (eriçó de mar), *Pisaster ochraceus* (estrella de mar) i *Thyone briareus* (Holothúria). El resultat es presenten en un gel GPAU en al figura BIII.2. Si ens fixem en la mobilitat electroforètica de la histona H1, observem que en els dos primers grups la mobilitat d'aquesta proteïna és similar i que es tracta d'una proteïna de pes molecular elevat (250-270 aminoàcids); en canvi, en el cas de la Holothúria, la histona H1

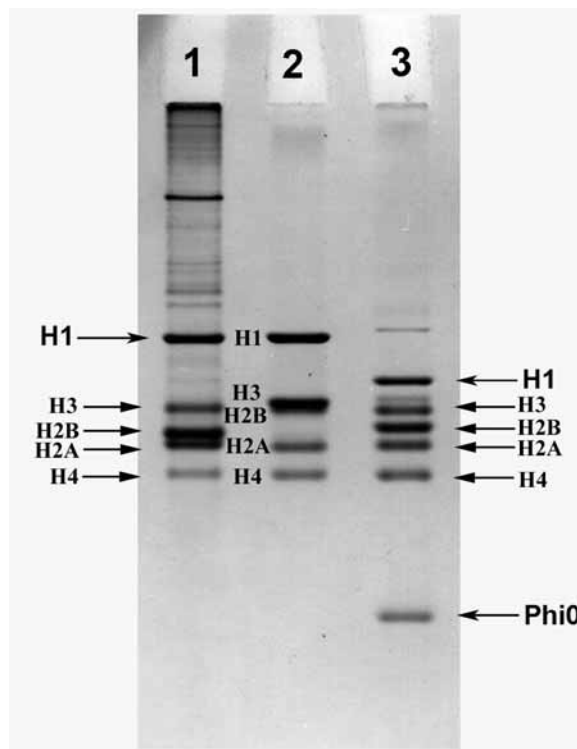


Fig.II.IV.2: Gel GPAU de les SNBPs dels equinoderms: Eriçó de mar, estrella de mar, i Holothúria. Carril 1: Extracció amb HCl 0.4N de les proteïnes nuclears bàsiques de la gònada de *Strongylocentrotus purpuratus* (Eriçó de mar). Carril 2: Proteïnes nuclears bàsiques de la gònada de *Pisaster ochraceus* (estrella de mar). Carril 3: Proteïnes bàsiques de la gònada de *Thyone briareus* (Holothúria).

Aquest fet, més la similitud de la proteïna phi0 en l'extrem N-terminal d'una histona H1, ens podria fer pensar en la possibilitat d'un origen comú entre la histona H1 i phi0 d'*Holothúria tubulosa*, de manera que fossin el resultat d'una modificació post-transcripcional de les histones H1 de la resta dels Equinoderms.

Aquesta hipòtesi, es contraposa amb el fet que la proteïna phi0 tingui el seu propi gen independent tal i com varen descriure E.Prats i Ll.Cornudella l'any 1995; és per això que en aquest capítol ens dediquem a fer una reexaminació del transcrypt original de la proteïna phi 0 d'*Holothúria tubulosa* mitjançant RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).

IV.3.-RESULTATS

IV.3A.- cDNA de la Phi 0: RACE.

Vàrem partir de gònades masculines madures d'*Holothúria tubulosa* i en vàrem extreure l'RNA i purificar els transcrits poliadelilats mRNAs.(veure Material i mètodes apt.2.1 i 2.2). Amb l'mRNA Poliadenilat vàrem procedir a la síntesi de cDNA (5' i 3' RACE ready) amb el Kit SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Bd Biosciences) i procedir a la reacció de PCR.

Donat que coneixíem la seqüència del cDNA per a la phi0 (Prats,E. et al. Nucleic Acid Research, vol. 17, number 23, 1989) vàrem poder disenyar uns primers pròxims als extrems 5' i 3' de la proteïna per poder aplicar la tècnica de RACE. La Fig. BIII.3. mostra els primers utilitzats per a fer les reaccions de 3' RACE (HTF2 i HTF3) ("*Holothúria tubulosa Forward 2 i 3'*") que es correspondrien al GSP2 (*Gene Specific Primer 1*) en l'esquema del procés de Material i Mètodes, Fig.BIII.2; i 5' RACE (HTR1) ("*Holothúria tubulosa Reverse 1'*") , anomenat GPS1 en la Fig.BIII.2 .

