



Universitat de Girona

PURIFICACIÓ, CHARACTERITZACIÓ I CLONATGE DE LA RIBONUCLEASA DE PÀNCREAS HUMÀ

Marc RIBÓ i PANOSA

Dipòsit legal: Gi. 1883-2012

<http://hdl.handle.net/10803/96757>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

UNIVERSITAT DE GIRONA

**FACULTAT DE CIÈNCIES EXPERIMENTALS I DE LA SALUT
ÀREA DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA**

**PURIFICACIÓ, CARACTERITZACIÓ I CLONATGE DE
LA RIBONUCLEASA DE PÀNCREAS HUMÀ**

Memòria presentada per adquirir el grau de Doctor en Ciències Biològiques per
Marc Ribó i Panosa, llicenciat en Ciències Biològiques

Treball realitzat a l'Institut de Biologia Fonamental "V. Villar i Palasí" de la
Universitat Autònoma de Barcelona i al Departament de Biologia de la
Universitat de Girona sota la direcció dels Drs. Rafael de Llorens Duran i Claudi
M. Cuchillo i Foix

Marc Ribó

Dr. Rafael de Llorens

Dr. Claudi M. Cuchillo

GIRONA, SETEMBRE DE 1994

ÍNDIX

Índex.....	i
Abreviatures.....	vii

I. INTRODUCCIÓ

I.A. LES RIBONUCLEASES.....	1
I.A.1. Classificació i funcions.....	1
I.A.2. Filogènia de la superfamília de les ribonucleases.....	4
I.A.3. La ribonucleasa de pàncreas boví: punt de referència d'altres ribonucleases.....	5
I.A.3.a. Estudis de l'estructura.....	6
I.A.3.b. Estudis de la funció.....	9
I.B. LES RIBONUCLEASES HUMANES.....	15
I.B.1. Ribonucleases humanes de tipus secretori i de tipus no secretori.....	15
I.B.2. La ribonucleasa de pàncreas humà: antecedents.....	20
I.B.3. El component glucídic de les ribonucleases.....	22
I.B.3.a. Glicoproteïnes i la glicosilació en asparagines.....	22
I.B.3.b. El component glucídic en les ribonucleases humanes.....	24
I.B.4. La ribonucleasa com a marcador de disfuncions pancreàtiques.....	28
I.C. CLONATGE I EXPRESSIÓ DE RIBONUCLEASES.....	29
I.C.1. Clonatge de gens i expressió de proteïnes heteròlogues.....	29
I.C.2. Expressió de ribonucleases.....	33
I.C.2.a. Expressió de ribonucleases en procarïotes.....	34
I.C.2.b. Expressió de ribonucleases en eucariotes.....	37
I.D. OBJECTIUS.....	38

II. MATERIAL I MÈTODES

II.A. EQUIPAMENT I PRODUCTES QUÍMICS EN GENERAL	41
II.A.1. Equipament.....	41
II.A.2. Productes químics.....	41
II.B. MATERIAL BIOLÒGIC I MEDIS DE CULTIU	42
II.B.1. Microorganismes.....	42
II.B.2. Plàsmidis.....	43
II.B.3. Medis de cultiu.....	46
II.B.4. Manteniment de les soques.....	49
II.C. MÈTODES DE DNA	49
II.C.1. Mètodes generals de DNA recombinant.....	49
II.C.1.a. Obtenció de DNA plasmídic.....	50
II.C.1.a.(1). Obtenció minipreparativa de DNA plasmídic a partir de cultius d' <i>E.coli</i>	50
II.C.1.a.(2). Obtenció preparativa de DNA plasmídic a partir de cultius d' <i>E.coli</i>	52
II.C.1.a.(3). Obtenció de DNA plasmídic a partir de cultius de llevat.....	53
II.C.1.b. Manipulació enzimàtica del DNA.....	54
II.C.1.b.(1). Tractament amb enzims de restricció.....	54
II.C.1.b.(2). Tractament amb altres enzims.....	57
II.C.1.c. Electroforesi analítica de DNA en gels d'agarosa.....	59
II.C.1.d. Estimació de concentracions de DNA.....	61
II.C.1.e. Purificació de fragments de DNA per electroforesi en gels d'agarosa.....	62
II.C.1.f. Obtenció i transformació de cèl.lules competents d' <i>E.coli</i>	63
II.C.1.g. Obtenció i transformació de cèl.lules competents d' <i>S.cerevisiae</i>	66
II.C.2. Construcció d'un gen sintètic de la ribonucleasa de pàncreas humà.....	68
II.C.2.a. Síntesi dels oligonucleòtids.....	68
II.C.2.b. Purificació dels oligonucleòtids.....	68
II.C.2.c. Lligament dels fragments I, II, III i IV.....	70

Índex

II.C.2.d. Amplificació del gen sintètic mitjançant l'ús de la PCR.....	71
II.C.3. Manipulació de vectors derivats de M13.....	75
II.C.3.a. Introducció.....	75
II.C.3.b. Propagació del vector M13mp19.....	76
II.C.3.b.(1). Cultiu en placa.....	77
II.C.3.b.(2). Cultiu líquid.....	77
II.C.3.c. Obtenció del DNA de vectors derivats de M13.....	78
II.C.3.c.(1). Obtenció del RFDNA.....	78
II.C.3.c.(2). Obtenció del ssDNA a petita escala.....	79
II.C.3.c.(3). Obtenció del ssDNA a gran escala.....	80
II.C.3.d. Manipulació del RFDNA.....	81
II.C.3.d.(1). Transformació de cèl.lules competents d' <i>E.coli</i> amb RF DNA de bacteriòfags.....	81
II.C.3.e. Seqüenciació de ss DNA pel mètode de Sanger.....	82
II.C.3.e.(1). Introducció.....	82
II.C.3.e.(2). Etapes de la seqüenciació.....	83
II.C.3.e.(3). Gel de seqüenciació.....	85
II.C.3.e.(4). Autoradiografia.....	87
II.C.3.f. Mutagènesi dirigida per oligonucleòtid.....	87
II.C.3.f.(1). Introducció.....	87
II.C.3.f.(2). Obtenció dels oligonucleòtids.....	89
II.C.3.f.(3). Reaccions de mutagènesi.....	91
II.C.3.f.(4). Anàlisi de les restriccions de mutagènesi.....	93
II.C.3.f.(5). Selecció dels mutants.....	94
II.D. MÈTODES D'EXPRESSIONIÓ.....	94
II.D.1. Condicions de cultiu per a l'expressió de la ribonucleasa recombinant en <i>S.cerevisiae</i>	94
II.D.2. Condicions de cultiu per a l'expressió de la ribonucleasa recombinant en <i>E.coli</i>	95
II.D.3. Obtenció de fraccions de cultiu de <i>S.cerevisiae</i> -[YEpHPR.1] i <i>S.cerevisiae</i> - [YEpHPR.2].....	96

Índex

II.D.4. Obtenció de fraccions de cultius d' <i>E. coli</i> : MC1061-[pIN11ompA1-HPR], BL21(DE3)-[pET22.HPR].....	97
---	----

II.E. MÈTODES DE PROTEÏNES

II.E.1. Mètodes cromatogràfics.....	97
II.E.1.a. Purificació de la ribonucleasa de tipus secretori a partir de pàncreas humana.....	98
II.E.1.b. Purificació de la ribonucleasa de pàncreas humana recombinant produïda en <i>S.cerevisiae</i> (reHPR.Y).....	101
II.E.1.c. Purificació de la ribonucleasa de pàncreas humana recombinant produïda en <i>E. coli</i> (reHPR.B).....	102
II.E.2. Mètodes analítics.....	104
II.E.2.a. Determinació de la quantitat de proteïna.....	104
II.E.2.b. Mètodes electroforètics.....	106
II.E.2.c. Determinació de l'activitat ribonucleasa.....	109
II.E.2.c.(1). Determinacions espectrofotomètriques.....	109
II.E.2.c.(2). Determinacions en placa.....	112
II.E.2.c.(3). Gels de poliacrilamida-SDS amb poli(C) revelats per activitat, zimogrames.....	114
II.E.2.d. Anàlisi de la glicosilació.....	116
II.E.2.d.(1). Digestions enzimàtiques amb glicohidrolases.....	116
II.E.2.d.(2). Digestions enzimàtiques amb proteases.....	117
II.E.2.d.(3). Aïllament dels glicopèptids.....	118
II.E.2.d.(4). Anàlisi d'aminoàcids i seqüenciació dels pèptids.....	119
II.E.2.d.(5). Anàlisi dels sucres.....	120

III. RESULTATS I DISCUSSIÓ

III.A. OBTENCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE LA RIBONUCLEASA

DE TIPUS SECRETORI A PARTIR DE PÀNCREAS HUMÀ (HPRNAasa).....	121
--	-----

III.A.1. Aïllament de la HPRNAasa mitjançant cromatografia líquida d'elevada resolució (HPLC i FPLC).....	121
--	-----

III.A.2. Estudi de la glicosilació.....	125
III.A.2.a. Caracterització amb glicohidrolases.....	125
III.A.2.b. Aïllament dels glicopèptids i determinació de la composició glucídica i de l'extrem C-terminal.....	127
III.B. CONSTRUCCIÓ I CLONATGE D'UN GEN SINTÈTIC PER A LA RIBONUCLEASA DE TIPUS SECRETORI DE PÀNCREAS HUMÀ (HPRNAasa).....	133
III.B.1. Disseny del gen sintètic per a la HPRNAasa.....	133
III.B.2. Disseny, síntesi i purificació dels oligonucleòtids per a la construcció del gen de la HPRNAasa.....	135
III.B.3. Construcció del gen de la HPRNAasa per hibridació dels oligonucleòtids sintètics i lligament dels fragments FI, FII, FIII i FIV.....	136
III.B.4. Amplificació del gen sintètic mitjançant l'ús de la PCR i el seu posterior clonatge en pTZ19U.....	138
III.B.5. Seqüenciació i reparació del gen HPR.....	142
III.C. OBTENCIÓ DE LA HPRNAasa RECOMBINANT PRODUÏDA EN LLEVAT (reHPR.Y).....	145
III.C.1. Construcció del vector YEpHPR.1.....	147
III.C.1.a. Obtenció del vector YEpHPR.1.....	147
III.C.1.b. Comprovació de l'expressió de reHPR.Y en cèl.lules de la soca <i>S.cerevisiae</i> BJ2168 transformades amb YEpHPR.1.....	150
III.C.1.c. Comprovació del marc de lectura en la unió del gen sintètic amb la regió codificant pel pèptid senyal del factor- α	154
III.C.2. Construcció del vector YEpHPR.2.....	158
III.C.2.a. Obtenció del vector YEpHPR.2.....	159
III.C.2.b. Comprovació de l'expressió de reHPR.Y en cèl.lules de la soca <i>S.cerevisiae</i> BJ2168 transformades amb YEpHPR.2.....	162
III.C.3. Expressió de la reHPR.Y en cèl.lules de <i>S.cerevisiae</i> BJ2168 transformades amb YEpHPR.1 i YEpHPR.2.....	163
III.C.4. Purificació de la reHPR.Y.....	166

Índex

III.C.5. Caracterització bioquímica.....	169
III.C.5.a. Homogeneïtat.....	169
III.D. OBTENCIÓ DE LA HPRNAasa RECOMBINANT D'<i>E.coli</i> (reHPR.B).....	171
III.D.1. Construcció del vector pNIIIompA1.HPR.....	173
III.D.1.a. Obtenció del vector pNIIIompA1.HPR.....	173
III.D.1.b. Comprovació de l'expressió de reHPR.B en cèl.lules de <i>E.coli</i> MC1061 transformades amb pNIIIompA1.HPR.....	177
III.D.2. Construcció dels vectors pET22.HPR i pET 17.HPR.....	178
III.D.2.a. Obtenció del vector pET22.HPR.....	179
III.D.2.b. Obtenció del vector pET17.HPR.....	183
III.D.2.c. Comprovació de l'expressió de la reHPR.B en cèl.lules d' <i>E.coli</i> BL21(DE3)-[pET22.HPR] i <i>E.coli</i> BL21(DE3)-[pET17.HPR].....	186
III.D.3. Expressió de la reHPR.B en cèl.lules de <i>E.coli</i> BL21(DE3) transformades amb pET22.HPR.....	189
III.D.3.a. Condicions generals de l'expressió.....	189
III.D.3.b. Localització de la reHPR.B.....	190
III.D.3.c. Breu estudi per l'optimització de la producció de reHPR.B.....	192
III.D.4. Purificació de la ribonucleasa de pàncreas humà recombinant expressada en <i>E.coli</i>	200
III.D.5. Caracterització de la reHPR.B.....	207
III.D.5.1. Determinació de la seqüència N-terminal.....	207
III.D.5.2. Propietats catalítiques.....	207
III.E. DISCUSSIÓ GENERAL.....	210
IV. CONCLUSIONS.....	219
V. BIBLIOGRAFIA.....	223

Abreviatures

Abs	Absorbància
A	Adenina
Amp	Ampicil.lina
Amp ^r	Soca resistent a l'ampicil.lina
ATP	Adenosina-5'-trifosfat
b	Bases
BPB	Blau de bromofenol
BSA	Albúmina de sèrum bovi
C	Citidina
2'-CMP	Citidina 2'-monofosfat
3'-CMP	Citidina 3'-monofosfat
5'-CMP	Citidina 5'-monofosfat
C>p	Citidina 2',3'-fosfat cíclic
C-terminal	Carboxi-terminal
Da	Dalton
dCTP	Desoxicitosina 5'trifosfat
dCTP α S	5'-[α -S]-trifosfat de 2',3'-dideoxicitosina
DMSO	Dimetilsulfòxid
DNA	Àcid desoxiribonucleic
cDNA	DNA còpia
dsDNA	DNA de doble cadena
dsDNA _{acc}	DNA doble cadena covalentment tancat
RFDNA	Forma replicativa (doble cadena) del DNA de fags filamentosos
ssDNA	DNA de cadena senzilla
DMT:	Dimetoxitritil
dNTP	desoxiribonucleòtid-5'trifosfat
ddNTP	dideoxiribonucleòtid-5'trifosfat
D.O.	Densitat òptica
DTT	1,4-ditio-DL-treitol
EDTA	Àcid etilendiamina-tetraacètic
ELISA	Assaig d'immunorbent lligat a enzim
endo-F	endo- β -N-acetilglucosaminidasa F
endo-H	endo- β -N-glucoaminidasa H.
FPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
Fuc	Fucosa
G	Guanina
g, mg, μ g	grams, mil.ligrams, micrograms
Gal	Galactosamina
GLcNAc	N-acetil glucosamina
HG	Fraccions de HPR altament glucosiladas
HPLC	Cromatografia líquida d'alta eficàcia
HPR	gen de la ribonucleasa pancreàtica humana
HPRNasa	ribonucleasa pancreàtica humana
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranòsid
Kcat	Constant catalítica
Km	Constant de Michaelis Menten
LacZ	Gen de la β -galactosidasa
l, ml, μ l	litre, mil.lilitre, microlitre
LB	Medi Luria-Bertrani
LG	Fraccions de HPR poc glucosiladas
M, mM, μ M	Molar, mil.limolar, micromolar
M9CAS	Medi mínim amb casaminoàcids
mA	Mil.liamper
Man	Manosa
min	minuts

Índex

MOPS	Àcid 3-morfolino-propano sulfònic
N-glicosilació	Glicosilació sobre arginina
NeuAc	Àcid acetil neuramínic
N-terminal	Amino-terminal
O-glicosilació	Glicosilació sobre Ser o Thr.
PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida
p/v	Relació pes/volum
pb	Parell de bases
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PEG	Poliètilenglicol
PMSF	feniletilsulfonil,fluorur
poli(C)	Àcid policitidílic
poli(U)	Àcid poliuridílic
reHPR.B	Ribonucleasa pancreàtica humana recombinant produïda en <i>E. coli</i> .
reHPR.Y	Ribonucleasa pancreàtica humana recombinant produïda en <i>S. cerevisiae</i>
r.m.n.	Ressonància magnètica nuclear
1H-r.m.n.	r.m.n. de protó
RNA	Àcid ribonucleic
tRNA	Àcid ribonucleic de transferència
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
RNAasa	Ribonucleasa
RNAasa A	Ribonucleasa de pàncreas bovi
r.p.m.	Revolucions per minut
SDS	Dodecil sulfat sòdic
T	Timina
TAE	Amortidor Tris/àcid acètic/EDTA
TB	Medi de cultiu (terrific broth)
TBE	Amortidor Tris/àcid bòric/EDTA
TE	Amortidor Tris/HCl/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamida
TFA	Àcid trifluoroacètic
TLCK	N-tosil-L-lisilclorometil cetona
TPCK	N-tosil-L-fenilalanilclorometil cetona
Tris	Tris-hidroximetil-aminometà
U, mU	Unitat(s), Mil.li-unitat(s)
U.D.O.	Unitats de densitat òptica
V _{max}	Velocitat màxima
v/v	Relació volum/volum
XC	Xilen cianol
xg	Força centrífuga relativa
X-Gal	5-Bromo-4Cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosid
-[]	soca portadora de plasmidi
#	número

vectors (construccions)

M13
M13mp19
pET17b(+)
pET22b(+)
pIN11lompA1
pTZ19U
YEpWL

(pET17.HPR)
(pET22.HPR)
pIN11lompA1.HPR
pTZ19U.HPR
YEpHPR.1
YEPHPR.2

soques

Escherichia coli MC1061
BL21(DE3)
TG1
XL1-Blue

Saccharomyces cerevisiae BJ2168

INTRODUCCIÓ

I.A. LES RIBONUCLEASES

I.A.1. Classificació i funcions

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

La forma com aquests enzims actuen sobre el seu substrat natural, els àcids ribonucleics, permet establir una primera distinció en dos grans grups: les exoribonucleases i les endoribonucleases. El mot exoribonucleasa fa referència a l'activitat que allibera mononucleòtids d'un extrem lliure successivament, mentre el mot endoribonucleasa serveix per a definir l'activitat ribonucleasa que allibera oligonucleòtids.

