

OBTENCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE LA RIBONUCLEASA A RECOMBINANT

M. G. Coll, M. Ribó i M. Vilanova

Departament de Biologia. Universitat de Girona. Pl. Hospital, 6. 17071 Girona.

RESUM

S'ha establert un protocol de purificació de la ribonucleasa de pàncreas boví (RNAasa A) recombinant expressada en *E. coli* BL21(DE3). Aquesta soca d'*E. coli* ha estat transformada amb un vector d'expressió que conté el cDNA del gen de la RNAasa A situat darrere la seqüència senyal pelB codificadora per un pèptid senyal d'exportació de la proteïna heteròloga a l'espai periplasmàtic de la cèl·lula. Seguint l'esmentat protocol s'obtenen al voltant de 30 mg de proteïna recombinant pura i activa per litre de cultiu en menys d'una setmana.

RESUMEN

Se ha establecido un protocolo de purificación de la ribonucleasa de páncreas bovino (RNAasa A) recombinante expresada en *E. coli* BL21(DE3). Esta cepa ha sido transformada con un vector de expresión que contiene el cDNA del gen de la RNAasa A situado detrás de la secuencia señal pelB codificadora por un péptido señal de exportación de la proteína heteróloga hacia el espacio periplasmático de la célula. Siguiendo dicho protocolo se obtienen alrededor de 30 mg de proteína recombinante pura y activa por litro de cultivo en menos de una semana.

ABSTRACT

A purification protocol of recombinant bovine pancreatic ribonuclease (RNAase A) expressed from *E. coli* BL21(DE3) has been established. This *E. coli* strain was transformed with an expression plasmid containing the RNAase A cDNA fused to the pelB signal sequence that codes for a signal peptide exporting the heterologous protein to the periplasma. About 30 mg of pure and active recombinant protein per litre of culture is obtained in less than one week.

Keywords: recombinant protein, purification, Ribonuclease A.

INTRODUCCIÓ

Les ribonucleases són enzims que catalitzen la degradació dels àcids ribonucleics i es troben en quasi tots els teixits, animals i vegetals, i en microorganismes.

La ribonucleasa de pàncreas boví (RNAasa A) (EC 3.1.27.5.) ha estat una de les proteïnes més àmpliament estudiades pel que fa a plegament, estabilitat i química de proteïnes; enzimologia; i evolució molecular (Richards i Wyckoff, 1971; Karpeisky i Yakovlev, 1981; Blackburn i Moore, 1982; Wlodaver, 1985; Eftink i Bilot-

nen, 1987; Beintema et al. 1988; Parés et al. 1991). La RNAasa A va ser cristal·litzada per primera vegada fa gairebé 50 anys (Kunitz, 1940), i aquests cristalls van ser difractats a 2 Å (Fankuchen, 1941). Les estructures de la RNAasa A i de la RNAasa S, producte de la digestió controlada de la RNAasa A amb subtilisina, com també la de complexos d'aquestes amb diversos inhibidors i anàlegs de substrat, han estat determinades mitjançant estudis de difracció de raigs X (Wlodaver, 1985). Finalment, la RNAasa A ha estat una de les primeres proteïnes estudiades per resonància magnètica nuclear tant per a l'elaboració de l'estructura proteica com per al plegament proteic (Rico et al. 1989).

Malgrat el gran nombre d'estudis, el paper concret de cada residu del centre actiu de la RNAasa A durant la catàlisi és dubtós. La RNAasa A és una proteïna petita (de massa molecular 13,7 kDa, constituïda per una única cadena polipeptídica formada per 124 residus, dels quals vuit són residus de cisteïna que formen quatre ponts disulfur) catalitzadora de la hidròlisi dels enllaços 3'-5'-fosfodiester de les cadenes senzilles de RNA mitjançant una reacció en dues etapes. El mecanisme de catàlisi més acceptat és el de Findley et al. (1961, 1962), modificat per Roberts et al. (1969) i refinat per Usher et al. (1970). En la primera etapa del mecanisme (figura 1), anomenada de transfosforilació, la cadena lateral de la His-12 actua de base desprotonant el grup O2' de la molècula de substrat i la cadena lateral de la His-119 actua d'àcid, protonant el grup O5'R que s'allibera i debilitant l'enllaç P-O5', i facilita així l'atac *in line* del O2' sobre el fòsfor. Aquestes funcions s'inverteixen en l'etapa d'hidròlisi on la His-119 actua de base, capta un protó d'una molècula d'aigua, mentre que la His-12 actua d'àcid, protonant el grup O2'. En les dues etapes es forma un complex intermediari, on l'àtom de fòsfor adopta una configuració de bipiràmide trigonal, estabilitzada principalment per la Lys-41.

