

## LES PROTEÏNES ESPECÍFIQUES DELS NUCLIS DELS ESPERMATOZOIDES EN ELS MOL·LUSCS

MONTSERRAT DABAN,<sup>1</sup> CARMÉ CÀCERES,<sup>1</sup> NÚRIA SAPERAS,<sup>1,2</sup>  
GADEL·LY KESSRA<sup>1</sup> i MANEL CHIVA<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> *Departament d'Enginyeria Química, ETSEIB, UPC;* <sup>2</sup> *Institut de Ciències del Mar, CSIC;*  
<sup>3</sup> *Departament de Ciències Fisiològiques Humanes i de la Nutrició, Div. 4, UB.*

### RESUM

El present treball revisa els estudis efectuats sobre les proteïnes bàsiques específiques en els nuclis espermàtics dels mol·luscs. En la primera part (Característiques de les SBP) fem un repàs de la informació disponible, mentre que en la segona part (Aspectes evolutius de les molècules i de la seva funció) intentem expressar una visió integrada de tals proteïnes i de llurs possibles relacions evolutives.

### SUMMARY

The present work is a revision of the studies on nuclear sperm-specific basic proteins in molluscs. In section II we check the information available in the literature, while in section III we try to express an integrated vision of such proteins and their possible evolutive relationships.

### INTRODUCCIÓ

En l'espermio·gènesi dels animals, el nucli cel·lular sofreix un procés de condensació que finalitza en l'espermatozoide. La condensació nuclear és efectuada per canvis en les proteïnes que interaccionen amb el DNA: en la major part de les espermio·gènesis les histones

somàtiques són reemplaçades per altres molècules més bàsiques anomenades genèricament proteïnes específiques de l'espermatozoide o *sperm basic proteins* (SBP) (18, 58). Les protamines són un cas particular de les SBP. Si bé la condensació del nucli espermàtic és una característica gairebé universal, les SBP conegudes mostren una variabilitat extraor-

dinària. Ja els primers treballs comparatius (18) varen mostrar que la major part de les SBP no eren homòlogues, tot i efectuar la mateixa funció. A partir d'aquests treballs, i a mesura que s'incrementaven els estudis de caracterització de noves SBP, també ho feia la diversitat trobada (19, 23, 56), de manera que les classificacions generals proposades per a aquestes proteïnes responen a criteris citoquímics (18, 19) o bioquímics (90) però no a criteris d'homologia. Conseqüentment un dels camps d'interès que ofereixen les SBP rau en la comprensió dels processos seguits en el seu canvi evolutiu i les raons a les quals respon aquest canvi. En la literatura existeixen un cert nombre de revisions sobre les SBP en general o bé sobre algun aspecte seu en particular (23, 48, 49, 57, 65, 66, 70, 77, 84, 90). De tota manera, tret d'alguns assaigs sobre les SBP dels mol·luscs bivalves (10, 11), la informació referent als mol·luscs és escassa, poc ordenada i extraordinàriament confusa (a causa en part de la nomenclatura no unificada utilitzada pels diferents investigadors). El propòsit d'aquest treball és revisar els estudis sobre les SBP en els mol·luscs, principalment els no inclosos en les revisions anteriors, i ordenar aquesta informació conjuntament amb altres aspectes significatius de la seva biologia de la reproducció. Cal remarcar quatre punts:

a) Per als mol·luscs bivalves ens hem basat en els treballs d'Ausió (10, 11). Aquests contenen més informació explícita que la revisió actual;

b) Una part de la informació sobre les SBP en gastròpodes no està encara publicada i correspon als treballs de tesi doctoral de M. Daban;

c) Hem presentat un treball preliminar amb el mateix objectiu que l'actual (24), el qual utilitzem reiteradament com a orientació;

d) Emprem correntment la classificació adoptada en la *Història natural dels Països Catalans* (vol. 8, 1991).

## CARACTERÍSTIQUES DE LES SBP

### Poliplacòfors

Format pels quitons, és un grup de mol·luscs de característiques primitives que va aparèixer en el Cambrià. Aquests animals han retingut al llarg de la seva evolució la fecundació externa. El seu espermatozoide és considerat de tipus primitiu segons la classificació de Franzén (33, 35), caràcter que concorda amb el tipus de fecundació. La morfologia de les cèl·lules espermioquímiques ha estat estudiada en diverses espècies (52, 82): en totes elles es condensa la cromatina començant per la formació de petits grànuls densos que s'agrupen en fibres per compactar-se finalment, i formar el nucli de l'espermatozoide. Han estat estudiades les SBP de cinc espècies de polioplacòfors: *Cryptochiton stellerii* (o. acantoquitònides, fam. acantoquitònids) i *Chiton olivaceus* (89), *Katharina tunicata*, *Mopalia ciliata* i *M. muscosa* (28) (o. quitònides, fam. quitònids). *C. stellerii* conté SBP en lloc d'histones en el nucli dels seus espermatozoides. En ser analitzades per electroforesi en gels de poliacrilamida/urea, les SBP es reparteixen en tres zones diferents del gel: una fracció (anomenada X en les referències originals) que migra en la zona de les histones somàtiques, una altra fracció (Y en les referències citades) de mobilitat intermèdia entre les histones somàtiques i la protamina salmina, i una última fracció (Z en referències) de més migració que les anteriors. Aquestes molècules han estat separades i la seva composició aminoacídica analitzada (vegeu la

TAULA I

**Composició aminoacídica (% de mols) de les SBP de tres espècies de poliplotòfors**

aa	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)
lys	13,6	19,4	11,1	9,6	12,1	34,2	15,4
his	—	—	—	1,7	—	—	0,3
arg	40,1	48,8	43,7	40,9	54,3	19,2	37,8
asp	—	—	0,8	2,7	0,1	0,3	2,0
thr	2,1	2,3	2,1	3,9	5,7	3,0	3,5
ser	5,3	4,5	5,0	8,5	3,7	6,7	10,5
glu	1,2	1,0	1,0	1,4	0,2	0,3	2,0
pro	2,0	4,1	1,4	1,2	4,6	9,7	4,8
gly	5,0	3,1	4,6	5,9	4,3	3,7	6,9
ala	8,4	5,0	7,5	8,5	6,8	20,5	8,5
cys	—	—	—	—	—	—	—
val	12,0	11,6	9,3	7,4	8,1	12,1	3,4
met	3,2	—	2,9	1,2	—	—	0,3
ile	1,9	—	0,8	2,0	0,1	0,1	0,9
leu	5,2	—	3,6	2,6	0,1	0,2	2,1
tyr	—	—	1,7	1,8	—	—	0,9
phe	—	—	0,8	0,8	—	—	0,6

Proteïnes específiques de *K. tunicata*: (a), proteïna PMh (P1); (b), proteïna PMP (P2); (c) proteïna K (minoritària).  
Proteïnes específiques de *C. stellerii*: (d), proteïna X (P1); (e), proteïna Y (P2); (f), proteïna minoritària Z.  
Proteïnes específiques de *C. olivaceus*; (g), mescla de totes elles.

taula I). X i Y tenen una composició similar per la seva riquesa en arginina i altres valors que es manifesten en la taula I. Es diferencien, però, en què X conté una petita proporció d'aminoàcids hidrofòbics que pràcticament estan absents en Y. La proteïna Z és més rica en lisina i alanina que en arginina, i la seva composició (per aquests valors i per la presència important de prolina) recorda la composició de la histona H1. En atenció a la seva composició aminoacídica, les tres proteïnes X, Y i Z han de ser considerades protamines segons el criteri de Subirana (90). *K. tunicata* també conté SBP majoritàries que pràcticament substitueixen les histones somàtiques. El seu nucli poseeix tres fraccions de SBP (28): una fracció de migració electroforètica similar a les histones,

equivalent a la fracció X de *C. stellerii*, anomenada PMh en el treball original (P1 en la fig. 1); una segona fracció equivalent a la fracció Y de *C. stellerii*, anomenada PMP (a la figura 1 apareix P2), i una fracció minoritària que no és equivalent a cap proteïna de *C. stellerii*. Els valors de les anàlisis composicionals de les fraccions separades per columnes de bescanvi iònic donen suport a la correspondència X-PMh i Y-PMP entre les SBP de les dues espècies (vegeu la taula I). Els nuclis espermàtics de les altres tres espècies (*C. olivaceus*, *M. muscosa*, *M. ciliata*) contenen SBP que exhibeixen el mateix patró electroforètic descrit. L'extracte global de les protamines de *C. olivaceus* també ha estat analitzat (89) (vegeu la taula I). Estudis

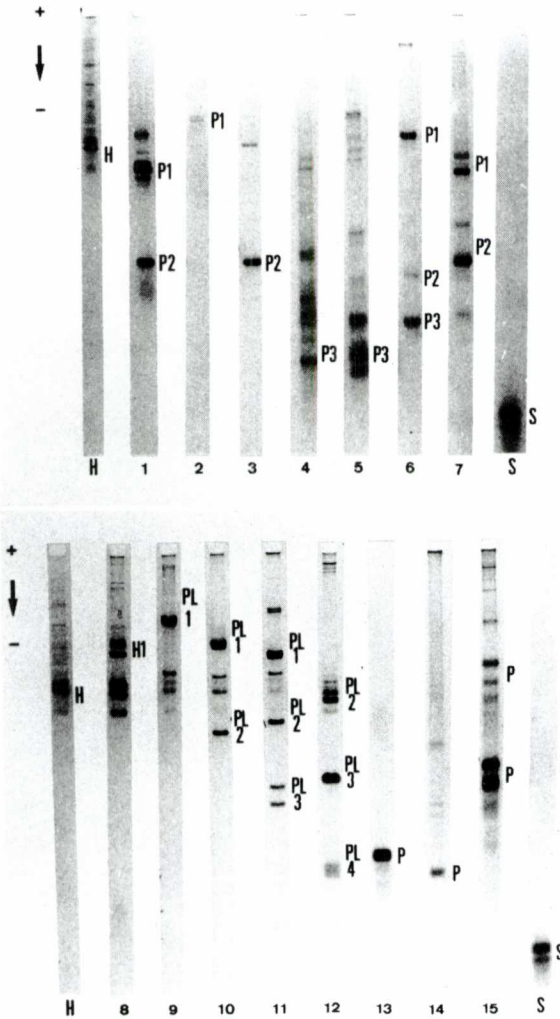


FIGURA 1: Patró electroforètic en gel d'acrilamida/àcid acètic/urea de les SBP en diferents espècies de mol·luscs. En aquesta figura es recullen tots els tipus coneguts de SBP en aquest grup: 1 *Katharina tunicata* (polioplacòfor); 2 *Tectura scutum* (patel·logastròpode); 3 *Astraea gibberosa* (vetigastròpode); 4 *Polynices lewisii* (cenogastròpode [mesogastròpode]); 5: *Murex brandaris* (cenogastròpode [neogastròpode]); 6 *Helix aspersa* (pulmonat); 7 *Aplysia* sp. (opistobranqui); 8 *Crassostrea gigas* (bivalve, grup 0); 9 *Spisula solidissima* (bivalve grup 1); 10 *Ensis ensis* (bivalve, grup 2); 11 *Macoma nasuta* (bivalve, grup 3); 12 *Mytilus edulis* (bivalve, grup 4); 13 *Loligo pealii* (tèutid); 14 *Octopus vulgaris* (octòpode); 15 *Eledone cirrhosa* (octòpode); H patró electroforètic de les histones somàtiques; S patró electroforètic de la protamina típica dels peixos (salmina). (8, 9, 10, 11 i 12 cedits per J. Ausió).

estructurals (28) mostren que la molècula de protamina PMh (P1) de *K. tunicata* conté un pèptid de 80 a 100 residus aminoacídics no digerible per la tripsina. Aquest pèptid no és present a la fracció PMP (P2). Malgrat la composició similar de les dues fraccions, és possible que l'estructura de la PMh (P1) sigui similar a la de la histona H1 (una zona globular central flanquejada per dos extrems desestructurats), mentre que PMP (P2) seria una molècula lineal, de menor longitud que l'anterior.

## Gastròpodes

Aquests mol·luscs formen un grup molt diversificat, durant l'evolució del qual s'han produït transformacions en la seva biologia de la reproducció: els gastròpodes més primitius (patel·logastròpodes i vetigastròpodes, entre d'altres) varen aparèixer en el Cambrià, i conserven la fecundació externa; el seu espermatozoide és de tipus primitiu (33, 35, 36, 37) i la condensació de la cromatina espermiogènica es fa per processos similars als dels polioplacòfors (47, 51, 53). A partir d'un grup de vetigastròpodes varen aparèixer en el Cretaci els cenogastròpodes (revisat a 45). Aquest grup ha adoptat la fecundació interna amb canvis importants en les estructures reproductores i en les espermiogènesis, ja que el seu espermatozoide és de tipus transformat. La condensació de la cromatina segueix un procés complicat en les seves últimes fases (vegeu la fig. 2) i els espermatozoides es troben

acompanyats per altres cèl·lules espermato-  
gèniques transformades (paraespermatozoides)  
que compleixen funcions no estrictament  
reproductores (2, 38, 40, 42, 43, 44, 47). Els  
pulmonats i opistobranquis també tenen  
fecundació interna, i els seus espermatozoides  
són transformats i acompanyats d'altres  
cèl·lules.

