

Received: 2006.02.13
Accepted: 2006.05.18
Published: 2006.06.30

Topologia chromosomów w jądrze komórkowym. Plemnik. Część 2

Topology of chromosomes in male gametes. Part 2

Ewa Wiland, Marta Żegała, Maciej Kurpisz

Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Streszczenie

Praca jest podsumowaniem aktualnej wiedzy na temat organizacji DNA oraz struktury chromatyny w jądrze ludzkiego plemnika. Przedstawiono poglądy i hipotezy dotyczące określonej i nieprzypadkowej lokalizacji chromosomów w jądrze plemnika. Centralny element architektury wewnątrzjądrowej plemnika stanowią indywidualne terytoria chromosomowe. W ich obrębie chromosomy przybierają konfigurację „szpilki do włosów” z centromerami skierowanymi do wnętrza jądra plemnika oraz telomerami skierowanymi peryferyjnie. Funkcjonalne znaczenie tej swoistej topologii pozostaje do wyjaśnienia.

Słowa kluczowe: topologia chromosomów • chromosomy plemnikowe

Summary

The article provides a summary of the present knowledge on the organization and chromatin structure in the nucleus of the human sperm cell. The study also presents views and hypotheses on the defined, non-random localization of chromosomes in the sperm nucleus. The individual chromosome territories constitute the central element of the intranuclear architecture. Within these territories, the chromosomes take on the configuration of “hairpin” extendines, with their centromeres towards the interior of the sperm nucleus and the telomeres directed towards the periphery. The functional purpose of this specific topology remains to be explained.

Key words: topology of chromosomes • chromosomes of sperm cells

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/9422.pdf

Word count: 3677

Tables: –

Figures: 1

References: 94

Adres autora: prof. dr Maciej Kurpisz, Instytut Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań;
e-mail: kurpimac@man.poznan.pl

Wykaz skrótów: **CT** – terytorium chromosomu (chromosome territory); **Da** – daltony; **FISH** – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (fluorescent hybridization *in situ*); **H** – histony (histones); **P1, P2** – protamina 1 i 2 (protamine 1 and 2); **Ser** – seryna (Serine); **Thr** – treonina (Threonine); **TP** – białka przejściowe (transition proteins); **CDY** – acetylotransferaza kodowana przez gen zlokalizowany na chromosomie Y; **CRE** – czynnik transkrypcyjny zależny od cAMP (cAMP-response element); **CK2** – kinaza białkowa II niezależna od cAMP (Ca²⁺/cAMP-independent protein kinase II); **Camk4** – kinaza białkowa IV zależna od kalmoduliny (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV); **CENP-A** – centromerowe białko A (centromere protein A); **H1LS1** – wariant histonu swoisty dla spermatyd (histone H1-like protein in spermatids); **HP1β** – białko HP1β zasocjowane z heterochromatyną (heterochromatin protein 1β); **MAR** – rejon połączenia DNA z macierzą jądrową (matrix associated region); **PKA** – kinaza białkowa A zależna od cAMP (cAMP-dependent protein kinase A); **RS** – reszty arginino-serynowe; **SRPK1** – kinaza białkowa 1 SR (serynowo-argininowa) (SR protein kinase 1); **TLF** – czynnik transkrypcji podobny do czynnika TBP wiążącego się z kasetą TATA (TBP-like factor).

1. WSTĘP

Dzięki rozwojowi technik mikroskopowych i metodologii badań *in vivo*, w ciągu ostatnich 10 lat dokonał się istotny postęp w poznawaniu wewnątrzjądrowej organizacji genomu w komórce somatycznej, w stadium interfazy. Wykazano, że w tak dynamicznej i aktywnej funkcjonalnie strukturze, jaką jest interfazowe jądro komórki somatycznej, chromosomy zajmują określone obszary (tzw. terytoria, CT – chromosome territory), a topologia wewnątrzjądrowa (zamienienie: architektura wewnątrzjądrowa) odgrywa integralną rolę w utrzymaniu i regulacji funkcji genomu [17,21,24,76]. Bodaj najbardziej fascynującą i intrygującą właściwością jądra komórki diploidalnej jest zdolność przemiany w haploidalne jądro plemnika. Plemniki tradycyjnie są uważane za swoistych „doręczycieli”, których jedyną funkcją jest dostarczenie zygocie genomu ojcowskiego. Pogląd ten wynika z obserwacji, że w główce plemnika znajduje się duże jądro komórkowe a cytoplazmatyczna część komórki jest ekstremalnie zredukowana i nie wykazuje większości, lub nawet żadnych funkcji metabolicznych, typowych dla komórek somatycznych. W ostatnich kilku latach, ze względu na odkrycie w plemniku nowych cząsteczek, takich jak RNA i białka, pogląd ten ewoluje i obecnie przeważa opinia, że plemnik jest również nośnikiem cząsteczek krytycznych dla wczesnego rozwoju embrionu [1]. Plemnik jest przykładem jednego z najbardziej zróżnicowanych typów komórek a chromatyna haploidalnego genomu plemnika różni się istotny sposób od komórki somatycznej składem chemicznym, strukturą i funkcją. Plemnik jest końcowym produktem spermatogenezy, która zaczyna się w komórkach nabłonka gametogenicznego (spermatogoniach), mających chromatynę typu somatycznego. Niektóre ze spermatogonii przechodzą podziały mejotyczne, w wyniku których różnicują się spermatocyty I i II rzędu, transformujące się w haploidalne okrągłe spermatydy. Następnie podczas spermiogenezy, tj. haploidalnego etapu dojrzewania plemnika, okrągłe spermatydy przechodzą fazę elongacji. W tym okresie następuje większość biochemicznych i morfologicznych przemian, prowadzących do ukształtowania jądra komórkowego plemnika, w którym chromatyna jest zorganizowana w transkrypcyjnie nieaktywną, maksymalnie skondensowaną konformację. Finalnie ukształtowane jądro plemnika, o wymiarach około 8 μm długości i 3 μm szerokości, stanowi tylko 5% objętości jądra diploidalnej komórki somatycznej [83]. Przemiana ta jest przede

wszystkim wynikiem zastąpienia histonów przez protaminy, w konsekwencji czego DNA w chromatynie plemnika nie jest superhelikalnie skręcony. Po fuzji plemnika z komórką jajową (ocytem), przed pierwszym podziałem mitotycznym zygoty, zachodzi proces odwrotny. Zatem związek między konformacją chromatyny typu somatycznego i konformacją plemnikową wyraża się zdolnością do dwukierunkowej przemiany obu strukturalnych typów chromatyny. Nie jest całkowicie wyjaśnione, czemu ma służyć tak radykalna zmiana konformacji i w rezultacie swoista budowa chromatyny plemnika. Sugeruje się, że swoista budowa chromatyny plemnika umożliwia spełnienie funkcji, jaką plemniki odgrywają w procesie zapłodnienia:

- (i) transport i ochrona ojcowskiej informacji genetycznej podczas przejścia przez żeńskie drogi rozrodcze, a następnie przez osłonkę przejrzystą (*zona pellucida*) komórki jajowej oraz
- (ii) zabezpieczenie chromatyny plemnika przed uszkodzeniami fizyko-chemicznymi.