D'entre les exoribonucleases n'hi ha que poden iniciar l'atac en l'extrem 5' o 3' d'una cadena de RNA. Les exoribonucleases bacterianes identificades hidrolitzen les cadenes de RNA en la mateixa direcció: 3' a 5', alliberant-se 5'-mononucleòtids (Deutscher, 1993). Les cèl·lules eucariotes contenen, addicionalment, exoribonucleases, la manera d'actuar de les quals és 5' a 3' (Stevens, 1980; Lasater i Eichler, 1984). Aquests enzims de la mateixa manera que les exoribonucleases bacterianes requereixen cations divalents per a la seva activitat i alliberen 5'-mononucleòtids. Una excepció la constitueix la fosfodiesterasa de melsa la qual actua en direcció 5' a 3', alliberant 3'-mononucleòtids (Takahashi i Moore, 1982).

Es coneixen endoribonucleases que poden actuar en tots dos costats de l'enllaç fosfodiéster. De forma general, les endoribonucleases de baixa massa molecular digereixen el RNA de manera que es generen productes amb un grup 3'-fosfat terminal, a conseqüència de la hidròlisi de l'intermediari 2',3'-fosfat cíclic resultant de la reacció de transfosforilació (Blackburn i Moore, 1982; Deutscher, 1988). Existeixen també endoribonucleases altament específiques que participen en el processament i recanvi del RNA les quals generen extrems amb un grup 3'-hidroxil terminal (Deutscher, 1988).

En els darrers anys s'ha reconsiderat profundament el concepte que hom tenia sobre l'especificitat de les ribonucleases. Totes les ribonucleases que havien estat estudiades en primer lloc (les endoribonucleases, la ribonucleasa de pàncreas boví (RNAasa A), la RNAasa I d'*E.coli*, i les exoribonucleases, les fosfodiesterases de melsa i de verí de serp o la RNAasa II d'*E.coli*) són inespecífiques, de manera que actuen degradant tot tipus de molècules de RNA. El descobriment de RNAases involucrades en el recanvi i el processament del RNA amb la capacitat d'actuar només sobre una subpoblació de molècules de RNA i catalitzar reaccions més específiques, significà el punt d'inflexió per a aquesta revisió de l'especificitat de les RNAases.

Introducció

Les ribonucleases degradatives esmentades abans com inespecífiques, poden ser considerades específiques per la base present en el punt de tall del substrat RNA. Així, la RNAasa A de pàncreas boví hidrolitza enllaços fosfodièsters en l'extrem 3' dels quals hi ha una pirimidina, la RNAasa T1 d'*Aspergillus oryzae* talla al costat de residus de guanina (Takahashi i Moore, 1982) i la RNAasa U2 d'*Ustilago* digereix al costat de residus de purina. En els procariotes la RNAasa I d'*E.coli* talla en qualsevol residu però la RNAasa M, també d'*E.coli*, presenta una especificitat similar a la de la RNAasa A (Cannistraro i Kennell, 1989; Meador i col., 1990). Existeixen a més, una elevada quantitat de RNAases d'altres microorganismes, principalment extracel·lulars, amb especificitat per la base present en el punt de tall o adjacent a aquest (Hill i col., 1983).

Les RNAases que intervenen en el processament i recanvi del RNA presenten una especificitat de substrat molt limitada i llocs de tall molt definits en les molècules de RNA. La RNAasa P, per exemple, digereix els tRNA precursors per generar l'extrem 5'-fosfat dels tRNA madurs (Altman, 1989). Dins d'aquest grup caldria incloure la RNAasa III i la RNAasa H, que actuen respectivament i exclusiva, sobre molècules de RNA de doble cadena (Chalcedurai i col., 1991), i sobre molècules híbrides de RNA-DNA (Crouch i Dirksen, 1982). En aquestes RNAases sembla ser que tant important pot ser l'estructura secundària com la seqüència del substrat.

Així doncs, tant dins del grup de les endoribonucleases com de les exoribonucleases, es troben diferents formes d'actuar sobre el substrat i diferents graus d'especificitat, des del reconeixement de seqüències o estructures secundàries determinades, passant pel reconeixement de la base, fins les purament degradatives.

Dins de les endoribonucleases pirimidina específiques, és a dir amb cert grau d'especificitat, Sierakowska i Shugar (1977) en un treball considerat com un clàssic en els intents de sistematització de les ribonucleases, classificaren les endoribonucleases de mamífer en dos grans grups anomenats tipus secretori i tipus no secretori. La nomenclatura no fa referència explícitament a la seva capacitat d'ésser o no secretades, sinó que prové de la característica dels òrgans a partir dels quals es van caracteritzar cinèticament i purificar de manera parcial les primeres ribonucleases humanes: ribonucleases de tipus secretori si eren semblants a la ribonucleasa produïda pel pàncreas o ribonucleases de tipus no secretori si eren semblants a la ribonucleasa purificada a partir del fetge o la melsa. Aquestes característiques han estat utilitzades per a incloure altres ribonucleases en un o altre grup i es troben resumides en la taula I.B.1.

En el grup de les anomenades RNAases pirimidina específiques que conté les ribonucleases de tipus pancreàtic o secretori i les ribonucleases de tipus hepàtic o no secretori, s'hi ha afegit més recentment una sèrie d'enzims per constituir la denominada superfamília de les ribonucleases (Beintema i col., 1988c). Aquest afegit inclou altres proteïnes afins com ara l'angiogenina,

responsable de la neovascularització i aïllada per primer cop d'una línia de cèl.lules tumorals humanes (Strydom i col., 1985; Shapiro i col., 1986); la proteïna catiónica d'eosinòfil (ECP) i la neurotoxina d'eosinòfil (EDN), proteïnes amb activitat citotòxica que provoquen la degeneració de determinats tipus cel.lulars del teixit nerviós (Gleich i col., 1986); la proteïna P-30, una proteïna amb activitat RNAasa i propietats antitumorals aïllada dels oòcits de *Rana pipiens* (Ardelt i col., 1991); una proteïna de la medul.la òssia de pollastre (RSFR) (Klenova i col., 1992) i una lectina que reconeix àcid siàlic (SLB) de *Rana catesbeiana* (Nitta i col., 1993). L'angiogenina catalitza la degradació del RNA ribosomal però és inactiva sobre els substrats característics de les ribonucleases de tipus secretori (Shapiro i col., 1986). La neurotoxina ECP presenta una activitat RNAasa similar a les denominades RNAases de tipus no secretori (Sorrentino i Glitz, 1991). La SBL hidrolitza tant poli(U) com poli(C) amb preferència pel primer i no és inhibida per l'inhibidor de placenta humana.

Recentment, Zhou i Strydom (1993) publicaren la seqüència d'una ribonucleasa purificada de plasma humà, que talla específicament en l'extrem 3' d'uridines. La seqüència proteica presenta un 43% d'identitat amb l'angiogenina. Aquests autors utilitzen una nomenclatura diferent a la clàssica fonamentada en l'estructura primària de les diferents ribonucleases aïllades i seqüenciades. Aquestes seqüències es presenten en la figura I.A.1.1.

	1	20	45
RNase 1	---KESRAKKFQRQHMDSDSSPSSSSTYCNQMMRRRNMTQGRCKPVNT		
RNase 4	---QDGMQRFLRQHVHPEETGG-SDRYCNLMMQRRKMTLYHCKRFNT		
Angiogenin	--QDNSRYTHFLTQHYDAKPQGR-DDRYCESIMRRRGLTSP-CKDINT		
RNase 2	KPPQFTSAQWFETQHINMTSQQ-----CTNAMQVINNYQRRCKNQNT		
RNase 3	RPPQFTRAQWFAIQHISLNPPR-----CTIAMRAINNYRWRCKNQNT		
		70	91
RNase 1	FVHEPLVDVQNVCFQEKVTCKNGQG--NCYKSNSSMHITDCRLTNGSR		
RNase 4	FIHEDIWNIRSICTTNIQCKNGKM--NCHEGV--VKVTD CRDTGSSR		
Angiogenin	FIHGKRSIKAICENKNGNPHRE----NLRIKSSSFQVTTCKLHGGSP		
RNase 2	FLLTTFANVVNVCNPNMTCPSNKTRKNCHHSGSQVPLIHCNLTTPSP		
RNase 3	FLRRTFANVVNVCNQSIRCPHNRTLNNCHRSRFRVPLLHCDLINPGA		
		110	128
RNase 1	--YPNCAYRTSPKERHIIVACEGS-----PYVPVHFDASVEDST		
RNase 4	--APNCRYRAIASTRVVIACEGN-----PQVPVHFDG-----		
Angiogenin	--WPPCQYRATAGFRNVVACENG-----LPVHLDQSI FRRP		
RNase 2	QNISNCRYAQT PANMFYIVACDNRDQRRDPPQYPVVPVHLDRII----		
RNase 3	QNISNCRYADRPGRRFYVACDNRD-PRDSPRYPVVPVHLDTTI----		

Figura I.A.1.1. Comparació de les seqüències d'aminoàcids de les ribonucleases humanes i l'angiogenina (Reproduït de Zhou i Strydom, 1993). RNAasa 1: Ribonucleasa de pàncreas o tipus secretori. RNAasa 2: Neurotoxina derivada d'eosinòfil (EDN) o tipus no secretori. RNAasa 3: Proteïna catiónica d'eosinòfil (ECP). RNAasa 4: Ribonucleasa aïllada de plasma.

Les ribonucleases intracel·lulars s'ha vist que participen en la maduració, processament i recanvi del diferents tipus de RNA cel·lulars (mRNA, rRNA i tRNA), amb una elevada especificitat de substrat, tant en procariotes com en eucariotes superiors. El metabolisme del RNA cel·lular pot ser un factor determinant en l'expressió gènica que faria necessària una estricta regulació de la gran diversitat de RNAases que participen en la degradació dels diferents tipus de RNA cel·lulars (Deutscher, 1988).

De les RNAases extracel·lulars, que hom considera podrien participar en el control del creixement i desenvolupament en organismes superiors, no se'n coneix en tots els casos una funció concreta. Benner (1988), en la hipòtesi que anomena del "RNA extracel·lular missatger", proposa una combinació de RNA, RNAases i inhibidors de RNAases, com a reguladors de processos biològics en els organismes superiors, en la qual el RNA funcionaria com un transmissor en els processos de comunicació cel·lular.

La ribonucleasa pancreàtica s'ha pogut aïllar en quantitats considerables però molt variables del pàncreas d'alguns mamífers i d'uns pocs rèptils. Barnard (1969) proposà que un nivell elevat de RNAasa pancreàtica és la resposta a la necessitat de digerir grans quantitats d'àcid ribonucleic que prové de la microflora de l'estomac i suggerí que la presència de ribonucleasa en el pàncreas de mamífers no rumugants pot ésser un vestigi evolutiu, atès que no existeix aquesta necessitat. Tanmateix però, l'expressió de la ribonucleasa pancreàtica i altres ribonucleases de tipus secretori en altres òrgans indica que l'enzim podria tenir altres funcions apart de l'esmentada funció digestiva, encara que aquestes romanen per desvetllar (Beintema i col., 1988c). Així la funció d'altres ribonucleases de tipus secretori com ara les de plasma seminal i cervell boví es manté també desconeguda encara que s'ha descrit una possible acció antitumoral (Matousek, 1973) i antiespermatogènica (Vescia i col., 1980) per la ribonucleasa de plasma seminal boví.

I.A.2. Filogènia de la superfamília de les ribonucleases

Des que es va trobar que les RNAases de tipus secretori i no secretori de mamífers i altres vertebrats, i altres proteïnes amb altres especificitats i funcions biològiques, presentaven estructures primàries homòlogues, se les va considerar, en conjunt, com a pertanyents a la superfamília de les ribonucleases (Beintema i col., 1988c).

Els mateixos autors recopilaven les seqüències de la ribonucleasa de pàncreas de 41 espècies de mamífer, l'estructura primària de la ribonucleasa de plasma seminal boví, la ribonucleasa de tipus secretori de tortuga, les de ribonucleases de tipus no secretori i altres ribonucleases pertanyents a la superfamília de les ribonucleases. Mitjançant el mètode de màxima parsimònia varen estructurar un arbre evolutiu en el qual tots els enzims serien descendents d'un avantpassat comú,

estructuració que ha estat revisada més recentment (Fitch i Beintema, 1990). Segons aquesta estructuració temptativa, es suggereix que s'hauria produït una duplicació gènica que donaria lloc a les ribonucleases de tipus secretori en mamífers per una banda, i a la ribonucleasa pancreàtica en rèptils i al factor angiogènic en mamífers per l'altra. Aquesta divergència hauria tingut lloc després d'una altra duplicació gènica que en mamífers hauria donat lloc a les RNAases de tipus secretori i a les RNAases de tipus no secretori. En l'arbre evolutiu de les RNAases de tipus secretori hi hauria com a mínim una altra duplicació originant la RNAasa seminal bovina i les RNAases de pàncreas. Segons aquests mateixos autors les RNAases digestives són probablement el fruit d'una adaptació recent a l'evolució de la digestió dels remugants.

Una altra hipòtesi interessant considera que les RNAases pancreàtiques podrien ser descendents de proteïnes implicades en la regulació del creixement cel·lular (Benner, 1988; Benner i Allemann, 1989).

I.A.3. La ribonucleasa de pàncreas boví: punt de referència d'altres ribonucleases

La ribonucleasa de pàncreas boví (EC 3.1.27.5.) ha estat una de les proteïnes més abastament estudiades a la qual cosa hi ha contribuït molt probablement, la facilitat per a purificar-la i l'abundor amb què es troba present en l'òrgan d'origen, la seva gran estabilitat i la seva massa molecular relativament petita. Aquests factors han permès que fos objecte d'una gran diversitat d'estudis realitzats sobre estructura de proteïnes i mecanismes d'activitat enzimàtica que estan recollits en nombroses revisions d'entre les quals es poden destacar les següents: Anfinsen i White (1961); Scheraga i Rupley (1962); Richards i Wickoff (1971); Blackburn i Moore (1982); Eftink i Biltonen (1987) i Parés i col. (1991).

El 1889, Salkowski havia descrit la presència d'activitat ribonucleasa en llevats, però es considera el treball de Jones (1920) com l'origen dels estudis de la ribonucleasa de pàncreas en descriure l'existència d'un enzim termoestable en el pàncreas capaç de degradar àcids nucleics d'extrets de llevat. Dubos i Thompson (1938) anomenaren aquest enzim ribonucleasa i Kunitz (1940) va purificar i cristal·litzar l'enzim, i determinà que era molt estable en un marge ampli de pH i temperatura.

El primer procés de purificació de pàncreas de bou fou el descrit per Kunitz (1940) i modificat per McDonald (1948). Hirs i col., (1953) varen obtenir mitjançant cromatografia de bescanvi catiònic una fracció majoritària i fraccions minoritàries que anomenaren respectivament RNAasa A i RNAases B.

Taborsky (1959) aconseguí també de purificar amb una cromatografia de bescanvi catiónic i un gradient de NaCl diverses fraccions de les quals, el pic principal, que anomenà D, corresponia amb la fracció A de Hirs i col., (1953).

El 1964 Plummer i Hirs descriuen les RNAases B com a formes glicosilades de la RNAasa A, en les quals la cadena glucídica estaria unida al residu Asn-34. Puett (1973) va comprovar que la RNAasa B conservava la mateixa estructura terciària que la RNAasa A.

La RNAasa A fou el primer enzim (i la segona proteïna) que es va seqüenciar. L'enzim està constituït per una única cadena polipeptídica de 124 residus, de forma globular i amb una massa molecular de 13.683 Da (Anfinsen i col., 1952; Smyth i col., 1963). Posseeix 8 residus de cisteïna que formen quatre ponts disulfur entre les posicions 26-84, 40-95, 58-110 i 65-72.

El 1976 Gutte i Merrifield (1971) sintetitzaren la RNAasa A pel mètode de fase sòlida. La proteïna sintètica mostrava la mateixa especificitat de substrat però només un 78% d'activitat per al seu substrat natural, el RNA.

Estudis sobre la RNAasa de pàncreas boví han permès aprofundir en el coneixement general de proteïnes i enzims així com en les relacions estructura-funció existents en aquests. La RNAasa de pàncreas boví o RNAasa A ha estat també emprada com a model per a aplicar tècniques d'anàlisi com la difracció de raigs X (Frankuchen, 1941), la ressonància magnètica nuclear (Saunders i col., 1957) i la seqüenciació de proteïnes (Smyth i col., 1963).

El grau de coneixement que hom té d'aquest enzim fa que jugui un paper clau en els estudis estructurals, en estudis del mecanisme catalític, en estudis sobre la funció i evolutius que s'han dut a terme amb altres ribonucleases o components de la superfamília de les ribonucleases. És per això que constitueix un punt de referència obligat en l'estudi de qualsevol altre membre d'aquesta superfamília.

Durant tot aquest treball, la ribonucleasa de pàncreas boví ha estat utilitzada com a referència i model, tant en el seu aïllament com en el seu clonatge, expressió i caracterització posteriors.

I.A.3.a. ESTUDIS DE L'ESTRUCTURA

Estudis per cristal·lografia i difracció de raigs X

L'estructura tridimensional de la RNAasa A es va determinar a partir dels estudis de cristal·lografia i difracció de raigs X (Kartha i col., 1967). Es va realitzar un primer mapa de la seva estructura

crystal·lina a 0,2 nm, i es determinaren les dimensions aproximades de la molècula. La RNAasa A té una forma similar a un ronyó amb una profunda depressió, consta de tres zones amb estructura de fulla plegada β antiparalela i té tan sols un 19% d'estructura en hèlix α . Wyckoff i col. (1967, 1970) en un estudi paral·lel van obtenir l'estructura de la RNAasa S a 0,35 nm i una resolució nominal a 0,2 nm; estructura que confirmaren per a la RNAasa A Carlisle i col.laboradors el 1974.

Estudis posteriors han millorat la resolució fins a 0,145 i 0,126 nm: s'observa una estructura en forma de U i dimensions aproximades de: 3,5 x 4,5 x 3,1 nm. A l'extrem N-terminal es descriu un segment llarg d'hèlix α i dues regions hèlix α més curtes (24-33 i 50-60) empaquetades enfront d'una regió tipus fulla plegada β formada per tres cadenes antiparaleles (42-48, 71-92 i 94-110) (figura I.A.3.a.1) (Wlodawer i col., 1982; Borkatoki i col., 1982; Svensson i col., 1986; Wlodawer i col., 1988). Wlodawer i Sjölin (1983) complementaren l'estudi per difracció de raigs X amb la difracció per neutrons, tècnica que va permetre definir amb més precisió l'orientació d'algunes cadenes laterals.