### *Patel·logastròpodes*

Les SBP han estat estudiades en nou  
espècies de dues superfam.: patel·loïdeus:  
*Patella cerulea* (28), *P. vulgata* (89), *P.*  
*granatina* (98), *P. aspera* (29) i acmeoïdeus:  
*Acmaea mitra*, *Tectura persona*, *T. scutum*,  
*Lottia digitalis* i *L. pelta* (28). La primera espècie  
estudiada fou *P. vulgata*. El nucli espermàtic  
conté només una proteïna específica, i no pre-  
senta histones. La migració electroforètica  
d'aquesta proteïna és similar a la de les  
protamines P1 dels polioplacòfors (vegeu les  
figures 1 i 3). La seva riquesa en arginina  
(43 %), lisina (9,9 %) i serina (14,7 %) també  
l'aproxima a les P1 dels polioplacòfors. D'altra  
banda, *P. granatina* conté una protamina  
d'iguals característiques (vegeu la taula II).  
Estudis sistemàtics (28, 29) indiquen que les  
protamines de totes les pegellides són similars  
entre elles i que responen a les característiques  
següents:

- a) Són proteïnes de 200-220 residus aminoacídics.
- b) De composició similar entre elles;
- c) Consten d'una o dues molècules semblants;
- d) Reemplacen les histones somàtiques.

En les figures 1 i 3 es mostren els patrons  
electroforètics de dos patel·logastròpodes  
conjuntament amb les SBP d'altres mol·luscs  
(les anomenem P1). La molècula de protamina

TAULA II

### Composició aminoacídica (% de mols) de les SBP (protamines P1) de quatre espècies de patel·logastròpodes

aa	(a)	(b)	(c)	(d)
lys	9,9	9,7	12,5	10,0
his	—	—	—	—
arg	43,0	50,7	50,2	46,4
asp	1,7	0,7	1,4	1,4
thr	2,5	2,1	0,5	1,6
ser	14,7	17,0	12,2	15,1
glu	0,7	0,3	—	—
pro	2,2	2,8	3,0	3,3
gly	6,9	4,4	6,1	8,2
ala	6,9	6,2	3,7	6,2
cys	—	—	—	—
val	5,5	2,3	7,6	4,6
met	—	—	—	0,5
ile	0,7	0,7	—	0,5
leu	3,9	2,7	2,8	3,1
tyr	0,6	0,4	—	0,5
phe	0,6	0,3	—	0,5

(a) *P. vulgata*; (b) *P. granatina*; (c) *P. cerulea*; (d) *P. aspera*.

P1 de *P. aspera* conté un pèptid resistent a la  
tripsinització similar al descrit abans en un  
polioplacòfor. Aquest pèptid conté pràcticament  
tots els residus hidrofòbics de la molècula,  
mentre que les arginines i lisines (residus bàsics)  
són gairebé absents (29) (vegeu la taula III).  
Aquest fet dóna suport a la idea que l'estructura  
molecular de les protamines P1 de patel·lo-  
gastròpodes i polioplacòfors poden ser similars  
a la histona H1 definida principalment per  
Chapman i col·l. (22) i Allan i col·l. (1).

### *Vetigastròpodes (arqueogastròpodes)*

Malgrat que hi ha un cert nombre d'observacions citoquímiques en nuclis espermàtics d'arqueogastròpodes (58), el nombre d'espècies estudiades bioquímicament es limita a dotze: o. pleurotomarioides, fam. haliòtids: *Haliotis tuberculata* (89), *H. crackeroidii* (15), *H. kamtschatkana*; o. fissurel·loides, fam. fissurèl·lids: *Fissurella picta*; fam. diodòrids: *Diodora aspera*; o. trocoïdes, fam. tròquids: *Tegula funebris*, *Calliostoma ligatum*, *Monodonta turbinata*, *M. articulata*, *Gibbula divaricata*, *G. richardii*; fam. turbínids: *Astraea gibberosa* (tots ells a 26, 28, 29). Els estudis pioners es varen fer en *Gibbula* i *Haliotis* (89). Els espermatozoides contenen una proteïna majoritària (protamina) (vegeu la taula IV) que migra per electroforesi en la zona de les P2 dels poliplotòfors (a les fig. 1 i 3 també són anomenades P2). Les caracteritzacions sistemàtiques de Daban permeten definir els següents trets particulars per a les protamines P2 de vetigastròpodes:

a) Contenen entre 80 i 100 residus aminoacídics.

b) Les seves composicions (vegeu la taula IV) són similars entre elles i amb les P2 de poliplotòfors, formades per pocs tipus de residus aminoacídics, i són particularment escassos els aminoàcids hidrofòbics.

c) Estan formades per un únic component proteínic.

d) Reemplacen sempre les histones somàtiques.

Basant-nos la composició sistemàtica, sembla que la regularitat en el tipus de protamina es correlaciona bé amb la regularitat de la condensació de la cromatina en les diferents espècies (63) i amb la forma general de l'espermatozoide (100). Les digestions enzimàtiques per tripsina suggereixen que són

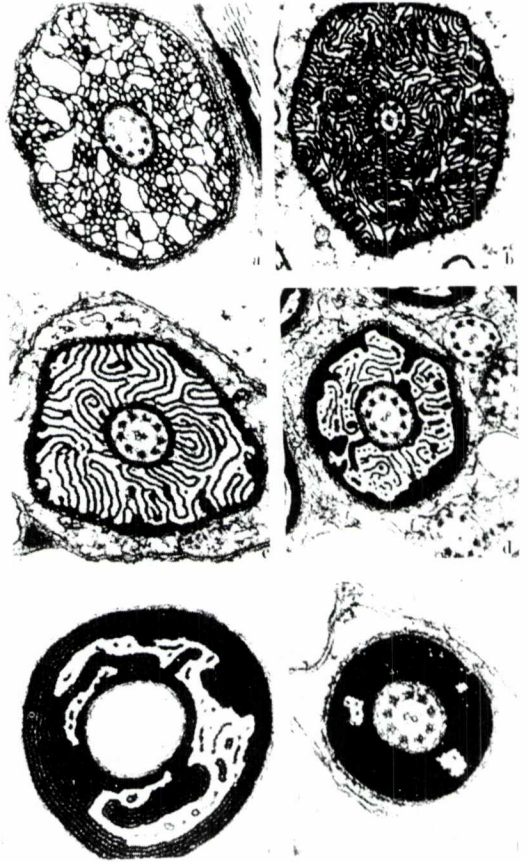


FIGURA 2. Últimes fases per les que travessa la condensació nuclear en l'espermioègesi de *Murex brandaris*, un cenogastròpode. La figura prové d'Amor i Durfort (2) (amb permís dels autors).

molècules lineals sense cap plegament intramolecular intrínsec (27), propietat compartida, com hem vist, per les P2 dels quitons. Les protamines dels vetigastròpodes coexisteixen en els nuclis espermàtics amb una petita quantitat de proteïnes especials de composició aminoacídica intermèdia entre les histones H1/H2B i les pròpies protamines. En aquest treball no discutirem les proteïnes minoritàries.

TAULA III

**Composició aminoacídica del pèptid resistent a la tripsinització de la protamina de *P. vulgata* (a) comparada amb la composició de la molècula sencera (b)**

aa	(a)	(b)
lys	4,0	9,9
his	—	—
arg	1,3	43,0
val	7,0	5,5
leu	7,3	3,9
tyr	3,4	0,6
Altres	77,0	37,1

La seqüència aminoacídica de la protamina P2 de *M. turbinata* està en estudi. Fins al moment es coneixen els primers 52 residus de l'extrem N-terminal. L'arginina està organitzada en agrupacions de 2 a 6 residus i el motiu arg-ser es repeteix 10 vegades. En la figura 4 es compara aquesta seqüència (29) amb totes les conegudes de SBP en mol·luscs.

L'estructura del complex DNA-protamina ha estat estudiada en l'espècie *Gibbula divaricata* a partir del seu espectre de difracció de raigs X (78, 88). Segons aquest últim treball, la protamina quedaria situada en el solc ample del DNA. Les arginines formarien enllaços d'hidrogen amb els grups fosfat del DNA, mentre que els pèptids neutres de la molècula de protamina quedarien col·locats en el solc estret de les molècules de DNA veïnes (vegeu la fig. 5). L'empaquetament del complex és molt dens (sistema hexagonal). Els autors treballen amb complexos reconstituïts, ja que la nuclioprotamina nuclear no és cristal·lina.

**Cenogastròpodes  
(mesogastròpodes i neogastròpodes)**

Els estudis es troben en un cas similar als referits pels vetigastròpodes: s'han fet un petit nombre d'observacions citoquímiques (58), però només vuit espècies han estat estudiades amb un mínim de detall: superfam. litorinoïdeus, fam. litorínids: *Littorina neritoides*, *L. scutulata*; superfam. naticoïdeus, fam. naticíds: *Polynices lewisii*; superfam. muricoïdeus, fam. murícids: *Murex brandaris*, *Thais stramonita chocolata* (83); fam. nucèlids: *Nucella canaliculata*, *N. emarginata*, *N. lamellosa* (excepte *Thais* totes les espècies han estat estudiades per Daban i col·l. (28)). Aquests mol·luscs posseeixen diverses

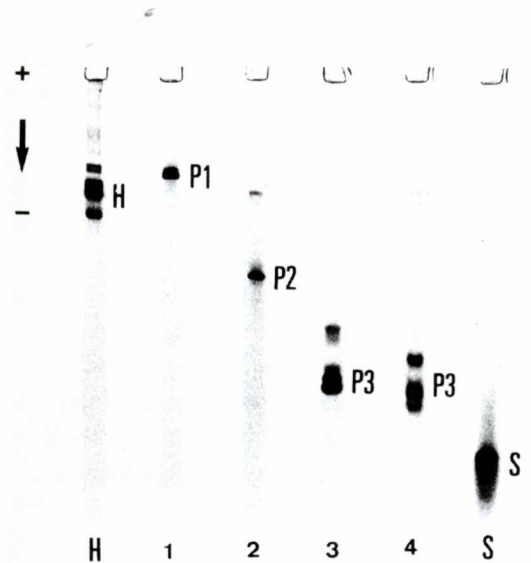


FIGURA 3. Patró electroforètic que il·lustra la variabilitat de les protamines en els patel·logastròpodes, vetigastròpodes i cenogastròpodes (prosobranquis); 1: *Patella aspera* (patel·logastròpode); 2: *Monodonta turbinata* (vetigastròpode); 3: *Littorina neritoides* (cenogastròpode [mesogastròpode]); 4: *Murex brandaris* (cenogastròpode [neogastròpode]); H i S són els patrons d'histones i salmina, respectivament.

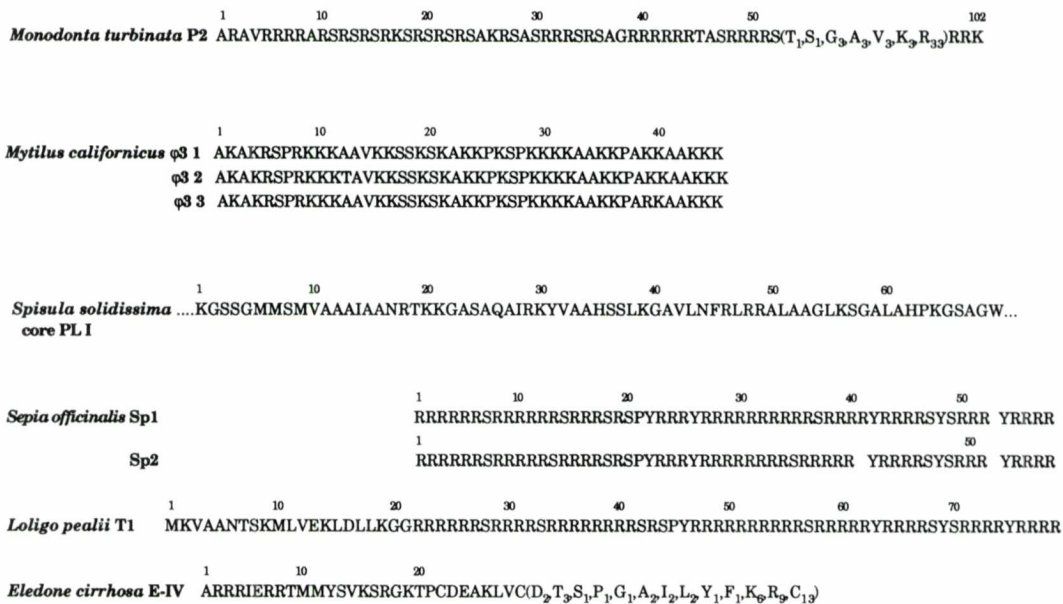


FIGURA 4. Seqüències conegudes de les SBP dels mol·luscs. Les que no han estat publicades es mostren amb el permís dels autors.

protamines d'elevada migració electroforètica (vegeu les figs. 1 i 3). Són protamines de mida menor que les dels vetigastropodes, ja que atenyen entre 40 i 60 residus aminoacídics. La seva composició és també excepcional, ja que pràcticament només estan constituïdes per tres residus diferents: arginina, lisina i glicina, i una quantitat remanent de serina i/o treonina (vegeu la taula V). Les propietats anteriors diferencien les protamines dels cenogastròpodes de les corresponents als polioplacòfors, patel·logastròpodes i vetigastropodes. En aquest sentit, l'espermioogènesi dels cenogastròpodes posseeix una altra qualitat no compartida amb els anteriors: la substitució de les histones per les protamines és efectuada per mitjà d'una sèrie molt complexa de canvis de proteïnes que apareixen i desapareixen progressivament en el decurs de l'espermioogènesi (vegeu la fig. 6).

