

TESI DOCTORAL

Núria Saperas Plana

**Distribució i caracterització
de les proteïnes espermàtiques bàsiques
en peixos, agnats i procordats**

Desembre, 1992

IV. Discussió

Hem estructurat la discussió del present treball en dos grans apartats. En el primer d'ells revisem els diferents tipus de PEB (proteïnes espermàtiques bàsiques) que hem trobat en cada un grup dels grups que hem estudiat i definim el model que es pot considerar com a característic de cada un d'ells. En el segon gran apartat es discuteixen una sèrie de qüestions concretes que s'han revelat d'un interès especial al llarg d'aquest treball.

1. Definició del model de PEB característic de cada un dels grups estudiats

1.1. Tunicats

Els tunicats (urocordats) formen un dels quatre subphyla dels cordats i es reparteixen en tres classes: Ascidiacea, Thaliacea i Larvacea (Appendicularia). Nosaltres hem estudiat aquí les PEB (proteïnes espermàtiques bàsiques) de diferents espècies dels dos ordres que constitueixen els ascidiacis (Enterogona i Pleurogona); concretament, hem estudiat l'únic subordre inclòs a l'ordre Pleurogona (el subordre Stolidobranchiata) i un dels dos subordres dels Enterogona (el subordre Phlebobranchiata però no el subordre Aplousobranchia). D'altra banda, s'ha estudiat una espècie de l'ordre Salpida, un dels tres ordres que constitueixen la classe Thaliacea (salpes). L'espècie estudiada ha estat *Thalia democratica*.

Les espècies dels Phlebobranchiata són les que presenten un patró més senzill de proteïnes espermàtiques bàsiques: totes contenen una única PEB (que hem anomenat P1, v. figura III-17, a-b) que desplaça les histones somàtiques al nucli de l'espermatozoide. Aquesta proteïna migra electroforèticament com la histona H4.

Les espècies dels Stolidobranchiata també exhibeixen aquesta PEB (P1) però mantenint restes d'histones (figura III-17, c-d); d'altra banda, les dues espècies del gènere *Styela* estudiades contenen a més proteïnes addicionals en

el nucli espermàtic (les que hem anomenat P2, v. figura III-20). L'estudi més detallat de les PEB de *S. plicata* (v. apartat III-1.3.) ens permet descriure la PEB-P1 (present en totes les espècies d'ascidiacis) com una molècula gran, molt bàsica (48-50% de residus bàsics, sobretot arginina) i amb una zona de la molècula resistent a la tripsinització on s'acumulen principalment els residus aminoacídics sense càrrega (encara que coexistent amb una certa proporció de residus bàsics). La seva composició, estructura primària i estructura secundària recorden les histones de tipus H1 o altres proteïnes afins. Així, consta d'una zona estructurada corresponent a la zona resistent a la tripsina, i dos braços on s'acumularien la major part dels residus bàsics. Hem vist, però, que el braç N-terminal és extremadament curt (dues arginines). De fet, hi ha altres casos descrits de proteïnes de tipus H1 amb braços escurçats; així per exemple, l'anèlid *Platynereis dumerilii* presenta entre les seves PEB dues variants de la histona H1 inusualment curtes degut a posseir extrems N i C terminals escurçats; en canvi, la mida del domini globular, com en el cas de la P1 dels tunicats, manté una mida d'uns 80 residus, similar a la corresponent a la d'altres H1s (Kmiécik et al., 1985).

La proteïna P1 dels ascidiacis sembla posseir variants en el cas del gènere *Styela* (veure els pous III i IV de la figura III-9, i la composició de la proteïna X d'*S. plicata* a la taula III-4) i possiblement també als altres Stolidobranchiata estudiats (*B. villosa*, *P. haustor* i *C. finmarkiensis*) però no als Phlebobranchiata (v. figura III-17).

Les PEB anomenades P2 semblen ser una característica pròpia del gènere *Styela* (figura III-20). Aquesta P2 és extraordinàriament bàsica, destacant la seva riquesa en arginina (taula III-4), i també presenta heterogeneïtat en les dues espècies d'*Styela* estudiades. La seva composició recorda molt la de l'extrem C-terminal de la P1 (v. taula III-6 i la discussió exposada més endavant a l'apartat IV-2.1.).

Aquests resultats, doncs, estarien d'acord amb que el model de PEB comú per a la classe Ascidiacea fos el de la PEB-P1, ja que la posseeixen totes les espècies estudiades. A partir d'aquí, mentre que els Phlebobranchiata no haurien introduït modificacions importants sobre aquest model, els Stolidobranchiata podrien haver sofert una sèrie de duplicacions del gen de la

PEB-P1 així com la incorporació per part del gènere *Styela* d'una nova proteïna de mida menor (la PEB-P2) que, creiem, pot representar una especialització evolutiva recent (ja que *C. finmarkiensis*, també pertanyent a la família Styelidae, posseeix P1 però no P2).

L'observació de les PEB feta en *Thalia democratica* (classe Thaliacea) ha estat limitada a l'anàlisi del seu patró electroforètic degut a l'extraordinària dificultat en obtenir esperma a partir d'aquests animals que no assoleixen més que uns pocs mil·límetres de mida. Tot i així, aquesta observació és important ja que l'absència de la proteïna PEB-P1 ens indica que el caràcter que estudiem (o sigui la presència i característiques moleculars de les PEB) ha seguit en els Thaliacea un camí independent als Ascidiacea. Sota aquest punt de vista, hem de dir que aquest resultat està més d'acord amb les classificacions filogenètiques basades en l'anatomia general que no amb les propostes de filogènies dels urocordats basades en la ultraestructura espermàtica (Holland, 1991; revisat per Jamieson, 1991) (v. figures IV-1 i IV-2) ja que el patró de proteïnes espermàtiques és el mateix en Phlebobranchiata i Stolidobranchiata mentre que en les salpes les característiques són particulars i diferents dels anteriors grups.

Dins del context general dels deuteròstoms, el patró i característiques de les PEB dels tunicats es pot considerar com a propi d'aquest grup, ja que no coincideix amb el dels equinoderms ni amb el dels vertebrats. Segons les dades disponibles fins al moment (els hemicordats no han estat estudiats sota aquest punt de vista), als tunicats apareixen *per primera vegada en la línia dels deuteròstoms* dos trets funcionals típics dels vertebrats (encara que no invariables):

a) Les histones somàtiques són gairebé substituïdes en la seva totalitat per una (o varies) PEB específiques.

b) La (o les) PEB finals són extraordinàriament bàsiques (el 50% o més de la molècula està constituït per residus aminoacídics bàsics, destacant principalment l'arginina).

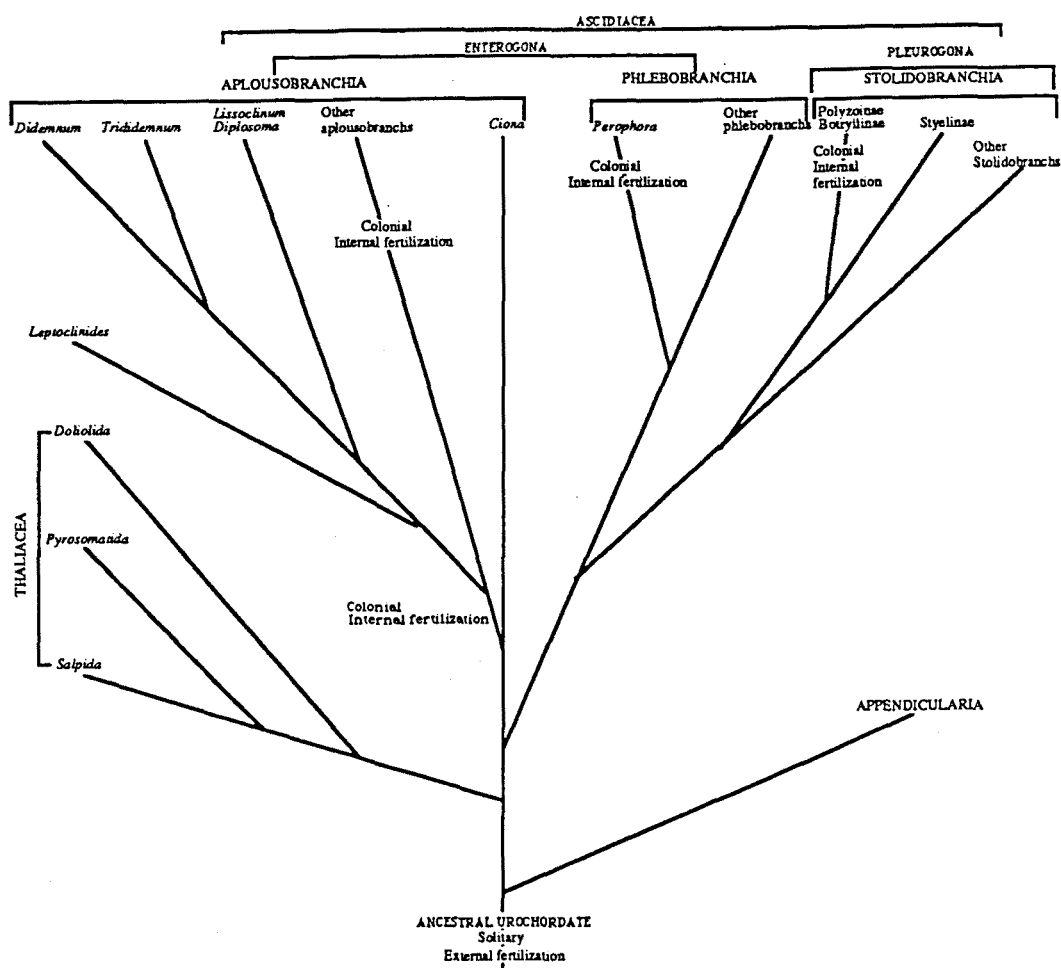


Figura IV-1. Filogènia dels grups principals de tunicats basada en l'anatomia general (segons P. Kott; tret de Jamieson, 1991).

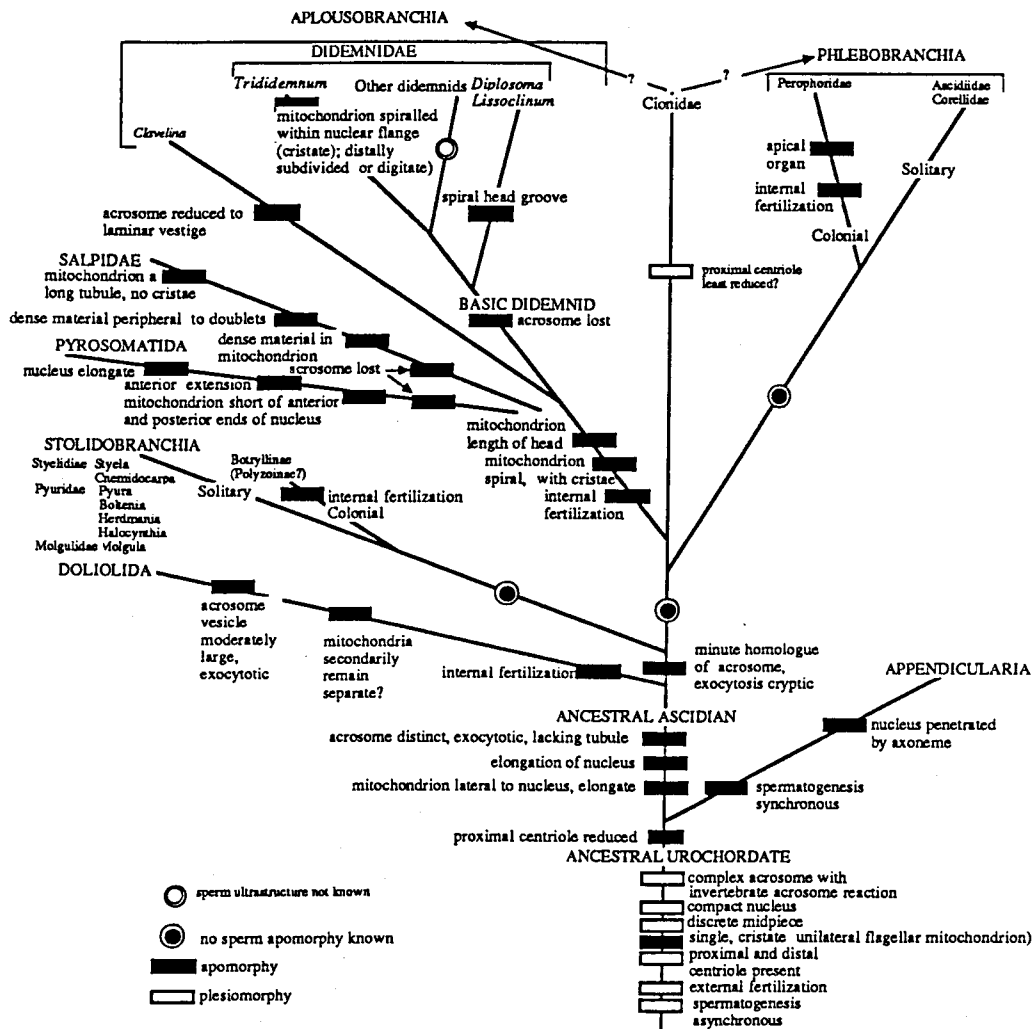


Figura IV-2. Proposta de filogènia dels urocordats basada en la ultraestructura de l'espermatozoide (Jamieson, 1991).

1.2. Cefalocordats

Com ja ha estat comentat amb anterioritat, aquest grup, tot i constituir un subphylum, és molt reduït quant al número d'espècies, contenint només unes 20 espècies repartides en dos gèneres (*Branchiostoma* i *Epigonichthys*). Hem de ressaltar que, fins al moment, mai no s'havien fet estudis sobre les PEB d'aquests animals i que el nostre estudi es basa en una sola espècie. Encara que degut a la gran variabilitat que presenten les PEB (revisat per Subirana, 1983; Poccia, 1986; Kasinsky, 1989; Oliva i Dixon, 1991) les observacions fetes en una sola espècie s'han de considerar amb precaució alhora de generalitzar-les per tot un grup, creiem que els resultats aquí presentats poden ser considerats com a representatius del grup amb bastanta seguretat. Aquesta afirmació no només respon al fet de tractar-se d'un taxon molt reduït quant al nombre de representants, sinó que també es fonamenta en el estudis fets sobre l'estructura de l'espermatozoide. Així, els estudis de microscopia electrònica sobre la morfologia de la condensació nuclear (Holland i Holland, 1989; Jamieson, 1991) denoten una marcada similitud entre totes les espècies estudiades.

El patró electroforètic de les PEB de *Branchiostoma floridae* mostra una distribució heterogènia de les bandes protèiques als gels (figura III-23). Les bandes de menor mobilitat corresponen a histones i representen un 20% del total de proteïna del nucli espermàtic. Pel que fa a la PEB-P, aquesta constitueix l'única proteïna especialitzada en aquesta espècie i apareix en una proporció majoritària (un 80% del total protèic).

La proteïna P consta només de 6 tipus diferents d'aminoàcids. La basicitat global de la molècula és lleugerament superior al 50% i en ella hi participen més o menys amb la mateixa importància la Lys (27.4%) i l'Arg (25.3%). En una proporció similar també hi trobem l'Ala (21.7%), conté força Ser (16.5%) i poca Pro i Gly (5.6% i 6.1%, respectivament) (v. taula III-7).

Curiosament, aquest "model" de composició aminoacídica d'una proteïna que compacta la cromatina espermàtica és el mateix (o molt similar) a l'utilitzat pels mol·luscs bivalves en les seves PEB anomenades PL-III

(Odintsova et al., 1981; Ausió, 1989) (v. taula III-7). Aquí ens podem trobar amb una convergència evolutiva, almenys quant a la composició aminoacídica de molècules que efectuen una mateixa funció.

Pel que fa a la seva estructura primària, a l'extrem amino terminal d'aquesta molècula trobem una alternància repetitiva dels residus Arg-Ser (v. figura III-25). Ja hem comentat a l'apartat III-2.2. que, el fet de trobar aquest motiu alternat en PEB de característiques diferents i en grups animals amb posicions filogenètiques allunyades, ha d'interpretar-se com una altra convergència evolutiva, possiblement deguda a alguna significació funcional especial d'aquesta estructura.

En el cas de *B. floridae* és especialment interessant el considerar conjuntament el patró de les proteïnes espermàtiques nuclears i la condensació de la cromatina espermàtica. De fet, les PEB són les causants de la condensació de la cromatina en el nucli espermàtic i aquesta condensació de la cromatina és, almenys parcialment, responsable del volum i potser inclús de la forma del nucli (Fawcett et al., 1971). Els estudis per microscopia electrònica del nucli de l'espermatozoide de *Branchiostoma* (Jamieson, 1984; Holland i Holland, 1989) demostren que la major part del DNA espermàtic està formant una estructura molt densa, la qual cosa està d'acord amb la presència d'una molècula de PEB molt especialitzada i bàsica com és la PEB-P descrita. No obstant, el nucli està molt vaquolitzat (figura IV-3) i es pot observar material dispers no condensat en les vaquoles. Aquest fet podria explicar el remanent d'histones somàtiques que s'observen en els desenvolupaments electroforètics de les proteïnes nuclears. La vaquolització dels nuclis als espermatozoides no és exclusiva dels cefalocordats sinó que es pot observar en moltes altres espècies, incloent els peixos (Brusle, 1981; Mattei i Mattei, 1984; Guha et al., 1988; entre d'altres).

En definitiva podem dir, doncs, que durant l'espermioogènesi del cefalocordat *B. floridae*, la majoria de les histones somàtiques són desplaçades del nucli de l'espermatozoide per una PEB especialitzada, molt més bàsica i d'una composició molt simple (ja que la molècula només consta de 6 tipus de

residus aminoacídics diferents). El desplaçament de les histones és un fet que, si bé no es dona als equinoderms, ja apareix als tunicats.

Pel que fa a les relacions entre aquests dos models, la PEB-P de *B. floridae* i la PEB-P2 del gènere *Styela* (pertanyent als tunicats) presenten una mobilitat electroforètica i una mida força similar. No obstant, les seves composicions aminoacídiques (taules III-4 i III-7) no indiquen que puguin ser proteïnes homòlogues ja que presenten les següents característiques significatives diferencials: La PEB-P2 d'*Styela* és molt rica en arginina (50.4%) i moderadament rica en lisina (17.4%) i en glicina (18.7%); els altres residus aminoacídics es reparteixen en proporcions molt baixes. En canvi, en la PEB-P de *Branchiostoma* les proporcions d'arginina, lisina i alanina són molt similars (25.3% / 24.7% / 21.7%) i conté una proporció elevada de serina (16.5%). Així, no es pot dir que es tracti de molècules homòlogues sinó que més aviat semblen haver aparegut independentment en l'evolució.

D'altra banda, malgrat la proteïna P de *B. floridae* comparteix alguns trets comuns amb les protamines típiques dels peixos ossis com és la seva gran basicitat i la baixa diversitat en aminoàcids, la majoria de les seves característiques la diferencien d'aquelles. Així, mentre que la basicitat de les protamines dels teleostis ve donada majoritàriament per l'Arg, aquí hem vist que hi participen per igual l'Arg i la Lys; igualment són característiques diferencials la seva gran riquesa en Ala, la seva major mida i el presentar l'alternància Arg-Ser al seu extrem N-terminal.

Tant les PEB dels tunicats com les dels cefalocordats compleixen els requisits postulats per Subirana (1983) com a necessaris per a ser considerades com a protamines però, en general, hem evitat denominar-les així per a no introduir confusions quant a les possibles homologies amb les protamines típiques dels peixos ossis (o dels altres vertebrats que les posseeixen).

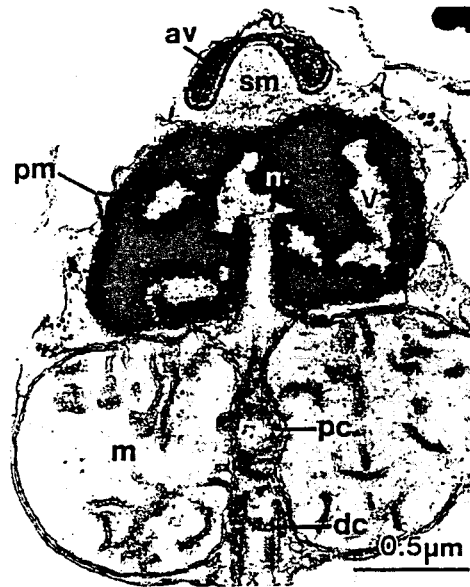


Figura IV-3. Tall longitudinal del cap de l'espermatozoide de *Branchistoma moretonensis* on s'aprecia l'aspecte vaquolat del nucli. av, vesícula acrosòmica; dc, centriol distal; m, mitrocondri; n, nucli; pc, centriol proximal; pm, membrana plasmàtica; sm, material subacrosòmic; v, vaquola. Tret de Jamieson, 1984.

1.3. Agnats

Els agnats agrupen dues classes, els Myxini i els Cephalaspidomorphi i, segons alguns autors, possiblement constitueixen un grup polifilètic (Janvier, 1981). Les PEB d'aquests animals tampoc no han estat mai descrites fins al moment. En el nostre treball hem estudiat una espècie del grup dels Cephalaspidomorphi: la llampresa *Petromyzon marinus*.

En els resultats presentats es pot observar que, per primera vegada en els deuteròstoms, el nucli de l'espermatozoide no conté cap proteïna especialitzada evident. El contingut proteínic bàsic d'aquest orgànul es limita a les 5

histones (H1, H2A, H2B, H3 i H4), amb les composicions aminoacídiques i el comportament electroforètic (en tots els sistemes estudiats) típics de les histones somàtiques. Hem de recordar aquí que els equinoderms posseeixen histones al nucli de l'espermatozoide, però les histones H1 i H2B han estat sovint substituïdes per formes més bàsiques específiques de l'espermatozoide (H1-sp i H2B-sp) (Strickland et al., 1977, 1978, 1980). Els tunicats i cefalocordats, per la seva banda, posseeixen proteïnes específiques molt riques en arginina i lisina que neutralitzen les càrregues negatives dels fosfats del DNA i s'encarreguen de la major compactació de la cromatina espermàtica.

La presència d'histones i l'absència de proteïnes especials addicionals dificulta la comprensió del fet que la cromatina es trobi més compactada en el nucli de l'espermatozoide. De fet, se sap que les càrregues negatives dels fosfats del DNA no estan totalment compensades per les càrregues bàsiques de les histones nucleosòmiques (revisat en Subirana, 1990) i que els nucleosomes poden acceptar fins a 3.6-4 molècules d'H1 per tal de compensar el 90% de totes les seves càrregues (Watanabe, 1989). Com ha estat estudiat per diferents autors, la progressiva neutralització de les càrregues dels fosfats per la histona H1 provoca la formació d'estructures compactes de la cromatina produint-se el canvi quan el 85% de les càrregues del DNA són neutralitzades (Watanabe, 1990). En el cas de *Petromyzon*, la sola presència de les 5 histones sense apreciar-se cap increment proporcional de l'H1 o cap de les altres histones fa suposar que en la compactació del DNA espermàtic s'ha de donar la participació d'una notable quantitat de contraions minerals per neutralitzar les càrregues del DNA. Aquesta suposició la suporta el fet que el tractament dels nuclis amb EDTA 20 mM produeixi l'inflament d'aquestes estructures (com hem apreciat en el decurs del treball experimental). Aquest fet és comú en els nuclis somàtics i en altres espermatozoides que només contenen histones. La participació d'aquests contraions juntament amb la sortida del nucli de les proteïnes no histones podria explicar la major compactació del nucli de l'espermatozoide respecte al nucli somàtic.

En una espècie propera, *Lampetra planeri* (Stanley, 1967), es pot observar que el nucli de l'espermatozoide presenta una condensació basada en l'acumulació d'una sèrie de grànuls de mida similar a la dels nucleosomes. Estudis citoquímics realitzats pels doctors E. Rosenberg i H.E. Kasinsky

(comunicació personal) indiquen que *Lampetra* també posseeix histones i no proteïnes especialitzades al nucli espermàtic.

Totes aquestes dades, si bé no ho demostren inequívocament, suggereixen la possibilitat que les espècies de la classe Cephalaspidomorphi condensin el nucli espermàtic a través d'una disposició molt pròxima de tots els seus nucleosomes.