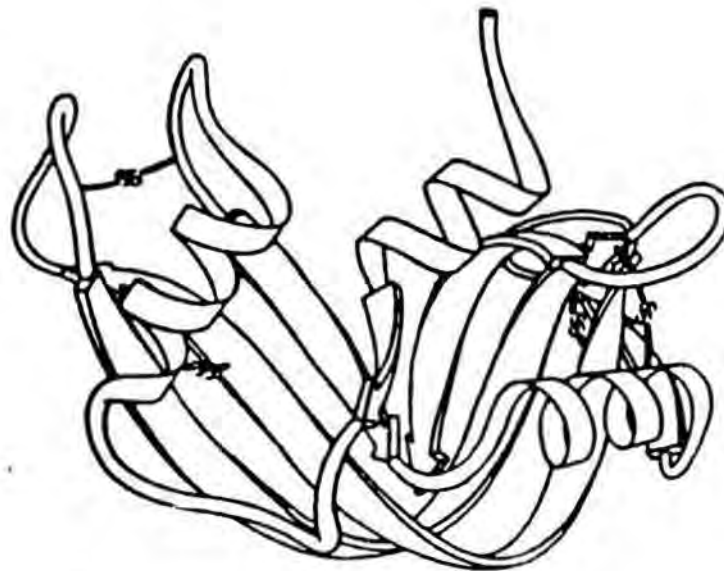


Figura I.A.3.a.1: Representació esquemàtica de la molècula de la RNAasa A a partir de l'estructura cristal·lina. Les fletxes representen les zones d'estructura de fulla plegada β i les espirals les de zones d'hèlix α . S'indiquen els enllaços disulfur. Reproduït de Wlodawer (1984).

La RNAasa A, proteïna d'estructura ben caracteritzada per cristal·lografia i difracció de raigs X, ha estat utilitzada sovint com a model per a diversos estudis estructurals: estudi dels efectes de la temperatura, de 98 a 320 °K, en l'estructura i dinàmica de la RNAasa A (Tilton, 1992); obtenció de

cristalls de la RNAasa A sota l'efecte de gravetat terrestre (0,106 nm) (Sjölin i col., 1991) o estudis sobre el procés de plegament mitjançant la identificació de regions iniciadores del plegament ("chain-folding initiation sites", CFIS) (Matheson i Scheraga, 1978; Beals i col., 1991) i estudis sobre els intermediaris de plegament (Rothwarf i Scheraga, 1993a,b,c,d), per no citar sinó alguns dels més recents.

L'estructura tridimensional de la RNAasa S és molt similar a la de la RNAasa A, però presenta l'extrem N-terminal en una posició més allunyada de la resta de la molècula, determinant una menor interacció entre aquesta regió i la resta (Carlisle i col., 1974). S'ha observat que els residus 16-20 del complex RNAasa S es troben desorganitzats; un S-pèptid de tan sols els 15 primers residus és suficient per a obtenir la unió amb la S-proteïna, i una estructura quasi equivalent a la RNAasa A, amb la mateixa activitat catalítica (Richards i Wyckoff, 1971; Blackburn i Moore, 1982). Es considera que els residus hidrofòbics Phe-8 i Met-13 són importants per la interacció del S-pèptid (Simonson i Brünger, 1992; Kim i col., 1992; Varadarajan i Richards, 1992).

Bello i Nowoswiat (1965) van observar que els cristalls de RNAasa A mantenen el 75% de l'activitat catalítica, suggerint que l'estructura de l'enzim cristal·litzat i en solució és molt similar. Els cristalls de RNAasa S també eren actius (Doscher i Richards, 1963).

Estudis per ressonància magnètica nuclear.



Figura I.A.3.a.2.: Estructura tridimensional de la RNAasa A en dissolució per espectroscòpia de ^1H -r.m.n. a pH 4 i 35°C. Visió estereooscòpica a partir de la superposició de 16 estructures. Reproduït de Santoro i col., (1993).

La RNAasa A fou la primera proteïna estudiada per r.m.n. (Saunders i col., 1957). Hahn i Rüterjans (1985) varen realitzar el primer estudi de la RNAasa A per ^1H -r.m.n. bidimensional i assignaren les

resonàncies corresponents a 21 residus. Rico i col. (1989) i Robertson i col. (1989) assignaren l'espectre de ^1H -r.m.n. de l'enzim en solució aquosa i identificaren els elements de l'estructura secundària. Recentment, Santoro i col. (1993) han obtingut una estructura tridimensional d'alta resolució de la RNAasa A en solució per r.m.n. (figura I.A.3.a.2). Comparant els resultats amb les estructures per cristal·lografia de raigs X, es confirma l'estructura global i la majoria de ponts d'hidrogen i posicions de les cadenes laterals de la majoria de residus.

I.A.3.b. ESTUDIS DE LA FUNCIO

Mecanisme de catàlisi

Tradicionalment s'ha considerat que la RNAasa A catalitza la hidròlisi dels enllaços 3',5'-fosfodiéster de les cadenes senzilles de RNA mitjançant una reacció en dues etapes (figura I.A.3.b.1). La primera etapa és una reacció de transfosforilació des de la posició 5' d'un nucleòtid a la posició 2' del nucleòtid adjacent, formant-se un extrem 2',3'-fosfat cíclic i un extrem 5'-OH lliure. Durant la segona etapa es dona la hidròlisi del fosfodiéster cíclic, formant-se un grup 3'-fosfat terminal. La base en la posició 3' de l'enllaç que s'hidrolitza ha d'ésser una pirimidina. La reacció de transfosforilació es produeix a una velocitat molt superior a la d'hidròlisi.

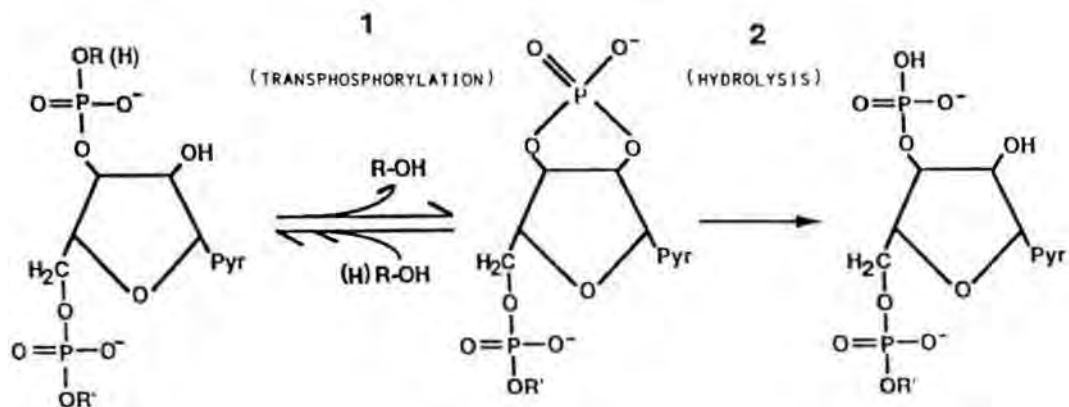


Figura I.A.3.b.1: Esquema de les dues etapes de degradació del RNA. Reproduït de Cuchillo i col., (1993). R i R': cadenes de polinucleòtid; Pyr: pirimidina

Han estat proposats diversos mecanismes de catàlisi per a la RNAasa A. El mecanisme de catàlisi acceptat és el de Findlay i col. (1961, 1962), modificat per Roberts i col. (1969) i refinat per Usher i col. (1970). En la catàlisi intervenen principalment els anells imidazole de dos residus histidina (figura I.A.3.b.2). En l'etapa de transfosforilació, la His-12 actua de base, desprotonant el grup O2' i la His-119 d'àcid, protonant el grup O5'R que s'allibera i debilitant l'enllaç P-O5', facilitant això l'atac

"in line" del O2' sobre el fósfor. Aquestes funcions s'inverteixen en l'etapa d'hidròlisi: la His-119 capta un protó d'una molècula d'aigua, mentre la His-12 protona el grup O2'. En les dues fases es forma un complex intermediari, on el fosfat adopta una configuració de bipiràmide trigonal, estabilitzada principalment per la Lys-41 (Borkakoti i col., 1983; Wlodawer i col., 1983); Marchiori i col. (1974) indicaren que el residu Lys-7 també podria intervenir en aquesta estabilització. L'estudi de l'estereoquímica de la reacció va determinar que es tractava d'un mecanisme "in-line", mitjançant el qual es forma l'intermediari pentacovalent (Usher i col., 1970).

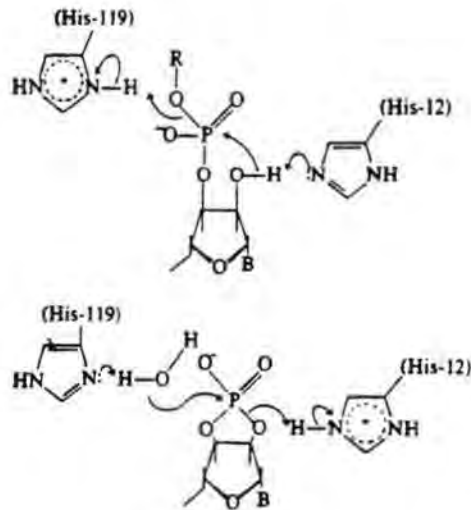


Figura I.A.3.b.2: Mecanisme catalític de la RNAasa A. Esquema dels desplaçaments electrònics originats durant la catàlisi àcid-base segons el mecanisme catalític acceptat actualment. Reproduït de Fersht (1985).

Estudis posteriors sobre el mecanisme de catàlisi confirmen el model inicial de catàlisi àcid/base on hi participen els grups imidazole de les histidines 12 i 119 (Eftink i Biltonen, 1983; Eftink i Biltonen, 1987).

Els grups imidazole actuen com a base i àcid en moltes reaccions enzimàtiques. S'han realitzat estudis comparatius entre el model de la RNAasa A i els grups imidazole i imidazolium lliures de l'amortidor imidazole que també poden catalitzar la hidròlisi del RNA (Breslow, 1991; Breslow i col., 1991).

Estudis recents sobre el mecanisme de catàlisi de la RNAasa A (Cuchillo i col., 1993) indiquen que no és correcte considerar la reacció com un procés seqüencial, amb la formació d'un intermediari associat a l'enzim. Les dues etapes de transforilació i hidròlisi s'han de considerar com dos processos catalítics separats. Els estudis cinètics d'anàlisi dels productes del procés de degradació del substrat poli(C) per HPLC (Cuchillo i Nogués, 1993) indiquen que els productes alliberats de la primera reacció, que presenten un extrem 2',3'-fosfat cíclic, no s'hidrolitzen mentre es trobin

substrats de la primera etapa de ciclació. La reacció d'hidròlisi pràcticament no es produeix fins que finalitza l'etapa de ciclació de tots els enllaços 3',5'-fosfodiéster disponibles. La hidròlisi dels enllaços 2',3'-fosfodiéster s'hauria de considerar com un procés equivalent a la reacció inversa de la transfosforilació dels enllaços 3',5'-fosfodiéster (figura I.A.3.b.1) (Cuchillo i col., 1993). Els autors suggereixen un canvi en la classificació de la RNAasa A: l'enzim s'hauria de catalogar com una transferasa i no com una hidrolasa.

Especificitat de la reacció.

L'enzim presenta un seti principal de fixació per a les bases pirimidíniques, on hi interacciona la base nitrogenada situada en posició 3' en relació a l'enllaç fosfodiéster que s'escindeix, i un seti secundari d'interacció per al nucleòtid en posició 5', que mostra una certa preferència pels nucleòtids purínics. D'altra banda, s'observa un increment d'eficiència catalítica en funció de la longitud del substrat.

L'especificitat de la reacció de transfosforilació pel que fa a la seqüència de bases del substrat no és absoluta. S'observa, però, una clara preferència per les pirimidines en la posició 3' (Brown i Todd, 1953; Markham i Smith, 1952a,b,c). La segona etapa de la reacció és molt més específica, només s'hidrolitzen els ésters fosfats cíclics que tenen una pirimidina com a base nitrogenada.

L'estructura i els aminoàcids implicats en el centre actiu es va determinar a partir dels estudis cristal·logràfics realitzats per Richards i Wickoff, i altres autors, a principis dels anys 70 (Richards i Wickoff, 1971). A partir de l'estudi de complexos entre la RNAasa S i mononucleòtids (2'-CMP, 3'-CMP, 5'-CMP) o el dinucleòtid UpcA (anàleg del substrat UpA) es van identificar els residus implicats en el seti principal fixador de pirimidines. L'especificitat vindria donada per la formació de 3 ponts d'hidrogen entre la base pirimidínica i l'enzim: es va observar ponts d'hidrogen entre la ribosa i la base de pirimidina amb els residus Asn-44, Thr-45 i Ser-123, així com interaccions de Van der Waals amb el residu Phe-120.

La majoria d'estudis per r.m.n. de la RNAasa A amb nucleòtids han utilitzat el nucli de protó i s'han centrat en les variacions de desplaçament químic i pK de les histidines del centre actiu.

L'estudi preliminar de Meadows i Jardetzky (1968) es va limitar a l'assignació dels 4 residus histidina de l'enzim. Posteriors estudis d'interacció de la RNAasa A amb inhibidors competitiu (3'-CMP i 2'-CMP) col·laboraren en la caracterització del procés d'interacció dels mononucleòtids amb la His-12 i His-119 del centre actiu (Meadows i col., 1969; Haar i col., 1974).

Arús i col. (1982) estudiaren la interacció de la RNAasa A amb nucleòtids purínics i observaren que la interacció de l'adenosina amb l'enzim induïa un canvi conformacional en el centre actiu: la interacció del residu Asp-121 amb la base nitrogenada promou el trencament de l'associació Asp-121 - His-119 i orienta el residu-119 en posició més favorable a la catàlisi.

Hahn i col. (1985) estudiaren la interacció dels mononucleòtids 2' i 3'-CMP, i 2' i 3'- UMP amb la RNAasa A, confirmant la formació d'un pont d'hidrogen entre les bases i els residus Thr-45 i Ser-123.

Bruix i col. (1991) estudiaren per $^1\text{H-r.m.n.}$ bidimensional l'estructura en solució de complexos entre la RNAasa A i mononucleòtids pirimidínics, indicant petits canvis a nivell dels residus Gln-11, His-12, Lys-41, Val-43, Asn-44, Thr-45, His-119, Phe-120 i Asp-121, que s'interpreten com a una interacció directa amb els mononucleòtids inhibidors o com a resultat de canvis conformacionals de tipus local.

Activitat sintètica

La reacció de síntesis és la reacció inversa de la reacció de transfosforilació (figura I.A.3.b.1). La primera etapa del mecanisme de catàlisi de la RNAasa A (reacció de transfosforilació), a diferència de la segona etapa (reacció d'hidròlisi), és un procés reversible. La reacció catalitza la síntesi de dinucleòtids a partir de nucleòtids de pirimidina cíclics, formant-se un enllaç 3',5'-fosfodiéster. El grup acceptor ha d'ésser un nucleòtid cíclic, mentre el grup donador (R-OH) pot ser un nucleòtid cíclic o un nucleòsid.

L'any 1955, Heppel i col.laboradors varen descriure per primera vegada la capacitat de la RNAasa A de catalitzar la síntesi de di- i trinucleòtids a partir de nucleòtids de pirimidina cíclics.

Bernfield (1965), amb l'objectiu d'identificar els residus que participen en la reacció de síntesi, va estudiar derivats de la RNAasa A on s'havia modificat o eliminat un dels residus catalítics principals: S-proteïna, 1-CM-His-119-RNAasa A o ϵ -dinitrofenil-Lys-41. Els derivats presentaven una activitat sintètica reduïda, però superior a l'activitat hidrolítica residual. Aquests resultats indicaven que el mecanisme de síntesis utilitzava una estratègia diferenciada de la corresponent al procés d'hidròlisi (segona etapa de la reacció).

Guasch i col.laboradors estudiaren simultàniament les reaccions de síntesis i hidròlisi, a partir d'elevades concentracions de substrat C>p. Observaren l'aparició del producte dinucleòtid CpC>p a partir de concentracions de C>p de 5 mM, i sintetitzaren CpA a partir de C>p i adenosina (Guasch i col., 1989 a,b).

Interacció RNAasa A-RNA i funció dels subsetis no catalítics

En la interacció de la RNAasa A amb el seu substrat natural, el RNA, participen, a més del centre actiu, altres subsetis (Richards i Wyckoff, 1971; Blackburn i Moore, 1982; Eftink i Biltonen, 1987; Parés i col., 1991). Richards i Wyckoff (1971) van introduir la nomenclatura per als subsetis d'unió a bases (B) riboses (R) i fosfats (p) respectivament. Segons aquesta nomenclatura es defineix p_1 com el seti catalític on es troba el grup fosfat de l'enllaç fosfodiéster que s'escindeix i B_1 com a seti principal específic per pirimidines. Els mononucleòtids 3'-pirimidina interaccions principalment amb $B_1R_1p_1$.

A partir d'estudis cinètics (Witzel i Barnard, 1962; Wieker i Witzel, 1967), cristal·logràfics (Richards i Wyckoff, 1971; Wodak i col., 1977) i de r.m.n. (Arús i col., 1982) es va caracteritzar un subseti secundari de fixació de bases B_2 amb preferència per purines.

Posteriorment es varen anar descrivint subsetis addicionals d'unió que es defineixen com a subsetis secundaris d'interacció amb el substrat. Es considera que aquests subsetis addicionals reconeixen principalment les càrregues negatives del grup fosfat del RNA (de Llorens i col., 1989; Parés i col., 1991).

Els subsetis secundaris d'interacció de la RNAasa A complementen i modifiquen les propietats catalítiques de l'enzim. El centre actiu $B_1R_1p_1$ determina l'especificitat de substrat (B_1 és específic per a pirimidines), el subseti B_2 confereix preferència per les purines, i s'observa un increment de l'eficiència catalítica de l'enzim en funció de la longitud de la cadena nucleotídica, que es relaciona amb l'existència de subsetis addicionals.