Fig.II.IV.3: Primers utilitzats per a les reaccions de PCR . Per a la reacció de 5'RACE es van utilitzar dos primers: HTF2 i HTF3, i per a la reacció 3'RACE un sol primer : HTR1.

Met

tccccctgtgtcggaaattccaactacaatcaataatc ATG GTA GCC

HTF2

AGA CGA CAA ACA AAG AAA GCT AGG AAG CCT GCA GCC **AGG AGA**

HTF3

CGC AGC GCA GCC AAA CGC GCA **GCC CCA GCT GCG AAG AAA**

GCG GCG AGT CGC CGT CGT CCA AAG AGT GCT AAG AAG GCT AAG

CCC GCA GCA AGG AGA CGC AGC AGC GTC AAA CCT AAA GCA GCA

AAA GCA GCC GCC CAA GTC CGT CGC AGG AGC **CGA CGA ATT CGC**

HTR1 End

CGT GCG TCC GTG TCA AAG TAA

TCCAATGGAAGACTGATCATTAAATCGTAACCCCTTCAAAGACTAAATTTATTAAT
 TTTAGTTTGTAGAACTGTCCAAATTTCTAGAATATTGCAGAACTGAACATTTAAAA
 CACATCCAAATTCGTAAGCGAACAAGCAAGCAACGATGACCTACAAAAAA

La reacció de PCR per a 5' RACE es va fer sota les següents condicions:
 Els resultats es mostren en la Fig. BIII.4, on es pot veure que el primer HTR1 (juntament amb el primer a 5' proveït per al Kit) dona un únic producte de reacció (carril 2), clar, nítid i intens d'uns 400 parells de bases aproximadament. Els controls negatius utilitzats consisteixen en deixar de posar un dels dos primers que fan possible la reacció, en el carril 3 hem precindit del primer a 5' proporcionat per al Kit , i en el carril 4 hem deixat de posar el primer a 3' HTR1, tant en un cas com en l'altre no s'obté cap banda

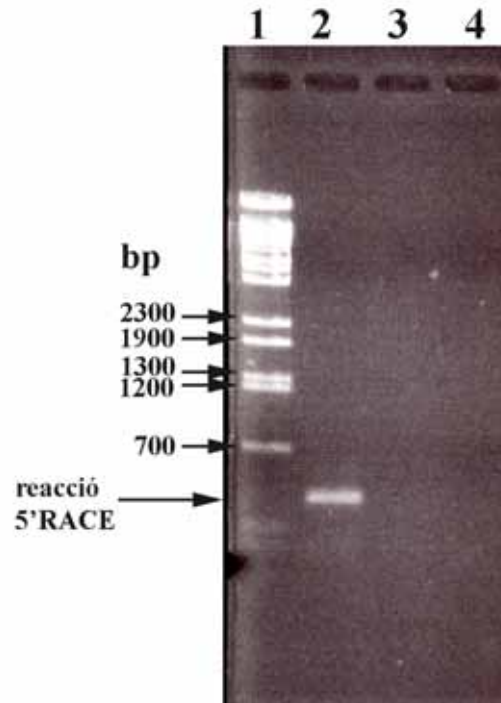
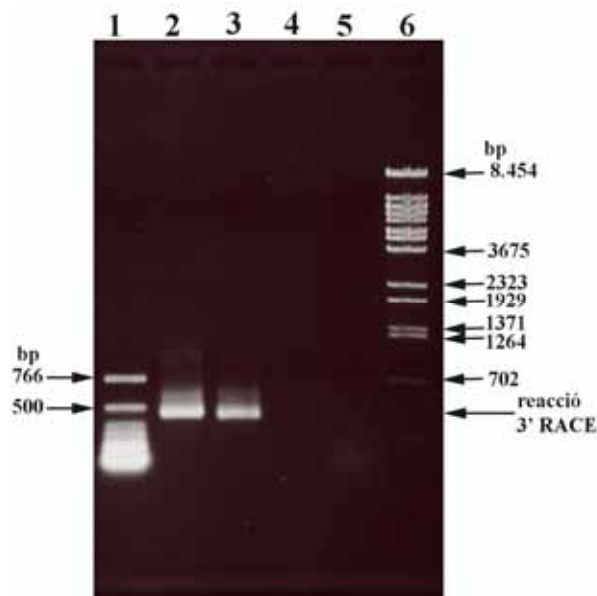


Fig.II.IV.4: Reacció de PCR de 5'RACE: Carril 1 : Marcador de pes molecular λ DNA-BstEII digest (Biolabs). La PCR utilitzant el primer HTR1 (i el propi primer reverse que proporciona el Kit) dóna una sola banda neta, nítida i intensa (**carril 2**). **Carril 3:** Control negatiu de la reacció 5'RACE (sense primers proporcionats per al Kit.). **Carril 4:** Control negatiu sense primer utilitzat per a nosaltres (HTR1).