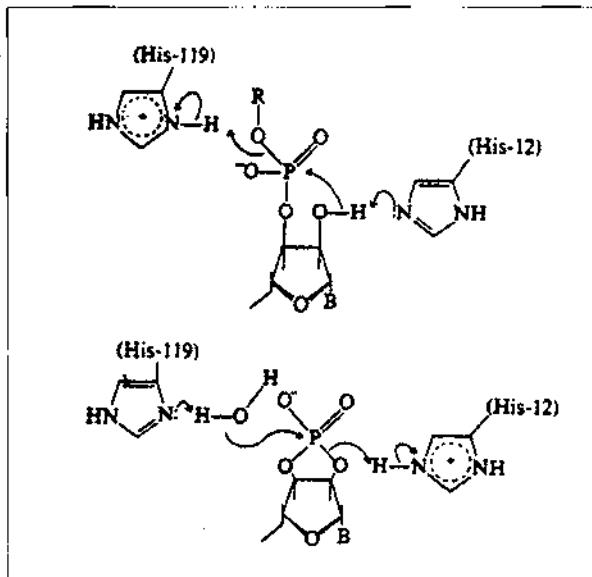


Fig. 1. Mecanisme catalític de la RNAasa A. Esquema dels desplaçaments electrònics originats durant la catàlisi àcid-base segons el mecanisme catalític acceptat actualment. Reproduït de Fersht (1985).

Estudis recents sobre el mecanisme de la RNAasa A (Cuchillo et al. 1993, Cuchillo i Nogués, 1993) indiquen que no és correcte considerar la reacció com un procés seqüencial, amb la formació d'un intermediari associat a l'enzim, sinó que les dues etapes, transfosforilació i hidròlisi, s'haurien de considerar com dos processos catalítics separats i l'etapa d'hidròlisi com un procés equivalent a la reacció inversa de l'etapa de transfosforilació.

En la interacció de la RNAasa A amb el seu substrat natural, el RNA, hi participen, a més del centre catalític, altres subetis de fixació de substrat (Richards i Wyckoff 1971; Blackburn i Moore, 1982; Eftink i Biltonen, 1987; Parés et al. 1991). El model proposat per a aquesta interacció s'indica a la figura 2.

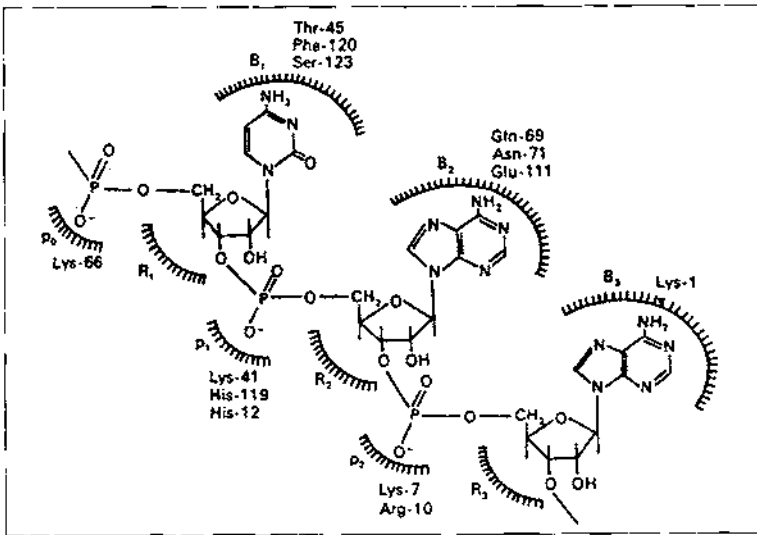


Fig. 2. Representació esquemàtica de la interacció d'un fragment de RNA amb la RNAasa A. B_1 , R_1 i p_1 fan referència als subetis per a la fixació de bases, riboses i fوسفats, respectivament. Es defineix p_1 com el subeti catalític on es troba el grup fosfat de l'enllaç fosfodiester que s'escindeix, B_1 com a seti principal específic per pirimidines i B_2 com a subeti secundari de fixació de bases amb preferència per purines. S'indiquen els residus que podrien participar en cada subeti. Reproduït de Parés et al. (1991).

La dificultat d'obtenir quantitats considerables de determinats tipus de ribonucleases, així com l'interès per realitzar estudis d'estructura i funció de la RNAasa A o altres RNAases, ha portat diferents autors a considerar el clonatge del gen i l'expressió heteròloga de la proteïna en qüestió. L'expressió de les ribonucleases en sistemes procarïotes ha estat limitada principalment per la seva potencial activitat citotòxica per a les cèl·lules transformades.

De tots els sistemes descrits a la bibliografia referent al clonatge i expressió de la RNAasa A, no n'hi ha cap que permeti obtenir rendiments elevats per pensar en l'obtenció de mutants d'aquesta proteïna per estudiar tant el seu plegament com la interacció enzim-substrat, mitjançant la substitució d'aminoàcids que participen en aquests processos.

En aquest treball es descriu un sistema d'obtenció de RNAasa A recombinant que permet aconseguir al voltant de 30 mg de proteïna pura i activa per litre de cultiu en menys d'una setmana de treball.