L'eficiència catalítica de la RNAasa A s'incrementa amb la longitud de la cadena de l'oligonucleòtid (Irie i col., 1984). Mentre que l'ocupació dels subsetis pròxims al centre actiu permet una correcta disposició del substrat per a la catàlisi i, com en el cas de B_2 , un petit canvi conformacional que incrementi l'eficiència catalítica, els subsetis addicionals facilitarien la interacció de polinucleòtids, possibilitant una orientació correcta de la cadena de RNA i impedit associacions no productives.

A fi de caracteritzar el procés implicat en la degradació de substrats de tipus polinucleotídic, Cuchillo i Nogués (1993) estudiaren el procés de degradació de l'àcid policitidílic mitjançant l'anàlisi dels productes de la reacció per HPLC. L'estudi de la distribució dels productes generats en funció del temps de reacció permet proposar un model de degradació per substrats de cadena llarga. En la primera etapa de la reacció, l'enzim prefereix substrats de cadena llarga, generant una acumulació inicial d'oligonucleòtids d'entre 5 i 7 unitats, oligonucleòtids que en una etapa posterior es degraden fins a la formació de C>p. Els resultats indiquen que l'eficiència catalítica s'incrementa en

funció de la longitud de la cadena dels substrat i que el procés de degradació dels oligonucleòtids no és a l'atzar. Es considera que el model de digestió observat és conseqüència de l'estructura en subunitats de l'enzim.

La interacció de la RNAasa A amb cadenes senzilles de RNA o DNA, i la capacitat de desestabilitzar la conformació nadiua del DNA, degut a la seva afinitat preferencial per les cadenes polinucleotídiques senzilles, podria tenir alguna funció fisiològica en la hidròlisi del RNA intestinal. Jensen i Von Hippel (1976) observaren la capacitat de la RNAasa A de desestabilitzar estructures secundàries de DNA. L'enzim iniciaria la digestió del RNA intestinal mitjançant la destrucció de les estructures secundàries i a continuació realitzaria una hidròlisi total de la cadena polinucleotídica.

Homologia dels subunitats en les RNAases pancreàtiques.

A partir de l'estudi comparatiu entre les seqüències de la RNAasa A i de les RNAases pancreàtiques de 40 espècies de mamífers, s'observa com els residus del centre actiu i subunitats adjacents s'han conservat durant el procés evolutiu (Beintema i col., 1988c). En general, es conserven la majoria de residus que es consideren importants per a la catàlisi, la interacció amb el substrat i la formació i estabilització de l'estructura terciària.

En totes les seqüències de RNAases pancreàtiques conegudes es conserven els residus: His-12, His-119 i Lys-41 (p₁), Lys-7 i Arg-10 (p₂) i Lys-66 (p₀). El residu Lys-104 (p₁) es substitueix en alguns casos excepcionals per una arginina, mentre que la Lys-37 (p₃) és molt més variable i es troba substituïda principalment per glutamina. Altres residus implicats en la interacció amb la base i ribosa del nucleòtid, són majoritàriament invariables: Ser-123, Thr-45 i Phe-120 (B₁); Gln-69, Asn-71 i Glu-111 (B₂) i Lys-1. Es conserven també els 8 residus cisteïna que constitueixen els 4 ponts disulfur. La majoria de residus que poden intervenir en les interaccions hidrofòbiques, relacionats en la constitució de les estructures secundària i terciària, es conserven en totes les RNAases pancreàtiques (Lenstra i col., 1977; Beintema i col., 1988c). Un estudi comparatiu del procés de plegament de 7 RNAases pancreàtiques suggereix mecanismes molt similars (Lang i col., 1986). Recentment s'ha publicat l'estructura cristal·lina de la RNAasa seminal bovina (Mazzarella i col., 1993).

Mentre que els residus del centre actiu His-12, His-119 i Lys-41 es conserven en tots els membres de la superfamília de les RNAases, no es troben en general els equivalents als subunitats secundàries i addicionals descrits en la RNAasa A (Beintema i col., 1986). El residu Asp-121 es conserva en tots els membres excepte en les RNAases de granota.

Estructura dels subsetis en altres nucleases.

S'ha descrit una estructura similar de subsetis addicionals al centre catalític que facilitarien la interacció de l'enzim amb substrats oligomèrics, en nucleases i altres enzims despolimeritzants, com per exemple la α -amilasa (Nitta i col., 1971).

Entre les nucleases s'han caracteritzat principalment les RNAases de microorganismes. Les RNAases de microorganismes estudiades catalitzen la degradació del RNA de cadena senzilla, amb un mecanisme d'acció similar al de la RNAasa A, amb una primera etapa de transesterificació i una segona etapa més lenta d'hidròlisi: escindeixen l'enllaç fosfodièster a nivell del fosfat 3' i de les guanines, formant intermediaris guanosina 2',3'-fosfat cíclic que posteriorment generen extrems guanosina 3'-fosfat.

La RNAasa T₁ (EC 3.1.27.3.), aïllada d'*Aspergillus oryzae*, de 104 aminoàcids i dos ponts disulfur, s'ha estudiat de forma exhaustiva, tant des del punt de vista estructural com funcional (Takahashi i Moore, 1982). Osterman i Walz (1979) definiren per a la RNAasa T₁ una estructura en subsetis del tipus N-2p-1N-1pG_{p1}N₁p₂N₂.

La Barnasa és una RNAasa extracel·lular de *Bacillus amyloliquefaciens*. Està constituïda per una cadena polipeptídica de 110 aminoàcids, sense cap pont disulfur. Encara que presenta preferència per guanosines, pot hidrolitzar l'enllaç fosfodièster d'altres nucleòsids. A diferència de la RNAasa T₁, la Barnasa és rica en residus carregats positivament (8 lisines i 6 arginines) i prefereix substrats de cadena llarga (Mossakowska i col., 1989). Les càrregues positives podrien possibilitar la formació de subsetis addicionals que interaccionarien amb el grup fosfat. Gordon-Beresford i col. (1991) a partir d'estudis de modelat gràfic per ordinador varen analitzar el complex format entre l'enzim i un pentanucleòtid, identificant 5 subsetis no específics (p-2, p-1, p₀, p₊₂, B₊₂ i B₊₁). Estudis cinètics amb tetranucleòtids sintètics, assenyalen també l'existència de subsetis diferenciats (Day i col., 1992).

I.B. LES RIBONUCLEASES HUMANES

I.B.1. Ribonucleases humanes de tipus secretori i de tipus no secretori

El 1977 Sierakowska i Shugar varen classificar les ribonucleases pirimidina específiques neutres i alcalines de mamífers en dues classes: les de tipus secretori i les de tipus no secretori. Aquesta classificació és la més extensament acceptada actualment i s'aplica també en l'espècie humana (si bé, com s'ha vist anteriorment se n'està desenvolupant una altra basada en l'estructura primària

Introducció

(Zhou i Strydom, 1993)). Les característiques fonamentals que utilitzaren Shugar i els seus col.laboradors per a fer la distinció en aquests dos grans blocs s'han resumit en la taula I.B.1:

CARACTERÍSTIQUES	TIPUS SECRETORI	TIPUS NO SECRETORI
pH òptim	8,5	7,0
activitat poli(C)/poli(U)	Molt activa amb poli(C) Poc activa amb poli(U)	Activa amb poli(C) Activa amb poli(U)
Inhibició per metalls	Inhibida per Zn^{2+} i Cu^{2+}	Poc inhibida per Zn^{2+} i Cu^{2+}
Degradació d'uridina 3'-(α -naftil) fosfat	Capacitat de degradació ràpida	Activitat pràcticament nula
Origen	Reticle endoplasmàtic rugós i aparell de Golgi	Lisosomal
Localització	pàncreas, cor, cervell, eritròcits, duodè, sèrum, saliva, plasma seminal i orina	fetge, melsa, ronyó, pulmó i cèl.lules sanguínies

Taula I.B.1: Característiques principals que defineixen els dos tipus de ribonucleases pirimidina específiques de mamífers establerts per Sierakowska i Shugar (1977).

Els treballs de Neuwelt i col., (1977) feren extensiva la distinció entre aquests dos tipus al terreny immunològic. A partir de diverses ribonucleases parcialment purificades de diferents teixits humans, es va dur a terme una comparació immunològica emprant anticossos policlonals obtinguts immunitzant conills amb les ribonucleases de pàncreas i fetge. Els estudis d'immunodifusió varen permetre observar que la diferenciació en els dos blocs de ribonucleases a partir de consideracions cinètiques o estructurals, tenia una bona correlació utilitzant criteris d'antigenicitat. Les ribonucleases obtingudes a partir de sèrum i pàncreas presentaven una resposta molt semblant entre elles, mentre que les ribonucleases procedents de fetge i melsa la presentaven molt semblant entre elles. No existia reacció creuada entre el primer i el segon grup. Aquests resultats foren confirmats posteriorment pels mateixos autors (Neuwelt i col., 1978) però utilitzant un espectre més ample de teixits, i Weickmann i Glitz (1982) utilitzant radioimmunoassaig, determinant que ambdós tipus es trobaven en la majoria de teixits i fluids estudiats encara que en proporcions diferents. Així per exemple, segons el treball de Weickmann i Glitz (1982), l'activitat ribonucleasa és inhibida en un 70-80% en sèrum i orina, mentre només ho és en un 8% en melsa i un 30% en fetge, quan s'utilitzen anticossos policlonals anti-ribonucleasa de pàncreas humà.

Des del treball de Zittle i Reading (1945) en el qual determinaren per primer cop activitat ribonucleasa en sèrum humà i la possibilitat exposada per Migliarese (1958) que nivells anòmals d'activitat ribonucleasa en sèrum poguessin associar-se al desenvolupament d'un procés tumoral

pancreàtic, els treballs efectuats sobre ribonucleases humanes han estat encaminats a esbrinar l'origen de les ribonucleases en sèrum, sense el coneixement del qual és impossible assignar una alteració dels nivells o dels components en sèrum a una causa determinada. Aquest objectiu ha portat a l'estudi de les ribonucleases en una gran diversitat de teixits, cèl·lules i fluids corporals.

La purificació del component ribonucleàsic de sèrum humà duta a terme pel Akagi i col., (1976) va permetre identificar la presència de cinc fraccions eluïdes d'una gel filtració amb masses moleculars diferents (45.000, 32.000, 20.000, 13.000 i 8.500 Da), amb pHs òptims d'activitat de 8,5-8,7 en les quatre primeres fraccions i de 7,5 en la darrera, i amb preferència pel substrat poli(C) davant del substrat poli(U) a excepció de l'última fracció o component. Aquests resultats suposaven una millora de la caracterització del component ribonucleàsic del sèrum, en relació a la duta a terme per Schmuckler i col., (1975), treball en el qual es descriu l'aïllament d'una única fracció ribonucleasa alcalina.

La complexitat del component ribonucleàsic del sèrum augmentà amb la descripció en el treball presentat per Blank i Dekker (1981) d'una activitat ribonucleasa la font de la qual seria probablement la ribonucleasa procedent de leucòcits. Houck i Berman (1958) ja havien proposat l'existència d'una clara correlació entre l'activitat ribonucleàsica detectada en sèrum i el número de leucòcits. Aquesta activitat ribonucleasa tindria el seu pH òptim per sota de 7 i segons Akagi i col., (1978) diferiria en la preferència de substrat, de la ribonucleasa de leucòcits. Blank i Dekker demostraren amb estudis en els quals combinaven gels tenyits per activitat i digestió amb diferents glicohidrolases que bona part de la heterogeneïtat descrita en el treball comentat anteriorment i per d'Akagi i col., (1978) és deguda a diferents graus de glicosilació. Després d'aquests treballs i probablement degut a la dificultat d'aconseguir mostra i les minses quantitats de ribonucleasa presents en el sèrum, existeix un buit de treballs sobre les ribonucleases de sèrum fins el treball de Zhou i Strydom (1993) en el qual es purificà i seqüencià una ribonucleasa de 119 residus que digereix en l'extrem 3' d'uridines. Aquesta ribonucleasa, que presenta un 43% d'identitat amb la ribonucleasa de pàncreas humà i un 90% d'identitat amb dues ribonucleases aïllades de fetge de porc i bou, suposaria un quart tipus de ribonucleasa diferent, en estructura primària, dels grups denominats secretori i no secretori i de la proteïna catiònica d'eosinòfil (ECP).

Un altre fluid corporal estudiat ha estat el fluid cerebroespinal en el qual es va detectar també activitat ribonucleasa (Rabin i col., 1977). En aquest fluid hi coexistiria un grup de cinc formes molt semblant al descrit per al sèrum (Blank i Dekker, 1981; Akagi i col., 1978). Posteriorment, Schieven i col., (1982) varen publicar l'existència de formes específiques en el fluid cerebroespinal no detectades en sèrum, cosa que fou corroborada posteriorment per Allinquant i col., (1987) en el que suposa l'intent més agosarat de separar l'heterogeneïtat descrita en fluid cerebroespinal. D'aquests treballs, els autors concloueren que malgrat que l'activitat ribonucleasa en fluid

cerebroespinal podria derivar completament de la sang, alguns mecanismes com ara el transport selectiu a través de la frontera hematoencefàlica, podrien alterar la composició de l'activitat ribonucleasa en el fluid cerebroespinal en relació a la del sèrum. Les diferències observades, no obstant, semblen obeir únicament a la presència d'estructures glucídiques i no descarten que part de l'activitat ribonucleasa descrita en el fluid cerebroespinal s'origini en teixits del sistema nerviós central.

L'orina constitueix l'exemple més clarificador per descriure un sistema en el qual coexisteixen ambdós tipus de ribonucleasa humana (secretori i no secretori) en un mateix fluid corporal. Dikman i col., (1958) varen descriure per primer cop l'existència d'activitat ribonucleàsica en orina, i Delaney (1963) fou el primer en observar l'existència de dues espècies en aquest fluid que anomenà RNAases U i P. La seva naturalesa glicoproteica fou proposada per Reddi (1977) i la presència de diverses formes corroborada per Sugiyama i col., (1981). El treball de Cranston i col., (1980) permetia distingir entre dues glicoproteïnes amb activitat ribonucleasa basant-se en criteris de pH òptim, activitat amb poli(C), composició de sucres i composició aminoacídica. Amb posterioritat Iwama i col., (1981) publicaren la purificació de dues formes ribonucleàsiques d'orina amb clares analogies a les formes descrites per Cranston i col., (1980). La RNAasa U_L, segons la nomenclatura establerta per Iwama i col., (1981), tindria una massa molecular de 38.000 Da, un pH òptim d'activitat amb RNA de 8,0 i un contingut en sucres neutres del 20,7% i un 7,8% d'hexosamina. Aquesta forma seria indistingible immunològicament de la ribonucleasa de pàncreas humà. La RNAasa U_S amb una massa molecular de 13.000 Da, tindria un pH òptim de 6,7 i un contingut en glúcids molt inferior a la RNAasa U_L. Ambdues es trobarien presents en formes de masses moleculars diferents. La RNAasa U_L fou aïllada també per Beintema i col., (1988a) (HU_A segons la nomenclatura d'aquests autors) els quals varen seqüenciar-la, determinant que es tractava d'una glicoproteïna de 128 residus que diferia de l'enzim pancreàtic en una Thr addicional en l'extrem C-terminal i en el fet que es trobava més extensament glicosilada. Simultàniament, Beintema i col., (1988b) publicaren la seqüència de la RNAasa U_S (HU_D segons la nomenclatura d'aquests autors) confirmant resultats presentats prèviament (Cranston i col., 1980; Niwata i col., 1985; Iwama i col., 1981) sobre la composició d'aminoàcids i la glicosilació de la ribonucleasa de tipus no secretori d'orina, indicant que aquesta tenia una semblança molt elevada amb les ribonucleases de melsa (Delaney, 1963) i la neurotoxina derivada d'eosinòfil (EDN) (Gleich i col., 1986). La RNAasa HU_D és una glicoproteïna de 134 residus, pirimidina específica, amb cinc cadenes curtes de carbohidrats unides via Asn i amb un 30% d'identitat amb la ribonucleasa de pàncreas humà, la seqüència de la qual es coneixia des de l'aparició del treball de Beintema i col., (1984).

En el mateix treball en què publicaven la seqüència de la ribonucleasa de tipus secretori d'orina, Beintema i col., (1988a) analitzaren la seqüència del component majoritari de plasma seminal. La seqüència determinada coincidí absolutament amb la seqüència obtinguda per l'orina àdhuc en la

presència de la Thr-128. Anteriorment De Prisco i col., (1984) havien determinat ja la composició en aminoàcids i l'havien identificat amb la ribonucleasa de pàncreas humà. Els autors del treball significaven l'activitat d'aquesta ribonucleasa sobre RNA de doble cadena, així com l'heterogeneïtat de formes detectada.

En relació amb els treballs sobre els components ribonucleàsics d'orina, Mizuta i col., (1990) varen purificar tres formes amb activitat ribonucleasa de ronyó i les varen comparar amb les d'orina. Basant-se en criteris de composició d'aminoàcids, seqüenciació de l'extrem N-terminal, immunològics i avaluant les propietats enzimàtiques, varen assignar la RNAasa HK-1 (18.000 Da) al grup de ribonucleases del tipus no secretori i les RNAases HK-2A (20.000 Da) i HK-2B (22.000 Da) al grup de ribonucleases del tipus secretori. L'estudi de la composició glucídica d'aquestes fraccions del tipus secretori va permetre postular a aquests autors que el ronyó no pot ser l'origen de les ribonucleases del tipus secretori trobades a orina.

La purificació de la ribonucleasa de fetge humà fou publicada en primer lloc per Frank i Levy (1976) determinant una massa molecular de 14.000, un pH òptim proper a la neutralitat, una elevada termoestabilitat i absència d'efecte inhibitor per part del Zn^{2+} i Cu^{2+} . Aquests resultats la definien com una ribonucleasa del tipus no secretori. El treball de Sorrentino i col., (1988) va permetre determinar la composició aminoacídica i la seqüència N-terminal de la proteïna, indicant que podia compartir una mateixa estructura primària amb la neurotoxina d'eosinòfil descrita per Gleich i col., (1986) i amb la ribonucleasa de tipus no secretori d'orina (Beintema i col., 1988b).