Per la seva composició aminoacídica, sembla que són molècules precursors de les formes finals de les protamines (29).

### ***Pulmonats i opistobranquis***

Aquestes dues infraclases dels eutineures presenten fecundació interna, i el seu espermatozoide és de tipus modificat (consulteu les referències de les pàgines 36, 37 i 38), particularment en els opistobranquis, on el nucli de l'espermatozoide es troba molt espiralitzat. L'única informació que hi ha sobre les SBP d'aquests grups són les presentades a la figura 1 (24). Les SBP d'un pulmonat, *Helix aspersa*, consten de dues bandes electroforètiques principals (P1 i P3 a



TAULA IV

Composició aminoacídica (% de mols) de les protamines P2 de vuit espècies de vetigastròpodes (arqueogastròpodes)

aa	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)
lys	10	12	23	34	11	7	7	17	6
his	—	—	1	—	—	—	—	—	—
arg	53	45	42	33	50	50	56	44	56
asp	—	1	—	—	—	—	—	—	—
thr	3	3	1	—	1	1	—	—	2
ser	16	16	16	16	20	19	16	14	17
glu	—	1	—	—	—	—	—	—	—
pro	1	1	—	—	—	—	—	—	—
gly	4	4	7	9	6	8	6	11	5
ala	10	11	6	6	10	10	9	9	10
cys	—	—	—	—	—	—	—	—	—
val	2	5	2	—	3	5	6	5	4
met	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ile	—	1	—	—	—	—	—	—	—
leu	—	1	—	—	—	—	—	—	—
tyr	—	—	1	2	—	—	—	—	—
phe	—	—	—	—	—	—	—	—	—

(a) *H. crackeroidii*; (b) *H. tuberculata*; (c) *F. picta*; (d) *D. aspera*; (e) *T. funebris*; (f) *A. gibberosa*; (g) *M. turbinata*; (h) *C. ligatum*; (i) *G. divaricata*.

la figura 1) i d'una de minoritària (P2 a la figura 1). Desconeixem si al llarg de l'espermioogènesi es donen canvis de proteïnes, com en el cas dels cenogastròpodes. Respecte a la composició de les protamines d'*Helix* només es disposa de les dades citoquímiques de Bloch i Hew (20), segons les quals haurien de ser molt riques en arginina, i possiblement no contindrien lisina ni histidina. Les SBP de l'opistobranqui *Aplysia* sp. són molt diferents de les del pulmonat

*Helix*: el seu patró electroforètic consta de dues bandes situades a la regió de les P1, dues a la regió de les P2 i una banda minoritària a la regió de les P3 (vegeu la fig. 1). Una propietat que les diferencia de la resta de les SBP dels altres gastròpodes rau en què no poden ser extretes de la cromatina de l'espermatozoide sense prèvia reducció química d'aquesta, i per tant, han de ser riques en el residu aminoacídic cisteïna (Colom i Subirana, en preparació).

TAULA V

**Composició aminoacídica (% de mols) de les protamines P3 de dues espècies de cenogastròpodes. *L. neritoides* (mesogastròpode) (a), i *M. brandaris* (neogastròpode) (b).**

aa	(a)	(b)
lys	43,7	30,2
arg	33,2	35,0
thr	0,7	—
ser	1,0	1,5
gly	21,0	31,3
altres	—	—

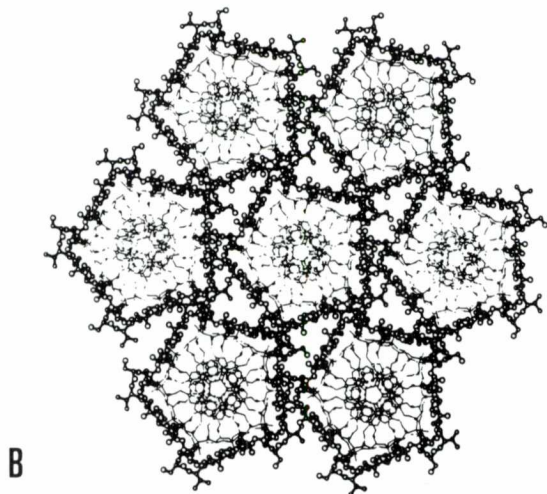
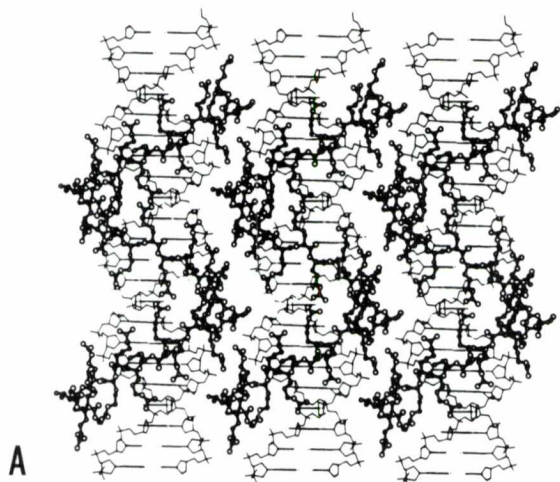


FIGURA 5. Empaquetament molecular dels complexos de nucliprotamina de *Gibbula divaricata*. A: vista normal a l'eix del DNA; B: projecció sobre el pla equatorial. El traç gruixut correspon a les molècules de protamina, el traç fi correspon al DNA. De Puigjaner i col·l. (78) (amb permís dels autors).

## Bivalves

És un grup complex, però totes les seves espècies han de ser considerades de fecundació externa. En la major part d'elles els espermatozoides són alliberats directament a l'aigua. En altres espècies els oòcits són fecundats dins dels límits de l'organisme, on els òvuls fecundats són incubats (96, 99), però mai no es dona una transferència d'espermatozoides pels espermatòfors o òrgans copuladors a l'interior del tracte reproductor de la femella. En concordància amb el tipus de fecundació, l'espermatozoide presenta una morfologia primitiva, malgrat que hi ha petites variacions segons les espècies (76). Els canvis esmentats en la morfologia espermàtica possiblement estan en relació, principalment, amb

amb les diferències específiques de la biologia de la reproducció, en particular amb el gruix de la coberta glicoproteínica que envolta l'òocit (67). Així, no sembla haver-hi una correlació clara entre els arbres filogenètics en els bivalves i la morfologia de l'espermatozoide (76). Un concepte emprat en aquest treball referit és que l'estructura dels espermatozoides està relacionada tant amb les tendències evolutives generals del grup (es refereix als bivalves) com amb les adaptacions particulars al comportament reproductiu, i que diferents pressions de selecció poden actuar sobre ella independentment. Aquest punt de vista pot ser també molt útil en analitzar les variacions evolutives de les SBP en els diferents animals, i concretament en els mol·luscs.

Les SBP dels bivalves han estat estudiades bioquímicament en no menys de 33 espècies. A continuació llistem les espècies i citem els treballs on es troba estudiat algun aspecte relacionat amb les seves SBP:

o. pterioides, superfam. mitiloïdeus, fam. mitílids: *Mytilus edulis* (3, 4, 6, 11, 24, 75, 89, 91, 106, 108), *M. edulis chilensis* (73), *M. californianus* (12, 105), *M. galloprovincialis* (97, 108), *Crenomytilus grayanus* (86, 104), *Modiolus difcilis* (86), *Aulacomya ater* (72); superfam. ostreoïdeus, fam. pectínids: *Swiftopecten swifti* (11, 104, 105, 106), *Patinopecten yessoensis* (11, 105), *Aequipecten irradians* (106), *Pecten maximus* (11); fam. ostrèids: *Crassostrea gigas* (7, 11, 86, 87);

o. paleoheterodonts, s. o. unionoides, fam. uniònids: *Anodonta piscinalis* (81);

o. veneroides, superfam. mactroïdeus, fam. màctrids: *Spisula solidissima* (3, 7, 8, 9, 10, 61, 89, 91), *S. sachalinensis* (106), *Macra corallina* (21), *Tresus capax* (7); superfam. veneroïdeus, fam. venèrids: *Mercenaria stimpsoni*, *Callista brevisiphonata* (106), *Tapes japonica* (105), *Saxidomus purpuratus* (68, 106), *S. giganteus*, *Protothaca staminea*

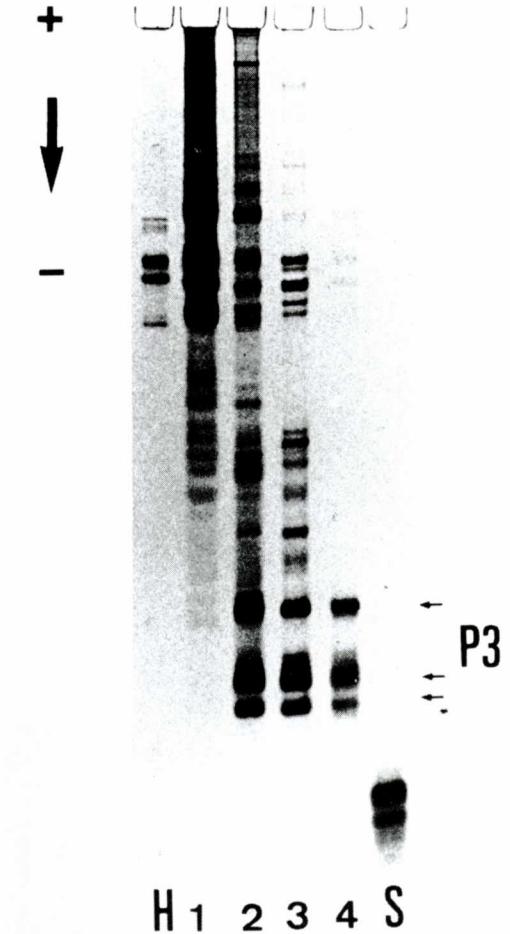


FIGURA 6. Electroforesi on es mostren els canvis en el patró de proteïnes nuclears durant la maduració de la gònada de *Murex brandaris*; 1: gener 1988; 2: febrer 1988; 3: juny 1988; 4: octubre 1988; H i S: patrons d'histones i salmina. Tret de Daban (29).

(105), *P. thaca* (71, 73); superfam. tel·linoïdeus, fam. donàcids: *Donax trunculus* (11, 21); fam. tel·línids: *Macoma nasuta*, *Macoma* sp (11); superfam. solenoïdeus, fam. solènids: *Ensis minor* (11), *E. ensis* (11); superfam. cardioïdeus, fam. càrdids: *Clinocardium nutallii* (7); superfam. dreissenoides, fam. dreissenids: *Dreissena polymorpha* (91).

TAULA VI

**Composició (% de mols) de les histones H1 específiques en els espermatozoides de bivalves**

aa	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
lys	29,0	26,2	31,6	36,3	28,2
his	1,0	1,0	0,9	0,7	1,2
arg	10,4	8,9	1,7	6,1	1,6
asp	2,3	1,7	4,2	2,9	3,3
thr	2,9	3,4	4,1	5,0	5,6
ser	12,0	13,6	7,4	7,1	5,0
glu	1,9	1,3	4,7	2,1	4,1
pro	7,3	7,4	7,4	7,6	9,0
gly	3,9	4,4	6,5	4,8	5,6
ala	18,6	21,4	18,1	22,5	23,3
cys	—	—	—	—	—
val	3,5	3,6	5,3	1,0	3,5
met	0,8	1,2	—	—	—
ile	1,6	1,6	2,2	1,4	2,1
leu	2,9	2,9	3,8	2,3	4,5
tyr	0,7	0,6	1,6	—	1,4
phe	1,1	0,9	0,6	—	1,6

(a) H1.1 de *C. gigas*; (b) H1.2 de *C. gigas*; (c) H1 específica en *A. piscinalis*; (d) H1 espermàtica de *P. thaca*; (e) H1 de *D. trunculus*. (Referències en el text.)

o. mioïdes, superfam, hiatel·loïdeus, fam. hiatèl·lids: *Panopaea generosa*; super fam. mioïdeus, fam. míids: *Mya arenaria* (7).