Nie można jednak wykluczyć alternatywnej, wielce intrygującej możliwości, że przemiana chromatyny typu somatycznego na plemnikowy może również służyć takiemu przeprogramowaniu genomu, który zapewnia odpowiednim genom z chromosomów ojcowskich ekspresję na najwcześniejszych etapach embriogenezy. Trzeba podkreślić, że w przeciwieństwie do jądra komórki somatycznej, którego funkcje są lepiej poznane, w wypadku plemników zależności między organizacją chromatyny a funkcją plemnika są znacznie słabiej wyjaśnione, a odkrywanie tajemnic wewnątrzjądrowej architektury plemnika jest dopiero w trakcie badań. Ostatnie lata wykazały, że architektura jądra plemnika jest swoista i dobrze określona, natomiast jej znaczenie wciąż pozostaje do wyjaśnienia [58,92,93]. Wydaje się to istotne, szczególnie w kontekście hipotezy, że w jądrze somatycznej komórki diploidalnej architektura wewnątrzjądrowa jest jedną z integralnych części epigenetycznych mechanizmów przestrzennych [17,19].

Przedstawiona praca podsumowuje bieżącą wiedzę na temat wewnątrzjądrowej architektury plemnika.

2. STRUKTURA CHROMATYNY PLEMNIKA

Swoista struktura chromatyny dojrzałego plemnika jest związana z odwracalnym stanem „uśpienia” genomu, w któ-



rym nie zachodzi ani replikacja, ani transkrypcja. Pod tym względem jądro plemnika oferuje unikatowy model do porównania organizacji genomu aktywnego w przeciwieństwie do nieaktywnego.

2.1. Częsteczki budujące chromatynę plemnika

Według powszechnie uznawanego modelu dotyczącego budowy chromatyny komórek somatycznych, podstawową jednostkę struktury tworzą nukleosomy, czyli odcinki DNA o długości 200 pz owinięte prawie dwukrotnie wokół oktameru histonowego. Z kolei 6 nukleosomów owiniętych jeden obok drugiego tworzą skręt, budując w ten sposób konfigurację włókna solenoidu o średnicy około 30 nm. Włókna solenoidu w postaci pętli (tzw. domen) są związane z macierzą jądrową. Ostatnim stopniem kondensacji pętli solenoidowych są chromosomy mitotyczne w stadium metafazy [18,21,36,77].

W chromatynie plemnika, w porównaniu z DNA komórek somatycznych, znaczących różnic nie ma jedynie na poziomie podwójnej helisy DNA. W chromatynie dojrzalego plemnika nukleosomy zastąpione są kompleksami DNA-protaminy, które nie są (lub są w minimalnym stopniu) superhelikalnie skręcone. W porównaniu z histonami, protaminy są białkami o połowę mniejszymi z dwukrotnie większą zawartością reszt argininy (50–70%) i cysteiny. W pierwszym modelu Balhorna z 1982 roku [4] sugerowano, że protaminy układają się wzdłuż wąskiego rowka podwójnej helisy DNA wiążąc się z nim poprzez centralną domenę, a wyeksponowane długie łańcuchy reszt argininy neutralizują ujemny ładunek fosfodiesterowego szkieletu DNA. W ten sposób polianionowy DNA ulega przekształceniu w neutralny polimer. Stabilność tego układu dodatkowo wzmacniają mostki dwusiarczkowe reszt cysteiny [12,77].

Konsekwencją odmiennej charakterystyki molekularnej kompleksu DNA-protaminy w plemnikach są różnice na wszystkich poziomach organizacji chromatyny/chromosomów w porównaniu z komórkami somatycznymi [58].

2.2. Białka przejściowe

Spektakularna przemiana chromatyny somatycznej w plemnikową jest kilkietapowym procesem, który zachodzi w haploidalnej fazie spermatogenezy, podczas przemiany okrągłych i podłużnych spermatyd w plemniki. Wstępem do zamiany somatycznych histonów przez protaminy jest rozluźnienie struktury nukleosomu, poprzedzone acetylacją histonu H4 [55] oraz ubikwitynacją histonów H2B i H3 [40]. Dokładny mechanizm tej relaksacji nie jest poznany, jednak znamienne wydaje się to, iż acetylotransferaza CDY (kodowana na chromosomie Y i katalizująca acetylację histonów) jest enzymem swoistym jądrowo, obecnym w jądrach spermatyd w okresie hiperacetytacji histonu H4 [44]. W chromatynie okrągłych spermatyd około 90% histonów zostaje zastąpionych przez tzw. białka przejściowe TP (transition proteins), z których najlepiej są scharakteryzowane TP1 (około 50%) i TP2 (około 40%). Białko TP1, zbudowane z 54 aminokwasów, jest bogate w argininę, lizynę i serynę [54]. Wykazano, że TP1 bierze udział w procesie naprawy DNA [14]. Dwukrotnie większe białko TP2 zawiera na karboksylowym końcu aminokwasy zasa-

dowe, a na końcu aminowym dwa palce cynkowe. W TP2 zarówno seryna Ser109 jak i treonina Thr101 są potencjalnymi miejscami fosforylacji poprzez cAMP-zależną kinazę białkową A (enzym PKA). Właśnie fosforylacja TP2 jest związana z mniejszą kondensacją DNA, ułatwiającą przyłączenie protamin [54].

Wraz z oddysocjowaniem większości histonów, pojawieniem się białek TP, zanikiem struktury nukleosomów i elongacją okrągłych spermatyd, ustaje w spermatydach aktywność transkrypcyjna. Zahamowanie transkrypcji może być związane z przyłączeniem się białek TP do niezmetylowanych wysp CpG, występujących w aktywnie transkrybowanych genach.

2.3. Protaminy

W wydłużonych spermatydach białka przejściowe TP zostają zastąpione protaminami [3]. Protaminy są małymi zasadowymi białkami o masie cząsteczkowej 4000–12000 Da. Są dwa typy protamin: protamina 1 (P1) występująca u prawie wszystkich ssaków [68] oraz protamina 2 (P2), obecna u człowieka i u kilku innych gatunków [8,53,64]. Ilość protaminy P2 jest gatunkowo różna: 67% u człowieka, 43% u chomika, 34% u myszy [9]. Ludzka protamina P1 (57 aminokwasów) wykazuje około 50% homologii do P2 [53]. Ewolucyjnie, protaminy wywodzą się z histonu H1 [47,61]. Różnią się jednak od H1 małą zawartością lizyny i ponad 50% zawartością argininy, odpowiedzialnej za dużą zdolność do tworzenia wiązań hydrofobowych z grupami guanidynowymi DNA [66]. Pojedyncze kopie genów ludzkich protamin P1, P2, a także białka TP2, są zlokalizowane w wielogenowym *locus* 16p13.13, tworząc pojedynczą domenę 28.5 kpz. Geny te zawierają jeden intron, elementy kasety TATA oraz CRE (cAMP-response element). Transkrypcja genów protamin zachodzi z haploidalnego genomu w okrągłych spermatydach, a 2–8 dni później ten mRNA ulega translacji. Wkrótce po syntezie protaminy ulegają fosforylacji. Protamina P2 ulega fosforylacji poprzez kinazę Camk4 (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV) lub poprzez kinazę CK2 (cAMP- and Ca²⁺-independent kinase II) [88]. Natomiast wszystkie protaminy P1 zawierają krótką domenę (RS) bogatą w argininę i serynę, która ulega fosforylacji z udziałem enzymu SRPK1 (SR protein kinase 1) [62]. Sugeruje się, iż w wydłużonych spermatydach fosforylacja protamin jest niezbędna do ich okresowej asocjacji z receptorem lamininy B, tj. białkiem wewnętrznej błony jądrowej. Ostateczne wbudowanie protamin do chromatyny plemnika jest poprzedzone ich defosforylacją [59]. W rezultacie, w chromatynie wydłużonych spermatyd białka przejściowe TP są zastąpione protaminami.