La ribonucleasa humana procedent de la melsa, segons Neuwelt i col., (1978) presentava analogies a nivell cinètic i antigènic prou similars amb la ribonucleasa hepàtica (Neuwelt i col., 1976; Neuwelt i col., 1977) com per suposar que es tractava de la mateixa proteïna o de proteïnes extraordinàriament relacionades entre elles. De fet Delaney (1963) publicà la composició d'aminoàcids de la fracció ribonucleàsica majoritària de melsa la qual va resultar molt semblant a la composició resultant de la seqüenciació de la ribonucleasa de tipus no secretori d'orina. Yasuda i col., (1990b) varen determinar la seqüència N-terminal de la ribonucleasa de melsa humana i trobaren que aquesta era idèntica a la seqüència de la neurotoxina d'eosinòfil descrita per Gleich i col., (1986) i de la ribonucleasa de tipus no secretori d'orina (Beintema i col., 1988b). La determinació de la composició en carbohidrats de la ribonucleasa de melsa pels mateixos autors mostrà que aquesta diferia de la composició glucídica de la ribonucleasa de tipus no secretori d'orina.

També en eritròcits Yasuda i col., (1990a) varen descriure la coexistència d'ambdós tipus de ribonucleases. El contingut de la ribonucleasa de tipus no secretori (RNAasa HE-1, 18.000 Da) era molt més elevat que no pas el de ribonucleasa de tipus secretori (RNAasa HE-2, 39.000-33.000

Da). En altres tipus cel·lulars sanguinis ja s'havia descrit també la presència d'activitat ribonucleasa: en leucòcits (Sznajd, 1972; Umeda i col., 1969; Naskalski i Snajd, 1967; Akagi i col., 1978) i la neurotoxina d'eosinòfil (Gleich i col., 1986). En aquest darrer tipus cel·lular sanguini el component majoritari correspondria al tipus no secretori.

Els estudis que s'han anat relacionant en aquest apartat permeten resumir una distribució tissular de les ribonucleases humanes. Així la ribonucleasa de tipus secretori sembla estar present majoritàriament en tots els fluids estudiats de l'organisme: orina, sèrum, líquid cerebroespinal i plasma seminal. En teixits apareix en pàncreas, ronyó, duodè, cor i cervell i en cèl·lules de la sang només en eritròcits. La ribonucleasa de tipus no secretori es troba com a component minoritari en els fluids corporals ja esmentats però apareix en tots els tipus cel·lulars sanguinis i teixits estudiats i com a major component de melsa i fetge. De forma general també es pot concloure que la ribonucleasa de tipus secretori és present amb un grau d'heterogeneïtat superior al de la ribonucleasa de tipus no secretori i que aquesta heterogeneïtat és deguda a diferents nivells de glicosilació.

1.B.2. La ribonucleasa de pàncreas humà: antecedents

Ha estat suggerit (Barnard, 1969), que la presència de ribonucleasa pancreàtica en vertebrats no remugants pot ésser un vestigi evolutiu atès que no existeix en aquests organismes la necessitat d'aprofitament de fòsfor i nitrogen procedent del RNA de la flora microbiana.

Els intents de purificació de la ribonucleasa de pàncreas humà han estat diversos però, degut a la dificultat d'obtenció de la mostra i al baix contingut d'aquest enzim en aquest òrgan la purificació a homogeneïtat no fou possible fins els treballs de Weickmann i col., (1981) i Weickmann i Glitz (1982).

En el treball de Bardon i col., (1976) es va dur a terme una caracterització parcial de l'enzim del pàncreas juntament amb el d'altres òrgans, que comprenia aspectes com ara la determinació d'un pH òptim de 8,5 i la demostració d'una forta inhibició provocada per $ZnSO_4$. Les dades aportades per Neuwelt i col., (1978) obtingudes a partir d'extrets crus vingueren a confirmar el pH òptim determinat en els estudis realitzats anteriorment (Delaney, 1963; Ukita i col., 1964; Bardon i col., 1976). Aquestes dades permetien catalogar la ribonucleasa de pàncreas humà dins de l'anomenat grup de ribonucleases de tipus secretori. Els estudis d'immunodifusió (Neuwelt i col., 1977 i 1978) i radioimmunoassaig (Weickmann i Glitz, 1982) varen permetre observar que la diferenciació en els dos blocs de ribonucleases, a partir de consideracions cinètiques o estructurals, tenia una bona correlació utilitzant criteris d'antigenicitat i per tant, en totes les localitzacions on cinèticament s'havia determinat la presència d'activitat ribonucleasa del tipus secretori, s'observava resposta

positiva quan s'exposaven aquests teixits o fluids a anticossos policlonals anti-ribonucleasa pancreàtica humana.

La purificació i caracterització immunològica de la ribonucleasa obtinguda a partir de suc pancreàtic duta a terme per Kurihara i col., (1982) va demostrar la presència de tres fraccions amb activitat ribonucleasa, amb un elevat grau de puresa, amb masses moleculars determinades per electroforesi en gels de poliacrilamida-SDS, de 27.000, 19.000 i 13.000 Da. Aquestes fraccions, segons els mateixos autors, correspondrien molt probablement, a una mateixa cadena polipeptídica amb diferents graus de glicosilació. Les activitats de les tres formes s'incrementava en presència de Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Na^+ , K^+ , espermina i espermidina, mentre es veia reduïda quan es mesurava l'activitat en presència d'heparina, Cu^{2+} i Zn^{2+} . El sèrum policlonal obtingut com a resposta a la ribonucleasa humana no va donar reacció creuada amb la RNAasa A de pàncreas bovi, dada que confirmava els resultats obtinguts per Neuwelt i col., (1977).

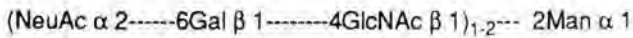
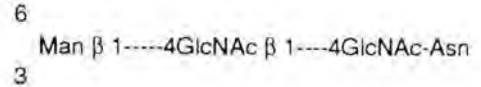
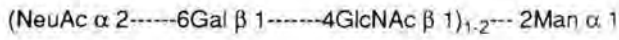
La ribonucleasa pancreàtica humana que obtingueren Weickmann i col., (1981) presentava una massa molecular determinada per electroforesi en gels de poliacrilamida-SDS, cromatografia de filtració en gel i composició d'aminoàcids de 15.000 Da, era inhibida per àcid iodacètic a pH 5,5 segons una cinètica molt semblant a l'experimentada en el cas de la RNAasa A bovina i presenta una forta activitat amb poli(C). Weickmann i col., (1981) afirmaren també detectar en electroforesi mitjançant gels de poliacrilamida-SDS, com a mínim, dues bandes més que els autors atribuïren a una mateixa cadena polipeptídica amb diferents nivells de glicosilació.

La seqüència d'aminoàcids de la ribonucleasa de pàncreas humà fou publicada poc temps després (Beintema i col., 1984). L'enzim constava, segons aquest treball, de 127 residus i diferia en 37 posicions de la ribonucleasa de pàncreas bovi incloent-hi els tres residus addicionals en l'extrem C-terminal, i com una de les característiques més destacables assenyalaven una elevada densitat de càrregues positives en l'extrem N-terminal. Posteriorment es va suggerir, en seqüenciar-se la ribonucleasa de tipus secretori d'orina i de plasma seminal i determinar la presència de la Thr-128 com a única diferència en l'estructura primària d'aquestes dues respecte l'enzim pancreàtic, que aquest residu s'hauria perdut en la ribonucleasa de pàncreas humà per l'acció de carboxipeptidases durant la purificació (Beintema i col., 1988a).

La ribonucleasa pancreàtica humana presenta activitat quan s'utilitza RNA de doble cadena. Aquesta activitat s'ha detectat en sèrum i orina encara que en aquest darrer cas s'ha vist que era menor (Bardon i col., 1976). El pH òptim d'activitat que exhibeix aquest enzim s'ha vist que és diferent en funció del substrat que és objecte de degradació: 8,5 per RNA, 8,0 per poli(C), 7,5 per RNA de doble cadena i 6,5 per poli(U). Les ribonucleases amb un contingut més elevat de càrregues positives en la seva superfície (pancreàtica humana, de balena i seminal i de cervell bovines) són

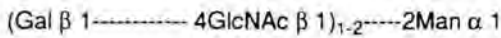
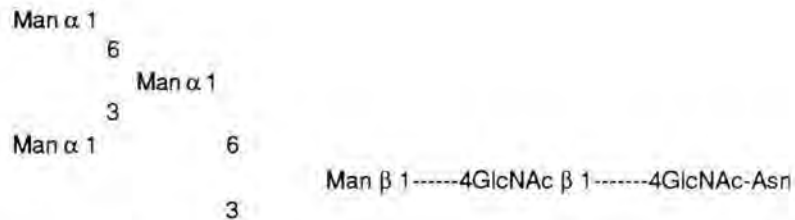
b. Tipus complex:

Presenta un nucli pentasacàrid anàleg al present en les estructures d'elevat contingut en manoses, apart de variacions en l'estructura i en el número de les cadenes més externes (les quals no contenen manoses) unides a les manoses del nucli:



c. Tipus híbrid:

Aquest tipus estructural presenta característiques comuns a tots dos grups prèviament exposats, de manera que una part de la molècula experimenta una maduració cap a estructures del tipus complex mentre l'altra part roman amb una estructura del tipus ric o d'elevat contingut en manoses:



En la biosíntesi d'aquests tres tipus de cadenes oligosacàrides existeixen dues fases diferenciades. La primera consistiria en la síntesi de la cadena de carbohidrats sobre l'intermediari dolicol-fosfat i la segona comprendria la transferència en bloc de la cadena completament sintetitzada des del dolicol-fosfat al punt de glicosilació de la proteïna (Chapman i Kornfeld, 1979). La seqüència diana de la cadena polipeptídica que rep l'estructura oligosacàrida a partir del dolicol-fosfat és **Asn-X-Ser/Thr** en la qual X pot ésser qualsevol aminoàcid.

Durant el procés complet de maduració, les glicoproteïnes es troben totalment aïllades del citoplasma. La unió del nucli pentasacàrid, la transferència i la maduració de la cadena s'inicia en el reticle endoplàsmic i finalitza en l'aparell de Golgi (Lennarz, 1987).

1.B.3.b. EL COMPONENT GLUCÍDIC EN LES RIBONUCLEASES HUMANES

Entre les ribonucleases humanes, l'estructura i la composició glucídica més ben coneguda fins fa poc corresponia a la de la ribonucleasa procedent d'orina de tipus secretori. Atesa la facilitat d'obtenció de mostra i la disponibilitat de mètodes de purificació per a la seva obtenció (Cranston i col., 1980; Iwama i col., 1981), l'anàlisi quantitativa i estructural del component glucídica d'aquestes ribonucleases fou el que avançà més ràpidament.

Segons la nomenclatura de Beintema i col., (1988a), en orina coexisteixen ribonucleases de tipus secretori HU_A (aproximadament constitueix el 60% del total d'activitat ribonucleasa en orina), HU_B i HU_C (també anomenades U_L per Iwama i col., 1981) i ribonucleases del tipus no secretori HU_D (anomenada U_S segons la nomenclatura d'Iwama i col., 1981).

L'anàlisi glucídica completa de la ribonucleasa de tipus no secretori d'orina HU_D o U_S no ha estat publicada, però la determinació de la seva seqüència polipeptídica publicada per Beintema i col., (1988b) anava acompanyada d'un breu estudi. Segons aquest estudi es podia deduir que les cinc Asn (en les posicions 17, 59, 84, 65 i 92) es trobaven lleument glicosilades si bé es pensava que aquest baix nivell de glicosilació era degut a l'acció d'exoglicosidases lisosomals. Si més no, aquesta opinió estava d'acord amb les observacions realitzades en altres treballs (Cranston i col., 1980; Iwama i col., 1981) en els quals es postulava que no hi havia siàlic i que la ribonucleasa U_S contenia molt poca quantitat de motiu glucídica.

Recentment però ha estat publicat un estudi en el qual es comparava l'estructura glucídica de la ribonucleasa de tipus no secretori de ronyó, melsa i fetge (Lawrence i col., 1993a,b). L'anàlisi electroforètica indicà un elevat nivell de puresa i una massa molecular de 17.000-18.000 Da. Els paràmetres cinètics i immunològics mostraren que tots tres enzims eren indistingibles i determinaven la seva assignació al tipus no secretori. Les tres glicoproteïnes eren reconegudes per lectines amb especificitat per GlcNAc i Fuc i amb un grau menor per lectines específiques per Gal β(1→4)GlcNAc. No es varen trobar doncs, diferències específiques de teixit entre tots tres enzims (Lawrence i col., 1993a). En la continuació d'aquest treball (Lawrence i col., 1993b), varen caracteritzar estructuralment el component glucídica de la ribonucleasa de tipus no secretori de ronyó, melsa i fetge però en aquest cas utilitzant tècniques de ¹H-r.m.n. i espectrometria de masses. Els resultats d'aquest estudi estan d'acord amb l'assaig per lectines i indiquen que la N-glicosilació de la ribonucleasa de tipus no secretori de ronyó, melsa i fetge és molt semblant sinó idèntica. Una altra dada interessant que els autors extreuen d'aquest treball, és que la N-glicosilació d'aquests enzims no es veu afectada quan s'utilitza una extracció àcida per a la seva purificació.

RNAasa de tipus secretori d'orina HU _A									
	Asn-34 ¹	Asn-76 ¹	Asn-88 ¹	Total ¹	RNAasa C ²	RNAasa U _L ³	HPRNAasa ⁴	RNAasa seminal ⁵	HK-2B ⁶
Fucosa	1,0	1,3	1,0	3,3			4,4	4,3	2,5
Manosa	2,7	3,2	3,0	8,9			3,0	3,2	3,0
Galactosa	2,1	6,0	2,7	10,8			4,6	3,4	+
Total hexoses				23,0	20,8	25			
NAcGlc	3,2	8,0	5,5	16,7	12,8	8,5	5,9	4,1	2,3
NeuAc	0,7	1,6	1,2	3,5	3,2		-	-	-
Xilosa	-	-	-				0,9	-	-
Glucosa	+	-	+				1,0	1,6	-

Taula I.B.3.1: Composició glucídica de la ribonucleasa de tipus secretori d'orina, pàncreas, plasma seminal i ronyó.¹. segons Beintema i col., (1988); ². segons Cranston i col., (1980); ³. segons Iwama i col., (1981); ⁴. segons Beintema i col., (1984); ⁵. segons De Prisco i col., (1984); ⁶. segons Mizuta i col., (1990). HU_A, RNAasa C i RNAasa U_L: ribonucleasa de tipus secretori d'orina; HPRNAasa: ribonucleasa de tipus secretori de pàncreas humana; HK-2B: ribonucleasa de tipus secretori d'orina. La quantitat de monosacàrid està expressada com a mol/mol de pèptid o proteïna.

Els resultats obtinguts de composició de glúcids de la ribonucleasa de tipus secretori de diferents teixits i fluids abans dels resultats de Mizuta i col., (1990), va permetre proposar a alguns autors que, degut a les diferències observades entre la composició glucídica de la ribonucleasa d'orina i la de pàncreas, la ribonucleasa de ronyó podia ser l'origen de la ribonucleasa d'orina. Els estudis realitzats per Yamashita i col., (1986) en els quals es duia a terme un fraccionament del component ribonucleàsic mitjançant cromatografia d'afinitat amb lectines, postulaven que la ribonucleasa de pàncreas humana es trobava glicosilada en un 93% de les molècules i no en un 50% com havien indicat Beintema i col., (1984) i indicaven que existien diferències organo-específiques en les estructures oligosacàrides. Segons aquest treball, la ribonucleasa que presentaria un comportament més semblant en les diferents columnes de lectina utilitzades, i probablement, una estructura glucídica més propera a la de la ribonucleasa d'orina, seria la ribonucleasa de pàncreas seminal. Segons els treballs de Mizuta i col., (1990) la ribonucleasa de tipus secretori de ronyó no podria ser l'origen de la d'orina.

Així doncs es pot dir que encara no està clar quin seria l'òrgan d'origen de la ribonucleasa de tipus secretori d'orina atenent-nos als resultats exposats. Encara resta menys clar l'origen de les ribonucleases de sèrum les quals es podrien considerar les desencadenants d'aquests estudis. Probablement una de les raons sigui que els nivells en sèrum d'ambdós tipus de ribonucleasa

sembla ser molt baix respecte el d'altres proteïnes. Weickmann i col., (1982) utilitzant radioimmunoassaig, estimaren la concentració de ribonucleasa en sèrum en 0,5 µg/ml.

L'estudi del comportament glucídic de la ribonucleasa de pàncreas humà ha de permetre la identificació d'aquesta d'entre les diferents ribonucleases presents en sèrum.

I.B.4. La ribonucleasa com a marcador de disfuncions pancreàtiques

El 1945 Zittle i Reading varen detectar per primer cop la presència d'activitat ribonucleàsica en sèrum humà. Anys més tard, Migliarese (1958) postulava una probable relació entre increments del nivell d'aquesta activitat en sèrum i el desenvolupament d'un procés tumoral pancreàtic. Això no obstant, molt aviat es va posar en dubte la correlació proposada atès que en pacients sotmesos a pancreatectomia també es detectava un nivell elevat d'activitat ribonucleàsica en sèrum. De la mateixa manera, també s'observaren increments de l'activitat ribonucleàsica en el sèrum de pacients afectats d'altres malalties com ara cirrosi, leucèmia i disfuncions renals, sense que existís una correlació amb el carcinoma pancreàtic (Levy i Rottino 1959 i 1960).

El 1966 Reddi proposava que els teixits transformats neoplàsicament són capaços de sintetitzar ribonucleasa que difereix qualitativament i quantitativa de l'existent en els teixits normals corresponents. Anys més tard, el mateix grup (Reddi i Holland, 1976) publicava un estudi segons el qual existiria una correlació entre l'activitat ribonucleàsica en sèrum i el desenvolupament de tumors. Utilitzant poli(C) com a substrat per a les mesures d'activitat ribonucleàsica detectaren increments anòmals en sèrum de pacients afectats de càncer de pàncreas mentre que, aquest increment no s'observava en malats amb pancreatitis. Els mateixos autors reconegueren que una insuficiència renal severa podia també generar un increment significatiu de l'activitat ribonucleàsica en sèrum humà. Aquesta darrera observació ha estat corroborada per altres autors (Shenkin i col., 1976; Karpetsky i col., 1977; Humphrey i col., 1977).

