

CARACTERITZACIÓ QUÍMICA DE LA PROTAMINA DEL CALAMARS *LOLIGO VULGARIS* I LA SEVA INTERACCIÓ AMB L'ADN

per M. UNZETA, P. SUAU, L. PUIGJANER i J. A. SUBIRANA

Departament de Química Macromolecular - C.S.I.C. - E.T.S.I.I.

El principal objectiu d'aquest treball és el de caracteritzar químicament proteïnes bàsiques procedents del nucli de cèl·lules germinals masculines del calamars (*Loligo vulgaris*), i estudiar el complex nucleoprotèinic format per la interacció de la protamina amb l'ADN.

Hom obtingué aquesta protamina de l'esperma de calamars amb extracció àcida en medi ClH 0.25N, havent estat prèviament purificats els nuclis per mitjà d'extraccions successives amb àcid acètic al 5 % i àcid sulfúric 0.2N.

Aquesta protamina fou caracteritzada per anàlisi d'aminoàcids, i posseïa més d'un 70 % d'arginina, un 10 % de serina, un 7 % de tirosina i la resta repartit entre prolina, glicina, alanina, histidina i lisina. El tret més important de l'esmentada proteïna és el gran contingut en tirosina, en comparació amb totes les protamines estudiades fins ara^{1,2}.

Hom tractà de determinar-ne la microheterogeneïtat per mètodes cromatogràfics en columna, i assolí fraccionar-la en dues subunitats per cromatografia en Biogel BP 10, bo i eluint-la amb ClNa 0.25M en ClH 0.02N. L'anàlisi d'aminoàcids d'aquestes dues fraccions, aparentment similars, ofereix petites variants en el nombre de residus de prolina, glicina, alanina i tirosina.

Posteriorment aquestes fraccions foren sotmeses a l'atac enzimàtic amb tripsina i termolisina⁴ i hom féu llurs mapes peptídics per mitjà de l'electroforesi d'alt voltatge combinada amb cromatografia en paper en 2.^a dimensió.

Aparentment aquests mapes peptídics són similars, d'acord amb les petites variacions que presenta l'anàlisi d'aminoàcids.

De la mateixa manera, l'única forma de determinar amb certesa les

diferències entre aquestes dues fraccions seria trobar la seqüència d'aminoàcids completa de cada pèptid i arribar a conèixer la seqüència completa d'aminoàcids de la molècula de protamina.

La interacció de la protamina amb l'ADN fou estudiada per mitjà de la difracció de raigs X. Aquesta proteïna té una gran afinitat per l'ADN, i forma complexos insolubles en ClNa 2M. Aquest fet podria ésser explicat pel gran contingut en arginina i per la presència de tirosina. La nucleoprotamina fou preparada partint de nuclis purificats d'espermatozous. Les cues dels espermatozous foren eliminades per sonicació en aigua de mar, seguida per rentats successius amb sacarosa 0.25M amb Triton X-100 0.5 %, Tris-ClH 0.25M pH = 8 i ClNa 0.15M. Tot seguit la nucleoprotamina fou dissociada amb clorur de guanidina 4M. Les restes de citoplasma i la membrana nuclear foren eliminats per centrifugació. La nucleoprotamina fou reconstituïda en un gradient de diàlisi en presència de concentracions decreixents de clorur de guanidina, EDTA 10^{-3} M pH = 7.5. Finalment fou dialitzada en presència de ClNa 10^{-3} M, EDTA 10^{-3} M, pH = 7.5. Del precipitat fibrós obtingut foren estriades algunes fibres, de les quals hom féu diagrames de difracció a diferents humitats relatives.

En qualsevol cas els diagrames patentitzen una gran cristallinitat, bé que l'orientació varia en les diferents mostres. L'anàlisi dels diagrames evidencia que a la nucleoprotamina de calamars l'ADN és en forma B i que la cèhula unitària és hexagonal, amb una sola molècula per cèhula; com s'esdevé en totes les nucleoprotamines estudiades fins ara⁵. Les dimensions de la cèhula unitària són $a = 22.3 \text{ \AA}$ i $c = 33.5 \text{ \AA}$ a 92 % d'humitat relativa. La intensitat de la radiació difractada en el primer nivell, molt superior a la de l'ADN, fa suposar que la protamina es troba en el solc estret de l'ADN⁵. Per aquest motiu la doble hèlice de l'ADN ressembla una hèlice senzilla, d'una sola espira formada per les dues cadenes de fosfats i la protamina. Els estudis portats a terme a diferents humitats relatives demostren que l'accés de l'aigua a l'estructura és limitat. L'embolcallament hexagonal de les molècules i l'estabilització de l'ADN en la nucleoprotamina enfront dels canvis d'humitat relativa fan suposar que les protamines disminueixen la reactivitat química de l'ADN en el nucli espermàtic, bo i protegint-lo dels agents degradants i mutagènics.

BIBLIOGRAFIA

1. ANDO, T. i SAWADA, F.: «J. Biochemistry», 48, 6 (1960).
2. BRETZEL, G.: «Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.», 353S, 1362 (1972).
3. FEUGHELMAN, M., LANGRIDGE, R., SEEDS, W. E., STOKES, A. R., WILSON, H. R., HOOPER, C. W., WILKINS, M. H. F., BARCLAY, R. K. i HAMILTON, L. D.: «Nature», 175, 834 (1955).
4. SMYTH, D. G., dins *Methods in Enzymology*, Hirs, C. H. M. ed., 11, 214. «Academic Press», London (1967).
5. SUBIRANA, J. A. i PUIGJANER, L. C., *X-Ray Diffraction Studies of Nucleoprotamines from Molluscs*, presentat al 5th Jerusalem Symposium «Conformation of Biological Molecules and Polymers» (abril 1972).