Protaminy wiążą się wzdłuż fosfodiesterowego szkieletu DNA, niezależnie od sekwencji nukleotydów. Jedna cząsteczka protaminy wiąże się do jednego skrętu DNA (około 11 pz DNA). Mechanizm, dzięki któremu protaminy uczestniczą w tym procesie, stanowi dotąd przedmiot dyskusji, stwierdzono bowiem, że w warunkach *in vitro* protaminy mogą wiązać się z DNA w szerszym rowku [5,25,67,82], zarówno w szerszym jak i węższym rowku [20], względnie elektrostatycznie do powierzchni DNA [10]. Ze względu na wyniki uzyskane ze spektroskopii Ramana przeważa jednak opinia, że w chromatynie plemnika protaminy wiążą

zą się z DNA w szerszym rowku [5]. Protaminy (a także inne polikationy testowane w badaniach *in vitro*) przyłączając się do DNA powodują związanie się cząsteczki DNA w szerokie, koncentryczne kręgi, tym samym tworząc postać przypominającą szpulkę nici. Nakładające się na siebie kręgi ulegają silnej kondensacji i powstaje struktura toroidu zawierająca około 50 kpz DNA [38,39]. Jądro plemnika ma około 50 000 toroidów [13]. Doświadczenia *in vitro* nad kondensacją i dekonduacją DNA wykazały, że formowanie toroidu i jego stabilność zależy od liczby domen białkowych bogatych w reszty argininowe. Kondensacja DNA w toroid zachodzi, gdy 90% ładunków wzdłuż cząsteczki DNA ulegnie zneutralizowaniu. Natomiast na modelu doświadczalnym dekonduacja DNA poprzez oddysocjowanie białek postępowała w takim tempie, że odłączenie protamin od genomu plemnika ($1,5 \times 10^9$ pz) wymagałoby około 6 lat. Jednak *in vivo* dekonduacja chromatyny plemnika w cytoplazmie komórki jajowej trwa od 6–10 min, co potwierdza hipotezę, że po zapłodnieniu protaminy muszą być aktywnie usuwane z DNA [13].

2.4. Warianty histonów

Niezwykły skład chromatyny plemnika, który jest wynikiem procesów zachodzących podczas spermatogenez, kryje w sobie jeszcze jedną swoistą cechę: w dojrzałym ludzkim plemniku 10–15% DNA pozostaje związane z histonami. Nukleosomy w plemniku są ściślej upakowane niż w komórkach somatycznych i zawierają warianty jądrowe histonów. Pewne ilości swoistych jądrowo wariantów histonów pojawiają się już w spermatogoniach, stąd sugeruje się, że mogą być niezbędne w procesach unikatowych dla mejozy. Większość tych wariantów jest syntetyzowana i inkorporowana do chromatyny w spermatocytach podczas mejozy [22,28,42].

Liczba wszystkich wariantów histonów występujących w męskich komórkach germinalnych jest niezwykle duża w porównaniu z komórkami somatycznymi [16,46]. Warianty te wyróżnia od ich odpowiedników somatycznych wiele cech:

- (i) różnice w sekwencjach aminokwasów (często łącznie z różnicami strukturalnymi),
- (ii) brak koordynacji replikacji DNA z syntezą mRNA dla wariantów histonów,
- (iii) brak na końcu 3' transkryptów struktury „stem-loop” przy jednoczesnej obecności długiego łańcucha poly-A oraz
- (iv) występowanie genów pojedynczo (a nie w grupach, tzw. clusters) i możliwa obecność intronów [42].

Obecność wariantów histonów umożliwia utrzymanie struktury nukleosomu i tym samym postmejozytyczną ekspresję genów z haploidalnego genomu w okrągłych spermatydach. Jednocześnie warianty te pełnią sygnałową rolę na poszczególnych etapach wymiany histonów na protaminy. Pierwsze wymiany histonów somatycznych na warianty gonadowe zachodzą już w diploidalnych spermatogoniach, w których histon H3 zostaje zastąpiony przez wariant TH3. Opisano jeszcze dwa inne warianty histonu H3: wariant H3.3A obecny w chromatynie do etapu różnicowania wydłużonych spermatyd, oraz wariant H3.3B związany z euchromatyną spermatocytów, co sugeruje jego wpływ na regulację aktywności transkrypcyjnej [11]. Znamienny

natomiast wydaje się fakt, iż obecny w centromerach chromosomów komórek somatycznych wariant histonu H3, tj. CENP-A (centromere protein A) nie jest zastępowany innym wariantem w trakcie spermiogenezy [42].

W spermatocytach, w stadium preleptotennym mejozy, histon H2A ulega wymianie na TH2A a histon H2B – TH2B [42]. Wewnątrzjądrowa lokalizacja TH2A jest na tyle charakterystyczna, że sugeruje jego asocjację ze swoistymi domenami chromatynowymi [93]. Następnie, w pachytenie, somatyczne histony H1A i H1B zastępowane są przez wariant H1t. Z kolei w okrągłych spermatydach, pojawia się wariant H1t2. Występuje on w regionie formowania akrosomu, który jest jednocześnie miejscem inicjacji kondensacji chromatyny. H1t2 ze względu na swe wysoce selektywne wewnątrzjądrowe rozmieszczenie wydaje się równie istotny w reorganizacji chromatyny jak protaminy [49,79]. Swoisty jedynie dla wydłużonych spermatyd jest wariant H1LS1 (histone H1-like protein in spermatids). Wewnątrzjądrowa lokalizacja tego wariantu jest taka sama jak TP2 i protaminy 1 (P1), co wskazuje na jego bezpośredni związek z kondensacją chromatyny [90]. Natomiast odpowiednikiem somatycznego histonu H4 jest gonadowy histon H4.

We wczesnych okrągłych spermatydach liczba histonów zastąpionych przez ich warianty przekracza 50%, ale nadal zachowana pozostaje struktura nukleosomu i aktywność transkrypcyjna. Aktywność transkrypcyjna ustaje wraz z oddysocjowaniem histonu H1t i większości histonów (a także ich wariantów) i pojawieniem się białek przejściowych TP.