El treball de Peterson (1979) entrà en contradicció frontal amb els estudis publicats per Reddi i Holland (1976). Emprant també poli(C) com a substrat Peterson concloué que les mesures de l'activitat ribonucleàsica en sèrum no són útils en la detecció preventiva del cancer de pàncreas. Altres autors proposen que, si bé l'activitat ribonucleasa es pot veure incrementada en el desenvolupament d'un carcinoma pancreàtic, aquest increment no es produeix exclusivament en aquesta situació, sinó que els nivells d'activitat també es poden veure alterats significativament en disfuncions hepàtiques (Doran i col., 1980), pancreatitis aguda (Warshaw i Lee, 1979), fibrosi cística (Gahl i col., 1978), càncer de pròstata (Chu i Maley 1980), càncer d'ovari (Schleich i col., 1981) i dependre de l'edat, pes o nutrició del pacient (Coombes i col., 1977; Francesconi i col., 1981).

Isaacs (1981) va observar, en concordança amb els resultats de mesura de l'activitat ribonucleàsica en sèrum de Peterson (1979), que la ribonucleasa sèrica no podia ésser utilitzada com a eina vàlida en la detecció del càncer de pàncreas, i que fins i tot, el seu nivell era més freqüentment anòmal en pacients amb altres tumors sòlids o disfuncions renals.

Atesa la confusió i diversitat de conclusions obtingudes a partir de dades d'activitat ribonucleàsica en sèrum, va esdevenir necessari substituir o combinar aquestes dades amb altres tècniques experimentals amb capacitat de millorar la detecció de ribonucleases en sèrum humà. Reddi i Dreiling (1982), Weickmann i col., (1984) i Kurihara i col., (1984) combinaren en els seus estudis de mesura d'activitat amb poli(C) com a substrat i la utilització d'anticossos policlonals obtinguts contra la ribonucleasa pancreàtica. D'aquests estudis se'n desprenia que la ribonucleasa pancreàtica present en sèrum humà no podia ésser utilitzada com a marcador per a la diagnosi del càncer de pàncreas. Malalts afectats d'altres tumors, malignes o benignes, o amb disfuncions renals presentaven també nivells alterats de ribonucleasa en sèrum.

Ara bé, tots els treballs comentats fins aquest punt, tant aquells basats exclusivament en mesures d'activitat ribonucleasa en sèrum, com els resultants de la combinació de tècniques immunològiques amb mesures d'activitat, han prescindit de dos fets prou contrastats: en primer lloc que les ribonucleases humanes, incloses les presents en sèrum humà, són glicoproteïnes i en segon lloc la més que probable existència d'un mecanisme d'eliminació de les ribonucleases sèriques, ja sigui per filtració glomerular o per endocitosi en fetge i melsa per tal de mantenir uns nivells baixos de ribonucleasa en sèrum i evitar-ne l'efecte citotòxic (Newton i col., 1992).

L'enfoc segons el criteri del nostre grup per a determinar la possible utilitat de la ribonucleasa de pàncreas humà com a marcador tumoral, ha de contemplar l'heterogeneïtat glucídica de les espècies ribonucleases que conviuen en sèrum i s'ha de basar en un estudi bioquímic que permeti comparar la proteïna que es troba en condicions tumorals amb la produïda en condicions normals i la recerca de diferències entre ambdues. En aquest sentit caldria dur a terme la caracterització del component glucídic de la ribonucleasa de pàncreas humà per tal de poder-lo comparar amb el comportament de la ribonucleasa produïda per línies de cèl·lules tumorals.

I.C. CLONATGE I EXPRESSIÓ DE RIBONUCLEASES

I.C.1. Clonatge de gens i expressió de proteïnes heteròlogues

La poca quantitat de ribonucleasa en el pàncreas humà, a part de la dificultat en aconseguir òrgans, així com l'interès del nostre grup en dur a terme estudis d'estructura i funció amb la ribonucleasa

pancreàtica humana ens va portar a considerar el clonatge del gen i l'expressió heteròloga de la proteïna.

En el procés de producció d'una proteïna heteròloga hom distingeix entre tres fases ben diferenciades com són el clonatge del gen (o cDNA), l'expressió en les cèl·lules heteròlogues i la purificació i caracterització final de la proteïna.

Actualment la metodologia del DNA recombinant ha assolit un elevat grau de sofisticació de manera que el clonatge d'un gen o cDNA no constitueix un obstacle insalvable sinó que pot resultar fins i tot relativament senzill encara que no per això deixi de ser laboriós o costós. De cara a obtenir el gen per al seu posterior clonatge hom pot optar per aïllar el gen del DNA genòmic, obtenir el cDNA o construir un gen sintètic. El gen obtingut a partir del DNA genòmic pot tenir l'inconvenient de ser portador d'introns i per tant necessitar d'una manipulació extra abans d'intentar-ne l'expressió. El cDNA pot presentar en canvi, problemes alhora d'aïllar-lo ja que ens podem trobar amb que la població del mRNA d'interès sigui extremadament baixa. L'estratègia de construir un gen sintètic és especialment vàlida per a proteïnes petites o mitjanes perquè la dificultat de construir-lo augmenta amb la longitud del gen. L'obtenció de gens sintètics pot resultar en principi, més ràpida que el clonatge de gens o cDNAs i presenta l'avantatge addicional que el gen sintètic es pot dissenyar de tal manera que contingui punts de restricció en llocs adequats i que els codons siguin els d'ús més freqüent de l'organisme que es vol utilitzar per a l'expressió. La construcció de gens sintètics s'inicia a partir d'oligonucleòtids que s'hibriden en una o més etapes fins a obtenir el gen sintètic que cal aleshores clonar en un vector. En l'actualitat, és possible sintetitzar de forma rutinària oligonucleòtids que van més enllà de 100 b i s'han arribat a construir gens de més de 1.000 pb. La síntesi de gens no només permet la producció heteròloga de proteïnes conegudes sinó de proteïnes totalment noves. Un dels principals inconvenients que pot presentar la síntesi de gens és que, degut al procés de síntesi pot aparèixer alguna base canviada respecte la seqüència prèviament dissenyada, però aquest problema és fàcilment solucionable gràcies a les tècniques de mutagènesi.

L'expressió d'una proteïna a partir d'un DNA codificant per a aquesta, per un organisme diferent a aquell en el qual on la proteïna es troba naturalment és el que s'anomena expressió heteròloga i pot esdevenir l'etapa de més difícil solució o assoliment. De forma general l'expressió de cada gen o cDNA presenta la seva peculiar problemàtica particular que cal solventar per aconseguir nivells elevats d'expressió. La síntesi o producció de proteïnes forànies és, actualment, encara molt empírica. No existeix un codi que reculli normes universals i ràpides per a seguir. De fet, una proteïna qualsevol és tant probable que constitueixi l'excepció, com ho és de seguir una norma. Les causes d'una expressió incorrecta o dolenta poden ser molt diverses. El DNA que codifica per a aquestes proteïnes pot no transcriure's o pot no traduir-se bé, la proteïna un cop formada pot no

plegar-se de la forma escaient i ser ràpidament degradada per proteases, o bé pot ser tòxica i causar la mort de les cèl·lules transformades.

Els sistemes d'expressió principals que més habitualment s'utilitzen són *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, llevat, baculovirus i cèl·lules de mamífer. D'entre aquests *E.coli* ha estat històricament el més emprat en la identificació de proteïnes heteròlogues, encara que darrerament cada vegada s'estan utilitzant més *Bacillus* i els llevats. Les raons de l'elecció dels microorganismes en detriment d'altres sistemes d'expressió com les cèl·lules de mamífer o baculovirus són diverses i inclouen fets com ara que resulten més fàcils de cultivar, tenen un creixement més ràpid, es coneixen millor genèticament i fisiològica de manera que l'obtenció de soques mutants és relativament més senzilla i hom pot disposar de numerosos vectors de clonatge i expressió.

Per a la producció heteròloga de proteïnes cal clonar el fragment de DNA codificant per a aquestes proteïnes en un dels anomenats vectors d'expressió, la característica comú dels quals, és la possessió d'un promotor fort i regulable que en principi ha d'assegurar una transcripció intensa del fragment en el sistema escollit, i seqüències reguladores que en un principi també, promouen la seva traducció a un nivell elevat. Una altra opció és utilitzar promotors més febles que no procuren un nivell de transcrit tant elevat, però possibiliten dur a terme una expressió que podríem anomenar constitutiva.

El sistema més utilitzat és l'expressió en *E.coli*. Hom assumeix de forma general, que qualsevol proteïna pot ésser produïda en *E.coli* sempre i quan aquesta no sigui massa petita, massa gran massa hidrofòbica o no contingui massa cisteïnes. S'han desenvolupat sistemes en *E.coli* per a l'expressió directa (o citosòlica), l'expressió de proteïnes de fusió i l'expressió de proteïnes de secreció cadascuna de les quals té els seus avantatges i els seus desavantatges i, si bé és difícil predir *a priori* la dificultat relativa de purificació de les proteïnes per aquests tres mètodes, existeixen altres raons per seleccionar una o altra aproximació en detriment de les altres.

L'expressió de proteïnes de fusió assegura un inici de la traducció correcte i sovint permet superar problemes d'instabilitat que hom podria tenir amb pèptids curts. A més l'elevat grau de certesa que proporciona el sistema de fusió de proteïnes el converteix en una bona aproximació per a generar immunògens.

L'ambient reductor present en *E.coli* no permet que proteïnes riques en cisteïnes formin els ponts disulfur requerits per a la conformació adequada. La secreció a ambients més oxidants com l'espai periplàsmic, ha de permetre la formació d'aquests ponts disulfur i el plegament correcte de la proteïna. Un altre avantatge rau en el fet que la secreció evita les N-Met no desitjades. Tampoc és

una garantia i un dels principals inconvenients que pot presentar és la impossibilitat que la proteïna sigui secretada efectivament i acabi essent substrat de les proteases.

El mètode d'expressió directa és aconsellable per a proteïnes heteròlogues no massa llargues (100-300 residus) sempre i quan no hi hagi un número desmesurat de cisteïnes. Moltes proteïnes quan s'expressen de forma heteròloga formen cossos d'inclusió en l'interior de les cèl·lules consistents en una aglomeració insoluble de proteïna, de mides considerables, en la qual la proteïna heteròloga es pot trobar barrejada amb proteïnes de la pròpia cèl·lula hoste i presentar una mescla de conformacions.

Existeixen diverses raons per les quals *Bacillus subtilis* pot ésser considerat útil com a hoste per l'expressió de proteïnes. És un procariota força ben estudiat i del qual hom en té un bon coneixement a nivell genètic i fisiològic. Addicionalment s'ha aconseguit un guany a nivell experimental degut a què s'han crescut i estudiat diverses espècies de *Bacillus* per a la producció industrial. El fet que en els darrers anys s'hagin desenvolupat diversos sistemes d'expressió relativament senzills d'utilitzar, també és un factor que ha contribuït a popularitzar-lo. Potser però, la característica principal per la qual *B.subtilis* és escollit com a hoste per a l'expressió de proteïnes és la seva capacitat per a secretar proteïnes directament al medi de cultiu acumulant-les fins a nivells altíssims i en un estat relativament pur. Un avantatge addicional que presenta la secreció al medi, és que les proteïnes estan sovint correctament plegades, amb els enllaços disulfur formats i en estat soluble. Per contra, *B.subtilis* secreta diverses proteases al medi de cultiu les quals potencialment poden degradar altres proteïnes que també són secretades al medi. L'obtenció de soques defectives en proteases ha de contribuir enormement a l'estabilitat de proteïnes heteròlogues en el medi de cultiu.

Els llevats han demostrat ser organismes experimentals útils per a l'expressió i l'estudi d'una àmplia diversitat de productes de gens eucariòtics tant per a la recerca bàsica com per a aplicacions industrials. Pel fet d'ésser microorganismes unicel·lulars, moltes de les manipulacions aplicades en procariotes poden ésser ràpidament aplicades als llevats. Una velocitat de creixement ràpida, el fet que puguin assolir densitats òptiques relativament elevades i créixer en medis definits senzills, ésser transformats amb una àmplia diversitat de plasmidis integradors o auto-replicatius i que darrerament s'hagin desenvolupat moltes tècniques a nivell genètic i bioquímic per a ésser aplicades als llevats, són factors que han contribuït de manera clara a estendre l'ús dels llevats com a hoste per a l'expressió de proteïnes recombinants. A diferència dels bacteris, els llevats, pel fet d'ésser organismes eucariotes, posseeixen bona part de la complexitat biològica típica del organismes multicel·lulars, incloent-hi una organització intracel·lular altament compartimentalitzada i una via de secreció elaborada que fa de mitjancera en la secreció i modificació de moltes proteïnes hostes. La proteòlisi però, es converteix també en llevats, en un dels principals inconvenients per a

garantir l'estabilitat de les proteïnes heteròlogues que hom hi vulgui expressar. En aquest cas però, les proteases es troben en vacúols i poden tenir accés a les proteïnes en el citoplasma. Una alternativa és l'ús de mutants defectius en proteases i una altra opció és la secreció de les proteïnes a expressar al medi on s'han detectat nivells de proteases molt baixos.

Els sistemes d'expressió basats en línies de cèl·lules de mamífer estables o en baculovirus requereixen molt més temps que qualsevol dels altres sistemes descrits, encara que poden esdevenir tant o més eficients a l'hora d'aconseguir l'expressió d'un gen heteròleg. La manca d'una diversitat de vectors, la lentitud de creixement, el cost, entre potser altres factors, són les causes que l'ús de línies de cèl·lules de mamífer no estigui tant extès com els altres sistemes d'expressió.

I.C.2. Expressió de ribonucleases

Carsana i col., (1988) clonaren i analitzaren l'estructura del gen que codifica per la ribonucleasa de pàncreas boví o RNAasa A. La regió codificadora no conté introns i està precedida per una regió de 735 nucleòtids on es troben les caixes CAAT i TATA, que podrien actuar d'element reguladors. L'estructura del gen suggereix que la seqüència codificadora per a la RNAasa A s'expressa sota el control de dos promotors diferents. L'estudi de l'expressió del gen en diferents teixits bovins indica que la majoria de teixits sintetitzen, a diferents nivells, el mRNA corresponent a la RNAasa A (Confalone i col., 1989). També s'observa en altres RNAases pancreàtiques de mamífer, a diferència de la majoria d'enzims pancreàtics, l'expressió en el pàncreas i a més a més en altres teixits (Beintema i col., 1988c).

En els teixits bovins s'han aïllat 2 gens amb un elevat grau d'homologia amb el gen per a la RNAasa A: el gen de la ribonucleasa seminal bovina, i el gen de la ribonucleasa de cervell. Aquests gens s'haurien originat per duplicació en organismes avantpassats dels remugants (Beintema i col., 1988c). Sasso i col., (1991) clonaren i seqüenciaren el gen que codifica per la RNAasa de cervell i Palmieri i col., (1985) i Preuss i col., (1990) analitzaren el cDNA corresponent a la RNAasa seminal bovina.

El 1992, Haugg i Schein, publicaven part de la seqüència corresponent al gen de la ribonucleasa de tipus secretori de pàncreas humana, la qual codificava per una seqüència proteica idèntica a la publicada per Beintema i col., (1984). En humans, Breukelman i col., (1993) demostraren, mitjançant transferència de tipus Southern, que només existeix un únic gen per a la RNAasa de tipus secretori i Fernández i col., (1994) en estudis basats en transferència tipus Northern, observaren la presència, a diferents nivells, del transcrit de la ribonucleasa de tipus secretori en diferents teixits.

I.C.2.a. EXPRESSIÓ DE LES RIBONUCLEASES EN PROCARIOTES

L'expressió de ribonucleases en sistemes procariotes va plantejar de bon començament certa dificultat, principalment per la seva potencial activitat citotòxica per a les cèl.lules transformades. Aquest fet va limitar els estudis funcionals i estructurals d'un dels enzims dels quals es disposava de més informació. La comprovació d'algunes de les hipòtesis sobre la participació de determinats residus aminoacídics en la catàlisi, interacció del substrat o processos de plegament, no ha estat possible fins que no s'han obtingut sistemes de clonatge i expressió de les ribonucleases escaients. La majoria d'estudis, així com d'intents d'expressió, s'han dut a terme amb la ribonucleasa de pàncreas boví o RNAasa A.

Expressió de la ribonucleasa de pàncreas boví (RNAasa A)

Nambiar i col. (1984) sintetitzaren el primer gen sintètic per a la proteïna S de la RNAasa A. La proteïna S que correspon als residus 21-124 de la RNAasa A, és una fracció inactiva i es va expressar en *E. coli*. El gen es va dissenyar de forma que incorporava 25 sets específics de restricció, permetent una obtenció fàcil de variants mutants de l'enzim. El disseny dirigit de gens sintètics, com ja s'ha comentat anteriorment, facilita la seva utilització posterior per tècniques de mutagènesi modular (Presnell i Benner, 1988). Posteriorment, Nambiar i col., (1987) expressaren en *E. coli* un gen sintètic per a la RNAasa A com a proteïna de fusió associada a la β -galactosidasa. La RNAasa A es va clonar darrera de la seqüència corresponent a la β -galactosidasa mitjançant la inserció d'un conector o adaptador. La digestió amb el factor Xa permetia escindir la RNAasa A de la β -galactosidasa. L'expressió com a proteïna de fusió reduïa la degradació intracel.lular per proteòlisi i evitava la seva activitat citotòxica. Aquest mètode presentava com a inconvenients principals rendiments molt baixos (aproximadament 200 μ g/l cultiu) i el fet que la proteïna de fusió expressada representava només un 1% del total de la proteïna de la cèl.lula. El rendiment final després de la digestió amb el factor Xa i dels processos de renaturalització i purificació era d'un 20%. El segon inconvenient era que la proteïna s'expressava en forma insoluble.