El fet que aquests animals presentin histones en lloc de proteïnes especials al nucli del seu espermatozoide mereix una consideració més acurada: Com ja hem dit, les solucions adoptades al problema de la compactació de la cromatina espermàtica en els deuteròstoms han estat diverses però sempre han involucrat la presència de proteïnes especials, mentre que en *Petromyzon* destaca l'absència de tal proteïna especialitzada. Les llampreses (i es creu que també els mixínids) posseeixen fertilització externa però, com ha estat revisat per Jamieson (1991), el seu espermatozoide presenta caràcters associats a la fertilització interna: un *perforatorium* intranuclear molt llarg, un nucli elongat, una làmina de mitocondris al voltant de l'axonema i nou fibres accessòries a l'axonema. Afzelius (1970) ha proposat que aquests fets poden ser explicats acceptant que els ancestres dels agnats fossin animals de fertilització interna i que aquest caràcter s'hagués perdut durant la seva evolució. Si aquesta hipòtesi és certa, una possible explicació per l'absència de proteïnes especialitzades al nucli de l'espermatozoide dels agnats cefalaspídmorfs podria ser el que aquests animals haguessin perdut l'expressió del gen de tal proteïna (o el propi gen) en un moment de grans canvis durant la seva evolució que conduís a la diferenciació d'aquesta línia i que hagués comportat canvis a nivell de la biologia de la reproducció. Amb aquesta observació no es pretèn establir una relació invariable histones-fecundació externa i protamina-fecundació interna sinó que el que es vol indicar és que, independentment del tipus de PEB que es posseeixi en un inici, quan es produeixen canvis dràstics en la biologia de la reproducció poden aparèixer-hi associats canvis en el model de PEB presentat. De fet, ja han estat descrits casos anàlegs en altres organismes (Daban et al., 1991a, 1991b; Chiva et al., 1991). D'aquesta manera, a l'haver indicis de canvis importants en la biologia de la reproducció dels agnats és factible pensar que aquests hagin estat

concomitants amb la pèrdua de la presència de PEB especialitzades (un caràcter que presenten la resta dels deuteròstoms). Una altra possibilitat que no s'ha d'excloure, no obstant, és que els representants d'aquest grup no hagin posseït mai cap PEB especialitzada.

1.4. Peixos cartilaginosos

Els holocèfals es van separar molt aviat dels altres condrictis i per tant han seguit una evolució separada durant un notable període de temps (Nelson, 1984). Aquesta característica ha fet interessant la comparació entre les proteïnes espermàtiques d'*Scyliorhinus canicula* (un esquàlid) i les d'*Hidrolagus colliei* (un holocèfal), ja que els caràcters que presenten en comú possiblement han de correspondre al tipus originari dels condrictis.

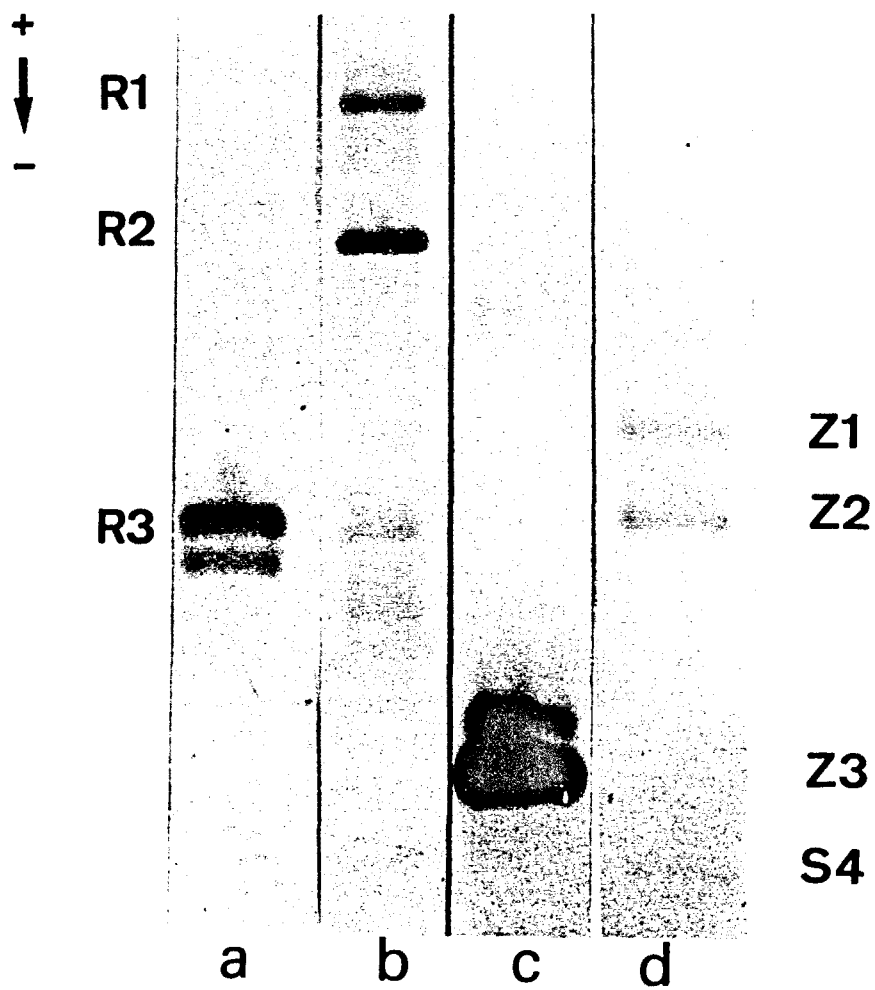
Hi ha dos fets a tenir en compte en aquest sentit, un és la definició d'un model comú de PEB per tots els condrictis i l'altre és la consideració de les característiques de les molècules en sí. Aquests són els temes que es tractaran a continuació.

1.4.1. Model de proteïnes espermàtiques bàsiques

El "model" de proteïnes espermàtiques sembla ser el mateix en *H. colliei* que en *S. canicula*. Així, ambdós presenten alhora proteïnes no queratinoses (R3/Z3) i proteïnes queratinoses no extraïbles de l'espermatozoide (però sí del testicle) sense una reducció prèvia; d'entre aquestes es poden trobar correspondències entre els grups R1-R2 i Z1-Z2, però no amb la S4 de *S. canicula* que, com hem vist (taula III-10), presenta característiques molt diferents i podria tractar-se d'una peculiaritat de *S. canicula*. Pel que fa als parells R3/Z3 i R1-R2/Z1-Z2, resulta interessant notar la diferència casi constant en la mobilitat electroforètica d'aquestes proteïnes, de manera que el patró d'*H. colliei* sembla el mateix que el de *S. canicula* (pel que fa a aquestes proteïnes) però desplaçat cap amunt (figura IV-4), diferència atribuïble a la major mida i menor basicitat de les protamines d'*H. colliei* respecte a les de *S.*

canicula. D'altra banda, *H. coliei* presenta una sèrie de proteïnes minoritàries no presents en *S. canicula* (m0, m1, m2, m3; v. figura III-32)

Figura IV-4. Comparació entre les PEB d'*H. coliei* (pous a, b) i *S. canicula* (pous c, d). PEB sense Cys: pous a, c. PEB amb Cys: pous b, d.



Gusse i Chevaillier (1980a, 1980b) van mostrar que les proteïnes Z1 i Z2 (juntament amb la S4) podrien formar una estructura en collaret de perles

amb el DNA espermàtic, mentre que la Z3 possiblement actuaria en ordres superiors d'empaquetament del DNA espermàtic. La presència d'un model molt similar en *H. coliei* suggereix una analogia funcional per a les proteïnes R1, R2 i R3, encara que aquesta analogia resta per comprovar. Quant al punt de vista evolutiu hi ha un fet assumible: El model de dues proteïnes queratinoses (amb cisteïna) més una proteïna no queratinosa ha de ser interpretat com un caràcter ancestral compartit pels condrictis durant la seva diferenciació com a grup.

1.4.2. Característiques de les molècules

En una sèrie d'estudis sobre les "scyliorhinines" (les protamines d'*Scyliorhinus canicula*), Chevaillier, Sautière, Gusse i col·legues han seqüenciat les quatre protamines d'*S. canicula* (Z1, Z2, Z3 i S4) així com dues proteïnes de transició (S1 i S2) que només estan presents en els nuclis de les espermàtides en diferenciació però no en el nucli de l'espermatozoide (Sautière et al., 1981, 1984; Martinage et al., 1985; Chevaillier et al., 1987; Chauvière et al., 1987; Chauvière et al., 1989) (v. apartat 2.3. de la introducció). Les generalitzacions evolutives més pertinents per la discussió del present estudi que es deriven d'aquests treballs són:

- i) La Z3 és una protamina molt similar estructuralment a la protamina típica dels peixos ossis (Sautière et al., 1981). Arran d'aquest fet s'ha suggerit que "la scyliorhinina Z3 i les protamines dels teleostis es van originar molt probablement a partir de la mateixa seqüència ancestral de DNA abans de la divergència de condrictis i osteïctis durant el Devònic" (Chevaillier et al., 1987).
- ii) Entre les protamines Z1, Z2 i S4 hi ha molt poques identitats a les seves seqüències. Possiblement aquestes proteïnes no han evolucionat a partir d'una mateixa família de gens.
- iii) Les proteïnes de transició S1 i S2 no són homòlogues a les protamines espermàtiques.

Aquestes dades signifiquen que les proteïnes bàsiques del nucli de les espermatides i espermatozoides d'*S. canicula* pertanyen a una sèrie de gens que s'expressen coordinadament al llarg de l'espermiogènesi però que no posseeixen entre elles una relació evolutiva pròxima.

De fet, la comparació de les protamines de la quimera *H. colliei* amb les del tauró *S. canicula* encara introdueix més variabilitat en aquest sistema de molècules. La protamina R3 d'*H. colliei* és molt diferent de la Z3 d'*S. canicula*: La R3 conté una gran diversitat de residus aminoacídics (14 tipus diferents) enfront dels 5 tipus que constitueixen la Z3; la R3 és relativament poc rica en arginina (27.6% enfront de 64.5% a la Z3), relativament molt rica en lisina (20.7% enfront de 0%) i conté histidina (4.3% enfront de 0%); no conté grans quantitats de glicina (4.0% / 19.4%) i la seva seqüència N-terminal mostra agrupacions heterogènies de residus bàsics (RRRH, KKKRK) absents en la Z3 i en les protamines dels peixos ossis.

La comparació de les composicions aminoacídiques de la R1 i R2 amb les scyliorhines Z1 i Z2 mostra que globalment totes aquestes proteïnes presenten una composició comparable (v. taula III-10). Aquest fet, però, no és necessàriament indicatiu d'una homologia per dues raons:

- i) Les scyliorhines Z1 i Z2 són similars composicionalment però gairebé no presenten identitats en les seves seqüències.
- ii) Hi ha desviacions importants entre les composicions de les R1 i R2 enfront de les Z1 i Z2 com són una gran proporció de glicina a la R2 (21.1%) i la presència d'una proporció molt baixa de cisteïna tant en la R1 com en la R2.

Els resultats aquí exposats, doncs, mostren una gran variabilitat en les protamines dels condriactis, deguda possiblement a procedir d'un conjunt diferent de gens o alternativament a una gran divergència evolutiva, i mostren la constància en el model de proteïnes que apareixen al nucli de l'espermatozoide.

Finalment, la gran diferència entre les proteïnes R3 i Z3 qüestiona la interpretació referent a què les protamines no queratinoses dels condriactis i les protamines típiques dels peixos ossis tinguin un ancestre comú.

1.5. Peixos ossis

Els diferents tipus de PEB utilitzades per les diverses espècies representen diferents solucions al problema de l'empaquetament de la cromatina de l'espermatozoide. En aquest treball hem agrupat les diferents alternatives trobades en els teleostis en les següents categories:

- a) Protamina típica.
- b) Histones somàtiques sense cap proteïna addicional.
- c) Histones somàtiques amb un increment d'histona H1.
- d) Histones somàtiques amb proteïnes addicionals específiques.
- e) Proteïna específica diferent de la protamina típica i que substitueix completament les histones.

Hem d'insistir en què aquestes categories no pretenen ser una classificació de les molècules implicades sinó una ordenació dels diferents tipus de continguts de PEB que hem trobat. La discussió concreta sobre el tipus de molècules trobades es tracta a l'apartat 2.1.

a) Protamina típica

Com ja hem vist a la introducció, es tracta d'una molècula petita (27-34 residus aminoacídics), d'una gran basicitat (degut principalment a la seva riquesa en arginina), i que substitueix les histones durant el decurs de l'espermioogènesi per aconseguir una major compactació de la cromatina del nucli de l'espermatozoide. D'entre les que hem estudiat nosaltres, aquesta molècula podria estar exemplificada per la protamina del llobarro (*Dicentrarchus labrax*, v. III-5.9.1.). Aquesta proteïna es troba present en moltes espècies tant amb posicions filogenètiques properes com molt distants (veure la taula IV-1). Així, per exemple, hem trobat protamina típica tant en Clupeiformes, que és un dels grups més antics dins dels teleostis, com en Perciformes, que és un dels grups de peixos més moderns evolutivament.

Malgrat aquesta molècula ha estat molt discutida i estudiada (veure introducció), hi ha un punt que no ha estat suficientment considerat. Com mostra el repàs de la bibliografia i el treball actual, la molècula de protamina típica, tot i ser considerada com una molècula molt variable, és molt similar en totes les espècies que la posseeixen encara que hagin divergit en períodes molt primerencs (encara que, a grans trets, el grau de similitud entre les diferents protamines es correspon amb el grau de divergència dels diferents grups que les posseeixen). Això es pot interpretar com que aquesta molècula té uns marges estrets per evolucionar (mida petita -27 a 34 aminoàcids-, basicitat -45-80%-, baixa diversitat en aminoàcids -5-10 tipus diferents-) i que en tots els peixos respecta un model estricte dins el qual es poden donar variacions limitades possiblement donades per restriccions funcionals.

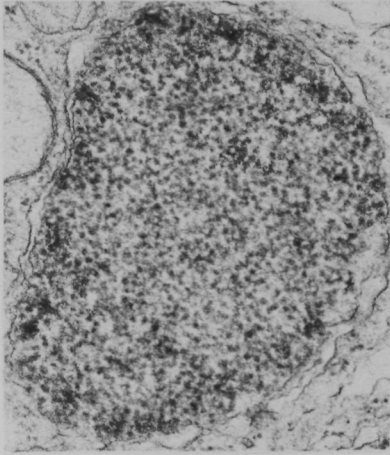
Respecte a aquest últim punt, hem estudiat conjuntament amb el doctor E. Ribes (Unitat de Biologia Cel·lular, Universitat de Barcelona) el procés de la condensació de la cromatina durant l'espermioogènesi de *D. labrax*. Com es mostra a la figura IV-5, la morfologia de la condensació de la cromatina durant l'espermioogènesi es desenvolupa en dues etapes ben establertes: la primera condueix a una compactació completa del nucli de l'espermàtida en forma d'una estructura fibro-granular de diàmetre igual a 25 ± 5 nm (figura IV-5, A), mentre que en la segona etapa es van formant

grànuls densos que arriben a un diàmetre de 150 ± 50 nm (figura IV-5, B). Els grànuls de 150 ± 50 nm semblen créixer perifèricament en zones on l'estructura de 25 ± 5 nm sembla deprimir-se i on possiblement es doni el desplaçament de les histones per la protamina (v. detall a la figura IV-5, E). L'aposió final d'aquests grànuls compacta el nucli espermàtic, que queda reduït a un volum molt menor que el de l'espermàtida inicial (figura IV-5, C i D).

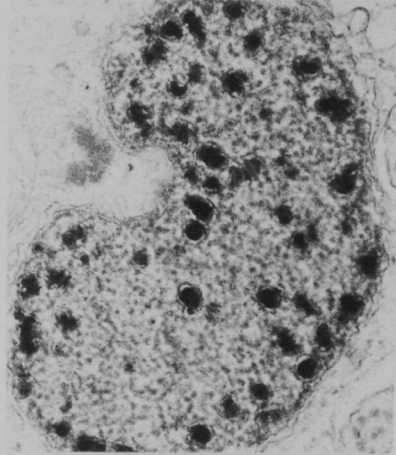
És remarcable el fet que aquest tipus d'estructura (la "fibra" de 30 nm) es presenti al nucli de l'espermatozoide d'espècies que només contenen histones (Casas et al., 1981; Muñoz-Guerra et al., 1982). L'estructura fibrogranular de 30 nm és típica de tota cromatina associada a histones i està constituïda per nucleosomes agrupats. Així, doncs, la primera etapa de la compactació de *D. labrax* (estructura de 25 ± 5 nm) representa una estructura nuclear que ja es mostra funcionalment competent en totes les espècies que retenen histones en el seu nucli espermàtic (v. més endavant) mentre que la segona part ha de correspondre a la compactació produïda per la protamina en desplaçar les histones.

Figura IV-5. (Pàgina següent) Observació per microscopia electrònica de les dues fases morfològiques de la condensació del nucli durant l'espermioogènesi de *Dicentrarchus labrax*. La figura A mostra un nucli al final de la primera fase de la condensació on s'aprecien les estructures fibro-granulars de 25 ± 5 nm que corresponen molt possiblement a nucleosomes agrupats. Les fases B i C representen la condensació addicional en grànuls densos mes grans; a la figura E es pot observar un detall de la formació dels grànuls majors (150 ± 50 nm). La fase D representa el nucli de l'espermatozoide que ha assolit un volum menor que el de la fase anterior correlativament amb la substitució de les estructures de 25 nm pels grànuls densos. En aquest nucli trobem únicament el DNA i la protamina típica. Les preparacions han estat realitzades pel Dr. Enric Ribes (Unitat de Biologia Cel·lular, Departament de Bioquímica i Fisiologia, Universitat de Barcelona). Augments: (A) $\times 33.000$; (B) $\times 30.000$; (C) $\times 30.500$; (D) $\times 30.000$; (E) $\times 125.000$.

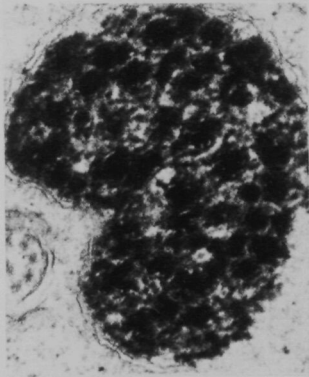
A



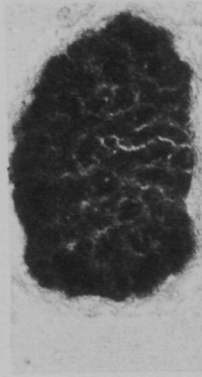
B



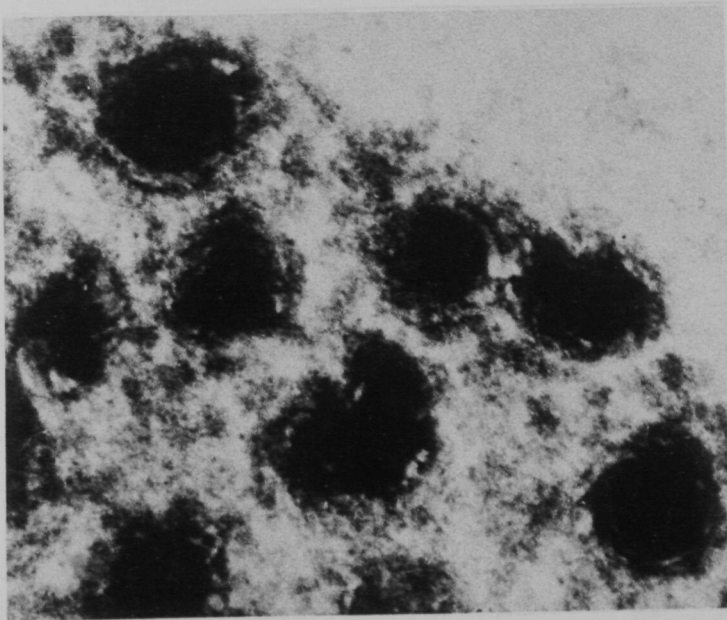
C



D



E



b) Histones somàtiques sense cap proteïna addicional

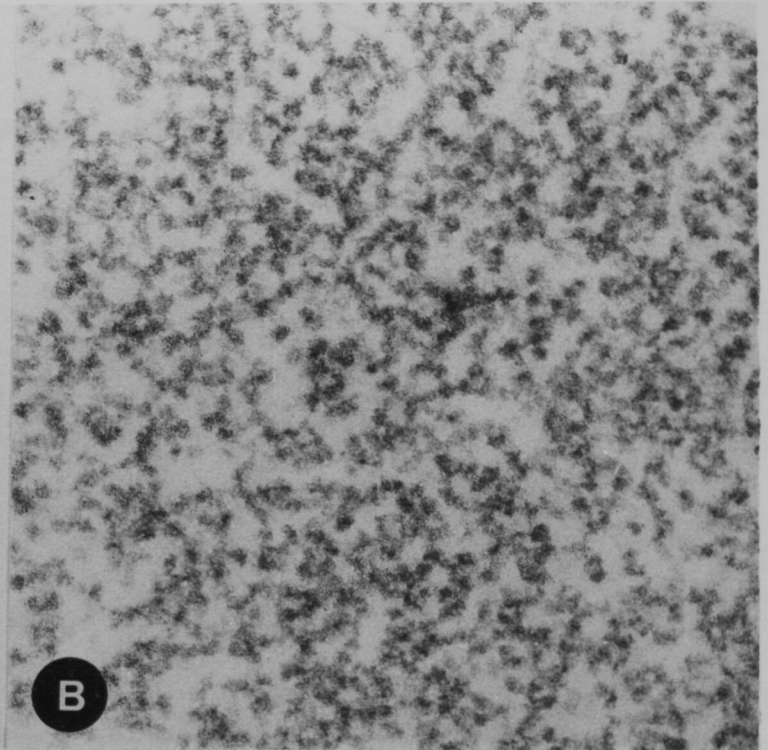
Les espècies amb aquest patró proteínic estan especificades a la taula III-16. La presència d'histones somàtiques al nucli espermàtic d'alguns peixos ossis ens planteja dues qüestions: en primer lloc, el problema de com compacten el DNA i, en segon lloc, quin sentit evolutiu té aquest fet tot i considerant la seva presència esporàdica així com la presència de protamines típiques en altres grups o espècies pròximes.

El primer punt ja ha estat discutit en relació al cas de l'agnat *Petromyzon marinus* (v. IV-1.3.). Quant a la qüestió de l'esporadicitat evolutiva cal considerar primer que, funcionalment, les histones representen una alternativa a la condensació de la cromatina radicalment diferent de la protamina. Degut a això i a l'esporàdica aparició d'histones i protamines als peixos (veure taula IV-1 o, concretament, el cas dels Scorpaeniformes on trobem famílies amb protamines i famílies amb histones, com també passa dins dels Perciformes) sembla clar que, dins dels peixos ossis, els casos on apareix el canvi de protamina per histones (o viceversa) no poden explicar-se per canvis graduals, acumulatius, que portessin a la diferenciació d'un tipus de molècula a partir de l'altre sinó que més aviat ha de tractar-se de canvis dràstics i més sobtats. Dit d'una altra manera, la distribució dels diferents tipus de PEB als peixos no sembla seguir línies ben definides on alguns grups poseixin histones mentre que altres grups posseeixin protamines. Arribats a aquest punt, sembla que les explicacions més plausibles per donar compte d'aquests esdeveniments poden ser dues. Una d'elles és la hipòtesi de la integració retrovívica proposada per Jankowski et al. (1986) i revisada en Oliva i Dixon (1991), segons la qual la protamina seria una molècula incorporada repentinament, esporàdicament i independentment en diverses espècies de peixos ossis (i amfibis) a través de la integració en el seu genoma del material genètic de retrovirus portadors de tal gen. Aquesta qüestió es discutirà més endavant (IV-2.2.).

Com ja apuntàvem, hi ha altres espècies per les quals s'ha descrit que el nucli del seu espermatozoide només conté histones somàtiques. En dues d'aquestes espècies (*Opsanus tau* i *Carassius auratus*) s'ha estudiat la compac-

tació de la cromatina del nucli del seu espermatozoide (Casas et al., 1981; Muñoz-Guerra et al., 1982) i s'ha vist que mantenen els seus nucleosomes, i concretament les estructures de 25 nm (figura IV-6).

Figura IV-6. (Full següent) Condensació d'un nucli d'espermatozoide amb histones somàtiques a l'espècie *Carassius auratus*. A. Espermatozoide (x20.000). B. Detall del nucli de l'espermatozoide després de sotmetre'l a un xoc hipotònic suau mostrant la presència de fibres de 25 nm (x90.000). Les estructures fibro-granulars d'aquest espermatozoide es corresponen amb molta fidelitat a les estructures observades a la primera part de la condensació de l'espermatozoide de *D. labrax*, prèvia a la condensació final produïda per la protamina (veure la figura IV-5, A). Fotos: Muñoz-Guerra et al., 1982.



c) Histones somàtiques amb una major quantitat d'H1

Aquest és el cas dels espermatozoides dels Sparidae i dels Trichiuridae (v. apartats III-5.9.2. i III.5.9.6.) on la quantitat d'histona H1 al nucli espermàtic és aproximadament el doble que la que posseeixen les cèl·lules somàtiques (referida a les histones totals). Sembla que aquestes espècies han incrementat l'expressió de la histona H1 durant l'espermiogènesi de manera que aquesta podria afegir-se als nucleosomes i ajudar a compensar les càrregues del DNA. La incorporació d'una molècula d'H1 addicional per nucleosoma, no obstant, no compensaria encara totalment les càrregues dels fosfats de l'àcid nuclèic ja que, com ja hem dit abans, els nucleosomes necessiten de 3.6 a 4 molècules d'H1 extra per tal de neutralitzar el 90% del DNA (Watanabe, 1989). Per tant, igual que en aquelles espècies on només es troben histones somàtiques a l'espermatozoide, els nuclis espermàtics dels Sparidae i Trichiuridae també haurien de contenir contraions minerals que col·laboressin en la condensació de la cromatina.

