

TESI DOCTORAL

Pepita Giménez Bonafé

*Proteïnes que estructurèn i remodelen
la cromatina espermàtica.
Alguns casos especials*

Novembre, 1999

2. Fraccionament de l'extracte d'oòcits de *D. labrax*

Sabem que l'extracte d'oòcits fecundats (*in vitro* o *in vivo*) de *D. labrax* presenta les proteïnes (o factors) que remouen la protamina. Un segon objectiu va ser el d'aïllar aquestes proteïnes (o proteïna) per la seva caracterització bioquímica, tal i com s'ha fet en altres espècies, i per això s'han utilitzat diferents tipus de cromatografia.

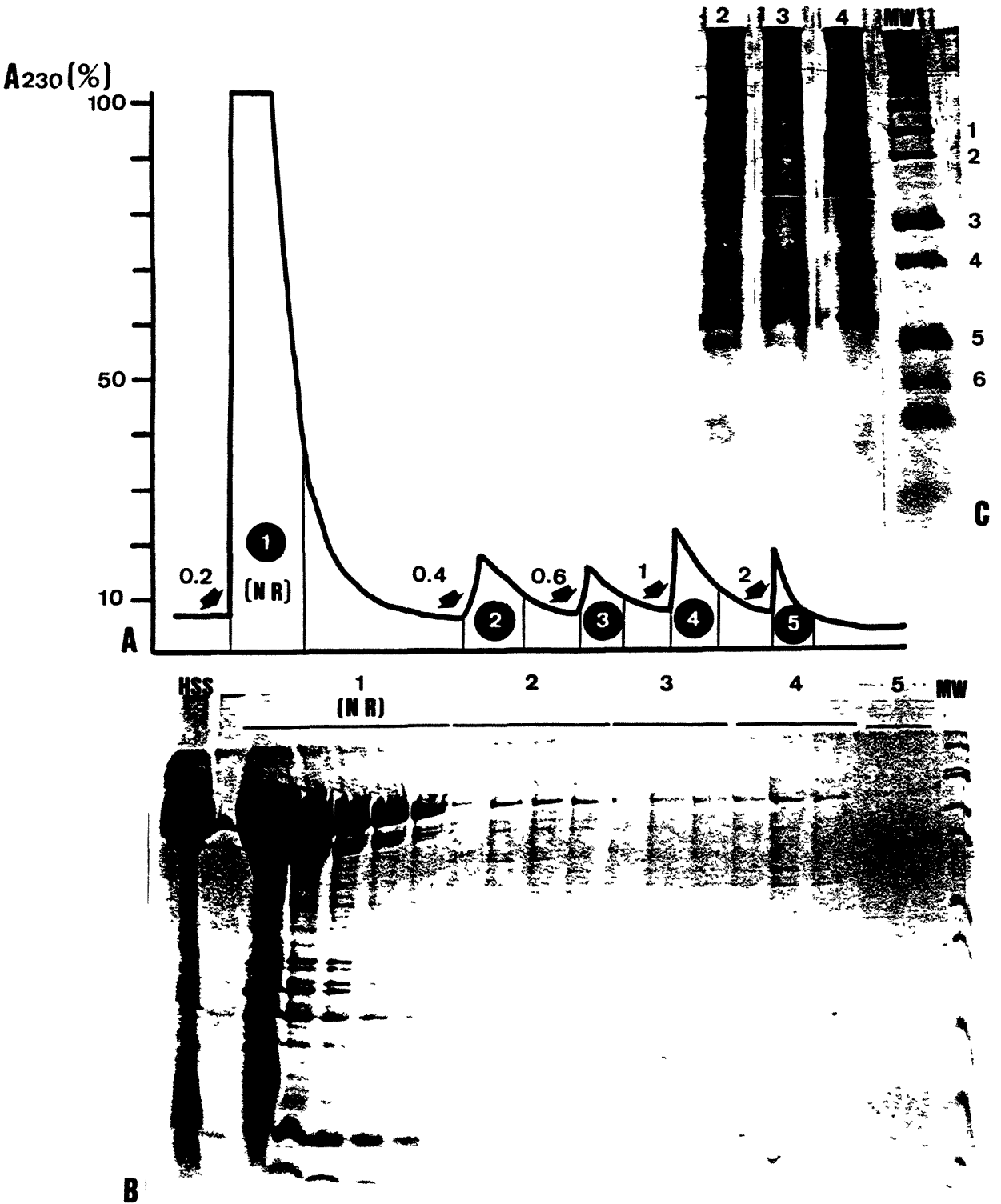
a. Columna de matriu d'agarosa amb protamina unida

Seguint *a priori* el model de la nucleoplasmina, la proteïna (o proteïnes) amb funció de treure les protamines i posar les histones en la cromatina espermàtica, ha de ser una proteïna àcida, per contrarestar la càrrega positiva de les protamines bàsiques. Se sap que la NP de *Xenopus* té un pH àcid, pH 5.0. Aquesta característica es va aprofitar per intentar "caçar" les proteïnes acídiques de l'extracte directe d'òvuls de *D. labrax*, i és per això que es va utilitzar un tipus de cromatografia on la matriu (agarosa) tenia unida protamina, amb la idea de que aquesta protamina pogués enganxar a les proteïnes acídiques i després les poguéssim eluir incrementant la força iònica.

Una alíquota de HSS es va dialitzar enfront de NaCl 0.15N (en TrisHCl 10 mM pH 7.2-7.4) (tampó d'equilibratge de la matriu) i es va aplicar en aquest tipus de columna. Posteriorment, es va aplicar un gradient discontinu de NaCl, rentant la columna en passos discrets de NaCl 0.2N, 0.6N, 1N, 2N i 4N (en TrisHCl 10 mM pH 7.2-7.4). Es treballava a un flux de 12 ml/h i es recollien fraccions d'1-2 ml.

Es van obtenir 5 pics (Fig.III.E.7), un primer pic amb les proteïnes no retingudes en la matriu (fracció anomenada NR, no retingut), i un pic en cada pas del gradient discontinu, excepte en l'últim pas (NaCl 4N), on ja no quedaven proteïnes enganxades. Les fraccions corresponents a cada pic es van dialitzar extensivament enfront d'aigua i es van concentrar en centrífeps; una petita alíquota es va destinar a fer una anàlisi electroforètica. Tal i com la Fig.III.E.7 mostra, gran part del contingut proteic de l'extracte no va quedar enganxat en la matriu (eluint-se en la fracció NR), i en la resta de pics no vàrem obtenir una separació clara de cap proteïna (o proteïnes) en concret.

Fig.III.E.7. Columna de matriu d'agarosa amb protamina unida, del HSS. A- Perfil cromatogràfic amb els pics eluïts en cada pas del gradient discontinu de NaCl 0.2N, 0.4N, 0.6N, 1N i 2N (en TrisHCl 10 mM pH 7.2-7.4); A.- Absorbància a 230 nm. B- Gel d' SDS al 15% d'acrilamida de les fraccions eluïdes tenyit en blau de Coomassie i en plata (C); MW- marcador pes molecular (kDa): 1- 66.3, 2- 55.4, 3- 36.5, 4- 31.0, 5- 21.5, 6- 14.4.



Vàrem repetir diverses vegades aquest tipus de cromatografia, carregant menys quantitat de mostra (per possibles colapsaments de la matriu degut a la relació quantitat de proteïna/matriu lliure) però els resultats es varen reproduir.

Amb cadascuna de les fraccions eluïdes en el gradient es va fer una incubació amb nuclis espermàtics de *D. labrax*. Incubant 1 milió de nuclis amb 150 µl de cada fracció amb una concentració de 0.7-0.8 mg/ml de proteïnes totals (quan es fan incubacions amb la NP de *Xenopus* pura s'utilitza una concentració de 0.8 mg/ml), no vàrem obtenir cap activitat de remoció de protamina espermàtica, fet que possiblement sigui degut a la baixa concentració de les fraccions utilitzades (perquè tot i estar al voltant de 0.8 mg/ml, hem de pensar que són una barreja de proteïnes, on la proteïna que realitza la funció de remoció es troba en una concentració molt inferior), o bé perquè l'activitat removedora no ha quedat retinguda a la columna i s'ha perdut en l'eluit del primer rentat.

b. Columna d'Hidroxiapatita

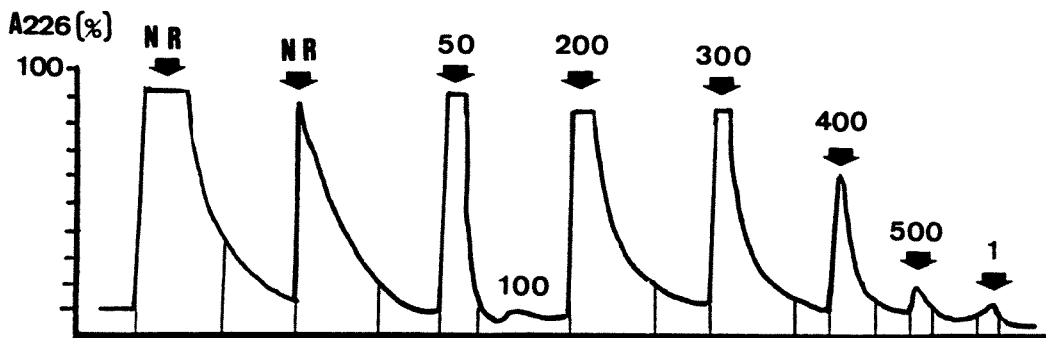
Un altre tipus de cromatografia que s'ha utilitzat ha estat la cromatografia d'hidroxiapatita, on les proteïnes àcídiques s'enganxen a la matriu mitjançant els ions Ca^{2+} presents en ella i després s'elueixen a l'augmentar la concentració en ions fosfat, de manera que els fosfats (negatius) competeixen amb les proteïnes àcídiques per la unió al Ca^{2+} i aconseguixen així desenganxar-les de la matriu.

Una alíqüota de 5 ml de HSS es va carregar a la columna (mostra prèviament dialitzada en NaHPO_4 10 mM i NaCl 1M en HEPES 20 mM, pH 7.0), i posteriorment es va rentar amb el tampó d'equilibratge (NaHPO_4 10 mM i NaCl 2M en HEPES 20 mM, pH 7.0), i aplicar un gradient en passos discrets incrementant la concentració d'ions fosfat, NaHPO_4 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM i 1M (tots ells en HEPES 20 mM pH 7.0), fins que les proteïnes s'eluien completament en cadascun dels passos. Es va treballar a un flux de 40 ml/h, i es van recollir fraccions d'aproximadament 1 ml.

