

Estudio de la transición nucleohistona-nucleoprotamina "in vivo" e "in vitro". Clonación, secuenciación y expresión del gen de la protamina galina.

Rafael Oliva Virgili

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

ESTUDIO DE LA TRANSICION NUCLEOHISTONA-NUCLEOPROTAMINA
IN VIVO E IN VITRO. CLONAJE, SECUENCIACION Y EXPRESION
DEL GEN DE LA PROTAMINA GALINA.

R. OLIVA

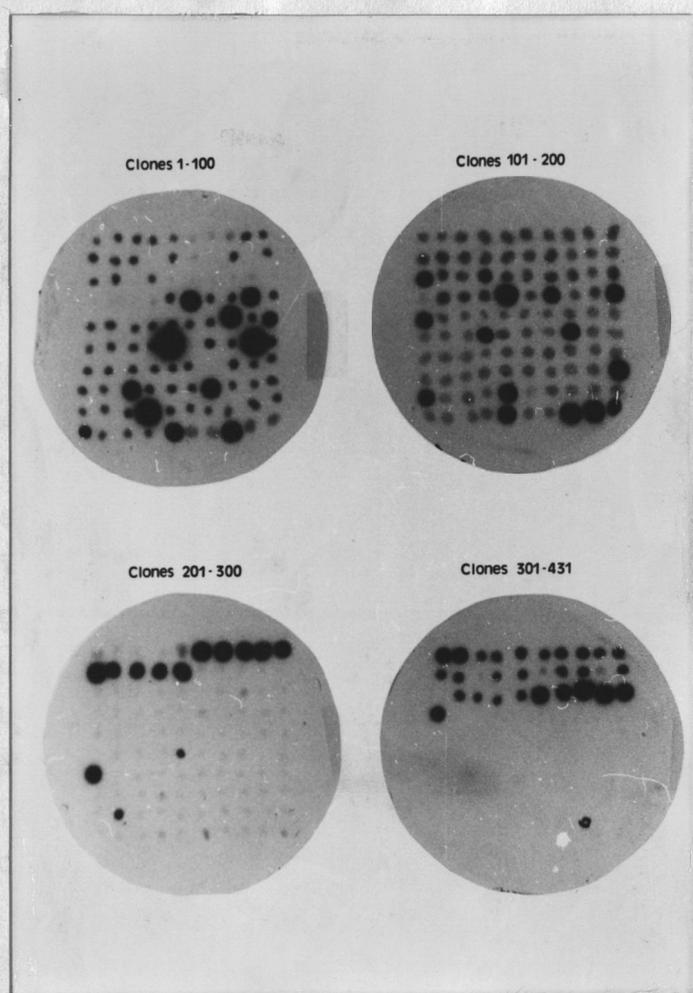


Fig 92.

Resultado de la hibridación de los clones 1-431 de la mini-librería de cDNA con una sonda correspondiente a la cadena "sin sentido" del cDNA del clon N° 24. La sonda se preparó según está descrito en pag 128-129 (sonda tipo "1").

Se detectaron varios clones positivos. Por supuesto los clones N° 59 (correspondiente al cDNA del gen de la protamina galina) y los clones 206-215 que son un replanteo del clon N° 59. La mayoría de los clones resultó imposible de secuenciarlos por el método enzimático de Sanger. El clon N° 261, aunque difícil de leer, mostró corresponder al extremo C-terminal codificante y 3' no codificante del gen de la protamina galina. Este clon (261), es 30 bases más grande que el clon N° 59.

3.3.6.- Secuencias del cDNA de la protamina galina obtenidas por el método de Sanger:

El resumen de las secuencias obtenidas del gen de la protamina galina mediante el método de Sanger, se muestra en la fig 93.

El fragmento secuenciado por este método, muestra la región del cDNA del gen de la protamina galina que codifica para los 13 aminoácidos de la región C-terminal de la protamina galina y el resto de la región 3' no codificante del gen. El tamaño de la secuencia obtenida es de 162 bases.

Solapándose con el codón de terminación, existe una secuencia seguida de otro codón de terminación, que si resultara traducida daría lugar a un dominio básico adicional (Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Tyr-(end)) que incrementaría el número de "clusters" de arginina encontrados en las protaminas.

La secuencia de la región 3' del cDNA del gen de la protamina galina muestra la señal (AATAAA) y la cola de poliadenilación.

El único codón que codifica para la arginina en la región codificante secuenciada es el "CGC" (de entre los 6 posibles codones que codifican para la arginina), lo que hace que esta región contenga un 85% de "G" o "C". De una forma similar, la región no codificante es también muy rica en "C" y "G".

El elevado número de clones que mostrando hibridación con la sonda del gen de la protamina galina son ilegibles, el hecho de que sólo se hayan encontrado pequeñas secuencias legibles correspondientes al gen de la protamina galina y el haber encontrado una secuencia casi ilegible que simplemente era un poco mayor que la del clon N°59, hizo pensar que debido a la riqueza en "CG" de este gen, probablemente las cadenas simples tenderían a aparearse sobre sí mismas, especialmente si su tamaño era superior a 160 bases, impidiendo de esta forma la secuenciación de los clones conteniendo la secuencia completa del gen de la protamina galina por el método enzimático de Sanger. (fig 94). La secuencia completa de este gen debería obtenerse mediante el método de Maxam and Gilbert, de destrucción química de las bases, en donde la estructura adoptada por el gen no es tan importante (pag 242).

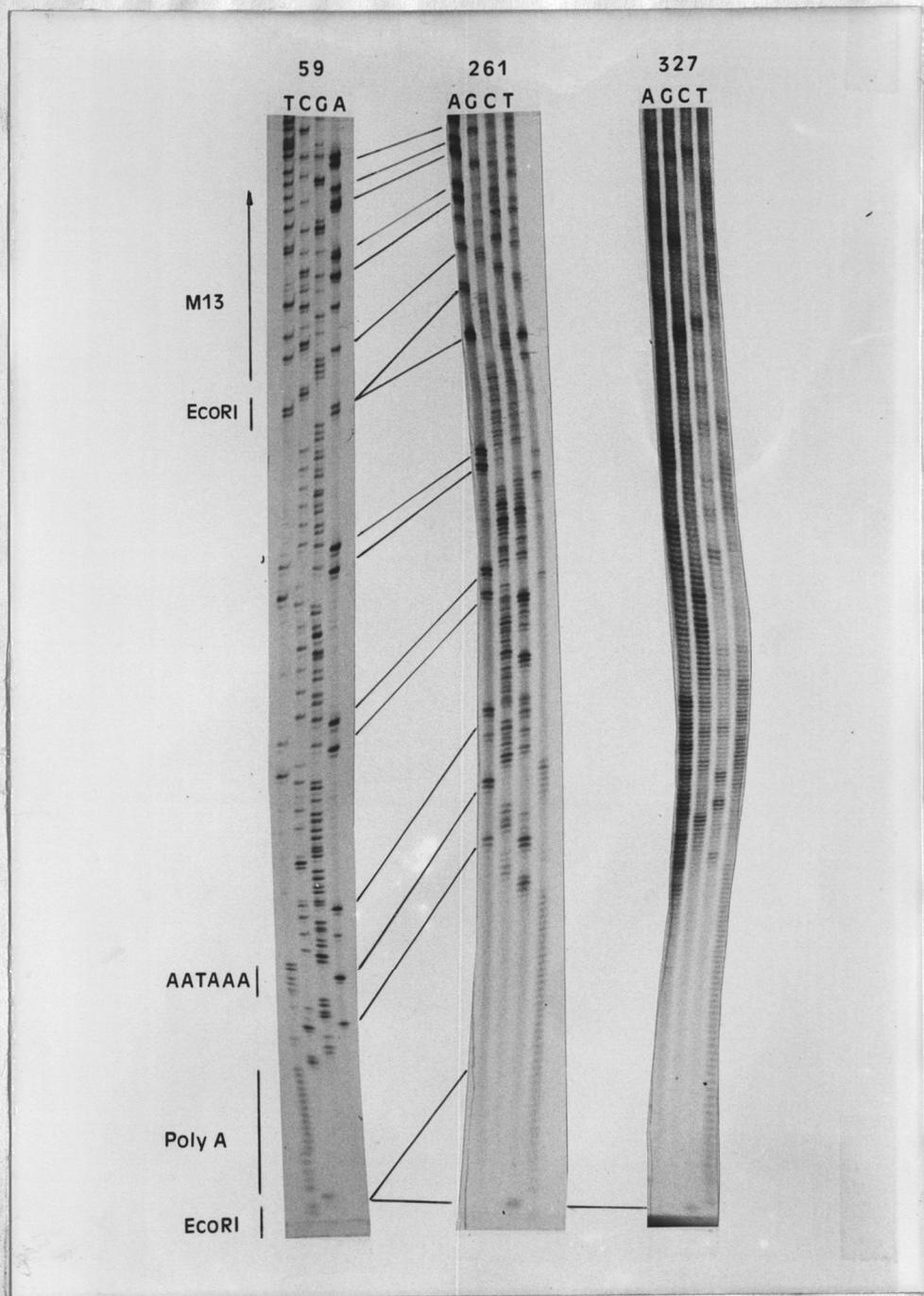


Fig 94.

Posibilidad de que las cadenas simples de los clones de M13mp9 conteniendo inserts correspondientes al cDNA del gen de la protamina galina, adopten superestructuras como consecuencia de la abundancia en codones "CGC" codificantes para la arginina. Los inserts pequeños (clones N° 59 y N° 261), dada su simpleza no adoptarían ninguna estructuración y por lo tanto pueden leerse a través del método enzimático de Sanger. El clon N° 327 resulta imposible de leer mediante el método de Sanger, hibrida con la sonda correspondiente al cDNA de la protamina galina y tiene un tamaño de unos 480 pares de bases. (pag 243-247), adecuado para corresponder al cDNA de longitud completa del gen de la protamina galina.

3.3.7.- Secuenciación por el método de Maxam and Gilbert:

3.3.7.1.- Ensayo de restricción para determinar el tamaño de los "inserts" de los clones conteniendo secuencias sospechosas de corresponder al gen de la protamina galina:

El primero de los pasos para secuenciar el gen de la protamina galina por el método de Maxam and Gilbert, fué determinar cuales eran los clones más adecuados. Para ello se realizó un ensayo de restricción de los distintos clones con EcoRI, para averiguar cual era el insert con un tamaño más adecuado para corresponder al cDNA de longitud completa del gen de la protamina galina (fig 95).

El clon más adecuado resultó ser el N° 327. En la fig 97 se muestra el análisis de los fragmentos de restricción con EcoRI de los clones N° 327 y N° 48. El tamaño del ARN mensajero del gen de la protamina galina es de unas 400-500 bases (fig 99 y 100), y este clon (N° 327) posee un tamaño de 480 bases.

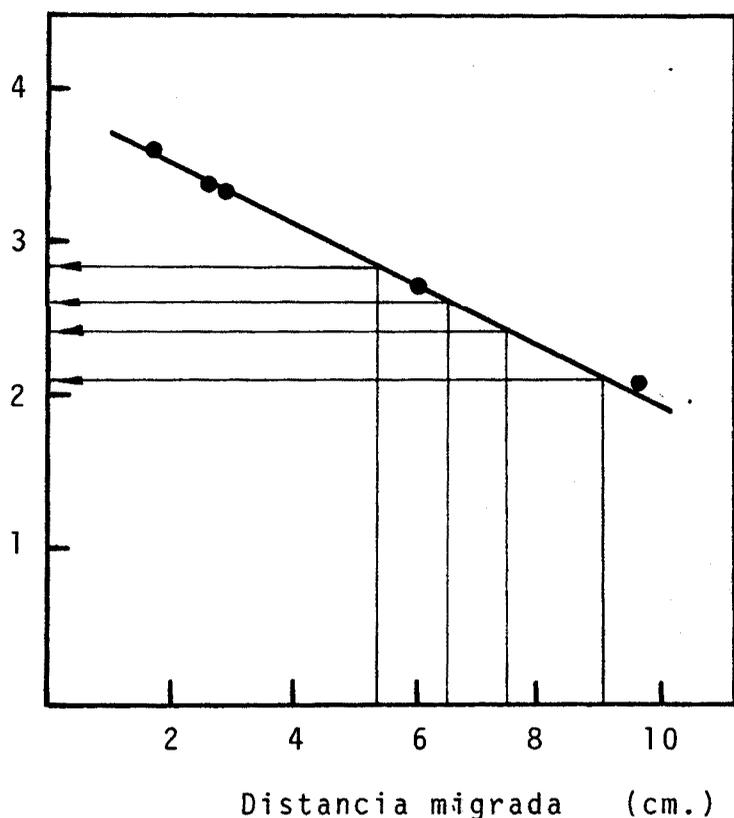
3.3.7.2.- Preparación de la forma replicativa del clon N° 327:

Se realizó según está descrito en (Bankier & Barrell, 1983).

3.3.7.3.- Restricción de la forma replicativa, marcaje con ^{32}P -ATP, aislamiento del fragmento a secuenciar y resultado obtenido:

La estrategia seguida para la secuenciación de parte del "insert" del clon N° 327 por el método de Maxam and Gilbert, se esquematiza en la fig 96. La forma replicativa del clon N° 327 se digirió con BamHI, se defosforilaron los extremos, se marcó con ^{32}P -ATP, se digirió con PvuI y aisló el fragmento a secuenciar mediante electroforesis en gel de baja temperatura de fusión (pag 137-140). La fig 97 muestra el análisis de los fragmentos de restricción con BamHI y PvuI de los clones N° 327 y 48. El incremento de tamaño de los fragmentos conteniendo el "insert" respecto a la restricción con EcoRI, corresponde a la distancia entre los sitios de restricción BamHI y PvuI hasta el sitio de restricción

Log₁₀ de los pares de bases



Clon #	Tamaño del insert
327	480 bp
48	750 bp
-	- p
36	150 bp
135	280 bp

Fig 95.

Tamaño aproximado de los inserts de algunos clones de los que mostraron hibridación con la sonda preparada a partir del clon N° 24 (fig 92).

El tamaño se determinó mediante la construcción de una forma replicativa parcial a partir de los clones de cadena simple: Los clones de cadena simple se hibridaron con el primer de secuenciación "M13 17mer", se construyó la cadena complementaria con Klenow y los 4 desoxirribonucleótidos y se digirió con el enzima EcoRI. El producto de la digestión se analizó en geles de TAE-agarosa 2%. Marcadores de tamaño (●).

El clon con un tamaño más adecuado para corresponder al cDNA de longitud completa del gen de la protamina galina, es el N° 327.