Skoro jednak, mimo tak radykalnej przebudowy struktury i składu chromatyny, w dojrzałym plemniku pozostaje około 15% histonów tworzących strukturę nukleosomów, powstaje pytanie zarówno o ich szczegółową lokalizację, jak i znaczenie tego faktu. Wykazano, że w plemniku regiony telomerowe wszystkich chromosomów mają strukturę nukleosomów. Charakterystyczną cechą tych nukleosomów jest obecność wariantu histonu spH2B [29,89,93]. Stwierdzono, że obecne w DNA plemnika domeny, które wykazują wrażliwość na działanie nukleaz (egzo- i endogennych) zawierają histony i umiejscowione są peryferyjnie [65]. Badania nad strukturą chromatyny plemnikowej, w regionie rodziny genów β -globiny, wykazały, że geny ϵ -globiny i γ -globiny, ulegające ekspresji we wczesnym okresie rozwoju embrionalnego są wzbogacone w histony, natomiast geny δ -globiny oraz β -globiny (ekspresja w późniejszym rozwoju) w protaminy [26]. Podlegające ojcowskiemu piętnowaniu allele genu *IGF-2* również mają w chromatynie plemnika zachowaną strukturę nukleosomu [6].

W związku z obecnością histonów w chromatynie plemnika nasuwa się intrygująca sugestia, że nukleosomy w chromatynie plemnika są wyznacznikiem genów, które ulegają transkrypcji na początkowym etapie rozwoju zarodka. Zatem histony w chromatynie plemnika mogłyby być związane z epigenetyczną kontrolą zróżnicowanej ekspresji genów podczas rozwoju embrionalnego. Alternatywną możliwością jest założenie, że histony w chromatynie plemnika są związane ze wszystkimi sekwencjami DNA kodującymi białka. Obydwe wspomniane możliwości pozostają na razie w sferze hipotez.



3. MODEL STRUKTURY CHROMATYNY PLEMNIKA

Przedstawiony niżej model, nazwany „the donut-loop model”, stanowi próbę opisanego, w jaki sposób w plemniku u ssaków cząsteczka DNA uczestniczy w budowie chromatyny [83]. Model ten nie opisuje sekwencji procesów molekularnych, ale jest podsumowaniem aktualnych poglądów na temat organizacji struktury chromatyny plemnika. Jednocześnie model „donut-loop” odpowiada takiej wizji chromatyny plemnika, w której struktura odgrywa bezpośrednią rolę w funkcji plemnika.

Na pierwszym poziomie struktury chromosomów plemnikowych, DNA jest zorganizowany na całej długości w postaci wypętlonych domen (loop domains) o długości około 50 kbp [7,52,83,86]. Domeny te są komórkowo swoiste i ulegają zmianom w trakcie spermatogenezy [43,60]. Wielkość tych domen jest prawie dwukrotnie mniejsza w porównaniu ze średnią wielkością domen w jądrach komórek somatycznych, przy czym to zmniejszenie nie wydaje się wynikać bezpośrednio z haploidalności genomu plemnika [86]. Każda z domen DNA w chromosomach plemnika ma u swej podstawy specyficzne sekwencje nazwane MARs (matrix attachment regions), poprzez które DNA wiąże się z macierzą jądrową, pełniąc funkcję wewnątrzjądrowego szkieletu [41,44,51,69,84].

Wiadomo, że w przypadku jąder komórek somatycznych domeny stanowiące pętle włókien solenoidów występują zarówno w chromosomach interfazowych, jak i w chromosomach mitotycznych; są one strukturami dynamicznymi, zmieniającymi się wraz z funkcjonalnymi zmianami w jądrze komórkowym [15,27,78,81]. W komórkach somatycznych domeny są związane z macierzą jądrową w sposób korelujący z funkcją DNA [35,63,76].

Model „donut-loop” zakłada, że podczas spermiogenezy pojedyncza domena DNA łącząc się z protaminami tworzy jeden toroid [83]. Znajdujące się pomiędzy toroidami sekwencje MAR tworzą odcinki łącznikowe (toroid linker regions). Odcinki łącznikowe między toroidami nie są związane z protaminami i pozostają niezmiennione w trakcie spermiogenezy [43,72]. Istnieją przesłanki wskazujące na możliwość, że właśnie te łącznikowe odcinki DNA pozostają związane z histonami (wariantami) i mają zachowaną strukturę nukleosomów [72,74], podobnie jak regiony subtelomerowe chromosomów plemnika [29,89,93].

Opisana w modelu „donut loop” strukturalna organizacja plemnikowego DNA jest stała i niezwiązana z dużą zmiennością morfologii plemników, obserwowaną w standardowej analizie nasienia [2]. Sugerowano, że taka organizacja DNA jest niezbędna do rozpoczęcia prawidłowej embriogenezy, bowiem jak się przypuszcza, miejsca wiązania DNA z macierzą jądrową są miejscami inicjacji transkrypcji i replikacji. Zatem po zapłodnieniu, domeny pełniłyby rolę funkcjonalnych podjednostek [57,75,85]. Wprowadzono nawet pojęcie „trójwymiarowego kodu genetycznego” dla podkreślenia, że oprócz informacji genetycznej zawartej w sekwencjach DNA, również strukturalna organizacja haploidalnego genomu plemnika dostarcza ważnych informacji epigenetycznych [75]. W doświadczeniach, w których wprowadzano do mysich oocytów (za pośrednictwem mikromanipulacji) jądra komórkowe plemni-

ków po uprzednim wypłukaniu z nich protamin wykazano, że nienaruszona integralność macierzy jądrowej i związanych z nią domen DNA była niezbędnym, ale jednocześnie wystarczającym czynnikiem do wykształcenia prawidłowych chromosomów mitotycznych [57,75].

Na podstawie modelu „donut-loop” nie można stwierdzić, w jaki sposób nukleoprotaminowe toroidy oddzielone łącznikowymi odcinkami tworzą struktury wyższego rzędu i kształtują chromosomy.

Mudrak i wsp. [58] zaproponowali model struktur chromosomów plemnika organizacyjnie wyższych w stosunku do „donut-loop”. Model ten powstał na podstawie analizy obrazów trójkolorowego FISH (fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*) z użyciem sond malujących ramiona krótkie (p) oraz długie (q) indywidualnych chromosomów w jądrach plemników, poddawanych stopniowo wzrastającej dekondensacji. Zaobserwowano, że zarówno ramiona p, jak i q są zbudowane z włókien chromatyny o szerokości około 1000 nm każde. Włókno 1000 nm jest złożone z dwóch połączonych globularnych struktur (2×500 nm), tworzących rowek wzdłuż długości włókna. Przyjmując wymiary toroidu jako 25×60–100 nm, w modelu zakłada się, że każda z globularnych struktur miałaby być utworzona przez 100–200 toroidów, co odpowiadałoby 3–5 Mbp DNA.

Model zaproponowany przez Mudrak i wsp. opisuje struktury większe aniżeli 300 nm, zatem brak jest ogniw, które łączyłyby go bezpośrednio z modelem „donut-loop” [58].