Quan amb els altres dos primers HTF2 i HTF3 fem la reacció cap a 3'de la molècula (3'RACE) obtemen en ambdós casos un producte, clar, nítid i intens d'aproximadament els mateixos parells de bases (400bp) (Fig.BIII.5), que quan fem l'amplificació de la molècula cap a 5'(Fig.BIII.4).

El següent pas immediat a fer va ser clonar les bandes obtingudes en aquestes tres reaccions i seqüenciar-les per poder comparar-les amb la seqüència de la phi0. El resultat de la clonació i seqüenciació de les bandes es mostra en la figura següent:

Fig.II.IV.5: Reacció de PCR de 3'RACE (Pàgina següent). Carril 1: Marcador de pes molecular Low Molecular Weight (Biolabs). Reacció de PCR 3'RACE amb el primer HTF2 (carril 2) i amb el primer HTF3 (carril 3). Carril 4: Control negatiu sense primers subministrats per al Kit. Carril 5: Control negatiu sense un dels nostres primers : HTF2. Carril 6: Marcador de pes molecular λ DNA-BstEII digest (Biolabs)



En els resultats de seqüenciació de les bandes, podem identificar clarament, el primer a 5' del Kit, la cua de poliadenines del transcrypt, i la seqüència de la proteïna phi0 proteïna.

En conseqüència, com a conclusió final d'aquests experiments podem dir que tal i com havien confirmat Prats et al., la proteïna phi0 en *Holothuria tubulosa* té el seu propi gen independent, i el seu transcrypt codifica exclusivament per la proteïna.

V. CONCLUSIONS

PART II:

- I. La proteïna específica de l'espermatozoide d'*Holothúria tubulosa* té el seu propi gen independent del de la histona H1, i el seu transcrypt codifica exclusivament per la pròpia proteïna phi0.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Aitken, A., M.J. Geisow, J.B.C. Findlay, C. Holmes I A. Yarwood (1989). En: Protein sequencing. A practical approach. J.B.C. Findlay I M.J. Geisow, eds., IRL Press, Oxford, pp. 43-68.
- Alami-Ouahabi, N., Veilleux, S., Meistrich, M.L., Boissonneault, G. (1996). *Mol. Cell Biol.* 16(7): 3720-3729.
- Alberts, B. Biología Molecular de la célula. 3ª Edición. Ediciones Omega S.A. (1993).
- Allen, G. (1989). En: Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology. R.H. Burdon i P.H. van Knippenberg, eds., Elsevier, Amsterdam. Vol.9.
- Alsheimer, M. and Benavente, R. (1966). *Exp. Cell Res.* 228: 181-188.
- Ausió, J. (1980). Tesi doctoral, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.
- Ausio, J. and Subirana, J.A. *J. Biol. Chem.* 257 (6): 2802-2805.
- Ausió, J. (1995). *Advances in Spermatozoal and Phylogeny and Taxonomy.* 166: 447-462.
- Ausió, L. (1999). *J. Biol. Chem.* 274(44): 31115-31118.
- Arnold, J.M., Williams-Arnold. L.D. (1978). *J. Exp. Zool.* 205: 13-25.
- Azorín, F., Olivares, C., Jordan, A., Pérez-Grau, L., Cornudella, L., and Subirana, J.A. (1983). *Exp. Cell Rres.*148: 331-344.
- Azorín, F., Rocha, E., Cornudella, L., and Subirana, J.A. (1985). *Eur. J. Biochem.* 148: 529-532.
- Baccetti, B., Pallini, V. I Burrini, A.G. (1976). *J. Ultrastructural Res.*, 54::261-275.
- Bedford, J.M. and Calvin, H.I. (1974). *J. Exp. Zool.* 187(2):181-204.