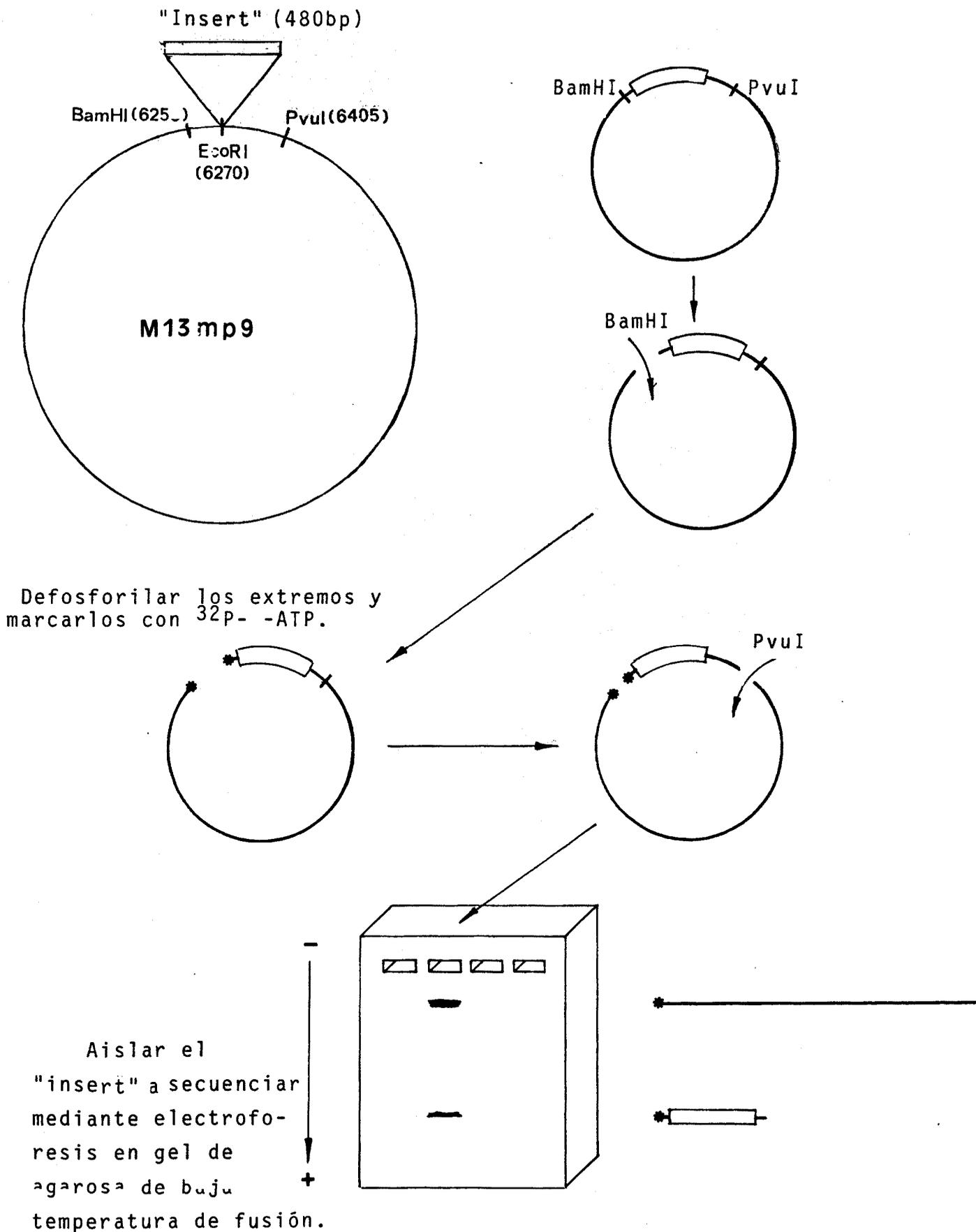


Fig 96.- Estrategia seguida para secuenciar un insert de 480 bases aproximadamente (clon N°327), por el método de Maxam and Gilbert (sigue en fig 24).

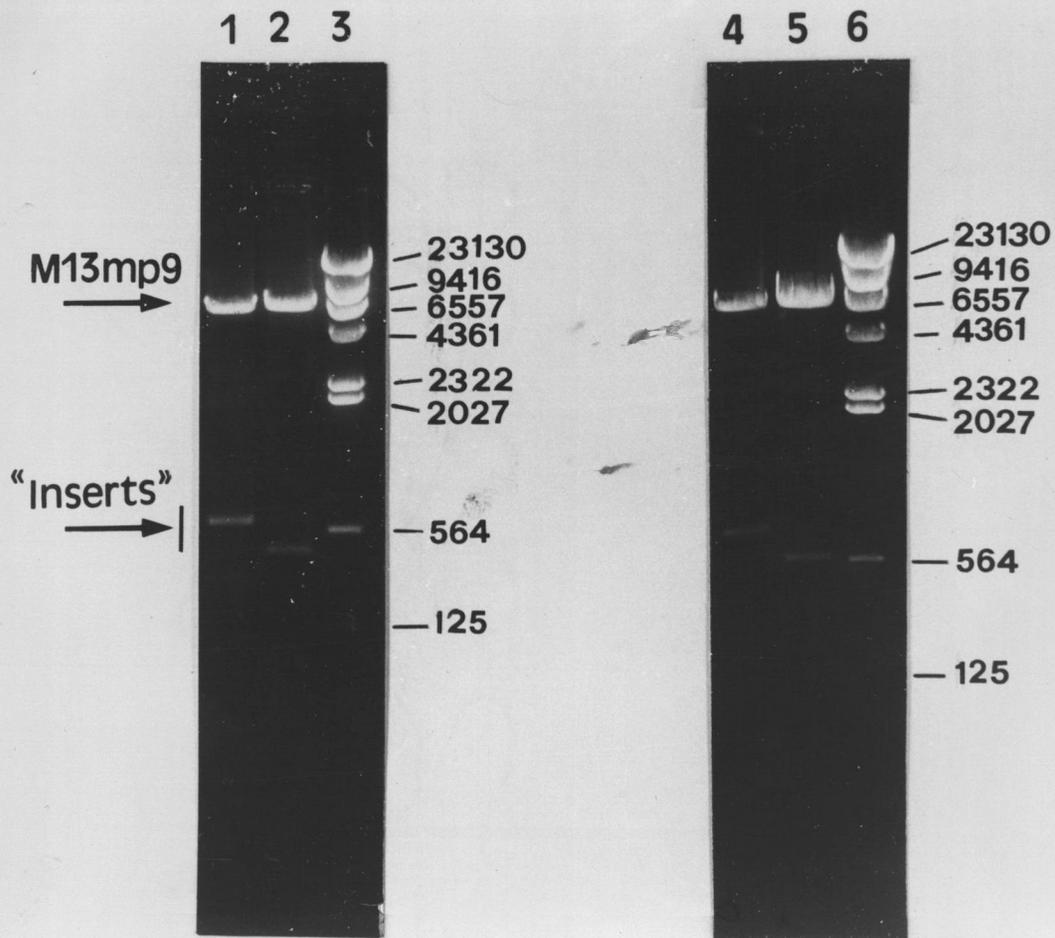


Fig 97.

Preparación del ADN de los clones N° 327 y N° 48 a secuenciar por el método de Maxam and Gilbert.

- 1.: Clon N° 48 digerido con EcoRI para determinar el tamaño del insert.
- 2.: Clon N° 327 digerido con EcoRI para determinar el tamaño del insert
- 3.: Marcador de tamaño -HindIII
- 4.: Clon N° 48 tras digerir con BamHI, marcar con ^{32}P -ATP y digerir con PvuI.
- 5.: Clon N° 327 tras digerir con BamHI, marcar con ^{32}P -ATP y digerir con PvuI.
- 6.: Marcador de tamaño -HindIII

El fragmento conteniendo el ADN a secuenciar, se aisló mediante agarosa de baja temperatura de fusión (pag 143).

En la fotografía no se aprecia, pero aparecieron algunas bandas de ácido nucleico (probablemente ADN bacteriano contaminante) de tamaños comprendidos entre 700 y 6000 bases. Estas bandas mostraron la misma movilidad electroforética independientemente del ensayo de restricción realizado, no se marcaron con ^{32}P - γ -ATP y no interfirieron con el aislamiento del "insert".

EcoRI. La secuencia de este clon, ilegible por el método de Sanger, resultó ser perfectamente legible por este método de destrucción química de las bases. La secuencia obtenida, probablemente correspondiente a la región 5' del cDNA del gen de la protamina galina es la siguiente:

```
5'- G A G G A G A A G T G A A G A A A A G A T C C
      A A T C C A T G T A T T G A G T G G A G A X X A
      A G A A T G G G C G T T G T C X C C X C C A A A
      A T C C G C C T X X X X X A A T T A A X A A A C
      T X A T G G C A G X A T X X G G A A A T A C C A
      C C C C T A A C A G A G A C A C C C A X A - 3'
```

No obstante, todavía no es posible conocer con certeza si esta secuencia corresponde realmente al gen de la protamina galina, dado que no muestra ninguna región codificante. Las "X" indican incertidumbre debida a la falta de marcaje de las bandas..

3.3.8.- Estudio de la expresión del gen de la protamina galina a lo largo de la espermatogénesis:

Para determinar si efectivamente la secuencia encontrada correspondiente al gen de la protamina galina (clon N°59) realmente correspondía a una de las poblaciones de mensajeros aisladas a partir de la suspensión de células enriquecidas en espermátidas alargadas y redondas, y para determinar el tamaño del ARN mensajero del gen de la protamina galina, se realizó un primer "Northern blot" (fig 99). El resultado indicó que efectivamente la secuencia encontrada correspondía a una de las poblaciones de mensajeros, y que el tamaño del ARN mensajero del gen de la protamina galina estaría comprendido entre 350 y 500 bases. Aunque en la foto (fig 99) no se observa, la banda parecía desdoblarse en dos, sugiriendo ya la posible presencia de dos poblaciones de ARN mensajeros.

Para estudiar la expresión del gen de la protamina galina a lo largo de la espermatogénesis, se preparó ARN a partir de testículos de gallo en distintas fases de desarrollo. Cada testículo se controló histológicamente para determinar con exactitud su composición celular (fig 98). El ARN se transfirió a papel "Pall Biodyne" e hibridó con una sonda preparada a partir del clon N°59.

Los resultados indicaron que la expresión del gen de la protamina galina es postmeiótica y que existen dos poblaciones de mensajeros que codificarían para la protamina galina, de 420 y 465 bases respectivamente. (fig 100).

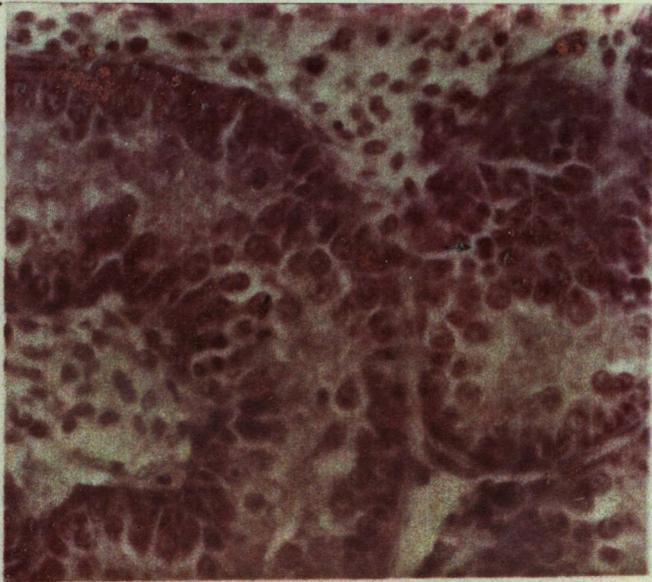
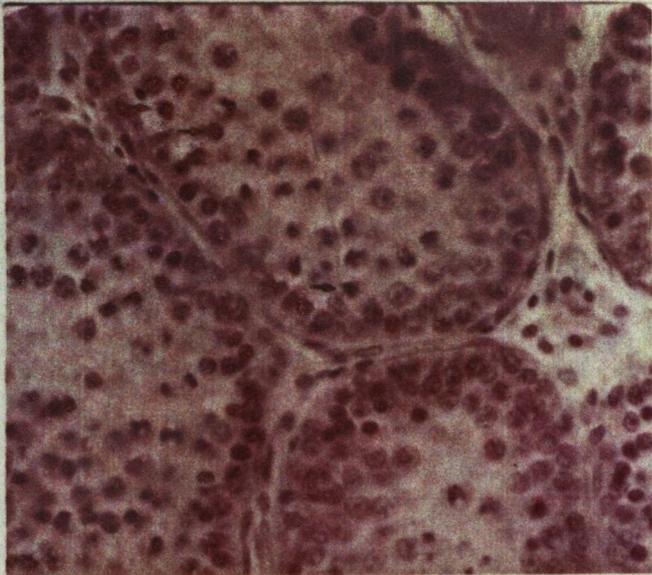
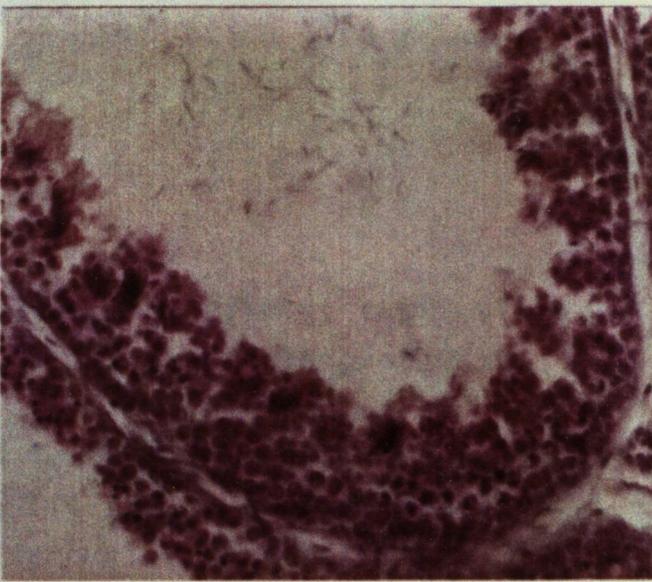
58 días	0.12 g	<u>MITOSIS</u>	
	0.20 g		
	0.29 g		
72 días	0.50 g	<u>MEIOSIS</u>	
	1.21 g		
78 días	1.46 g		
	1.75 g		
	2.55 g		
Adulto	15 g	<u>ESPERMATOGENESIS</u>	
	25 g		

Fig 98. Composición celular de testículos de gallo en distintas fases de desarrollo. Fotos obtenidas por el Prof. Dr D. Ribas, Dpto. de Histología, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona.

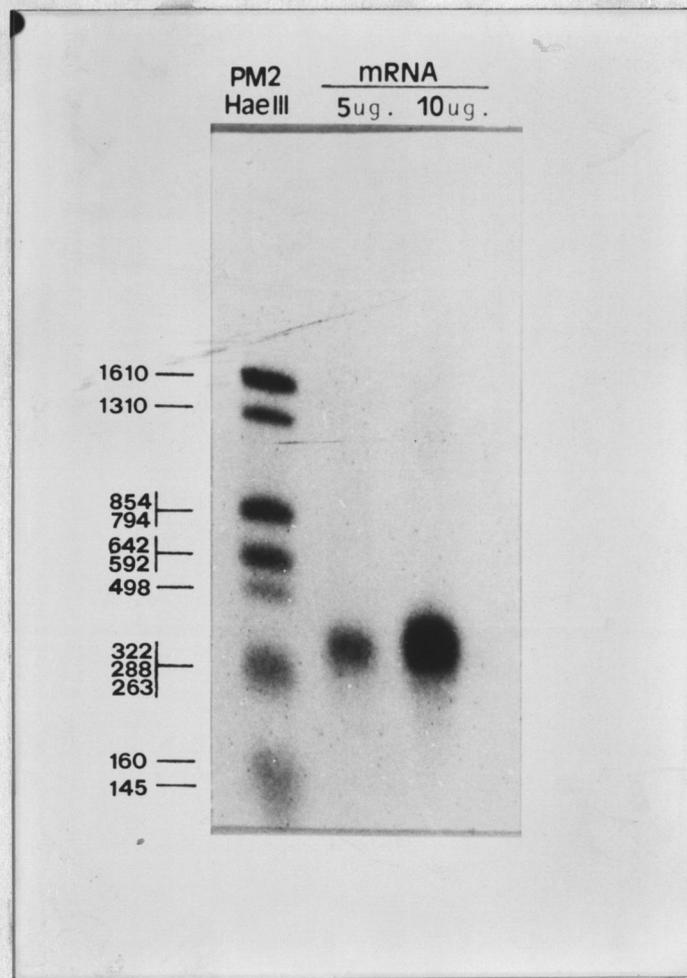


Fig 99.

Northern blot de ARN mensajero de células testiculares de gallo, hibridado con la sonda del gen de la protamina gallina.

ARN mensajero de células testiculares de gallo preparado como está descrito en pag 114-116 se analizó mediante electroforesis en gel de metilmercurio-agarosa 2% (pag 118), transfirió a papel "Pall Bidyne" e hibridó con una sonda construida a partir del ADN del clon N° 59 (sonda tipo "2" de pag 128-129). Se muestra una fotografia del autorradiograma.