4. WEWNĄTRZJĄDROWA ARCHITEKTURA PLEMNIKA

Osią hipotezy dotyczącej architektury wewnątrzjądrowej plemnika jest założenie, że każdy chromosom zajmuje indywidualny obszar, tzw. terytorium chromosomowe (chromosome territory – CT), którego umiejscowienie w jądrze komórkowym jest określone i nieprzypadkowe [33,92,94]. Założenie to wynika z analizy sygnałów uzyskiwanych metodą FISH po zastosowaniu sond malujących (całe) ramiona chromosomów i sond centromerowych. Tym sposobem wykazano, m.in. preferencyjną lokalizację chromosomów 2, 5, 6, i 18 u człowieka w tzw. bazalnej części jądra plemnika (tj. sąsiadującej z witką) a chromosomów 1, 7 i X w tzw. części apikalnej (tj. sąsiadującej z akrosomem) [48,93]. Są dowody, że chromosomy w ludzkim plemniku zajmują również określoną pozycję radialną: np. chromosomy 6 i 7 bardziej peryferyjną a 16 oraz X wewnętrzną [93]. Natomiast dla chromosomu 13 obserwowano raczej przypadkową lokalizację [34]. Jednak w badaniach, w których analizowano wewnątrzjądrowe umiejscowienie pięciu chromosomów akrocentrycznych jednocześnie, wykazano, że ich centromery skupiają się w określonym obszarze zajmującym około 8% objętości jądra plemnika. Subakrosomową lokalizację chromosomu X potwierdzono również w jądrach komórkowych plemników u torbaczy i stekowców [30,31,87]. W związku z tym, że jest to jednocześnie umiejscowienie bliskie miejsca pierwszego kontaktu plemnika z cytoplazmą komórki jajowej po raz pierwszy zwrócono uwagę, że umiejscowienie chromosomów może mieć znaczenie funkcjonalne [48,80]. Wewnątrzjądrowa pozycja chromosomu w plemniku mogłaby określać kiedy i które domeny poszczególnych chromosomów ulegają dekondensacji i przebudowie poprzedzającej ekspresję genomu ojcowskiego. Co

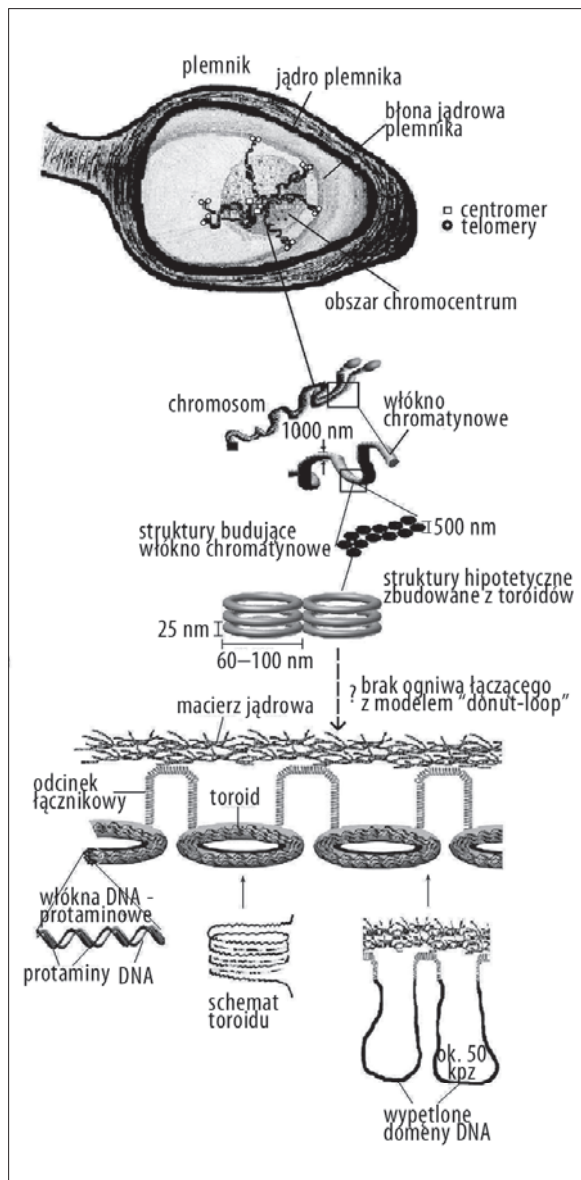
ciekawe, w badaniach na plemnikach świni zaobserwowano, że wewnątrzjądrowe umiejscowienie m.in. chromosomów X i Y (analizowano również chromosomy 5 i 13) ulega w trakcie spermatogenezy reorganizacji i w konsekwencji w plemniku jest odmienna od tej w spermatocytach [23]. Z większości badań wynika, że w jądrze ludzkiego plemnika terytoria chromosomowe mają wydłużony kształt i leżą równoległe do dłuższej osi plemnika [58]. Jedynie terytorium chromosomu 13 wykazywało zarówno wydłużony jak i okrągły kształt. Zarówno terytoria [58] jak i chromatyna [33,84] poszczególnych chromosomów są kilkakrotnie (4–6-krotnie) silniej skondensowane w porównaniu z chromosomami w stadium metafazy.

Stwierdzono, iż heterochromatyna centromerów chromosomów plemnika tworzy skondensowane zgrupowanie w wyodrębnionym, centralnym regionie jądra plemnika, który to region nazwano chromocentrum [92]. Chromocentrum wyodrębnia się podczas spermiogenezy i jest strukturą unikatową dla haploidalnych spermatyd. Czynniki odpowiedzialne za formowanie chromocentrum nie są jeszcze znane. Wiadomo jednak, że z heterochromatyną chromocentrum, zarówno w spermatydach jak i w dojrzałym plemniku, zassocjowane jest białko HP1 β (heterochromatin protein 1 β) [37]. Jednym z czynników, któremu przypisuje się istotną rolę w organizacji chromocentrum w okrągłych spermatydach, jest czynnik TLF (TBP-like factor), białko, które wchodzi w interakcje z czynnikami transkrypcyjnymi wiążącymi się do sekwencji TATA [50]. W związku z tym, że chromocentrum ma określoną pozycję wewnątrzjądrową, nasuwa się przypuszczenie, że poprzez heterochromatynę centromerów może mieć ono bezpośredni kontakt z macierzą jądrową. Jednak bezpośrednio takich asocjacji dotąd nie przedstawiono [58].

W przeciwieństwie do centromerów, telomery chromosomów umiejscawiają się w pobliżu wewnętrznej błony jądra komórkowego plemnika, tworząc dimery i tetrametry [71]. Wykazano, że dimery powstają w wyniku swoistej interakcji telomerów ramion krótkich (p) i długich (q) tego samego chromosomu, co oznacza, że chromosomy tworzą pętle, przybierając konformację „szpilki do włosów” (hairpin). Dimery telomerów są zakotwiczone do wewnętrznej części błony jądrowej [29,33]. Zdolność telomerów do asocjacji wynika z obecności swoistych struktur chromatyny zlokalizowanych na końcach ramion p oraz q. Przypuszczalnie w genomie ojcowskim właśnie telomery jako pierwsze mają bezpośredni kontakt z cytoplazmą komórki jajowej, a opisana wyżej konformacja jest niezbędna do prawidłowej dekondensacji chromatyny w przedjądrze męskim, co jest warunkiem prawidłowego rozwoju zygoty [71]. Trzeba w tym miejscu podkreślić, iż już z wcześniejszych badań wiadomo, że chronologia i charakterystyka aktywacji genów w zygocie zależy bardziej od zmian struktury chromatyny niż od aktywacji czynników transkrypcyjnych [70].