MATERIAL I MÈTODES

Material

Per a l'expressió de la RNAasa A recombinant en *E. coli* s'ha utilitzat la soca BL21(DE3) (F',*ompT*,*rB*,*mB*'(DE3)) (Studier i Moffatt, 1986) de Novagen (Madison, WI, EUA). Aquesta soca presenta la particularitat que en el gen *int* del genoma bacterià s'ha inserit el bacteriòfag DE3, derivat del fag λ , que és portador entre altres regions del promotor *lac* UV5, induïble per isopropil β -D-tiogalactopiranosid (IPTG), i del gen per la RNA polimerasa de T7.

El vector d'expressió utilitzat ha estat el pET-22b (+) que conté, entre altres regions, un promotor del tipus T7 *lac* reconeixedor de la RNA polimerasa de T7. A través de les dianes *Msc* I i *Sal* I d'aquest vector s'ha lligat el gen de la RNAasa A obtingut a partir d'una llibreria de cDNA de pàncrees de vaca. En l'esmentada posició el gen de la RNAasa A queda situat just al darrere de la seqüència senyal pel B que codifica per un pèptid senyal d'exportació, el qual permet exportar la proteïna heteròloga cap a l'espai periplasmàtic de la cèl·lula transformada. La construcció resultant s'anomena pBXR (figura 3) i ens ha estat cedida pel Dr. Ronald T. Raines, del Departament de Bioquímica de la Universitat de Wisconsin-Madison (Wisconsin-EUA).

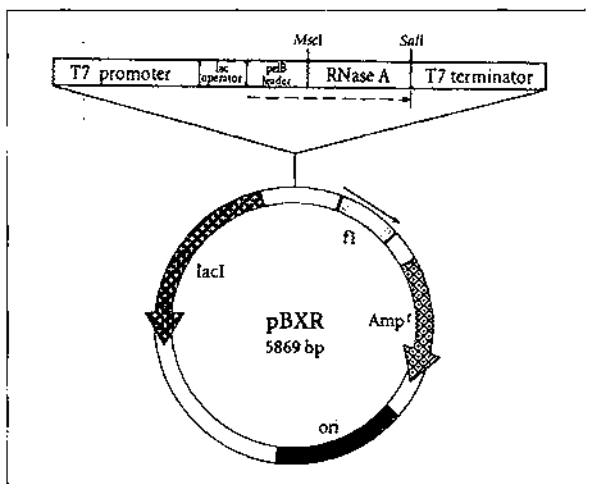


Figura 3. Esquema de la construcció pBXR.

La RNAasa A no recombinant s'ha obtingut per purificació de la ribonucleasa pancreàtica bovina comercial de Sigma Chemical Company (Sant Louis, MO, EUA) mitjançant cromatografia de bescanvi catiónic seguint el mètode descrit per Alonso et al. (1986).

Els reactius utilitzats foren de grau analític. Les dissolucions d'ampicilina i d'IPTG foren esterilitzades per filtració utilitzant filtres de 0,22 mm (Millipore). El medi de cultiu utilitzat fou TB (*Terrific broth*) (Maniatis et al. 1989) i es va autoclavar.

Totes les diàlisis s'han efectuat en tubs de diàlisi Spectra/Por; Spectrum, Texas, EUA, amb una mida d'exclusió de 3500 Da.

Mètodes

Electroforesi

Les proteïnes foren separades per electroforesi discontinua en gels de poliacrilamida al 15% en presència de SDS (PAGE 15%-SDS) (0,1% p/v) (Ausubel et al. 1989).

Determinació de la concentració de proteïna

- Mètode de Bradford (1976). El reactiu utilitzat ha estat subministrat per Bio-Rad.
- Mètode espectrofotomètric a partir del valor d'absorbància a 278 nm i utilitzant el coeficient d'extinció molar a aquesta longitud d'ona $\epsilon_{278} = 9800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Sela i Anfinsen, 1957).

Determinació de la seqüència N-terminal de la RNAasa A recombinant

S'ha realitzat al Servei de Química de Proteïnes del Centro de Investigaciones Biológicas, del CSIC de Madrid, emprant un seqüenciador automàtic de proteïnes Applied Biosystems 447 A.

Determinació de l'activitat ribonucleasa

1. Determinacions espectrofotomètriques per a la determinació dels paràmetres cinètics de les ribonucleases amb les quals s'ha treballat:

- Seguiment espectrofotomètric de la hidròlisi de citidina 2',3'-fosfat cíclic (cCMP) (Sigma, EUA) (Crook et al. 1960, Herries et al. 1962). S'ha utilitzat el valor de $\Delta\epsilon_{296} = 516,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Arús, 1981).
- Seguiment espectrofotomètric de la hidròlisi de poli(C) (Sigma, EUA) mesurant el decrement d'absorbància a 294 nm (Boix, 1993).

En ambdós casos s'ha utilitzat un espectrofotòmetre Hewlet Packard HP 8452 A i cambra de cubetes termostatitzada a 25°C.