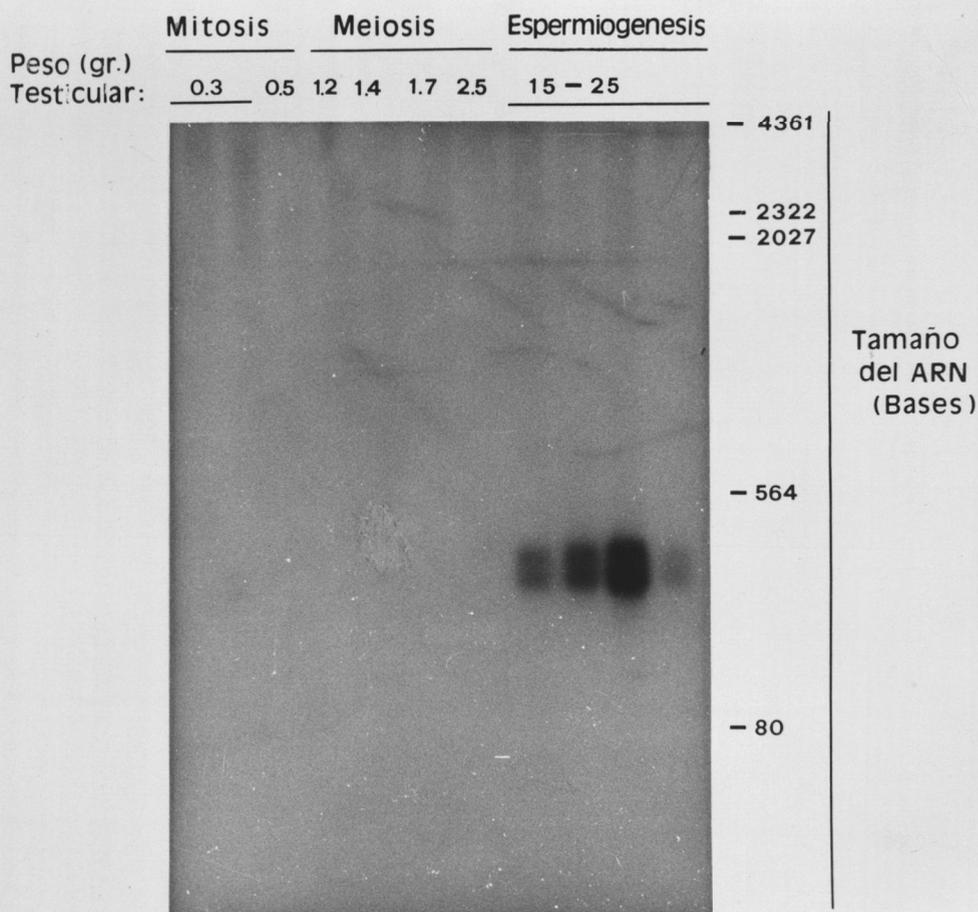


Fig 100.

Northern blot de ARN de testículos de gallo en diferente estado de desarrollo.

ARN mensajero de testículos de gallo en diferente estado de desarrollo preparado como está descrito en pag 115-116 se analizó mediante electroforesis en gel de formaldehido-agarosa 2% (pag 117-118), transfirió a papel "Pall Biodyne" e hibridó con una sonda construida a partir del ADN del clon N° 59 (sonda tipo "2" de pag 128-129). Paralelamente con la preparación de ARN, se controló histológicamente los distintos testículos (ver fig 98). Se muestra una fotografia del autorradiograma.

DISCUSSION

4.1.- LA TRANSICION NUCLEOHISTONA-NUCLEOPROTAMINA "IN VIVO".

4.1.1.- Cronologia del aumento de protamina y disminución las histonas en la espermiogénesis. Método de separación de células a gravedad unidad:

SEPARACION DE CELULAS:

La metodología para la obtención y separación de células a gravedad unidad fue esencialmente descrita por Meistrich (1977), si bien hasta el presente no había sido aplicada a la separación de células germinales del gallo (Oliva et al., 1982).

La disociación triptica controlada del tejido testicular ha permitido la obtención de una suspensión de células (fig 25) susceptibles de separación mediante diversos métodos (elutriación, sedimentación a gravedad unidad citofluorimetría).

El método de separación a gravedad unidad (pag 147-153) separa las células esencialmente en función de su volumen celular (pag 7), en un gradiente de densidad cuya única finalidad es la de evitar corrientes de convección en el seno del fluido de la cámara de separación. Resulta esencial que este gradiente de densidad carezca de actividad osmótica, ya que en el caso de que tuviera, provocaría un cambio en el volumen celular o colapsamiento de las células. Para crear este gradiente de densidad, clásicamente se han venido empleando diversos polímeros (albúmina de suero bovino, percoll, ficoll). Tales polímeros presentan el inconveniente de que resultan excesivamente caros (debido a los volúmenes que se manejan) cuando la separación de células a gravedad unitaria se convierte en una práctica diaria. Por esta razón, se utilizó un pequeño soluto que debido a su elevada permeabilidad, carece de actividad osmótica: el glicerol. Los perfiles de la separación (fig 26) y diversos parámetros bioquímicos (pag 159) resultaron similares cuando se utilizó Ficoll en lugar de glicerol.

Además de su elevada permeabilidad, el glicerol posee una toxicidad muy baja, y se ha utilizado como agente criopreservativo desde que se descubrió que confiere protección a los espermatozoides en la congelación (Polge, 1980).

Las distintas poblaciones celulares obtenidas mediante este método de separación a gravedad unitaria, han sido caracterizadas morfológicamente (Fig 25-29). Los espermatozoides testiculares sedimentan en la región 0-1 mm/h, las espermátidas alargadas en la región 1-2,5 mm/h, las espermátidas redondas en la región 2-4 mm/h y el resto de células sedimentan con velocidades de sedimentación superiores a 3.5 mm/h atendiendo a sus diferencias de tamaño.

En la región comprendida entre la población de espermátidas alargadas y la de espermátidas redondas, se detectan morfológicamente ambos tipos de células. No obstante, la composición bioquímica de esta población de células morfológicamente mixta, es distinta que una simple mezcla de las composiciones bioquímicas de las poblaciones de espermátidas alargadas y espermátidas redondas (Fig 31, 33-36, 42, 43 y 49). Dada la reducción progresiva de tamaño que las espermátidas redondas experimentan en el proceso de espermiogénesis, estos resultados indican que el volumen celular (y por lo tanto la velocidad de sedimentación) pueden ser utilizados como marcador del estado de diferenciación.

El método de separación de células a gravedad unitaria estandarizado para el gallo, se complementa con los otros métodos de separación de núcleos o células, y presenta ventajas e inconvenientes respecto a estos:

1º) Rapidez:

-Elutriación: Método rápido cuando sólo se requiere una pequeña cantidad de células (2 horas de trabajo manual). Método lento cuando se requiere bastante material: 10 horas de trabajo manual para conseguir una población de espermátidas redondas correspondiente a un mg de ADN.

-Gravedad unitaria: Método lento si sólo se requiere una pequeña cantidad de células (2 horas de trabajo manual y 5 horas de espera). Método rápido cuando se requiere

bastante material. Dado el bajo precio del equipamiento, se pueden utilizar 2 cámaras de 28 cm de diámetro a la vez: en 7.5 horas (3 horas de trabajo manual y 4.5 de espera) se puede conseguir una población de espermátidas redondas equivalente a 2 mg de ADN.

2º) Composición de las poblaciones celulares obtenidas:

La composición de las poblaciones de espermatozoides testiculares, espermátidas alargadas y espermátidas redondas es aproximadamente similar en ambos métodos. Tal vez con la elutriación pueden conseguirse poblaciones de células ligeramente más homogéneas, independientemente de la composición de células de la población a separar. Con el método a gravedad unitaria, puede ocurrir que si un determinado tipo celular se halla en excesiva abundancia en la población de células a separar, enmascare ligeramente las poblaciones celulares inmediatamente vecinas de la cámara de separación. Esto puede convertirse en una ventaja si previamente a la separación a gravedad unitaria, se somete la población a separar a una cierta selección a favor de enriquecerla en aquellos tipos celulares en los que estamos interesados estudiar. Este enriquecimiento puede conseguirse centrifugando a pocas "g" durante tiempos breves la suspensión celular (pag 114).

En la elutriación, conjuntamente con la población de espermátidas alargadas, aparece una buena proporción de partículas residuales (Boix i Roca, 1984).

3º) Alteración de las células: En ambos casos (elutriación y gravedad unitaria), la exclusión al colorante azul tripán ensayada en las células después de la separación, resultó ser superior al 99%. Hay que tener en cuenta que en la elutriación, dado que las células se hallan sometidas a la acción de un flujo constante relativamente elevado (respecto al método de gravedad unitaria), existe cierto efecto de cizallamiento que puede remover parte de membrana y citoplasma de algunos tipos celulares.

El método de separación de núcleos se ha comentado en pag 6. Existen en el mercado versiones del método de sedimentación a gravedad unitaria mucho más sofisticadas y caras, que no presentan ninguna ventaja respecto al sencillo método descrito, con la única excepción de que permiten ahorrar un 20% aproximadamente de tampón.

INCREMENTO DE LA PROTAMINA GALINA Y DISMINUCION DE LAS HISTONAS EN LA ESPERMIOGENESIS:

Para poder interpretar los resultados obtenidos de cualquier cuantificación de proteínas nucleares, es especialmente importante tener en cuenta los tres siguientes puntos:

1º) Proteolisis: La proteolisis puede tratarse del inconveniente metodológico más grave a la hora de intentar cuantificar las proteínas. En el modelo estudiado estos fenómenos de proteolisis pueden ser aún más peligrosos debido a que los tejidos utilizados contienen una de las proteasas más potentes: la acrosina y su precursor la pro-acrosina (Ustrell i Mezquita, 1985).

El resultado de los fenómenos de proteolisis es que las bandas correspondientes a las proteínas a cuantificar desaparezcan, y en su lugar, aparezcan nuevas bandas correspondientes a los productos de degradación. En los geles de PA-SDS, los productos de degradación de las histonas muestran una mayor movilidad electroforética que la histona de la que proceden. En los geles de PA-tritón-urea y PA-urea, los productos de degradación de las histonas y de la protamina suelen dar lugar a bandas de mayor (y también es posible de menor) movilidad electroforética que la proteína de la que proceden. En las células testiculares del gallo, las proteínas más susceptibles de degradación, son la protamina galina, seguidas de las histonas H3, H4 y resto de histonas y no histonas. (Walker et al., 1985).

En los resultados obtenidos en relación con las variaciones cuantitativas y cualitativas de proteínas nucleares durante la espermatogénesis, en ningún caso se observaron sobre los geles bandas atribuibles a productos de degradación de las histonas o de la protamina. (Fig. 31 y 41-54).

Las condiciones utilizadas para evitar los fenómenos de proteolisis consistieron en la utilización de ácido cítrico 10 mM., bisulfito 50 mM, PMSF 1 mM, un pH bajo de 2.4, trabajar a una temperatura de 0°C, trabajar con la máxima rapidez y en algunos casos 10 mM benzamidina.

Esta combinación resulta tan efectiva que los núcleos preparados en estas condiciones (pag 84-86) pueden incubarse a 37°C (por lo menos 10 min) a un pH de 8.0 en un medio que tan sólo contiene 0.1 mM PMSF como inhibidor y siguen sin detectarse productos de degradación de las histonas.

2º) Pérdida de las proteínas nucleares o entrada de proteínas citoplasmáticas al núcleo durante los procesos de preparación de núcleos: La redistribución de proteínas depende fundamentalmente de la composición del medio utilizado en los procesos de preparación de núcleos. De esta forma, distintos métodos pueden conllevar distintos tipos de pérdida o redistribución.

Los resultados presentados sobre el aumento de protamina y disminución de las histonas en la espermiogénesis, se han obtenido utilizando 2 métodos independientes: método del ácido cítrico 10 mM (Mezquita and Teng, 1977a) y un método específico para evitar la pérdida de las histonas H3 y H4 acetiladas (Krause, 1978) (pag 84-86). Los resultados obtenidos, son congruentes con un tercer método (pag 83-84) en el que se separaron núcleos en lugar de células.

3º) Errores cometidos en la cuantificación de los geles:

Fundamentalmente pueden ser debidos a la superposición de distintas proteínas en una misma banda, a la falta de linealidad cantidad de proteína-intensidad de la banda, y a diferencias en la afinidad que distintos colorantes presentan hacia las distintas proteínas.

Los resultados expuestos se han obtenido analizando las proteínas nucleares mediante 6 tipos distintos de electroforesis: Electroforesis en gel de PA-SDS al 18%, electroforesis en gel de PA-SDS con gradiente, electroforesis en gel de PA-urea, electroforesis en gel de PA-tritón-urea, electroforesis bidimensional 1ªD. PA-urea/2ªD. PA-SDS y electroforesis bidimensional 1ªD. PA-tritón-urea / 2ªD. PA-SDS. Se han utilizado también dos tipos distintos de tinción: "Amido black" y "Coomasie blue". El "Coomasie blue" (R-250) es más sensible, pero el "Amido black" ofrece más linealidad. Las diferencias de afinidad de los colorantes hacia las distintas histonas se han tenido en cuenta (Hardison and Chalkley, 1978).

A medida que progresa la espermiogénesis, cantidades crecientes de protamina y decrecientes de histonas son detectadas (fig 31-33). Estos resultados pueden ser compatibles con 2 hipótesis distintas:

1.- Desplazamiento de las histonas previo a la unión de la protamina al ADN.

2.- Unión de la protamina a la cromatina, seguida del desplazamiento de las histonas.

La pequeña caída de las histonas detectada al inicio de la espermiogénesis, en ausencia de niveles significativamente elevados de protamina ($1/SV = 0.25$, fig 32), iría a favor de la primera hipótesis. Esta hipótesis vendría apoyada por el hecho de que en otras especies (Christensen et al., 1984) se han detectado regiones de la cromatina de las espermátidas en las que por microscopía electrónica se muestra ADN desprovisto de proteínas. Este ADN desprovisto de proteínas explicaría parte de la exposición de sitios detectada a nivel del ADN en la transición nucleohistona nucleoprotamina de diversas especies (Mezquita and Teng, 1977 b; Loir Lanneau, 1978; Grimes and Smart, 1985).

Los argumentos expuestos en el sentido de apoyar la primera hipótesis, pueden a su vez ser discutidos: La exposición de sitios a nivel del ADN sería simplemente debida a la decondensación de la cromatina que tendría lugar para incrementar la accesibilidad del ADN a la protamina. Esta decondensación podría estar mediatizada, por lo menos en parte por la acetilación de las histonas (pag 266). Las regiones de la cromatina de trucha en las que se ha detectado por microscopía electrónica ADN desprovisto de proteínas, podría tratarse de un artefacto de los procesos de preparación de muestras, en el que las regiones conteniendo nucleosomas más relajados perderían la estructura nucleosómica. La pequeña caída de las histonas en las células con $1/SV = 0.25$ podría reflejar simplemente diferencias en la actividad génica (por ejemplo transcripcional) entre células meióticas, premeióticas, algunos eritrocitos contaminantes que sedimentarian en la región $1/SV = 0.18-1.2$, y las espermátidas redondas con $1/SV = 0.25$ (fig 32). (La presencia de hematies contaminantes (4% en la región $1/SV = 0.25$) se minimizó sangrando al máximo el testículo).

Una pequeña cantidad de protamina podría ser suficiente para condensar parcialmente una región relativamente amplia de nucleohistona (a la relación arginina/nucleótido = 0.3, por debajo del rango fisiológico, la protamina galina es capaz de precipitar el 90% de los nucleosomas "in vitro" (fig. 81)). Varios mecanismos de desensamblaje de los nucleosomas podrían además estar operando a la vez (independientemente o en conexión) o incluso con distinta cronología. Mecanismos que podrían verse implicados en el desensamblaje de los nucleosomas podrían ser: Topoisomerasas que modificarían la superhelicidad del ADN favoreciendo o incluso provocando el desensamblaje de los nucleosomas (Roca i Mezquita, 1985), polianiones que competirían con el ADN por las histonas (Mezquita, 1985), fenómenos de proteólisis, modificaciones químicas de las histonas... (ver introducción pag 25-53). Estos mecanismos de desensamblaje de los nucleosomas señalados, aunque posibles, se hallan en el terreno de la pura especulación por la falta de pruebas experimentales que sugieran su intervención en la espermiogénesis. Probablemente, varios de estos mecanismos puedan actuar relajando la estructura de la cromatina, aunque no serían suficientes para desensamblar por sí solos la estructura nucleosómica.

Otra hipótesis acerca de cómo resultarían desensamblados los nucleosomas en la espermiogénesis, sería que la propia protamina, tras su unión con el ADN, competiría con las histonas por el ADN (dado su carácter altamente básico) y acabara provocando el desplazamiento de las histonas y el desensamblaje de los nucleosomas. Los resultados obtenidos en los experimentos de desensamblaje de nucleosomas "in vitro" (pag 190-218 y 269-272), indican que la segunda hipótesis (unión de la protamina a la cromatina, seguida del desplazamiento de las histonas) gozaría de un mayor respaldo experimental, pudiendo ser la propia protamina galina la responsable del desplazamiento de las histonas en la transición nucleohistona-nucleoprotamina.