El patró de PEB format per les histones somàtiques amb una major quantitat d'H1 pot representar una alternativa propera al patró anterior (o sigui, nuclis amb histones somàtiques) de manera que un increment de l'activitat en la transcripció o traducció del gen de l'H1 permetria hipotèticament comprendre la relació entre ambdós patrons. Curiosament, el patró que es discuteix es presenta en dues famílies de Perciformes (Sparidae i Trichiuridae) que no poseeixen una relació taxonòmica estretament propera. És a dir, malgrat les dues famílies pertanyen al mateix ordre, ambdues pertanyen a subordres diferents (Percoidei i Scombroidei, respectivament) entre els que existeix un bon nombre d'altres subordres dels quals, a més, la immensa majoria posseeix protamines i no histones (v. annex 2). Per tant, els patrons trobats als Sparidae i Trichiuridae semblen solucions que poden haver-se produït amb independència. No s'ha descrit aquest model en altres grups de peixos estudiats.

d) Histones somàtiques amb proteïnes addicionals específiques

Aquest és el cas del lluç (*Merlucciidae*), i possiblement dels *Gadidae* i *Moridae*, dins de l'ordre dels *Gadiformes*; del *Notacanthus* (*Notacanthidae*, *Notacanthiformes*); i del *Cataetyx* (*Bythitidae*, *Ophidiiformes*).

Tant per les característiques pròpies dels patrons estudiats (v. apartats III-5.1., 5.5. i 5.6.) com per la posició taxonòmica d'alguns dels ordres on apareixen, sembla que si bé aquests grups han adoptat un model similar, les proteïnes específiques no són necessàriament homòlogues entre sí.

Merluccius i *Cataetyx*, tot i respectant les histones, han afegit una proteïna específica que apareix en els desenvolupaments electroforètics en una quantitat similar a la de cada una de les histones somàtiques; la composició aminoacídica d'aquestes proteïnes específiques és similar a la de les histones H5 de les hematies, és a dir similar a l'H1 però amb major basicitat (revisat a Klyszejko-Stefanowicz, 1989). Podem suposar, per tant, que el model de la compactació del nucli espermàtic en aquestes espècies (i molt possiblement en el cas anterior, c) és en molts aspectes similar al que presenten els nuclis inactius de les hematies dels vertebrats no mamífers.

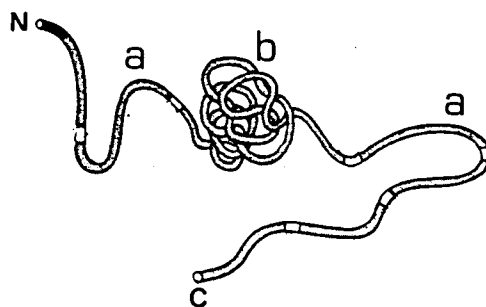
e) Proteïnes específiques diferents de la protamina típica i que substitueixen completament les histones

Aquest és el cas que hem estudiat en el moll (*Mullus*) (apartat III-5.9.3.). Tot i que només ha aparegut en una família és un cas interessant quan el situem en el context de les proteïnes espermàtiques.

En primer lloc, aquesta proteïna pertany a un "model protèic" utilitzat molt sovint com a proteïna específica. Aquest "model" es basa en un cor o nucli hidrofòbic i un o dos braços on s'hi acumulen les càrregues positives (v. figura IV-7). Un model com aquest el trobem a les histones, principalment l'H1 (revisat a Allan et al, 1980; i Crane-Robinson i Ptitsyn, 1989), a l'H5, que compacta la cromatina de les hematies (Briand et al, 1980), i el trobem també al nucli de l'espermatozoide de molts animals substituint totalment o

parcialment les histones, com és per exemple el cas d'alguns bivalves (Ausió et al., 1987; Ausió, 1988; Jutglar et al., 1991; Daban et al., 1991a), mol·luscs patel·lacis i polioplacòfors (Daban et al., 1991b; Daban, 1991), i tunicats (v. IV-1.1.). Quan aquest "model" apareix en els espermatozoides sempre és molt més bàsic que en el cas de la histona H5 i les variants de la histona H1.

Figura IV-7. Possible estructura de la PEB del moll (*Mullus*). a: extrems bàsics. b: zona amb estructura; aquí s'acumularien els residus hidrofòbics i alguns de bàsics. Esquema adaptat del que apareix proposat a Berkaloff et al. (1983) per la histona H1.



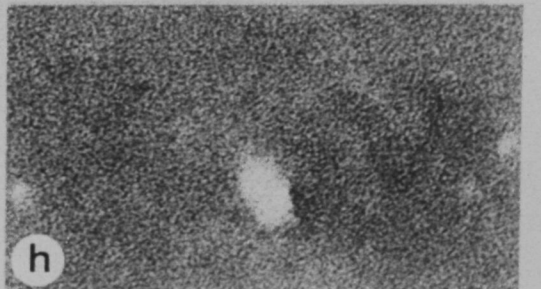
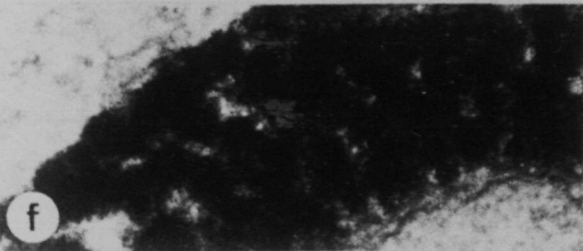
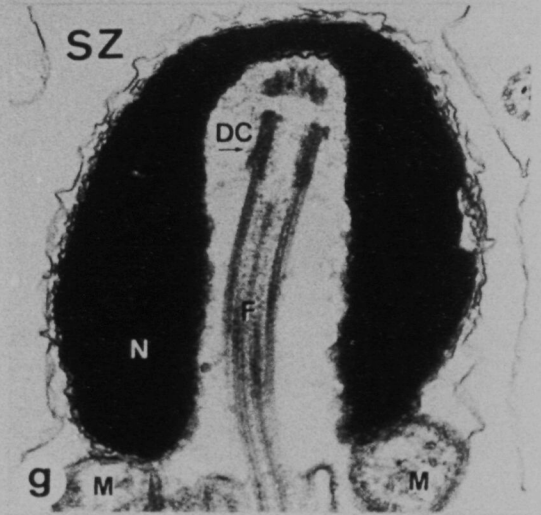
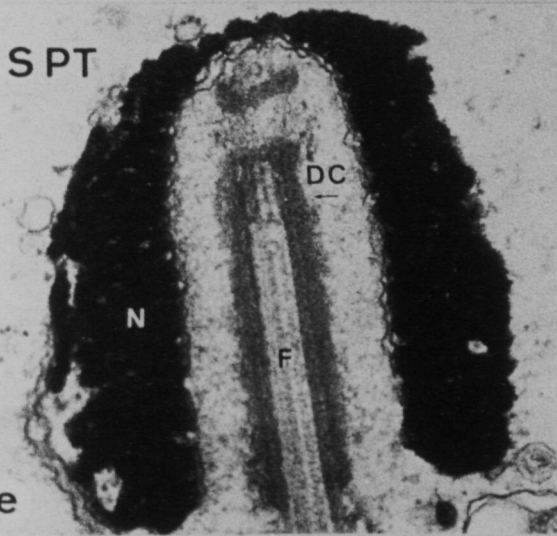
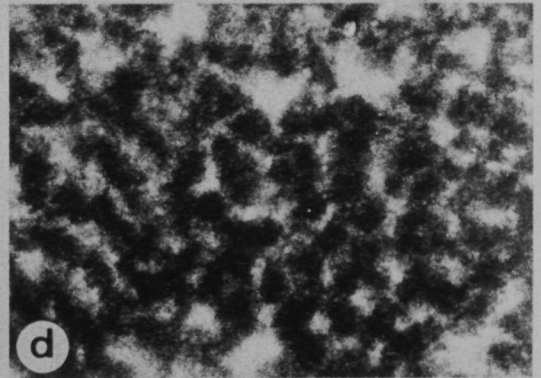
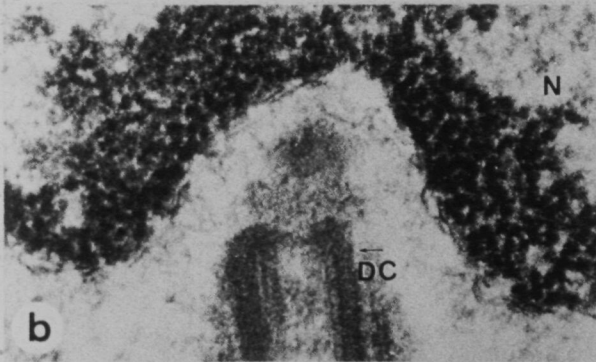
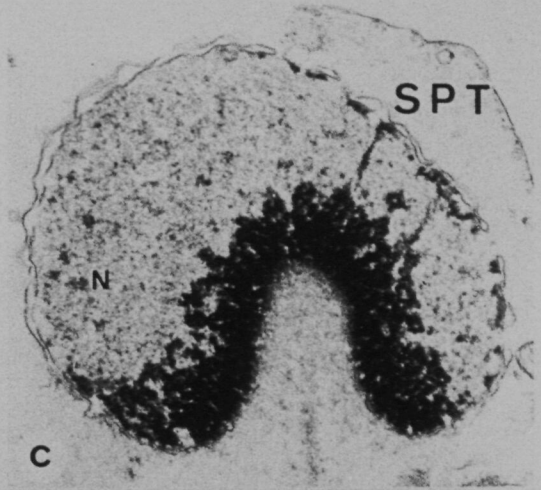
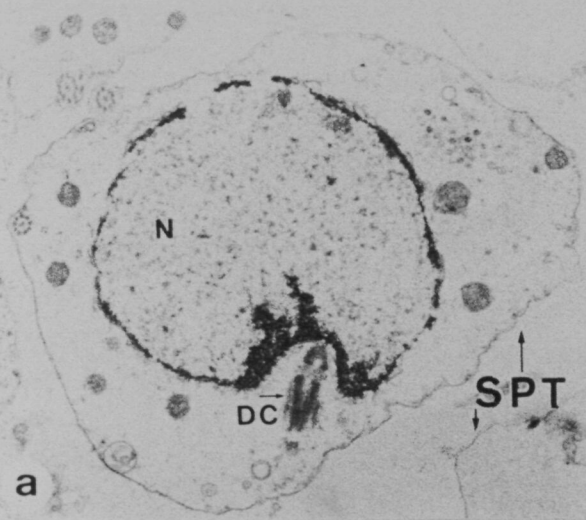
Degut a la similitud estructural, en alguns casos composicional i, en els casos estudiats, de seqüència aminoacídica del cor o nucli hidrofòbic (Ausió et al., 1987; Jutglar et al., 1991), ha estat repetidament proposat que aquestes molècules poden provenir de la histona H1 a través de la basificació dels seus extrems (Subirana i Colom, 1987; Chiva et al., 1991).

Igual que pel cas del llobarro (*D. labrax*), hem estudiat amb el doctor E. Ribes (Unitat de Biologia Cel·lular, Universitat de Barcelona) l'evolució morfològica de la condensació cromatínica durant l'espermioogènesi del moll roquer (*Mullus surmuletus*) per microscopia electrònica. Com s'aprecia a la

figura IV-8, la compactació presenta alguns trets diferencials respecte a la descrita en *D. labrax*.

En l'espermioogènesi del moll es produeix una condensació parcial en les espermatides primerenques en estructures fibro-granulars de 25 ± 5 nm de diàmetre (figura IV-8, a, b). La mida d'aquestes estructures es correspon amb les de *D. labrax*, però en el cas del moll s'acumulen en la base del nucli envoltant una invaginació nuclear (la fossa basal) mentre que en el pol oposat la cromatina es manté poc condensada (figura IV-8, c). La part de la cromatina condensada en aquest estadi es correspon amb la forma final del nucli (v. figura IV-8, g). En el següent estadi, les estructures de 20-30 nm constitueixen una nova estructura fibro-granular de 50 ± 10 nm (figura IV-8, e, f) i, finalment, al nucli de l'espermatozoide la cromatina està formada per petits grànuls de 2.3 ± 0.5 nm presentant un aspecte molt homogeni (figura IV-8, g, h).

Figura IV-8. (Pàgina següent) Condensació nuclear espermiogènica en *Mullus surmuletus*. a. Espermatida primerenca que inicia la condensació de la cromatina en estructures fibro-granulars de 25 ± 5 nm (detall de la condensació a b). c. Espermatida mitja que substitueix les estructures anteriors per estructures fibro-granulars més grosses (detall: d). e. Espermatida avançada (detall: f). g. Espermatozoide i detall (h) de la seva cromatina homògena. La composició d'aquesta cromatina consta només del DNA i la PEB estudiada. Les preparacions s'han efectuat al laboratori del Dr. E. Ribes (Unitat de Biologia Cel·lular, Dept. de Bioquímica i Fisiologia, Universitat de Barcelona). DC, centriol distal; F, flagel; M, mitocondri; N, nucli; SPT, espermatida; SZ, espermatozoide. Augments: (a) $\times 13.000$; (b) $\times 66.000$; (c) $\times 27.000$; (d) $\times 100.000$; (e) $\times 46.000$; (f) $\times 120.000$; (g) $\times 46.000$; (h) $\times 170.000$.



2. Problemes d'interès especial

Al llarg d'aquest apartat discutirem tres qüestions relacionades amb aquest treball i que considerem d'un interès especial. Concretament es tractarà en primer lloc sobre els grans models generals de PEB que es poden trobar i les seves possibles relacions evolutives. En segon lloc s'abordarà la problemàtica concreta sobre la "esporadicitat" de la distribució de les protamines (o histones) als peixos ossis, tema que clàssicament ha preocupat a molts autors. Finalment ens plantejem si les PEB han seguit o no una línia evolutiva contínua en els deuteròstoms.

2.1. Tipus de molècules específiques del nucli espermàtic i les seves possibles relacions evolutives

Des del punt de vista de les anàlisis composicionals, estructurals i de mida que hem efectuat en aquest treball, podem definir dues categories principals de proteïnes específiques del nucli espermàtic en els deuteròstoms; aquestes dues categories les anomenarem:

- a) Proteïnes "relacionades amb histones" (generalment l'H1).
- b) Proteïnes "especialitzades" (o molt especialitzades).

Les primeres serien proteïnes relativament grans i que en la seva molècula almenys presenten dues parts: una zona hidrofòbica, resistent a la tripsinització, on s'hi acumulen els residus aminoacídics neutres i on els carregats hi són poc presents, i una zona no resistent a la tripsina on hi són acumulats els residus aminoacídics Arg i Lys sent, per tant, una zona molt bàsica. A aquesta categoria pertanyirien, dins dels grups que hem estudiat, la proteïna P1 dels tuïcats ascidiacis (v. III-1.3.5.) i la PEB del moll (*Mullus surmuletus*) (v. III-5.11.2.).

La zona hidrofòbica d'aquestes molècules estudiades pot presentar una estructura globular i les seves seqüències (quan es comparen amb totes les de les proteïnes conegudes) són molt similars als nuclis hidrofòbics de les histones H1 o H5 (v. figures III-16 i III-70). Hem de dir que els estudis que comparen les diferents seqüències de les histones H1 mostren que la zona globular hidrofòbica d'aquesta histona és la més conservada evolutivament (Crane-Robinson i Ptitsyn, 1989) i, consegüentment, és molt factible que les zones hidrofòbiques de la protamina P1 dels tunicats i la del moll puguin tenir un origen relacionat amb la histona H1 (o amb una forma propera a aquesta). És evident que això no significa que hi hagi una relació directa entre la P1 dels tunicats i la PEB del moll sinó que creiem que el seu origen a partir d'aquesta hipotètica histona H1 ha d'haver estat independent (de fet entre els ascidiacis i el moll trobem altres tipus de proteïnes específiques espermàtiques no relacionades amb aquestes).

Cal dir que la histona H1 ja ha estat proposada anteriorment com el possible origen d'algunes "protamines" que tenen una estructura relacionada amb les histones en els mol·luscs (Subirana i Colom, 1987; Jutglar et al., 1991; Daban, 1991; Chiva et al., 1991). El nostre estudi recolza, doncs, aquest punt de vista també en els deuteròstoms.

Al llarg d'aquest treball, a més de la P1 dels ascidiacis i la PEB del moll (que substitueixen les histones somàtiques al nucli de l'espermatozoide), ens hem trobat dins dels peixos ossis amb algunes espècies que contenen la dotació completa d'histones més algunes proteïnes addicionals. Aquest seria el cas de *Notacanthus*, *Merluccius* i *Cataetyx* (v. apartats III-5.1., III-5.5. i III-5.6.). És de ressaltar que si bé només en el cas de *Merluccius* hem pogut purificar i analitzar la proteïna específica, aquesta ha resultat posseir una composició que permet incloure-la dins de la família de les proteïnes H1/H5 (taula III-15).

Un altre fet que demostra la importància de la histona H1 (o de les seves variants) en la cromatina espermàtica és el cas de les famílies Sparidae i Trichiuridae (v. apartats III-5.9.2. i III-5.9.8.). A l'espermatozoide d'aquests

animals s'incrementa la quantitat d'histona H1 quan es produeix la condensació de la cromatina.

En conclusió, sembla que la histona H1, a través de

- a) incrementar la seva proporció (Sparidae, Trichiuridae),
- b) modificar-se en major o menor grau (major basicitat, modificacions als braços) (P1 dels ascidiacis, *Mullus*, *Merluccius*)

ha donat diferents formes funcionalment competents per a compactar la cromatina espermàtica. Aquests processos poden ser independents o relacionats, però és evident que hi ha independència almenys en algunes ocasions (per exemple la P1 dels tunicats i la PEB del moll).

La segona categoria de proteïnes específiques del nucli de l'espermatozoide que havíem establert era la de les proteïnes que anomenàvem "especialitzades". Aquesta categoria estaria formada per proteïnes menors que les anteriors (de 30 a 100 residus aminoacídics) i que tenen com a característiques comunes la manca de la zona resistent a la tripsinització i relacionat amb això una molt baixa proporció (en molts casos absència) de residus hidrofòbics. Els residus arginina i lisina formen la major part de la molècula. Dins d'aquesta categoria inclouríem les següents molècules d'entre les estudiades en aquest treball:

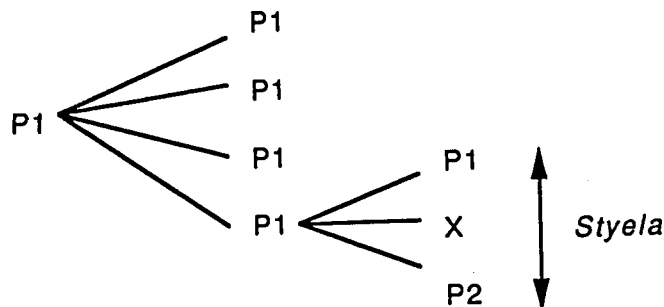
- Proteïna P2 del gènere *Styela* (figura III-20).
- Proteïna P de l'amfiox (figura III-23).
- "Protamines típiques" dels peixos ossis
(v. per exemple la figura III-50, pous "c" i "s").
- Proteïna R3 d'*Hydrolagus colliei*. (figura III-32).

Exactament igual que quan discutíem les anteriors molècules, el fet que les inqubim en una mateixa categoria és independent de la seva relació

evolutiva (poden estar relacionades o poden no estar-ho). En realitat, pels resultats exposats aquí sembla que no hi ha un nexa clar entre elles. El nexa més aviat sembla poder estar amb les proteïnes de la categoria anterior (les "relacionades amb histones"), almenys en el cas de la P2 dels tunicats.

Com es mostra a la taula III-6, la composició de la protamina P2 d'*Styela* és gairebé idèntica a la composició de l'extrem C-terminal de la P1 del mateix animal. Sembla, doncs, que en els tunicats ascidiacis les diferents famílies expressin variacions de la proteïna P1 i que, en la família dels Styelidae, el gen d'aquesta proteïna hagi sofert una sèrie de canvis que han originat variants de la pròpia P1 (v. la proteïna X de la figura III-12 i taula III-4) i, possiblement, una part o tot l'extrem C-terminal de la molècula hagi originat la "protamina" P2 (figura IV-9). Creiem, doncs, que la proteïna P2 ha de ser considerada com una adquisició evolutiva recent i particular d'aquest gènere, i evidentment no relacionada amb les protamines dels peixos ossis (o d'altres) que pertanyen a línies evolutives que estan separades de la línia dels ascidiacis.

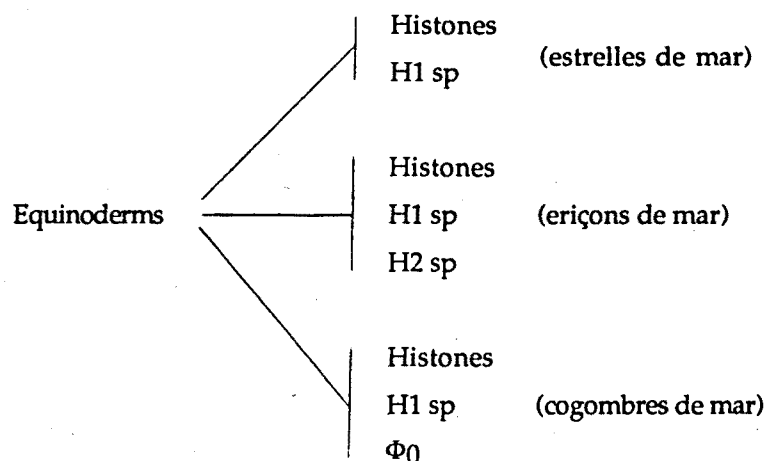
Figura IV-9. Representació esquemàtica de la diversificació de les proteïnes específiques de l'espermatozoide dels tunicats ascidiacis.



Hi ha dos comentaris adjacents a aquesta idea:

a) El fet que en un grup es trobi una protamina de tipus "relacionada amb histones" i que en alguns animals dins del mateix grup apareixi una proteïna "especialitzada" sembla que es dona independentment en altres taxons, com per exemple els mol·luscs bivalves i gastròpodes; dins dels deuteròstoms trobem que en les holotúries apareix un cas similar, ja que es manifesta una proteïna especialitzada, la Φ_0 , en un grup que manté les histones i variants espermàtiques de les histones (v. apartat 2.1. de la introducció). La figura IV-10 representa esquemàticament aquesta situació.

Figura IV-10. Representació esquemàtica de la variabilitat en les PEB dels equinodermes.



b) El segon comentari afecta a estudis molt recents fets en mol·luscs bivalves (Carlos et al., 1993a, en premsa). En aquests estudis es mostra que en *Mytilus* l'espermàtida sintetitza una molècula que anomenen "H1-like" (que correspondria a la categoria "relacionada amb histones" aquí exposada) i que post-traduccionalment hi ha una escissió d'una part de l'extrem C-terminal d'aquesta molècula, apareixent una "protamina", l'anomenada Φ_3 (que en el

En els casos de les protamines de l'amfiox, dels peixos ossis i de la R3 d'*Hydrolagus collicii*, aquestes proteïnes apareixen com a úniques, faltant el possible testimoni d'una proteïna de la categoria "relacionada amb histones" per a suposar el seu origen a partir d'aquesta. En aquests casos es pot imaginar que aquesta hipotètica proteïna ha existit i s'ha perdut la seva expressió, o que el seu origen ha estat un altre. Entre les possibles hipòtesis a explorar amb respecte a l'origen de la protamina típica dels peixos, i addicionalment a altres ja exposades (von Holt et al., 1979, 1984; Jankowski et al., 1986), podríem considerar els pèptids de localització nuclear, alguns dels quals estan formats per un doblet de residus bàsics i un grup de 4 aminoàcids bàsics separat del primer per un nombre variable d'altres residus (bàsic-bàsic-...-bàsic-bàsic-bàsic-bàsic).

Finalment cal remarcar que, dins del context presentat, la "protamina típica" dels peixos ossis no seria més que un cas particular de la categoria que hem anomenat PEB especialitzades (o molt especialitzades).