Przedstawiona wyżej topologia chromosomów w jądrze ludzkiego plemnika dotyczy prawdopodobnie wszystkich chromosomów, trzeba jednak zaznaczyć, iż w przypadku chromosomów akrocentrycznych i małych metacentrycznych danych doświadczalnych jest niewiele.

Ilustrację hipotez dotyczących zarówno chromocentrum i peryferyjnej lokalizacji telomerów chromosomów plem-



Ryc. 1. Ilustracja hipotez dotyczących architektury wewnątrzjądrowej w jądrze ludzkiego plemnika: model chromocentrum oraz „donut-loop model” [58, 83, 92]. Szczegóły w tekście (rozdz. 3 i 4)

nika [92], budowy włókien chromatyny [58] jak i modelu „donut-loop” [83] stanowi ryc. 1.

Badania dotyczące architektury wewnątrzjądrowej plemników u innych gatunków są nieliczne, wskazują jednak, że podstawowe zasady organizacji są podobne u wszystkich ssaków [24,30,31,56,58]. Natomiast w plemnikach ptaków nie stwierdzono ściśle określonej lokalizacji chromosomów; stąd pojawiły się nawet spekulacje, iż ta różnica w stosunku do ludzkich plemników mogłaby być cechą dywergencji ptaków i ssaków [71].

Trzeba również pamiętać, że stosowane dotychczas procedury badawcze do analizy topologii chromosomów plemnikowych wymagały wcześniejszego utrwalania plemników i ich nieznacznej dekondensacji. Choć wykazano, że procedury te nie powinny zmieniać topologii chromoso-



mów [58], jednak kształtując nasze wyobrażenie o architekturze wewnątrzjądrowej *in vivo*, na podstawie uzyskanych wyników, trzeba zachować ostrożność.

PODSUMOWANIE

Jądro komórkowe dojrzałego ludzkiego plemnika stanowi unikatowy model do porównania wewnątrzjądrowej organizacji aktywnego diploidalnego genomu w stosunku do haploidalnego genomu nieaktywnego. Podstawową jednostką strukturalną haploidalnego genomu plemnika są nukleoprotaminowe toroidy. Chromatyna w plemniku jest wysoce skondensowana i upakowana w 23 nukleoprotaminowe chromosomy, w których nie zachodzi ani replikacja, ani transkrypcja. W architekturze wewnątrzjądrowej plemnika centralnym elementem, analogicznym do komórek diploidalnych, jest organizacja chromatyny indywidualnych chromosomów w postaci wyodrębnionych obszarów, tzw. terytoriów (CT). W plemniku,

terytoria mają określone, nieprzypadkowe wewnątrzjądrowe umiejscowienie. Chromosomy w obrębie swego terytorium wykazują swoistą konfigurację „szpilki do włosów”. Centromery chromosomów plemnika są skierowane do wnętrza jądra, gdzie grupują się tworząc wyodrębniony obszar zwany „chromocentrum”. Natomiast telomery ramion p oraz q tego samego chromosomu tworzą dimery umiejscowione peryferyjnie. Sugeruje się, że telomery mogą być pierwszą strukturą genomu ojcowskiego uczestniczącą w wydarzeniach podczas formowania się męskiego przedjądrza, na najwcześniejszych etapach rozwoju zarodka.

Choć implikacje do przedstawionej w niniejszym przeglądzie topologii chromosomów nie są jeszcze wyjaśnione, obecnie przeważa pogląd, iż prawdopodobnie przestrzenna organizacja haploidalnego męskiego genomu zawiera ważne epigenetyczne informacje, krytyczne zarówno dla funkcji plemnika jak i dla wczesnego rozwoju zarodka.

PIŚMIENICTWO

- [1] Ainsworth C.: The secret life of sperm. *Nature*, 2005; 436: 770–771
- [2] Ankem M.K., Mayer E., Ward W.S., Cummings K.B., Barone J.G.: Novel assay for determining DNA organization in human spermatozoa: implications for male factor infertility. *Urology*, 2002; 59: 575–578
- [3] Aoki V., Carrell D.T.: Human protamines and the developing spermatozoa: their structure, function, expression and relationship with male infertility. *Asian J. Androl.*, 2003; 5: 315–324
- [4] Balhorn R.: A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J. Cell Biol.*, 1982; 93: 298–305
- [5] Balhorn R., Cosman M., Thornton K.: Protamine mediated condensation of DNA in mammalian sperm. *The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Application*. C. Gagnon, Ed. (Cache River Press, Vienna, IL, 1999) pp. 55–70
- [6] Banerjee S., Smallwood A.: Chromatin modification of imprinted H19 gene in mammalian spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, 1998; 50: 474–484
- [7] Barone J.G., De Lara J., Cummings K.B., Ward W.S.: DNA organization in human spermatozoa. *J. Androl.*; 1994; 15: 139–144
- [8] Bellve A., McKay D., Renaux B.S., Dixon G.H.: Purification and characterization of mouse protamines P1 and P2. Amino acid sequence of P2. *Biochemistry*, 1988; 27: 2890–2897
- [9] Bench G.S., Friz A.M., Corzett M.H., Morse D.H., Balhorn R.: DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects. *Cytometry*, 1996; 23: 263–271
- [10] Bianchi F., Rousseaux-Prevost R., Bailly C., Rousseaux J.: Interaction of human P1 and P2 protamines with DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994; 201: 1197–1204
- [11] Bramlage B., Kosciessa U., Doenecke D.: Differential expression of the murine histone genes H3.3A and H3.3B. *Differentiation*, 1997; 62: 13–20
- [12] Braun R.E.: Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat. Genet.*, 2001; 28: 10–12
- [13] Brewer L.R., Corzett M., Balhorn R.: Protamine-induced condensation and decondensation of the same DNA molecule. *Science*, 1999; 286: 120–123
- [14] Caron N., Veilleux S., Boissonneault G.: Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein. *Mol. Reprod. Dev.*, 2001; 58: 437–443
- [15] Chambeyron S., Bickmore W.A.: Does looping and clustering in the nucleus regulate gene expression? *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2004; 16: 256–262
- [16] Churikov D., Zalenskaya I.A., Zalensky A.O.: Male germline-specific histones in mouse and man. *Cytogenet. Genome Res.*, 2004; 105: 203–214
- [17] Claussen U.: Chromosomics. *Cytogenet. Genome Res.*, 2005; 111: 101–106
- [18] Cremer T., Cremer C.: Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat. Rev. Genet.*, 2001; 2: 292–301
- [19] Cremer T., Kupper K., Dietzel S., Fakan S.: Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function. *Biol. Cell.*, 2004; 96: 555–567
- [20] D'auria G., Paolillo L., Sartorio R., Wurzbürger S.: Structure and function of protamines and nuclear magnetic resonance investigation of the interaction of cuplines with mononucleotides. *Biochem. Biophys. Acta*, 1993; 1162: 209–216
- [21] Dehghani H., Dellaire G., Bazett-Jones D.P.: Organization of chromatin in the interphase mammalian cell. *Micron*, 2005; 36: 95–108
- [22] Doenecke D., Drabent B., Bode C., Bramlage B., Franke K., Gavenis K., Kosciessa U., Witt O.: Histone gene expression and chromatin structure during spermatogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1997; 424: 37–48
- [23] Foster H.A., Abeydeera L.R., Griffin D.K., Bridger J.M.: Non-random chromosome positioning in mammalian sperm nuclei, with migration of the sex chromosomes during late spermatogenesis. *J. Cell Sci.*, 2005; 118: 1811–1820
- [24] Foster H.A., Bridger J.M.: The genome and the nucleus: a marriage made by evolution. *Genome organization and nuclear architecture*. *Chromosoma*, 2005; 114: 212–229
- [25] Fuentes-Mascorro G., Serrano H., Rosado A.: Sperm chromatin. *Arch. Androl.*, 2000; 45: 215–225
- [26] Gardiner-Garden M., Ballesteros M., Gordon M., Tam P.P.: Histone and protamine-DNA association: conservation of different patterns within the beta-globin domain in human sperm. *Mol. Cell Biol.*, 1998; 18: 3350–3356
- [27] Gasser S.M.: Visualizing chromatin dynamics in interphase nuclei. *Science*, 2002; 296: 1412–1416
- [28] Gatewood J.M., Cook G.R., Balhorn R., Bradbury E.M., Schmid C.W.: Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science*, 1987; 236: 962–964
- [29] Gineitis A.A., Zalenskaya I.A., Yau P.M., Bradbury E.M., Zalensky A.O.: Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. *J. Cell. Biol.*, 2000; 151: 1591–1598
- [30] Greaves I.K., Rens W., Ferguson-Smith M.A., Griffin D., Marshall-Graves J.A.: Conservation of chromosome arrangement and position of the X in mammalian sperm suggest functional significance. *Chromosome Res.*, 2003; 11: 503–512
- [31] Greaves I.K., Svartman M., Wakefield M., Taggart D., De Leo A., Ferguson-Smith M.A., Rens M.A., O'Brien P.C., Voullaire L., Westerman M., Greaves J.A.: Chromosomal painting detects non-random chromosome arrangement in dasyurid marsupial sperm. *Chromosome Res.*, 2001; 9: 251–259
- [32] Gurevitch M., Amiel A., Ben-Zion M., Fejgin M., Bartoov B.: Acrocentric centromere organization within the chromocenter of the human sperm nucleus. *Mol. Reprod. Dev.*, 2001; 60: 507–516