2. Determinacions en placa d'agarosa-RNA.

S'ha utilitzat per detectar les regions d'una cromatografia amb activitat ribonucleasa, ja que permet assajar un elevat nombre de fraccions de manera molt ràpida i sensible. Es van dipositar, de manera ordenada, les fraccions de proteïna (1 μl) sobre una placa d'agarosa de baixa EEO (Ecogen) (0,8% p/v) que conté RNA (*Torula Yeast*, tipus VI, Sigma, EUA) (0,5 mg/ml) i amortidor Tris/HCl 0,1 M, pH 8. Les plaques es van incubar a 37°C durant 12-24 h i llavors es van tenyir amb una solució de toluídina 0,1% (p/v) en amortidor Tris/HCl 10 mM, pH 8, que s'uneix al RNA. Les fraccions amb activitat ribonucleasa van aparèixer com una taca blanca sobre un fons blau.

3. Determinacions electroforètiques en gels PAGE-SDS amb poli(C) revelats per activitat (Zimogrames) (Bravo et al. 1994).

Cromatografies

1. A pressió atmosfèrica:

- Cromatografia de bescanvi catiònic emprant una reina del tipus CM-Sepharose CL-6B (Farmàcia, Suècia) empaquetada en una columna (2,5 cm x 20 cm)

i equilibrada amb amortidor Tris/HCl 20 mM, pH 7,8 contenint urea (6M) i 1,4-ditio-DL-treitol (DTT) (2 mM). El gradient aplicat fou lineal de NaCl (0-0,5 M) en el mateix amortidor.

2. Pel sistema de cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC) utilitzant un equip Waters (Millipore Corp., EUA):

- a) Cromatografia de bescanvi catiònic emprant una columna Protein-pak CM-8HR AP-1 (Millipore, EUA) equilibrada amb amortidor Tris/HCl 20 mM, pH 8. El gradient aplicat fou lineal de NaCl (0-1 M) en el mateix amortidor.
- b) Cromatografia de fase inversa emprant una columna Vydac 214-TP C₁₈ (Vydac, EUA) equilibrada amb acetonitril 10% : àcid trifluoracètic 0,1%. El gradient aplicat fou lineal d'acetonitril (10-100%).

En tots tres tipus de cromatografia les fraccions recollides van ser enregistrades a 280 nm i s'assajà tant la seva activitat, per zimograma, com la seva puresa, per electroforesi en gels PAGE 15%-SDS.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Al cap de 7 hores després de la inducció del cultiu de cèl·lules d'*E. coli* BL21(DE3) transformades amb el vector d'expressió de la RNAasa A descrit com a pBXR que havien estat creixent en medi líquid TB suplementat amb ampicilina (50 µg/ml) a 37°C en agitació constant (250 rpm) es va observar que la major part de la RNAasa A produïda no apareixia en el sobrenedant del cultiu en centrifugar-se aquest previ xoc osmòtic. Per tant, l'enzim quedava retintut a la fracció cel·lular tot i que el sistema d'expressió emprat està dissenyat per dirigir l'exportació de la proteïna recombinant a l'espai periplasmàtic de la cèl·lula. La RNAasa A era produïda en una forma insoluble però processada, ja que l'anàlisi dels set primers residus de la seva seqüència N-terminal va indicar que l'escissió entre el pèptid senyal i la proteïna s'havia produït correctament, ja que els set primers residus van coincidir amb els de la RNAasa A comercial.

L'estratègia seguida en la purificació de la RNAasa A recombinant va consistir a aconseguir solubilitzar la màxima quantitat de proteïna a partir de la resuspensió del sediment cel·lular sota condicions desnaturalitzants (presència d'urea) i reductores (presència de DTT) per tal de reduir els ponts disulfur entre molècules que s'haguessin pogut formar i d'aquesta manera desfer els possibles agregats proteics, per posteriorment dur a terme el procés de purificació de la RNAasa A recombinant i, una vegada pura, sotmetre-la a un procés de replègament i reoxidació sota condicions òptimes per a la RNAasa A.

El sediment de les cèl·lules induïdes a l'expressió del gen de la RNAasa A es va resuspendre en 500 ml d'amortidor de solubilització (Tris/HCl 20 mM, pH 7,8, contenint urea (6M), EDTA (1 mM), PMSF (0,2 mM) i DTT (20 mM) i es va incubar durant 1 hora a 37°C en agitació constant (250 rpm). Aquest procés es va realitzar fraccionadament, en tres etapes, per tal de solubilitzar la màxima quantitat de proteïna.

El sobrenedant resultant de cada etapa es va reunir i sotmetre al procés de purificació de la RNAasa A recombinant per cromatografia de bescanvi catiònic a pressió atmosfèrica en presència d'agent desnaturalitzant i reductor. El perfil d'elució de proteïna corresponent, enregistrat a 280 nm, va indicar la presència d'un pic central i majoritari amb activitat ribonucleasa (figura 4). En les condicions en què es va portar a

terme aquesta cromatografia de bescanvi catònic es va poder separar una fracció corresponent a proteïna amb activitat ribonucleasa d'altres proteïnes, la major part de les quals s'elueixen durant el rentat de la columna. L'anàlisi electroforètica en gels PAGE 15%-SDS va mostrar la presència d'una única banda de mobilitat similar a la de la RNAasa A comercial i l'anàlisi per zimograma va demostrar que aquesta banda presentava activitat ribonucleasa. Tot i la presència de la urea i el DTT, tant en l'amortidor de solubilització com en el de la cromatografia, va ser possible assajar l'activitat de les diferents fraccions, pel mètode en placa d'agarosa-RNA i per zimograma, gràcies a l'elevada sensibilitat de les dues tècniques i al fet que ambdues permeten el replegament, encara que parcial, de l'enzim.