2.2. El problema de l'esporadicitat de les protamines o histones als peixos ossis

La distribució dels diferents tipus de PEB als peixos ossis es troba simplificada a la taula IV-1 i explicitada a l'annex 2 (al final d'aquest treball). La taula IV-1 presenta el tipus de proteïna que contenen les diferents famílies de peixos ossis a partir de les dades obtingudes de la bibliografia corresponent i del treball fet aquí. Cal tenir en compte que algunes de les dades són molt antigues i es basen en observacions citoquímiques o electroforètiques en gels poc resolutius (veure les corresponents cites bibliogràfiques a la taula de l'annex 2), de manera que no es descarta el que alguna de les dades recopilades pugués actualment ser reclassificada. Malgrat tot, a partir de l'observació d'aquest conjunt de dades és possible posar de manifest alguns fets importants:

a) El tipus de proteïna espermàtica és consistent dins de cada família. O sigui, en els casos en què s'han pogut estudiar dues o més espècies pertanyents a una mateixa família, totes elles presenten el mateix tipus de proteïna espermàtica. El cas més evident dins del nostre treball és el de la família Sparidae. Tots els membres d'aquesta família presenten el mateix model, histones amb una major quantitat d'H1, i això dins d'un ordre (Perciformes) on la majoria de famílies presenten protamina típica.

b) En general però no sempre (segons la informació disponible), els ordres també són consistents quant el tipus de proteïna específica que es presenta: Globalment, dels 38 ordres reconeguts dins de la subclasse Actinopterygii (classe Osteichthyes, peixos ossis) segons la classificació de Nelson (1984), s'han estudiat espècies representants de 22 ordres; de 8 d'aquests ordres s'han estudiat espècies pertanyents a més d'una família (Clupeiformes, 2 famílies; Cypriniformes, 2; Siluriformes, 3; Salmoniformes, 3; Gadiformes, 3; Cyprinodontiformes, 3; Scorpaeniformes, 3; Perciformes, 33). En sis d'aquests ordres, totes les famílies posseeixen el mateix tipus de proteïnes espermàtiques i només en dos d'ells (Scorpaeniformes i Perciformes) es presenten famílies amb diferents tipus de PEB.

c) Una anàlisi de la distribució dels tipus de PEB en l'ordre Perciformes ens indica que, almenys dins d'aquest ordre, la distribució de les protamines no és esporàdica i en canvi sí que ho és la distribució de les histones: De les 33 famílies estudiades, 28 d'elles contenen protamina típica, 2 contenen histones canòniques, 2 histones amb una major proporció d'H1 i 1 una proteïna especial (Mullidae).

Aquesta distribució, segons la nostra opinió, pot ser molt important per tal de poder interpretar la història evolutiva d'aquest caràcter (tipus de PEB) en els peixos. En efecte, almenys en aquest grup, és molt més fàcil d'interpretar que la PEB ancestral fos la protamina típica i que esporàdicament s'hagués substituït aquest caràcter en algunes famílies per les histones somàtiques o altres molècules. Aquest punt de vista, explicitat més endavant, s'oposaria a l'alternativa proposada per Jankowski et al. (1986) sobre

la hipòtesi de la transmissió retrovívica (v. l'apartat 2.2.4. de la introducció i la figura IV-12).

d) El conjunt dels ordres és més difícil i inexacte de generalitzar: dels 22 ordres estudiats, 11 d'ells només posseeixen protamina, 2 d'ells (els Perciformes i Scorpaeniformes) posseeixen majoritàriament protamina típica, 7 ordres posseeixen histones o histones més una proteïna específica i 2 ordres posseeixen proteïnes especials. Sembla doncs que es dóna una lleugera proporció (13/7) favorable a la presència de protamina típica pel que fa als ordres.

e) Finalment, queda clar que les espècies amb PEB especials, com poden ser les de *Mullus* o bé les de *Pseudopleuronectes americanus* (Kennedy i Davies, 1980), són excepcions puntuals i han de ser considerades com a tals.

Taula IV-1. Tipus de PEB present als diferents ordres i famílies de peixos ossis (subclasse Actinopterygii, classe Osteichthyes) segons les dades bibliogràfiques disponibles i el present treball. Classificació segons Nelson (1984). Aquesta taula és un resum de la que apareix a l'annex 2, on a més s'expliciten les espècies i les referències bibliogràfiques corresponents. Abreviatures: A, proteïna addicional específica; E, proteïnes especials; H, histones; P, protamina típica; --, no estudiat.

<i>Ordre</i>	<i>Família</i>	<i>PEB</i>
Acipenseriformes	Acipenseridae	P
Lepisosteiformes	Lepisosteidae	P
Amiiformes	Amiidae	H
Osteoglossiformes	Notopteridae	P
Elopiformes	--	--
Notacanthiformes	Notacanthidae	H+A
Anguilliformes	Congridae	P
Clupeiformes	Clupeidae	P
	Engraulidae	P

(segueix)

(continuació taula IV-1)

Gonorynchiformes	--	--
Cypriniformes	Cyprinidae	H
	Cobitidae	H
Characiformes	--	--
Siluriformes	Bagridae	H
	Clariidae	H
	Heteropneustidae	H
Gymnotiformes	--	--
Salmoniformes	Salmonidae	P
	Esocidae	P
	Alepocephalidae	P
Stomiiformes	--	--
Aulopiformes	--	--
Myctophiformes	Myctophidae	E
Percopsiformes	--	--
Gadiformes	Moridae	H+A
	Gadidae	H+A
	Merlucciidae	H+A
Ophidiiformes	Bythitidae	H+A
Batrachoidiformes	Batrachoididae	H
Lophiiformes	Lophiidae	P
Gobiesociformes	--	--
Cyprinodontiformes	Exocoetidae	P
	Hemiramphidae	P
	Belonidae	P
Atheriniformes	--	--
Lampriformes	--	--
Beryciformes	Berycidae	P
Zeiformes	--	--
Gasterosteiformes	Gasterosteidae	P
Indostomiformes	--	--
Pegasiformes	--	--
Syngnathiformes	--	--

(segueix)

(continuació taula IV-1)

Dactylopteriformes	--	--
Synbranchiformes	--	--
Scorpaeniformes	Scorpaenidae	P
	Triglidae	H
	Cyclopteridae	P
Perciformes	Centropomidae	P
	Percichthyidae	P
	Percidae	P
	Sillaginidae	P
	Pomatomidae	P
	Carangidae	P
	Emmelichthyidae	P
	Lutjanidae	P
	Sparidae	H+H1
	Sciaenidae	P
	Mullidae	E
	Pentacerotidae	P
	Nandidae	P
	Cichlidae	P
	Mugilidae	P
	Polynemidae	P
	Labridae	P
	Notothenidae	P
	Harpagiferidae	P
	Channichthyidae	P
	Trachinidae	P
	Uranoscopidae	P
	Blenniidae	H
	Gobiidae	P
	Gempylidae	P
	Trichiuridae	H+H1
	Scombridae	P
	Xiphiidae	P
	Centrolophidae	P
	Nomeidae	P
	Stromateidae	P
	Anabantidae	P
	Channidae	H
Pleuronectiformes	Pleuronectidae	E
Tetraodontiformes	Tetraodontidae	P

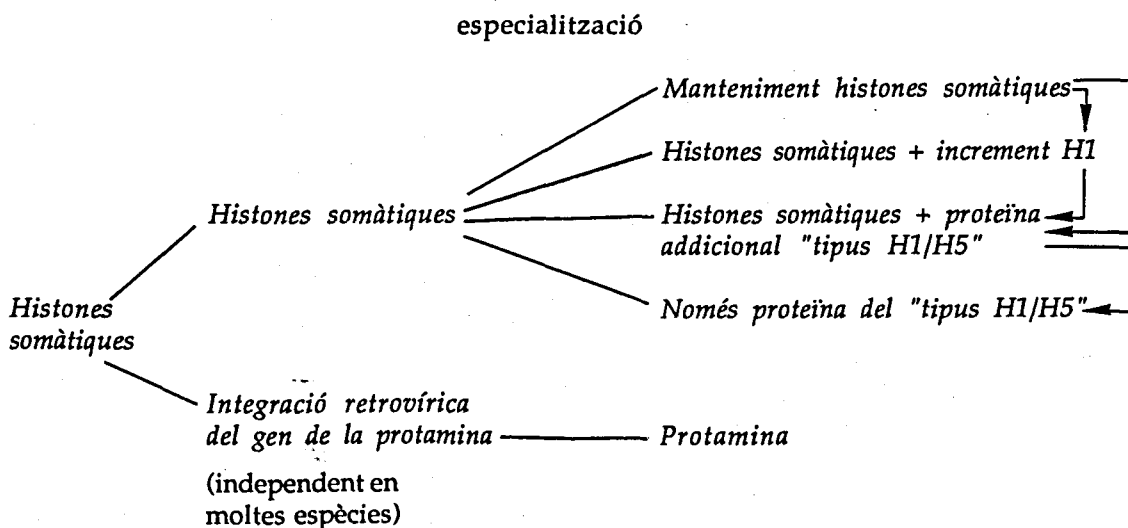
Ja hem argüït el nostre parer sobre el que el trobar una distribució no uniforme de la protamina als diferents grups de peixos ossis implicaria que el pas d'histona a protamina (o alternativament de protamina a histona) hauria d'haver estat un canvi produït de forma sobtada en diferents ocasions. Així doncs, aquesta dualitat histones/protamines podria ser explicada com a resultat d'una transmissió horitzontal del gen de la protamina o bé per una pèrdua del gen o de la seva expressió (per exemple podria haver-se donat una translocació del gen a una altra situació de manera que ja no podés expressar-se).

La primera de les possibilitats ha originat la hipòtesi de la integració retrovírica (v. introducció, apartat 2.2.4.). Segons els autors que defensen aquesta hipòtesi (Jankowski et al., 1986), els peixos, des de la seva formació com a grup, posseeixen histones somàtiques per a compactar el DNA i el gen de la protamina s'ha introduït per retrovirus esporàdicament i independentment repetides vegades. És a dir, el que aquests autors plantegen és que el fet "normal" als peixos ossis és la presència d'histones i que l'aparició de protamines seria "accidental" i deguda a aquesta transmissió horitzontal. A la figura IV-12 s'exposa una possible explicació de l'actual distribució de les PEB als peixos si aquesta hipòtesi fos certa.

La segona alternativa, en canvi, suposaria que els peixos ossis posseïen des del seu origen una protamina típica per a la compactació del seu nucli espermàtic (resultat de la modificació d'una proteïna de tipus histona o bé amb un origen diferent) i que, repetidament i independentment durant l'evolució de diferents grups de peixos, durant la formació d'aquests grups ("ordres", però també en alguns casos "famílies"), s'ha produït una pèrdua del gen de la protamina o bé de la seva expressió. Aquesta alternativa és la que proposem basant-nos en l'anàlisi de la distribució de les protamines típiques i les histones en els diferents grups taxonòmics dins dels osteïctis (v. annex 2), i basant-nos també en el fet que sembla una alternativa molt més fàcil d'haver pogut esdevenir. No s'ha d'oblidar que casos equivalents (pèrdua del gen o de la seva expressió) han estat documentats per a la P2 dels mamífers (Johnson et al., 1988b; Bunick et al., 1990; Maier et al., 1990; Bunick et al., 1990). D'altra banda, la pèrdua de la protamina com a agent

compactador del nucli de l'espermatozoide no hauria significat necessàriament una pèrdua total de la compactació sinó només una pèrdua parcial (veure les fases de la compactació de la cromatina durant l'espermioogènesi de *D. labrax*, apartat IV-1.5, a). D'aquesta manera, la pèrdua o no expressió de la protamina no hauria de suposar necessàriament una pèrdua que impliqués la desaparició de l'organisme o línia d'organismes on es produís, ja que en alguns casos podria retornar-se a la condensació del nucli assolida per les histones, que és compatible amb un espermatozoide viable i eficient. Això explicaria que la pèrdua de la protamina hagi pogut ocórrer amb una certa "facilitat". Un cop arribats a aquest estadi, les histones poden haver-se mantingut invariables respecte a les somàtiques o bé pot haver-se evolucionat cap a un model una mica més el·laborat (increment de l'H1, aparició de proteïnes addicionals). Aquesta segona alternativa s'il·lustra a la figura IV-13.

Figura IV-12. L'alternativa de la integració retrovívica proposada per Jankowski, States i Dixon (1986) pressuposa que, en els seus orígens, els peixos ossis contindrien histones al nucli de l'espermatozoide (o sigui les histones serien les PEB representatives d'aquest grup) i que en alguns casos esporàdics han adquirit el gen de la protamina exògenament. L'esquema mostra diferents alternatives per la possible evolució que poden haver seguit aquestes proteïnes fins arribar a la situació que ens trobem en l'actualitat.



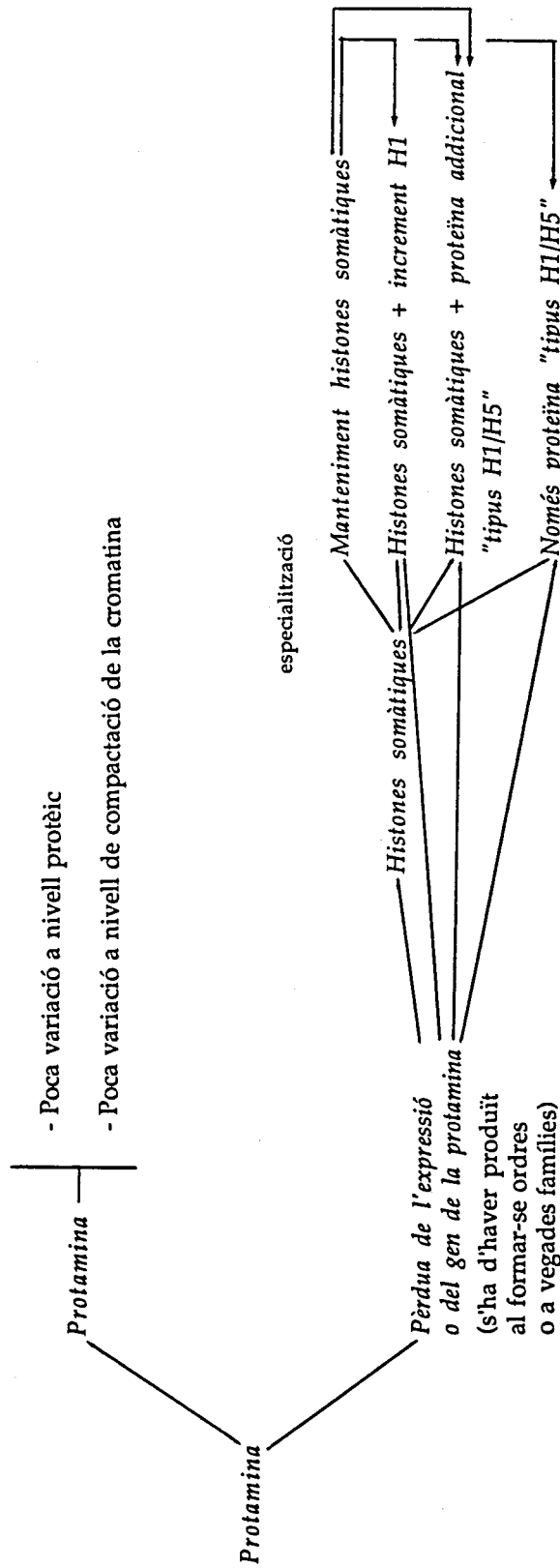


Figura IV-13. Alternativa evolutiva proposada en aquest treball per explicar la distribució esporàdica de les PEB als peixos ossis. Aquesta proposta es basaria en que la protamina fos la PEB representativa d'aquest grup però admetent que hi ha hagut casos independents en que s'ha perdut l'expressió o el gen de la protamina retornant l'espermatozoide a la seva dotació d'histones somàtiques (fet funcionalment no impossible). En els casos en que s'ha mantingut la protamina, aquesta ha petit poques variacions. En els casos en que s'han perdut les protamines es pot haver mantingut una dotació d'histones canòniques o presentar una dotació més especialitzada. Les fletxes indiquen possibles vies que es poden haver seguit per arribar a la situació actual.

Una prova directa que podria suportar aquesta segona hipòtesi seria la realització d'hibridacions entre DNA d'espècies amb i sense protamina de manera que si es donava una hibridació positiva significaria que el gen de la protamina hi és present encara que no s'expressi. De tota manera, s'ha deixat de banda aquesta prova degut a què altres autors (Moir, 1987) han intentat hibridacions entre truita i espècies posseïdores de protamines molt similars i no es va arribar a un grau d'hibridació superior al 7%. Només les espècies de la mateixa família (Salmonidae) hibridaven en un grau significatiu amb la sonda de protamina de truita.

Discernir entre aquestes dues possibilitats és de moment difícil excepte en el cas dels Perciformes, on sembla bastant clar que la PEB característica és la protamina i que en alguns casos independents s'ha pogut perdre l'expressió de tal proteïna. Una crítica a la hipòtesi de la integració retrovírica és que no havien estudiat extensament la distribució histones-protamines quan varen proposar l'espordicitat de la protamina; textualment, en un treball posterior Krawetz i Dixon (1988) diuen: "*Una de les característiques interessants de les protamines és la seva distribució no uniforme al llarg del regne animal. El millor cas per il·lustrar-ho el trobem a l'ordre dels peixos teleostis on només un limitat número de subordres, principalment els salmoniformes i els clupeiformes, expressen les protamines petites i riques en arginina (Dixon et al., 1980) que van ser designades per Bloch (1969) com a protamines 'verdaderes'*", quan en realitat les protamines típiques es troben en la major part dels ordres estudiats de peixos (veure taula IV-1 i annex 2).

Hem de dir, però, que aquestes alternatives no s'exclouen mutuament i que per tant histones/protamines podrien haver revertit repetidament durant l'evolució de les diferents espècies de peixos. Aquests possibles fets compliquen encara més la interpretació de les molècules en estudi.

Un altre punt interessant a discutir és la interpretació que havien fet Nandi et al. (1979) sobre la distribució histones/protamines en els peixos ossis: En un estudi efectuat sobre 26 espècies de peixos marins i d'aigua dolça, aquests autors varen proposar que la protamina seria la PEB que posseïrien

els peixos marins o d'aigües salobres i les histones les que trobaríem als peixos d'aigua dolça (v. introducció, apartat 2.2.4.). En el seu estudi argüien que la nucleoprotamina té una major estabilitat enfront de la salinitat. Aquesta és una proposta interessant com a hipòtesi uniformitzadora, però no sembla reconciliar totes les dades disponibles. Així, en el nostre estudi és evident que no es dona una correl·lació entre aigües salines-protamines i aigua dolça-histones; les 24 famílies que hem estudiat són totes marines i en canvi n'hi ha forces que mantenen les histones. Altres casos discutits a la literatura tampoc semblen estar d'acord amb la interpretació de Nandi et al. D'aquesta manera, per exemple, trobem espècies en què es dona el cas contrari: Tant *Amia calva* com *Lepisosteus osseus* (dos peixos considerats com a "fòssils vivents") són d'aigua dolça, però mentre que *Amia* sí que presenta histones, *Lepisosteus* presenta protamines a l'esperma madur (revisat a Kasinsky, 1989).

Finalment, cal considerar una altra possible explicació proposada per Kasinsky (v. introducció, apartat 2.2.4.). Aquest autor planteja que la variabilitat observada en les PEB dels peixos ossis podria estar relacionada amb la biologia de la reproducció d'aquest grup que és, majoritàriament, de fecundació externa. Kasinsky proposa que l'evolució de les proteïnes bàsiques de l'esperma podria estar relacionada amb el modus de fertilització (externa o interna); observa que en els grups de fertilització interna (urodels, rèptils, aus, mamífers) es dona una relativa constància en el tipus de PEB presentada, mentre que els de fertilització externa (peixos, anurs) presenten una major variabilitat en el tipus de PEB. Encara més, l'autor proposa l'associació general histones-fecundació externa i protamines-fecundació interna.

La hipòtesi de Kasinsky es basa en un estudi fet sobre anurs, urodels i rèptils i d'aquí l'ha feta extensiva a la resta de grups zoològics (v. Kasinsky, 1989). De fet, es tracta d'una correlació que s'ha de tenir en compte però no té perquè ser necessàriament l'explicació de la gran variabilitat de proteïnes espermàtiques bàsiques que trobem als peixos.

Estem d'acord amb aquest autor en què el presentar fecundació interna podria "fixar" més el tipus de PEB presentat en el sentit que, com més especialitzada és la biologia de la reproducció, més pot marcar els límits de

variació permesa en aquestes molècules (o dit d'una altra manera, a major especialització més fàcil és que les variacions sobre la molècula perjudiquin la seva funcionalitat). Això podria estar relacionat amb el fet que en altres grups no es dona la relativa "facilitat" que semblen posseir els peixos ossis i anurs per donar el "pas enrera" que suposaria el retornar a les histones com a PEB i seguir presentant un espermatozoide funcional. Val la pena recordar com en mamífers s'ha proposat una situació similar en el cas de la P2: en els casos on aquesta protamina no s'arriba a produir en quantitats importants o bé es produeix en forma no funcional, el paper de la condensació de la cromatina recauria completament sobre la P1, protamina amb funció presumiblement més transcendent que la de la P2 (v. apartat 2.4.4. de la introducció d'aquest treball).

2.3. ¿Es pot definir una línia evolutiva ininterrompuda en les PEB dels deuteròstoms?

Una última qüestió a discutir és la que fa referència a la pregunta plantejada en el present apartat. En realitat, pel que es desprèn d'aquest treball no es pot contestar afirmativament a aquesta pregunta. Creiem que la idea d'una evolució continuada proposada clàssicament (histones → proteïnes intermèdies → protamines) pot ser certa dins de grups particulars però no dins dels deuteròstoms agafats globalment.

Una possible explicació alternativa (o complementària) a l'anterior seria la següent: La histona H1 pot haver donat moltes formes variants que empaquetarien la cromatina espermàtica (com la histona H5 ho fa en l'eritròcit, per exemple); aquestes formes poden ser molt diverses (des de molt petites modificacions a modificacions molt grans) i es poden haver donat *repetidament i independentment* (H1 sp dels equinoderms, P1 dels tunicats, proteïna addicional de *Merluccius*, proteïna espermàtica de *Mullus*, etc.). Algunes d'aquestes proteïnes poden haver originat, en alguns casos, les

proteïnes especialitzades (com són les protamines de l'amfiox, les protamines típiques dels peixos, la P2 dels tunicats, etc.). Hem de considerar, doncs, que la formació d'aquestes proteïnes especialitzades pot ser independent entre els diferents grups, ja que poden provenir de proteïnes "H1-like" ja independents, amb la qual cosa es pot comprendre la gran diversificació d'aquestes molècules. Aquesta explicació, com ja hem dit, no necessàriament ha d'abarcabar totes les proteïnes especialitzades, i es pot imaginar altres orígens per algunes d'elles, de manera que encara es pot incrementar més aquesta diversitat.

D'altra banda, sembla que a partir del model de protamina dels peixos ossis s'hagin produït una sèrie de modificacions que hagin originat l'aparició de les protamines característiques dels diferents grups de tetràpodes. És a dir, mentre que no es pot establir una homologia clara entre les PEB dels diferents grups de deuteròstoms estudiats en aquest treball, sembla que sí es pot parlar d'homologia entre les protamines dels peixos i les dels tetràpodes (amfibis: Kasinsky et al., 1978; Kasinsky et al., 1985a; Risley i Eckhardt, 1981; Takamune et al., 1991; rèptils: Kasinsky et al., 1978; Huang et al., 1978; Chiva et al., 1989; aus: Nakano et al., 1987, 1988; mamífers: Kistler, 1989; Hecht, 1989, i referències d'aquestes dues cites; v. també la revisió d'Oliva i Dixon publicada el 1991).