En ciertas especies, se ha descrito que el proceso de condensación del ADN durante la espermiogénesis es más complejo que un simple reemplazamiento de las histonas por protaminas, y que proteínas de transición, presentes en las espermatidas y que no se hallan en el espermatozoide, podrían jugar un papel en la transición nucleohistona-nucleoprotamina (Loir and Lanneau, 1978).

En el gallo se ha detectado mediante electroforesis en geles de PA-acético-urea, una banda que migra a nivel de las formas acetiladas de la histona H4 y que aumenta en las espermatidas alargadas (Mezquita and Teng, 1977a). Aunque no necesariamente la misma, una proteína de movilidad electroforética similar que también aumenta en las espermatidas alargadas (SP) (Chiva, 1982; Oliva and Mezquita, 1982, Ustrell et al., 1984) se ha aislado a partir de núcleos testiculares preparados mediante diversos métodos y caracterizado por electroforesis en geles de PA-SDS (fig 54), electroforesis en gel de PA-tritón-urea (fig 41, 42 y 43) y electroforesis bidimensional (fig 44). Esta proteína (SP) es indetectable en núcleos de espermatozoide de gallo aislados por el procedimiento del ácido cítrico, utilizado para preparar la protamina de fig 64 y 65.

A pesar de que se han utilizado varios métodos independientes para preparar núcleos, no se puede descartar la posibilidad de contaminación extranuclear, particularmente por el hecho de que extractos celulares de espermatidas presentan una proteína con un comportamiento electroforético similar.

Otra posibilidad para esta proteína es que se tratara de una histona modificada químicamente de tal forma que cambiara su movilidad electroforética en los geles de PA-SDS y PA-tritón-urea. También podría tratarse de un enzima abundante relacionada con los cambios de estructura nuclear de las espermatidas alargadas. Finalmente, también en el terreno de la especulación, esta proteína podría tratarse de un precursor de la protamina galina, como también podría serlo restos de una proteína presente en los espermatozoides (fig 65 (*)).

Los análisis de la composición de aminoácidos realizados en el laboratorio de G.H. Dixon permiten descartar algunas de estas interpretaciones. La proteína posee residuos de cisteína, por lo que al igual que la histona H3, formaría un dímero detectable en los geles de PA-SDS como consecuencia de la ausencia de 2-mercaptoetanol (u otro agente reductor) durante los procesos de aislamiento y preparación de núcleos (fig 44, el dímero se indica con una flecha).

4.1.2.- Contenido celular y biosíntesis de poliaminas durante la espermatogénesis del gallo:

El número de procesos en los que las poliaminas parecen hallarse implicadas es elevado (introducción pag 28-48). Asimismo, el aumento detectado en los niveles y biosíntesis de poliaminas coincidiendo con los cambios estructurales de la cromatina en el proceso de metamorfosis de la espermátida, puede ser compatible con diversas hipótesis. Varias de estas hipótesis pueden ser compatibles entre si, aunque a continuación se analizarán una por una:

-Hipótesis de la protección del ADN. Inhibición de endonucleasas de restricción:

Clásicamente se conocían ya las propiedades antimutagénicas de las poliaminas en sistemas procarióticos y eucarióticos (Clarke and Shankel, 1975; Rajalakshmi et al., 1978). Últimamente se ha descrito que las poliaminas actúan inhibiendo a las nucleasas y endonucleasas de restricción (Kuosmanen and Pösö, 1985; Pingout et al., 1984; Shalitin and Vishlizky, 1984). En algunos casos, las poliaminas aumentarían la especificidad de las endonucleasas de restricción tipo II (Pingout, 1982).

Las poliaminas, através de su unión al ADN, podrían disminuir la accesibilidad de este a las nucleasas y agentes mutágenos. A través de este mecanismo podrían actuar confiriendo protección al ADN expuesto de las espermátidas alargadas (Mezquita and Teng, 1977b), especialmente en estas células que son las responsables de la transmisión de la información genética de la línea germinal.

-Hipótesis de la condensación del ADN. Estabilización de la forma Z del ADN.

Las poliaminas actúan facilitando el empaquetamiento de los ácidos nucleicos víricos en la nucleocápside (Gosule and Shellman, 1976; Nash, 1975; Gottesman and Gottesman, 1975). "In vitro" precipitan y condensan al ADN y lo protegen frente a la desnaturalización por el calor, de las fuerzas de cizalla-

miento o de la acción de los rayos X (Tabor and Tabor, 1984; Market et al., 1985; Baase et al., 1984; Thomas and Bloomfield, 1979; Maning, 1978; Widom and Badwin, 1980; Gosule and Schellman, 1978, Chatteraj et al., 1978; Marx and Ruben, 1983).

Si se diese una pérdida de la estructura nucleosómica antes de la formación del complejo nucleoprotamina (pag 257), se plantearía la cuestión de cómo puede el ADN desprovisto de proteínas, vencer la tendencia electrostática a la repulsión que implicarían las cadenas cargadas negativamente. De forma similar ¿cómo podría vencerse la tendencia entrópica que las rígidas cadenas presentan hacia la expansión y mantenerse en un volumen reducido, en una cromatina que tiene una tendencia a la condensación?. En este caso las poliaminas podrían ejercer las funciones de condensación del ADN antes de la formación del complejo final nucleoprotamina.

Si la pérdida de la estructura nucleosómica fuese posterior (o consecuencia) de la unión de la protamina galina al ADN (pag 257), las poliaminas podrían actuar como un mecanismo transitorio de condensación de la cromatina como forma de compensar la exposición de sitios a nivel del ADN detectada durante la espermiogénesis.

Concentraciones de espermina del orden 5 mM actúan precipitando a los nucleosomas "in vitro" (Baer and Rhodes, 1983) (pag 204, fig 71), si bien concentraciones superiores a 15 mM podrían presentar un efecto solubilizador de los nucleosomas.

La adición de poliaminas exógenas a líneas celulares ha mostrado que estas poliaminas actúan provocando una condensación de la cromatina y una reducción del volumen nuclear (Nagl et al., 1984).

Las concentraciones de poliaminas detectadas en las espermátidas alargadas del gallo, podrían favorecer que el ADN adoptara la conformación Z, especialmente si se tiene en cuenta que ADN con superhelicidad negativa podría estar presente como consecuencia del desensamblaje de la estructura nucleosómica (Mezquita, 1985)(Pag 43). El ADN Z presentaría una mayor tendencia a autoagregarse (Rich et al., 1984).

-Hipótesis de la intervención de las poliaminas en el desensamblaje de los nucleosomas:

La espermina facilita el ensamblaje de los nucleosomas "in vitro" a concentraciones del orden 0.01-0.1 mM (Bogdanova, 1984), razón por la cual podrían también favorecer el desensamblaje. En este sentido se ha descrito que las poliaminas actúan compitiendo con las histonas por el ADN (Agrell and Hebbly, 1971). Los experimentos realizados muestran que las poliaminas actúan solamente aumentando ligeramente la eficiencia de desensamblaje de nucleosomas por protaminas (Pag 204, fig 72).

-Hipótesis de su función como mensajeros intracelulares controlando diversas actividades enzimáticas:

Las poliaminas actúan modificando numerosas actividades enzimáticas. En relación con el modelo objeto de estudio en esta tesis, cabe citar las siguientes:

Actividad histona acetiltransferasa: La espermina actúa estimulando a la actividad histona acetiltransferasa "in vitro" (Mezquita et al., 1980; Estepa and Pestaña, 1981).

Actividad histona desacetilasa: Las poliaminas (especialmente la espermina) presentan un efecto bifásico, con el máximo de estimulación a la concentración 1 mM espermina (Libby and Bertran, 1980).

Estos efectos sobre la acetilación de las histonas son compatibles con los niveles de poliaminas y la hiperacetilación de las histonas asociada a un elevado recambio de grupos acetato, que se dan coincidiendo con los cambios de estructura nuclear en la transición nucleohistona-nucleoprotamina.

Fosforilación de proteínas nucleares: Las poliaminas actúan estimulando la fosforilación de proteínas (ver pag 46-47). Aparte de las histonas, entre las proteínas nucleares susceptibles de experimentar cambios en su fosforilación durante la espermiogénesis mediatizados por las poliaminas, cabe citar a la protamina. La fosforilación de la protamina se ha estudiado extensamente en otras especies (Louie and Dixon, 1973). La protamina galina, analizada en geles ácidos, presenta unas formas de menor movilidad electroforética que son sospechosas de corresponder a bandas de fosforilación (fig 34).

ADP-ribosilación: Durante la espermatogénesis del gallo se dan variaciones en los niveles de ADP-ribosilación de las proteínas nucleares (Corominas and Mezquita, 1985). Niveles de poliaminas como los detectados durante la espermatogénesis del gallo actúan estimulando la ADP ribosilación de proteínas nucleares "in vitro" (Fig 40)(Wallace et al., 1984).

Topoisomerasas: Niveles de poliaminas como los detectados en las células germinales del gallo, actúan modificando "in vitro" la actividad de las topoisomerasas (Krasnow and Cozzarelli, 1982). Actividad topoisomerasa I ha sido detectada en la línea germinal del gallo (Roca and Mezquita, 1985). A parte de actuar modificando la actividad de los enzimas que modifican la topología del ADN, las poliaminas podrían también por sí mismas actuar modificando la topología del ADN.

-Hipótesis de su intervención en el citoesqueleto:

Existen numerosos trabajos que sugieren que las poliaminas pueden actuar mediatizando fenómenos de citoquinesis y metamorfosis de la estructura celular y nuclear (pag 45-46). Durante la espermiogénesis se dan marcados cambios en la morfología celular y nuclear (fig 1), incluyendo el ensamblaje del flagelo de la cola de los espermatozoides. Tal vez las variaciones que los niveles de poliaminas experimentan durante la espermiogénesis del gallo, puedan también guardar relación con estos fenómenos de metamorfosis celular.

-Hipótesis de su función a través de unirse covalentemente a proteínas:

Ver pag 48.

BIOSINTESIS DE POLIAMINAS:

Las gonadotrofinas, actúan estimulando la espermatogénesis, y también inducen a las actividades enzimáticas testiculares ornitina descarboxilasa y S-adenosilmetionina descarboxilasa (MacIndoe and Turkington, 1973; Reddy and Vिलlee, 1975).

En las células testiculares de gallo, la actividad ornitina

descarboxilasa aumenta paralelamente al contenido celular de putrescina, alcanzando el máximo en las espermátidas alargadas (fig 36). La máxima actividad S-adenosilmetionina descarboxilasa se detectó en la fracción de baja velocidad de sedimentación que contiene espermátidas avanzadas y espermatozoides testiculares (fig 36). En los espermatozoides del deferente, ambas actividades enzimáticas mostraron ser bajas.

Incrementos similares en las actividades ornitin descarboxilasa y S-adenosilmetionina descarboxilasa se han detectado durante la maduración de las espermátidas en la rata (MacIndoe and Turkington, 1973). No obstante, estos autores no fueron capaces de detectar actividad ornitin descarboxilasa en las espermátidas de testículo de rata separadas a gravedad unitaria después de una disociación mecánica del tejido. Este procedimiento elimina citoplasma de las espermátidas alargadas y agrega a las células, reduciendo la calidad de la separación (Meistrich, 1977).

Una crítica al incremento de actividad ornitin descarboxilasa detectado en las espermátidas alargadas del gallo, sería que se realizó una disociación triptica controlada del tejido, cuando recientemente se ha descrito que la ornitin descarboxilasa resulta activada tras el tratamiento de monocapas de células CHO por la tripsina (Gerner et al., 1985). No obstante, hay que tener en cuenta que esta activación ocurre en unas células un tanto especiales y sólo en unas condiciones determinadas. Si fuese cierto que la digestión controlada con tripsina de las células testiculares de gallo, indujera a la actividad ornitin descarboxilasa, esta activación afectaría preferentemente a las espermátidas alargadas, hecho que también sería interesante.

Las actividades ornitin descarboxilasa, S-adenosilmetionina descarboxilasa, o incluso todo el patrón de actividades enzimáticas responsables de la biosíntesis de poliaminas, no basta para explicar los niveles celulares de poliaminas. Estos niveles dependen además de la disponibilidad de precursores, de la acetilación de las poliaminas, de la incorporación de poliaminas a proteínas, y de su rapidez de eliminación.

Las actividades enzimáticas pueden además modificarse por la concentración de los productos o por otras poliaminas. La ornitina descarboxilasa está sujeta a feedback por la putrescina (Jänne et al., 1978). La actividad S-adenosilmetionina descarboxilasa resulta activada por la putrescina y por una depleción de poliaminas (Tabor and Tabor, 1976; Alhonen-Hongisto, 1980).

4.1.3.- Hiperacetilación de las histonas coincidiendo con la transición nucleohistonas-nucleoprotamina:

Las modificaciones químicas de los grupos ϵ -amino de ciertas lisinas de las histonas mediante acetilación, neutraliza su carga positiva y en consecuencia disminuye las interacciones electrostáticas entre el ADN y las histonas.

Existen en la actualidad 3 situaciones en la cromatina eucariota que claramente se correlacionan con modificaciones notables en el grado de acetilación de las histonas:

- 1) Acetilación de las histonas en relación con la transcripción del ADN.
- 2) Diacetilación de la histona H4 en relación con la formación de nuevos nucleosomas durante la replicación del ADN.
- 3) Hiperacetilación de las histonas en relación con la transición nucleohistona-nucleoprotamina que tiene lugar en la espermiogénesis de diversas especies.

Probablemente en todas ellas, la acetilación actúe como elemento modulador de la interacción ADN-histonas, y en consecuencia sea uno de los elementos que actúe controlando la estructura de la cromatina asociada a cada una de estas situaciones particulares:

1) Acetilación de las histonas en relación con la transcripción del ADN:

A pesar de las numerosas correlaciones entre acetilación de las histonas y actividad transcripcional (Allfrey, 1977; Doenecke and Gallwitz, 1982; Dobson and Ingram, 1980; Csordas et al., 1984), esta modificación afecta a regiones mucho más amplias de la cromatina (40% de las histonas H4 y H3) que las que se supone que estarían siendo transcritas en estas células (10%).

Una mejor correlación existe entre actividad transcripcional y el grado de hiperacetilación de la histona H4 (Chahal et al., 1980), e incluso mejor con el recambio elevado de grupos acetilo asociado a una pequeña población de nucleosomas que supondría un 15% del total.

Los resultados obtenidos en las células transcripcionalmente activas de la línea germinal del gallo, indican que se dan ambos fenómenos: cierto grado de acetilación de las histonas asociado a un elevado turnover de grupos acetilo (fig 56)(Oliva and Mezquita, 1982).

2) Diacetilación de la histona H4 en relación con la formación de nuevos nucleosomas durante la replicación del ADN:

Recientemente se ha puesto de manifiesto que niveles elevados de diacetilación de la histona H4 estarían en relación con la unión de histonas al ADN asociada a la formación de nuevos nucleosomas durante la replicación del ADN (Chahal et al., 1980; Chambers and Shaw, 1984; Allis et al., 1985). La acetilación de las histonas facilita el ensamblaje de cromatina "in vitro" (Cotten and Chalkley, 1985).

Los resultados obtenidos en las células germinales del gallo indican que niveles elevados de diacetilación de la histona H4 se hallan asociados a los estadios correspondientes a las células en división (Oliva and Mezquita, 1982)(fig 47-50).

3) Hiperacetilación de la histona H4 en relación con la transición nucleohistona-nucleoprotamina en la espermatogénesis:

En contraste con la clásica idea de una correlación precisa entre acetilación de las histonas y transcripción, los trabajos realizados con el modelo de espermatogénesis demostraron que no existe una relación unívoca entre acetilación de las histonas y actividad transcripcional (Oliva and Mezquita, 1982; Christensen and Dixon, 1982; Grimes and Henderson, 1984).

La hiperacetilación de la histona H4 que se da a medida que progresa la espermatogénesis (pag 167-185) estaría en relación con los cambios estructurales que la cromatina experimenta en la transición nucleohistona-nucleoprotamina. Las especies que no reemplazan histonas en el núcleo del espermatozoide presentan niveles muy bajos de acetilación de las histonas (Ruiz-Carrillo and Palau, 1973; Kennedy and Davies, 1980).