Per tant, a priori semblava que la RNAasa A recombinant estava ja purificada i

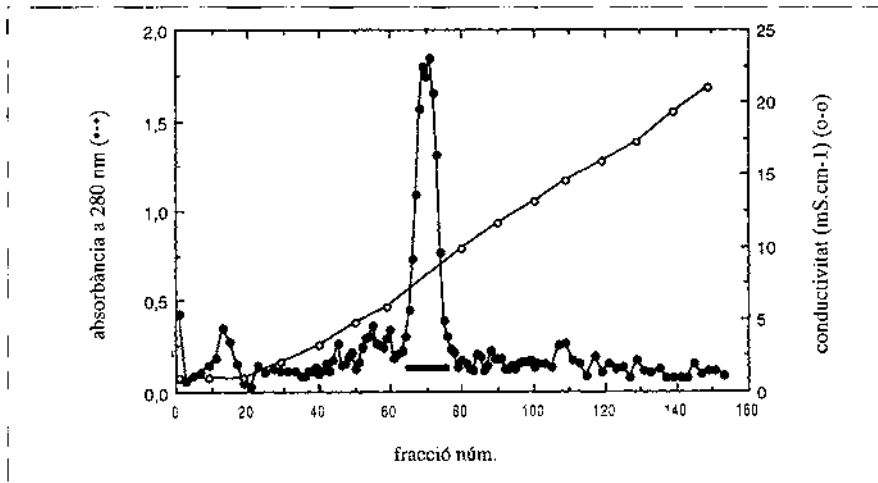


Fig. 4. Perfil d'elució de proteïna enregistrat a 280 nm, corresponent a la cromatografia de bescanvi catònic (CM-Sepharose Cl-6B) a pressió atmosfèrica en presència d'agent desnaturalitzant i reductor del sobrenedant (500 ml) corresponent al procés de solubilització de la RNAasa A recombinant d'un cultiu d'E. coli BL21 (DE3) transformat amb el vector pBXR. La fracció que presenta activitat ribonucleasa, eluïda a un valor de conductivitat al voltant de 8 mS.cm⁻¹, s'ha indicat amb una barra negra sota el cromatograma (•••) absorbància a 280 nm, (o-o) conductivitat en mS.cm⁻¹.

es va procedir al procés de replegament i reoxidació de la proteïna mitjançant dues diàlisis. En la primera diàlisi, contra l'amortidor Tris/HCl 20 mM, pH 7,8 contenint NaCl (0,1 M), glutatió oxidat (0,2 mM) i glutatió reduït (1 mM), es va poder eliminar la urea i el DTT provinent de les etapes anteriors, alhora que va permetre el procés de reoxidació dels quatre ponts disulfur gràcies a la presència de la parella redox glutatió oxidat/glutatió reduït a les concentracions esmentades anteriorment (del Cardayré et al. 1995). La segona diàlisi, contra l'amortidor Tris/HCl 20 mM, pH 7,6, va permetre acabar d'eliminar la urea i el DTT i alhora la sal i el glutatió. Finalment es va centrifugar la mostra per tal d'eliminar la fracció de proteïna no soluble, probablement no replegada, i es va liofilitzar.

Posteriorment es va comprovar la puresa de la proteïna aïllada en aquesta etapa

mitjançant dues cromatografies pel sistema de HPLC, una primera de bescanvi catiònic i una segona de fase inversa. En les condicions en què es van portar a terme aquestes dues cromatografies es va obtenir un únic pic amb activitat ribonucleasa molt ben definit (cromatogrames no inclosos). L'anàlisi electroforètica en gels PAGE 15%-SDS va mostrar la presència d'una única banda de mobilitat idèntica a la de la RNAasa A comercial en cadascun dels casos i l'anàlisi per zimograma va demostrar que aquesta banda presentava activitat ribonucleasa.

A les figures 5 i 6 es mostren els resultats corresponents a l'anàlisi electroforètica en gel PAGE 15%-SDS tenyit amb blau de Coomassie i en zimograma, respectivament, de les fraccions obtingudes durant el procés de purificació de la RNAasa A recombinant. Amb els resultats obtinguts es pot veure que després de la cromatografia de bescanvi catiònic a pressió atmosfèrica en presència d'urea i DTT es detecta una sola banda, de mobilitat idèntica a la de la RNAasa A comercial, i amb activitat ribonucleasa per a les diferents fraccions analitzades. Com a conclusió d'aquestes anàlisis es pot veure que s'aconsegueix purificar la proteïna recombinant en una sola etapa cromatogràfica corresponent a una cromatografia de bescanvi catiònic a pressió atmosfèrica en presència d'urea i DTT. Això suposa aconseguir la RNAasa A recombinant pura en un temps relativament curt, cinc dies, incloent des del creixement del cultiu cel·lular fins a l'obtenció de la proteïna replegada i reduïda.