V. Conclusions

Conclusions

1. Tunicats: Aquest és el primer grup conegut dins dels deuteròstoms on les histones són substituïdes pràcticament en la seva totalitat per PEB específiques. La PEB característica dels tunicats ascidiacis és la que hem anomenat P1. Aquesta proteïna es mostra tant composicionalment com estructuralment relacionada amb les histones de la família de l'H1, encara que posseeix un extrem N-terminal extremadament reduït. La seqüència parcial de la P1 d'*Styela plicata* és la següent: RRQKGRHPSYVMVKRA IASLRNKNNGASSKSIARYVFAHFNVK?K?S?PCK?K?AVARCLKRMVSG GFIYKNKRNLKLTGKGRKMKGKKRRRRGRRAL(R o L)?KGG(...). En el gènere *Styela*, a més, apareix una altra proteïna (P2) de menor mida i major riquesa en arginina; la composició de la P2 s'assembla molt a la de l'extrem C-terminal de la P1.
2. Cefalocordats: Al llarg de l'espermioogènesi de *Branchiostoma floridae* les histones són substituïdes per una proteïna altament especialitzada que consta només de 6 tipus diferents d'aminoàcids, el 50% dels quals estan constituïts per la suma Arg+Lys (que apareixen en quantitats equivalents). La seqüència parcial de l'extrem N-terminal d'aquesta proteïna (G/P-R-S-R-S-R-S-A-S) mostra l'alternància R-S ja descrita en les PEB d'altres grups animals (però no en les dels peixos ossis ni en les dels tunicats).
3. Agnats: Les proteïnes que compacten la cromatina a l'espermatozoide de *Petromyzon marinus* són histones de tipus canònic, sense que es doni l'aparició de cap proteïna addicional específica de l'espermatozoide.
4. Holocèfals (condrictis): Les PEB corresponents a *Hydrolagus colliei* consten de 3 proteïnes majoritàries (2 queratinoses i 1 no queratinosa) i 4 minoritàries (3 queratinoses i 1 no queratinosa) que substitueixen les histones en l'espermatozoide. Els 16 primers aminoàcids de la proteïna no queratinosa majoritària (R3) són els següents: ARRRHSMKKKRKSVRR. Aquesta seqüència mostra diferències substancials amb la corresponent molècula tro-

- bada als condrictis elasmobranquis i amb la protamina típica dels peixos ossis.
5. Teleostis (osteïctis): Hem trobat una àmplia varietat de continguts de PEB als nuclis espermàtics d'aquest grup: a) protamines típiques; b) histones sense proteïnes addicionals específiques; c) histones somàtiques amb un increment de la histona H1; d) histones amb proteïnes addicionals específiques; e) PEB diferents de les protamines típiques però que també substitueixen les histones durant l'espermiogènesi. Hem seqüenciat les proteïnes de dues espècies corresponents a la primera i la última d'aquestes categories (que són els dos casos on les histones són substituïdes per unes proteïnes específiques de l'espermatozoide). La PEB de *Dicentrarchus labrax* compleix les característiques d'una protamina típica; la seva seqüència aminoacídica és la següent: PRRRRQASRPVRRRRRTRRSTAERRRR RVVRRRR. La PEB de *Mullus surmuletus* pertany a la categoria (e) i la seva seqüència parcial és: PSTTSSKSPKRRRAKSPRRKRTGPTVSDLILMA MSASSDRGGLSLAALKKDLKGRGYDVVRNKGRVLMIAKRLVANKSV VKAKGFYKLNKNPPT(?)RR?RVAKKK?K?PKRGRKRKAAPKKKSAKKK RKRRRR?K(...). Tant a nivell de composició aminoacídica com a nivell d'estructura primària i secundària, aquesta proteïna és molt similar a la família de les histones H1 i proteïnes afins. També els casos que hem pogut analitzar de proteïnes específiques de l'espermatozoide que apareixen juntament amb la dotació d'histones, mostren característiques composicionals que recorden les histones H1 o H5.
6. La major part dels diferents tipus de proteïnes específiques de l'espermatozoide que hem trobat als grups estudiats poden classificar-se en dos grups generals: a) molècules relacionades amb les histones (P1 dels ascidiacis, PEB del moll, proteïna addicional de *Merluccius* i de *Cataetyx*); b) molècules especialitzades (P2 dels ascidiacis, PEB de l'amfiox, R3 d'*Hydrolagus collei*, protamines típiques dels peixos ossis).
7. L'anàlisi de les característiques moleculars de les PEB actuals en els deuteròstoms no recolza una evolució continua entre totes elles sinó orígens independents en diferents grups d'aquestes proteïnes.

VI. Annexos

Annex 1. Aminoàcids: Nomenclatura i característiques dels seus radicals.

<i>Aminoàcid</i>	<i>Codi de tres lletres</i>	<i>Codi d'una lletra</i>	<i>Tipus de radical (pH 6.0-7.0)</i>
Àcid aspàrtic	Asp	D	Polar carregat
Àcid glutàmic	Glu	E	Polar carregat
Alanina	Ala	A	No polar
Arginina	Arg	R	Polar carregat
Asparagina	Asn	N	Polar no carregat
Cisteïna	Cys	C	Polar no carregat
Fenilalanina	Phe	F	No polar
Glutamina	Gln	Q	Polar no carregat
Glicina	Gly	G	Polar no carregat
Histidina	His	H	Polar carregat
Isoleucina	Ile	I	No polar
Leucina	Leu	L	No polar
Lisina	Lys	K	Polar carregat
Metionina	Met	M	No polar
Prolina	Pro	P	No polar
Serina	Ser	S	Polar no carregat
Tirosina	Tyr	Y	Polar no carregat
Treonina	Thr	T	Polar no carregat
Triptòfan	Trp	W	No polar
Valina	Val	V	No polar

Annex 2. Recull de la informació disponible sobre el tipus de PEB dels peixos ossis (veure la taula de les pàgines següents).

La classificació seguida ha estat la de Nelson (1984). La majoria de la nomenclatura utilitzada ha estat obtinguda a partir dels següents llibres: pels peixos de l'Atlàntic NE i Mediterrani, Whitehead et al. (1984-1986); pels Clupeoidei de diferent distribució s'ha seguit la nomenclatura de Whitehead (1985); pels peixos de Canadà: costa pacífica, Hart (1973); costa atlàntica, Leim i Scott (1966); i pels d'aigua dolça, Scott i Crossman (1973); pels peixos d'aigua dolça de distribució europea s'ha seguit la nomenclatura de Maitland i Linsell (1980); pels peixos del Mar del Japó i zones adjacents, Lindberg i Legeza (1969) i Lindberg i Krasnyukova (1971).

Per facilitar futures consultes sobre les espècies que ja han estat estudiades s'ha afegit el nom de l'autor que va designar l'espècie i s'han actualitzat els noms de les espècies en els casos en què ha estat convenient. Així, quan apareixen dos noms a la taula, el primer fa referència a la nomenclatura usada en el treball original mentre que el segon correspon al que s'utilitza en la nomenclatura actual. Les espècies de les que no s'ha trobat la nomenclatura actualitzada s'han assenyalat amb un asterisc.

En el cas de les dades obtingudes dels articles originals, aquests apareixen citats a la bibliografia del present treball; en canvi, en el cas de dades trobades en treballs de revisió, aquest s'especifica a la columna "citats a" i és el que apareix a la bibliografia.

Abreviacions:

PEB (tipus de proteïna espermàtica bàsica presentat):

A = Proteïna addicional específica

E = Proteïnes especials

H = Histones

H+H1 = Histones amb un increment de la histona H1

P = Protamina típica

? = No estudiat

Citat a:

A = Ando et al., 1973

K = Kasinsky, 1989

Ordenació taxonòmica (cont.)	PEB	Referència	Citació
Família: COBITIDAE			
<u>Misgurnus fossilis</u> (Linnaeus, 1758)	H	Kadura <u>et al.</u> , 1988	
Ordre: CHARACIFORMES	(?)		
Ordre: SILURIFORMES			
Família: BAGRIDAE			
<u>Mystus vittatus</u> (Bloch, 1797)	H	Nandi <u>et al.</u> , 1979	
Família: CLARIIDAE			
<u>Clarias batrachus</u> Bleeker, 1865	H	Nandi <u>et al.</u> , 1979	
Família: HETEROPNEUSTIDAE			
<u>Heteropneustes fossilis</u> *	H	Nandi <u>et al.</u> , 1979	
Ordre: GYMNOTIFORMES	(?)		
Ordre: SALMONIFORMES			
Família: SALMONIDAE			
<u>Coregonus albus</u> = <u>C. albula</u> (Linnaeus, 1758)	P	Kossel, 1913	A
<u>Coregonus lavaretus</u> (Linnaeus, 1758)	P	Waldschmidt-Leitz i Gutermann, 1961	A
<u>Coregonus macrophthalmus</u> *	P	Kossel i Staudt, 1926	A
<u>Oncorhynchus keta</u> (Walbaum, 1792)	P	Watanabe (Ph. D. T.), 1969	A
<u>Oncorhynchus kisutch</u> (Walbaum, 1792)	P	Ingles (Ph. D. T.), 1968	A
<u>Oncorhynchus nerka</u> (Walbaum, 1792)	P	Yamakawa i Nokata, 1923	A
<u>Oncorhynchus tshawytscha</u> = <u>O. tshawytscha</u> (Walbaum, 1792)	P	Callanan <u>et al.</u> , 1957	A
<u>Prosopium williamsoni</u> (Girard, 1856)	P	Moir (Ph. D. T.), 1987	
<u>Salmo clarki</u> = <u>Oncorhynchus clarki</u> (Richardson, 1836)	P	Moir (Ph. D. T.), 1987	
<u>Salmo fontinalis</u> = <u>Salvelinus fontinalis</u> (Mitchill, 1815)	P	Hammarsten, 1924	A
<u>Salmo gairdneri</u> = <u>Oncorhynchus mykiss</u> (Walbaum, 1792)	P	Ingles (Ph. D. T.), 1968	A
<u>Salmo irideus</u> = <u>Oncorhynchus mykiss</u> (Walbaum, 1792)	P	Ando i Watanabe, 1969	K
<u>Salmo lacustris</u> = <u>Salmo trutta lacustris</u> (Linnaeus, 1758)	P	Klezkowski, 1946	A
<u>Salmo salar</u> Linnaeus, 1758	P	Miescher, 1874; Felix <u>et al.</u> , 1952	A
<u>Salmo trutta fario</u> (Linnaeus, 1758)	P	Waldschmidt-Leitz, 1961	A
<u>Salmo trutta lacustris</u> (Linnaeus, 1758)	P	Waldschmidt-Leitz, 1961	A
<u>Salvelinus alpinus</u> (Linnaeus, 1758)	P	Waldschmidt-Leitz i Gutermann, 1961	A
<u>Salvelinus fontinalis</u> (Mitchill, 1815)	P	Waldschmidt-Leitz i Gutermann, 1961	A
<u>Salvelinus namaycush</u> (Walbaum, 1792)	P	Kossel i Edlbacher, 1913	A
<u>Thymallus arcticus</u> (Pallas, 1776)	P	Moir (Ph. D. T.), 1987	
<u>Thymallus thymallus</u> (Linnaeus, 1758)	P	Moir (Ph. D. T.), 1987	
Família: ESOCIDAE			
<u>Esox lucius</u> (Linnaeus, 1758)	P	Daisley (Ph. D. T.), 1980	K
Família: ALEPOCEPHALIDAE			
<u>Alepocephalus rostratus</u> Risso, 1820	P	Present treball	
Ordre: STOMIIFORMES	(?)		
Ordre: AULOPIIFORMES	(?)		
Ordre: MYCTOPHIFORMES			
Família: MYCTOPHIDAE			
<u>Lampanyctus crocodilus</u> (Risso, 1810)	E	Present treball	
<u>Symbolophorus veranyi</u> (Moreau, 1888)	E	Present treball	
Ordre: PERCOPSIFORMES	(?)		

Ordenació taxonòmica (cont.)	PEB	Referència	Citació
Ordre: GADIFORMES Família: MORIDAE			
<u>Mora moro</u> (Risso, 1810)	H+A	Present treball	
Família: GADIDAE			
<u>Gadus morhua</u> Linnaeus, 1758	H	Bloch, 1969	K
<u>Lota vulgaris</u> = <u>Molva molva</u> (Linnaeus, 1758)	H	Bloch, 1969	K
<u>Micromesistius poutassou</u> (Risso, 1826)	H+A	Present treball	
<u>Phycis blennoides</u> (Brünnich, 1768)	H+A	Present treball	
Família: MERLUCCIIDAE			
<u>Merluccius capensis</u> Castelnau, 1861	H+A	Present treball	
<u>Merluccius merluccius</u> (Linnaeus, 1758)	H+A	Present treball	
Ordre: OPHIDIIFORMES Família: BYTHITIDAE			
<u>Cataetyx laticeps</u> Koefoed, 1927	H+A	Present treball	
Ordre: BATRACHOIDIFORMES Família: BATRACHOIDIDAE			
<u>Opsanus beta</u> (Goode i Bean, 1885)	H	Bloch, 1976	K
<u>Opsanus tau</u> (Linnaeus, 1766)	H	Casas <u>et al.</u> , 1981	
Ordre: LOPHIIFORMES Família: LOPHIIDAE			
<u>Lophius budegassa</u> Spinola, 1807	P	Present treball	
Ordre: GOBIESOCIFORMES	(?)		
Ordre: CYPRINODONTIFORMES Família: EXOCOETIDAE			
<u>Cypselurus agoo</u> = <u>Cheilopogon agoo agoo</u> (Temminck i Schlegel, 1846)	P	Yamakawa <u>et al.</u> , 1923	A
Família: HEMIRAMPHIDAE			
<u>Hemiramphus unifasciatus</u> *	P	Nandi <u>et al.</u> , 1979	
Família: BELONIDAE			
<u>Xenentodon cancila</u> *	P	Nandi <u>et al.</u> , 1979	
Ordre: ATHERINIFORMES	(?)		
Ordre: LAMPRIIFORMES	(?)		
Ordre: BERYCIFORMES Família: BERYCIDAE			
<u>Beryx splendens</u> Lowe, 1834	P	Kadura <u>et al.</u> , 1988	
Ordre: ZEIFORMES	(?)		
Ordre: GASTEROSTEIFORMES Família: GASTEROSTEIDAE			
<u>Gasterosteus aculeatus</u> Linnaeus, 1758	P	Lemke (M. Sci. T.)	K
Ordre: INDOSTOMIFORMES	(?)		
Ordre: PEGASIFORMES	(?)		

Ordenació taxonòmica (cont.)	PEB	Referència	Citació
Ordre: SYNGNATHIFORMES	(?)		
Ordre: DACTYLOPTERIFORMES	(?)		
Ordre: SYNBRANCHIFORMES	(?)		
Ordre: SCORPAENIFORMES Família: SCORPAENIDAE			
<u>Helycolenus dactylopterus dactylopterus</u> (Delaroche, 1809)	P	Present treball	
Família: TRIGLIDAE			
<u>Trigla lucerna</u> Linnaeus, 1758	H	Present treball	
Família: CYCLOPTERIDAE			
<u>Cyclopterus lumpus</u> Linnaeus, 1758	P	Markowin, 1899	A
Ordre: PERCIFORMES Subordre: Percoidei Família: CENTROPOMIDAE			
<u>Lates calcarifer</u> (Bloch, 1790)	P	Nandi <u>et al.</u> , 1979	
Família: PERCICHTHYIDAE			
<u>Dicentrarchus labrax</u> (Linnaeus, 1758)	P	Present treball	
<u>Lateolabrax japonicus</u> (Cuvier, 1828)	P	Yamakawa <u>et al.</u> , 1916	A
<u>Morone americanus</u> = <u>M. americana</u> (Gmelin, 1788)	P	Daisley (Ph. D. T.), 1980	K
<u>Stereolepis ishinagi</u> = <u>S. gigas</u> Ayres, 1859	P	Yamakawa <u>et al.</u> , 1916	A
Família: PERCIDAE			
<u>Luciperca sandra</u> *	P	Lisitzuin i Aleksandrovskaya, 1933	A
<u>Lucioperca lucioperca</u> = <u>Stizostedion lucioperca</u> (Linnaeus, 1758)	P	Kadura <u>et al.</u> , 1988	
<u>Perca flavescens</u> (Mitchill, 1814)	P	Daisley (Ph. D. T.), 1980	K
<u>Perca fluviatilis</u> (Linnaeus, 1758)	P	Kadura <u>et al.</u> , 1988	
<u>Stizostedion vitreum</u> (Mitchill, 1818)	P	Kossel, 1913	A
Família: SILLAGINIDAE			
<u>Sillago sihama</u> (Forsskal, 1775)	P	Nandi <u>et al.</u> , 1979	
Família: POMATOMIDAE			
<u>Scombrops boops</u> (Houttuyn, 1782)	P	Yamakawa <u>et al.</u> , 1916	
Família: CARANGIDAE			
<u>Caranx fulvoguttatus</u> = <u>Carangoides fulvoguttatus</u> (Forsskal, 1775)	P	Kadura <u>et al.</u> , 1988	
<u>Decapterus kiliche</u> (Valenciennes, 1839)	P	Kadura <u>et al.</u> , 1988	
<u>Seriola aureovittata</u> Temminck i Schlegel, 1842	P	Yamakawa <u>et al.</u> , 1916	A
Família: EMMELICHTHYIDAE			
<u>Emmelichthys nitidus</u> Richardson, 1845	P	Kadura <u>et al.</u> , 1988	
<u>Plagiogeneion rubiginosus</u> (Hutton, 1875)	P	Kadura <u>et al.</u> , 1988	
Família: LUTJANIDAE			
<u>Lutianus vitta</u> = <u>Lutjanus vitta</u> (Quoy i Gaimard, 1824)	P	Yamakawa <u>et al.</u> , 1923	A

Ordenació taxonòmica (cont.)	PEB	Referència	Citat a
<p>Família: SPARIDAE</p> <p><u>Diplodus annularis</u> (Linnaeus, 1758) <u>Diplodus sargus sargus</u> (Linnaeus, 1758) <u>Lithognathus mormyrus</u> (Linnaeus, 1758) <u>Pagellus acarne</u> (Risso, 1826) <u>Sparus aurata</u> Linnaeus, 1758</p>	<p>H+H1 H+H1 H+H1 H+H1 H+H1</p>	<p>Present treball Present treball Present treball Present treball Present treball</p>	
<p>Família: SCIAENIDAE</p> <p><u>Sagenichthys ancylodon</u> = <u>Macrodon ancylodon</u> (Bloch i Schneider, 1801) <u>Sciaena schlegeli</u> = <u>Argyrosomus argentatus</u> (Houttuyn, 1782)</p>	<p>P P</p>	<p>Kossel i Staudt, 1927 Yamakawa <u>et al.</u>, 1916</p>	<p>A A</p>
<p>Família: MULLIDAE</p> <p><u>Mullus barbatus</u> Linnaeus, 1758 <u>Mullus sumuletus</u> Linnaeus, 1758</p>	<p>E E</p>	<p>Present treball Present treball</p>	
<p>Família: PENTACEROTIDAE</p> <p><u>Pentaceros richardsoni</u> Smith, 1849</p>	<p>P</p>	<p>Kadura <u>et al.</u>, 1988</p>	
<p>Família: NANDIDAE</p> <p><u>Nandus nandus</u> Valenciennes, 1836</p>	<p>P</p>	<p>Nandi <u>et al.</u>, 1979</p>	
<p>Família: CICHLIDAE</p> <p><u>Sarothedon mossambica</u>* <u>Tilapia mossambica</u> (Peter, 1852)</p>	<p>P P</p>	<p>Moav <u>et al.</u>, 1974 Nandi <u>et al.</u>, 1979</p>	<p>K</p>
<p>Subordre: Mugiloidei Família: MUGILIDAE</p> <p><u>Mugil cephalus</u> Linnaeus, 1758 <u>Mugil japonicus</u>* <u>Mugil parsia</u> = <u>Liza parsia</u> (Hamilton-Buchanan, 1822) <u>Mugil tade</u> = <u>Liza tade</u> (Forsskal, 1775)</p>	<p>P P P P</p>	<p>Yamakawa i Nokata, 1926 Ota <u>et al.</u>, 1966 Nandi <u>et al.</u>, 1979 Nandi <u>et al.</u>, 1979</p>	<p>A A</p>
<p>Subordre: Polynemoidei Família: POLYNEMIDAE</p> <p><u>Eleutheronema tetradactylum</u> (Shaw, 1804) <u>Polynemus paradiseus</u> Linnaeus, 1758</p>	<p>P P</p>	<p>Nandi <u>et al.</u>, 1979 Nandi <u>et al.</u>, 1979</p>	
<p>Subordre: Labroidei Família: LABRIDAE</p> <p><u>Crenilabrus pavo</u> = <u>Symphodus (Crenilabrus) tinca</u> (Linnaeus, 1758) <u>Symphodus (Crenilabrus) ocellatus ocellatus</u> (Forsskal, 1775)</p>	<p>P P</p>	<p>Kossel, 1910 Present treball</p>	<p>A</p>
<p>Subordre: Nototheniidae Família: NOTOTHENIIDAE</p> <p><u>Eleginops maclovinus</u> (Valenciennes, 1830)</p>	<p>P</p>	<p>Present treball</p>	
<p>Família: HARPAGIFERIDAE</p> <p><u>Harpagifer</u> sp.</p>	<p>P</p>	<p>Present treball</p>	
<p>Família: CHANNICHTHYIDAE</p> <p><u>Champocephalus esox</u> (Günther, 1861)</p>	<p>P</p>	<p>Present treball</p>	
<p>Subordre: Trachinoidei Família: TRACHINIDAE</p> <p><u>Trachinus draco</u> Linnaeus, 1758</p>	<p>P</p>	<p>Present treball</p>	

Ordenació taxonòmica (cont.)	PEB	Referència	Citació
Família: URANOSCOPIDAE			
<u>Uranoscopus scaber</u> Linnaeus, 1758	P	Present treball	
Subordre: Blennioidei Família: BLENNIIDAE			
<u>Lipophrys trigloides</u> (Valenciennes, 1836)	H	Present treball	
Subordre: Gobioidi Família: GOBIIDAE			
<u>Glossogobius giuris</u> (Buchanan-Hamilton, 1877)	P	Nandi <u>et al.</u> , 1979	
Subordre: Scombroidei Família: GEMPYLIDAE			
<u>Thyrsites atun</u> (Euphrasen, 1791)	P	Present treball	
<u>Thyrsitoides marleyi</u> Fowler, 1929	P	Kadura <u>et al.</u> , 1988	
Família: TRICHIURIDAE			
<u>Lepidopus caudatus</u> (Euphrasen, 1788)	H+H1	Present treball	
Família: SCOMBRIDAE			
<u>Gymnosarda vaquas</u> = <u>Katsuwonus pelamis</u> (Linnaeus, 1758)	P	Yamakawa i Nokata, 1923	A
<u>Pelamys sarda</u> = <u>Sarda sarda</u> (Bloch, 1793)	P	Kossel, 1913	A
<u>Scomber</u> sp.	P	Present treball	
<u>Scomber japonicus</u> Houttuyn, 1782	P	Kadura <u>et al.</u> , 1988	
<u>Scomber scombrus</u> Linnaeus, 1758	P	Kurajeff, 1899	A
<u>Scomberomorus niphonius</u> (Cuvier, 1831)	P	Yamakawa <u>et al.</u> , 1916	A
<u>Thunnus alalunga</u> (Bonnaterre, 1788)	P	Kossel i Staudt, 1927	A
<u>Thunnus thynnus</u> (Linnaeus, 1758)	P	Bretzel, 1973	K
Família: XIPHIIDAE			
<u>Xiphias gladius</u> Linnaeus, 1758	P	Kossel, 1913	A
Subordre: Stromateoidei Família: CENTROLOPHIDAE			
<u>Hyperoglyphe antarctica</u> *	P	Kadura <u>et al.</u> , 1988	
<u>Schedophilus ovalis</u> (Valenciennes, 1833)	P	Kadura <u>et al.</u> , 1988	
Família: NOMEIDAE			
<u>Cubiceps coeruleus</u> *	P	Kadura <u>et al.</u> , 1988	
<u>Cubiceps brevimanus</u> *	P	Kadura <u>et al.</u> , 1988	
Família: STROMATEIDAE			
<u>Stromateus argenteus</u> = <u>Pampus argenteus</u> (Euphrasen, 1788)	P	Nandi <u>et al.</u> , 1979	
Subordre: Anabantoidei Família: ANABANTIDAE			
<u>Anabas testudineus</u> Valenciennes, 1836	P	Nandi <u>et al.</u> , 1979	
Subordre: Channoidei Família: CHANNIDAE			
<u>Channa punctatus</u> o bé <u>Ophicephalus punctatus</u> *	H	Nandi <u>et al.</u> , 1979	
Ordre: PLEURONECTIFORMES Família: PLEURONECTIDAE			
<u>Hippoglossus hippoglossus</u> (Linnaeus, 1758)	E	Moir (Ph. D. T.), 1987	
<u>Pseudopleuronectes americanus</u> (Walbaum, 1792)	E	Kennedy i Davies, 1980	K

Ordenació taxonòmica (cont.)	PEB	Referència	Citat a
Ordre: TETRAODONTIFORMES Família: TETRAODONTIDAE <u>Spherooides pardalis*</u> <u>Spherooides rubripes*</u>	 P P	 Yamakawa <u>et al.</u> , 1923 Yamakawa <u>et al.</u> , 1923	 A A

VII. Bibliografia

Bibliografia

- Aboukarsh, N. i M. Kunkle (1985) Ultrastructural organization of heterochromatin within sea urchin sperm nuclei. *Gam. Res.*, 12:55-64.
- Afzelius, B.A. (1970) Discussió a Nicander, L. 1970. Comparative studies on the fine structure of vertebrate spermatozoa. En: *Comparative Spermatology*. B. Baccetti, ed., Academic Press, New York, pp. 47-55.
- Agell, N., M. Chiva, C. Mezquita (1983) Changes in nuclear content of protein conjugate histone H2A-ubiquitin during rooster spermatogenesis. *FEBS Lett.*, 155:209-212.
- Aiken, J.M., D. McKenzie, H.Z. Zhao, J.C. States i G.H. Dixon (1983) Sequence homologies in the protamine gene family of rainbow trout. *Nucleic Acids Res.*, 11:4907-4922.
- Aitken, A., M.J. Geisow, J.B.C. Findlay, C. Holmes i A. Yarwood (1989) Peptide preparation and characterization. En: *Protein sequencing. A practical approach*. J.B.C. Findlay i M.J. Geisow, eds., IRL Press, Oxford, pp. 43-68.
- Alder, D. i M.A. Gorovsky (1975) Electrophoretic analysis of liver and testis histones of the frog *Rana pipiens*. *J. Cell Biol.*, 64:389-397.
- Allan, J.A., G.J. Cowling, N. Harborne, P. Cattini, R. Craigie i H. Gould (1981) Regulation of the higher-order structure of chromatin by histones H1 and H5. *J. Cell Biol.*, 90:279-288.
- Allan, J. A., P.G. Hartman, C. Crane-Robinson i F. X. Avilés (1980) The structure of histone H1 and its location in chromatin. *Nature*, 288:675-679.
- Allen, G. (1989) Sequencing of proteins and peptides. En: *Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 9. R.H. Burdon i P.H. van Knippenberg, eds., Elsevier, Amsterdam.
- Ammer, H. i A. Henschen (1988) Primary structure of rabbit sperm protamine, the first protamine of its type with an aberrant N-terminal. *FEBS Lett.*, 242:111-116.
- Amor, M.J. (1987) La espermatogénesis de *Murex brandaris* (L.) (Gastropoda, Prosobranchia). Estudio ultraestructural. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona.
- Ando, T., K. Iwai, S. Ishii, M. Azegami i C. Nakahara (1962) The chemical structure of one component of clupeine. *Biochim. Biophys. Acta*, 56:628-630.
- Ando, T. i K. Suzuki (1966) The amino acid sequence of the second component of clupeine. *Biochim. Biophys. Acta*, 121:427-429.
- Ando, T. i K. Suzuki (1967) The amino acid sequence of the third component of clupeine. *Biochim. Biophys. Acta*, 140:375-377.