Candido and Dixon (1972) sugirieron por primera vez que la acetilación de las histonas podría actuar como mecanismo de reemplazamiento de las histonas por protamina durante la espermatogénesis en la trucha. Los datos obtenidos en el gallo no apoyan esta idea de que la acetilación de las histonas sea un mecanismo general para desplazarlas del ADN, dado que tan sólo la histona H4 (y en menor grado la H3) resultan hiperacetiladas durante la espermiogénesis.

Existe una correlación clara entre hiperacetilación de la histona H4 en las espermátidas alargadas transcripcionalmente inactivas del gallo, y exposición de sitios de unión en el ADN (Mezquita and Teng, 1977a,b)(pag 54-56).

La hiperacetilación de la histona H4 en las espermátidas alargadas tiene lugar en presencia de un elevado recambio de grupos acetilo (Fig 56). La actividad desacetilasa determinada en estas células (pag 185) es congruente con este elevado recambio.

Estos resultados permitieron postular que independientemente del estado transcripcional de las células, a través de hiperacetilación de la histona H4 asociada a un elevado recambio de los grupos acetilo, pueden exponerse sitios de unión en el ADN, rápida y reversiblemente, facilitando la unión de proteínas cromosómicas al ADN. Las consecuencias funcionales de la hiperacetilación de la histona H4 asociada a elevado recambio de grupos acetilo, dependerán entonces del tipo de proteínas unidas al ADN en cada estadio particular de los procesos de diferenciación celular (Oliva and Mezquita, 1982).

4.2.- DESENSAMBLAJE DE LOS NUCLEOSOMAS "IN VITRO": La protamina galina puede jugar un papel directo en el desensamblaje de los nucleosomas que tiene lugar en la transición nucleohistona-nucleoprotamina.

Aunque la espermiogénesis ofrece un modelo excelente en el que investigar los cambios de composición y actividad funcional de la cromatina, hasta el presente todavía se desconocen los mecanismos precisos por los que los nucleosomas resultan desensamblados en la transición nucleohistona-nucleoprotamina.

Los trabajos clásicos de desplazamiento de las histonas por protaminas de peces, mostraron que utilizando núcleos de timo de ternera, tan sólo las histonas ricas en lisina resultaban desplazadas en un rango arginina/nucleótido fisiológico (Wong and Marushige, 1975). Bode et al. (1977) mostraron que utilizando cromatina, contactos específicos entre las histonas de nucleosomas vecinos prevendrían el desplazamiento de las histonas por protaminas.

La ineficiencia de la protamina salmina para desplazar a las histonas de cromatina de timo de ternera "in vitro" junto con la observación de que las espermátidas de trucha mostraban pequeños péptidos que podían tratarse de productos de degradación de las histonas, hizo proponer que el desplazamiento de las histonas de cromatina en las espermátidas podría verse asistida por la acción de una proteasa firmemente unida a la cromatina. La proteasa hidrolizaria preferentemente histonas acetiladas (Wong and Marushige, 1975; Marushige and Marushige, 1983).

Utilizando partículas nucleosómicas sin superestructura Bode et al. (1980) mostraron que es posible desplazar hasta un 30% de las histonas del octámero (relación arginina nucleótido = 0.4-4) si las partículas nucleosómicas derivaban de células conteniendo histonas hiperacetiladas mediante tratamiento con butirato.

En congruencia con las observaciones previas (Wong and Marushige, 1975; Bode et al., 1977, 1980), los resultados

presentados en esta tesis indican que las pequeñas protaminas de peces no pueden causar ningún desplazamiento mayoritario de las histonas de nucleosomas "in vitro" en el rango de relaciones arginina/nucleótido = 1-8, y que la acetilación de las histonas facilita el desensamblaje de los nucleosomas (fig 68-70, pag 201). En contraste, la protamina galina, con un tamaño y número de residuos de arginina (38) de casi el doble del de las protaminas de peces (21 en la salmina), es capaz de desplazar completamente a las histonas de nucleosomas en un rango arginina/nucleótido = 0.6-1.2 (Relación arginina/nucleótido en el espermatozoide = 0.8).

También en congruencia con los resultados de Bode et al. (1977), se ha observado que la eficiencia de desplazamiento de las histonas de núcleos o cromatina por protaminas, es inferior que si se utilizan nucleosomas sin superestructura (Fig 67, 68, 75, 79 y 80):

Utilizando núcleos genéticamente inactivos de eritrocito de pollo, ambas protaminas (galina y salmina) se muestran completamente ineficientes para desplazar a las histonas del octámero dentro de un rango fisiológico, mientras que la histona H1 resulta completamente extraída (las histonas H1 y H5 son las únicas que resultan extraídas por relaciones fisiológicas de protaminas, cualesquiera que sean las condiciones utilizadas).

Si en lugar de utilizar núcleos de eritrocito de pollo, se utiliza cromatina de la misma procedencia, la protamina galina consigue desplazar un 20% de las histonas del octámero en un rango arginina/nucleótido = 0.6-2, mientras que en el mismo rango, la salmina se muestra completamente ineficiente (fig 79).

Con nucleosomas de eritrocito de pollo (sin superestructura) el desplazamiento de las histonas es total por la protamina galina en el rango 0.6-1.6 (fig 67), mientras que la salmina consigue en el mismo rango, desplazar tan sólo a un 6% de las histonas.

En contraste con la ineficiencia de ambas protaminas para desplazar a las histonas de núcleos genéticamente inactivos con histonas hipoacetiladas, de eritrocito de pollo, utilizando núcleos de testículo de gallo, la protamina galina

es capaz de desplazar completamente a las histonas de una población de nucleosomas que supone aproximadamente el 50% de la cromatina testicular, a una relación arginina/nucleótido = 0.6-1.8, también dentro del rango fisiológico (fig 75). En el mismo rango, la salmuna no desplaza a histonas del octámero.

Esta población de nucleosomas desensamblados por la protamina galina utilizando núcleos, podría corresponder en parte a los nucleosomas en condiciones de ser desensamblados en el proceso de espermiogénesis, no obstante falta establecer esta correlación experimental.

Estos resultados pueden interpretarse en el sentido de que ambos, el número de residuos de arginina por molécula de protamina unidos a un segmento de ADN y el grado de acetilación de las histonas, puede modular el desensamblaje de los nucleosomas. Los residuos de arginina de la protamina pueden establecer enlaces de hidrógeno y interacciones electrostáticas múltiples con los oxígenos de los grupos fosfato, con una afinidad más elevada que las interacciones establecidas por los residuos lisina e histidina de las histonas nucleosómicas (DeSantis et al., 1974), especialmente cuando las cargas positivas de los residuos lisina de las histonas son neutralizadas por acetilación.

Estas notables diferencias entre el número de residuos de arginina y la eficiencia relativa para desensamblar a los nucleosomas "in vitro" por parte de las protaminas de ave y peces, se correlaciona con el tiempo requerido para completar la transición nucleohistona-nucleoprotamina en ambas especies. La espermiogénesis es más bien lenta en los peces (varias semanas) y bastante más rápida en las aves (6 días en el gallo). Una evidencia acerca de esta posible tendencia evolutiva a cambiar el número de residuos de arginina de las protaminas, sería la existencia de una secuencia que se solapa con el codón de terminación del gen de la protamina galina, que si resultara traducida, daría lugar a cinco argininas adicionales incrementando el número de clusters de arginina encontrados en las protaminas (pag 230-240).

La hiperacetilación de las histonas puede contribuir a la apertura de la estructura de la cromatina para permitir la unión de la protamina (Mezquita and Teng, 1977b; Oliva and Mezquita, 1982). Esta modificación química no se ha observado en las especies que retienen histonas en el núcleo del espermatozoide (Ruiz-Carrillo and Palau, 1973; Kennedy and Davies, 1980) y se halla presente en la cromatina de las espermátidas de la trucha, rata y gallo durante el reemplazamiento de las histonas nucleosómicas por la protamina (Christensen and Dixon, 1982; Oliva and Mezquita, 1982; Grimes and Henderson, 1984).

Se ha sugerido que el nivel alcanzado de acetilación de los residuos lisina durante la espermiogénesis (8-10 residuos) sería suficiente para abrir la estructura nucleosómica (Bode et al., 1983; Christensen et al., 1984; Bertrand et al., 1984; Cary et al., 1982)(pag 173). No obstante, no está del todo claro hasta que punto la hiperacetilación de las histonas cambia la estabilidad de las estructuras nucleosómicas o polinucleosómicas. Aunque la cromatina acetilada estaría algo menos condensada que la cromatina control, la hiperacetilación de las histonas no previene la formación de la fibra de 30 nm (McGhee et al., 1983) en las condiciones utilizadas en estos experimentos. A diferencia de estos estudios, la neutralización de las cargas positivas de las histonas durante la transición nucleohistona-nucleoprotamina, tiene lugar en presencia de protaminas y poliaminas (Oliva and Mezquita, 1982; Oliva et al., 1982) y puede producir bajo estas circunstancias una disrupción de la estructura de la cromatina creando sitios para la unión de la protamina (Mezquita and Teng, 1977b; Oliva and Mezquita, 1982; Oliva and Mezquita, 1986).

Si al final de la espermiogénesis ocurriera una proteólisis de las histonas, tal como se ha sugerido (Marushige and Marushige, 1983), las proteasas hidrolizarían a las histonas después de su desplazamiento del ADN por la protamina. Proteólisis de histonas no unidas al ADN se ha observado en otros sistemas (Tsurugi and Ogata, 1979; Tsurugi et al., 1983).

4.3.- SECUENCIA Y EXPRESION DEL GEN DE LA PROTAMINA GALINA.

4.3.1.- Estrategia seguida:

Conociendose de antemano la secuencia a nivel proteico, existen diversas estrategias que pueden utilizarse para conseguir la secuencia del gen que codifica para esta proteina:

- 1ª) Seleccionar el gen o cDNA mediante una sonda correspondiente al gen de la protamina de otra especie evolutivamente próxima.
- 2ª) Preparar anticuerpos frente a la proteina, clonar el cDNA en un vector de expresión y detectar mediante anticuerpos aquellos clones que expresan la proteina.
- 3ª) Preparar un oligonucleótido sintético guiándose por la secuencia obtenida previamente a nivel proteico.
- 4ª) La estrategia seguida (pag 219).

La variabilidad evolutiva a la que están sometidos los genes de las protaminas, y la falta de hibridación entre genes de protaminas distantes desaconsejó la primera posibilidad.

La segunda posibilidad presentaba 2 graves inconvenientes: 1º) Las proteínas son muy poco inmunogénicas, 2º) Aquellos clones que expresaran protamina, resultarían rápidamente inactivados genéticamente como consecuencia del efecto condensante que las protaminas ejercen sobre el ADN.

El inconveniente de la tercera posibilidad es que la mayoría de aminoácidos de la protamina galina son argininas, y precisamente este aminopácido puede ser codificado por 6 codones distintos (CGC, CGG, CGA, CGT, AGG, AGA), incrementando la posibilidad de no acertar a la hora de la construcción del oligonucleótido sintético.

Aparte de las razones teóricas para haber utilizado la 4ª posibilidad, los resultados efectivamente indican que se ha conseguido aislar (y hasta el presente secuenciar en parte) el cDNA correspondiente al gen de la protamina galina.

La centrifugación de una suspensión de células testiculares a pocas "g", dió lugar a un sobrenadante enriquecido en espermátidas alargadas y redondas (85%), donde supuestamente debería encontrarse el ARN mensajero codificante para la protamina galina (fig 83). El método utilizado para preparar el ARN (Chirgwin et al., 1979), es uno de los mejores que existen para evitar la acción de las RNAasas (Sirvió para aislar el ARN mensajero de la insulina en el pancreas, tejido de los más ricos en RNAasas) y efectivamente sirvió para conseguir poblaciones de ARN intactas (fig 84).

Al seleccionar los Poly A⁺ mRNA mediante cromatografía en oligo dT-celulosa (fig 85), existía el riesgo de que si el mensajero codificante para la protamina galina fuese poly A⁻, se perdería junto con los ARN ribosómicos y ARN de transferencia. No obstante en vistas a que otros genes de protaminas (Dixon, 1985; Kleene et al., 1984) contienen poly A⁺, se siguió adelante suponiendo que esta especie también presentaría cola de poliadenilación.

La síntesis del cDNA por el método de Okayama and Berg (1982) (fig 86), resultó ser correcta, y todos los pasos hasta la selección de distintos tamaños de cDNA indicaron que este se hallaba íntegro y en buenas condiciones (fig 87-88).

A pesar de que el tamaño de cDNA seleccionado para el clonaje oscilaba alrededor de 350-1000 bp (fig 88-89), el tamaño de los inserts obtenidos presentó tan sólo una media de 200 bases (100-400) (pag 230-2333). Probablemente esto es en parte debido a que los fragmentos pequeños resultan clonados con más eficiencia que los grandes. Además, según se desprende del análisis de las secuencias EcoRI de los extremos de los inserts, algunos de estos sitios de restricción corresponden al propio "insert", indicando que la eficiencia de metilación de los sitios de restricción para EcoRI no fué del 100%.

4.3.2.- Secuencias obtenidas por el método de Sanger:

De los 117 clones secuenciados, 4 correspondieron al extremo C-terminal codificante y región 3' no codificante del gen de la protamina galina, 21 resultaron ser ilegibles, 18 corresponden con certeza a poly A⁺ mRNA todavía no identificados y el resto a "inserts" del cDNA cuya secuencia todavía no se ha identificado.

Los clones no identificados corresponden a proteínas que potencialmente tienen que expresarse durante la espermiogénesis (pag 59), y su identificación se abordará inicialmente a base de comparar estas secuencias con bancos de datos de ácidos nucleicos y proteínas para buscar homologías.

Los fragmentos secuenciados correspondientes al gen de la protamina galina, corresponden a pequeños "inserts" (160 bases). Un clon (Nº 261) estaba en el límite de ser legible, y la única diferencia que presentaba con los clones claramente legibles (Nº 59) era que poseía una cola de polyadenilación un poco más larga y una secuencia adicional correspondiente a la región codificante (fig 94). Estos hechos junto con la riqueza en "C+G" del fragmento secuenciado y la tendencia que las zonas ricas en "C+G" presentan a replegarse sobre sí mismas, indicaba que tal vez las secuencias ilegibles cuyo ADN hibridaba con la sonda de la protamina galina, correspondían al cDNA del gen de la protamina galina con una longitud completa. Tan sólo pequeños inserts, debido a su reducida complejidad, podrían ser leídos por este método enzimático de Sanger.

4.3.3.- Región codificante:

El único codón que codifica para la arginina en la zona secuenciada de la región codificante, es el "CGC". Dada la riqueza en el aminoácido arginina de esta región, la riqueza en "C+G" de esta región resulta ser del 85%. Este elevado % de "C+G" es congruente con el observado en las secuencias

del gen de la protamina en otras especies (Kleene et al., 1985; Dixon et al., 1985). La secuencia de aminoácidos de esta región, deducida a partir de la secuencia de nucleótidos del cDNA, corresponde con la secuencia descrita con anterioridad a nivel proteico (Nakano et al., 1976).

4.3.3.- Región flanqueante 3':

Los resultados indican que en el gallo (fig 93), al igual que en la trucha y en el ratón (Dixon et al., 1985; Kleene et al., 1985), esta región contiene la señal canónica de poliadenilación AAUAAA, supuesta necesaria para la poliadenilación y/o la terminación del transcrito (Fitzgerald and Shenk, 1981; Montell et al., 1983).

En los clones N° 59 y N° 361, la cola de poliadenilación presenta una longitud de 20-43 adeninas.

La longitud de esta región flanqueante 3' hasta el punto donde se inicia la cola de poliadenilación, es en el gallo de 79 bases. Esta longitud estaría comprendida entre la de esta misma región en el ratón (147 bases en la protamina I) y en la trucha (59 bases).

Solapándose con el codón de terminación, existe una secuencia, seguida de otro codón de terminación, que si resultara traducida daría lugar a un dominio básico adicional (Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Tyr-(End)) que incrementaría el número de bloques de arginina encontrados en las protaminas. Tal vez esta secuencia tenga un cierto interés evolutivo (pag 270).

Al igual que en la trucha, esta región no es especialmente abundante en "A+T".