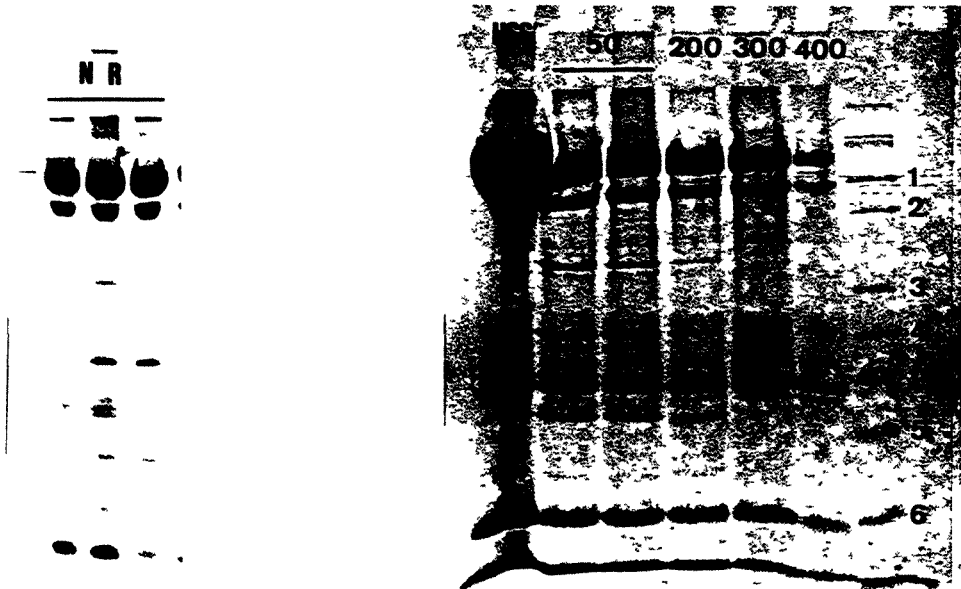
La Fig.III.E.8A mostra el perfil cromatogràfic obtingut. Es van analitzar electroforèticament cadascun dels pics i es va veure que en general, no vàrem aconseguir purificar cap proteïna en concret, però sí vàrem veure que les fraccions eluïdes en 50 mM, 200 mM, 300 mM i en menys proporció 400 mM de

NaHPO₄ quedaven enriquides en una sèrie de proteïnes que migraven al voltant dels 20-30 kDa (v. Fig.III.E.8B). Així doncs, es va procedir a realitzar incubacions amb aquestes fraccions.

Fig.III.E.8. Columna d'Hidroxiapatita, del HSS. A- Perfil cromatogràfic amb els pics eluïts en cada pas del gradient discontinu de NaHPO₄ 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM i 1M (tots ells en HEPES 20 mM pH 7.0); Abs.- Absorbància a 226 nm. B- Gel d' SDS al 15% d'acrilamida de les fraccions eluïdes; st- estàndard de HSS; MW- marcador pes molecular (kDa): 1- 66.3, 2- 55.4, 3- 36.5, 4- 31.0, 5- 21.5, 6- 6.0.



A



B

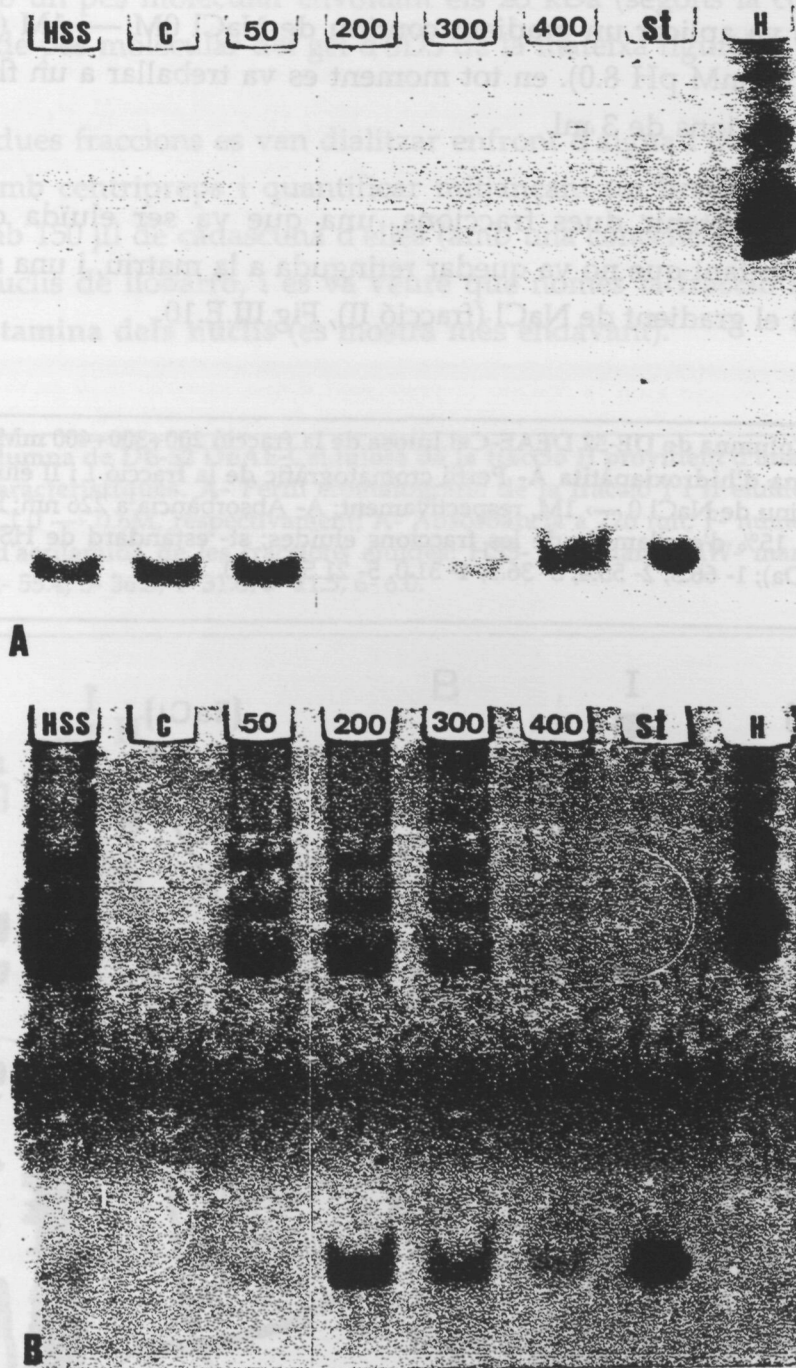
Cadascuna de les fraccions es va dialitzar extensivament enfront d'aigua, i es va concentrar a l'*speedvac* fins assolir una concentració final d'aproximadament 3 mg/ml (quantificació realitzada mitjançant el mètode de Bradford) en les fraccions 50, 100, 200 i 300 mM de NaHPO₄, i de 0.6 mg/ml en la fracció 400 mM.

Es van incubar 150 µl de cada fracció amb 1 milió de nuclis de llobarro durant 1h, i posteriorment es va analitzar el contingut proteic tant de nuclis com de sobrenadants en un GPAU. Es va fer un control positiu incubant amb 150 µl de HSS. El resultat es mostra a la Fig.III.E.9.

Tal i com es pot apreciar, aquestes fraccions presenten activitat de remoció de la protamina, doncs veiem una disminució de la protamina en els nuclis, la qual augmenta en els sobrenadants, especialment en la fracció 200 mM i 300 mM (i també en la 400 mM, ja que s'ha de pensar que la incubació en aquest cas s'ha fet a una concentració inferior). Una pregunta que ens podem fer és a què és deguda la diferència en la remoció entre les diferents fraccions, si a simple vista no hi ha diferència en les proteïnes trobades al sobrenadant (v. Fig.III.E.9), que són les que en teoria arrancarien la protamina. Hem de tenir en compte però, que les proteïnes del sobrenadant que s'observen en el gel d'electroforèsi no són totes les proteïnes, ja que els sobrenadants obtinguts de les incubacions es solubilitzen amb HCl 0.4N, i per tant, moltes proteïnes queden insolubilitzades; les proteïnes extretes que trobem als sobrenadants semblen (per la seva mobilitat) histones (lo qual és lògic si considerem que les histones són solubles en HCl 0.4N, v. II.B.4.b).

Així doncs, a partir de la columna d'hidroxiapatita s'han obtingut unes fraccions que tenen activitat de remoció de la protamina del nucli espermàtic. Les fraccions 200, 300 i 400 mM es van ajuntar i es van passar per un altre tipus de cromatografia per veure si aconseguíem enriquir la fracció en alguna proteïna (o proteïnes) amb la funció específica de remodelació de la cromatina. La cromatografia que es va aplicar va ser d'intercanvi iònic del tipus DEAE-Cel.lulosa.

Fig.III.E.9. Incubació de les fraccions 50, 200, 300 i 400 mM de NaHPO_4 provinents d'una columna d'hidroxiapatita, amb nuclis de llobarro (per detalls v. texte). A- Proteïnes extretes dels nuclis incubats. B- Proteïnes extretes dels sobrenadants. C- control; st- estàndard de protamina de *D. labrax*; H- estàndard d'histones d'eritròcit de pollastre. GPAU 6.25M urea/15% acrilamida.

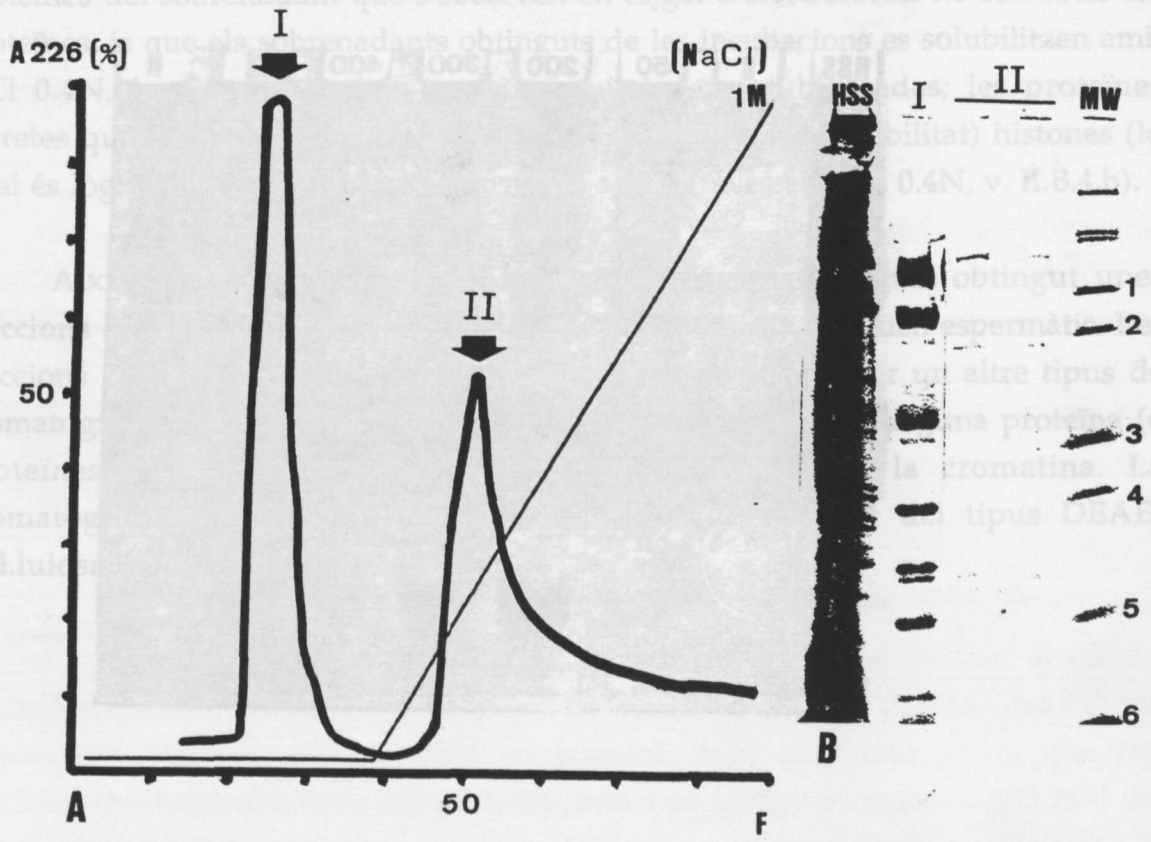


c. Columna DE-52 DEAE Cel.lulosa

La fracció 200+300+400 mM NaHPO₄ provinent de la columna d'hidroxiapatita, es va dialitzar enfront del tampó d'equilibratge de la matriu (EDTA 1 mM en TrisHCl 25 mM pH 8.0) i es va aplicar a la columna prèviament equilibrada amb el mateix tampó. Es va fer un rentat amb el tampó d'equilibratge i després es va aplicar un gradient continu de NaCl 0M → 1M (en EDTA 1 mM en TrisHCl 25 mM pH 8.0). en tot moment es va treballar a un flux de 30 ml/h i s'agafaven fraccions de 3 ml.