- Ando, T. i S. Watanabe (1969) A new method for fractionation of protamines and the amino acid sequence of one component of salmine and three components of iridine. *Int. J. Protein Res.*, 1:221-224.
- Ando, T., M. Yamasaki i K. Suzuki (1973) Protamines. Isolation, characterization, structure and function. Springer-Verlag, Berlin.
- Arceci, R.J. i P.R. Gross (1980) Sea urchin chromatin structure as probed by pancreatic DNase I: Evidence for a novel cutting periodicity. *Dev. Biol.*, 80:210-224.
- Ausió, J. (1980) Caracterización de proteínas de los moluscos bivalvos: *Mytilus edulis* y *Spisula solidissima* y estudio de sus interacciones con el ADN. Tesi doctoral, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.
- Ausió, J. (1986) Structural variability and compositional homology of the protamine-like components of the sperm from the bivalve mollusks. *Comp. Biochem. Physiol.*, [B], 85:439-449.
- Ausió, J. (1988) An unusual cysteine-containing histone H1-like protein and two protamine-like proteins are the major nuclear proteins of the sperm of the bivalve mollusc *Macoma nasuta*. *J. Biol. Chem.*, 263:10141-10150.
- Ausió, J. (1989) Presència d'una proteïna altament específica del tipus histona H1 en la cromatina espermàtica dels mol·luscs bivalves. *Biol. Reprod. (Soc. Cat. Biol.)*, 1:52-67.
- Ausió, J. (1992) Purification and biochemical characterization of the nuclear sperm-specific proteins of the bivalve mollusks *Agriondesma saxicola* and *Mytilimeria nuttalli*. *Biol. Bull.*, 182:31-40.
- Ausió, J., K.O. Greulick, E. Haas i E. Wachtel (1984) Characterization of the fluorescence of the protamine thynnine and studies of binding to double-stranded DNA. *Biopolymers*, 23:2559-2571.
- Ausió, J., A. Toudmadje, R. McParland, R. Becker, W.C. Johnson i K.E. van Holde (1987) Structural characterization of the trypsin-resistant core in the nuclear sperm-specific protein from *Spisula solidissima*. *Biochemistry*, 26:975-982.
- Ausió, J. i K.E. van Holde (1987) A dual chromatin organization in the sperm of the bivalve mollusc *Spisula solidissima*. *Eur. J. Biochem.*, 165:363-371.
- Aviles, F.J., G.E. Chapman, G.G. Kneale, C. Crane-Robinson i E.M. Bradbury (1978) The conformation of histone H5. Isolation and characterization of the globular segment. *Eur. J. Biochem.*, 88:363-371.
- Avramova, Z., A. Zalensky i R. Tsanev (1984) Biochemical and ultrastructural study of the sperm chromatin from *Mytilus galloprovincialis*. *Exp. Cell Res.*, 152:231-239.
- Azorín, F., C. Olivares, A. Jordan, L. Pérez-Grau, L. Cornudella i J.A. Subirana (1983) Heterogeneity of the histone-containing chromatin in sea cucumber spermatozoa. Distribution of the basic protein \varnothing_0 and absence of non-histone proteins. *Exp. Cell Res.*, 148:331-344.

-
- Babu, A. i R.S. Verma (1987) Chromosome structure: Euchromatin and heterochromatin. *International Review of Cytobiology*, 108:1-60.
- Balhorn, R. (1982) A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J. Cell Biol.*, 93:298-305.
- Balhorn, R., M. Corzett, J. Mazrimas i B. Katkins (1991) Identification of bull protamine difulfides. *Biochemistry*, 30:175-181.
- Balhorn, R., J.A. Mazrimas, M. Corzett, J. Cummins i B. Fadem (1989) Analysis of protamines isolated from two marsupials, the ring-tailed wallaby and gray short-tailed opossum. *J. Cell Biol.* 107:167a.
- Balhorn, R., S. Weston, C. Thomas i A.J. Wyrobek (1984) DNA packaging in mouse spermatids. Synthesis of protamine variants and four transition proteins. *Exp. Cell Res.*, 150:298-308.
- Barnes, R.D. (1980) *Invertebrate zoology*. 4th edition. Saunders College, Philadelphia.
- Bedford, J.M. i H.I. Calvin (1974) The occurrence and possible functional significance of S-S crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *J. Exp. Zool.*, 183:137-156.
- Bellvé, A.R. i R. Carraway (1978) Characterization of two basic chromosomal proteins isolated from mouse spermatozoa. *J. Cell Biol.*, 79:177a.
- Bellvé, A.R., D.J. McKay, B.S. Renaux i G.H. Dixon (1988) Purification and characterization of mouse protamines P1 and P2. Amino acid sequence of P2. *Biochemistry*, 27:2890-2897.
- Benyajati, C. i A. Worcel (1976) Isolation, characterization, and structure of the folded interphase genome of *Drosophila melanogaster*. *Cell*, 9:393-407.
- Berkaloff, A., J. Bourguet, P. Favard i J.C. Lacroix (1983) *Biología y Fisiología Celular*. Vol. IV: Cromosomas, nucleolos, envoltura celular. Ediciones Omega, S.A., Barcelona.
- Bidlingmeyer, B.A., S.A. Cohen i T.L. Tarvin (1984) Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J. Chromatogr.*, 336:93-104.
- Bisbee, C.A., M.A. Baker, A.C. Wilson, I. Hadji-Azimi i M. Fischberg (1977) Albumin phylogeny for clawed frogs (*Xenopus*). *Science*, 195:785-787.
- Bloch, D.P. (1969) A catalog of sperm histones. *Genetics (Suppl.)*, 61:93-111.
- Bloch, D.P. (1976) Histones of sperm. En: *Handbook of Genetics*, vol. 5. R.C. King, ed., Plenum Press, New York, pp. 139-149.
- Bols, N.C., S.A. Boliska, J.B. Rainville i H.E. Kasinsky (1980) Nuclear basic proteins changes during spermiogenesis in the longnose skate and the spiny dogfish. *J. Exp. Zool.*, 212:423-433.
-

- Bols, N.C., E.W. Byrd Jr. i H.E. Kasinsky (1976) On the diversity of sperm histones in the vertebrates. I. Changes in basic proteins during spermiogenesis in the newt *Notophthalmus viridiscens*. *Differentiation*, 7:31-38.
- Bols, N.C. i H.E. Kasinsky (1972) Basic protein composition of anuran sperm. A cytochemical study. *Can. J. Zool.*, 50:171-177.
- Bols, N.C. i H.E. Kasinsky (1973) An electrophoretic comparison of histones in anuran testes. *Can. J. Zool.*, 51:203-208.
- Bols, N.C. i H.E. Kasinsky (1974) Cytochemistry of sperm histones in three cartilaginous fish. *Can. J. Zool.*, 52:437-439.
- Bols, N.C. i H.E. Kasinsky (1976) On the diversity of sperm histones in the vertebrates: II. A cytochemical study of the basic protein transitions during spermiogenesis in the cartilaginous fish *Hydrolagus colliei*. *J. Exp. Zool.*, 198: 109-114.
- Bonner, W.M., M.H.P. West i J.D. Stedman (1980) Two-dimensional gel analysis of histones in acid extracts of nuclei, cells and tissues. *Eur. J. Biochem.*, 109:17-23.
- Bower, P.A., P.C. Yelick i N.B. Hecht (1987) Both protamine 1 and 2 genes are expressed in the mouse, hamster and rat. *Biol. Reprod.*, 37:479-488.
- Brandt, W.F., W.N. Strickland, M. Strickland, L. Carlisle, D. Woods i C. von Holt (1979) A histone programme during the life cycle of the sea urchin. *Eur. J. Biochem.*, 94:1-7.
- Bretzel, G. (1972) Über Thynnin, das Protamine des Thunfisches. Die Sequenz der Komponente Y1. XII. Mitteilung über die Struktur der Protamine in der Untersuchungsreihe von E. Waldschmidt-Leitz und Mitarbeitern, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 353:933-943.
- Bretzel, G. (1973) Über Thynnin, das Protamine des Thunfisches. Die Aminosäuresequenz von Thynnin Z1. XIII. Mitteilung über die Struktur der Protamine in der Untersuchungsreihe von E. Waldschmidt-Leitz und Mitarbeitern, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 354:543-549.
- Briand, G., D. Kmiecik, P. Sautière, D. Wouters, O. Boris-Loy, G. Biserte, A. Mazen i M. Champagne (1980) Chicken erythrocyte histone H5. IV. Sequence of the carboxy-terminal half of the molecule (96 residues) and complete sequence. *FEBS Lett.*, 112:147-151.
- Brusle, S. (1981) Ultrastructure of spermiogenesis in *Liza aurata* Risso, 1810 (Teleostei, Mugilidae), *Cell Tissue Res.*, 217:415-424.
- Bunick, D., R. Balhorn, L.H. Stanker i N.B. Hecht (1990) Expression of the rat protamine 2 gene is suppressed at the level of transcription and translation. *Exp. Cell Res.*, 188:147-152.
- Burlingame, R.W., W.E. Love, B. Wang, R. Hamlin, N.H. Xuong i E.N. Moudrianakis (1985) Crystallographic structure of the octameric histone core of the nucleosome at a resolution of 3.3 Å. *Science*, 228:546-553.
- Butler, R.D. i M.S. Gabri (1984) Structure and development of the sperm head in the lizard *Podarcis (=Lacerta) taurica*. I. *Ultrastruct. Res.*, 88:261-274.

-
- Carlos, S., D.F. Hunt, C. Rocchini, D.P. Arnott i J. Ausió (1993a) Post-translational cleavage of a histone H1-like protein in the sperm of *Mytilus*. *J. Biol. Chem.*, 268 (en premsa).
- Carlos, S., L. Jutglar, I. Borrell, D.F. Hunt i J. Ausió (1993b) Sequence and characterization of a sperm-specific histone H1-like protein of *Mytilus californianus*. *J. Biol. Chem.*, 268 (en premsa).
- Casas, M.T., J. Ausió i J.A. Subirana (1993) Chromatin fibers with different protamine and histone compositions. *Exp. Cell Res.* (en premsa).
- Casas, M.T., S. Muñoz-Guerra i J.A. Subirana (1981) Preliminary report on the ultrastructure of chromatin in the histone containing spermatozoa of a teleost fish. *Biol. Cell*, 40: 87-92.
- Chaveau, J., Y. Moule i C. Rouiller (1956) Isolation of pure and unaltered liver nuclei morphology and biochemical composition. *Exp. Cell Res.*, 11:317-321.
- Chauvière, M., B. Laine, P. Sautière i P. Chevaillier (1983) Purification and characterization of two basic spermatid-specific proteins isolated from the dog-fish *Scylliorhinus caniculus*. *FEBS Lett.*, 152:231-235.
- Chauvière, M., A. Martinage, G. Briand, P. Sautière i P. Chevaillier (1987) Nuclear basic protein transition during sperm differentiation. Amino acid sequence of a spermatid-specific protein from the dog-fish *Scylliorhinus caniculus*. *Eur. J. Biochem.*, 169:105-111.
- Chauvière, M., A. Martinage, G. Briand, P. Sautière i P. Chevaillier (1989) Nuclear basic protein transition during sperm differentiation. Primary structure of the spermatid-specific protein S2 from the dog-fish *Scylliorhinus caniculus*. *Eur. J. Biochem.*, 180:329-335.
- Chevaillier, P. (1983) Some aspects of chromatin organization in sperm nuclei. En: *The Sperm Cell, Proceedings of the Fourth International Symposium on Spermatology*. J. André, ed., Martinus Nijhoff, The Hague, pp. 179-196.
- Chevaillier, P., A. Martinage, M. Gusse i P. Sautière (1987) Amino acid sequence of scylliorhinine Z1 and comparison of the primary structure of the protamines of the dogfish *Scylliorhinus caniculus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 914:19-27.
- Chiva, M., M. Daban, E. Rosenberg i H.E. Kasinsky (1991) Protamines in polyplacophors and gastropods as a model for evolutionary changes in molluscan sperm basic proteins. En: *Comparative spermatology 20 years after*. B. Baccetti, ed., Serono Symposia Publications from Raven Press, vol. 75, pp. 27-30.
- Chiva, M., H.E. Kasinsky, M. Mann i J.A. Subirana (1988) On the diversity of sperm basic proteins in the vertebrates: VI. Cytochemical and biochemical analysis in birds. *J. Exp. Zool.*, 245:304-317.
- Chiva, M., H.E. Kasinsky i J.A. Subirana (1987) Characterization of protamines from four avian species. *FEBS Lett.*, 215:237-240.
- Chiva, M., D. Kulak i H.E. Kasinsky (1989) Sperm basic proteins in the turtle *Chrysemis picta*: Characterization and evolutionary implications. *J. Exp. Zool.*, 249:329-333.
-

- Chiva, M. i C. Mezquita (1983) Quantitative changes of high mobility group non-histone chromosomal proteins HMG-1 and HMG-2 during rooster spermatogenesis. *FEBS Lett.*, 162:324-328.
- Chiva, M. i J.A. Subirana (1986) Estudi dels patrons de difracció de raigs X dels complexos del DNA amb dues protamines d'aus. III Jornades Biologia Molecular, Soc. Cat. Biol., p. 9.
- Chiva, M. i J.A. Subirana (1987) Mètode per a obtenir protamines testiculars riques en arginina. IV Jornades de Biologia Molecular, Secció de Biologia Molecular de la Societat Catalana de Biologia, pp. 77-80.
- Chou, P.Y. i G.D. Fasman (1978) Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Advances in Enzymology*, 47:45-148.
- Christensen, M.E. i G.H. Dixon (1982) Hyperacetylation of histone H4 correlates with the terminal, transcriptionally inactive stages of spermatogenesis in rainbow trout. *Dev. Biol.*, 93:404-415.
- Christensen, M.E., J.B. Rattner i G.H. Dixon (1984) Hyperacetylation of histone H4 promotes chromatin decondensation prior to histone replacement by protamines during spermatogenesis in rainbow trout. *Nucleic Acids Res.*, 12:4575-4592.
- Coelingh, J.P., T.H. Rozijn i C.H. Monfoort (1969) Isolation and partial characterization of a basic protein from bovine sperm heads. *Biochim. Biophys. Acta*, 188:353-356.
- Colom, J. i J.A. Subirana (1979) Protamines and related proteins from spermatozoa of molluscs: characterization and molecular weight determination by gel electrophoresis. *Biochem. Biophys. Acta*, 581:217-227.
- Connor, W., J. Mezquita, R.J. Winkfein, J.C. States i G.H. Dixon (1984) Organization of the histone genes in the rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *J. Mol. Evol.*, 20:227-235.
- Cook, P.R. i I.A. Brazell (1976) Conformational constraints in nuclear DNA. *J. Cell Sci.*, 22:287-302.
- Cornudella, L. i E. Rocha (1979) Nucleosome organization during germ cell development in the sea cucumber *Holothuria tubulosa*. *Biochem.* 18:3724-3732.
- Corzett, M., R. Blacher, J.A. Mazrimas i R. Balhorn (1987) Analysis of hamster protamines: Primary sequence and species distribution. *J. Cell Biol.*, 105:152a.
- Crane-Robinson, C. i O.B. Ptitsyn (1989) Binding of the globular domain of linker histones H5/H1 to the nucleosome: a hypothesis. *Prot. Eng.*, 3:577-582.
- Creighton, T.E. (1980) Counting integral numbers of amino acid residues per polypeptide chain. *Nature*, 284:487-489.
- Cruz-Hofling, M.A. i C. Cruz-Landim (1978) The fine structure of nuclei during spermiogenesis in the lizard *Tropidurus torquatus* (Lacertilia). *Cytologia*, 43:61-68.
- Daban, M. (1991) Protamines de mol·luscs gastròpodes i polioplacòfors. Caracterització i implicacions evolutives. Tesi doctoral. ETSEIB, UPC, Barcelona.

-
- Daban, M., C. Càceres, N. Saperas, G. Kessra i M. Chiva (1991a) Les proteïnes específiques dels nuclis dels espermatozoides en els mol·luscs. *Treb. Soc. Cat. Biol.*, 42:35-61.
- Daban, M., M. Chiva, E. Rosenberg, H.E. Kasinsky i J.A. Subirana (1991b) Protamines in prosobranchian gastropods (Mollusca) vary with different modes of reproduction. *J. Exp. Zool.*, 257:265-283.
- Daban, M., H.E. Kasinsky, F. Lafargue i M. Chiva (1991c) Nuclear sperm basic proteins (protamines) in chitons (Polyplacophora). Compositional and structural analogies with protamines of other molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.*, 98B:437-443.
- Daisley, E.E.St.L. (1980) Protamine gene evolution in fish. Ph. D. Thesis, Queens University, Kingston, Ontario.
- Daisley, St.L. i P.L. Davies (1982) Divergence of protamine gene sequences in fish. *Biochim. Biophys. Acta*, 698:271-279.
- Davies, H.G., A.B. Murray i M.E. Walmsley (1974) Electron microscope observations on the organization of the nucleus in chicken erythrocytes and a superunit thread hypothesis for chromatin structure. *J. Cell Sci.*, 16:261-299.
- Davis, B.J. (1964) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121:404-427.
- Dixon, G.H., J.M. Aiken, J.M. Jankowski, D.I. McKenzie, R. Moir i J.C. States (1985) Organization and evolution of the protamine genes of salmonid fishes. En: *Chromosomal proteins and gene expression*. G.R. Reeck, G.A. Goodwin i P. Puigdomènec, eds., Plenum Press, New York, NATO ASI Series, Series A: Life Sciences, 101:287-314.
- Domenjoud, L., C. Fronia, F. Uhde, W. Engel (1988) Sequence of human protamine 2 cDNA. *Nucleic Acids Res.*, 16:7733.
- Doolittle, R.F. (1986) Of URFS and ORFS. A primer on how to analyze derived amino acid sequences. University Science Books, Mill Valley.
- Dunker, A.K. i R.R. Rueckert (1969) Observations on molecular weight determinations on polyacrylamide gel. *J. Biol. Chem.*, 244:5074-5080.
- Edman, P. (1950) Method for the determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem. Scand.*, 4:283-293.
- Edman, P. (1953) Note on the stepwise degradation of peptides via phenylthiohydantoins. *Acta Chem. Scand.*, 7:700-701.
- Edman, P. (1956) Mechanism of the phenyl isothiocyanate degradation of peptides. *Nature*, 177:761-768.
- Edman, P. i G. Begg (1967) A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.*, 1:80-91.
- Edman, P. i A. Henschen (1975) Sequence determination. En: *Protein sequence determination*. S.B. Needleman, ed., Springer-Verlag, Berlin, pp. 232-279.
-

- Elsevier, S.M. (1982) Messenger RNA encoding basic chromosomal proteins of mouse testis. *Dev. Biol.*, 90:1-12.
- Elsevier, S.M. i C. Pieau (1988) Purification and partial characterization of protamines from the European pond turtle *Emys orbicularis*. *J. Exp. Zool.*, 246:33-41.
- Fawcett, D.W., W.A. Anderson i D.M. Phillips (1971) Morphogenetic factors influencing the shape of the sperm head. *Dev. Biol.*, 26:220-251.
- Felix, K. (1960) Protamines. *Adv. Protein Chem.* 15:1-56.
- Fifis, T., D.W. Cooper i R.J. Hill (1990) Characterization of the protamines of the tammar wallaby *Macropus eugenii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 95B:571-575.
- Finch, J.T. i A. Klug (1976) Solenoidal model for superstructure of chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73:1897-1901.
- Fischer, W., M.L. Bauchot i M. Schneider (1987) Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche (Révision 1). Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37. Volume I. Végétaux et Invertébrés. FAO, Rome.
- Franklin, S.G. i A. Zweidler (1975) Mammalian histone variants. *J. Cell Biol.*, 67:122a.
- Franklin, S.G. i A. Zweidler (1977) Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals. *Nature*, 266:273-275.
- Franzén, Å (1956) On spermiogenesis, morphology of the spermatozoan and biology of fertilization among invertebrates. *Zool. Bidr. Upps.*, 31:355-482.
- Franzén, Å (1976) The fine structure of spermatid differentiation in a tunicate, *Corella parallelograma* (Muller). *Zoon.*, 4:115-120.
- Franzén, Å (1983) Urochordata. En: *Reproductive Biology of Invertebrates. Vol. II. Spermatogenesis and sperm function.* K.G. Adiyodi i R.G. Adiyodi, eds., John Wiley and Sons, Chichester, pp. 621-632.
- Franzén, Å (1987) Spermatogenesis. En: *Reproduction of marine invertebrates, vol. 10, General aspects: Seeking unity in diversity.* R.C. King, J.S. Pearse i V.B. Pearse, eds., Blackwell, Palo Alto, California, pp. 1-47.
- Furieri, P. (1970) Sperm morphology in reptiles: Squamata and Chelonia. En: *Comparative Spermatology*, B. Baccetti, ed., Academic Press, New York, 115.
- Gabrielli, F. (1989) Human histone variants. En: *Histones and other basic nuclear proteins*, L.S. Hnilica, G.S. Stein i J.L. Stein, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 3-16.
- Garnier, J., D.J. Osguthorpe i B. Robson (1978) Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.*, 120:97-120.
- Gatewood, J.M., G.R. Cook, R. Balhorn, E.M. Bradbury i C.W. Schmid (1987) Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science*, 236:962-964.