- Benavente, R. and Krohne, G. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 6176-6180.
- Bergstrom, B. and Arnold, J.M. (1974). *J. Cell Biol.* 62: 917-920.
- Bloch, D.P. (1969). *Genetics.* 61(suppl.): 93-110.
- Bols, N.C. i Kasinsky, H.E. (1976). *J. Exp. Zool.*, 198: 109-114.
- Càceres, C., Giménez-Bonafé, P., Ribes, E., Wouters-Tyrou, D., Martinage, A., Kouach, M., Sautière, P., Muller, S., Palau, J., Subirana, J.A., Luis Cornudella, L. and Manel Chiva. (1999). *J. Biol. Chem.* 274(2): 649-656.
- [Carlemalm E.](#), [Armbruster, B.L.](#), [Chiovetti, R.](#), [Garavito, R.M.](#), [Hobot, J.A.](#), [Kellenberger, E.](#), [Villiger, W.](#) (1982). Specimen preparation for electron microscopy using low temperature embedding resins. *J. Microsc.* 126: 77-85.
- [Carlemalm, E.](#), [Villiger, W.](#), [Hobot, J.A.](#), [Acetarin, J.D.](#), [Kellenberger, E.](#) (1985). Low temperature embedding with Lowicryl resins: two new formulations and some applications. *J. Microsc.* 140:55-63.
- Carlos, S., Hunt, D.F., Rocchini, C., Arnott, D.P., and Ausió, J. (1993). *J. Biol. Chem.* 268: 195-199.
- Casas, M.T., Mura, C.V., Subirana, J.A., and Cornudella, L. (1989). *Exp. Cell Res.* 182: 14-25.
- Chieffi, P., Battista, S., Barchi, M., Di Angostino, S., Pierantoni, G.M., Fedele, M., Chiariotti, L., Tramontano, D. and Fusco, A. (2002). *Oncogene.* 21: 3644-3650.
- Chiva, M., Kasinsky, H. E., i Subirana, J.A. (1987). *FEBS Lett.*, 215: 237-240.
- Churikov, D., Zalenskaya. I.A., Zalensky, A.O. (2004). *Cytogenet. Genome Res.* 105: 203-214.
- Cornudella, L., Rocha, E. (1979) *Biochemistry*, 18(17): 3724-3732.
- Coupez, M., Martín-Ponthieu, A, and Sautière, P. (1987). *J. Biol. Chem.* 262 (6): 2854-2860.

- Cristensen, M.E., Rattner, J.B., and Dixon, G.H. (1984). *Nucleic Acid Res.* 12: 4575-4592.
- Dunker, A.K. i Rueckert, R.R. (1969). *J. Biol. Chem.*, 244: 5074-5080.
- Franklin, S. G. i Zweidler, A. (1975). *J. Cell Biol.*, 67: 122a.
- Franklin, S. G. i Zweidler, A. (1977). *Nature*, 266: 273-275.
- Franzén, Å. (1955). Comparative morphological investigations into the spermiogenesis among mollusca. *Zooll. Institute, Uppsala*. 399-456.
- Franzén, Å. (1956). *Zool. Bidr. Uppsala*, 31:355:482.
- Franzén, Å. (1967). *Arkiv. För Zoologi Band*, 19 (16): 323-337.
- Franzén, Å. (1970). En: Comparative spermatology, ed. B. Baccetti. Academia Press. New York, pp. 29-46.
- Galangau, V. (1969), Tesi doctoral. Universitat de Montpellier, França.
- Galangau, V. I Tuzet, O. (1968a). *comp.. Rend. Acad.Sci. Paris*, 267:1462-1467.
- Galangau, V. I Tuzet, O. (1968b). *Comp.. Rend. Acad.Sci. Paris*, 267:1735-1737.
- Giménez-Bonafé, P., Ribes, E., Kasinsky, H.E., Subirana, J.A., and Chiva, M. (1999). *J. Exp. Zool.* 283: 580-589.
- Giménez-Bonafé, P., Ribes, E., Sautière, P., González, A., Kasinsky, H.E., Kouach, M., Sautière, P.E., Ausió, J., and Chiva, M. (2002a). *Eur. J. Cell Biol.* 81: 341-349.
- Giménez-Bonafé, P., Ribes, E., Zamora, M.J., Kasinsky, H.E., and Chiva, M. (2002b). *Mol. Reprod. Dev.* 62: 357-362.
- Glaserapp, E. von and Benavente, R. (2000). *Chromosoma*. 109: 117-122.
- Goldman, R.D., Baccetti, B., Collodel, G., Gamberra, L., Moretti, E., Piomboni, P. (1998). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 30: 573-580.