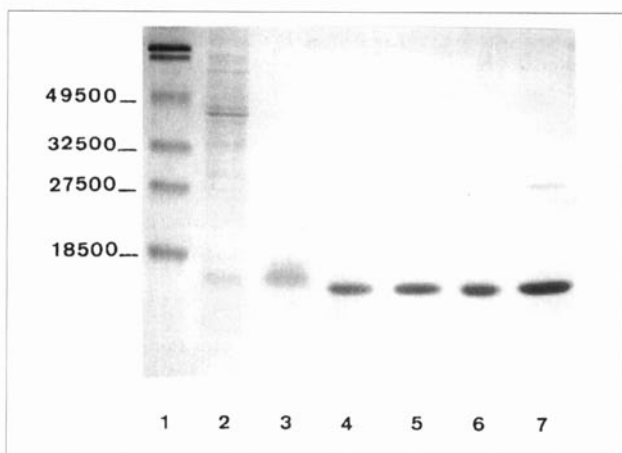


Fig. 5. Anàlisi electroforètiques en gels PAGE 15%-SDS tenyits amb blau de Coomassie de les fraccions obtingudes en la purificació de la RNAasa A recombinant. 1) Marcadors de massa molecular pretenyits (fosforilasa b (106000 Da), BSA (80000 Da), ovoalbúmina (49500 Da), anhidrasa carbònica (32500 Da), inhibidor de tripsina de soja (27500 Da) i lisozim (18500 Da); 2) fracció corresponent al procés de solubilització de RNAasa A recombinant; 3) fracció majoritària amb activitat ribonucleasa corresponent a la cromatografia de bescanvi catiònic a pressió atmosfèrica en presència d'urea i DTT; 4) fracció corresponent al sobrenedant de la proteïna amb activitat ribonucleasa després del procés de replegament i reoxidació amb centrifugació prèvia per tal d'eliminar la fracció de proteïna no soluble; 5) fracció majoritària amb activitat ribonucleasa de la cromatografia de bescanvi catiònic per HPLC; 6) fracció majoritària amb activitat ribonucleasa de la cromatografia de fase inversa per HPLC; 7) RNAasa A comercial.

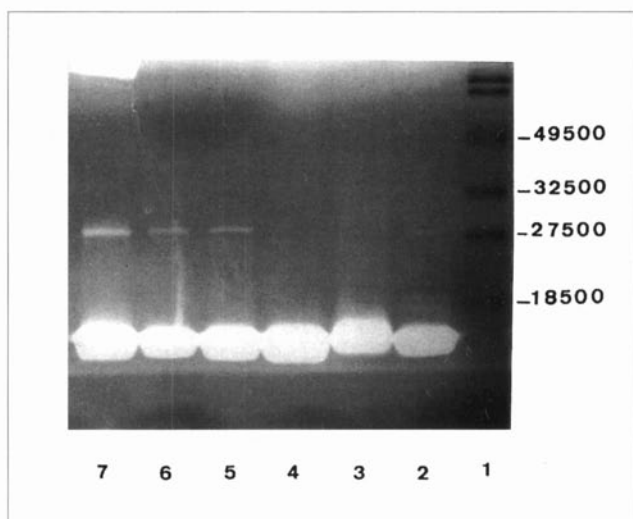


Fig. 6. Anàlisi electroforètica en gels PAGE 15%-SDS amb poli(C) revelats per activitat (zimograma) de les fraccions obtingudes en el procés de purificació de la RNAasa A recombinant. Els carrers 1), 2), 3), 4), 5), 6) i 7) es corresponen amb els indicats a la figura anterior (5).

La taula I mostra d'una manera comparativa els diferents sistemes d'expressió de la RNAasa A descrits a la bibliografia, com també els rendiments corresponents, els quals resulten molt inferiors al que s'ha obtingut en aquest procés (al voltant de 30 mg de RNAasa A recombinant pura i activa per litre de cultiu després de la cromatografia de bescanvi catiònic pel sistema de HPLC).

S'ha caracteritzat la RNAasa A recombinant a nivell cinètic determinant els paràmetres cinètics enfront de dos substrats, poli(C) i cCMP, per tal de comparar-los amb els de la RNAasa A comercial. La mostra de RNAasa A recombinant assajada provenia de l'etapa de cromatografia de bescanvi catiònic pel sistema de HPLC. Els resultats d'aquestes anàlisis s'indiquen a la taula II.

Els paràmetres cinètics calculats amb el substrat cCMP per a la proteïna recombinant són pràcticament idèntics als de la RNAasa A comercial, mentre que els calculats amb el substrat poli(C) es desvien lleugerament pel que fa a $V_{m\grave{a}x}$. Aquestes desviacions estarien dins del marge d'error experimental d'aquest mètode de determinació de l'activitat ribonucleasa amb un substrat d'elevada massa molecular.

Aquests resultats indiquen que el plegament de la proteïna recombinant ha estat correcte, en adoptar una conformació idèntica a la de la proteïna obtinguda a partir de pàncrees boví.