Ausió (7, 11 i 24) ha ordenat els patrons electroforètics de les SBP dels bivalves en cinc grups. Utilitza la nomenclatura PL (*protamine-like*) seguida d'una xifra romana segons la mobilitat electroforètica. Així, les PL I migrarien en gels de poliacrilamida/àcid acètic/urea menys que les histones somàtiques, les PL II com les histones somàtiques, les PL III més que les histones, i les PL IV més que les PL III (vegeu la fig. 1). En les taules VII, VIII i IX apareixen totes les composicions aminoacídiques conegudes de les proteïnes PL I, II, III i IV. Els grups d'Ausió són:

**Grup 0:** Les espècies d'aquest grup mantenen les histones somàtiques fins al final de l'espermioïgènesi. En el nucli de l'espermatozoide, a més de les histones somàtiques s'hi troba una histona H1 característica que presenta dos o tres components (vegeu la taula VI mostra totes les composicions aminoacídiques conegudes d'aquestes H1). Aquests nuclis mantenen l'estructura nucleosòmica, però el nucleosoma tindria una mida superior al somàtic (225-226 pb). El patró electroforètic de les SBP d'un representant d'aquest grup es pot observar a la figura 1. Pertanyen a aquest grup: *Pecten maximus*, *Aequipecten irradians*, *Crassostrea gigas*, *Swiftopecten swifti*, *Patinopecten yessoensis*, *Glycimeris yessoensis* i *Anodonta piscinalis*.

**Grup 1:** Contenen una proteïna específica PL I majoritària de baixa mobilitat electroforètica. Retenen d'un 20 a un 30 % de les histones somàtiques en el nucli de l'espermatozoide. La cromatina està organitzada parcialment en nucleosomes, i parcialment en fragments compactes de nuclioprotamina, formada per DNA i proteïna PL I (8) (el model proposat per a l'organització d'aquest tipus de cromatina apareix a la fig. 7). El patró electroforètic de les SBP d'un representant del grup es mostra a la figura 1. Pertanyen a aquest grup: *Callista chione*, *C. brevisiphonata*, *Spisula solidissima*, *S. sachaliensis*, *Mercenaria stimpsoni*, *Saxidomus purpuratus*, *S. giganteus*, *Tapes japonica*, *Tresus capax*, *Panopaea generosa*, *Protothaca thaca*, *Protothaca staminea*, *Dreissena polymorpha* i *Venus verrucosa*.

**Grup 2:** Apareixen dos components majoritaris específics de l'espermatozoide: PL I i PL II (vegeu la fig. 1). Ambdós components coexisteixen amb un 20-30 % d'histones en el nucli de l'espermatozoide. Exemples del grup 2 són: *Cardium edule*, *Ensis ensis*, *Ensis minor*, *Clinocardium nutallii* i *Mya arenaria*.

**Grup 3:** Contenen d'un 20 a un 30 % de la quantitat total d'histones somàtiques, que coexisteixen amb els components principals. Aquestes són tres proteïnes específiques: una PL I, una PL II i una PL III (vegeu la fig. 1). Pertanyen a aquest grup, entre d'altres: *Macoma nasuta* i *Donax trunculus*.

**Grup 4:** Dins d'aquest grup s'hi troben la immensa majoria dels mitílids. Els nuclis dels espermatozoides contenen, com en el cas anterior, 3 SBP que coexisteixen amb una quantitat residual d'histones somàtiques. D'acord amb la mobilitat electroforètica, les proteïnes d'aquest grup són PL II, PL III i PL IV (vegeu la fig. 1).

Malgrat l'heterogeneïtat electroforètica, gairebé totes les PL presenten una composició aminoacídica similar. Particularment, les PL I i PL II son gairebé idèntiques (vegeu les taules VII, VIII, XI i la fig. 8) i ambdós tipus contenen el pèptid globular resistent a la tripsinització que inclou la major part dels residus hidrofòbics (9, 11, 39). No s'ha trobat cap evidència que indiqui la possessió d'aquest pèptid per a les PL III i PL IV. En la figura 4 es representa la seqüència del pèptid globular de la PL I de *Spisula solidissima* (9) i de les tres formes de la PL IV ( $\phi_3$ ) de *Mytilus californianus* (12).

TAULA VII

**Composició aminoacídica de les proteïnes específiques PL I de mol·luscs bivalves (% de mols)**

aa	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	(j)	(k)
lys	24,8	23,0	21,3	19,9	30,1	29,1	30,7	32,7	21,6	27,6	27,0
his	—	1,3	0,8	1,8	0,8	1,5	1,2	1,0	2,4	0,7	1,0
arg	23,1	19,1	20,6	25,0	25,4	23,8	26,0	27,9	19,5	24,7	27,5
asp	0,6	2,8	2,9	2,2	1,7	1,8	0,2	0,7	2,5	1,6	0,8
thr	4,3	3,3	2,8	3,0	2,3	2,1	—	1,2	2,8	1,2	1,5
ser	21,7	19,4	21,8	19,6	20,3	19,9	26,1	22,1	19,7	22,7	23,9
glu	0,6	3,6	3,4	2,4	1,9	2,8	0,1	0,5	2,8	0,5	0,5
pro	2,4	1,8	3,0	2,8	2,1	2,2	1,6	1,7	1,2	0,8	1,5
gly	3,0	5,1	3,8	5,0	3,8	6,0	3,3	3,2	6,4	4,2	3,2
ala	14,2	12,0	13,1	7,0	6,6	5,5	6,1	5,3	9,8	8,9	7,7
cys	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
val	2,3	2,0	2,0	2,4	1,9	1,7	1,3	1,2	2,8	2,3	1,9
met	0,4	—	0,2	2,0	—	—	1,0	0,1	0,9	0,9	1,1
ile	0,5	1,5	1,4	1,8	0,6	0,7	0,8	0,7	1,8	1,1	0,5
leu	1,7	2,8	2,2	3,1	2,3	1,9	1,3	1,0	2,5	1,7	0,8
tyr	0,3	1,0	0,5	1,0	—	0,3	0,4	0,3	1,8	0,7	0,6
phe	0,3	1,2	0,5	0,6	—	0,6	0,2	0,3	1,4	0,6	0,8

(a) *S. solidissima*; (b) *S. sachalinensis*; (c) *M. corallina*; (d) *M. stimpsoni*; (e) *C. brevisiphonata*; (f) *S. purpuratus*; (g) *P. staminea*; (h) *P. thaca*; (i) *D. trunculus*; (j) *C. nutallii*; (k) *D. polymorpha*.

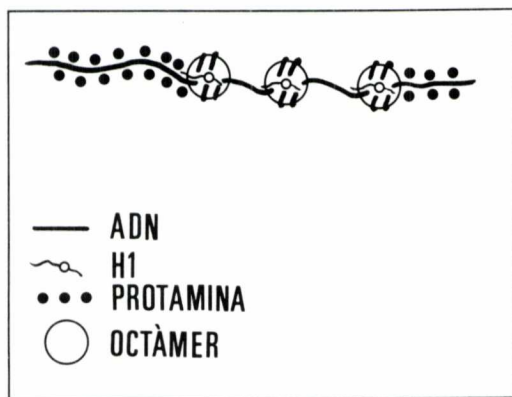


FIGURA 7. Representació esquemàtica del model proposat per Ausió i Van Holde (8) sobre l'organització de la cromatina de *Spisula solidissima* (adaptat de l'original).

## Cefalòpodes

Són marins, de fecundació interna, i representen els mol·luscs que han adoptat les característiques més diferents en l'evolució d'aquest fílum. Han estat estudiades bioquímicament les SBP de les espècies següents:

o. sèpides, fam. sèpids: *Sepia officinalis*;

o. tèutides, s.o. miòpsides, fam. loligínids: *Loligo vulgaris*, *L. forbesi*, *L. pealii*;  
S.O. egòpsides, fam. ommastrèfids; *Ilex argentinus*;

o. octòpodes, s.o. incirrats, fam. octopòdids: *Octopus vulgaris*, *Eledone cirrhosa*.

## Sèpids i Tèutids (decàpodes)

Wouters i col·l. (10) observaren que la cromatina nuclear de les cèl·lules gonadals de *Sepia officinalis* contenen histones acetilades

(H3 i H4) i cinc fraccions de proteïnes (anomenades T) que posseeixen una mobilitat electroforètica intermèdia entre les histones i les protamines dels mamífers. Tals proteïnes T són formes fosforilades d'una o dues proteïnes (102). Són molt riques en arginina (50-60 %, (vegeu la taula X) i mostren una distribució asimètrica dels residus bàsics, de manera que les arginines estan acumulades en els 2/3 carboxiterminals de les molècules. En l'espermatozoide madur no hi ha ni histones ni proteïnes T, i només apareix un component (Sp en el treball original) que migra electroforèticament com les protamines dels mamífers (vegeu la fig 1). La proteïna Sp és una protamina

TAULA VIII

### Composició aminoacídica (% de mols) de les proteïnes espermàtiques PL II dels mol·luscs bivalves

aa	(a)	(b)	(c)	(d)
lys	20,0	22,9	30,8	29,3
his	0,8	1,3	3,9	0,7
arg	7,9	10,8	19,1	19,4
asp	5,3	4,8	2,9	2,4
thr	3,3	2,7	2,9	1,8
ser	12,2	11,2	10,4	21,0
glu	3,6	1,0	2,5	1,6
pro	6,7	8,4	3,4	4,3
gly	9,4	6,3	7,3	3,1
ala	13,9	15,8	6,7	11,6
cys	—	—	—	—
val	4,2	2,8	2,4	1,2
met	1,9	1,5	—	—
ile	3,0	3,0	1,5	1,0
leu	4,7	5,1	3,4	1,7
tyr	0,7	0,7	2,4	0,5
phe	1,6	1,6	0,5	0,4

(a) PLII (φ 2B) de *M. edulis*; (b) PLII (X) d'*A. ater*; (c) PLII (Hp) en *A. piscinalis*; (d) PLII (Y) de *D. trunculus*.

(vegeu la taula X) que només està constituïda per quatre tipus de residus aminoacídics diferents (serina, prolina, tirosina i arginina). L'arginina forma el 77 % de la molècula. Les reaccions immunoquímiques amb l'anticòs de la protamina T(80) revelen que aquesta proteïna comença a aparèixer en les espermatides rodones, que és abundant en les espermatides en elongació però que no es pot detectar en l'espermatozoide. El mateix treball també mostra per electroforesi que les espermatides més avançades i els espermatozoides no contenen proteïna T. Segons els autors, i principalment basant-nos aquests treballs, al llarg de l'espermioogènesi de *Sepia* es donen dues transicions de proteïnes:

histones → proteïna T → protamina Sp.  
Per la seva composició aminoacídica, sembla que la proteïna T és una molècula precursora de la protamina Sp (vegeu la taula X), de manera que aquesta última correspondria als 2/3 C-terminals de la proteïna T. Martin-Ponthieu i col·l. (62) i Schindler i col·l. (85) han combinat tècniques d'espectrometria de masses i de seqüenciació per demostrar que la protamina Sp de *Sepia* és microheterogènia, ja que està formada per dues proteïnes: Sp1 i Sp2, de 57 i 56 residus aminoacídics, respectivament (vegeu la figura 4 i la taula X). En les seves molècules, s'hi distingeixen tres dominis: els aminoterminals i carboxiterminals (aa 1 al 25 i 42 al 57/41 al 56), amb totes les tirosines i la

TAULA IX

Composició aminoacídica de les PL III i PL IV conegudes dels bivalves (% de mols)

aa	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	(j)	(k)	(l)
lys	21,7	29,1	25,4	25,1	26,6	29,2	30,0	25,2	50,2	49,5	35,0	41,0
his	0,3	—	—	1,5	—	0,9	—	0,2	0,1	—	1,5	—
arg	28,7	21,5	26,5	16,7	20,4	22,0	24,9	27,9	4,5	5,2	5,5	10,1
asp	0,4	—	0,9	1,8	—	2,8	1,9	3,5	0,5	—	2,5	—
thr	3,5	1,7	3,4	2,1	3,4	1,4	—	—	2,2	5,5	4,0	7,4
ser	16,9	14,7	15,6	15,5	18,7	20,7	29,5	28,7	9,8	8,1	11,0	4,7
glu	0,2	1,1	0,9	3,2	—	2,2	0,8	0,9	0,4	—	4,0	1,8
pro	6,3	6,8	5,1	7,3	10,1	1,6	3,6	0,6	9,6	6,0	5,2	9,8
gly	6,3	5,8	6,5	7,9	2,5	3,1	1,8	1,8	0,5	4,0	8,1	1,9
ala	13,9	18,3	12,9	14,3	16,6	11,6	7,0	9,5	20,6	21,7	17,1	21,4
cys	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
val	1,0	0,9	1,5	1,2	1,3	0,8	0,3	0,4	1,9	—	2,3	—
met	—	—	—	—	—	—	0,1	0,1	—	—	—	—
ile	0,1	—	0,4	0,8	—	1,1	0,2	0,5	0,1	—	0,8	—
leu	0,2	—	0,6	1,3	—	1,5	0,1	0,5	0,5	—	1,8	1,7
tyr	0,4	—	0,1	0,7	—	0,3	—	0,1	—	—	0,5	—
phe	0,3	—	—	0,6	—	0,5	—	0,2	—	—	0,7	—

Proteïnes específiques PL III (de (a) a (h)) de: *M. edulis* (ϕ1) (a); *M. edulis chilensis* (Mec 2) (b); *C. grayanus* (c); *M. difcilis* (d); *A. ater* (Aa5) (e); *D. trunculus* (Z) (f); *C. nuttallii* (g); *Macoma* sp. (h).