Posteriorment, Mc Geehan i Benner (1989) clonaren el mateix gen sintètic per a la RNAasa A (Nambiar i col., 1987) darrera del promotor λ controlat per un repressor sensible a la temperatura. La inducció es realitzava en un curt interval de temps augmentant la temperatura del cultiu a 42°C durant uns 30 min. El rendiment d'aquest mètode era superior a l'anterior (aproximadament 2 mg/l de cultiu) però tenia com a principals desavantatges que la proteïna expressada es trobava en cossos d'inclusió en forma insoluble i per tant s'havia de renaturalitzar i que en l'extrem N-terminal s'hi trobava un residu de formilmetionina.

Trautwein i Benner (1991) optimitzaren el protocol anterior obtenint rendiments de 5-15 mg/l de cultiu i de 2-3 mg/l quan s'utilitzava el medi de cultiu mínim M9. Aquest mètode permetia expressar la proteïna en un medi ^{15}N -M9, utilitzant com a única font de nitrogen $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. D'aquesta manera la proteïna podia incorporar aminoàcids marcats amb ^{15}N i podia estudiar-se per ^3D -r.m.n. A partir del mètode descrit per Mc Geehan i Benner (1989), els nivells d'expressió s'incrementaren mitjançant dues estratègies, utilitzant la soca *lon* - d'*E. coli*, soca deficitària en la proteasa La i eliminant la diana de restricció *Not* I (GCG GCC) en la regió N-terminal (codons núm. 4 i 5). A partir de l'estudi de predicció de l'estructura secundària del mRNA s'observà que es produïa un aparellament estable entre la seqüència GCG GCC i la seqüència Shine-Dalgarno i regió d'inici de la traducció. La substitució pels codons GCA GCA impedia aquest teòric aparellament i havia de permetre que la seqüència Shine-Dalgarno es trobés accessible.

El mateix equip investigador va intentar desenvolupar un sistema de secreció en *E. coli* utilitzant la seqüència senyal OmpA i una seqüència senyal sintètica corresponent al pèptid senyal per a la β -lactamasa, obtenint un rendiment màxim de 100 $\mu\text{g/l}$ de cultiu (Presnell i Benner, 1988).

Tarragona-Fiol, i col. (1992) expressaren la RNAasa A darrera de la seva seqüència senyal a partir del cDNA en *E. coli*, sota el control del promotor *tac* en un sistema bi-cistrònic. Varen inserir una seqüència que codifica per un hexapèptid davant de l'extrem 5' de la pre-RNAasa A, per tal de minimitzar la formació d'estructures secundàries del mRNA. El sistema produïa la proteïna activa secretada a l'espai periplasmàtic amb un rendiment considerablement baix (0,1 mg/l de cultiu).

Schultz i Baldwin (1992) expressaren un gen sintètic per a la RNAasa A en *E. coli* utilitzant el sistema d'expressió de la T7 RNA polimerasa, obtenint la proteïna amb un residu metionina addicional en l'extrem N-terminal.

Laity i col., (1993) desenvoluparen un nou mètode d'expressió en *E. coli* de la RNAasa A com a proteïna de fusió, utilitzant el sistema d'expressió de la T7 RNA polimerasa. La proteïna expressada s'acumula a nivell intracel·lular en cossos d'inclusió. Per evitar l'agregació de la proteïna, es bloquegen els residus cisteïna per obtenció de la forma sulfonada. La RNAasa A s'escindeix amb el factor Xa, s'aïlla inicialment en forma soluble desplegada (forma sulfonada) i es renaturalitza. El rendiment final, després del procés de purificació i replegament de la proteïna, és de 3-5 mg/l de cultiu.

Vasanthi i Filpula (1989) varen descriure un sistema d'expressió de la RNAasa A en *Bacillus subtilis*, utilitzant el promotor i la seqüència senyal del gen *apr[BamP]* d'una proteasa alcalina de *B. subtilis*. Van obtenir un gen de fusió per inserció d'un gen sintètic per a la RNAasa A darrera de la proteasa alcalina. Aquest mètode permetia l'obtenció de 1-5 mg de proteïna secretada per litre de

medi de cultiu. El sistema determinava la secreció extracel·lular d'enzim actiu al medi de cultiu, amb la seqüència N-terminal correctament processada. L'acumulació de proteïna expressada en el medi de cultiu es veia limitada, però, per nivells alts de proteòlisi.

Expressió de la RNAasa pancreàtica de ratolí:

Schein i col. (1992) desenvoluparen un sistema d'expressió en *E. coli* per a la secreció de la RNAasa pancreàtica de ratolí utilitzant la seva pròpia seqüència senyal. Es va aïllar un cDNA de seqüència idèntica a la corresponent a la RNAasa pancreàtica de ratolí d'una llibreria de melsa de ratolí (Haugg i col., 1990). Aquesta seqüència codificava per una proteïna idèntica a la RNAasa pancreàtica de ratolí (Schüller i col., 1990). El cDNA de la RNAasa pancreàtica de ratolí es va clonar darrera del promotor *trp* de *E. coli*. El gen es va expressar en la sòca *lon-htpr* i es va obtenir la secreció al medi d'aproximadament 1 mg de RNAasa activa per litre de cultiu.

Expressió de la RNAasa seminal bovina:

La RNAasa seminal bovina s'ha expressat en un sistema eucariota en cèl·lules d'ovari de hamster xinès en la seva forma soluble però amb rendiments inferiors a 0,5 mg/l de cultiu (Russo i col., 1993), i en *E. coli* sota el control del promotor de la RNA polimerasa de T7 (de Nigris i col., 1993; Kim i Raines, 1993), obtenint la proteïna insoluble en cossos d'inclusió amb rendiments superiors (50-100 mg/l).

Expressió de la RNAasa T₁:

Per a l'expressió de la RNAasa T₁, d'*Aspergillus oryzae*, s'han desenvolupat diverses metodologies en *E. coli*. Quaas i col., (1988) expressaren un gen sintètic per a la RNAasa T₁ en *E. coli* utilitzant un vector de secreció amb la seqüència codificadora pel pèptid senyal corresponent a la proteïna OmpA. La RNAasa T₁ se secretava a l'espai periplasmàtic amb un rendiment final, després del procés de purificació, de 20 mg/l de cultiu. La ribonucleasa secretada presentava però, 4 aminoàcids addicionals en l'extrem N-terminal. Steyaert i col. (1990) adaptaren el protocol clonant el mateix gen sintètic darrera la seqüència del pèptid senyal de secreció del gen de la fosfatasa alcalina d'*E. coli* *phoA* i el promotor *tac*, obtenint amb rendiments similars la secreció de la proteïna a l'espai periplasmàtic amb l'extrem N-terminal correctament processat.

Fujimura i col. (1990) clonaren un gen sintètic per a la RNAasa T₁ darrera de la seqüència corresponent al pèptid senyal per la fosfatasa alcalina d'*E. coli* sota el control del promotor del triptòfan *trp*. La proteïna se secretava a l'espai periplasmàtic amb l'extrem N-terminal correctament escindit, amb un rendiment de 1,8 mg/l de cultiu.

Expressió de la barnasa:

La barnasa, RNAasa extracel·lular de *Bacillus amyloliquefaciens*, es va expressar en *E. coli* en forma inactiva a fi d'eliminar la seva activitat citotòxica. Paddon i Hartley (1987) expressaren mutants inactius de la barnasa en *E. coli* darrera del promotor i seqüència senyal de la fosfatasa alcalina d'*E. coli* (*phoA*). Hartley (1988) va eliminar els efectes letals de la proteïna clonant l'inhibidor de la barnasa (barstar) en el mateix plasmidi, darrera de la seqüència senyal *phoA*, obtenint la secreció de fins a 100 mg/l de cultiu.

Expressió de l'angiogenina:

L'angiogenina es va expressar en *E. coli* a partir d'un gen sintètic i sota el control del promotor *trp*. La proteïna es va obtenir en forma insoluble i amb una metionina addicional en l'extrem N-terminal, amb rendiment de 2 mg/l de cultiu. Mitjançant un tractament amb l'aminopeptidasa d'*Aeromonas* es va eliminar el residu Met(-1) (Shapiro i col., 1988).

Expressió d'altres ribonucleases:

A més a més de les descrites hi ha altres ribonucleases que s'han aconseguit clonar o expressar en procarotes com ara la RNAasa I (Zhu i col., 1990), la RNAasa II (Zilhao i col., 1993) i la RNAasa III (Chen i col., 1990) d'*E. coli*, la RNAasa H de *Thermus thermophilus* HB8 (Itaya i Kondo, 1991) la qual s'ha vist que pot reemplaçar la RNAasa H d'*E. coli*, la transcriptasa inversa de HIV-1 (D'aquila i Summers, 1989) que s'ha aconseguit expressar a nivells elevats en *E. coli* i s'ha vist que presenta tant activitat DNA polimerasa dependent de RNA, com activitat ribonucleasa idèntica a la RNAasa H d'*E. coli*. També s'ha aconseguit clonar el cDNA i expressar en *E. coli* la RNAasa PL3 (Vicentini i col., 1994), una de les ribonucleases de fetge de porc que presenta un 90% d'identitat amb la RNAasa 4 aïllada de sèrum humà (Zhou i Strydom, 1993).

I.C.2.a. EXPRESSIÓ DE LES RIBONUCLEASES EN EUCARIOTES

El 1989 Raines i Rutter, clonaren el cDNA de la RNAasa A darrera la seqüència codificant pel pèptid senyal del factor α de *Saccharomyces cerevisiae*, sota el control del promotor *PHO5* i la seqüència de finalització de transcripció corresponent al gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH). Amb aquest sistema s'obtenia la secreció d'aproximadament 2 mg de RNAasa A activa per litre de cultiu.

Russo i col., (1993) publicaren l'expressió de la ribonucleasa pancreàtica humana en cèl·lules d'ovari d'hàmmster xinès (cèl·lules CHO), per a la qual havien clonat un gen sintètic darrera el

promotor hMTIIA. Emprant aquest sistema obtenien dues fraccions anomenades P1 i P2, la primera d'elles glicosilada, en una relació 1:1 i amb un rendiment global de 3 mg/ml.

Altres ribonucleases expressades en eucariotes són les S-RNAases de *Petunia inflata* (Mu i Kao, 1992) produïdes en el sistema d'expressió de cèl·lules d'insecte anomenat baculovirus, i la RNAasa dependent de 2', 5'-oligoadenina (Zhou i col., 1993) estudiada en cèl·lules de mamífer, i de la qual s'ha determinat una elevada homologia amb la RNAasa E d'*E.coli* implicada en el control de l'estabilitat de mRNAs.

I.D. OBJECTIUS

A final dels anys setanta, es va produir un creixement de l'interés per les ribonucleases humanes, estimulat per la voluntat de determinar l'origen de les formes presents en els fluids biològics i la possibilitat que aquestes poguessin ésser utilitzades com a marcadors sèrics de diferents disfuncions orgàniques en especial les d'origen pancreàtic.

Altrament, les ribonucleases han estat objecte de multitud d'estudis sobre l'estructura i el mecanisme de catàlisi i de la seva interacció amb el seu substrat el RNA. Especialment els estudis de la relació estructura-funció efectuats amb la ribonucleasa de pàncreas boví representen un model de referència per a la comprensió de com els enzims interaccionen amb els seus substrats polimèrics.

El nostre grup de treball està interessat en ambdós aspectes. D'una banda, aportar dades sobre la relació estructura-funció de les ribonucleases, centrant-se en la ribonucleasa de pàncreas humà i de l'altra, basant-se en les dades obtingudes en la recerca anterior, estudiar la possibilitat d'utilitzar la ribonucleasa de pàncreas humà com a marcador de les disfuncions pancreàtiques.

Per això l'objectiu general d'aquesta tesi es centrava en la caracterització de la ribonucleasa de pàncreas humà a nivell glucídic, continuant els estudis iniciats per Osset (1991), i l'obtenció de mostra per a garantir proteïna suficient com per a dur a terme els estudis esmentats.

Els objectius concrets que es proposaren per a la realització d'aquest treball foren:

- Establiment d'un sistema de purificació de la ribonucleasa pancreàtica humana que fos ràpid, sensible i repetitiu i permetés la conservació de l'heterogeneïtat glucídica per a la seva posterior caracterització.
- Disseny i construcció d'un gen sintètic codificant per a la ribonucleasa pancreàtica humana.
- Clonatge del gen en vectors escaients i expressió del mateix.

- Desenvolupar els protocols de purificació de la ribonucleasa pancreàtica humana recombinant i caracterització posterior d'aquesta.

L'assoliment d'aquests objectius havia de permetre introduir i posar a punt, en el nostre grup, la metodologia del DNA recombinant i constituir un punt de partida per a una línia de recerca molt més oberta de la ribonucleasa de pàncreas humà que compregués la manipulació de determinades propietats enzimàtiques mitjançant les tècniques de mutagènesi dirigida i enginyeria de proteïnes, estudis estructurals i del mecanisme catalític, així com d'aspectes relacionats amb el seu plegament.

MATERIAL I MÈTODES

II.A. EQUIPAMENT I PRODUCTES QUÍMICS EN GENERAL

II.A.1. Equipament

Durant la realització d'aquest treball s'ha emprat l'equipament que a continuació es detalla. Els aparells utilitzats només en el cas d'una tècnica puntual es citaran en l'apartat en el qual es descriu aquesta tècnica.

- Agitador vortex Heidolph (RFA), model Top-mix 94323.
- Aparell d'ultrafiltració d'aigua Millipore (EEUU), model Milli-Q plus.
- Autoclau Matachana (Espanya) model 140L2.
- Balances Sartorius (RFA) models R200D i PTI200.
- Banyos termostàtics Heron (RFA), model Kotterman i Huber (RFA), model Polystat.
- Bany termostàtic circulat LKB (Suècia), model 2219 Multitemp II.
- Bloc termostàtic Bioblock (França), model 92617.
- Cabina de flux laminar Telstar (Espanya), model CAM-1400-1.
- Càmera fotogràfica Polaroid (EEUU), model MP-4.
- Centrifugues Sorvall (EEUU), model RC5C i Heraeus (EEUU) model Christ Minifugue T.
- Congeladors -20°C Liebherr (RFA) i Philips (RFA) i de -80°C Forma Bio-Freezer.
- Comptador portàtil Geiger Mini-Instruments Ltd (EEUU), model 5-10x.
- Destil·lador d'aigua Millipore Milli-RO 15 (EEUU).
- Espectrofotòmetre Beckmann (EEUU), model DU-70.
- Estufa de cultiu Memmert (RFA).
- Estufa d'assecat Heraeus (EEUU).
- Fonts d'alimentació per a electroforesi Atom (Espanya), model 502 i Isco (Espanya), model 453.
- Incubadors d'aire amb agitació New Brunswick (EEUU), model G24 ; i Braun Biotech (RFA), model Centromat™.
- Làmpada de llum ultraviolada Atom (Espanya), model 70.
- Liofilitzador Telstar.
- Minifugues Sorvall (EEUU), model microspin 24, MSE (EEUU), model Microcentaur, i Eppendorf (EEUU).
- pH-metre Radiometer (Dinamarca), model PHM83.
- Rotovapor (centrifuga de buit) Uniscience (Anglaterra), model Univap.
- Transil·luminadors de llum ultraviolada Ultra-Violet Products (EEUU), model TM-36 i Spectroline (EEUU), model TC-365A.

II.A.2. Productes químics

Els productes químics d'ús general han estat reactius de grau analític procedents de les cases Fluka (Suïssa), Merck (RFA), Serva (RFA) i Sigma Chemical Co. (EEUU). La procedència dels productes d'ús més específic s'indicarà quan aquests apareguin en el text.

II.B. MATERIAL BIOLÒGIC I MEDIS DE CULTIU

II.B.1. Microorganismes

Durant aquest treball s'han emprat les soques següents:

Escherichia coli soca **TG1** (Gibson, 1984). El genotip d'aquesta soca és el següent:

thr, hsd D5, sup E, Δ(lac-pro AB) / F' [tra D36, pro A⁺, proB⁺, lac I^q lac ZΔM15].

Aquesta soca subministrada per Amersham Ltd. (Anglaterra), fou utilitzada durant tot el treball com a hoste dels vectors derivats de M13 així com dels vectors plasmídics pTZ19U i YEpWL, i els seus derivats en les diverses manipulacions gèniques.

Escherichia coli soca **MC1061** (Casadaban i Cohen, 1980). El genotip d'aquesta soca és el següent:

hsd R2, hsd M⁺, hsd S⁺, ara D139, Δ(ara-leu) 7697, Δ(lac)X47, gal E15, gal K16, rps L (Str^r), Mcr A, Mcr B1

Aquesta soca s'utilitzà per a l'expressió de la HPRNAasa en cèl.lules transformades amb el vector pN111ompA1.HPR.

Escherichia coli soca **XL1-Blue** (Bullock i col., 1987) amb el genotip que es detalla a continuació:

rec A1, end A1, gyr A96, thi -1, hsd R17, sup E44, rel A1, lac, [F' pro AB, lacI^q ZΔM 15, Tn 10 (tetr)

La soca XL1-Blue s'emprà durant aquest treball per a la propagació i manipulació dels vectors pET17b(+) i pET22b(+), així com la dels seus derivats.

La soca d'*Escherichia coli* **BL21(DE3)** (Studier i col, 1990) presenta el següent genotip:

F⁻, ompT, r B⁻, m B⁻ (DE3)

Aquesta soca fou utilitzada per l'expressió de HPRNAasa recombinant. Presenta la particularitat que en el gen *int* del genoma bacterià s'hi ha insertat el bacteriòfag DE3 derivat del fag λ. Com que el gen *int* està inactivat, el DE3 derivat del fag λ, que és portador de la regió d'immunitat del fag 21, duu un fragment de DNA que conté el gen *lacI*, el promotor *lac UV5*, l'inici del gen *lac Z* i el gen per la RNA polimerasa de T7, necessita un helper tant per la integració com per l'excisió del genoma. Un cop s'ha format un lisogen DE3 l'únic promotor conegut per dirigir la transcripció del gen de la T7 RNA polimerasa és el promotor *lacUV5*, el qual és induïble per IPTG. L'addició d'aquest inductor a un cultiu de BL21(DE3) genera la síntesi de T7 RNA polimerasa la qual és capaç de transcriure el DNA d'un vector portador del promotor que reconeix aquesta polimerasa.