Taula I. Anàlisi comparativa dels diferents sistemes d'expressió de la RNAasa A.
 (apr[Bam P1]: gen de la proteasa alcalina de *Bacillus amyloliquefaciens*; P_{17} : promotor de la RNA polimerasa de T7; P_{lac} : modificador del promotor de l'operó de la lactosa;
 P_{mp} : promotor de l'operó del triptòfan.

GEN	VECTOR/ SIST. EXPRESSIÓ	ORGANISME	RENDIMENT (RNAasa A / cultiu)	PROCEDIMENT PURIFICACIÓ	REFERÈNCIA
sinètic	pGX21.34 / $P_{(apr[Bam P1])}$ pèp. senyal (apr[Bam P1]) secreció al medi de cultiu	<i>B. subtilis</i> GX5596	1-5 mg no purificada	-	Vasantha i Filipula (1989)
sinètic	pT7-7 / P_{17} expressió citosòlica en cossos d'inclusió	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	0.5-2 mg no purificada	prep. cossos d'inclusió reducció i oxidació 2 precipit. sulfat amònic 1 cromatografia	Schulz i Baldwin (1992)
sinètic	pHR148 / P_{mp} exportació pèp. senyal RNAasa A de ratolí	<i>E. coli</i> lon hptr	3-6 mg pura i activa	lisi cel·lular 3 cromatografies	Boix i col. (1994)
cDNA	pKK 223.3 / P_{lac} bicistrònic exportació pèp. senyal RNAasa A	<i>E. coli</i> JM107	0.1 mg pura i activa	lisi cel·lular 2 cromatografies	Tarragona-Fiol i col. (1992)
sinètic	pGEMEX-2 / P_{17} citosol proteïna fusió amb prot. 10 i factor Xa	<i>E. coli</i> HMS 174(DE3) -pLys(S)	3-5 mg pura i activa	lisi cel·lular sulfonació residus Cis digestió amb F. Xa 3 cromatografies renaturalització	Laity i col. (1993)
cDNA	pET22b(+)/ P_{17} exportació pèp. senyal pelB	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	30 mg pura i activa	lisi cel·lular 1 cromatografia replegament i reoxidació	aquest treball

Taula II. Comparació dels paràmetres cinètics de la RNAasa A recombinant i la RNAasa A comercial per als substrats cCMP i poli(C). Ambdós assaigs s'han realitzat en amortidor acetat sòdic 0.2 M, pH 5.5 i a 25°C. Per al substrat cCMP s'ha utilitzat una concentració final d'enzim de 0.1 μ M i de substrat entre 0.1 i 3 mM, i per al substrat poli(C), una concentració d'enzim de 5 nM i de substrat entre 0.1 i 2.5 mg/ml.

cCMP

Enzim	Km (mM)	K_{cat} (min ⁻¹)	K_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹) $\times 10^3$
RNAasa A comercial	0.42	147	5.77
RNAasa A recombinant	0.48	145	4.98

Poli (C)

Enzim	Km (mg/ml)	Rel. $V_{max}/[E_0]$ (%)	Rel. $V_{max}/[E_0] / K_m$
RNAasa A comercial	0.21	100	209.4
RNAasa A recombinant	0.22	90	184.5

AGRAÏMENTS

Aquest treball ha estat subvencionat per l'ajut PB93-0872 de la DGICYT del Ministeri d'Educació y Ciència. Volem agrair a la Fundació M. F. de Roviralta (Barcelona) els diferents ajuts concedits per a l'adquisició d'equipament de laboratori.

Bibliografia

- ALONSO, J., NOGUÉS, M. V. i CUCHILLO, C. M. 1986. Modification of bovine pancreatic ribonuclease A with 6-chloropurine riboside. *Arch. Biochem. Biophys.* 246: 681-689.
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A. i STRUHL, K. 1989. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley. Nova York.
- BEINTEMA, J. J., SCHÜLLER, C., IRIE, M. i CARSANA, A. 1988. Molecular evolution of the ribonuclease superfamily. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 51: 165-192.
- BLACKBURN, P. i MOORE, S. 1982. Pancreatic ribonucleases. *The Enzymes*. Boyer P. D. (ed.). Academic Press. Nova York. 15: 317-433.
- BOIX, E. 1993. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.
- BOIX, E., NOGUÉS, M. V., SCHEIN, C. H., BENNER, S. A. i CUCHILLO, C. M. 1994. Reverse transfosforilation by ribonuclease A needs an intact p_2 binding site. Point mutations at Lys-7 and Arg-10 alter the catalytic properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 269: 2529-2271.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-252.
- BRAVO, J., FERNÁNDEZ, E., RIBÓ, M., DE LLORENS, R. i CUCHILLO, C. M. 1994. A versatile negative-staining ribonuclease zymogram. *Anal. Biochem.* 219: 82-86.
- CROOK, E. M., MATHIAS, A. P. i RABIN, B. R. 1960. Spectrophotometric assay of bovine pancreatic ribonuclease by the use of cytidine 2':3'-phosphate. *Biochem. J.* 74: 234-238.
- CUCHILLO, C. M. i NOGUÉS, M. V. 1993. The mechanism of breakdown of poly(C) by bovine pancreatic ribonuclease A. A Ribonucleases: Chemistry, Biology, Biotechnology, 3rd International Meeting. Capri, Itàlia.
- CUCHILLO, C. M., PARÉS, X., GUASH, A., BARMAN, T. E., TRAVERS, F. i NOGUÉS, M. V. 1993. The role of 2',3'-cyclic phosphodiester in the bovine pancreatic ribonuclease catalysed cleavage of RNA: intermediates or products? *FEBS Lett.* 333: 207-210.
- DEL CARDAYRÉ, S. B., RIBÓ, M., YOKEL, E. M., QUIRK, D. J., RUTTER, W. J. i RAINES, R. T. 1995. Engineering ribonuclease A: production, purification and characterization of wild-type enzyme and mutants at Gln-11. *Protein Eng.* 8: 261-273.
- EFTINK, M. R. i BILTONEN, R. L. 1987. Pancreatic ribonuclease A: the most studied endoribonuclease. *A Hydrolytic Enzymes*. Elsevier Science Publishers. Amsterdam, Nova York i Oxford. 7: 333-375.
- FERSHT, A. 1985. *Enzyme, Structure and Mechanism*. 2nd ed. W. H. Freeman and Co. Nova York. pp. 426-473.
- FINDLAY, D., HERRIES, D. G., MATHIAS, A. P., RABIN, B. R. i ROSS, C. A. 1961. The active site and mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease. *Nature* 190: 781-785.