Es van obtenir dues fraccions, una que va ser eluïda durant el rentat (fracció I), per tant que no va quedar retinguda a la matriu, i una segona que es va eluir durant el gradient de NaCl (fracció II), Fig.III.E.10.

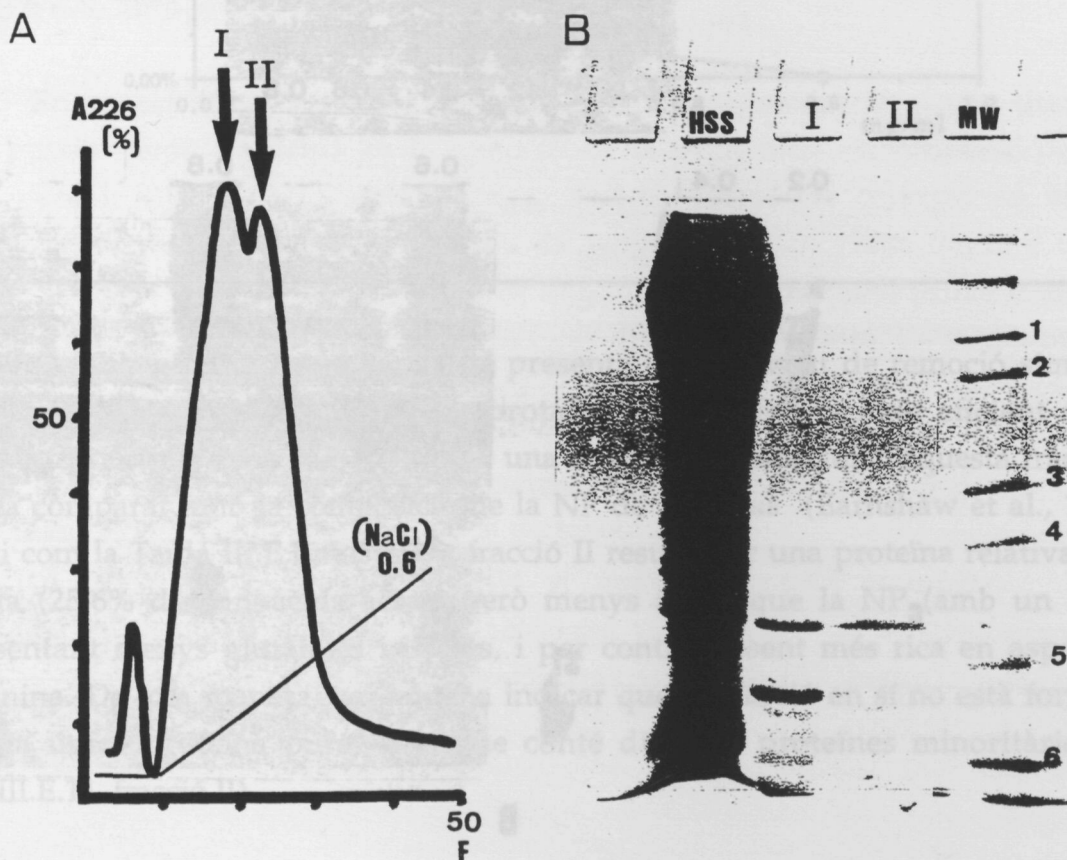
Fig.III.E.10. Columna de DE-52 DEAE-Cel.lulosa de la fracció 200+300+400 mM de NaHPO₄ provinent d'una columna d'hidroxiapatita A- Perfil cromatogràfic de la fracció I i II eluïdes en el rentat i en el gradient continu de NaCl 0 → 1M, respectivament; A- Absorbància a 226 nm; F- número de fracció. B- Gel d' SDS al 15% d'acrilamida de les fraccions eluïdes; st- estàndard de HSS; MW- marcador pes molecular (kDa); 1- 66.3, 2- 55.4, 3- 36.5, 4- 31.0, 5- 21.5, 6- 6.0.



La fracció que es va quedar enganxada a la matriu, fracció II, es va dialitzar i preparar per ser carregada de nou en una segona columna de DEAE-Cel.lulosa, treballant amb les mateixes condicions que en la columna anterior però fent un gradient més pla, de 0M \rightarrow 0.6 M NaCl. Es van tornar a obtenir dues fraccions (Fig.III.E.11), però aquest cop una d'elles quedava enriquida en bàsicament una proteïna, amb un pes molecular envoltant els 25 kDa (segons la comparació amb el marcador de pes molecular del gel d' SDS de la mateixa figura).

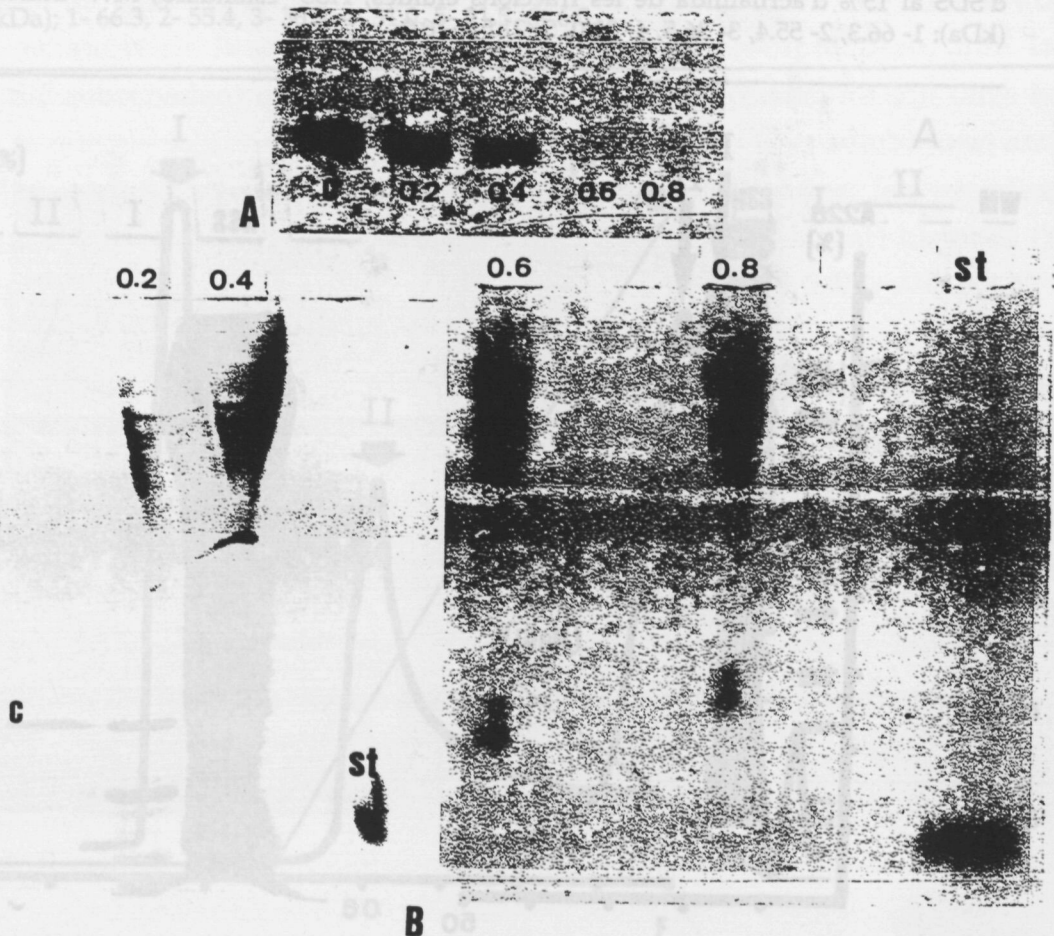
Totes dues fraccions es van dialitzar enfront d'aigua i posteriorment es van concentrar amb centripres i quantificar mitjançant un Bradford. Es va fer una incubació amb 150 μ l de cadascuna d'elles (amb una concentració d'1 mg/ml) amb 1 milió de nuclis de llobarro, i es va veure que només la **fracció II era capaç de remoure protamina dels nuclis** (es mostra més endavant).

Fig.III.E.11. Columna de DE-52 DEAE-Cel.lulosa de la fracció II provinent d'una columna anterior de les mateixes característiques. A- Perfil cromatogràfic de la fracció I i II eluïdes durant el gradient continu de NaCl 0 \rightarrow 0.6M, respectivament; A- Absorbància a 226 nm; F- número de fracció. B- Gel d' SDS al 15% d'acrilamida de les fraccions eluïdes; HSS- estàndard; MW- marcador pes molecular (kDa): 1- 66.3, 2- 55.4, 3- 36.5, 4- 31.0, 5- 21.5, 6- 6.0.