Proteïnes específiques del tipus PL IV (de (i) a (l)): *M. edulis* (ϕ 3) (i); *M. edulis chilensis* (Mec 3) (j); *M. difcilis* (k); *A. ater* (Aa6) (l).

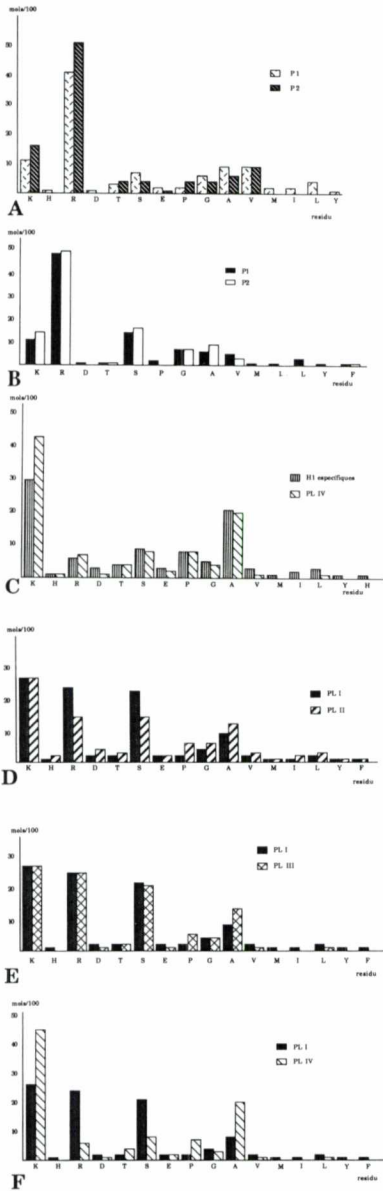


FIGURA 8. Comparació de les mitjanes composicionals de les SBP dels mol·luscs de fecundació externa; A: P1 polioplacòfors *versus* P2 polioplacòfors; B: P1 patel·logastròpodes *vs.* P2 vetigastròpodes; C: H1 específiques de bivalves *vs.* PL IV bivalves; D: PL I *vs.* PL II (bivalves); E: PL I *vs.* PL III (bivalves); F: PL I *vs.* PL IV (bivalves)

major part de residus no arginina, i el domini central (aa 27 al 41/27 al 42) que només conté una llarga seqüència d'arginines trencada per un residu serina.

El model que incorpora proteïnes de transició en lloc d'un desplaçament directe de les histones per les protamines és interpretat pels autors com una analogia respecte a les transicions de proteïnes espermiogèniques dels mamífers (14, 41, 64).

Simultàniament als treballs referits, Kadura, Khrapunov i altres autors varen estudiar els canvis de proteïnes en els nuclis espermiogènics d'una espècie de calamar: *Ilex argentinus* (54, 55, 60). Els canvis són similars als descrits en *Sepia* (encara que els autors anomenen I1 la proteïna corresponent a la T de *Sepia* i I2 la corresponent a Sp). Les histones, doncs, són reemplaçades en l'espermiogènesi d'aquest calamar per una proteïna I1 (de 9 KDa) i aquesta és substituïda per la I2 (de 7 KDa), que també presenta dues subfraccions. Les composicions aminoacídiques de les diferents proteïnes (vegeu la taula X) també suggereixen als autors que I1 no és sinó el precursor de I2. De fet, treballs no publicats encara (Colom, Sautière i Subirana, en preparació) han conduït a la seqüenciació de la proteïna T d'un altre calamar (*Loligo pealii*); aquesta seqüència indica clarament que les proteïnes T (I1) són les precursors de les protamines Sp (I2): consta de la seqüència aminoacídica de la protamina, precedida per un pèptid especial de 21 residus aminoacídics en el seu extrem N-terminal (vegeu la fig. 4 i la taula X).

Les protamines de dues altres espècies de *Loligo* ja havien estat analitzades prèviament (89) (vegeu la taula X).

S'han efectuat estudis estructurals de la cromatina espermàtica d'*Ilex argentinus* per digestions amb l'enzim nucleasa micrococcal (60), i de la nuclioprotamina d'altres tètids i



sèpids per difracció de raigs X (31, 32, 88). Els nuclis gonadals immadurs són accessibles a l'enzim i estan estructurats en nucleosomes de  $195 \pm 5$  parells de bases de DNA. Durant la maduració de la gònada del DNA esdevé progressivament més inaccessible a l'atac enzimàtic de la nucleasa. En ser aquest procés simultani a la transició histones --> I1 --> I2, possiblement aquesta transició és la responsable dels canvis estructurals evidenciats per la nucleasa (60). Els mateixos autors també mostren que la protamina I2 posseeix una gran afinitat pel DNA, i és fins i tot major que l'exhibida per la salmina, fet que pot ser atribuïble a la longitud de la molècula (69, 70).

La protamina de calamars i sèpies empaqueta d'una manera molt compacta el DNA nuclear. El complex DNA-protamina dels

sèpids i tètids estudiats és una estructura semicristal·lina en el sistema hexagonal (88). La identificació d'aquesta estructura ha estat possible gràcies a l'aplicació de tècniques de difracció de raigs X als mateixos nuclis espermàtics sense necessitat de separar i reconstituir els complexos.

En aquests dos grups de cefalòpodes, doncs, les histones són progressivament reemplaçades per un precursor de la protamina que comença a condensar el DNA i es perd l'estructura nucleosòmica. El precursor perdria el seu extrem apolar i la nuclioprotamina acabaria la seva condensació en una estructura semicristal·lina. Aquest procés i les característiques de les protamines semblen diferir clarament de les esmentades en els polioplacòfors, patel·lo-gastròpodes, vetigastropòdes i bivalves, i

TAULA X

**Composicions aminoacídiques conegudes de les protamines dels mol·luscs cefalòpòdes (% de mols)**

aa	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)
lys	5,0	—	7,6	0,6	—	1,8	11,7	18,7	13,7
his	—	—	2,3	3,2	—	1,5	3,1	1,7	—
arg	58,7	77,1	45,5	75,0	78,0	77,5	54,2	17,7	19,2
asp	2,1	—	3,8	0,8	—	0,4	1,8	4,7	4,1
thr	0,6	—	2,8	1,8	—	1,4	0,3	3,3	6,8
ser	9,6	11,5	11,4	10,0	12,1	9,6	5,6	5,9	4,1
glu	2,6	—	3,7	0,9	—	0,5	1,1	4,4	2,7
pro	1,4	2,2	1,8	1,0	2,4	2,1	—	8,3	2,7
gly	3,1	—	4,2	1,4	—	0,4	15,7	4,8	2,7
ala	3,3	—	1,1	5,1	—	0,3	1,8	3,7	5,5
cys	—	—	—	—	—	—	—	12,3	20,5
val	1,7	—	2,9	0,5	—	—	1,2	2,7	2,7
met	1,0	—	1,3	—	—	—	—	—	2,7
ile	—	—	0,8	0,2	—	0,2	0,7	3,8	4,1
leu	4,3	—	3,6	0,3	—	0,2	0,7	5,2	4,1
tyr	6,5	9,1	2,8	2,9	7,3	4,2	1,0	1,3	2,7
phe	—	—	0,4	0,2	—	—	1,0	1,5	1,4

(a) proteïna T i (b) protamina Sp de *S. officinalis*; (c) proteïna I1 i (d) protamina I2 d'*I. argentinus*; (e) protamina de *L. pealii*; (f) protamina de *L. opalescens*; (g) protamina del pop *O. vulgaris*; (h) mescla de proteïnes específiques d'*E. cirrhosa*; (i) protamina ceratinosa de la mateixa espècie.

TAULA XI

Valors de les mitjanes ( $\bar{x}$ ) (a), desviacions típiques ( $\sigma_n$ ) (b) i coeficients de variació ( $\sigma_n/\bar{x}$ ) (c) de les composicions aminoacídiques de diferents grups de SBP en els mol·luscs

aa	P1 polioplacòfors			P2 polioplacòfors			P1 patel·logastròpodes		
	$\bar{x}$	$\sigma_n$	$\sigma_n/\bar{x}$	$\bar{x}$	$\sigma_n$	$\sigma_n/\bar{x}$	$\bar{x}$	$\sigma_n$	$\sigma_n/\bar{x}$
lys	11,60	2,00	0,17	15,75	3,65	0,23	10,52	1,14	0,10
his	0,85	0,85	1,00	—	—	—	—	—	—
arg	40,50	0,40	0,01	51,55	2,75	0,05	74,57	3,12	0,06
asp	1,35	1,35	1,00	—	—	—	1,30	0,36	0,27
thr	3,00	0,90	0,30	4,00	1,70	0,42	1,67	0,75	0,45
ser	6,90	1,60	0,23	4,10	0,40	0,09	14,75	1,71	0,11
glu	1,30	0,10	0,08	0,60	0,40	0,67	0,25	0,29	1,16
pro	1,60	0,40	0,25	4,35	0,25	0,06	2,82	0,40	0,14
gly	5,45	0,45	0,08	3,70	0,60	0,16	6,40	1,37	0,21
ala	8,45	0,05	0,01	5,90	0,90	0,15	5,75	1,22	0,21
cys	—	—	—	—	—	—	—	—	—
val	9,70	2,30	0,23	9,85	1,75	0,17	5,00	1,90	0,38
met	2,20	1,00	0,45	—	—	—	0,12	0,22	1,73
ile	1,95	0,05	0,02	—	—	—	0,47	0,29	0,61
leu	3,90	1,30	0,33	—	—	—	3,12	0,47	0,15
tyr	0,90	0,90	1,00	—	—	—	0,37	0,23	0,61
phe	0,40	0,40	1,00	—	—	—	0,35	0,23	0,65

aa	P2 vetigastròpodes			H1 esp. bivalves			PL I bivalves		
	$\bar{x}$	$\sigma_n$	$\sigma_n/\bar{x}$	$\bar{x}$	$\sigma_n$	$\sigma_n/\bar{x}$	$\bar{x}$	$\sigma_n$	$\sigma_n/\bar{x}$
lys	14,11	8,70	0,62	30,26	3,48	0,11	26,16	4,20	0,16
his	0,11	0,31	2,86	0,96	0,16	0,17	1,14	0,60	0,52
arg	47,67	7,04	0,15	5,74	3,61	0,63	23,87	2,88	0,12
asp	0,11	0,31	2,86	2,088	0,85	0,30	1,62	0,89	0,55
thr	1,22	1,13	0,93	4,20	0,99	0,24	2,22	1,14	0,51
ser	16,67	1,70	0,10	9,02	3,23	0,36	21,56	2,00	0,09
glu	0,11	0,31	2,86	2,82	1,33	0,47	1,74	1,26	0,72
pro	0,22	0,41	1,87	7,74	0,64	0,08	1,92	0,63	0,33
gly	6,67	2,21	0,33	5,04	0,92	0,18	4,27	1,13	0,26
ala	9,00	1,70	0,19	20,78	2,08	0,10	8,86	3,11	0,35
cys	—	—	—	—	—	—	—	—	—
val	3,60	1,83	0,51	3,38	1,37	0,41	1,98	0,45	0,23
met	—	—	—	0,40	0,50	1,26	0,60	0,61	1,01
ile	0,11	0,31	2,86	1,78	0,31	0,17	1,04	0,48	0,46
leu	0,11	0,31	2,86	3,28	0,77	0,24	1,94	0,69	0,36
tyr	0,33	0,67	2,02	0,86	0,58	0,67	0,63	0,47	0,75
phe	—	—	—	0,84	0,53	0,63	0,59	0,40	0,67

TAULA XI (Continuació)

aa	PL II bivalves			PL III bivalves			PL IV bivalves		
	$\bar{x}$	$\sigma_n$	$\sigma_n/\bar{x}$	$\bar{x}$	$\sigma_n$	$\sigma_n/\bar{x}$	$\bar{x}$	$\sigma_n$	$\sigma_n/\bar{x}$
lys	25,75	4,45	0,17	26,54	2,6	0,10	43,29	6,29	0,14
his	1,67	1,30	0,78	0,36	0,52	1,44	0,40	0,64	1,59
arg	14,30	5,05	0,35	23,57	3,86	0,16	6,32	2,21	0,35
asp	3,85	1,22	0,32	1,41	1,22	0,87	0,75	1,03	1,37
thr	2,67	0,55	0,20	1,94	1,35	0,70	4,77	1,91	0,40
ser	13,70	4,26	0,3	20,04	5,54	0,28	8,40	2,37	0,28
glu	2,17	0,98	0,45	1,16	0,99	0,85	1,55	1,56	1,01
pro	5,70	1,97	0,35	5,16	2,91	0,56	7,65	2,07	0,27
ala	12,00	3,40	0,28	13,05	3,44	0,26	20,20	1,83	0,09
cys	—	—	—	—	—	—	—	—	—
val	2,65	1,07	0,40	0,92	0,39	0,43	1,05	1,06	1,01
met	0,85	0,86	1,01	—	—	—	—	—	—
ile	2,12	0,89	0,42	0,39	0,37	0,95	0,22	0,33	1,50
leu	3,72	1,33	0,36	0,52	0,55	1,05	1,00	0,57	0,77
tyr	1,07	0,77	0,72	0,20	0,23	1,17	0,12	0,22	1,80
phe	1,02	0,58	0,56	0,20	0,23	1,14	0,17	0,30	1,78

sembla presentar alguns punts de semblança amb els cenogastròpodes, com són la presència de precursors i la simplicitat composicional de les formes finals de les protamines.