- FINDLAY, D., HERRIES, D. G., MATHIAS, A. P., RABIN, B. R. i ROSS, C. A. 1962. The active site and mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease. VII. The catalytic mechanism. *Biochem. J.* 85: 152-153.
- FRANCKUCHEN, I. 1941. *J. Gen. Physiol.* 24: 315-316.
- HERRIES, D. G., MATHIAS, A. P. i RABIN, B. R. 1962. The active site and mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease. 3. The pH-dependence of kinetic parameters for the hydrolysis of cytidine 2',3'-phosphate. *Biochem. J.* 85: 127-134.
- KARPEISKY, M. Y. i YAKOLEV, G. I. 1981. Topochemical principles of the substrate specificity of nucleases. *Sov. Sci. Rev. Sect. D2*: 145-257.
- KUNITZ, M. 1940. Crystalline ribonuclease. *J. Gen. Physiol.* 24: 15-32.
- LAITY, J. H., SHIMOTAKAHARA, S. i SCHERAGA, H. A. 1993. Expression of wild-type and mutant bovine pancreatic ribonuclease A in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 615-619.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E. F. i SAMBROOK, J. 1989. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour. Nova York.
- PARÉS, X., NOGUÉS, M. V., DE LLORENS, R. i CUCHILLO, C. M. 1991. Structure and function of ribonuclease A binding subsites. *Essays in Biochemistry* 24: 89-103.
- RICHARDS, F. M. i WYCKOFF, H. W. 1971. Bovine Pancreatic Ribonuclease. *The enzymes*. Boyer P.D.(ed.). Academic Press, Nova York. 4: 647-806.
- RICO, M., BRUIX, M., SANTORO, J., GONZALEZ, C., NEIRA, J. L., NIETO, J. L. i HERRANZ, J. 1989. Sequential ¹H-NMR assignment and solution structure of bovine pancreatic ribonuclease A. *Eur. J. Biochem.* 183: 623-638.
- ROBERTS, G. C. K., DENNIS, E. A., MEADOWS, D. H., COHEN, J. S. i JARDETZKY, O. 1969. The mechanism of action of ribonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62: 1151-1158.
- SCHULTZ, D. A. i BALDWIN, R. L. 1992. Cis proline mutants of ribonuclease A. 1. Thermal stability. *Protein Science* 1: 910-916.
- SELA, M. i ANFINSEN, C. B. 1957. Some spectrophotometric and polarimetric experiments with ribonuclease. *Biochem. Biophys. Acta* 24: 229.
- STUDIER, F. W. i MOFFATT, B. A. 1986. Use of Bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189: 113-130.
- TARRAGONA-FIOL, A., TAYLORSON, C. J., WARD, J. M. i RABIN, B. R. 1992. Production of mature bovine pancreatic ribonuclease in *Escherichia coli*. *Gene* 118: 239-245.
- USHER, D. A., RICHARDSON, D. I. i ECKESTEIN, F. 1970. Absolute stereochemistry of the second step of ribonuclease action. *Nature* 228: 663-665.
- VASANTHA, N. i FILPULA, D. 1989. Expression of bovine pancreatic ribonuclease A coded by a synthetic gene in *Bacillus subtilis*. *Gene* 76: 53-60.
- WLODAVER, A. 1985. Structure of bovine pancreatic ribonuclease by X-ray and neutron diffraction. *Jurnak, F. A. and Mc. Pherson, A. (ed.) Nucleic Acids and Interactive Proteins, Vol. II, Biological Macromolecules and Assemblies*. Wiley. Nova York. pàg. 395-439.