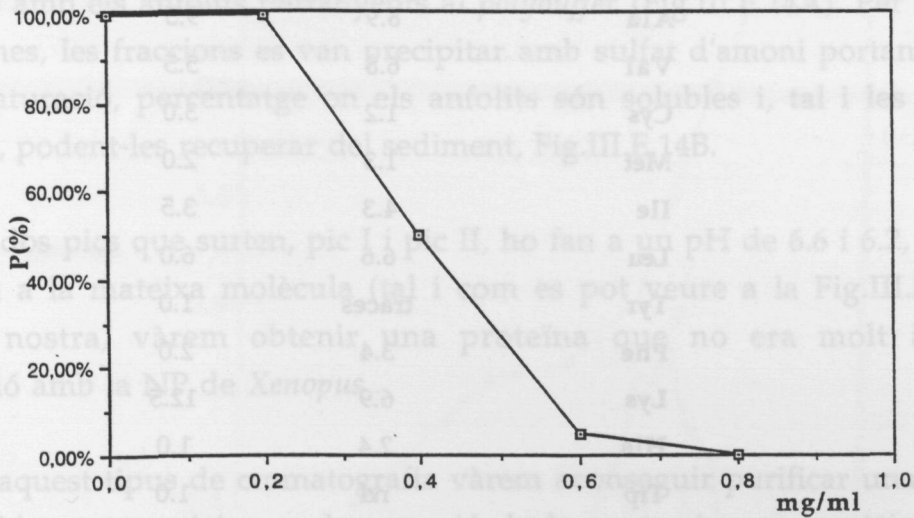
Així doncs, es va tornar a **incubar la fracció II provinent de la segona columna de DEAE-Cel.lulosa** amb nuclis de llobarro, però treballant amb diferents concentracions de la mateixa: en 150 µl de volum final es van incubar 0.2, 0.4, 0.6 i 0.8 mg/ml de la fracció II (ajustant amb tampó EM) amb un milió de nuclis de llobarro, durant 1h. El resultat es mostra a la Fig.III.E.12: a una concentració de 0.4 mg/ml de fracció II disminueix considerablement la quantitat de protamina en el nucli espermàtic, i a 0.6 i 0.8 mg/ml desapareix al complet; la protamina desplaçada la trobem als sobrenadants. (Nota: els sobrenadants d'aquesta incubació no s'han extret amb HCl fins 0.4N com s'explica a II.C.9, sinó que directament es van concentrar a l'*speedvac*, de manera que les sals provinents el tampó EM amb el qual es fa la incubació es van concentrar, i d'aquí que les proteïnes presentin una mobilitat tan distorsionada).

Fig.III.E.12. Incubació amb la fracció II provinent d'una repurificació en cromatografia de DEAE-Cel.lulosa, treballant amb diferents concentracions de la fracció (0.2, 0.4, 0.6 i 0.8 mg/ml) (150 µl finals) i 1 milió de nuclis de llobarro. A- Proteïnes extretes dels nuclis incubats. B- Sobrenadants. GPAU 6.25M urea/15% acrilamida; C- control; st- estàndard de protamina de llobarro.



A partir del gel d'electroforèsi dels nuclis incubats (Fig.III.E.12A) es va quantificar la quantitat de proteïna present en cada incubació mitjançant un microdensitòmetre (Joyce-Loebl MK III CS). Es va obtenir el gràfic de la Fig.III.E.13: en ell podem veure com després d'1 hora, i a una concentració de 0.4 mg/ml de la fracció II, es remou aproximadament el 50% de la protamina nuclear.

Fig.III.E.13. Remoció de la protamina de l'espermatozoide de *D. labrax* mitjançant diferents concentracions de la fracció II. P(%)- percentatge de protamina present en el nucli espermàtic. Concentracions fracció II: 0.2, 0.4, 0.6 i 0.8 mg/ml.



Sembla ser que aquesta fracció presenta una activitat de remoció similar a la NP de *Xenopus* (la qual remou protamina d'una forma molt eficient a una concentració de 0.8 mg/ml). Es va fer una anàlisi d'aminoàcids d'aquesta fracció i es va comparar amb la composició de la NP de *Xenopus* (Earnshaw et al., 1980). Tal i com la Taula III.E.I mostra, la fracció II resulta ser una proteïna relativament àcida (25.6% d'aminoàcids àcids) però menys àcida que la NP (amb un 27%), presentant menys glutàmics i lisines, i per contra, éssent més rica en aspartic i arginina. De tota manera, val la pena indicar que la fracció en sí no està formada d'una única proteïna pura, sinó que conté diverses proteïnes minoritàries (v. Fig.III.E.11, fracció II).

Taula III.E.I. Composició aminoacídica de la fracció II de *D. labrax* i la NP de *X. laevis*.

aa	fracció II	NP <i>Xenopus</i>
Asp	11.3	7.0
Thr	6.5	5.5
Ser	8.8	6.5
Glu	14.3	17.5
Pro	6.1	6.0
Gly	6.7	6.5
Ala	8.9	9.5
Val	6.8	5.5
Cys	1.2	3.0
Met	1.3	2.0
Ile	4.3	3.5
Leu	6.6	6.0
Tyr	traces	1.0
Phe	3.4	2.0
Lys	6.9	12.5
His	2.4	1.0
Trp	nd	1.0
Arg	4.4	2.5

aa's àcids (%)	25.6	27.0
aa's bàsics (%)	13.7	16.0

d. Columna d'Isoelectrofoc

Com ja s'ha mencionat, la NP de *Xenopus* té un pH 5.0. Aquesta característica la vàrem voler aprofitar per buscar proteïnes que estiguéssin al voltant d'aquest pH dintre de l'extracte d'òdits de *D. labrax*.

La fracció II (possible molècula candidata a ser una "NP-like ") es va carregar en una columna d'isoelectroenfoc que es basa en separar les molècules segons el seu pI. Després de ser carregada es va aplicar el tampó d'elució, en aquest cas anomenat *polybuffer 74*, tampó que genera un gradient lineal de pH 7.4 → 4.0 al llarg de la columna, i d'aquesta manera es van recollir fraccions d'1 ml, treballant a un flux de 15 ml/h. Les fraccions es van llegir a dues longituds d'ona: a 280 nm per detectar les proteïnes, i a 254 nm ja que és la longitud a la que absorbeixen els anfolits (i així, quan hem detectat un pic hem sabut a què pertanyia).

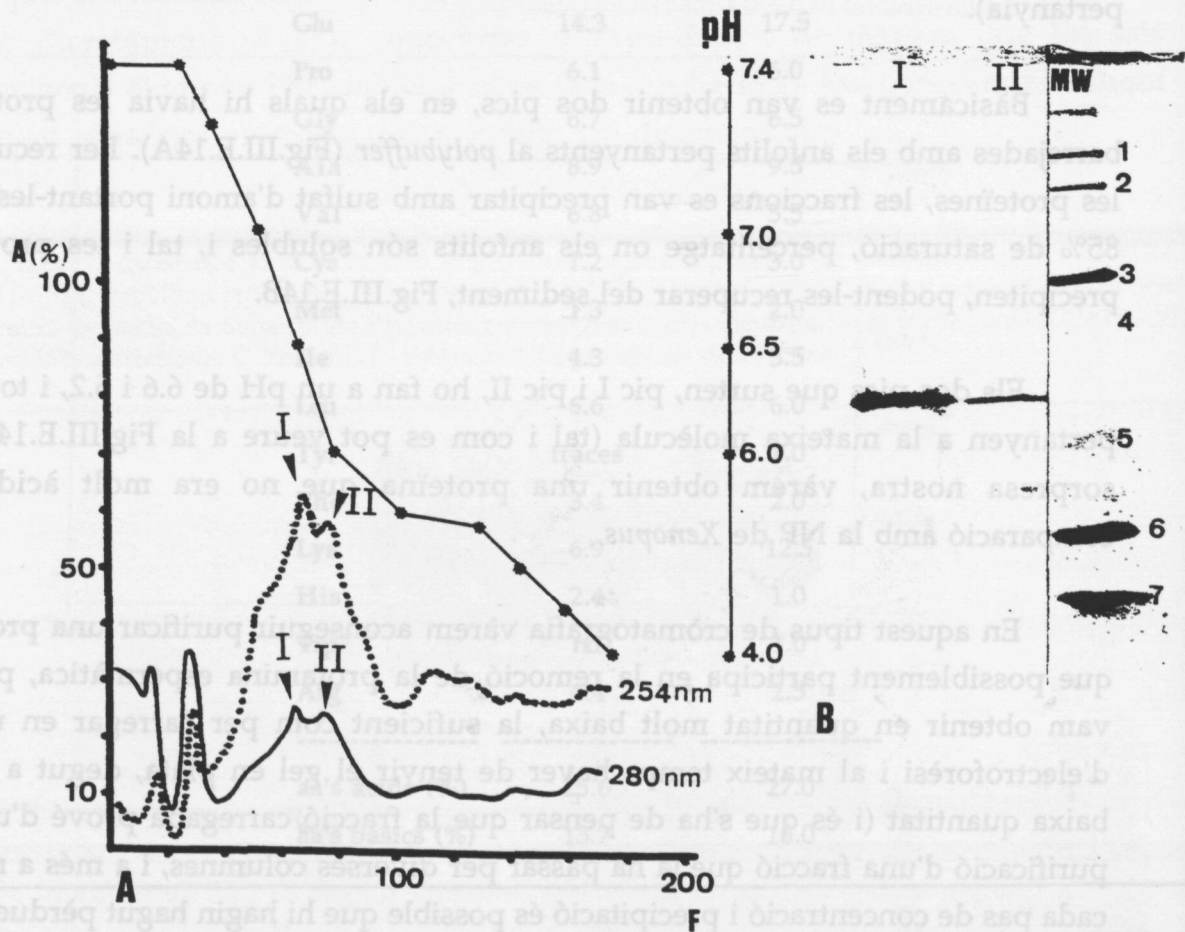
Bàsicament es van obtenir dos pics, en els quals hi havia les proteïnes barrejades amb els anfolits pertanyents al *polybuffer* (Fig.III.E.14A). Per recuperar les proteïnes, les fraccions es van precipitar amb sulfat d'amoni portant-les a un 85% de saturació, percentatge on els anfolits són solubles i, tal i les proteïnes precipiten, podent-les recuperar del sediment, Fig.III.E.14B.

Els dos pics que surten, pic I i pic II, ho fan a un pH de 6.6 i 6.2, i tots dos pertanyen a la mateixa molècula (tal i com es pot veure a la Fig.III.E.14). Per sorpresa nostra, vàrem obtenir una proteïna que no era molt àcida, en comparació amb la NP de *Xenopus*.

En aquest tipus de cromatografia vàrem aconseguir purificar una proteïna, que possiblement participa en la remoció de la protamina espermàtica, però la vam obtenir en quantitat molt baixa, la suficient com per carregar en un gel d'electroforèsi i al mateix temps haver de tenyir el gel en plata, degut a la tan baixa quantitat (i és que s'ha de pensar que la fracció carregada prové d'una repurificació d'una fracció que ja ha passar per diverses columnes, i a més a més en cada pas de concentració i precipitació és possible que hi hagin hagut pèrdues).

Així doncs, degut a que no vàrem recuperar proteïna, no va ser possible fer cap assaig bioquímic ni analític amb la mateixa.

Fig.III.E.14. Columna d'Isoelectroenfoc de la fracció II provinent de columnes de DEAE-Cel.lulosa. A- Perfil cromatogràfic obtingut llegint a dues longituds d'ona: a 280 nm es detecten les proteïnes, i a 254 nm els anfolits pertanyents al tampó d'elució. A- Absorbància; F- número de fracció. B- GPAU 6.25M urea/15% acrilamida dels dos pics obtinguts; gel tenyit en plata, MW- marcador pes molecular (kDa): 1- 66.3, 2- 55.4, 3- 36.5, 4- 31.0, 5- 21.5, 6- 14.4, 7- 6.0.