### Octòpodes

Només es coneixen les SBP de dues espècies d'octòpodes: *Octopus vulgaris* i *Eledone cirrhosa* (89). *Octopus* conté una protamina majoritària de mobilitat electrofòretica similar a la dels altres dos grups de cefalòpodes (sèpids i tètids) (a la fig. 1 l'anomenem P), però la seva riquesa en arginina, glicina i lisina (vegeu la taula X) l'aproxima més composicionalment a les protamines dels cenogastròpodes que a les dels altres cefalòpodes. No s'ha estudiat si durant l'espermioèlisi es donen transicions de proteïnes com les descrites anteriorment. Pel que fa al cas d'*Eledone*, les proteïnes han de ser reduïdes abans de poder ser extretes amb

àcids de la cromatina nuclear espermàtica. La composició aminoàcida de la mescla de SBP d'*Eledone* és rica en prolina, cisteïna i histidina (vegeu la taula X). Evidentment són proteïnes molt diferents a les dels altres cefalòpodes, incloses les d'*Octopus*. La seqüència dels 29 primers aminoàcids de l'extrem amino (Subirana, Sautière, Colom, no publicat) (vegeu la fig. 4) dona suport a aquest punt de vista.

La interpretació morfològica de l'evolució de l'espermioèlisi i de la fecundació pot presentar un gran interès per a situar els canvis de les SBP d'aquests animals. Els cefalòpodes sèpids i tètids (*Loligo*, *Sepia*) presenten un espermatozoide modificat en el que el nucli s'ha allargat però no ha arribat a espiralitzar-se. Alguns octòpodes (*Octopus*) presenten aquest mateix tipus d'espermatozoide (amb certes variacions que no afecten la morfologia nuclear), però altres octòpodes, com *Eledone*, han sofert una complicació extraordinària en

els seus processos relacionats amb la biologia de la reproducció, i paral·lelament el nucli del seu espermatozoide s'ha espiralitzat. Segons alguns autors l'espermatozoide d'*Eledone* ha evolucionat a partir del tipus d'espermatozoide d'*Octopus* (es pot parlar d'una recapitulació morfològica de l'espermioogènesi d'*Octopus* en l'espermatozoide d'*Eledone*). L'increment de la complexitat espermàtica d'*Eledone* està correlacionat també amb la complexitat de les estructures de l'òdit. Aquests temes foren revisats per Franzén (34).

## ASPECTES EVOLUTIUS DE LES MOLÈCULES I DE LA SEVA FUNCIO

### Proteïnes

En atenció a les característiques composicionals podem agrupar les SBP dels mol·luscs en els grups següents:

- a) Protamines P1 dels polioplacòfors  
Protamines P1 dels patel·logastròpodes
- b) Protamines P2 dels polioplacòfors  
Protamines P2 dels vetigastròpodes
- c) Protamines P3 dels cenogastròpodes
- d) Proteïnes H1 específiques dels bivalves
- e) Proteïnes PL I i PL II dels bivalves
- f) Proteïnes PL III dels bivalves
- g) Proteïnes PL IV dels bivalves
- h) Protamines dels sèpids, tètids i *Octopus*  
(cefalòpodes en general)
- i) Proteïnes específiques particulars  
(*Eledone*, *Aplysia*)

En la taula XI hem recollit les mitjanes ( $\bar{x}$ ), desviacions típiques ( $\sigma_n$ ) i coeficients de variació ( $\sigma_n/\bar{x}$ ) de les composicions aminoacídiques de les proteïnes agrupades. A causa dels

petits valors dels coeficients de variació, la composició mitjana d'un grup de proteïnes pot ser considerada com a representativa de cadascuna d'elles, pràcticament sense excepció. En la figura 8 es comparen les mitjanes composicionals en els grups de fertilització externa.

La consideració de la informació estructural coneguda permet establir semblances interessants entre alguns dels grups anteriors de proteïnes:

- Les protamines P1 posseeixen una zona globular hidrofòbica no digerible per la tripsina, flanquejada per un o dos extrems molt bàsics fàcilment atacables per aquest enzim. Aquesta característica, i també la mida de les molècules no és exclusiva de les P1 de polioplacòfors i patel·logastròpodes, sinó que és també compartida per les PL I i PL II dels bivalves.
- Les protamines P2 dels polioplacòfors i vetigastròpodes són fàcilment digeribles per la tripsina i no s'ha trobat cap indicatiu que reveli una estructura estable de les molècules. Tal característica i la mida molecular són compartides per les PL III dels bivalves.

Donat el paral·lisme en mida i estructura i per tal de simplificar el text, anomenem P1s el grup de proteïnes format per les P1 de polioplacòfors i patel·logastròpodes, i les PL I i PL II de bivalves. Per les mateixes raons anomenem P2s les P2 de polioplacòfors i vetigastròpodes, i PL II de bivalves.

Un fet notable que evidencia la figura 8 rau en la gran semblança composicional entre les P2s i P1s de cada grup: P2-P1 en polioplacòfors; P2 en vetigastròpodes-P1 en patel·logastròpodes; PL III-PL I i II en bivalves. L'única diferència significativa entre les P2s i P1s es troba en l'absència sistemàtica (o menor quantitat) d'aminoàcids hidrofòbics (metionina,



FIGURA 9. Evolució de les SBP dels mol·luscs bivalves. Adaptat de l'original de Subirana i Colom (91).

isoleucina, leucina, fenilalanina i valina) en les primeres. Aquesta absència pot estar relacionada amb la manca del pèptid resistent a la tripsinització, ja que en tots els casos estudiats, la composició dels pèptid és molt més rica en aquests residus.

Curiosament, les mateixes relacions exposades entre les P1s i les P2s poden ser observades entre les histones H1 específiques i les PL IV dels bivalves (vegeu la fig. 8).

Hem de ressaltar que totes aquestes proteïnes pertanyen a espècies de fertilització externa.

El possible origen de les SBP dels bivalves a partir de la histona H1 ha estat considerat repetidament: Subirana i col·l. (89) apunten la possibilitat que en els mol·luscs les SBP hagin aparegut a partir d'un fragment bàsic d'una histona, i posteriorment (91) proposen una via evolutiva per a les protamines d'aquests mol·luscs (vegeu la fig. 9). La semblança estructural amb la histona H1 també ha suggerit

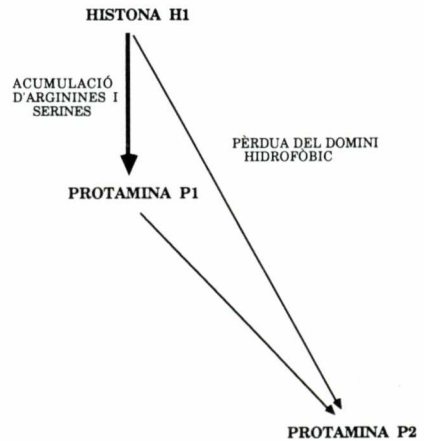


FIGURA 10. Esquema de l'evolució de les protamines de polioplacòfors i vetigatròpodes (25).

a altres autors una possible relació evolutiva entre aquesta histona i les PL I (81). Concretament, Ausió (11) assigna alguns components PL I (*Macoma nasuta*, *Spisula solidissima*) a la família de les histones H1; es basa en l'estudi de l'estructura secundària d'aquestes molècules (principalment del pèptid resistent a la tripsinització). Aquest autor no afirma que el pèptid sigui homòleg al corresponent en la histona H1, però evidencia una analogia estructural molt clara (9).

Les hipòtesis sobre l'evolució de les SBP en polioplacòfors i alguns gastròpodes també es basen en l'origen a partir de la histona H1 o una forma similar de proteïna. Chiva i col·l. (25) suggeriren que les protamines P1 de quitons i pegellides provenen d'una forma de la histona H1 per acumulació de residus d'arginina, i que l'aparició de les protamines P2 en quitons i vetigatròpodes pot ser deguda a la pèrdua de

la part del gen corresponent al domini globular (vegeu la fig. 10). Aquest cas pot haver-se produït repetidament d'una manera independent en diferents grups de mol·luscs. En l'evolució de proteïnes, els canvis deguts a l'adquisició o pèrdua d'un domini estructural per part del genoma ha estat descrit en diversos casos. Les regions codificants en el DNA dels dominis estructurals de les proteïnes poden estar flanquejades per introns, de manera que s'afavoreixi la pèrdua o adquisició del domini complet (30).

El grup de mol·luscs que analitzem a continuació (cenogastròpodes, cefalòpodes) han modificat el tipus de reproducció, i les seves SBP no poden ser aparentment identificades amb les anteriors. Per la seva composició, mida i síntesi en forma de precursors, les protamines P3 dels cenogastròpodes són molt diferents de les dels mol·luscs de fertilització externa. Chiva i col·l. (25) proposen que quan un grup de mol·luscs ha adquirit la fecundació interna, simultàniament als canvis a diferents nivells (compactació de la cromatina, tipus de gàmeta, aparició de cèl·lules de suport...) es dona una substitució radical en el tipus "primitiu" de protamina (P1s i P2s), essent expressada una molècula molt més especialitzada que l'anterior. Les sèpies, calamars i pops (concretament *Octopus*) també presenten protamines molt especialitzades, ja que només quatre residus aminoacídics diferents poden constituir tota la molècula. Tals protamines són també sintetitzades en forma de precursors. En aquests aspectes s'observa un paral·lelisme entre els cenogastròpodes i els cefalòpodes.

Un dels casos especials és l'octòpode *Eledone cirrhosa* (*Aplysia* en pot ser un altre), que presenta SBP diferents a les altres.

En arribar a aquest punt és interessant reconsiderar les idees sobre l'evolució de

l'espermatozoide (76) i aplicar-les a les SBP en els mol·luscs. La filogènia pot anar canviant molt lentament les protamines, mantenint-les dintre d'uns límits composicionals/estructurals; la protamina primitiva dels mol·luscs pot provenir d'una histona (H1?) que hagi sofert una basificació (addició d'arginines), i en alguns casos una pèrdua del domini hidrofòbic central. Aquests processos haurien donat grups estables (així, les P2 dels vetigastròpodes són molt similars entre elles, les PL I i PL II dels bivalves també, etc.). Per un altre cantó, quan hi ha hagut canvis en la biologia de la reproducció, les protamines expressades han variat molt, i poden no ser homòlogues a les anteriors; aquest podria ser el cas dels cenogastròpodes i cefalòpodes, en particular *Eledone*. Així, podríem distingir una tendència general en els canvis a la qual superposar variacions molt ràpides, relacionades amb els canvis reproductius. La correlació entre el tipus de SBP i la biologia de la reproducció ha estat discutida extensament per Kasinsky i col·l. (57, 58).

## Condensació de la cromatina

La composició i estructura de les proteïnes és la base de la seva funció, i tots els canvis evolutius que adoptin les proteïnes haurien de respectar-la. La funció de les SBP és empaquetar el DNA per reduir el volum del nucli de l'espermatozoide, però la diversitat de les SBP planteja el problema d'aclarir com és efectuada aquesta funció de manera eficaç per totes elles (94). Aquest treball citat i dos més (92, 93) contenen una anàlisi implícita dels possibles canvis permissibles de les SBP dels mol·luscs en relació amb la seva funció concreta de compactació de la cromatina espermàtica. Segons l'autor, els empaquetaments més eficients de la cromatina es podrien donar de

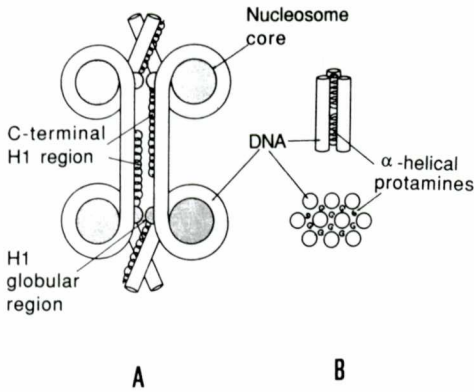


FIGURA 11. Interacció de les regions helicoïdals de les protamines amb el DNA; A: segment C-terminal de la histona H1; B: complexos de nucleoprotamina. De Subirana (94) (amb permís).

dues maneres: incrementant la interacció de la histona H1 amb el DNA, per produir complexos quasi-cristal·lins protamina-DNA. En primer lloc, l'increment de la interacció H1-DNA s'efectuaria a través de les zones N- i C-terminals amb el DNA internucleosòmic. Aquestes zones acostumen a ser majors en les H1 espermàtiques (o proteïnes derivades, com podria ser el cas de les P1, PL I i PL II descrites), amb una distribució de càrrega uniforme, i estructurades parcialment en hèlix  $\alpha$ , com s'ha demostrat en els equinoderms (50). Aquest tipus d'interacció és compatible amb la conservació de l'estructura nucleosòmica. En segon lloc, la interacció de les protamines amb el DNA també conduiria la protamina a adoptar una estructura en hèlix  $\alpha$ ; els nucleosomes estarien absents, i l'efecte que faria la protamina equivaldria al dels extrems N- i C-terminals de les H1. En ambdós casos, la molècula de proteïna interaccionaria amb diverses molècules de DNA veïnes. La figura 11 representa el model proposat per Subirana (94).