- [33] Haaf T., Ward D.C.: Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by *in situ* hybridization and extended chromatin fibers. *Exp. Cell Res.*, 1995; 219: 604–611
- [34] Hazzouri M., Rousseau S., Mongelard F., Usson Y., Pelletier R., Faure A.K., Vourc'h C., Sèle B.: Genome organization in the human sperm nucleus studied by FISH and confocal microscopy. *Mol. Reprod. Dev.*, 2000; 55: 307–315
- [35] Heng H.H., Goetze S., Ye C.J., Liu G., Stevens J.B., Bremer S.W., Wykes S.M., Bode J., Krawetz S.A.: Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions. *J. Cell Sci.*, 2004; 117: 999–1008
- [36] Horn P.J., Peterson C.L.: Chromatin higher order folding: wrapping up transcription. *Science*, 2002; 297: 1824–1827
- [37] Hoyer-Fender S., Singh P.B., Motzkus D.: The murine heterochromatin protein M31 is associated with the chromocenter in round spermatids and is a component of mature spermatozoa. *Exp. Cell Res.*, 2000; 254: 72–79
- [38] Hud N.V., Allen M.J., Downing K.H., Lee J., Balhorn R.: Identification of the elementary packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993; 193: 1347–1354
- [39] Hud N.V., Vilfan I.D.: Toroidal DNA condensates: unraveling the fine structure and the role of nucleation in determining size. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2005; 34: 295–318
- [40] Jason L.J., Moore S.C., Lewis J.D., Lindsey G., Ausio J.: Histone ubiquitination: a tagging tail unfold? *Bioessays*, 2002; 24: 166–174
- [41] Kalandadze A.G., Bushara S.A., Vaszetzky Y.S.Jr., Razin S.V.: Characterization of DNA pattern in the site of permanent attachment to the nuclear matrix located in the vicinity of replication origin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990; 168: 9–15
- [42] Kimmins S., Sassone-Corsi P.: Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature*, 2005; 434: 583–589
- [43] Klaus A.V., McCarrey J.R., Farkas A., Ward W.S.: Changes in DNA loop domain structure during spermatogenesis and embryogenesis in the Syrian golden hamster. *Biol. Reprod.*, 2001; 64: 1297–1306
- [44] Kramer J.A., Krawetz S.A.: Nuclear matrix interactions within the sperm genome. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 11619–11622
- [45] Lahn B.T., Tang Z.L., Zhou J., Barndt R.J., Parvinen M., Allis C.D., Page D.C.: Previously uncharacterized histone acetyltransferases implicated in mammalian spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 8707–8712
- [46] Lewis J.D., Abbott D.W., Ausio J.: A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochem. Cell Biol.*, 2003; 81: 131–140
- [47] Lewis J.D., Sapera N., Song Y., Zamora M.J., Chiva M., Ausio J.: Histone H1 and the origin of protamines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 4148–4152
- [48] Luetjens C.M., Payne C., Schatten G.: Non-random chromosome positioning in human sperm and sex chromosome anomalies following intracytoplasmic sperm injection. *Lancet*, 1999; 353: 1240
- [49] Martianov I., Brancorsini S., Catena R., Gansmuller A., Kotaja N., Parvinen M., Sassone-Corsi P., Davidson I.: Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 2808–2813
- [50] Martianov I., Brancorsini S., Gansmuller A., Parvinen M., Davidson I., Sassone-Corsi P.: Distinct functions of TBP and TLF/TRF2 during spermatogenesis: requirement of TLF for heterochromatic chromocenter formation in haploid round spermatids. *Development*, 2002; 129: 945–955
- [51] Martins R.P., Ostermeier G.C., Krawetz S.A.: Nuclear matrix interactions at the human protamine domain: a working model of potentiation. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 51862–51868
- [52] McCarthy S., Ward W.S.: Functional aspects of mammalian sperm chromatin. *Hum. Fertil.*, 1999; 2: 56–60
- [53] McKay D.J., Renaux B.S., Dixon G.H.: Human sperm protamines. Amino-acid sequences of two forms of protamine P2. *Eur. J. Biochem.*, 1986; 156: 5–8
- [54] Meistrich M.L., Mohapatra B., Shirley C.R., Zhao M.: Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma*, 2003; 111: 483–488
- [55] Meistrich M.L., Trostle-Weige P.K., Lin R., Bhatnagar Y.M., Allis C.D.: Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Mol. Reprod. Dev.*, 1992; 31: 170–181
- [56] Meyer-Ficca M., Muller-Navia J., Scherthan H.: Clustering of pericentromeres initiates in step 9 of spermiogenesis of the rat (*Rattus norvegicus*) and contributes to a well defined genome architecture in the sperm nucleus. *J. Cell Sci.*, 1998; 111: 1363–1370
- [57] Mohar I., Szczygiel M.A., Yanagimachi R., Ward W.S.: Sperm nuclear halos can transform into normal chromosomes after injection into oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 2002; 62: 416–420
- [58] Mudrak O., Tomilin N., Zalensky A.: Chromosome architecture in the decondensing human sperm nucleus. *J. Cell Sci.*, 2005; 118: 4541–4550
- [59] Mylonis I., Drosou V., Brancorsini S., Nikolakaki E., Sassone-Corsi P., Giannakourou T.: Temporal association of protamine 1 with the inner nuclear membrane protein lamin B receptor during spermiogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 11626–11631
- [60] Nadel B., de Lara J., Finkernagel S.W., Ward W.S.: Cell-specific organization of the 5S ribosomal RNA gene cluster DNA loop domains in spermatozoa and somatic cells. *Biol. Reprod.*, 1995; 53: 1222–1228
- [61] Oliva R., Dixon G.H.: Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 1991; 40: 25–94
- [62] Papoutsopoulou S., Nikolakaki E., Chalepakis G., Kruff V., Chevaillier P., Giannakourou T.: SR protein-specific kinase 1 is highly expressed in testis and phosphorylates protamine 1. *Nucleic Acids Res.*, 1999; 27: 2972–2980
- [63] Pienta K.J., Getzenberg R.H., Coffey D.S.: Cell structure and DNA organization. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 1991; 1: 355–385
- [64] Pirhonen A., Valtonen P., Linnala-Kankuunen A., Heiskanen M.L., Maenpaa P.H.: Primary structures of two protamine 2 variants (St2a and St2b) from stallion spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta*, 1990; 1039: 177–180
- [65] Pittoggii C., Renzi L., Zaccagnini G., Cimini D., Degraffi F., Giordano R., Magnano A.R., Lorenzini R., Lavia P., Spadafora C.: A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. *J. Cell Sci.*, 1999; 112: 3537–3548
- [66] Pogany G.C., Corzett M., Weston S., Balhorn R.: DNA and protein content of mouse sperm. *Exp. Cell Res.*, 1981; 136: 127–136
- [67] Prieto M.C., Maki A.H., Balhorn R.: Analysis of DNA-protamine interactions by optical detection of magnetic resonance. *Biochemistry*, 1997; 36: 11944–11951
- [68] Queralt R., Adroer R., Oliva R., Winkfein R.J., Retief J.D., Dixon G.H.: Evolution of protamine P1 genes in mammals. *J. Mol. Evol.*, 1995; 40: 601–607
- [69] Schmid C., Heng H.H., Rubin C., Ye C.J., Krawetz S.A.: Sperm nuclear matrix association of the prm1→prm2→tnp2 domain is independent of Alu methylation. *Mol. Hum. Reprod.*, 2001; 7: 903–911
- [70] Schultz R.M., Worrall D.M.: Role of chromatin structure in zygotic gene activation in the mammalian embryo. *Semin. Cell Biol.*, 1995; 6: 201–208
- [71] Solovoi I.V., Joffe B.J., Hori T., Thomson P., Mizuno S., Macgregor H.C.: Unordered arrangement of chromosomes in the nuclei of chicken spermatozoa. *Chromosoma*, 1998; 107: 184–188
- [72] Solov'eva L., Svetlova M., Bodinski D., Zalensky A.O.: Nature of telomere dimers and chromosome looping in human spermatozoa. *Chromosome Res.*, 2004; 12: 817–823
- [73] Sotolongo B., Huang T.T., Isenberger E., Ward W.S.: An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *J. Androl.*, 2005; 26: 272–280
- [74] Sotolongo B., Lino E., Ward W.S.: Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biol. Reprod.*, 2003; 69: 2029–2035
- [75] Sotolongo B., Ward W.S.: DNA loop domain organization: the three dimensional code. *J. Cell Biochem. Suppl.*, 2000; Suppl. 35: 23–26
- [76] Sumer H., Craig J.M., Sibson M., Choo K.H.: A rapid method of genomic array analysis of scaffold/matrix attachment regions (S/MARs) identifies a 2.5-Mb region of enhanced scaffold/matrix attachment at a human neocentromere. *Genome Res.*, 2003; 13: 1737–1743
- [77] Szczygiel M., Kurpisz M.: Struktura plemninkowego DNA ssaków. *Post. Biol. Kom.*, 1996; 23: 211–219
- [78] Taddei A., Hediger F., Neuman F.R., Gasser S.M.: The function of nuclear architecture: a genetic approach. *Annu. Rev. Genet.*, 2004; 38: 305–345
- [79] Tanaka H., Iguchi N., Isotani A., Kitamura K., Toyama Y., Matsuoka Y., Onishi M., Masai K., Maekawa M., Toshimori K., Okabe M., Nishimune Y.: HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Mol. Cell Biol.*, 2005; 25: 7107–7119