- Gordon Fields, W. and Thompson, K. A. (1975). *Can. J. Zool.* Vol. 54, n°6: 908-932
- Govin, J., Carou, C., Lestrat, C., Rousseaux, S., Khochbin, S. (2004). *Eur. J. Biochem.* 271: 3459-3469.
- Grimes, S.R., Meistrich, M.L., Platz, R.D. and Hnilica, L.S. (1977). *Exp. Cell Res.* 110(1): 31-39.
- Gusse, M. i Chevallier, P. (1978). *Cytobiologie*, 16: 421-443.
- Healy, J.M., (1989). *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 323: 589-600
- Healy, J.M., (1990a). *Helgolaender Meeresuntersuchungen* 44: 109-123.
- Healy, J.M., (1990b). *Helgolaender Meeresuntersuchungen* 44: 95-108.
- Healy, J.M., (1993). *J. Mol. Studies* 49: 105-115.
- Heinrickson, R.L. i Meredith S.C. (1984). *Anal. Biochem.*, 136: 65-74.
- Hofemeister, H., Khun, C., Franke, W.W., Webwe, K., Stick, R. (2002). *Eur. J. Cell Biol.* 81: 51-60.
- Hou, S.T. and Maxwell W.L. (1992). *Zoomorphology*. Berlín. 112:207-215.
- Howard, G.A. i Martin. A.J.P. (1950). *Biochem. J.*, 46: 532-538.
- Hurley, C. K. (1977). *Anal. Biochem.*, 80: 624-626.
- Investigación y Ciencia, abril, 2006. p. 50-59.
- Johns EW. (1967). New method for the selective extraction of histone fractions f2(a1) and f2(a2) from calf thymus deoxyribonucleoprotein at pH 7. *Biochem. J.* 105: 611-614.
- Kadura, N and Khrapunov, N. (1988a). *Eur. J. Biochem.* 175: 603-607.
- Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscope. *J. Cell Biol.* 27: 137A.

- Kellenberg, E. (1982). Low Denaturation Embedding for Electron Microscopy of Thin Sections. *Chemische Werke Lowi*.
- Khrapunov, N., Kadura, N and Dragan, A.I.(1988b). *Eur. J. Biochem.* 175:609-613.
- Kierszenbaum, A.L.(2002). *Mol. Reprod. Dev.*63: 1-4.
- Koehler, J.K. (1970). *J. Cell Biol.*, 47: 108a-285.
- Laemmli, U.K. (1970). *Nature*, 227: 680-685.
- Leik, J. (1970). *J. Cell Biol.*, 47: 118a-311.
- Lewis, J.D., McParland, R., and Ausió, J. (2004). *Biochemistry*.43:7766-7775.
- Longo, F.J. and Anderson, E. (1970). *J. Ultrastruct. Res.*, 32:94-106.
- Martin, A.W., Thiersch, J.B., Dott, H.M., Harrison, R.A. and Mann, T. (1970). *Martini. Proc. Roy. Soc. Lond.*, 175: 63-68.
- Martín-Ponthieu, A., Wouters-Tyrow, D., Bélaïche, D., Sautière, P., Schindler, P., Van Dorsselaer, A. (1991). *Eur. J. Biochem.* 195: 611-619.
- Martín-Ponthieu, A., Wouters-Tyrow, Pudlo, B., Buisine, E., and Sautière, P.(1994). *Eur. J. Biochem.* 220: 463-468.
- Maxwell, W.L., (1974). *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 186: 181-190.
- Maxwell, W.L., (1975). *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 191: 527-535.
- Meistrich M.L., (1989). *CRC Press*. Orlando, Fla, pp 165-182
- Meistrich M.L., Mohapatra, B., Shirley, C. and Zhao, M. (2003). *Chromosoma*, 111:483-488.
- Mennella, M.R., Farina, B., Irace, M.V., Di cristo, C., and Di Cosmo, A. (2002). *Mol. Reprod. Dev.* 63:355-365.
- Monné, L. (1933). *C.R. Soc. Biol.* 113: 197-198.