Aquestes consideracions abonen el punt de vista que les SBP dels mol·luscs puguin derivar de la histona H1 (P1, PL I, PL II), d'un dels seus fragments terminals (P2, PL III, PL IV), o bé posseir la potencialitat de mimetitzar la interacció d'aquests fragments amb el DNA (cas de les protamines P3 dels cenogastròpodes i dels cefalòpodes).

Tot i això, aquest model ha de ser contrastat amb d'altres proposats anteriorment (78, 88), i també considerat conjuntament amb la varietat de tipus de condensacions que es donen durant l'espermioïgenesis dels mol·luscs.

## Agraïments

Manifestem el nostre sincer agraïment i consideració a: J. A. Subirana, Ll. Cornudella, J. Colom, H. E. Kasinsky, M. Durfort, P. Sautière i J. Ausió. Aquest treball ha estat subvencionat per una borsa de viatge i un ajut a joves investigadors, concedit per la CIRIT.

## BIBLIOGRAFIA

1. ALLAN, J., P. G. HARTMAN, C. CRANE-ROBINSON i F. X. AVILÉS. (1980) The structure of histones H1 and its location in chromatin. *Nature*, **288**: 675-679.
2. AMOR, M. J. i M. DURFORT. (1990) Changes in nuclear structure during eupyrene spermatogenesis in *Murex brandaris*. *Molec. Reprod. Develop.* **25**: 348-356.
3. AUSIÓ, J. i J. A. SUBIRANA. (1982) Conformational study and determination of the molecular weight of highly charged basic proteins by sedimentation equilibrium and gel electrophoresis. *Biochemistry*, **21**: 5910-5918.
4. AUSIÓ, J. i J. A. SUBIRANA. (1982) Nuclear proteins and the organization of chromatin in spermatozoa of *Mytilus edulis*. *Exp. Cell. Res.* **141**: 39-45.
5. AUSIÓ, J. i J. A. SUBIRANA. (1982) A high molecular weight nuclear basic protein from the bivalve mollusc *Spisula solidissima*. *J. Biol. Chem.* **257**: 2802-2805.
6. AUSIÓ, J. i P. SAU. (1983) Structural heterogeneity of reconstituted complexes of DNA with typical and intermediate protamines. *Biophys. Chem.* **18**: 257-267.

7. AUSIÓ, J. (1986) Structural variability and compositional homology of the protamine-like components of the sperm from the bivalve molluscs. **Comp. Biochem. Physiol.** 85B: 439-449.
8. 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.
9. AUSIÓ, J., A. TOUMADJE, 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.
10. AUSIÓ, J. i K. E. van HOLDE. (1988) The histones of sperm from *Spisula solidissima* include a novel cysteine-containing H1-histone. **Cell. Diff.** 23: 175-190.
11. AUSIÓ, J. (1989) Presència d'una proteïna altament específica del tipus histona H1 en la cromatina espermàtica dels mol·luscs bivalves. **Biol. Reprod. I.** Soc. Cat. Biol. pp. 52-67.
12. AUSIÓ, J. i R. McPARLAND. (1989) Sequence and characterization of the sperm-specific protein  $\Phi_3$  from *Mytilus californicus*. **Eur. J. Biochem.** 338: 1-8.
13. BACCETTI, B. (1970) The spermatozoon of arthropoda. IX The sperm cell as an index of arthropod phylogenesis. En: **Comparative Spermatology**, B. Baccetti ed. Adademia Nazionale dei Lincei. Roma. pp. 169-181.
14. BALHORN, R., B. L. GLEDHILL i A. J. WYROBEK. (1977) Mouse sperm chromatin proteins: quantitative isolation and partial characterization. **Biochemistry.** 16: 4074-4080.
15. BALHORN, R., S. LAKE i B. L. GLEDHILL. (1979) Electrophoretic analysis of nuclear proteins isolated from the sperm of the black abalone *Haliotis crackeroidii*. **Exp. Cell. Res.** 123: 414-417.
16. BALHORN, R., S. WESTON, C. TOMAS i A. J. WYROBEK. (1984) DNA packaging in mouse spermatids. Synthesis of protamine variants and four transition proteins. **Exp. Cell. Res.** 150: 298-308.
17. BALHORN, R. (1989) Mammalian protamines: structures and molecular interactions. En: **Molecular Biology and Chromosome Function**. K. W. Adolph, ed. pp. 365-395.
18. BLOCH, D. P. (1969) A catalog of sperm histones. **Genetics (Suppl.)** 61: 93-111.
19. BLOCH, D. P. (1976) Histones of sperm. En: **Handbook of Genetics**. Vol.5. R.C. King, ed. Plenum Press. N.Y. pp. 139-167.
20. BLOCH, D. P. i H. Y. C. HEW. (1960) Changes in nuclear histones during fertilization and early embryonic development in the pulmonate snail *Helix aspersa*. **J. Biophys. Biochem. Cytol.** 8: 69-77.
21. COLOM, J. i J. A. SUBIRANA (1979) Protamines and related proteins from spermatozoa of molluscs. Characterization and molecular weight determination by gelelectrophoresis. **Biochim. Biophys. Acta** 581: 217-227.
22. CHAPMAN, G. E., P. G. HARTMAN i E. M. BRADBURY. (1976) Studies on the role and mode of operation of the very lysine-rich histone H1 in eukaryotic chromatin. **Eur. J. Biochem.** 61: 69-75.
23. CHEVAILLIER, P. (1983) Some aspects of chromatin organization in sperm nuclei. En: **The Sperm Cell**. J. André, ed. Martinus Nijhoff, The Hague. pp. 179-196.
24. CHIVA, M., J. AUSIÓ, M. DABAN, J. COLOM i J. A. SUBIRANA. (1989) Proteïnes bàsiques dels espermatozoides dels mol·luscs. Composició, característiques i relacions. **Biol. Molec.** 6, Soc. Cat. Biol. pp. 39-49
25. CHIVA, M., M. DABAN, E. ROSENBERG i H. E. KASINSKY. (1991) Protamines in Polyplacophora and Gastropods as a model for evolutionary changes in Molluscan sperm basic proteins. En: **Comparative Spermatology**. J. B. Baccetti, ed., Academic Press N.Y. (en premsa)
26. DABAN, M., E. MORRICONI, H. E. KASINSKY i M. CHIVA. (1990) Characterization of the nuclear sperm basic proteins in one Archaeogastropod: Comparison of protamines between species. **Comp. Biochem. Physiol.** 96B: 123-127.
27. DABAN, M., H. E. KASINSKY, F. LAFARGUE i M. CHIVA. (1991) Nuclear sperm basic proteins (protamines) in chitons (Polyplacophora). Compositional and structural analogies with protamines of other molluscs. **Comp. Biochem. Physiol.** 96B: 437-443.
28. DABAN, M., M. CHIVA, E. ROSENBERG, H. E. KASINSKY i J. A. SUBIRANA. (1991) Protamines in Prosobranchian Gastropods (Mollusca) vary with different modes of reproduction. **J. Exp. Zool.** 257: 265-283.
29. DABAN, M. (1991) Caracterització de les proteïnes bàsiques de nuclis d'espermatozoides en gastròpodes i poliplacefòfors. Implicacions evolutives. Tesi Doctoral. Univ. Politècnica de Catalunya.
30. DOOLITTLE, R. F., D. F. FENG, M. S. JOHNSON i M. A. McCLURE. (1986) Relationships of human protein sequences to those of other organisms. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.** LI: 447-455.
31. FEUGHELMAN, M., R. LANDGRIDGE, W. E. SEEDS, A. R. STOKES, H. R. WILSON, C. V. HOOPER, M. H. F. WILKINS, L. K. BARCLARY i L. D. HAMILTON. (1955) Molecular structure of deoxyribose nucleic acid and nucleoprotein. **Nature** 175: 834-838.
32. FITA, I., L. CAMPOS, L. C. PUIGJANER i J. A. SUBIRANA. (1983) X-Ray diffraction study of DNA complexes with arginine peptides and their relation to nucleoprotamine structure. **J. Mol. Biol.** 167: 157-177.
33. FRANZÉN, Å. (1956) On spermiogenesis, morphology of the spermatozoon and biology of fertilization among invertebrates. **Zool. Bidr. Uppsala.** 31: 335-482.
34. FRANZÉN, Å. (1966) Spermiogenesis and spermatozoa of the cephalopoda. **Arkiv. Zool.** 19: 323-327.
35. FRANZÉN, Å. (1970) Phylogenetic aspects of the morphology of spermatozoa and spermiogenesis. En: **Comparative Spermatology**. J. B. Baccetti, ed. Academic Press. NY. pp. 29-46.
36. FRANZÉN, Å. (1977) Sperm structure with regard to fertilization biology and phylogenetics. **Vehr. Dtsch. Zool. Ges.** 123-128.



37. FRANZÉN, Å. (1987) Spermatogenesis. En: **Reproduction of marine invertebrate**. 19. General Aspects: Seeking Unity in Diversity. A.C. Giese, J. A. Pearse and V. B. Pearse, eds. Blackwell, Palo Alto, California.
38. GALLARDO, C. S. i O. GARRIDO. (1989) Spermiogenesis and sperm morphology in the marine gastropod *Nucella crassilabrum* with account of morphometric patterns of spermatozoa variation in the family Muricidae. **Invert. Reprod. Develop.** 15: 163-170.
39. GIANCOTTI, V., E. RUSSO, M. GASPARINI, D. SERRANO, D. DEL PIERO, A. W. THORNE, P. D. CARY i C. CRANE-ROBINSON. (1983) Proteins from the sperm of the bivalve mollusc *Ensis minor*. Co-existence of histones and a protamine-like protein. **Eur. J. Biochem.** 136: 509-516.
40. GIUSTI, F. i M. G. SELMI. (1982) The atypical sperm in the prosobranch molluscs. **Malacologia**. 22: 171-181.
41. GRIMES, S. R., M. L. MEISTRICH, R. D. PLATZ i L. S. HNILICA. (1977) Nuclear protein transitions in rat testis spermatids. **Expl. Cell Res.** 110: 31-39.
42. HEALY, J. M. i B. G. M. JAMIESON. (1981) An structural examination of developing and mature spermatozoa in *Pyrazus ebeninus* (Mollusca, Gastropoda, Potamididae). **Zoomorphology**. 98: 101-119.
43. HEALY, J. M. (1983) Ultrastructures of euspermatozoa of cerithiacean gastropods (Prosobranchia: Mesogastropoda). **J. Morphol.** 178: 57-75.
44. HEALY, J. M. (1983) An ultrastructural study of bassomatophoran spermatozoa (Mollusca, Gastropoda). **Zool. Scripta**. 12: 57-66.
45. HEALY, J. M. (1984) The structure of gastropod spermatozoa and spermiogenesis. Tesi Doctoral, Univ. de Queensland, Austràlia.
46. HEALY, J. M. i R. C. WILLIAM. (1984) Ultrastructure and phylogenetic significance of notaspidean spermatozoa (Mollusca, Gastropoda, Opisthobranchia). **Zool. Scripta**. 13: 107-120.
47. HEALY, J. M. (1987) Spermatozoon ultrastructure and its bearing on gastropod classification and evolution. **Aust. Zool.** 24: 108-113.
48. HECHT, N. B. (1989) Molecular biology of structural chromosomal proteins of the mammalian testis. En: **Molecular Biology and Chromosome Function**. K.W. Adolph, ed. pp. 396-420.
49. HECHT, N. B. (1989) Mammalian protamines and their expression. En: **Histones and other basic nuclear proteins**. L. Hnilica, G. Stein and J. Stein, eds. CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp. 347-374.
50. HILL, C. S., S. R. MARTIN i J. O. THOMAS. (1989) A stable alpha-helical element in the carboxi-terminal domain of free and chromatin-bound histone H1 from sea urchin sperm. **EMBO J.** 8: 2591-2599.
51. HODGSON, A. N. i R. T. F. BERNARD. (1988) A comparison of the structure of the spermatozoa and spermatogenesis of 16 species of patellid limpets (Mollusca: Gastropoda: Archaeogastropoda). **J. Morphol.** 195: 205-223.
52. HODGSON, A. N., J. M. BAXTER, M. G. STURROCK i R. T. F. BERNARD. (1988) Comparative spermatology of 11 species of Polyplacophora (Mollusca) from the suborders Lepidopleurina, Chitonina and Acanthochitonina. **Proc. R. Soc. Lond.** B235: 161-177.
53. HODGSON, A. N., J. HELLER i R. T. F. BERNARD. (1990) Ultrastructure of the sperm and spermatogenesis in five south african species of the trochid genus *Oxistele* (Mollusca: Prosobranchia). **Molec. Reprod. Develop.** 25: 263-271.
54. KADURA, S.N., S. N. KHRAPUNOV, S. Y. MOROZOV i G. D. BERDYSEV. (1986) Replacement of histones by sperm-specific proteins (gametons) at different stages of squid spermatogenesis. **Biokhimiya** (trad. anglesa) 51: 737-745.
55. KADURA, S. N. i S. N. KHRAPUNOV. (1988) Displacement of histones by sperm-specific proteins at different stages of spermatogenesis of squid. **Eur. J. Biochem.** 175: 603-607.
56. KASINSKY, H. E., S. Y. HUANG, S. KWAWUK, M. MANN, M. A. J. SWEENEY i B. YEE. (1978) On the diversity of sperm histones in the vertebrates. III Electrophoretic variability of testis-specific histone patterns in Anura contrasts with relative constance in Squamata. **J. Exp. Zool.** 203: 109-126.
57. KASINSKY, H. E., M. MANN, M. LEMKE i S. Y. HUANG. (1985) 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. NY. pp. 337-359.
58. KASINSKY, H. E. (1989) Specificity and distribution of sperm basic proteins. En: **Histones and Other Basic Nuclear Proteins**. L.S. Hnilica, G. Stein and J. Stein, eds., CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp. 73-163.
59. KISTLER, W. S. (1989) Structures of testis-specific histones, spermatid transition proteins and their genes in mammals. En: **Histones and Other Nuclear Basic Proteins**. L.S. Hnilica, G. Stein and J. Stein, eds. CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp. 331-346.
60. KHRAPUNOV, S. N., S. N. KADURA i A. J. DRAGAN. (1988) Rearrangement of chromatin structure during spermatogenesis of squid. **Eur. J. Biochem.** 175: 609-613.
61. LIBERTINI, L. J., J. AUSIÓ, H. E. van HOLDE i E. W. SMALL. (1988) Highly cooperative binding by a histone-like, sperm-specific protein from *Spisula solidissima*. **Biopolymers**. 27: 1459-1477.
62. MARTIN-PONTHIEU, A., D. WOUTERS-TYROU, D. BÉLAÏCHE, P. SAUTIÈRE i A. C. van DOORSSELAER. (1991) Cuttlefish sperm protamines: amino acidic sequences of two distinct variants. **Eur. J. Biochem.** 195: 611-619.
63. MAXWELL, W. (1983) Mollusca. En: **Reproductive Biology of Invertebrates**. 2. K.G. Adiyodi and R.G. Adiyodi, eds., J. Willey and sons. NY. pp. 275-319.
64. MEISTRICH, M. L., W. A. BROCK, S. R. GRIMES, R. D. PLATZ i L. S. HNILICA. (1978) Nuclear transitions during spermatogenesis. **Fed. Proc.** 37: 2522-2525.