4.3.4.- Expresión del gen de la protamina galina:

El resultado de los "Northernblots" del ARN obtenido de testículos de gallo en distintas fases de desarrollo e hibridándolos con sondas preparadas a partir del clon N° 59, indica que la expresión del gen de la protamina galina es postmeiótica (fig 100). En las espermátidas haploides, la expresión de alelos recesivos podría tener consecuencias en la diferenciación evolutiva del espermatozoide (Erickson et al., 1981; Bennet, 1985).

De los "Northernblots", se deduce también que existen dos poblaciones distintas del ARN mensajero del gen de la protamina galina, con tamaños aproximados de 420 y 465 bases respectivamente (fig 100).

La existencia de un componente proteico minoritario que migra cerca de la protamina galina en los geles ácidos y que presenta la misma insolubilidad al SDS que la protamina galina (fig 65-B), podría interpretarse como una variante todavía no descrita de protamina, codificada por una de estas dos poblaciones de ARN mensajero. No obstante, parece más probable que estas dos poblaciones de ARN mensajero correspondan a moléculas de ARN-poli.A en diferente estado de procesamiento (Sinclair and Dixon, 1982; Kleene et al., 1984).

CONCLUSIONES

- Durante la espermatogénesis del gallo tiene lugar un aumento de la biosíntesis y de los niveles de poliaminas, alcanzando su máximo en coincidencia con la transición nucleohistona-nucleoprotamina.
- Coincidiendo con los cambios estructurales que la cromatina experimenta en la transición nucleohistona-nucleoprotamina, la histona H4 experimenta una hiperacetilación.
- Esta hiperacetilación tiene lugar en presencia de un elevado recambio de grupos acetilo. Las actividades histona acetiltransferas y desacetilasa determinadas "in vitro" resultan congruentes con este elevado recambio de acetilación.
- Los resultados obtenidos sobre la hiperacetilación de la histona H4, demuestran que este no es un fenómeno exclusivo de los genes activos como había sido sugerido, ya que se da también en estas células genéticamente activas durante la transición nucleohistona-nucleoprotamina.
- El significado de esta hiperacetilación de la histona H4 tiene que estar relacionado con los cambios estructurales que durante la espermatogénesis conducen al desensamblaje de los nucleosomas y al reemplazamiento de las histonas por la protamina.
- La protamina galina, con un tamaño de casi el doble del de las protaminas de peces, presenta una eficiencia muy superior para desensamblar a las histonas de nucleosomas "in vitro", provocando un desplazamiento total de las histonas a relaciones arginina/nucleótido = 0.6-1.2, próximas a las fisiológicas (0.8).
- Utilizando salmón, la hiperacetilación de las histonas facilita el desensamblaje de los nucleosomas.
- Ambos, el número de residuos de arginina de las protaminas y la acetilación de las histonas, modularían el desensamblaje de los nucleosomas.

- La histona H1 es la primera en resultar extraída por las protaminas "in vitro", y el desensamblaje del octámero parece iniciarse desensamblando primero las histonas H2A y H2B.
- Con núcleos de testículo de gallo, la protamina galina consigue extraer una población de nucleosomas (50% del total) en un rango arginina/nucleótido = 0.6-1.6 próximo al fisiológico. Dicha población podría corresponder a aquellos nucleosomas que ya se encuentran estructuralmente dispuestos para ser desensamblados en la transición nucleohistona-nucleoprotamina.
- En conjunto los resultados de desensamblaje "in vitro" sugieren que la protamina galina se halla directamente involucrada en el desensamblaje de los nucleosomas que tiene lugar durante la transición nucleohistona-nucleoprotamina en la espermatogénesis del gallo.
- A través de clonar en M13, cDNA preparado por el método de Okayama and Berg (198) a partir de ARN mensajero aislado y purificado a partir de células testiculares de gallo , y secuenciar al azar 114 clones, se ha obtenido entre diversas secuencias correspondientes a poly A⁺ mRNA, la secuencia de un fragmento del extremo C-terminal codificante y 3' no codificante del cDNA correspondiente al gen de la protamina galina.
- La secuencia obtenida, correspondiente al gen de la protamina galina, muestra la señal y la cola de poliadenilación; el único codón que codifica para la arginina en la región codificante es el "CGC", y la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos del cDNA coincide con la secuencia descrita a nivel proteico con anterioridad para la protamina galina.
- Solapándose con el codón de terminación de la protamina galina, existe una secuencia (seguida de otro codón de terminación), que si resultara traducida daría lugar a 5 argininas seguidas de una tirosina, incrementando el número de clusters de arginina encontrados en la protamina galina.

- Según se deduce del análisis de "Northern blots" de ARN procedente de testículos en distintas fases de desarrollo, la síntesis del ARN mensajero que codifica para la protamina galina es postmeiótica, y existen dos poblaciones de mensajeros correspondientes a esta proteína.

BIBLIOGRAFIA

- Agell N., Chiva M. and Mezquita C. (1983) FEBS letters 155, 209-212.
- Agell N. and Mezquita C. (1985) Biologia del desenvolupament 3, 173-180
- Agrell I. and Heby O. (1971) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd 352. S.39-42.
- Ahmed K., Davis A.T. and Gouelli S.A. (1983) Biochem.J. 209, 197-205.
- Alhonen-Hongisto L. (1980) Biochem.J. 190, 747-754.
- Alestrom P., Akusjarvi G., Lager M., Yeh-Kai L. and Pettersson U. (1984) J. Biol. Chem. 259, 13980-13985.
- Altenburger W., Hörz W. and Zachau H.G. (1976), Nature 264, 517-522.
- Allfrey, V.G. (1977) en "Chromatin and Chromosome structure", Li, H.J. and Eckhard, R.A. eds pp 167-192, Academic Press, N.Y.
- Allfrey V.G. (1980) en "Cell Biology" Golstein L. and Prescott D.M. eds pp 348-433, Academic Press N.Y.
- Ames B.N. and Dubin D.T. (1960) The Journal of Biological Chemistry 235, 769-775.
- Ando T., Watanabe S. (1969) Int. J. Protein Peptide Res. 1, 221-224.
- Ando T., Yamasaki M. and Sezuki K. (1973) Protamines: Isolation, characterization, structure and function, Springer Berlin.
- Anehus H., Emanuelsson H., Persson L., Sundler E., Scheffler I.E. and Heby O. (1984) European Journal of Cell Biology 35, 264-272.

- Anderson P.J., Bardocz R., Campos R. and Brown D.L. (1985) Biochem.Biophys.Res.Comm. 132, 147-154.
- Atmar V.J. and Khuen G.D.(1981) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78, 5518-5522.
- Auberger P., Samson M., Cam G.L. and Cam A.L.(1984) Biochimica et Biophysica Acta 801, 461-469.
- Avivi and Leder (1972) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 69, 1408-1412.
- Axel (1978) Methods in Cell Biology 17, pag 41-54,G.Stein J.Stein L.J.Kleinsmith eds. Academic Press N.Y.
- Baase W.A., Staskus P.W., Allison S.A.(1984) Biopolimers 23, 2835-2851.
- Bankier A.T. and Barrell B.G. (1983)Biochemistry vol B5 "Techniques in nucleic acid Biochemistry" Flavell R.A. ed. Elsevier.
- Balhorn R.(1982)The Journal of Cell Biology 93, 298-305.
- Bakayev V.V., Bakayeva G., Schmatchenko V.V. and Georgiev G.P.(1978) Eur.J.Biochem.91, 291-301.
- Bailei J.M. and Davidson N. (1976) Analitical Biochemistry 16, 75-85.
- Batholeyns J., Mamont P. and Casara P.(1984) Cancer Res. 44, 4972-4977.
- Barcellona W., Brackeen r.B. and Brinkley B.R.(1974) J. Reprod.Fertil. 39, 41-48.
- Berger F.G., Szymanski P., Reade Watson (1984) J.Biol.Chem 259, 7941-7946.
- Bertrand E., Erard M.,Gómez-Lira M. and Bode J. (1984) Archives of Biochemistry and Biophys 229, 395-398.

- Beninetti S., Piacenti M., Argento-Cerú M.P., Ruso-Caia S. and Autouri F. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 841, 120-126.
- Bennet D. (1975) *Cell* 6, 441.
- Bird A., Taggart M., MacLeod D., (1981) *Cell* 26, 381-390.
- Bitonti A.J., Bacchi C.J. McCann P.P. and Sjoerdsma A. (1985) *Biochem. Pharmacol.*
- Bloch D.P. (1969) *Genetics Suppl.* 61, 93-110.
- Blankenship J. and Marchant P.E. (1984) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 177, 180-187.
- Bogdanova E.S. (1984) *FEBS Letters* 175, 321-334.
- Bonne-Andrea C., Harper F., Sobczak J. and De Recondo A.M. (1984) *EMBO J.* 3, 1193-1199.
- Bode J., Willmitzer L., Arfmann H-A and Wehling K. (1979) *Int. J. Biology Macromolecules* 1, 73-78.
- Bode J., Henko K. and Wingender E. (1980) *Eur. J. Biochem.* 110, 143-152.
- Bode J., Gómez-Lira M. and Schröter H, (1983) *Eur. J. Biochem.* 130, 437-445.
- Bode j. (1984) *Archives of Biochemistry and Biophysics* 228, 364-372.
- Bode W.M. Willmitzer, L. and Opatz K. (1977) *Eur. J. Biochem.* 72, 393-403.
- Boix J. and Roca J. (1984) *Biologia del Desenvolupament* 2, 77-84.
- Boix J. and Mezquita C. (1985) *Biologia del desenvolupament* 3, 137-142.

- Bonner W.M. and Laskey R.A. (1974) *Eur. J. Biochem* 46, 83-88.
- Bouvier D. and Chevalier P. (1976) *Cytobiol.* 12, 287-304.
- Bradford W.B. and Rhodes D. (1983) *Nature* 301, 482-488.
- Bradbury E.M., MacLean N. and Matthews H.R. (1981) "Chromatin Structure" Blackwell Scientific Publications. London
- Bradbury E.M., Price W.C. and Wilkinson G.R. (1962) *J. Molec. Biol.* 4, 39-49.
- Burlingame R.W., Love W.E., Wang B.C., Hamlin R., Xuong N-H., and Mourdinakis N. (1985) *Science* 228, 546-553.
- Burton K. (1968) in *Methods in Enzymology*. Grossman L. and Mondale K. Eds., Vol XII pp 163-169.
- Caldarera C.M., Zappia V., Bachrach U. eds (1981) *Advances in Polyamide Research*. Vol 3 New York: Raven 493.
- Canellakis E.S., Kyriakidis D.A., Rinehard C.C., Huang S.C., Panagiotidis C. and Fong W.F. (1985) *Bioscience Reports* 5, 189-204.
- Candido E.P.M. and Dixon G.H. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 3868-3873.
- Cary P.D., Crane-Robinson C., Bradbury E.M. and Dixon G.H. (1982) *Eur. J. Biochem.* 127, 137-143.
- Chahal S.S., Matthews H.R. and Bradbury E.M. (1980) *Nature* 287, 76-79.
- Chattoraj D.K., Gosule L.C. and Schellman J.A. (1978) *J. Mol. Biol.* 121, 327-337.
- Chayen R. (1984) *Cell Biochemistry and function* 2, 15.
- Chambers S.A.M. and Shaw B.R. (1984) *The Journal of Biological Chemistry* 259, 13458-13463.

- Christensen M.E. and Dixon G.H.(1982) Dev.Biol.93, 404-415.
- Christensen M.E., Ratner J.B. and Dixon G.H.(1984) Nucleic Acids Res. 12, 4575-4593.
- Chiva M. and Mezquita C. (1983) FEBS Letters 162, 324-328.
- Chiva M and Subirana J.A.(1986) Biologia Molecular III Jornadas Sant Quirze de Safaja, Barcelona, pag 9. 3.
- Chen K.Y., Presepe V., Parken N., Liu A.Y.(1982) J. of Cell. Physiol. 110, 285-290.
- Chen Y.K.(1984) Molecular and cellular Biochemistry 58, 91-97.
- Chirgwin J.M., Przyba A.E. MacDonald R.J. and Rutter W.J. (1979) Biochemistry 18, 5294-5299.
- Clarke G.H. and Shankel D.M. (1975) Bocteriol.Rev. 39, 33-53.
- Cohen S.S.(1978) en Advances in Polyamine Research (Cambell R.A., Morris D.R. Bartos D., Daves G.D. and Bartos F eds. vol 1 y 2 . Raven Press, N.Y.
- Corcés V.G., Salas J., Salas M.L. and Avila J. (1978) Eur. J.Biochem 86, 473-479.
- Corden J., Wasylyk B., Buchwalder A., Sassone-Corsi P. Kedinger C. and Chambon P (1980) Science 209, 1406-1414.
- Cooper H.L., Park M.H. Folk J.E. Safer B., and Braverman R. (1983) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80, 1854-1857.
- Cotten M. and Chalkley R. (1985) Nucleic Acids Research 13, 401-414.
- Cox R.(1979) Biochem.Biophys.Res.Commun. 86, 594-598.

- Corominas M. and Mezquita C.(1985) J.Biol.Chem. 260, 16269-16273.
- Corominas M and Mezquita C.(1985) Biologia del Desenvolupament 3, 167.
- Coeling J.P. and Rozijnt H. (1975) Biol.L.Linn.Soc. 7, Suppl 1 245-256.
- Crick F.H.C.(1976) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73, 2639-2643.
- Crick F.C. and Klug A.(1975) Nature 255, 530-533.
- Csordas A., Multhaup I. and Grunicke H.(1984) Bioscience Reports 4, 155-163.
- Davidson E.H.(1976)en "Gene activity and Development" Capítulo 8. Academic Press, N.Y.
- Della Ragione F. and Pegg A.E.(1983) Biochemical Journal 213, 701-706.
- Della Ragione E. and Pegg A.E.(1984) en "Advances in Biomedical Sciences" Calderera C.M. and Bachrach U. eds. pp 97 -104 CIUEB. Bologna.
- Dixon G.H., Aiken J.M., Jankovski J.M., McKenzie D.I., Moir R and States J.C. (1985) en "Chromosomal Proteins and Gene Expression" (Reeck G.R., Goodwin G.H. and Puigdomenech P. eds) Plenum Press, N.Y.
- Dion A.S. and Cohen S.S.(1972) J.Virol.9, 419-422.
- Di Nardo S., Voelkel K. and Sternglanz R.(1984) Proc.Natl. Acad.Sci.USA. 81, 2616-2620.
- Dobson M.E. and Ingram V.M. (1980) Nucleic Acids Research 4201-4219.
- Dod B., Kervabon A. and Parello J.(1982) Eur. J.Biochem.121, 401-405.

- Doenecke D. and Gallwitz D.(1982) Molecular and Cellular Biochemistry 44, 113-128.
- Douvas A.S., Harrington C.A. and Bonner J. (1975) Proc.Natl. Acad.Sci.USA 72, 3909-3906.
- Dubnoff J.W.(1941) J.Biol.Chem. 141, 711-716.
- Duerre J.A., Quick D.P., Traynor M.D. and Onisk D.V.(1982) Biochimica et Biophysica Acta 719, 18-23.
- Dykstra W.G. and Herst E.J.(1965) Science 149, 428-429.
- Eloranta T.O. and Kajander E.O.(1984) Biochem.J.224, 137-144
- Erickson R.P.(1973) Nature 243, 210-213.
- Erickson R.P., Kramer J.M., Rittenhouse J. and Salkeld A. (1980) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77. 6086-6090.
- Erickson R.P., Lewis S.E. and Butley M.(1981) J.Reprod. Immunol. 3, 195-217.
- Erwin B.G. and Pegg A.E.(1982) Biochem.Pharmacol. 31, 2820-2823.
- Erwin G., Seely J.E. and pegg A.E. (1983) Biochemistry 22, 3027-3032.
- Erwin G., Persson L. and Pegg A.E. (1984) Biochemistry 23, 4250-4255.
- Evans K., Konigsberg P. and Cole R.O.(1970) Arch. Biochem. Biophys. 141, 389.
- Ewton D.Z., Erwin B.G., Pegg A.E. and Florini J.R. (1984) Journal of Cellular Physiology 120, 263-270.
- Farr R.M., Luckow V. and Sundharadas G.(1979) Exp. Cell. Res. 121, 428-432.
- Feughelman M. et al.(1955) Nature 175, 834-838.