- Moore, S.C. i Stein, W.H. (1948). *J. Biol. Chem.*, 176: 367-388.
- Oliva, R. i Dixon, G.H. (1991). *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 40: 25-94.
- Panyim, S. i R. Chalkley (1969). *Arch. Biochem. Biophys.*, 130: 337-346.
- Poccia, D. (1995). *Advances in Spermatozoal Taxonomy and Phylogeny*. 166: 475-489.
- Ribes, E., Sanchez, L.D., Kasinsky, H.E., del Valle, L., Giménez-Bonafé, P., Chiva, M. (2001). *J. Exp. Zool.* 289: 304-316.
- Ribes, E., Giménez-Bonafé, P., Zamora, M.J., González, A., Kasinsky, H.E., and Chiva, M. (2002). *Mol. Reprod. Dev.* 62: 363-367.
- Rosseau-Prévost, R., Engelhardt, R., Rousseaux, J., Wouters-Tyrou, D. and Sautière, P. (1988). *Gam. Res.* 19: 277-290.
- Pitt-Rivers, R. i Impiombato, F.S.A. (1968). *Biochem. J.*, 109: 825-830.
- Platz, R.D. i Meistrich, L.M. (1977). En: *Methods and cell Biology*, vol. 16, cap. 18, pp. 297-316.
- Prats, E., Cornudella, L., and Ruiz- Carrillo, A. (1989). *N. Ac. Res.*17: 10097.
- Prats, E., & Cornudella, L. (1995). *Adv. In spermatozoal phyl. And Taxonomy*. 166: 491-500.
- Reynolds, J.A. i Tandford, C. (1970a). *Proc. Natl. Acad. Ssci. USA*, 66: 1002-1007.
- Reynolds, J.A. i Tandford, C. (1970b). *J. Biol. Chem.*, 245: 5161-5165.
- Russell, L.D., Russell, J.A., MacGregor, G.R. and Meistrich, M.L. (1991). *Am. J. Anat.* 192(2): 97-120.
- Saperas, N., Ribes, E., Buesa, C., García-Hegart, F. and Chiva, M. (1993). *J. Exp. Zool.* 265: 185-194.
- Schindler, P., Bitsch, F., KlarsKov, K., Roepstorff, P., Briand, G., Wouters-Tyrow, D., Sautière, P. and Van Dorsselaer, A. (1991). *Eur. J. Biochem.* 195: 621-629.

- Shapiro, A. L., Vinuela, E. i Maizal, J. V. (1967). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28: 815-820.
- See, Y.P. i Jackowski, G. (1989) En: Protein structure : a practical approach. T.E. Creghton, ed., IRL Press, Oxford, pp. 1-21.
- Suau, P. and Subirana, J.A. (1977). *J. Mol. Biol.* 117: 909-926.
- Subirana, J.A., (1970). *Exp. Cell Res.* 63: 253-260.
- Thesing, G. (1904). *Zeit. Für wiss. Zool.* 76: 94-136.
- Thomas, J.O. i Kornberg, R.D. (1978). En: Methods in Cell Biology, G. Stein, J. Stein i L.K. Stein, eds., Academic Press, New York, vol. 18, pp. 429-440.
- Weber, K. i Osborn, M. (1969). *J. Biol. Chem.*, 244: 4406-4412.
- Wouters-Tyrow, D., Martin-Pontieu, A., and Richard, A.. (1988). *Biochim. Biophys. Acta.* 953: 86-94.
- Wouters-Tyrow, D., Chartier-Harlin, M.C., Martin-Pontieu, A., Boutillon, C., Van Dorselaer, A. and Sautière, P (1991). *J. Biol..Chem.*vol. 266;26: 17388-17395.
- Wouters-Tyrow, D., Martin-Pontieu, A., Ledoux-Andula, N., Kouach, M., Jaquinod, M., Subirana, J.A., and Sautière, P (1995). *Biochem. J.* 309: 529-534.
- Yoshida, T., Ioshii, S.O., Imanaka-Yoshida, K. and Izutsu, K. (1994). *J.Cell. Sci.* 107: 625-633.
- Zalenskaya, I.A., and Zalenzky, A.O. (1980a).*Comp. Biochem. Physiol.* 65B: 369-373.
- Zalenskaya, I.A., Zalenskaya, E.O.,and Zalenzky, A.O. (1980b).*Comp. Biochem. Physiol.* 65B: 375-378.
- Zweidler, A. i Cohen. L.H. (1978). *Fed. Proc.* 31: 926A.