-
- Gatewood, J.M., G.R. Cook, R. Balhorn, C.W. Schmid i E.M. Bradbury (1990) Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *J. Biol. Chem.*, 265:20662-20666.
- Gedamu, L., G.H. Dixon i P.L. Davies (1977) Identification and isolation of protamine messenger ribonucleoprotein particles from rainbow trout testis. *Biochemistry*, 16:1383-1391.
- Gedamu, L. M.A. Wosnick, W. Connor, D.C. Watson, G.H. Dixon i K. Iatrou (1981) Molecular analysis of the protamine multi-gene family in rainbow trout testis. *Nucleic Acids Res.*, 9:1463-1482.
- Giancotti, V., F. Quadrifoglio, M. Lancieri i G. Geraci (1980) Separation and properties of an H2B histone variant from the sperm chromatin of the sea urchin *Sphaerechinus granulatus*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2:309-312.
- Goldenberg, D.P. (1989) Analysis of protein conformation by gel electrophoresis. En: *Protein structure: A practical approach*. T.E. Creighton, ed., IRL Press, Oxford, pp. 225-250.
- Goodwin, G.H., J.M. Walker i E.W. Johns (1978) The high mobility group (HMG) non-histone chromosomal proteins. En: *The cell nucleus*, vol. VI, Chromatin, part C, H. Busch, ed., Academic Press, New York, pp. 181-219.
- Grimes, S.R. (1986) Nuclear proteins in spermatogenesis. *Comp. Biochem. Physiol. [B]*, 83:495-500.
- Guha, T., A.Q. Siddiqui i P.F. Prentis (1988) Ultrastructure of testicular spermatozoon of the fish *Oreochromis niloticus*. *Proceedings of the 46th Annual Meeting of the Electron Microscopy Society of America*. San Francisco Press, San Francisco, pp. 278-279.
- Gusse, M. i P. Chevaillier (1978) Étude ultrastructurale et chimique de la chromatine au cours de la spermiogenèse de la roussette *Scyliorhinus caniculus* (L.). *Cytobiologie*, 16:421-443.
- Gusse, M. i P. Chevaillier (1980a) Electron microscope evidence for the presence of globular structures in different sperm chromatins. *J. Cell. Biol.*, 87:280-284.
- Gusse, M. i P. Chevaillier (1980b) Molecular structure of chromatin during sperm differentiation of the dogfish *Scyliorhinus caniculus* (L.). *Chromosoma*, 77:57-68.
- Gusse, M. i P. Chevaillier (1981) Microelectrophoretic analysis of basic protein changes during spermiogenesis in the dogfish *Scylliorhinus caniculus* (L.). *Exp. Cell Res.*, 136:391-397.
- Gusse, M., P. Sautière, D. Belaiche, A. Martinage, C. Roux, J.P. Dadoune i P. Chevaillier (1986) Purification and characterization of nuclear basic proteins of human sperm. *Biochim. Biophys. Acta*, 884:124-134.
- Gusse, M., P. Sautière, M. Chauvière i P. Chevaillier (1983) Extraction, purification and characterization of the sperm protamines of the dog-fish *Scylliorhinus caniculus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 748:93-98.
-

- Hardison, R. i R. Chalkley (1978) Polyacrylamide gel electrophoretic fractionation of histones. En: *Methods in cell biology*, vol. XVII, Chromatin and chromosomal protein research, II. G. Stein, J. Stein i L.J. Kleinsmith, eds., Academic Press, New York, pp. 235-251.
- Hart, J.L. (1973) Pacific fishes of Canada. Fisheries Research Board of Canada, Bulletin 180, Ottawa.
- Hartman, P.G., G.E. Chapman, T. Moss i E.M. Bradbury (1977) Studies on the role and mode of operation of the very-lysine-rich histone H1 in eukaryotic chromatin. The three structural regions of the histone H1 molecule. *Eur. J. Biochem.*, 77:45-51.
- Hecht, N.B. (1989) Mammalian protamines and their expression. En: *Histones and other basic nuclear proteins*. L.S. Hnilica, G.S. Stein i J.L. Stein, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 347-373.
- Hecht, N.B., K.C. Kleene, P.C. Yelick, P.A. Johnson, D.D. Pravtcheva i F.H. Ruddle (1986) Haploid gene mapping: The genes for both mouse protamines are located on chromosome 16. *Somatic Cell Mol. Genet.*, 12:191-196.
- Heinrickson, R.L. i S.C. Meredith (1984) Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography. Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.*, 136:65-74.
- Hermodson, M.A., L.H. Ericsson, K. Titani, H. Neurath i K.A. Walsh (1972) Application of sequenator analyses to the study of proteins. *Biochem.* 11:4493-4502.
- Hiyoshi, H., S. Uno, T. Yokota, C. Katagiri, H. Nishida, M. Takai, K. Agata, G. Eguchi i S. Abe (1991) Isolation of cDNA for a *Xenopus* sperm-specific basic nuclear protein (SP4) and evidence for expression of SP4 mRNA in primary spermatocytes. *Exp. Cell Res.*, 194:95-99.
- Hoffman, P. i R. Chalkley (1978) Procedures for minimizing protease activity during isolation of nuclei, chromatin and the histones. En: *Methods in cell biology*, vol. XVII, Chromatin and chromosomal protein research, II. G. Stein, J. Stein i L.J. Kleinsmith, eds., Academic Press, New York, pp. 1-12.
- Holland, L.Z. (1991) The phylogenetic significance of tunicate sperm morphology. En: *Comparative spermatology 20 years after*. B. Baccetti, ed., Sero Symposia Publications from Raven Press, vol. 75, pp. 961-965.
- Holland, N.D. i L.Z. Holland (1989) The fine structure of the testis of a lancelet (=Amphioxus), *Branchiostoma floridae* (Phylum Chordata: Subphylum Cephalochordata = Acrania). *Acta Zoologica*, 70:211-219.
- Hollecker, M. (1989) Counting integral numbers of residues by chemical modification. En: *Protein structure. A practical approach*. T.E. Creighton, ed., IRL Press, Oxford, pp. 145-153.
- Hollecker, M. i T.E. Creighton (1980) Counting integral numbers of amino acid groups per polypeptide chain. *FEBS Lett.*, 119:187-189.

-
- Honda, B.M., D.L. Baillie i E.P.M. Candido (1974) The subunit structure of chromatin: Characteristics of nucleohistone and nucleoprotamine from developing trout testis. *FEBS Lett.*, 48:156-159.
- Hopp, T.P. i K. Woods (1981) Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:3824-3828.
- Howard, G.A. i A.J.P. Martin (1950) The separation of the C12-C18 fatty acids by reversed-phase partition chromatography. *Biochem. J.*, 46:532-538.
- Hozier, J., M. Renz i P. Nehls (1977) The chromosome fiber: Evidence for an ordered superstructure of nucleosomes. *Chromosoma*, 62:301-317.
- Huang, S.Y., S. Kwauk, G. Slemmer i H.E. Kasinsky (1978) Amino acid analysis of testis-specific proteins from several amphibians and reptiles. Twelfth FEBS Meeting, abstract num. 2146, Dresden, Germany.
- Hulley, P.A. (1984) Myctophidae. En: *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*, vol. 1. P.J.P. Whitehead, M.L. Bauchot, J.C. Hureau, J. Nielsen, E. Tortonese, eds., UNESCO, Paris, pp. 429-483.
- Hureau, J.C. (1986) Triglidae. En: *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*, vol. III. P.J.P. Whitehead, M.L. Bauchot, J.C. Hureau, J. Nielsen, E. Tortonese, eds., UNESCO, Paris, pp. 1230-1238.
- Hurley, C.K. (1977) Electrophoresis of histones: A modified Panyim and Chalkley system for slab gels. *Analyt. Biochem.*, 80:624-626.
- Iatrou, K. i G.H. Dixon (1978) Protamine messenger RNA: its life history during spermatogenesis in rainbow trout. *Fed. Proc.* 37:2526-2533.
- Iatrou, K., A.W. Spira i G.H. Dixon (1978) Protamine messenger RNA: evidence for early synthesis and accumulation during spermatogenesis in rainbow trout. *Dev. Biol.*, 64:82-98.
- Ilse, D. i P. Edman (1963) The formation of 3-phenyl-2-thiohydantoins from phenylthiocarbonyl amino acids. *Aust. J. Chem.*, 15:411-416.
- Imschenetzky, M., M. Puchi, A.M. Oyarce, R. Massone i D. Inostroza (1984) A comparative study of the histones isolated from sperm of the sea urchin *Tetrapygus niger*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 78B:393-399.
- Iwai, K. i T. Ando (1967) N→O acyl rearrangement. En: *Methods in Enzymology*. C.H.W. Hirs, ed., vol. XI, Academic Press, New York, pp. 263-282.
- Jamieson, B.G.M. (1984) Spermatozoal ultrastructure in *Branchiostoma moretonensis* Kelly, a comparison with *B. lanceolatum* (Cephalochordata) and with other deuterostomes. *Zoologica Scripta*, 13:223-229.
- Jamieson, B.G.M. (1991) Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa. With a survey of lophophorate, echinoderm and protochordate sperm and an account of gamete cryopreservation. Cambridge University Press, Cambridge.
-

- Jankowski, J.M., J.C. States i G.H. Dixon (1986) Evidence of sequences resembling avian retrovirus long terminal repeats flanking the trout protamine gene. *J. Mol. Evol.*, 23:1-10.
- Janvier, P. (1981) The phylogeny of the Craniata, with particular reference to the significance of fossil "agnathans". *J. Vert. Paleont.*, 1(2):121-159.
- Jenkins, J.R. (1979) Sequence divergence of rainbow trout protamine mRNAs; comparison of coding and non-coding nucleotide sequences in three protamine cDNA plasmids. *Nature*, 279:809-811.
- Johnson, P.A., J.J. Peschon, P.C. Yelick, R.D. Palmiter i N.B. Hecht (1988a) Sequence homologies in the mouse protamine 1 and 2 genes. *Biochim. Biophys. Acta*, 950:45-53.
- Johnson, P.A., P.C. Yelick, H. Liem i N.B. Hecht (1988b) Differential distribution of the P1 and P2 protamine gene sequences in eutherian and marsupial mammals and a monotreme. *Gamete Res.*, 19:169-175.
- Jones, G.M.T., S.C. Rall i R.D. Cole (1974) Extension of the amino acid sequence of a lysine-rich histone. *J. Biol. Chem.* 249:2548-2553.
- Jorcano, J.L., G. Meyer, L.A. Day i M. Renz (1980) Aggregation of small oligonucleotide chains into 300 Å globular particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:6443-6447.
- Jordan, A. (1982) Proteïnes nuclears espermàtiques de l'equinoderm *Holothuria tubulosa*. Caracterització i seqüència de la proteïna Φ_0 . Estudi de la interacció Φ_0 -ADN per difracció de raigs. Tesi doctoral, Universitat de Barcelona.
- Jutglar, L., J.I. Borrell i J. Ausió (1991) Primary, secondary and tertiary structure of the core of a histone H1-like protein from the sperm of *Mytilus*. *J. Biol. Chem.*, 266: 8184-8191.
- Kadura, S.N., S.N. Khrapunov i V.R. Alekseenko (1988) Three types of sperm proteins in eukaryotes [Rus] *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal*, 60(1):14-19.
- Kadura, S.N., S.N. Khrapunov, V.N. Chabanny i G.D. Berdyshev (1983a) Changes in chromatin basic proteins during male gametogenesis of grass carp. *Comp. Biochem. Physiol.*, 74B:343-350.
- Kadura, S.N., S.N. Khrapunov, V.N. Chabanny i G.D. Berdyshev (1983b) Chromatin structure during male gametogenesis of grass carp. *Comp. Biochem. Physiol.*, 74B:819-824.
- Kasinsky, H.E. (1985) Why are sperm histones more variable in frogs than in salamanders, snakes and lizards? *Biol. Mol.*, 2:34-40.
- Kasinsky, H.E. (1986) Sperm basic protein diversity in animals and the biology of fertilization. *J. Cell Biol.*, 103:82a.
- Kasinsky, H.E. (1989) Specificity and distribution of sperm basic proteins. En: *Histones and other basic nuclear proteins*, L.S. Hnilica, G.S. Stein i J.L. Stein, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 73-163.
- Kasinsky, H.E., S.Y. Huang, S. Kwauk, M. Mann, M.J. Sweeney i B. Yee (1978) On the diversity of sperm histones in the vertebrates. III. Electrophoretic variability of the testis-specific

-
- histone patterns in Anura contrasts with relative constancy in Squamata. *J. Exp. Zool.*, 203:109-126.
- Kasinsky, H.E., S.Y. Huang, M. Mann, J. Roca i J.A. Subirana (1985a) On the diversity of sperm histones in the vertebrates. IV. Cytochemical and amino acid analysis in Anura. *J. Exp. Zool.*, 234:33-46.
- Kasinsky, H.E., M. Mann, M. Lemke i S.Y. Huang (1985b) Diversity of sperm-basic chromosomal proteins in the vertebrates: A phylogenetic point of view. En: *Chromosomal proteins and gene expression*. G.R. Reeck, G.H. Goodwin i P. Puigdomènech, eds., Plenum Press, New York, pp. 333-359.
- Kasinsky, H.E., M. Mann, S.Y. Huang, L. Fabre, B. Coyle i E.W. Byrd Jr. (1987) On the diversity of sperm basic proteins in the vertebrates. V. Cytochemical and amino acid analysis in Squamata, Testudines and Crocodylia. *J. Exp. Zool.*, 247:137-151.
- Kasinsky, H.E., M. Mann, L. Pickerill, L. Gutovich i E.W. Byrd Jr. (1981) Sperm histone diversity in the vertebrates: a macroevolutionary trend. *J. Cell Biol.*, 91:187a.
- Kasper, C.B. (1970) Fragmentation of proteins for sequence studies and separation of peptide mixtures. En: *Protein sequence determination*, S.B. Needleman, ed. Springer-Verlag, Berlin, pp. 137-184.
- Kaye, J.S. i R. McMaster-Kaye (1966) The fine structure and chemical composition of nuclei during spermiogenesis in the house cricket. I. Initial stages of differentiation and the loss of non-histone proteins. *J. Cell Biol.*, 31:159-179.
- Keichline, L.D. i P.M. Wassarman (1979) Structure of chromatin in sea urchin embryos, sperm, and adult somatic cells. *Biochemistry* 18:214-219.
- Kennedy, B.P. i P.L. Davies (1980) Acid-soluble nuclear proteins of the testis during spermatogenesis in the winter flounder: loss of the high mobility group proteins. *J. Biol. Chem.*, 255:2533-2539.
- Kennedy, B.P. i P.L. Davies (1982) Chromatin reorganization during spermatogenesis in the winter flounder. *J. Biol. Chem.*, 257:11160-11165.
- Kennedy, B.P. i P.L. Davies (1985) Sites of phosphorylation on the high molecular weight basic nuclear proteins of the winter flounder. *J. Biol. Chem.*, 260:4338-4344.
- Kharchenko, E.P. i N.N. Nalivaeva (1980) Analysis of structural characteristics of sperm chromatin in amphibians. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, 15:410.
- Khrapunov, S.N. i G.D. Berdyshev (1981) Structure and function of the chromatin basic proteins in male gametes of eucaryotes. *Usp. Sovrem. Biol.*, 92:323-337.
- Kierszenbaum, A.L. i L.L. Tres (1978) The packaging unit: A basic structural feature for the condensation of late cricket spermatid nuclei. *J. Cell Sci.*, 33:265-283.
- Kistler, W.S. (1989) Structures of testis-specific histones, spermatid transition proteins, and their genes in mammals. En: *Histones and other basic nuclear proteins*, L.S. Hnilica, G.S. Stein i J.L. Stein, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 331-345.
-

- Kleene, K.C., R.J. Distel i N.B. Hecht (1983) cDNA clones encoding cytoplasmatic poly(A)⁺ RNAs which first appear at detectable levels in haploid phases of spermatogenesis in the mouse. *Dev. Biol.*, 98:455-464.
- Kleene, K.C., R.J. Distel i N.B. Hecht (1984) Translational regulation and deadenylation of a protamine mRNA during spermiogenesis in the mouse. *Dev. Biol.*, 105:71-79.
- Kleene, K.C., R.J. Distel i N.B. Hecht (1985) Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding mouse protamine 1. *Biochemistry*, 24:719-722.
- Klyszejko-Stefanowicz, L., W.M. Krajewska i A. Lipinska (1989) Histone occurrence, isolation, characterization and biosynthesis. En: *Histones and other basic nuclear proteins*, L.S. Hnilica, G.S. Stein i J.L. Stein, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 17-71.
- Kmićik, D., D. Sellos, D. Belaïche i P. Sautière (1985) Primary structure of the two variants of a sperm-specific histone H1 from the annelid *Platynereis dumerilii*. *Eur. J. Biochem.*, 150:359-370.
- Kolk, A.H. i J.T. Samuel (1975) Isolation, chemical and immunological characterization of two strongly basic nuclear proteins from spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta*, 393:307-319.
- Kornberg, R.D. (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*, 184:868-871.
- Kornberg, R.D. (1977) Structure of chromatin. *Annu. Rev. Biochem.*, 46:931-954.
- Kossel, A. (1898) Über die Constitution der einfachsten Eiweisstoffe. *Z. Physiol. Chem.*, 25:165-189.
- Kossel, A. (1928) *The protamines and histones*. Longmans Green, London.
- Kossel, A. i E.G. Schenk (1928) Untersuchungen über die basischen Eiweisstoffe: eine Beitrag zu ihrer Entwicklungsgeschichte. *Z. Physiol. Chem.*, 173:278-308.
- Kossel, A. i W. Staudt (1926) Zur Kenntniss der basischen Proteine. *Z. Physiol. Chem.*, 159:172-178.
- Kozloff, E.N. (1987) *Marine invertebrates of the Pacific Northwest*. University of Washington Press, Seattle.
- Krawetz, S.A., W. Connor i G.H. Dixon (1988) Bovine protamine genes contain a single intron. The structures of the two alleles. *J. Biol. Chem.*, 263:321-326.
- Krawetz, S.A. i G.H. Dixon (1988) Sequence similarities of the protamine genes: Implications for regulation and evolution. *J. Mol. Evol.*, 27:291-297.
- Krawetz, S.A., M.H. Herfort, J.L. Hamerton, R.T. Pon i G.H. Dixon (1989) Chromosomal localization and structure of the human P1 protamine gen. *Genomics*, 5:639-645.
- Kuehl, J. (1979) Synthesis of high mobility group proteins in regenerating rat liver. *J. Biol. Chem.*, 254:7276-7281.

-
- Kyte, J. i R.F. Doolittle (1982) A simple method of displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 157:105-132.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Leim, A.H. i W.B. Scott (1966) Fishes of the Atlantic coast of Canada. Fisheries Research Board of Canada, Bulletin 155, Ottawa.
- Liao, L.W. i R.D. Cole (1981) The amino acid sequence of residues 1-104 of CTL-1, a bovine H1 histone. *J. Biol. Chem.*, 265:3024-3029.
- Lindberg, G.U. i Z.V. Krasnyukova (1971) Fishes of the Sea of Japan and the adjacent areas of the Sea of Okhotsk and the Yellow Sea. Part 3. Teleostomi. XXIX. Perciformes. Academy of Sciences of the Union Soviet Socialist Republics, Leningrad.
- Lindberg, G.U. i M.I. Legeza (1969) Fishes of the Sea of Japan and the adjacent areas of the Sea of Okhotsk and the Yellow Sea. Part 2. Teleostomi. XII. Acipenseriformes - XXVIII. Polynemiformes. Academy of Sciences of the Union of Soviet Socialist Republics, Moskva-Leningrad.
- Lloris, D. (1986) Ictiofauna demersal y aspectos biogeográficos de la costa sudoccidental de Africa (SWA/Namibia). *Monogr. Zool. Mar.*, 1:9-432.
- Lloris, D. i J. Rucabado (1991) Ictiofauna del Canal Beagle (Tierra del Fuego), aspectos ecológicos y análisis biogeográfico. *Publ. Espec. Inst. Esp. Oceanogr.*, núm. 8, Madrid.
- Lloris, D., J. Rucabado, L. del Cerro, F. Portas, M. Demestre i A. Roig (1984) Tots els peixos del mar català. I: Llistat de cites i de referències. *Treballs Soc. Cat. Ict. Herp.*, 1:1-208.
- Lohr, D., J. Corden, K. Tatchell, R.T. Kovacic i K.E. van Holde (1977) Comparative subunit structure of HeLa, yeast, and chicken erythrocyte chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:79-83.
- Loir, M., D. Bouvier, M. Fornells, M. Lanneau i J.A. Subirana (1985) Interactions of nuclear proteins with DNA, during sperm differentiation in the ram. *Chromosoma*, 92:304-312.
- Loir, M. i M. Lanneau (1978) Transformation of ram spermatid chromatin. *Exp. Cell Res.*, 115:231-243.
- López, J. (1979) Espermatogénesis de crustáceos inferiores. Tesi doctoral, Universitat de Barcelona.
- Louie, A.J. i G.H. Dixon (1972a) Trout testis cells. II. Synthesis and phosphorylation of histones and protamines in different cell types. *J. Biol. Chem.*, 247:7962-7968.
- Louie, A.J. i G.H. Dixon (1972b) The biosynthesis of protamine in trout testis. IV. Kinetics of enzymatic modifications of newly synthesized protamine. *J. Biol. Chem.*, 247:5490-5497.
-

- Maier, W.M., G. Nussbaum, L. Domenjoud, U. Klemm i W. Engel (1990) The lack of protamine 2 (P2) in boar and bull spermatozoa is due to mutations within the P2 gene. *Nucleic Acids Res.*, 18:1249-1254.
- Maitland, P.S. i K. Linsell (1980) *Guía de los peces de agua dulce de Europa*. Editorial Omega, Barcelona.
- Mann, M. (1981) Variability of sperm histones in Anura contrasts with relative constancy in Urodela, Squamata and Aves. M. Sc. Thesis, University of British Columbia, Vancouver.
- Mann, M., M.S. Risley, R.A. Eckhardt i H.E. Kasinsky (1982) Characterization of spermatid/sperm basic chromosomal proteins in the genus *Xenopus* (Anura, Pipidae). *J. Exp. Zool.*, 222:173-186.
- Marsden, M.P.F. i U.K. Laemmli (1979) Metaphase chromosome structure: Evidence for a radial loop model. *Cell*, 17:849-858.
- Martínage, A., M. Gusse, D. Bélaïche, P. Sautière i P. Chevaillier (1985) Amino acid sequence of a cysteine-rich, arginine-rich sperm protamine of the dog-fish *Scylliorhinus caniculus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 831:172-178.
- Matsubara, H. (1970) Purification and assay of thermolysin. *Methods Enzymol.*, 19:642-651.
- Matsubara, H. i J. Feder (1971) Other bacterial, mold and yeast proteases. En: *The enzymes*. P.D. Boyer, ed., 3rd edition, Academic Press, New York, vol. 3, pp. 721-795.
- Mattei, C. i X. Mattei (1975) Spermiogenesis and spermatozoa of the Elopomorpha (Teleost Fish). En: *The functional anatomy of the spermatozoon*, B.A. Afzélius, ed., Pergamon Press, Oxford, pp. 211-221.
- Mattei, C. i X. Mattei (1984) Spermatozoïdes biflagellés chez un poisson téléostéen de la famille Apogonidae. *J. Ultrastr. Res.*, 88:223-228.
- Mattei, X. i Mattei, C. (1976) Spermatozoïdes à deux flagelles de type 9+0 chez *Lampanyctus* sp. (Poisson Myctophidae). *J. Microscopie Biol. Cell.*, 25:187-188.
- Mayes, E.L.V. i E.W. Johns (1982) Accumulated data. En: *The HMG chromosomal proteins*. E.W. Johns, ed., Academic Press, New York, pp. 223-247.
- McGuee, J.D. (1986) The structure of interphase chromatin. En: *Chromosome structure and function*, M.S. Risley, ed., van Nostrand-Reinhold, Comp. Inc., New York, pp. 1-38.
- McGhee, J.D., J.M. Nickol, G. Felsenfeld i D.C. Rau (1983) Higher order structure of chromatin: orientation of nucleosomes within the 30 nm chromatin solenoid is independent of species and spacer length. *Cell*, 33:831-841.
- McIntosh, J.R. i K.R. Porter (1967) Microtubules in the spermatids of the domestic fowl. *J. Cell Biol.*, 35:153-173.
- McKay, D.J., B.S. Renaux i G.H. Dixon (1986a) Rainbow trout protamines. Amino acid sequences of six distinct proteins from a single testis. *Eur. J. Biochem.*, 158:361-366.

- McKay, D.J., B.S. Renaux i G.H. Dixon (1986b) Human sperm protamines. Amino acid sequences of two forms of protamine P2. *Eur. J. Biochem.*, 156:5-8.
- McMaster-Kaye, R. i J.S. Kaye (1980) Organization of chromatin during spermiogenesis: Beaded fibers, partly beaded fibers, and loss of nucleosomal structure. *Chromosoma*, 77:41-56.
- Mezquita, C. i C.S. Teng (1977) Studies on sex-organ development. Changes in nuclear and chromatin composition and genomic activity during spermatogenesis in the maturing rooster testis. *Biochem. J.*, 164:99-111.
- Miescher, F. (1874) Das Protamin, eine neue organische Base aus den Samenfäden des Rheinlachs. *Ber.*, 7:376-379.
- Miki, B.L.A. i J.M. Neelin (1976) Histone H5 from carp erythrocytes. *Can. J. Biochem.*, 55:384-389.
- Mita, K., K. Takamune i C. Katagiri (1991) Genes for sperm-specific basic nuclear proteins in *Bufo* and *Xenopus* are expressed at different stages in spermatogenesis. *Dev. Growth Differ.*, 33:491-498.
- Moir, R.D. (1987) Structure of several multigene families in salmonid fishes. Ph. D. Thesis, Department of Medical Science, University of Calgary, Alberta, Canada.
- Moir, R.D. i G.H. Dixon (1988) Characterization of a protamine gene from the Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*). *J. Mol. Evol.*, 27:8-16.
- Moore, S. i W.H. Stein (1948) Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.*, 176:367-388.
- Moyita, M. i C. Katagiri (1991) Immunoelectron microscopic localization of sperm-specific nuclear basic proteins during spermatogenesis in anuran amphibians. *Dev. Growth Differ.*, 33:19-27.
- Moyle, P.B. i J.J. Cech Jr. (1982) *Fishes: An introduction to Ichthyology*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J.
- Muñoz-Guerra, S., F. Azorín, M.T. Casas, X. Marcet, M.A. Maristany, J. Roca i J.A. Subirana (1982) Structural organization of sperm chromatin from the fish *Carassius auratus*. *Exp. Cell Res.*, 137:47-53.
- Nakano, M., T. Tobita i T. Ando (1976) Studies on a protamine (galline) from fowl sperm. 3. The total amino acid sequence of intact galline molecule. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 8:565-578.
- Nandi, A.K., A. Chaudhuri i R.K. Mandal (1979) Nature and evolutionary significance of basic proteins in fish spermatozoa. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 16:6-10.
- Nelson, J.S. (1984) *Fishes of the world*. 2nd edition, John Wiley and Sons, New York.
- O'Brien, D. i A.R. Bellvé (1980) Protein constituents of the mouse spermatozoon. II. Temporal synthesis during spermatogenesis. *Dev. Biol.*, 75:405-418.