Com ja s'ha mencionat, la NP de *Xenopus* té un pH 5.0. Aquesta característica la varem voler aprofitar per buscar proteïnes que estiguessin al voltant d'aquest pH dintre de l'extracte d'òcits de *D. labrax*.

e. *Conclusió preliminar*

Fins aquest punt, aquest són els resultats obtinguts amb l'estudi de l'activitat de remoció de la cromatina espermàtica per part dels extractes d'òcits de llobarro. Aquest ha estat un estudi inicial que cal aprofundir, doncs hi ha molts aspectes a estudiar i a assajar. Tot i que no hem obtingut els resultats que esperavem, cal a dir que molt possiblement, en els òcits de *D. labrax* existeix una activitat tipus nucleoplasmina. Els experiments que hem realitzat són preliminars, de manera que serà necessari examinar en profunditat aquesta espècie i altres (que presentin un model de condensació i protamines diferents) per així comprendre les diferents maneres en què la manquinària molecular de l'òcit actua sobre el nucli espermàtic.



IV. Discussió



Biologia evolutiva de les SNBP's

En el capítol de la Introducció hem revisat la gran diversitat de proteïnes bàsiques nuclears espermàtiques (SNBP's, o protamines) existent. Les SNBP's són segurament el col·lectiu més heterogeni de molècules que realitzen una mateixa "funció".

En el nostre treball hem estudiat alguns tipus d'SNBP's especials que aporten informació als coneixements actuals, i hem fet una anàlisi en cada cas ubicant les protamines, quan ha estat possible, en el seu marc biològic i taxonòmic.

En aquesta última part intentarem discutir algunes idees sobre a quins nivells i de quina manera la selecció natural ha intervingut per permetre, induir o evitar el canvi evolutiu, i quins són els diversos mecanismes de canvi que les SNBP's han pogut seguir en la seva evolució.

A. Quina funció tenen totes les SNBP's?

Les SNBP's són les proteïnes que trobem en el nucli espermàtic madur. És important remarcar que la funció de totes les SNBP's és la de mantenir una estructura de la cromatina en un estadi altament compactat, o dit d'una altra manera més general, la de mantenir el nucli espermàtic en un volum reduït.

El tipus d'estructura de la cromatina espermàtica en sí, no és en molts casos responsabilitat de les SNBP's, i en cap cas és responsabilitat exclusiva de les mateixes. En els processos experimentals de reconstitució de nuclioprotamina a partir dels seus components (DNA i protamina) no s'ha arribat mai a un nucli espermàtic.

L'estructura de la cromatina espermàtica és producte d'un procés progressiu (de vegades molt complex) de substitució controlada de proteïnes nuclears. En els casos més simples, les SNBP's desplacen directament les proteïnes nuclears, i un exemple és el que ocorre en els Gasterosteiformes, cas que apareix en aquest treball; en altres casos es dona un processament complex de precursors de les protamines finals, tal i com hem vist a *Murex brandaris*, i

possiblement a *Octopus vulgaris* ; i en els casos més complexos, com són les espermiogènesis d'alguns mamífers, les histones són substituïdes primerament per unes altres histones específiques de l'espermiogènesi, a la vegada aquestes són substituïdes per proteïnes de transició, i aquestes són de nou substituïdes per les protamines, algunes de les quals es troben en forma de precursor, el qual és processat, i altres es troben en la seva forma definitiva (Meistrich, 1989; Kistler, 1989; Hecht, 1989a). És evident que en els dos últims casos, l'estructura de la cromatina espermàtica no es troba determinada per les protamines presents en el nuli espermàtic (en tot cas intervenen en l'últim pas de la formació de l'estructura en qüestió).

Aquest fet complica molt la interpretació de l'evolució de les SNBP's, ja que aquests canvis es trobaran vinculats a altres canvis de proteïnes (o parts) transitoriament nuclears. En la discussió que segueix no considerarem aquest aspecte quan no sigui absolutament indispensable.

B. Cóm es pot entendre l'evolució de les SNBP's?

1. Delimitació dels nivells als quals actuen les SNBP's i als quals poden rebre la pressió de la selecció natural

Considerarem "en sentit ascendent" tres nivells d'organització en els quals repercuteix la presència i funció de les SNBP's.

a. Interacció amb el DNA

Aquest és el nivell més basal, i clàssicament l'únic nivell en el qual ha estat interpretada l'evolució de les SNBP's.

La idea que aquí delimitem és que les SNBP's són molècules especialitzades en interaccionar amb el DNA, éssent per tant bàsiques o molt bàsiques, i són en definitiva, les responsables de mantenir l'estructura de la cromatina espermàtica en estat condensat.

Com a conseqüència, aquestes proteïnes han evolucionat optimitzant la seva funció fins produir en diferents ocasions (en diferents espècies) un estat de

condensació adequat. A partir d'aquest moment, el model d'SNBP's ha quedat fixat, i només ha acceptat petits canvis mutacionals que no han modificat substancialment el model (v. Subirana, 1975).

Els diversos estudis biofísics, i especialment els de difracció de raigs X o electrons dels complexos de nucliprotamina a partir dels seus elements (reconstituïció de la nucliprotamina a partir del DNA, i de la protamina purificats), i fins i tot a partir de nuclis (Suau i Subirana, 1977; Puigjaner et al., 1986; Suzuki i Wakakayashi, 1988), ens estan donant informació de la funció de les SNBP's exclusivament a aquest nivell d'organització, és a dir, de la manera en què la protamina pot interaccionar i estructurar el DNA a nivell molecular.

b. El nucli espermàtic (complex nucliprotamina) considerat com una unitat

Les SNBP's conjuntament amb el DNA, formen part d'una estructura superior que es comporta en certs aspectes com una unitat indestruïble (irreductible): el nucli espermàtic.

El tamany, i sobretot la forma del nucli espermàtic, ha sofert variacions importantíssimes al llarg de l'evolució dels diferents grups taxonòmics (Franzén, 1956, 1977 i 1987; Jamieson, 1987 i 1991; Baccetti, 1985). La forma del nucli sembla segur que ha d'estar sotmesa a la selecció natural, ja que repetidament s'ha descrit la seva correlació tant amb el tipus de fertilització (per exemple interna/externa), com la seva correlació amb l'estructura i característiques de l'òvul (Franzén, 1983).

Tal i com es discutirà posteriorment, la forma del nucli pot dependre de molts diversos factors i mecanismes (v. també Meistrich, 1993), però sembla clar que quan la selecció natural imposa en una espècie una forma concreta de nucli espermàtic (amb les característiques de resistència, rigidesa, etc, que permeten que aquesta morfologia sigui funcional), la o les SNBP's que aquest nucli conté, han de permetre que aquesta forma pugui ser adquirida, i han de proporcionar les característiques funcionals adequades. (S'ha de dir que, en aquest aspecte, no tan sols s'han de tenir en compte les SNBP's en sí, sinó tot el procés de recanvi proteic nuclear que s'efectua durant l'espermioogènesi).

El que tot això significa és que quan la pressió selectiva actua sobre la forma del nucli, afavorint unes formes o bé impeding-ne unes altres, està actuant sobre el tipus d'SNBP's.

c. L'espermatozoide considerat com un nivell d'organització unitari

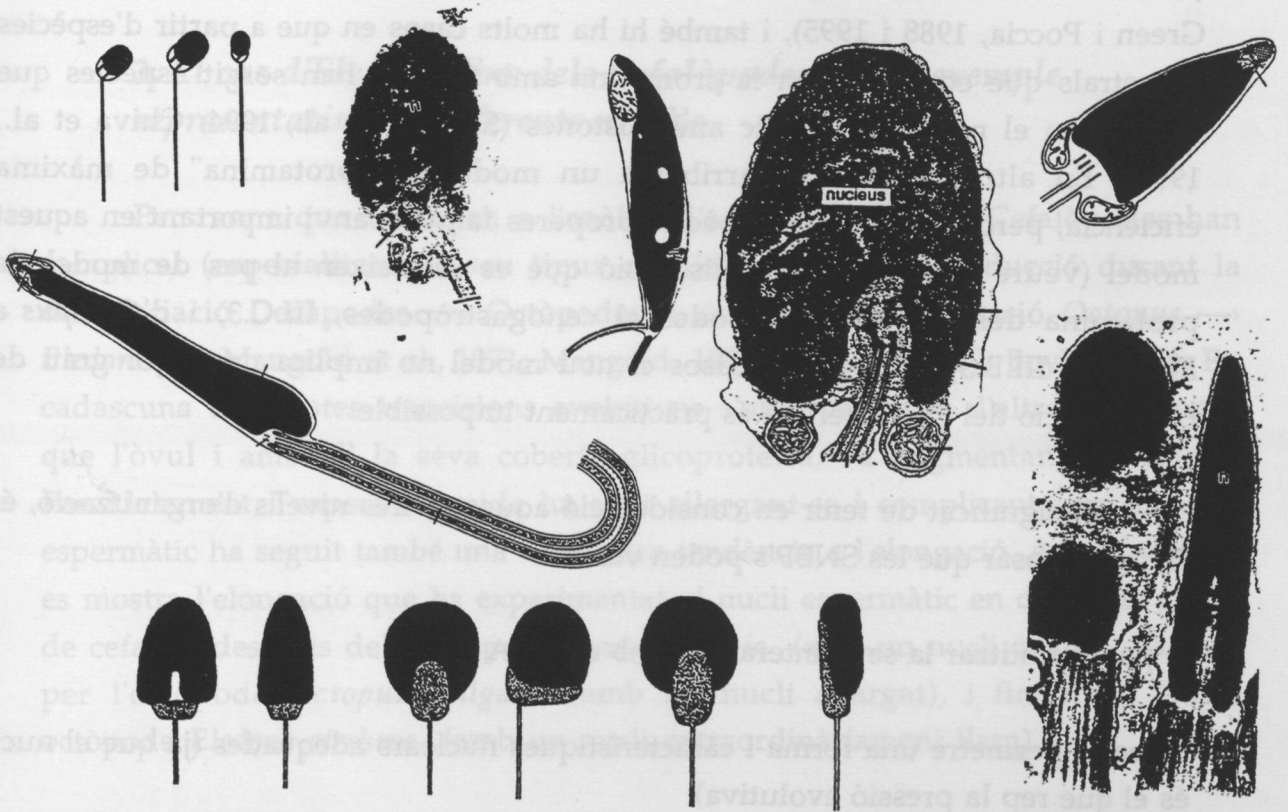
Un dels fets més clars en l'evolució dels gàmetes és l'aparició de l'anisogàmia. Els gàmetes han tendit a evolucionar de manera que un d'ells, el "femení", ha acumulat totes o quasi totes les activitats potencials per a produir un embrió, mentre que el gàmeta "masculí" s'ha simplificat i especialitzat en la motilitat per a tal de poder fecundar l'òvul. L'òvul és doncs, una cèl.lula molt gran i immòbil, mentre que l'espermatozoide és comparativament molt petit, i mòbil.