- Fitzgerald M. and Shenk T.(1981) Cell 24, 251-260.
- Finch J.T., Lutter L.C., Rhodes D., Brown R.S., Rushton B., Levitt M. and Klug A.(1977) Nature 269, 29-36.
- Finkelstein J.D. and Martin J.J.(1984) J.Biol.Chem. 259, 9508-9513.
- Fout G.S., Merappa K.C., Mapoles J.E., and Rueckert R.R.(1984) The Journal of Biological Chemistry 259, 3639-3643.
- Fujimoto H., Erickson R.P., Quinto M. and Rosenberg M.P. (1984) Bioscience Reports 4, 1037-1044.
- Fujimoto H. and Erickson R.P.(1982) Biochim.Biophys Res. Commun. 108, 1369-1375.
- Gallwitz D. and Sures L. (1972) Biochim..Biophys. Acta 263, 315-328.
- Gawlita et al., (1981) Cell and Tissue Res. 215, 249-261.
- Goldberg D.A. (1980) Proc.Natl.Acad:Sci.USA 77, 5794.
- Gedamu L., Wosnick M.A., Connor W., Watson D.C. and Dixon G.H. (1981) Nucleic Acids Res. 9, 1463-1482.
- Gedamu L., Davies P.L. and Dixon G,H.(1977) Biochemistry 16, 1383-1391.
- Gerner E.W., Glass J.R. and Fuller D.J.M.(1985) Journal of Cellular Physiology 125, 567-572.
- Geiger L.E., Morris D.R.(1978) Nature 272, 730-732.
- Geiger L.E. and Morris D.R.(1980) J.Bacteriol. 141, 1192-1198.
- Glikin G.C. Ruberti I. and Worcel A.(1984) Cell 37, 33-41.

- Gosule L.C. and Schellman J.A.(1978) J.Mol.Biol. 121, 311-326.
- Gosule L. and Schellman J. (1976) Nature 259, 333-335.
- Gottesman S. and Gottesman M. (1975) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 72, 2188-2192.
- Grimes S.R., Chae C.B. and Irwin J.L. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 168, 425-435.
- Grimes S.R. and Henderson N.(1984b) Dev.Biol. 101, 516-521.
- Grimes S.R. and Henderson N.(1984b) Experimental Cell Research 152, 91-97.
- Grimes S.R. and Henderson N.(1983) Archives of Biochemistry and Biophysics 221, 108-116.
- Grimes S.R. and Smart P.G.(1985) Biochimica et Biophysica Acta 824, 128-139.
- Grant N.J. Oriol-Auditt C. and Dickens M.J. (1983) European Journal of Cell Biology 30, 67-73.
- Grant N.J. and Oriol-Audit C. (1985) European Journal of Cell biology 36, 239-246.
- Grove J., Fozard J.R. and Mamont P.S. (1981) J.Chromatogr. 223, 409-416.
- Groudine M. and Conkin K.F.(1985) Science 228, 1061.
- Gubler U. and Hoffman B.J.(1983) Gene 25, 263-269.
- Guilidori P. Galli-Kinelli M., Catto E. and Stramentinoli G. (1984) J.Biol.Chem. 259, 4205-4211.
- Hathaway G.M. and Traugh J.A.(1984) J.Biol.Chem. 259, 7011-7015.

- Hara T., Takahashi K., Yamamoto M., Kasaki H. and Endo H. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106, 131-138.
- Halligan B.P., Davis J.L., Edwards K.A. and Liu L.F. (1982) *J. of Biol. Chem.* 257, 3995-4000.
- Hardison R. and Chalkley R. (1978) *Methods in Cell Biology* 17, 235-251 (Stein G., Stein J. and Kleinsmith L.J. eds.) Academic Press, N.Y.
- Haddox M.K. and Russell D.H. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 1712-1716.
- Hecht N.B., Bower P.A., Kleene K.C. and Distel R.J. (1985) *Differentiation* 29, 189-193.
- Heby O. and Agrell I. (1971) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd.* 352. S29-38.
- Heby O. (1981) *Differentiation* 19, 1-20.
- Heby O., Oredsson S.M. and Kanje M. (1984) *Adv. Enzyme Regul.* 22, 243-264.
- Heston W.D.W., Fleishmann J., Tackett R.E. and Ratliff T.L. (1984) *Cancer Res.* 44, 243-264.
- Hershko A., Ciechanover A., Hellar H., Haas A.L. and Rose I.A. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1783-1786.
- Hewish D.R. and Burgoyne L.A. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215, 508-510.
- Heby O. and Anderson G. (1980) en "Polyamines in Biomedical Research" (Gaugas J.M. ed.) John Wiley and Sons N.Y.
- Henley C. (1973) *Chromosoma* 42, 163-174.
- Hirose M., Sarui K. and Sumagawa A. (1985) *J. Biochem.* 97, 781-789.
- Hosaka A. and Yamashita (1981) *Eur. J. Biochem.* 116, 1-6.

- Hu N. and Messing J. (1982) *Gene* 17, 271-277.
- Iatrou K. and Dixon G.H. (1977) *Cell* 10, 433-441.
- Iatrou K., Spira A.W. and Dixon G.H. (1978) *Dev. Biol.* 64, 82-98.
- Igarashi K., Kashigawi K., Kishida K., Kakegawa T., Hirose S. (1981) *Eur. J. Biochem.* 114, 127-131.
- Igarashi K., Kashigawi K., Kishida K., Watanabe Y., Kogo A., Hirose S. (1979) *Eur. J. Biochem.* 93, 345-353.
- Igarashi K., Kakegawa T., Hirose S. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 697, 185-192.
- Inoue A. and Fujimoto D. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 220, 307-316.
- Inoue S. and Fluke M. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 204, 296-303.
- Irie S. and Sezaki M. (1983) *Analytical Biochemistry* 134, 471-478.
- Isenberg I. (1979) *Ann. Rev. Biochem.* 48, 159-191.
- Isomaa V.V., Pajunen A.E.I., Bardin C.W. and Jänne O.A. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 6735-7640.
- Jahner D., Stuhlmann H., Steward C.L., Harbers K., Lohler J., Simon I., Jaenni C.H.R. (1982) *Nature* 298, 623-628.
- Jänne J. and Williams-Ashman G.H. (1971a) *J. Biol. Chem.* 246, 1725-1732.
- Jänne J. and Williams-Ashman G.H. (1971b) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 222-229.

Jänne J., Hölttä E., Kallio A. and Käpyajo K. (1983) en Special Topics in Endocrinology and Metabolism vol 5 (Cohen M.P. and Foa P.P. eds.)pp. 227-293 Alan R. Liss, N.Y.

Jänne J. Raina A. and Siimes M. (1964) Acta Physiol.Scand. 62, 352-358.

Jänne J., Pösö H. and Raina A. (1978) Biochim. Biophys. Acta 473, 241-293.

Jänne J. and Morris D.R. (1984) Biochem J. 218, 947-951.

Johns W.E.(1977) en Methods in Cell Biology (Stein G., Stein J. and Kleinsmith L.J. eds.) vol 16, pp 183-203. Academic .. Press, London and N.Y.

Johns E.W. (1964) Biochem.J.92, 55-59.

Kahana C. and Nathans D. (1985) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82, 1673-1677.

Kaye A.M.(1984) Cell Biochemistry and Function 2, 2-6.

Karvonen E. and Pösö H.(1984) Biochim Biophys Res. Commun.791, 239-243.

Kennedy B. & Davies P.L. (1980) J.Biol.Chem. 255, 2533-2539.

Kinohara N., Usui H., Yoshikawa K. and Takeda M.(1984) J. Bichem. 95, 597-600.

Kleene K.C., Distel R.J. and Hecht N.B. (1983) Developmental Biology 98, 455-464.

Kleczkowska D., Niedbalski W. and Zwierzchowski L. (1981) Acta Biochimica Polonica 28, 295-305.

Kleene K.C., Distel R.J. and Hecht N.B.(1985) Biochemistry 24, 719-722.

- Kleene K.C., Distel. R.D. and Hecht N.B. (1984) Dev.Biol. 105, 71-79.
- Klug A., Rhodes D., Smith J., Finch J.T. and Thomas J.O. (1980) Nature 287, 509-516.
- Knuutila S. and Pohjanpelto P. (1983) Exp. Cell Res. 145, 222-226.
- Kontula K.K., Torkkeli T.K., Bardin C.W. and Janne O.A. (1984) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81, 731-735.
- Koenig H., Goldstone A.D. and Lu C.Y. (1983) Biochim.Biophys. Res.Commun. 116, 1039-1048.
- Koenig H., Golstone A.D. adn Lu C.Y.(1983) Proc.Natl.Acad. Sci.USA 80, 7210-7214.
- Kozak M.(1984) Nucleic Acids Research 12, 857-872.
- Kornberg R.D.and Thomas J.O.(1974) Science 184, 865-868.
- Kornberg R.D.(1977) A.Rev.Biochem 46, 931-954.
- Konieczny S.E. and Emerson C.P.(1984) Cell 38, 791-800.
- Kramer D. L., Paul B. and Porter C.W. (1985) Cancer Res. 45, 2512-2515.
- Krasnow M.A. and Cozzarelli N.R. (1982) J.Biol.Chem. 257, 2687-2693.
- Krause M.O. (1978) en Methods in Cell Biology (Stein G., Stein J. and Kleinsmith L.J. eds.) vol 17 pp. 51-58, Academic Press, London and N.Y.
- Kuosmanen M. and Pösö H. (1985) FEBS letters 179, 17-20.

- Kuehn G.D. and Atmar V.J.(1982) Federation Proceedings 41, 3078-3083.
- Laugh J.(1984) Experimental Cell Res. 150, 23-28.
- Lake .E. and Smiles J.(1952) Proc. Soc. Study Fert. 4, 18.
- Laskey R.A. and Mills A.D. (1975) Eur.J. Biochem. 56, 335-341.
- Laskey R.A., Honda B.M., Mills A.D. and Finch J.L. (1978) Nature 275, 416-420.
- Langdon R.C., Fleckman P. and McGuire J.(1984) Journal of Cellular Physiology 118, 39-44.
- Levinger L. and Varshavsky A. (1982) Cell 28, 375-385.
- Lehrach H.D., Diamonds J.M., Wonzey J.M., Boedtner H., Golberg D.A. (1977) Biochemistry 16, 4743.
- Liew C.C., Haslett G.W. and Alfrey V.G. (1970) Nature 226, 414.
- Linderoth N. and Morris D.R. (1983) Biochim.Biophys.Res. Commun. 117, 616-622.
- Libby P.R.(1983) Methods in Enzymol, 94, 325-328.
- Libby P.R. and Bertram J.S.(1980) Archives of Biochemistry and Biophysics 201, 359-361.
- Lipman P.J. and Maizael J.(1982) Nucleic Acids Res. 10, 2723-2739.
- Louie A.J. and Dixon G.H.(1972) J.Biol.Chem. 247, 7962-7968.
- Loir M. and Hochereau de Reviers M.T.(1972) J.Reprod.Fertil. 31, 127-130.
- Loir M and Lanneau M.(1978).Experimental Cell Research 115, 231-243.

- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Loidl P., Loidl A., Puschendorf B. and Gröbner P. (1984) *Nucleic Acids Research* 12, 5405-5417.
- Loir M. and Lanneau M. (1984) *Journal of Ultrastructure Research* 86, 262-276.
- Louie A.J. and Dixon G.H. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 7962-7968.
- Louie A.J. and Dixon G.H. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 5490-5497.
- Louie A.J. and Dixon G.H. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 5498-5505.
- Louie A.J. and Dixon G.H. (1973) *Nature New Biol.* 243, 164-168.
- Loir M. and Courtens J.L. (1979) *Journal of Ultrastructure Research* 67, 309-324.
- López-Rodas G., Perez-Ortín J.E., Tordera v., Salvador M.L. and Franco L. (1985) *Archives of Biochemistry and Biophysics* 239, 184-190.
- Lundkist A., Löwkist B., Linden M. and Heby O. (1983) *Developmental Biology* 95, 253-259.
- Luzzate V. and Nicolaieff A. (1963) *J. Mol. Biol.* 7, 142
- Market R., Houssier C. Fredericq E. (1985) *Biochimica et Biophysica Acta* 825, 365-374.
- Maning G.S. (1978) *Q. Rev. Biophys.* 11, 179-246.
- Marekov L.N., Beltchev B.G. and Pivec L. (1984) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 120, 782-788.
- Marekov L.N., Beltchev B.G. (1982) *Archiv. Biochem. Biophys.* 219, 261-267.
- Maxam and Gilbert (1980) *Methods in Enzymology* 65, 499-460, Grossman L and Moldane (eds,) Academic press N.Y.

- Marx K.A., Ruben G.C. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11, 1839-1854.
- MacIndoe J.H. and Turkington R.W. (1973) *Endocrinology* 92, 595-605.
- Matsui S., Seon B.K. and Sandberg A.A. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 6386-6390.
- Marushige K., Ling V. and Dixon G.H. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 5953-5958.
- Marushige K. and Dixon G.H. (1971) *J. Biol. Chem.* 246,
- Macgregor H.C. and Walter M.H. (1973) *Chromosoma* 40, 243-262.
- Mamont P.S., Siat M., Joder-Ohlenbush A.M.; Bernhardt A. and Casara P. (1984) *Eur. J. Biochem.* 142, 457-463.
- Marton L.J., Oredson S.M., Hung D.T., and Deen D.F. (1983) *Adv. Polyamine Res.* 4, 33-40.
- Marushige Y. and Marushige K. (1975) *Biochimica et Biophysica Acta* 403, 180-191.
- Marushige Y., and Marushige K. (1975) *J. Biol. Chem.* 250,
- Marushige Y. & Marushige K. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 761, 48-57.
- McGhee J.D. and Felsenfeld G. (1980) *Ann. Rev. Biochem.* 49, 1115-1156.
- McKay D.H., Renaux B.S. and Dixon G.H. (1985) *Bioscience Reports* 5, 383-391.
- McGhee J.D., Nickol J.M., Felsenfeld G., Rau D.C. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11, 4065-4074.
- Meistrich M.L. (1977) *Methods Cell Biol* 15, 15-53.
- Mezquita C. and Teng C.S. (1977a) *Biochem. J.* 164, 99-111.
- Mezquita C. and Teng C.S. (1977b) *Biochem. J.* 170, 203-210.

- Mezquita C. and Oliva R. (1984) *Journal of Cell Biology* 99, 502.
- Mezquita C. (1985) en "Cromosomal Proteins and Gene Expression" (Reeck, G.R., Goodwin G.H. and Puigdomenech P. eds.) Plenum N.Y. pp315-322..
- Mezquita C. (1985), *Revisiones sobre Biologia Celular* 5. Servicio Editorial pais Vasco.
- Mezquita J., Chiva M., Vidal S. and Mezquita C. (1982) *Nucleic Acids Research* 10, 1781-1797.
- Mezquita C. and Oliva R. (1985) *Journal of Cell Biology* a
- Menko A.S. and Tan K.B. (1980) *Biochim. Biophys Acta* 629, 359-370.
- Mirzabekov A. Kolchinsky S.D., Melnikova A. (1977) *Eur. J. Biochem.* 75, 379-389.
- Miller R.C. and Philips R.A. (1969) *J. Cell. Physiol* 73, 191-202.
- Mithieux G., Alquier C., Roux B. and Rousset B. (1984) *The Journal of Biological Chemistry* 259, 15523-15531.
- Montell C., Fisher, E.F. Caruthers M.H. and Berk A.J. (1983) *Nature* 305, 600-605.
- Morris D.R., Applebaum O., Koferon K.I. (1970) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 71, 968-976.
- Morris D.R. and Harada J.J. (1980) en "Polyamines in Biomedical Research" (Gaugas ed.) N.Y. John Willey Sons
- Moulinoux J.P., Delamaire D., Beau B., Kemerner V., Brissot P. LeCaine M., Deugnier Y., Chambon Y., Bourel M. (1985) *Clinica chimica Acta* 147, 77-87.
- Morioka K., Tanaka Y., Kezuka K., Suganuma K., Yui K., Ono T. (1983) *Oncodevelopmental Biology and Medicine* 4, 231-237.