- Odintsova, N.A., F.P. Svinarchuk, I.A. Zalenskaya i A.O. Zalensky (1981) Partial fractionation and certain characteristics of the basic chromatin proteins of bivalve mollusc sperm. *Biokhimiya* (trad. anglesa), 46:404-414.
- O'Farrel, P.H. (1975) High resolution, two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 275:4007-4021.
- Oliva, R., D. Bazett-Jones, C. Mezquita i G.H. Dixon (1987) Factors affecting nucleosome disassembly by protamines *in vitro*. Histone hyperacetylation and chromatin structure, time dependence, and the size of the sperm nuclear proteins. *J. Biol. Chem.*, 262:17016-17025.
- Oliva, R. i G.H. Dixon (1989) Chicken protamine genes are intronless. The complete genomic sequence and organization of the two loci. *J. Biol. Chem.*, 264:12472-12481.
- Oliva, R. i G.H. Dixon (1991) Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 40:25-94.
- Oliva, R., R. Goren i G.H. Dixon (1989) Quail (*Coturnix japonica*) protamine, full-length cDNA sequence and the function of evolution of vertebrate protamine. *J. Biol. Chem.*, 264:17627-17630.
- Oliva, R. i C. Mezquita (1982) Histone H4 hyperacetylation and rapid turnover of its acetyl groups in transcriptionally inactive rooster testis spermatids. *Nucleic Acids Res.*, 10:8049-8059.
- Oliva, R. i C. Mezquita (1986) Marked differences in the ability of distinct protamines to disassemble nucleosomal core particles *in vitro*. *Biochemistry*, 25:6508-6511.
- Oliva, R., J. Mezquita, C. Mezquita i G.H. Dixon (1988) Haploid expression of the rooster protamine mRNA in the postmeiotic stages of spermatogenesis. *Dev. Biol.*, 125:332-340.
- Olivares, C., R. Valdivia, N. Lafuente, D. Kulak i H.E. Kasinsky (1990) Electrophoretic analysis of sperm basic proteins in *Schroederychthys chilensis* and comparison with other cartilaginous fish. *Rev. Biol. Mar., Valparaiso*, 25:99-108.
- Ornstein, L. (1964) Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121:321-349.
- Oudet, P., M. Gross-Bellard i P. Chambon (1975) Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell*, 4:281-300.
- Panyim, S. i R. Chalkley (1969) High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. *Arch. Biochem. Biophys.*, 130:337-346.
- Parker, T.J., W.A. Haswell i J. Nadal (1987) *Zoología. Cordados. Volumen 2. Editorial Reverté, Barcelona.*
- Paulson, J.R. i U.K. Laemmli (1977) The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell*, 12:817-828.

-
- Pederson, D.S., F. Thoma i R.T. Simpson (1986) Core particle, fiber and transcriptionally active chromatin structure. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 2:117-147.
- Phelan, J.J., J.A. Subirana i R.D. Cole (1972) An unusual group of lysine-rich histones from gonads of a sea cucumber, *Holothuria tubulosa*. *Eur. J. Biochem.*, 31:63-68.
- Picheral, B. (1970) Nature et évolution des protéines basiques au cours de la spermiogenèse chez *Pleurodeles waltlii*, Michah, Amphibien, Urodèle. *Histochemie*, 23:189-206.
- Picheral, B. (1979) Structural, comparative and functional aspects of spermatozoa in urodels. En: *The Spermatozoon Maturation, Motility, surface properties and comparative aspects*. D.W. Fawcett i J.M. Bedford, eds., Urban and Schwarzenberg, Baltimore, Md., pp. 267-287.
- Pitt-Rivers, R. i F.S.A. Impiombato (1968) The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins. *Biochem. J.*, 109:825-830.
- Platz, R., M.L. Meistrich i S.R. Grimes Jr. (1977) Low-molecular-weight basic proteins in spermatids. En: *Methods in cell biology*, vol. XVI, Chromatin and chromosomal protein research II, G. Stein, J. Stein i L.J. Kleinsmith, eds., Academic Press, New York, pp. 297-316.
- Poccia, D. (1986) Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization and early development. *Int. Rev. Cytol.*, 105:1-65.
- Poccia, D.L. (1991) Sp histones and chromatin structure in male germ line nuclei and male pronuclei of the sea urchin. En: *Comparative spermatology 20 years after*. B. Baccetti, ed., Serono Symposia Publications from Raven Press, vol. 75, pp. 61-65.
- Poccia, D.L. i G.R. Green (1992) Packaging and unpackaging the sea urchin sperm genome. *TIBS*, 17:223-227.
- Poccia, D., W. Pavan i G.R. Green (1990) 6DMAP inhibits chromatin decondensation but not sperm histone kinase in sea urchin male pronuclei. *Exp. Cell Res.*, 188:226-234.
- Pogany, G.C., M. Corzett, S. Weston i R. Balhorn (1981) DNA and protein content of mouse sperm. Implications regarding sperm chromatin structure. *Exp. Cell Res.*, 136:127-136.
- Prats, E. (1989) Clonatge molecular i seqüenciació del cDNA per la proteïna Φ_0 d'esperma de l'equinoderm *Holothuria tubulosa* i aïllament dels clons genòmics. Tesi doctoral, Universitat de Barcelona.
- Prunell, A. i R.D. Kornberg (1982) Variable center to center distance of nucleosomes. *J. Mol. Biol.*, 154:515-523.
- Puigjaner, L.C., L. Fita, S. Arnott, R. Chandrasekaran i J.A. Subirana (1986) Modelling and refinement of the crystal structure of nucleoprotamine from *Gibbula divaricata*. *J. Biomol. Struct. Dynam.* 3(6):1067-1078.
- Rall, S.C. i R.D. Cole (1971) Amino acid sequence and sequence variability of the amino-terminal regions of lysine-rich histones. *J. Biol. Chem.* 264:7175-7190.
-

- Reisfeld, R.A., U.J. Lewis i D.E. Williams (1962) Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature*, 195:281-283.
- Reynolds, J.A. i C. Tanford (1970a) Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 66:1002-1007.
- Reynolds, J.A. i C. Tanford (1970b) The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *J. Biol. Chem.*, 245:5161-5165.
- Richmond, T.J., J.T. Finch, B. Rushton, D. Rhodes i A. Klug (1984) Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature*, 311:532-537.
- Ris, H. i J. Korenberg (1979) Chromosomal structure and levels of chromosome organization. En: *Cell Biology*, D.M. Prescott i L. Goldstein, eds., vol. 2, Academic Press, New York, pp. 267-361.
- Risley, M.S. (1990) Chromatin organization in sperm. En: *Chromosomes: Eukaryotic, prokaryotic and viral*, K.W. Adolph, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, vol. II, pp. 62-85.
- Risley, M.S. i R.A. Eckhardt (1981) H1 histone variants in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.*, 84:79-87.
- Risley, M.S., S. Einheber i D.A. Bumcrot (1986) Changes in DNA topology during spermatogenesis. *Chromosoma*, 94:217-227.
- Sakai, M., Y. Fujii-Kuriyama, T. Saito i M. Muramatsu (1981) Closely related mRNA sequences of protamines in rainbow trout testis. *J. Biochem.*, 89:1863-1868.
- Sanders, M.M. i G.H. Dixon (1972) The biosynthesis of protamine in trout testis. IV. Sites of phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 249:851-855.
- Sautière, P., D. Belaiche, A. Martinage i M. Loir (1984) Primary structure of the ram (*Ovis aries*) protamine. *Eur. J. Biochem.*, 144:121-125.
- Sautière, P., G. Briand, M. Gusse i P. Chevaillier (1981) Primary structure of a protamine isolated from the sperm nuclei of the dog-fish *Scylliorhinus caniculus*. *Eur. J. Biochem.*, 119:251-255.
- Sautière, P., M. Gusse, G. Briand, A. Martinage i P. Chevaillier (1984) Primary structure of scylliorhinine S4, a protamine isolated from sperm nuclei of the dog-fish *Scylliorhinus caniculus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 791:82-86.
- Schaeffer, B. (1981) The xenacanth shark neurocranium, with comments on elasmobranch monophyly. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, 169(1):1-66.
- Scott, W.B. i E.J. Crossman (1973) Freshwater fishes of Canada. Fisheries Research Board of Canada, Bulletin 184, Ottawa.
- See, Y.P. i G. Jackowski (1989) Estimating molecular weights of polypeptides by SDS gel electrophoresis. En: *Protein structure: A practical approach*. T.E. Creighton, ed., IRL Press, Oxford, pp. 1-21.

-
- Shapiro, A.L., E. Vinuela i J.V. Maizel (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28:815-820.
- Simpson, R.T. (1978) Structure of the chromosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry*, 17:5524-5531.
- Sinclair, G.D. i G.H. Dixon (1982) Purification and characterization of cytoplasmic protamine messenger ribonucleoprotein particles from rainbow trout testis. *Biochemistry*, 21:1869-1877.
- Smith, G.R. i R.F. Stearley (1989) The classification and scientific names of rainbow and cutthroat trouts. *Fisheries*, 14:4-10.
- Spackman, D.H., W.H. Stein i S. Moore (1958) Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.*, 30:1190-1206.
- Spadafora, C., M. Bellard, J.L. Comptom i P. Chambon (1976) The DNA repeat length in chromatin from sea urchin sperm and gastrula cells are markedly different. *FEBS Lett.*, 69:281-285.
- Speckert, W., B. Kennedy, St. L. Daisley i P. Davies (1983) Primary structure of protamine from the Northern pike *Esox lucius*. *Eur. J. Biochem.*, 136:283-289.
- Stanley, H.P. (1961) Studies on the genital systems and reproduction in the chimaeroid fish *Hydrolagus colliei* (Lay and Bennett). Ph. D. Thesis, Oregon State University.
- Stanley, H.P. (1963) Urogenital morphology in the Chimaeroid fish *Hydrolagus colliei*. *J. Morph.*, 112:11-127.
- Stanley, H.P. (1966) The structure and development of the seminiferous follicle in *Scyliorhinus caniculus* and *Torpedo marmorata* (Elasmobranchi). *Z. Zellforsch.*, 75:453-488.
- Stanley, H.P. (1967) The fine structure of spermatozoa in the lamprey *Lampetra planeri*. *J. Ultrastruct. Res.*, 19:84-99.
- States, J.C., W. Connor, J.M. Aiken, L. Gedamu i G.H. Dixon (1982) Nucleotid sequence of a protamine component CII gene of *Salmo gairdnerii*. *Nucleic Acids Res.*, 10:4551-4563.
- Steinhardt, J. i S. Beychok (1964) Interaction of proteins with hydrogen ions and other small ions and molecules. En: *The proteins. Composition, structure and function*. H. Neurath, ed., 2nd edition, Academic Press, New York, vol. 2, pp. 139-304.
- Strickland, M., W.N. Strickland, W. Brandt i C. von Holt (1977) The complet amino-acid sequence of histone H2B(1) from sperm of the sea urchin *Parechinus angulosus*. *Eur. J. Biochem.*, 77:263-275.
- Strickland, M., W.N. Strickland, W.F. Brandt i C. von Holt (1978) The partial amino acid sequences of the two H2B histones from the sperm of the sea urchin *Psammechinus miliaris*. *Biochim. Biophys. Acta*, 536:289-297.
-

- Strickland, M., W.N. Strickland, W. Brandt, C. von Holt, B. Wittman-Liebold i A. Lehmann (1978) The complete amino-acid sequence of histone H2B(3) from sperm of the sea urchin *Parechinus angulosus*. Eur. J. Biochem., 89:443-452.
- Strickland, M., W.N. Strickland i C. von Holt (1980) The histone H2B from the sperm cell of the starfish *Marthasterias glacialis*. Eur. J. Biochem., 106:541-548.
- Strickland, W.N., M. Strickland, W. Brandt i C. von Holt (1977) The complete amino-acid sequence of histone H2B(2) from sperm of the sea urchin *Parechinus angulosus*. Eur. J. Biochem., 77:277-286.
- Strickland, W.N., M. Strickland, W.F. Brandt, C. von Holt, A. Lehmann i B. Wittmann-Liebold (1980a) The primary structure of histone H1 from sperm of the sea urchin *Parechinus angulosus*. 2. Sequence of the C-terminal CNBr peptide and the entire primary structure. Eur. J. Biochem., 104:567-578.
- Strickland, W.N., M. Strickland, P. DeGroot, C. von Holt i B. Wittmann-Liebold (1980b) The primary structure of histone H1 from sperm of the sea urchin *Parechinus angulosus*. Eur. J. Biochem., 104:559-566.
- Strickland, W.N., M. Strickland i C. von Holt (1982a) A comparison of the amino acid sequences of histones H1 from the sperm of *Echinolampas crassa* and *Parechinus angulosus*. Biochem. Biophys. Acta, 700:127-129.
- Strickland, W.N., M. Strickland, C. von Holt i V. Giancotti (1982b) A partial structure of histone H1 from sperm of the sea urchin *Sphaerechinus granulatus*. Biochim. Biophys. Acta, 703:95-100.
- Suau, P. i J.A. Subirana (1977) X-ray diffraction studies of nucleoprotamine structure. J. Mol. Biol., 117:909-926.
- Subirana, J.A. (1970) Nuclear protein from a somatic and germinal tissue of the echinoderm *Holothuria tubulosa*. Exp. Cell Res., 63:253-260.
- Subirana, J.A. (1975) On the biological role of basic proteins in spermatozoa and during spermiogenesis. En: The biology of the male gamete. J.G. Duckett i P.A. Racey, eds. (Suppl. 1 to the Biological Journal of the Linnean Society, vol. 7), pp. 239-244.
- Subirana, J.A. (1983) Nuclear proteins in spermatozoa and their interactions with DNA. En: The sperm cell. J. André, ed., Martinus Nijhoff, The Hague, pp. 197-213.
- Subirana, J.A. (1990) Proteins as counterions of DNA: A new model of nucleoprotamine structure. En: Water and ions in Biomolecular Systems. D. Vasilescu et al., eds., Birkhäuser Verlag AG, Basel, pp. 63-70.
- Subirana, J.A. (1992) Order and disorder in 30 nm chromatin fibers. FEBS Lett., 302:105-107.
- Subirana, J.A. i J. Colom (1987) Comparison of protamines from freshwater and marine bivalve molluscs: evolutionary implications. FEBS Lett., 220:193-196.
- Subirana, J.A., C. Cozcolluela, J. Palau i M. Unzeta (1973) Protamines and other basic proteins from spermatozoa of molluscs. Biochim. Biophys. Acta, 317:364-379.

-
- Subirana, J.A., S. Muñoz-Guerra, J. Aymami, M. Radermacher i J. Frank (1985) The layered organization of nucleosomes in 30 nm chromatin fibers. *Chromosoma*, 91:377-390.
- Subirana, J.A., S. Muñoz-Guerra, A.B. Martínez, L. Pérez-Grau, X. Marcet i I. Fita (1981) The subunit structure of chromatin fibers. *Chromosoma*, 83:455-471.
- Subirana, J.A. i J. Palau (1968) Histone-like proteins from the sperm of echinoderms. *Exp. Cell Res.*, 53:471-477.
- Subirana, J.A., L.C. Puigjaner, J. Roca, R. Llopis i P. Suau (1975) X-ray diffraction of nucleohistones from spermatozoa. En: *The structure and function of chromatin*, Ciba Foundation Symp. 28, Elsevier, Amsterdam, pp. 157-179.
- Suzuki, M. (1989) SPKK, a new nucleic acid-binding unit of protein found in histone. *EMBO J.*, 8:797-804.
- Suzuki, M., M. Sugiura, S. Ebashi (1990a) Sea urchin protease specific to the SPKK motif in histone. *J. Biochem.*, 108:347-355.
- Suzuki, M., H. Sohma, M. Yazawa, K. Yagi i S. Ebashi (1990b) Histone H1 kinase specific to the SPKK motif. *J. Biochem.*, 108:356-364.
- Sze, L.C., J.Z. Zhang, Y.-C. Yan i Z.-C. Mao (1981) A comparative study of the basic proteins and ultrastructure of the sperm chromatin from *Rana nigromaculata* and *Bufo asiaticus*. *Acta Biol. Exp. Sinica*, 14:90.
- Takamune, K., H. Nishida, M. Takai i C. Katagiri (1991) Primary structure of toad sperm protamines and nucleotide sequence of their cDNAs. *Eur. J. Biochem.*, 196:401-406.
- Tanphaichitr, N., P. Sabhon, N. Talupphet i P. Chalermisarachai (1978) Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp. Cell Res.*, 117:347-356.
- Tarr, G.E. (1977) Improved manual sequencing methods. *Methods Enzymol.*, 47:335-357.
- Thoma, F., R. Koller i A. Klug (1979) Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt dependent superstructures of chromatin. *J. Cell Biol.*, 83:403-427.
- Thoma, F. i T. Koller (1981) Unravelled nucleosomes, nucleosome beads and higher order structures of chromatin: influence of non-histone components and histone H1. *J. Mol. Biol.*, 149:709-733.
- Thoma, F., R. Losa i T. Koller (1983) Involvement of the domains of histones H1 and H5 in the structural organization of soluble chromatin. *J. Mol. Biol.*, 167:619-640.
- Thomas, J.O. i R.D. Kornberg (1978) The study of histone-histone associations. En: *Methods in cell biology*, G. Stein, J. Stein i L.K. Stein, eds., Academic Press, New York, vol. 18, pp. 429-440.
- Thomas, W.K., R.E. Withler i A.T. Beckenbach (1986) Mitochondrial DNA analysis of Pacific salmonid evolution. *Can. J. Zool.*, 64:1058-1064.
-

- Trevithick, J.R., C.J. Ingles i G.H. Dixon (1969) The biosynthesis of protamine in trout testis. I. Intracellular site of synthesis. *Can. J. Biochem.*, 47:51-60.
- Vanhoutte-Durand, G., J. Mizoh, P. Sautière i G. Biserte (1977) Histones from gonads of the starfish *Asterias rubens*. *Comp. Biochem. Physiol. [B]*, 57:121-126.
- Vaughn, J.C. i G.W. Hinsch (1972) Isolation and characterization of chromatin and DNA from the sperm of the spider crab *Libinia emarginata*. *J. Cell Sci.*, 11:131-152.
- Vendrely, R. i C. Vendrely (1966) Biochemistry of histones and protamines. *Protoplasmatologia*, 5:2-88.
- von Holt, C., P. de Groot, S. Schwager i W.F. Brandt (1984) The structure of sea urchin histones and consideration of their function. En: *Histone genes: Structure, organization and regulation*. G.S. Stein, J.L. Stein i W.F. Marzluff, eds., John Wiley, New York, pp. 65-105.
- von Holt, C., W.N. Strickland, W.F. Brandt i M. Strickland (1979) More histone structures. *FEBS Lett.*, 100:201-218.
- Walker, M.H. (1971) Studies on the arrangement of nucleoprotein in elongate sperm heads. *Chromosoma*, 34:340-354.
- Watanabe, F. (1989) The role of charge neutralization and cooperative binding of linker histone in the higher-order structure of chromatin. *FEBS Lett.*, 249:147-150.
- Watanabe, F. (1990) The transition of the higher-order structure of rat liver chromatin takes place at about 85% neutralization of DNA charges. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172:1129-1131.
- Weber, K. i M. Osborn (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244:4406-4412.
- Whitehead, P.J.P. (1985) Clupeoid fishes of the world (Suborder clupeoidei), part 1, Chirocentridae, Clupeidae and Pristigasteridae, FAO Species Catalogue, vol. 7, FAO Fisheries Synopsis num. 125, Rome.
- Whitehead, P.J.P., M.L. Bauchot, J.C. Hureau, J. Nielsen, E. Tortonese (eds.) (1984-86) *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*, UNESCO, 3 vols.
- Willmer, P. (1990) *Invertebrate relationships. Patterns in animal evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Worcel, A., S. Strogatz i D. Riley (1981) Structure of chromatin and the linking number of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:1461-1465.
- Wray, W. i E. Stubblefield (1970) A highly sensitive procedure for detection of histones in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 38:454-460.
- Wunsch, A.M. i J. Lough (1990) Histone variant patterns during vertebrate embryogenesis and limb development. *Cell Diff. Develop.*, 30:19-25.

-
- Wyrobek, A.J., M.L. Meistrich, R. Furrer i W.R. Bruce (1976) Physical characteristics of mouse sperm nuclei. *Biophys. J.*, 16:811-825.
- Yelick, P.C., R. Balhorn, P.A. Johnson, M. Corzett, J.A. Mazrimas, K.C. Kleene i N. B. Hecht (1987) Mouse protamine 2 is synthesized as a precursor whereas mouse protamine 1 is not. *Mol. Cell. Biol.*, 7:2173-2179.
- Yokota, T., K. Takamune i C. Katagiri (1991) Nuclear basic proteins of *Xenopus laevis* sperm: their characterization and synthesis during spermatogenesis. *Dev. Growth Differ.*, 33:9-17.
- Young, D.C.R. i P.L. Davies (1987) Repeated sequence elements in the high molecular weight basic nuclear proteins from the winter flounder. *Biochem. Cell Biol.*, 65:909-916.
- Yulikova, E.P., L.K. Evseenko, L. Baratova, L.P. Belyanova, V.K. Rybin i A.B. Silaev (1976) The primary structure of sturine B, a protamine from Caspian sturgeon. *Bioorg. Khim.*, 2:1613-1618.
- Yulikova, E.P., V.K. Rybin i A.B. Silaev (1979) The primary structure of stellin A. *Bioorg. Khim.*, 5:5-10.
- Young, R.J. i K. Sweeney (1979) The structural organization of sperm chromatin. *Gamete Res.*, 2:265-282.
- Zalenskaya, I.A., V.A. Pospelov, A.O. Zalensky i V.I. Vorob'ev (1981) Nucleosomal structure of sea urchin and starfish sperm chromatin. Histone H2B is possibly involved in determining the length of linker DNA. *Nucl. Acids Res.*, 9:473-487.
- Zalenskaya, I.O., E.O. Zalenskaya i A.O. Zalensky (1980) Basic chromosomal proteins of marine invertebrates. II. Starfish and holothuria. *Comp. Biochem. Physiol. [B]*, 65:375-378.
- Zalenskaya, I.A. i A.O. Zalensky (1980) Basic chromosomal proteins of marine invertebrates. I. Sperm histones of nine sea urchin species. *Comp. Biochem. Physiol. [B]*, 65:369-373.
- Zalensky, A.O. i Z.V. Avramova (1984) Nuclear organization of a part of chromatin in mollusc sperm nuclei with a mixed basic composition. *Molec. Biol. Rep.*, 10:69-74.
- Zentgraf, H. i W.W. Franke (1984) Differences of supranucleosomal organization in different kinds of chromatin: cell type-specific globular subunits containing different numbers of nucleosomes. *J. Cell Biol.*, 99:272-286.
- Zentgraf, H., U. Müller i W.W. Franke (1980a) Supranucleosomal organization of the sea urchin sperm chromatin in regularly arranged 40 to 50 nm large granular subunits. *Eur. J. Cell Biol.*, 20:254-264.
- Zentgraf, H., U. Müller i W.W. Franke (1980b) Reversible in vitro packing of nucleosomal filaments into globular supranucleosomal units in chromatin of whole chick erythrocyte nuclei. *Eur. J. Cell Biol.*, 23:171-188.
-

- Zweidler, A. (1978) Resolution of histones by polyacrylamide gels electrophoresis in presence of nonionic detergents. En: *Methods in cell biology*, vol. XVII, Chromatin and chromosomal protein research, II, G. Stein, J. Stein i L.J. Kleinsmith, eds., Academic Press, New York, pp. 235-251.
- Zweidler, A. (1980) Non allelic histone variants in development and differentiation. *Dev. Biochem.*, 15:47-56.
- Zweidler, A. (1984) Core histone variants of the mouse: primary structure and differential expression. En: *Histone genes*, G.S. Stein, J.L. Stein i S.F. Marzluff, eds., John Wiley and sons, New York, pp. 339-371.
- Zweidler, A. i L.H. Cohen (1972) A new electrophoretic method revealing multiplicity, tissue specificity and evolutionary variation in histones F2a2 and F2b. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 31:926A.