S'han donat diverses explicacions per a la reducció, i relacionades amb ella, explicacions sobre el tamany de l'espermatozoide. Les teories principals anomenades *sperm competition* (Parker et al., 1972) i *sperm limitation* (Levitan, 1996) difereixen en l'explicació de perquè l'òvul ha incrementat de volum, però coincideixen en que la selecció natural ha actuat reduint l'espermatozoide per tal de maximitzar el nombre de gàmetes masculins, el que condueix a un increment dels zigots produïts. (Per una revisió d'altres teories, v. Dacks i Kasinsky, 1999).

La gran especialització i reducció del tamany de l'espermatozoide ha conduït a l'expulsió (absència) de molts orgànuls cel.lulars no indispensables i, tant important com lo anterior, a la reducció del volum nuclear. Hem de tenir present que en la major part d'espermatozoides el nucli és, en molt, l'orgànul de major volum (la major part del volum del gàmeta és "nucli", v. Fig.IV.B.1).

Com a conseqüència, l'anisogàmia en els animals es troba indistriablement associada a la reducció del volum del nucli cel.lular. Un estudi recent mostra que això és cert pels Protozous: en aquest grup no hi ha diferenciació entre gàmetes sense haver-hi associada una reducció del volum del nucli espermàtic (Dacks i Kasinsky, 1999). La condensació nuclear és doncs, un procés principal i inseparable de l'anisogàmia.

Fig.IV.B.1. Variabilitat en la forma de nuclis espermàtics on destaca el nucli com a orgànu de major volum.



Per tant, l'aparició de processos de condensació del nucli espermiogènic i de molècules que mantinguin òptimament l'estat condensat, és també un fet que va coordinat, integrat en una altra sèrie complexa de processos cel.lulars. La selecció també actua sobre el nivell "espermatozoide" com una unitat irreductible: tota la cèl.lula es minimitza, apareixen processos coordinats de reducció del volum cel.lular entre els quals es troba la reducció del volum nuclear. No tindria sentit la compactació del nucli sense reducció i eliminació de citoplasma, aparició de flagells, etc.

2. Significació i sentit direccional dels tres nivells

Els canvis evolutius de les SNBP's han de ser considerats dins dels tres nivells: interacció amb el DNA, complex nuclioprotamina i espermatozoide.

No es poden comprendre els diversos canvis evolutius si ens restringim al nivell més baix, el de la interacció amb el DNA: per exemple, hi ha moltes espècies que empaqueten el nucli espermàtic amb histones i no amb SNBP's (Cornudella i Rocha, 1979; Prats i Cornudella, 1995; Muñoz-Guerra et al., 1982a; Green i Poccia, 1988 i 1995), i també hi ha molts casos en que a partir d'espècies ancestrals que compactaven la cromatina amb SNBP's han sorgit espècies que compacten el nucli espermàtic amb histones (Saperas et al., 1994; Chiva et al., 1995). En altres casos s'ha arribat a un model de "protamina" de màxima eficiència, però es troba que espècies properes fan un canvi important en aquest model (veure els apartats de discussió que es refereixen al pas de model de protamina dels arqueogastròpodes al cenogastròpodes, III.C.3, i d'*Octopus* a *Eledone*, III.B.3). En aquests casos el nou model no implica un major grau de compactació del DNA perquè és pràcticament impossible.

El significat de tenir en consideració aquestes tres nivells d'organització, és el de proposar que les SNBP's poden variar:

- a) per optimitzar la seva interacció amb el DNA
- b) per a permetre una forma i característiques nuclears adequades (ja que el nucli és el que rep la pressió evolutiva)
- c) per a participar en l'elaboració d'un espermatozoide adequat, de manera que la condensació nuclear es doni en el moment oportú i en coordinació amb els altres processos de canvis cel·lulars durant l'espermioogènesi.

El sentit direccional dels tres nivells, en la nostra opinió, va de major a menor, però no a l'inrevés: quan la selecció actua sobre un nivell superior, afecta als nivells inferiors. Això ho soporta el fet de que sempre que es dona un canvi important en el tipus de la biologia de la fertilització (i sobretot si és sobtat, ràpid), aquest canvi va associat a variacions importantíssimes en el tipus d'espermatozoide, en la forma nuclear, i en el model de "protamina". No s'observa però el contrari, és a dir, que variacions sobtades i importants en la protamina portin a canvis en altres nivells esmentats aquí.

Per simplificar la idea podriem dir que, quan la selecció actua sobre el tipus de la biologia de la reproducció, pot també canviar el tipus d'SNBP, però quan la selecció actua sobre la SNBP no actua sobre el tipus de reproducció.

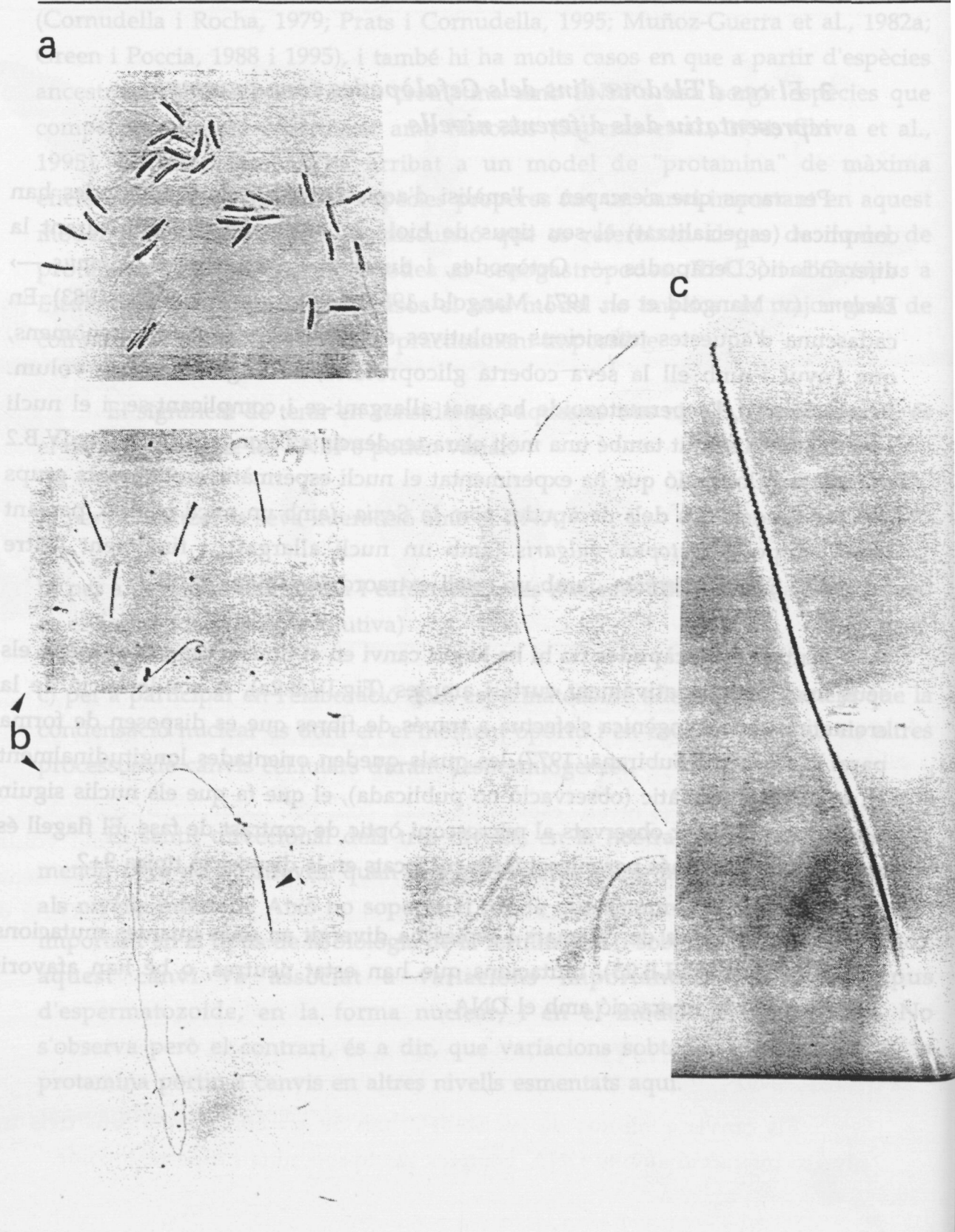
3. *El cas d'Eledone dins dels Cefalòpodes com a exemple representatiu dels diferents nivells*

Per raons que s'escapen a l'anàlisi d'aquest treball, els Cefalòpodes han complicat (especialitzat) el seu tipus de biologia de la reproducció durant la diferenciació Decàpodes → Octòpodes, i durant la diferenciació *Octopus* → *Eledone* (v. Mangold et al., 1971; Mangold, 1987; Boletzky, 1989; Boyle, 1983). En cadascuna d'aquestes transicions evolutives s'observa, entre d'altres fenòmens, que l'òvul i amb ell la seva coberta glicoproteica, va augmentant de volum. Paral·lelament, l'espermatozoide ha anat allargant-se i complicant-se, i el nucli espermàtic ha seguit també una molt clara tendència a l'elongació. A la Fig.IV.B.2 es mostra l'elongació que ha experimentat el nucli espermàtic en diferents grups de cefalòpodes, des dels decàpodes com la *Sepia* (amb un nucli ovalat), passant per l'octòpode *Octopus vulgaris* (amb un nucli allargat), i finalment l'altre octòpode *Eledone cirrhosa* (amb un nucli extraordinàriament llarg).

Entre els Decàpodes no hi ha hagut canvi en el tipus d'espermatozoide; els seus nuclis són relativament curts i amples (Fig.IV.B.2a), la condensació de la cromatina espermiogènica s'efectua a través de fibres que es disposen de forma paral·lela (Suau i Subirana, 1977) les quals queden orientades longitudinalment en el nucli espermàtic (observació no publicada), el que fa que els nuclis siguin birrefringents al ser observats al microscopi òptic de contrast de fase. El flagell és simple, format només per microtúbuls col·locats en la disposició típica 9+2.

La protamina de calamars i sèpies ha divergit en unes quantes mutacions puntuals (v. Fig.III.B.23), mutacions que han estat neutres, o bé han afavorit lleugerament la interacció amb el DNA.

Fig.IV.B.2. Nuclis espermàtics dels cefalòpodes: espermatozoide del decàpode *Sepia officinalis* (a), dels octòpodes *Octopus vulgaris* (b) i *Eledone cirrhosa* (c). a i b- 900x; c- dreta 1100x, esquerra 900x



Es considera que els decàpodes tenen fertilització externa, a diferència dels octòpodes, grup de cefalòpodes que ha adquirit una modalitat especial de fertilització interna.