65. MEISTRICH, M. L. (1989) Histone and nuclear protein transitions in mammalian spermatogenesis. En: **Histones and Other Nuclear Basic Proteins**. L.S. Hnilica, G. Stein and J. Stein, eds., CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp. 165-182.
66. MEZQUITA, C. (1985) Chromatin composition, structure and function in spermatogenesis. **Rev. Biol. Cell.** (Univ. Pais Vasco). 5.
67. NISHIWAKI, S. (1964) Phylogenetical study on the dimorphic spermatozoa in Prosobranchia. **Sci. Rev. Tokyo Vyocho Daig.** 11B: 237-275.
68. 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.
69. OLIVA, R. i C. MEZQUITA. (1986) Marked differences in the ability of distinct protamines to disassemble nucleosomal particles *in vitro*. **Biochemistry**. 25: 6508-6511.
70. OLIVA, R. i G. M. DIXON (1991) Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. En: **Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology**. 40: 25-94.
71. OLIVARES C. (1986) Interacción proteína-DNA en cromatina de invertebrados marinos. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona.
72. OLIVARES, C., S. RUIZ i L. CORNUDELLA. (1986) Characterization of histone and protamine variants in sperm of the bivalve mollusc *Aulacomys ater*. **FEBS Lett.** 205: 195-199.
73. OLIVARES, C., H. GANZ i D. INOSTROZA. (1986) A comparative study of the basic nuclear proteins from sperm of bivalve molluscs. **Comp. Biochem. Physiol.** 83B: 185-189.
74. PARIVAR, K. (1981) Spermatogenesis and sperm dimorphism in land slug *Arion ater* (Pulmonata, Mollusca). **Z. Mikrosk. Anat. Forsch. Leipzig** 95: 81-92.
75. PHELAN, J. J., J. COLOM, C. COZCOLLUELA, J. A. SUBIRANA i R. D. COLE. (1974) A lysine-rich protein from spermatozoa of the mollusc *Mytilus edulis*. **J. Biol. Chem.** 249: 1099-1102.
76. POPHAM, J. D. (1979) Comparative spermatozoon morphology and bivalve phylogeny. **Malacol. Rev.** 12: 1-20.
77. POCCIA, D. (1986) Remodelling of nucleoproteins during gametogenesis fertilization and early development. **Int. Rev. Cytol.** 105: 1-65.
78. PUIGJANER, L. C., I. FITA, S. ARNOTT, R. CHANDRASEKARAN i J. A. SUBIRANA. (1986) Modelling and refinement of the crystal structure of nucleoprotamine from *Gibbula divaricata*. **J. Biomol. Str Dyn.** 3: 1067-1078.
79. ROGINSKAYA, I. S. (1963) Dimorphism of spermatozoa in some species of molluscs of the genus *Coryphella gray* (Gastropoda, Nudibranchia). **Zoology** (trad. anglesa de Doklady Akademii Nauk USSR) 152: 1256-1259.
80. ROUSSEAU-PRÉVOST, R., R. ENGELHARDT, J. ROUSSEAU, D. WOUTERS-TYROU i P. SAUTIÈRE. (1988) Nuclear protein transitions in cuttlefish spermiogenesis: immunocytochemical localization of a protein specific for the spermatid stage. **Gamete Res.** 19: 277-290.
81. ROISOV, S. M., V. A. BERDIKOV, F. L. GOREL', M. V. LAURENTEVA i L. P. SOLONENKO. (1985) Structure of lysine-rich histone from sperm of *Anodonta piscinalis*. **Molekul. Biol.** (trad. anglesa). 18: 1497-1508.
82. RUSSELL-PINTO, F., C. AZEVEDO i E. OLIVEIRA. (1984) Comparative structural studies of spermiogenesis and spermatozoa in some species of polyplacophora (Mollusca). **Int. J. Invert. Reprod. Develop.** 7: 263-277.
83. SANCHEZ-ROMERO, L. D., M. DABAN i M. CHIVA. (1990) Estudio comparativo de las proteínas básicas espermáticas de *Thais stramonita chocolata* i *Murex brandaris* (O. Neogasterópodos). **Biol. Molec.** 7: Soc. Cat. Biol. pp. 20.
84. SAUTIÈRE, P. i D. WOUTERS-TYROU. (1986) Evolution of nuclear basic proteins in invertebrates. **Adv. in Inv. Repr.** 4, M. Porchet, J. C. Andries i A. Dhainaut eds., Elsevier Science Publishers B. V.
85. SCHINDLER, P., F. BITSCH, K. KLARSKOV, P. ROEPSTORFF, G. BRIAND, D. WOUTERS-TYROU, P. SAUTIÈRE i C. van DORSSELAER. (1991) Cuttlefish sperm proteins. Mass spectrometry of protamines and related peptides. **Eur. J. Biochem.** 195: 621-629.
86. SELLOS, D. (1981) Les protéines basiques nucleaires histones dans les spermatozoides d'invertebrés marines. **Oceanis.** 7: 727-738.
87. SELLOS, D. (1985) The histones isolated from the sperm of the oyster *Crassostrea gigas*. **Cell. Dif.** 17: 183-192.
88. SUAUP, P. i J. A. SUBIRANA. (1977) X-ray diffraction studies of nucleoprotamine structure. **J. Mol. Biol.** 117: 909-926.
89. 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.
90. SUBIRANA, J. A. (1983) Nuclear proteins in spermatozoa and their interaction with DNA. En: **The Sperm Cell**. J. André ed., Martinus Nijhoff, The Hague. pp. 197-213.
91. SUBIRANA, J. A. i J. COLOM. (1987) Comparison of protamines from freshwater and marine bivalve molluscs: evolutionary implications. **FEBS Lett.** 220: 193-196.
92. SUBIRANA, J. A. (1990) Analysis of the charge distribution in the C-terminal region of histone H1 as related to its interactions with DNA. **Biopolymers.** 29: 1351-1357.
93. SUBIRANA, J. A. (1990) Proteins as counterions of DNA: a new model of nucleoprotamine structure. En: **Advances in Life Sciences**. D. Vasilescu ed., Birkhauser Verlag, Basel. pp. 63-70.
94. SUBIRANA, J. A. (1991) Protein-DNA interactions in spermatozoa. En: **Comparative Spermatology**. 4, B. Baccetti ed., (en premsa).

95. YAKAICHI, S. (1978) Spermiogenesis in the pulmonate snail *Euhadra hickonis* II. Structural changes of the nucleus. **Develop. Growth Differ.** 20: 301-315.
96. TURNER, R. P. (1966) A survey and illustrated catalog of the Terebridae. En: **Museum Comparative Zoology**, Harvard University, Cambridge.
97. USCHEWA, A., C. PATRIOTIS i Z. AVRAMOVA. (1985) An H1-like protein from the sperm chromatin of *Mytilus galloprovincialis*. **Cell. Biol. Int. Rep.** 9: 253-263.
98. van HELDEN, P. D., V. N. STRICKLAND, W. F. BRANDT i C. von HOLT. (1979). The complete amino acid sequence of histone H2B from the mollusc *Patella granatina*. **Eur. J. Biochem.** 93: 71-78.
99. WEIR, J. (1969) Order Unionoida, En: **Treatise on Invertebrate paleontology**. Part.IV: Mollusca. R.C. Moore ed., Geol. Soc. Amer. and Univ.Kansas.
100. WIRTH, U. (1984) Die struktur der metazoen-spermien und ihre bedeutung fur die phylogenetik. **Vehr. Natur.** Hamburg. NE27: 295-362.
101. WOUTERS-TYROU, D., A. MARTIN-PONTHIEU, P. SAUTIÈRE i G. BISERTE. (1981) Acetylation of histone H4 in chicken erythrocyte and cuttlefish testis chromatin. **FEBS Lett.** 121: 195-200.
102. WOUTERS-TYROU, F., A. MARTIN-PONTHIEU, A. RICHARD i P. SAUTIÈRE. (1988) Characterization of the nuclear basic proteins specific of spermiogenesis in cuttlefish *Sepia officinalis*. **Biochim. Biophys. Acta** 953: 86-94.
103. YOCHELSON, A. L. (1978) An alternative approach to the interpretation of the phylogeny of ancient molluscs. **Malacologia.** 17: 165-191.
104. ZALENSKAYA, I. A., N. A. ODINTSOVA, A. O. ZALENSKY i V. I. BOROV'EV. (1982) Nucleosomal organization of sperm chromatin of the bivalve mollusc *Swiftopecten swifti*. **Molek. Biol.** (trad. anglesa). 16: 271-275.
105. ZALENSKAYA, I. A., N. A. ODINTSOVA i V. I. BOROV'EV. (1985) Chromatin from sperm of Bivalvia molluscs. Specific features of nucleosomal organization. **FEBS Lett.** 188: 243-247.
106. ZALENSKY, A. O. i I. A. ZALENSKAYA. (1980) Basic chromosomal proteins of marine invertebrates. II. The proteins from sperm of Bivalvia molluscs. **Comp. Biochem. Physiol.** 66B: 415-419.
107. ZALENSKY, A. O., K. F. TUTUROVA, N. A. ODINTSOVA i I. A. ZALENSKAYA. (1982) Partial salt dissociation of chromatin from sperm of some marine invertebrates. **Studia Biophys.** 87: 137-138.
108. ZALENSKY, A. O. i Z. V. AVRAMOVA. (1984) Nucleosomal organization of a part of chromatin of mollusc sperm nuclei with a mixed basic protein composition. **Molec. Biol. Rep.** 10: 69-74.
109. ZALENSKY, A. O. i G. L. CHELOMINA. (1986) Isolation, partial fractionation and characterization of mRNA coding basic proteins of sperm chromatin in the mollusc *Crenomytilus grayanus*. **Molek. Biol.** (trad. anglesa). 20: 677-682.