- Nagatsu T., Yamaguchi T., Sawada M., Fujita K., Shinpo K., Ito M., Sugimoto T., Matsuura S., Akino M. (1984) *Biogenic Amines* 1, 51-62.
- Nakano M., Tobita T., and Ando T. (1976) *Int.J.Peptide Protein Res.* 8, 565-578.
- Nagl W., Ribicki R., Mertler H.O., Hezel U., Jacobi R., and Bachman E. (1984) *Protoplasma* 122, 138-144.
- Nelson T., Wiegand R. and Brutlag D. (1981) *Biochemistry* 20, 2594-2601.
- Nicchita C.V. and Williamson J.R. (1984) *J.Biol.Chem.* 259, 12978-12983.
- Nikula P., Ruohola H., Alhonen-Hongisto L. and Janne J. (1985) *Biochem. J.* 228, 513-515.
- O'Farrell P.H., O'Farrell P.Z. (1977) *Methods in Cell Biology* Stein G., Stein J. and Kleinsmith L.J. eds. vol 16, pp 407-420.
- Okayama H. and Berg P. (1982) *Molecular and Cellular biology* 2, 161-170.
- Olins A.L. and Olins D.E. (1974) *Science* 183, 330-332.
- Oliva R. and Mezquita C. (1982) *Nucleic Acids Research* 10, 8049-8059.
- Oliva R., Vidal S. and Mezquita C. (1982) *Biochemical Journal* 208, 269-273.
- Oliva R. and Mezquita C. (1986) "Marked differences in the ability of distinct protamines to disassemble nucleosomal core histones in vitro" *Biochemistry* (en prensa).
- Oliva R., Mezquita J., Mezquita C. and Dixon G.H. (1986) "Partial Sequence of a cDNA clone encoding chicken protamine galline" *Journal of Cell Biology* a.

- Oliva R.(1983) *Biologia del Desenvolupament* 1, 101-105
- Oliva R. and Mezquita C.(1985) *Biologia del desenvolupament* 3, 125-136.
- Oliva R.(1984) *Biologia del Desenvolupament* 2, 65-70.
- Oliva R., Mezquita C., Dixon G.H. and Mezquita J.(1985) *Revisiones sobre Biologia Celular* a209. Servicio editorial Universidad del Pais Vasco.
- Oredsson S.M., Anehus S. and Heby O. (1984) *Molecular and Cellular Biochemistry* 64, 163-172.
- Ottersmeyer F.P., Whiting R.F. and Korn A.P.(1975) *Proc.Natl. Acad.Sci.USA* 72, 4953-4955.
- Oyanagui Y.(1984) *Agents and Actions* 14, 228-237.
- Palés J.L., Lopez A. and Vidal S.(1984) *Scand.J.Haemathol.* 32, 241-244.
- Pardon J.F., Wilkins M.H.F. and Richards B.M.(1967) *Nature* 215, 507-509.
- Park M.H., Chung S.I., Cooper H.L. and Folk J.E.(1984a) *J.Biol.Chem.* 259, 4563-4565.
- Park M.H., Liberato D.J. Yergey A.L. and Folk J.E.(1984b) *J. Biol.Chem.* 259, 12123-12127.
- Pasek M., Goto T., Gilbert W., Zinle B., Schaller H. Mzckay P., Leadbetter G. and Murray K.(1979) *Nature* 282, 575-579
- Paonesa G., Metafora S., Tajana G., Abrescia P., De Santis A., Gentile V. and Porta R.(1984) *Science* 226, 852-855.
- Pestaña A and Petot H.C. (1974) *Nature* 247, 200.
- Pegg A.E. and McCann A.E.(1982) *Am.J.Physiol.* 243, C212-C221.
- Pegg A.E., Wechter R., Clark R.S., Wiest L. and Erwin B.G. (1985a) *Biochemistry* (in press)

Pegg A.E., Erwin B.G. and persson L. (1985b) *Biochim. Biophys. Acta* 842, 111-118.

Pegg A.E. (1986) *Biochem J.* 234, 249-262.

Pegg A.E., Tang K.C. and Coward J.K. (1982b) *Biochemistry* 21, 5082-5089.

Pegg A.E., Seely J.E., Pösö H., Della Ragione F. and Zagon I.S. (1982a) *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 41, 3065-3072.

Persson L., Rosengren E., Sundler F. and Uddman r. (1983) *Methods Enzymol* 94, 166-169.

Pingoud A. (1985) *Eur. J. Biochem.* 147, 105-109.

Pingout A., Urbanke C., Alves J., Ehbrecht H.J., Zabeau M. and Gualerzi C. (1984) *Biochemistry* 23, 5697-5703.

Pienta K.J. and Coffey D.S. (1984) *J. Cell. Sci. Suppl.* 1, 123-135.

Pohjanpelto P., Hölltä E. and Jänne O.A. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5, 1385-1390.

Pochon F., Cohen S.S. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 720-726.

Polge C. (1980) en "Low temperature preservation in Medicine and Biology" (Ashwood-Smith, M.J. & Farrant J., eds.) pp. 45-64, Pitmen medical, Tenbridge Wells, Kent

Porschke D. (1984) *Biochemistry* 23, 4821-4828.

Pohjanpelto P. and Knuutila S. (1982) *Experimental Cell Research* 141, 333-339.

Przybyla A.E., MacDonald R.J., Harding J.D., Pictet R.L. and Rutter W.J. (1979) *The Journal of Biological Chemistry* 254, 2154-2159.

Prosser F.H., Schmidt C.J., Nichols S.V. and Nichols W.K. (1984) *Journal of Cellular Physiology* 120, 75-82.

- Raina A.(1963) Acta physiol.Scand. 60, Sppl. 218, 1-81.
- Rajalakshmai S., Rao P.M. and Sarma S.R.(1978) Biochemistry 17, 4515-4518.
- Rich A., Nordheim A. and Wang A.H.F.(1984) Ann.Rev.Biochem. 53, 791-846.
- Richmond T.J., Finch J.T., Rushton B., Rhodes D. and Klug A. (1984) Nature 311, 532-537.
- Robinson R.D. and Halton D.W.(1982) Z.Parasitenkd 68, 53-72.
- Rosenblum M.G. and Gutterman J.U.(1984) Cancer Res.44, 2339-2340.
- Rosenheim O.(1924) Biochem.J. 18, 1253-1262.
- Rowlatr C. and Smith G.J.(1981) J.CellSci.48, 171-179.
- Rocamora N. and Mezquita C.(1984) FEBS letters 177, 81-84.
- Roca J. and Mezquita C.(1985) Biologia del desenvolupament 3, 151-156.
- Rüssel D.H. (1980) Pharmacology 201, 117-129.
- Russell D.H. (1973) Polyamines in normal and neoplastic growth. Raven press, N.Y.
- Ruiz-Carrillo A. and Palau J.(1973) Dev.Biol. 35, 115-123.
- Ruiz-Carrillo A., Wang L.J. and Allfrey V.G.(1975) Science 190, 117.
- Ryoji M. and Worcel A.(1984) Cell 37, 21-32.
- Sano Y., Deen D.F., Oredson S.M. and Marton L.J.(1984) Cancer Res 144, 577-581.
- Sanderson R.J. and Bird K.E.(1977) Methods in Cell Biology 15, 1-14 (Prescott Dm ed.) Academic Press, N.Y.

- Sanders M.M. and Dixon G.H. (1972) *The Journal of Biological Chemistry* 247, 351-355.
- Sakai M., Kuriyama Y.F. and Muramatsu M. (1978) *Biochemistry* 17, 5510-5515.
- Sautiere P., Belaiche D., Martinage A. and Loir M. (1984) *Eur. J. Biochem* 144, 121-125.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. (1977) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Scraba D.G., Bradley R.D., Leyritz-Wills M. and Warren R.A.J. (1983) *Virology* 124, 152-160.
- Seiler N., Bokenius F.N. and Renert O.M. (1981) *Med. Biol.* 59, 334-346.
- Seiler N., Sarhan S. and Roth-Schechter F. (1984) *Neurochemical Research* 9, 871.
- Seely J.E. and Pegg A.E. (1983a) *J. Biol Chem.* 258, 2496-2500.
- Seely J.E. and Pegg A.E. (1983b) *Biochem. J.* 216, 701-717.
- Sealy L. and Chalkley R. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 197, 78-82.
- Shibayama T., Nakaya K., Nakamura Y. (1983) *J. Biochem.* 94, 1579-1586.
- Shalitin C. and Vishlizky A. (1984) *Biochimica et Biophysica Acta* 782, 328-330.
- Shih T.Y. and Bonner J. (1970) *J. Mol. Biol.* 117, 909-926.
- Sipski M.L. and Wagner T.E. (1977) *Biology of Reproduction* 16, 428-440.
- Siclair G.D. and Dixon G.H. (1982) *Biochemistry* 21, 1869-1877.
- Singleton C.K., Klysik J., Stirdivant S.M. and Wells R.D. (1982) *Nature* 299, 312-317.

- Sinclair G.D. and Dixon G.H. (1982) *Biochemistry* 21, 1869-1877.
- Sjoerdsma A., and Schechter P.J. (1984) *Clin. Pharmacol. Ther.* 35, 287-300.
- Sjoerdsma A., Golden J.A., Schechter P.J., Barlow L.J.R.; and Santi V.D. (1984) *Trans. Assn. Physicians* 97, 70-79.
- Speckert W., Kennedy B., Daisley L. and Davies P. (1983) *Eur J. Biochem.* 136, 283-289.
- Sperrazza J.M., Spremulli L.L. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11, 2665-2679.
- Stein A., Whitlock J.P. and Bina M. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5000-5004.
- Stros M., Skalka M., Matyasova J. and Cejkova M. (1984) *gen. Physiol. Biophys.* 3, 307-316.
- Stern L., Kleene K.C., Gold B. and Hecht N.B. (1983) *Experimental Cell research* 143, 247-255.
- Strauss F. and Varshavsky A. (1984) *Cell* 37, 889-901.
- Stevens M.S., Alibadi Z. and Moore M.R. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 132-138.
- Subirana J.A. (1982) *Proceedings of the Fourth International Symposium on Spermatology, Seillac. France.*
- Subirana J.A. (1975) in "The Biology of the Male Gamete" Vol 7, (Duckett J.E. and Racey P.A. eds.) *Suppl 1 Academic Press N.Y.*
- Suwalsky M. and Traub W. (1972) *Biopolymers* 11, 2223.
- Suau P. and Subirana J.A. (1977) *J. Mol. Biol.* 117, 909-926.
- Sunkara P.S., Prakash N.S., Mayerg G.D. and Sjoerdsma A. (1983) *Science* 219, 851-853.

- Sunkara et al., (1979) Exp.Cell res. 119, 63-68.
- Sunkara P.S., Prakash N.J., Rosenberg A.L., Hagan A.C.
Lachman P.J. and Mayer G.D. (1984) Cancer Res. 44, 2799-2802.
- Suau P., Kneale G.G., Braddock G.W., Baldwin J.P. and Bradbury E.M.(1977) Nucleic Acids Research 4, 3769-3786.
- Tabor C.W. and Tabor H.(1976) Ann.Rev.Biochem. 45, 285-306.
- Tabor C.W. and Tabor H.(1984) Ann.Rev.Biochem. 53, 749-790.
- Takigawa M., Verma A.K., Simsiman R.C. and Boutel R.K.(1982) Biochim. Biophys.Res.Commun. 105, 969-976.
- Taylor J.H.(1984) Cell Biol. Macrograhs 11.
- Tanphaichitr N., Bobtton P., Chalermisarachi P. and Chutatape C..(1982) Gamete Research 6, 235-255.
- Tabor C.W. and Tabor H.(1984) Adv.Enzymol.Relat.Areas Mol. Biol. 56, 251-282.
- Thomas J.O. and Kornberg R.D.(1978) en Methods in Cell Biology (Stein G, Stein J. and Kleinsmith L.J. eds.) vol 18, 429-440. Academic Press, London and N.Y.
- Thompson R.C., Dix D.B., Gerson R.B. and Karim A.M.(1981) J.Biol.chem. 256, 6676-6681.
- Thompson R.C., Kairm A.M.(1982) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79, 4922-4926.
- Thomas T.J. and Bloomfield V.A.(1984) Biopolymers 23, 1295-1306.
- Thomas J.O. and Kornberg R.D.(1975a) Proc.Natl.Acad.Sci. USAS 72, 2626-2630.
- Thomas J.O. and Kornberg R.D.(1975b) FEBS letters 58, 353-358.

- Tingary M.D.(1973) J.Reprod.Fertil. 34, 255-265.
- Tofilon P.J., Deen D.F. and Marton L.J.(1983) Science 222, 1132-1134.
- Torrelío B.M., Paz M.A. and Gallop P.M. (1984) Exp.Cell Res. 154, 454-463.
- Tofilon P.J. , Oredsson S.M. , Deen D.F., Marton L.J.(1982) Science 217, 1044-1046.
- Tobita T., Suzuki H., Soma K., Nokano M. (1983) Biochimica et Biophysica Acta 748, 461-464.
- Trevithick J.R., Ingles C.J. and Dixon G.H.(1969) Can.J. Biochem. 47, 51-60.
- Tsai Y-H. and Lin S-N.(1985) J.Androl 6, 348-352.
- Tsurugi K. and Ogata K.(1979) Eur.J.Biochem 101, 205-213.
- Tsurugi K., Oyanagi M., and Ogata K.(1983) J.Biochem. 93, 1231-1237.
- Ustrell V. and Mezquita C.(1985) Biologia del desenvolupament 3, 157-166.
- Ustrell V., Reixach M., Pau M., Oliva R., Mezquita C. (1984) Biologia del Desenvolupament 2, 71-76.
- Vanderbilt J.N., Bloom K.S. and Anderson J.N.(1982) The Journal of Biological Chemistry 257, 13009-13017.
- Vayda M.E., Rogers A.E. and Flint S.J.(1983) Nucleic Acids Res. 11, 441-460.
- Van der Westhuyzen D.R. and Von Holt C.(1971) FEBS letters 14, 333.
- Watson D.C., Peters E.H. and Dixon G.H.(1977) Eur.J.Biochem. 74, 53-60.

- 300 -
- Wagner M.J., Sharp P.A. and Summers W.C. (1981) Proc.Natl. Acad.Sci.USA 78, 1441-1445.
- Watson and Crick (1953) Nature 171, 737-738.
- Warran T.R.W. and Kim S.H.(1978) Nature 271, 130-135.
- Walker M.H.(1971) Chromosoma 34, 340-354.
- Watanabe T., Shafman T. and Kufe D.W. (1985) Journal of Cellular Physiology 122, 435-440.
- Wallace H.M., Gordon A.M., Keir H.M. and pearson C.K.(1984) Biochem.J. 219, 211-221.
- Wilkins M.H.F.(1956) Cold Spring Harbor Symp.quant.Biol. 21, 75-90.
- Williams-Ashman H.G.(1984) Mol.Cell.Biochem.58, 51-61.
- Williams-Ashman H.G., Beil R.E., Wilson J., Hawkins M. Grayhack J., Zunamon A. and Weinstein N.K.(1980) Adv. Enzyme Regul. 18, 239-258.
- Willison K.R., Dudley K. and Potter J.(1986) Cell 44, 727-738.
- Wilson R.W. and Bloomfield V.A.(1979) Biochemistry 18; 2192-2196.
- Widom J. and Badwin R.L.(1980) J. Mol Biol. 144, 431-453.
- Wouters-Tyrou D., Martin-Ponthieu A., Sautiere P. and Biserte G.(1981) FEBS letters 128, 195-200.
- Wong T.K. and Marushige K. (1975) Biochemistry 14, 122-127.
- Womble J.R., Larson D.F., Copeland J.G. and Russel D.H. (1984) Transplantation Proceedings 16, 1573-1575.
- Wong T.K. and Marushige K.(1975) Biochemistry 14, 122-127.

Young D.H. and Kaus H.(1983) Plat Physiol. 73, 698-702.

Young R.J. and Sweeney K.(1979) Gamete Research 2, 265-282.

Zagon I.S., Seely J.E. and pegg A.E.(1983) Methods in Enzymology 94, 169-176.

Zagon I.S., McLaughlin P.J., Seely J.E., Hoeksema G.N. and Pegg A.E.(1984) Cell and Tissue Res 235, 371-377.

Zlotnick I.(1957) Q.Jl.Microsc. Sci.88, 353-364.

Ziff E.B. and Evans R.M.(1978) Cell 15, 1463-1475.

Zwelling L.A., Kerrigan D. and marton L.J.(1985) Cancer Res. 45, 1122-1126.

Zweidler A.(1978) en Methods in Cell Biology (Stein G., Stein J. and Kleismith L.J. eds.) vol. 17, 223-233. Academic Press N.Y.