L'espermatozoide en els **Octòpodes** ha sofert un canvi general. El més destacable és que el flagell ha adquirit, ja en *Octopus*, unes estructures fibrilars gruixudes (ODF's) similars a les presents en els mamífers (Fawcett, 1975), estructures que permeten desenvolupar més força d'empenta per penetrar a l'òvul, i a la vegada donen una estabilitat mecànica quan el flagell és molt llarg. Correlativament, en *Octopus* el nucli s'ha allargat i aprimat (Fig.IV.B.2b), sense ser espiralitzat, mentre que l'acrosoma sí que ho és. És de suposar que l'allargament i reducció del diàmetre del cap (nucli) afavoreixen que l'espermatozoide atravesi la capa glicoproteica de l'òvul.

La cromatina en el nucli espermàtic d'*Octopus* no es troba condensada en fibres paral·leles, ja que el nucli no presenta birrefringència al ser observat al microscopi òptic de contrast de fase.

Les protamines i els seus precursors han canviat. El grau de basicitat química de les protamines d'*Octopus* és igual a la dels decàpodes (v. Fig.III.B.17, Fig.III.B.21, Fig.III.B.24 i Taula III.B.VI), i per tant la força d'unió electrostàtica amb el DNA és equivalent. Tot i així, el nombre de protamines i de precursors s'ha modificat substancialment. Podem especular que aquest sistema permet l'elongació del nucli millor que el sistema precursor-protamina dels decàpodes, al haver una progressió cap a l'enriquiment de càrregues positives en el cas d'*Octopus* que permet que la cromatina es vagi amotllant al llarg d'aquests canvis, mentre que en els decàpodes el canvi és més bruscat (el precursor passa a protamina en un sol pas).

Un altre aspecte interessant a destacar és la presència de microtúbuls en l'espermatozoide. En els decàpodes, i en *Octopus*, es troben microtúbuls en el nucli espermàtic madur, amb funció no coneguda. Durant el procés de l'espermioogènesi, els microtúbuls poden haver contribuït a l'adopció de la forma nuclear, i possiblement la seva presència en el nucli espermàtic suggereix la seva participació en ajudar a donar rigidesa i resistència a una estructura (el nucli, la nucli-protamina) que ha adoptat una forma de vareta llarga i prima (consideració

que estaria relacionada amb l'espermatozoide d'*Octopus*, ja que el de *Sepia* no és tant d'allargat).

Eledone ha anat més enllà en la seva biologia de la reproducció. Deixant de banda altres aspectes, els seus òvuls tenen un tamany de l'ordre d'1cm, i presenten una coberta molt gruixuda, extraordinàriament gruixuda si es considera que ha de ser atravesada per una cèl.lula empentada per la força d'un flagell.

L'espermatozoide és molt llarg (510 μm); el seu flagell es troba reforçat per unes fibres anomenades ODF's, i el seu nucli espiralitzat té un diàmetre de 0.5 μm i una longitud de 43 μm (Fig.IV.B.2c), de manera que si es fa la relació longitud/diàmetre, dóna un valor d'aproximadament 80. (Nota: en Maxwell (1974) diu que el diàmetre del nucli és de 1 μm , però el calcula de punta a punta de l'espiral, agafant doncs part buida, i aquí l'hem calculat sense contar les "punxes").

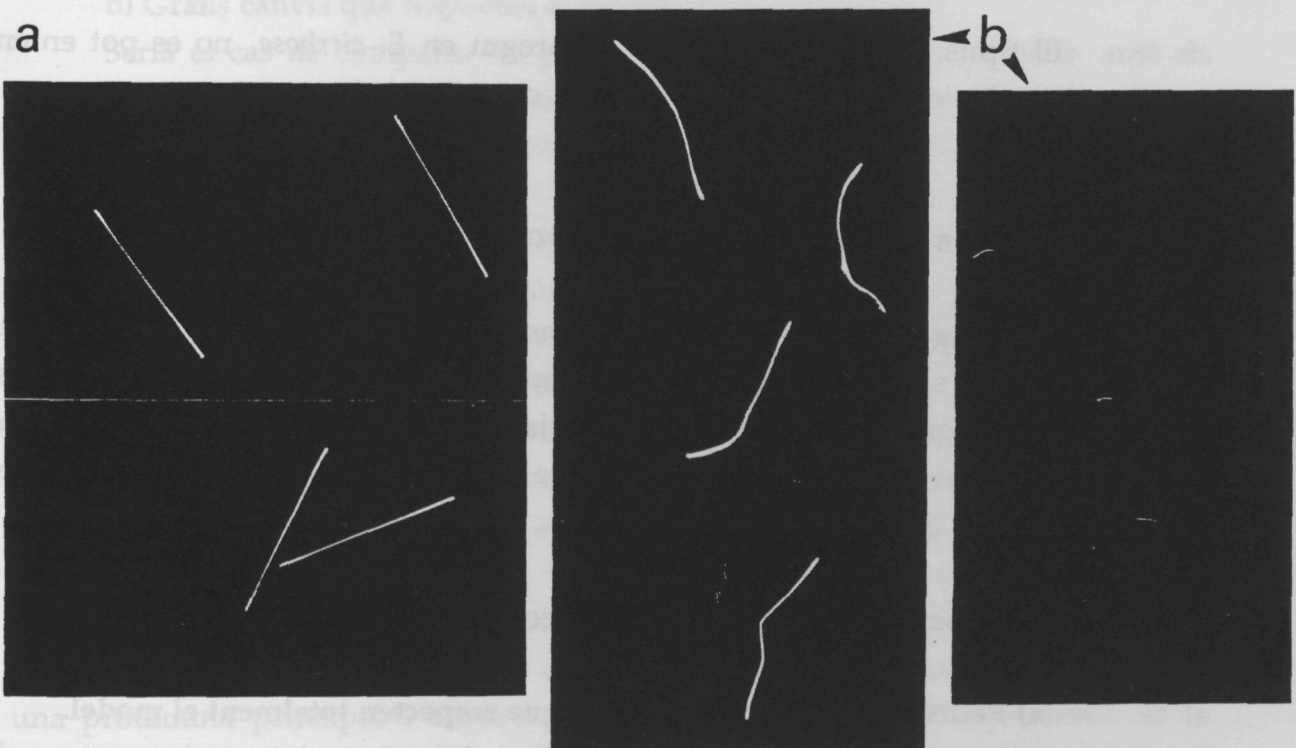
Si la selecció natural ha fet que aquests sistemes arribin a un estat, és necessari que hagi "inventat" un nou material nuclear que poseeixi la suficient rigidesa i resistència (recordem que el nucli espermàtic és una vareta rígida).

Els apartats III.A.1, 2 i 3 del present treball mostren que una bona part de l'espermioogènesi està regulada a fi de que es pugui aconseguir aquest tipus de nucli: en l'estadi V de les espermàtides (v. Fig.III.A.14) el nucli és un cilindre doblegat, en el qual la cromatina es troba totalment condensada, però no és rígida, ja que canviarà de forma. Els microtúbuls, que s'havien anat disposant helicoidalment, donaran forma al nucli espermioogènic mitjançant les seves forces de contracció i, immediatament després, s'efectuarà el control de la formació dels ponts disulfur entre les cisteïnes de les molècules de protamina, enllaços covalents que oferiran una elevada rigidesa al nucli. La regulació espacial i temporal continua amb la desaparició dels microtúbuls i altres estructures citoplasmàtiques.

En el cas d'*Eledone*, el nucli de l'espermatozoide madur no està envoltat per microtúbuls. La seva forma i resistència es basa en la gran quantitat de ponts disulfur establerts per les molècules de protamina. (Hem de fer constar que la protamina d'*Eledone* és la que posseïx més cisteïnes dintre de les conegudes).

La reducció química dels enllaços disulfur fa perdre la rigidesa i la forma nuclear enfront de tractaments mecànics i químics molt dèbils. En la Fig.IV.B.4B es mostren espermatozoides d'*Eledone* homogeneïtzats (tractament mecànic) amb una solució que conté una baixa quantitat d'agent reductor (DTT 50 mM en EDTA 2mM i TrisHCl 50 mM, pH 8.4) (tractament químic); tal i com es pot apreciar a la imatge, els nuclis passen de ser varetes rígides (Fig.IV.B.3a) a nuclis torçats (figura b), que han perdut la seva rigidesa, al haver-hi una certa reducció dels ponts disulfur pel DTT. Això ens assegura que els ponts disulfur són els responsables de mantenir la forma i característiques funcionals del nucli d'aquest espermatozoide.

Fig.IV.B.3 . Nuclis d'*Eledone cirrhosa* sense tractar (a) i tractats amb un agent reductor (b). Tinció amb Hoechst. a- 500x; b- dreta 300x, esquerra 500x



Aquest exemple il.lustra els següents fets:

a) La protamina d'*Eledone* no ha aparegut per millorar la interacció amb el DNA (de fet, és menys bàsica que la resta de protamines dels cefalòpodes i a més, els

ponts disulfur no impliquen al DNA) sinó per a mantenir la resistència, rigidesa i forma d'un nucli necessàriament llarg i prim.

b) La forma del nucli no depèn de l'aparició de la protamina, sinó de diferents processos cel·lulars coordinats. Per tant, el canvi en el model de protamina no ha estat la "raó" del canvi general.

c) La selecció natural ha escollit un òvul i un espermatozoide concrets (i especials). Durant l'espermioquèsi els diferents processos cel·lulars actuen coordinadament i de manera indèstriable: formació de microtúbuls i disposició helicoidal dels mateixos, unió d'una protamina especial al DNA, contracció dels microtúbuls, expulsió del citoplasma, aparició de les ODF's en el flagell com a recolzament, etc. Qualsevol dels processos anteriors no té cap sentit si no s'efectua en coordinació espacial i temporal amb els altres.

El tipus de protamina que ha aparegut en *E. cirrhosa* no es pot entendre sinó dins de l'espermatozoide considerat com una unitat.

C. De quines formes poden evolucionar les SNBP's?

Una vegada descrit el que en la nostra opinió és el marc general d'evolució de les SNBP's, passem a analitzar el tipus de canvis que han seguit aquestes molècules. Aquest apartat no és una revisió exhaustiva, sinó que pretèn posar de manifest unes quantes vies generals de canvi, algunes de les quals apareixen clarament en el nostre treball.

Proposem que els canvis interespecífics principals són:

a) **Petits canvis en les molècules que respecten totalment el model.**

Serien mutacions puntuals, petites delecions i insercions o canvis de posició d'algun residu aminoacídic.

Un exemple d'aquest tipus de canvis és el que es troba entre els Decàpodes (v. Fig.III.B.23). Representen canvis menors, i la identificació de la relació d'homologia entre proteïnes és trivial.

Un altre exemple diferent el trobem dins d'aquest treball, entre els Gasterosteiformes. Les protamines d'aquest grup han sofert una ràpida evolució, els canvis han estat acumulatius. *A priori* resulta més difícil establir una relació d'homologia entre la protamina de *Gasterosteus aculeatus* i la protamina típica dels peixos ossis (per exemple, la que presenten els Perciformes). De tota manera, si seguim la sèrie *Aulorhynchus* → *Pungitius* → *Gasterosteus*, la relació és clara.