- [80] Terada Y., Luetjens C.M., Sutovsky P., Schatten G.: Atypical decondensation of the sperm nucleus, delayed replication of the male genome, and sex chromosome positioning following intracytoplasmic human sperm injection (ICSI) into golden hamster eggs: Does ICSI itself introduce chromosomal anomalies? *Fertil. Steril.*, 2000; 74: 454–460
- [81] van Driel R., Fransz P.: Nuclear architecture and genome functioning in plants and animals: what can we learn from both? *Exp. Cell Res.*, 2004; 296: 86–90
- [82] Vilfan I.D., Conwell C.C., Hud N.V.: Formation of native-mammalian sperm cell chromatin with folded bull protamine. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 20088–20095
- [83] Ward M.A., Ward W.S.: A model for the function of sperm DNA degradation. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2004; 16: 547–554
- [84] Ward W.S.: Deoxyribonuclei acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 1993; 48: 1193–1201
- [85] Ward W.S., Coffey D.S.: DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol. Reprod.*, 1991; 44: 569–574
- [86] Ward W.S., Kishikawa H., Akutsu H., Yanagimachi H., Yanagimachi R.: Further evidence that sperm nuclear proteins are necessary for embryogenesis. *Zygote*, 2000; 8: 51–56
- [87] Ward W.S., Partin A.W., Coffey D.S.: DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma*, 1989; 98: 153–159
- [88] Watson J.M., Meyne J., Marshall Graves J.A.: Ordered tandem arrangement of chromosomes in sperm heads of monotreme mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 10200–10205
- [89] Wu J., Ribar T., Cummings D.E., Kimberly A.B., McKnight G.C., Means A.R.: Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking Camk4. *Nat. Genet.*, 2000; 25: 448–452
- [90] Wykes S.M., Krawetz A.: The structural organization of sperm chromatin. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 29471–29477
- [91] Yan W., Ma L., Burns K.H., Matzuk M.M.: HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during spermiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 10546–10551
- [92] Zalenskaya I.A., Bradbury E.M., Zalensky A.O.: Chromatin structure of telomere domain in human sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000; 279: 213–218
- [93] Zalenskaya I.A., Zalensky A.O.: Non-random positioning of chromosomes in human sperm nuclei. *Chromosome Res.*, 2004; 12: 163–173
- [94] Zalensky A.O., Siino J.S., Gineitis A.A., Zalenskaya I.A., Tomilin N.V., Yau P., Bradbury E.M.: Human testis/sperm specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 43474–43480