Amb respecte aquest punt és interessant assenyalar que sembla ser que la zona C-terminal de les protamines està meys sotmesa a la fixació evolutiva. Aquesta zona és quasi sempre bastant confusa en front la relativa uniformitat de l'organització de les altres parts de la protamina (v. per exemple l'organització de la protamina de l'arqueogastròpode *Monodonta turbinata*, a la Fig.III.C.13).

b) Grans canvis que respecten el model.

Seria el cas de comparar les protamines/precursors d'*O. vulgaris* amb els decàpodes. Les proteïnes són diferents, no es pot establir *a priori* una relació d'homologia entre elles, però posseeixen les mateixes característiques químiques fonamentals.

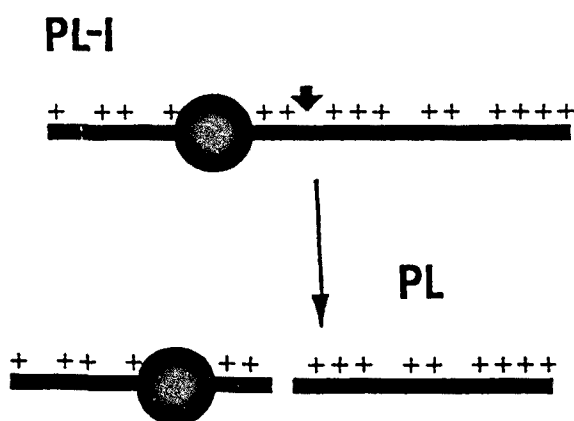
La forma en com es pot arribar a aquests canvis pot ser variada: pot haver-hi una ràpida acumulació de mutacions petites (com seria el cas dels Gasterosteiformes), o bé una multiplicació de gens, variacions importants en alguns d'ells i finalment, una substitució funcional de la proteïna ancestral per part d'aquestes últimes. Una altra possibilitat és l'aparició d'una proteïna nova, a partir d'un nou gen, que reemplaci la primera.

Els fets estudiats en *O. vulgaris* i altres cefalòpodes que no hem inclòit en l'estudi, indiquen que el segon punt és molt factible. En aquestes espècies es troba una protamina principal i altres secundàries, les quals poden provenir de la multiplicació de part o tot el gen, podent divergir amb facilitat. En un estudi preliminar hem observat que la proporció de protamines "minoritàries" presents en el nucli espermàtic madur pot variar des d'un valor de quasi zero (en *Sepia officinalis* i *Loligo vulgaris*) fins a valors iguals o superiors a la protamina "principal" (cas de *Todaropsis argolensis*, no mostrat aquí).

c) Canvis importants i sobtats a partir d'una molècula preexistent.

No hem trobat cap cas en el nostre treball. Estarien representats pels Mol.luscs Bivalves i els Tunicats (Chiva et al., 1995; Ausió, 1995). En els casos esmentats hi trobem espècies amb una molècula d'SNBP (anomenada PL-I) que conté dos braços bàsics i una zona central globular similar a la histona H1. En algunes espècies relacionades es dóna un trencament de la proteïna de manera que en el nucli espermàtic es troben només els braços, i per tant, una proteïna diferent de l'ancestral (Fig.IV.C.1).

Fig.IV.C.1 . Processament de la proteïna PL-I dels mol.luscs bivalves. (Tret de Ausió, 1995).



Aquest tipus de canvi evolutiu pot fer variar sensiblement el model d'SNBP sense canvis a nivells superiors, i representaria un canvi típic molt eficient de millorar la força d'interacció electrostàtica global amb el DNA i el seu empaquetament.

c) Canvis globals en el model SNBP.

En aquest tipus de canvis, el que sembla trivial és que la nova protamina no és homòloga a la de l'espècie ancestral.

Els exemples que hem trobat en aquest treball són clars: el canvi arquogastròpodes (*Monodonta turbinata*) → cenogastròpodes (*Murex brandaris*), i el canvi que ha seguit *Eledone* a partir d'espècies properes a *Octopus*. En

aquests exemples sembla que la variació en el model de la protamina vé imposat per l'actuació de la selecció natural a nivells superiors que el molecular.

En aquests tipus de canvis esmentats, hauria d'haver-hi una expressió d'un nou gen associada a una més àmplia reestructuració de l'expressió del genoma (almenys d'aquelles parts que afecten directa o indirectament a la reproducció en general). Això ens porta a una interessant qüestió en biologia evolutiva: hi ha alguna mena de control o coordinació en els canvis evolutius del genoma?

e) Pèrdua de l'expressió del gen de la SNBP.

No hem trobat cap exemple en el treball present, però és un cas ben documentat en mamífers (pèrdua de la protamina P2, v. Maier et al., 1990), Agnats i peixos (Chiva et al., 1995), i molt possiblement en anfibis (Kasinsky et al., 1999).

Conjuntament amb els casos c) i d), permet explicar la presència esporàdica d'SNBP's diferents dintre d'un grup taxonòmic amb un tipus d'SNBP fixat. En alguns casos la pèrdua de l'expressió del gen de la SNBP condueix a que l'espermatozoide condensi el nucli espermàtic amb histones. Desconeixem si aquests casos tenen relació o no amb canvis a altres nivells d'organització.

D. Dos comentaris addicionals

En la Introducció hem donat una visió dels principals motius químics que componen les protamines. En relació a aquest punt i, finalitzat el nostre treball, volem ampliar aquests punts amb dos comentaris addicionals.

1. Protamines amb precursor. Límits de la basicitat

Independentment de que altres tipus d'SNBP's puguin arribar a una composició química molt simple, hem de constatar que en els casos que hem trobat i/o analitzat aquí (*Murex brandaris*, *Octopus vulgaris*, i protamines de decàpodes), les protamines que provenen d'un precursor presenten la basicitat química més elevada de totes les protamines conegudes. Destaquen la protamina

P3 de *M. brandaris*, i sobretot la protamina principal P d'*O. vulgaris* (v. Fig.III.B.12 i Fig.III.C.5 respectivament).

Les protamines que són sintetitzades en forma de precursor contenen una part N-terminal formada per diferents tipus de residus aminoacídics, i una part C-terminal bàsica, que serà en definitiva la proteïna (pèptid) que es trobarà en el nucli espermàtic. La part N-terminal (part precursora) ha de tenir una funció de regulació de la interacció electrostàtica de la part C-terminal (protamina) amb el DNA, de manera que el processament intranuclear de la part precursora (el qual pot ser simple o complicat) ajudarà a determinar el patró de condensació del DNA espermiogènic (Càceres et al., 1999).

En el nucli espermàtic madur només està present la part corresponent a la protamina, la qual és una part especialitzada exclusivament en empaquetar el DNA. No és d'extranyar que aquestes protamines siguin les que han estat sotmeses a la simplificació major de totes les SNBP's conegudes.

Podem interpretar que aquests pèptids han arribat a assolir el màxim "caràcter bàsic" (en el sentit químic), éssent excepcionalment rics en arginina. Entre aquestes protamines destaca la protamina P d'*Octopus vulgaris*, organitzada com a $(GR_n)_m$ en 43 dels 44 residus aminoacídics que conté.

És de destacar que entre totes les protamines, la major part de motius (*clusters*) d'arginina no superen els 5-6 residus, encara que entre els Cafalòpodes hi trobem excepcions. Sembla doncs, que la millor manera d'interaccionar amb el DNA sigui a partir de les agrupacions de *clusters*.

Els *clusters* d'arginina donen cooperativitat a la interacció amb el DNA (Willmitzer i Wagner, 1980), i durant l'espermiogènesi la progressió de la interacció de la protamina amb l'àcid nucleic possiblement es pot regular molt millor si les arginines es troben en grups petits, que no pas si la protamina és una seqüència lineal homogènia de poliarginines.

En cap cas una protamina és una poliarginina. El fet que la basicitat màxima trobada sigui aproximadament del 80% podria indicar, *grosso modo*, que els *clusters* més competents siguin els de 4-5 arginines separades per un residu

neutre. És destacable que en el cas d'*O. vulgaris* el residu neutre sigui la glicina, un residu que pràcticament no ocupa volum.

2. Les protamines amb cisteïna: permeten més canvis en la molècula?

Protamines riques en cisteïna es coneixen en els mamífers, condriactis i l'octòpode *Eledone* (Balhorn, 1982; Gusse i Chevaillier, 1978). En condriactis i *Eledone*, aquestes protamines estan compostades per una varietat de tipus de residus aminoacídics que no acostumen a estar presents en altres protamines. Addicionalment, la basicitat química de la molècula és menor.

Posats en el cas d'*E. cirrhosa* que ens ocupa principalment en aquest treball, sembla que hi ha *a priori* dues alternatives possibles i no excloents que podrien explicar la baixa basicitat i per tant, la presència de diferents tipus d'aminoàcids que serien prohibitius en altres protamines:

a) El fet que s'estableixin enllaços covalents entre molècules de protamina en el nucli cel.lular, crea una xarxa més o menys rígida que atrapa el DNA. En aquest cas, la interacció de la protamina amb el DNA es pot "relaxar" fins a certs límits sense conseqüències importants que afectin l'estructura i estabilitat d'algunes arginines per altres aminoàcids.

b) (Exclusivament aplicat a *Eledone*): és necessari que la interacció de la protamina amb el DNA no sigui massa intensa, i que el complex tingui una estructura "amorfa". D'aquesta manera, la força que efectuen els microtúbuls podrà "deformar" la cromatina i fer que el nucli adquireixi una forma espiralitzada. Una protamina com la dels decàpodes segurament no permetria l'amotllament del nucli cap a la forma helicoidal.



V. Conclusions

P2 RRRRRRGKGRGKRRKGGKGGKRRGSKGRKKKKGGKGGKRRR
RRRRRKGSKGKGGK

P3 RRRRRRGKGGKGGKGGKGGKRRRRGRKGGKGGKGGKGGKRRGGR
RRRRRKGKGGK

- 6- En els **Gasterosteiformes** les protamines han evolucionat des d'un model identificable al de la protamina típica dels peixos ossis fins a formes moleculars majors. En aquest canvi, la part C-terminal de les molècules s'ha mostrat amb una major permissivitat evolutiva. L'estructura primària de 5 de les espècies (*Gasterosteus aculeatus*, *Gasterosteus aculeatus trachurus*, *Gasterosteus wheatlandi*, *Pungitius pungitius* i *Aulorhynchus flavidus*) és la següent:

G.a i G.a.t PRRTGSRYPARRRRVARRTPLRRRRVIRRRRVIRRGAGFQQTSRR

G.w PRRVASRHGPARRRRATRRTPIVRRRRVLRRKRVLRRSVGVQQPTTRR

P.p PRRSASRVSIRRRRTARRTPMLPRRRVFRRRTIRPKSRR

A.f PRRASSRYGRVRRRRRRAPARRSPMRRRRMAFRRRR

- 7- En els òvuls del peix ossi *Dicentrarchus labrax* (llobarro), hem trobat una activitat que modifica les característiques de composició i estructura del nucli espermàtic homoespecífic. Aquesta activitat però, encara ha de ser identificada.