La soca de *Saccharomyces cerevisiae* **BJ2168** [MAT a, *prc1-407, prb1-1122, pep4-3, leu 2, trp1, ura3-52*], s'ha utilitzat com a hoste per a l'expressió de la HPRNAasa recombinant. Aquesta soca presenta tres marcadors de selecció per auxotrofia: leucina, triptòfan i uracil. A més a més, és una

soca deficient en proteases, la qual cosa pot ser un factor que jugui a favor de l'expressió d'una determinada proteïna.

II.B.2. Plasmidis

Com a vector inicial de clonatge del gen sintètic de la ribonucleasa de pàncreas humana en *E. coli*, es feu servir el fagèmid **pTZ19U** de 2.863 pb pertanyent al sistema de vectors Genescribe-Z™ de U. S. B. (Cleveland, EEUU). Aquest vector com els altres del mateix sistema, conté un gen de la beta-lactamasa (nucleòtids 1063-1923) que permet una selecció positiva del plasmidi, un origen de replicació plasmídic d'elevat número de còpia, una regió de clonat múltiple que conté tretze dianes de restricció úniques i el gen lacZ' el qual permet la selecció de putatius recombinants positius de forma visual. El gen lacZ' és un fragment de l'operó lac d'*E. coli* que codifica per un fragment de 146 residus de l'extrem N-terminal de la β -galactosidasa. Aquest fragment, la síntesi del qual pot ser induïda per isopropiltio- β -D-galactosidasa (IPTG), possibilita la complementació intra-al·lèlica (α) amb una forma defectiva de la β -galactosidasa codificada per la cèl·lula hoste. Les cèl·lules exposades a l'inductor gratuït, IPTG, sintetitzen ambdós fragments de l'enzim i formen colònies blaves quan se sembren en un medi que conté el substrat cromogènic 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosidasa (X-Gal). La inserció de DNA forani en la seqüència amb múltiples dianes de clonatge del vector inactiva el fragment N-terminal de la β -galactosidasa, abolint la α -complementació. D'aquesta manera, les cèl·lules portadores de plasmidis recombinants donen lloc a colònies blanques. A més a més, el fagèmid pTZ19U conté la regió intragènica (origen de replicació) del fag filamentós f1, orientada en el sentit U (nucleòtids 476-931) la qual cosa permet la replicació com partícules fàgiques de cadena senzilla i un promotor fort de la RNA polimerasa de T7 el qual inicia la transcripció entre els 2-4 nucleòtids de la primera diana de restricció en la regió de clonat. Aquesta darrera característica permet la transcripció en RNA del DNA forani, en presència dels precursors ribonucleòtids i la RNA polimerasa adequada, podent-se utilitzar per l'obtenció de sondes o la traducció "in vitro".

Per a la seqüenciació i reaccions de mutagènesi dirigida del gen sintètic de la HPR, es va emprar el vector **M13mp19** (Yanisch-Perron i col., 1985). Aquest és un vector derivat del bacteriòfag filamentós salvatge M13. A més a més dels gens de M13, posseeix el gen del polipeptid alfa que complementa l'activitat β -galactosidasa. El tamany d'aquest vector és de 7.250 pb i és portador d'un fragment amb diverses dianes de restricció úniques situat a partir de la posició 6231 pb, just entre els codons que codifiquen per al 6è i 7è residus del pèptid alfa. Tanmateix, qualsevol inserció en l'esmentat fragment de clonatge múltiple és capaç d'interrompre l'expressió correcta d'aquest pèptid i per tant desfer la possibilitat de complementació.

El vector utilitzat per a l'expressió en llevat ha estat el plasmidi **YEplW**. El plasmidi YEplW és un vector llançadera dissenyat per facilitar les manipulacions requerides en enginyeria genètica i que fou construït en el laboratori del Dr. Ronald T. Raines a Madison, Universitat de Wisconsin, EEUU (del Cardayré i col., 1994). El plasmidi, que pertany a la família dels vectors episomals de llevat (Yeast episomal plasmids), és portador

Material i Mètodes

de regions suficients per a la replicació (ori) i empaquetament com un fagèmid de cadena senzilla (f1) en *E.coli*, i per la replicació en soques [cir⁺] de *S.cerevisiae* (2μ). Cèl·lules competents d'*E.coli* transformades amb YEpWL poden ésser seleccionades per resistència a ampicil.lina (Ap^r). Quan es transforma *S.cerevisiae* amb el vector YEpWL, es pot seleccionar per la recuperació de la prototrofia per triptòfan (TRP1) i/o leucina (LEU2-d). La presència d'aquests dos gens de *S.cerevisiae* facilita la transformació perquè una única còpia del gen TRP1 és suficient per conferir la prototrofia per triptòfan, mentre calen un número de còpies elevat per conferir la prototrofia per leucina, atès que el gen LEU2-d es troba escapçat en 5' (Erhart i col., 1983). La inserció d'un gen en el marc de lectura, entre les dianes de restricció *Kpn* I i *Sal* I de YEpWL, dona com a resultat la producció d'una proteïna fusionada al pèptid líder del factor α de 85 residus, el qual possibilita que la proteïna madura sigui secretada al medi (Fuller i col., 1989). La producció de proteïnes de fusió de YEpWL es troba sota el control transcripcional del promotor híbrid ADH2-GAPDH (Cousens i col., 1987), el qual és desreprimint per la reducció de fonts de carboni fermentables en el medi, i pel finalitzador GAPDH (De Baetselier i col., 1991).

Com a primer intent de l'expressió de la HPRNAasa en procarïotes es va fer servir el plasmidi **pIN11ompA1**, de 7.250 pb. Aquest plasmidi pertany a una família de vectors, els pIN11ompA (Ghrayeb i col., 1984), que posseeixen un gen de resistència a l'ampicil.lina, el gen del repressor *lacI*, un origen de replicació del tipus ColE1 i un promotor *lpp-lacZpo*, el qual és induïble per IPTG. El promotor esmentat controla l'expressió de la seqüència senyal ompA, constituïda per 63 pb i que codifica per un pèptid senyal d'exportació. Darrera d'aquesta seqüència es poden inserir els gens foranis, quedant les proteïnes per les quals codifiquen fusionades al pèptid senyal ompA. Els tres vectors que constitueixen aquesta família, varien en el marc de lectura en el qual es troben les tres dianes de clonatge : *Eco* RI, *Bam* HI i *Hind* III

També per l'expressió de la HPRNAasa en *E.coli* s'han utilitzat els vectors **pET17b(+)** i **pET22b(+)**. Els vectors originals de la sèrie pET i les soques hostes adequades foren desenvolupades per Studier i col., (1986). La projecció d'aquest treball ha estat recollida en una excel·lent revisió dels mateixos autors (Studier i col., 1990). El vector pET22b(+) conté un origen de replicació d'*E.coli* (ori), un gen de resistència a l'ampicil.lina i un origen de replicació f1, el qual permet la producció de DNA plasmídic de cadena senzilla per infecció de soques hoste F amb la presència d'un fag de suport o "helper phage". El vector pET22b(+) conté un promotor del tipus T7/*lac*, la qual cosa significa que existeix un operador *lac* just darrera del promotor de la T7 RNA polimerasa. A més a més, el pET22b(+) és portador del promotor natural i de la seqüència codificant pel repressor *lac* (*lac I*), orientat en el sentit oposat al promotor T7/*lac*. Quan aquest vector s'utilitza en lisògens del tipus DE3 per l'expressió de gens foranis, el repressor *lac* actua tant sobre el promotor *lac*UV5 per reprimir la transcripció de la RNA polimerasa de T7 [apartat II.B.I], com per bloquejar la transcripció del gen forani per qualsevulla RNA polimerasa de T7 que es pugui trobar. En aquest punt, cal recordar l'enorme especificitat existent entre la RNA polimerasa de T7 i el promotor que aquesta reconeix. El sistema descrit serveix per a regular l'expressió de la seqüència senyal pelB de 63 pb que codifica per un pèptid senyal d'exportació. Darrera d'aquesta seqüència es poden inserir els gens foranis a través de les dianes *Msc* I i

Material i Mètodes

Nco I, produint-se la proteïna per la qual codifiquen fusionada al pèptid líder *pelB*. Aquest líder està dissenyat per exportar les proteïnes heteròlogues al periplasma de la cèl.lula bacteriana (Better i col., 1988). El vector també comprèn un terminador propi de la RNA polimerasa de T7, necessari per impedir la transcripció de tot el vector. Finalment, cal dir també que s'hi pot trobar un lloc de clonatge múltiple amb nou possibles dianes i que aquest sistema permet afegir una caixa de 6 histidines en l'extrem C-terminal, la qual cosa possibilita la purificació de la proteïna de fusió mitjançant una cromatografia d'afinitat amb metalls.

Pel que fa al vector **pET17b(+)**, la diferència principal respecte al pET22b(+), a efectes del que ens interessa per a aquest treball, rau en l'absència d'una seqüència senyal que pugui ésser reconeguda *in vivo*. Aquest vector doncs, s'ha utilitzat per intentar l'expressió citosòlica de la HPRNAasa.

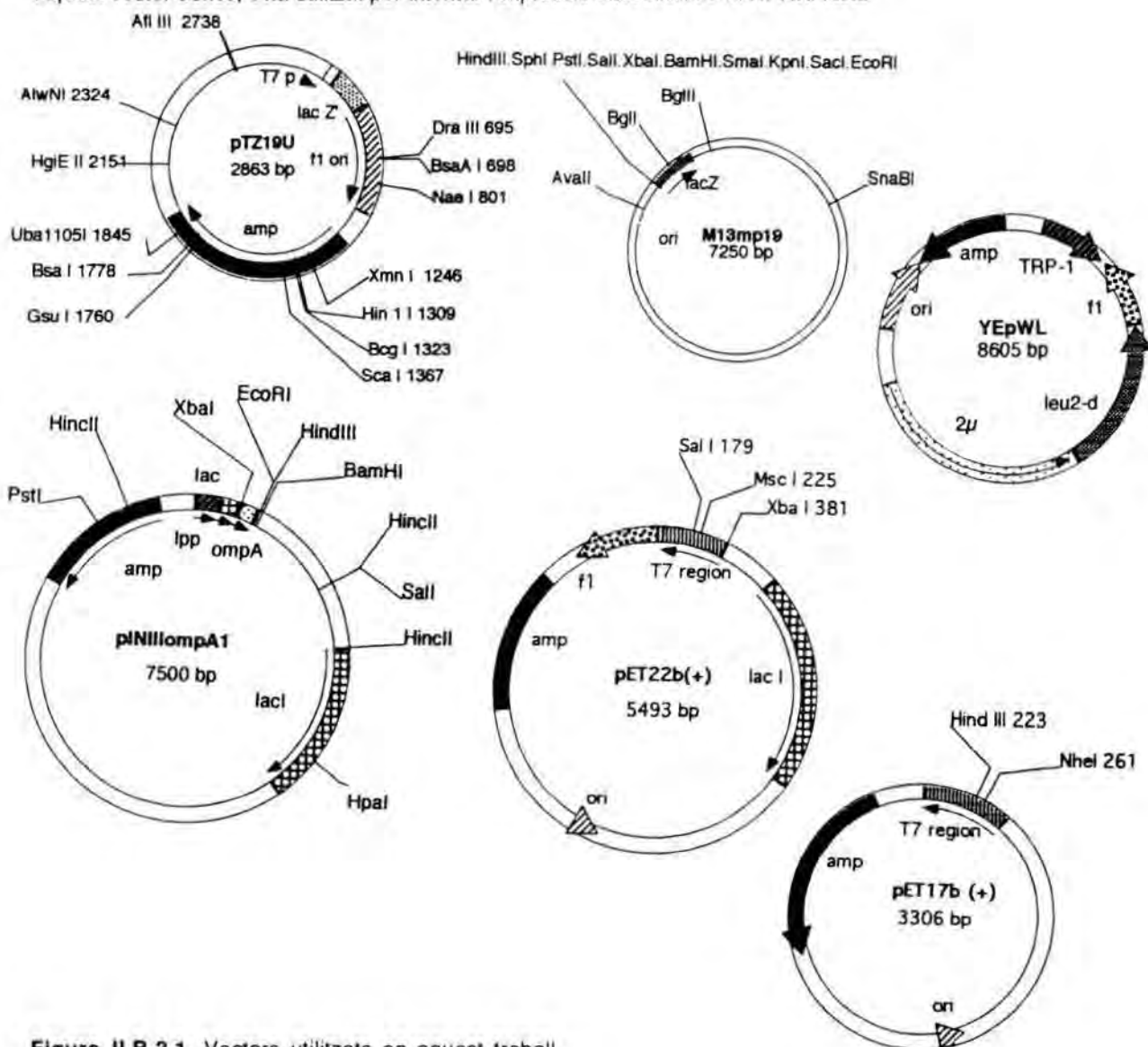


Figura II.B.2.1. Vectors utilitzats en aquest treball.

II.B.3. Medis de cultiu

Com a medis de cultiu pel creixement de les soques, s'han utilitzat els que es detallen a continuació. Els medis líquids s'han conservat a temperatura ambient, mentre els medis sòlids han estat guardats a 4°C en plaques de Petri.

Medi LB

El medi LB és un medi ric d'ús general. Durant aquest treball s'ha emprat pel cultiu de la soca d'*E.coli* TG1 com a tal i un cop transformada amb M13mp19 i els derivats obtinguts d'aquest, i també per la soca XL1-Blue com a tal i un cop transformada amb pET17b(+) i pET22b(+) en la manipulació i obtenció dels seus derivats

Composició per 1 litre de LB:

Bactotripton	10g
Extret de llevat	5g
NaCl	10g
Aigua destil.lada	1 l

Per a l'obtenció de medi sòlid per plaques de cultiu s'afegeixen 5g d'agar (1,5% final). En la selecció de transformants β -galactosidasa negatius, en els experiments de clonat en els vectors derivats de M13, s'utilitza el que s'anomena agar tou o de cobriment, pel qual cal afegir 7g d'agar (0,7% final). En tots els casos cal ajustar el pH a 7,5 amb NaOH i posteriorment s'esterilitza autoclavant a 120°C durant 20 minuts.

Medi mínim M9

El medi M9 és un medi mínim que s'ha utilitzat pel creixement i pel manteniment, durant períodes curts de temps, de la soca d'*E.coli* TG1.

Composició per 1 litre de M9:

Sals M9 x 5	200ml
MgSO ₄ 1M	2ml
CaCl ₂ 0,1M	1ml
Tiamina 1M	1ml
Glucosa 20%	10ml
Aigua destil.lada	1 l

Aquestes solucions s'esterilitzen per separat, autoclavant-se 20 minuts a 120°C, llevat de la solució de tiamina que s'esterilitza per filtració. Per a l'obtenció de medi sòlid per cultiu en placa, cal afegir 15g d'agar (1,5% final).

Material i Mètodes

Composició de les sals M9 x 5:

Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	32,3g
KH ₂ PO ₄	15g
NH ₄ Cl	5g
NaCl	2,5g
Aigua destil.lada	1 l

Un cop barrejades totes les sals s'ajusta el pH a 7,4 i s'esterilitza autoclavant-se 20 minuts a 120 °C.

Medi M9CAS

Aquest medi s'empra pel cultiu de la soca MC1061 portadora del vector pN111ompA i els derivats. La composició d'aquest medi és idèntica a la del M9 amb la particularitat que es suplementa amb casaminoàcids a una concentració final del 0,2% (p/v). Per això es prepara una solució de casaminoàcids al 20 %, s'autoclava a 120 °C durant 20 min i d'aquesta solució s'afegeixen 10 ml per 1 litre de medi M9.

Medi TB

El medi TB (terrific broth) és un medi ric que s'ha utilitzat pels experiments d'expressió de la ribonucleasa de pàncreas humà recombinant en cultius d'*E. coli* BL21(DE3).

Composició per 1 litre de TB:

Bactotripton	12g
Extret de llevat	24g
Glicerol (80 %)	4 ml
Fosfat potàssic monobàsic	2,31g
Fosfat potàssic dibàsic	12,5g

La bactotripton i l'extret de llevat es dissolen en 900 ml i les sals en 100 ml d'aigua destil.lada. S'autoclaven per separat, la qual cosa també cal fer amb el glicerol, 20 minuts a 120°C. Un cop autoclavats tots tres components per separat es reuneixen en les concentracions esmentades conservant les condicions d'esterilitat necessàries.

Addició d'antibiòtics als medis de cultiu

En cultivar soques transformades amb vectors, els medis de cultiu s'han de suplementar amb els antibiòtics per als quals confereixen resistència, amb l'objectiu que la soca no perdi el vector. Per això es prepara per separat i de forma estèril una solució mare o d'emmagatzament. Durant aquest treball s'ha utilitzat únicament l'antibiòtic ampicil.lina.

Material i Mètodes

Ampicil·lina (Ap): La solució d'emmagatzament és de 25 mg/ml en aigua destil·lada. Un cop preparada s'esterilitza per filtració i es guarda a -20°C en al·iquotes. La concentració de treball en els diferents medis de cultiu és de 50µg/ml o bé 400 µg/ml.

Medi mínim per llevat : S4%D-trp i S4%D-leu

El medi mínim per llevat fou utilitzat per seleccionar la recuperació de prototrofia per triptòfan i/o leucina en cèl·lules de *S.cerevisiae* BJ2168 transformades amb YE_pWL, YE_pHPR.1 i YE_pHPR.2, així com pel creixement d'aquestes cèl·lules per l'expressió de la ribonucleasa de pàncreas humana recombinant de llevat.

Composició per 1 litre de medi mínim de llevat:

CM-trp / CM-leu*	1,30g
YNB-aa/as	1,36g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,00g
Glucosa 4% (p/v)	40,0g
Aigua destil·lada	1 litre

Per a l'obtenció de medi sòlid per cultiu en placa, cal afegir 20 g d'agar (2,0 % final). És convenient deixar assecar aquestes plaques 24 hores a temperatura ambient abans del seu ús.

Composició de CM-trp i CM-leu:

Sulfat d'adenina	1 g	Uracil	1 g
L-Trp	1 g	L-His	1 g
L-Arg	1 g	L-Met	1 g
L-Tyr	1,5 g	L-Leu	1 g
L-Ile	1,5 g	L-Lys	1,5 g
L-Phe	2,5 g	L-Glu	5,0 g
L-Asp	5,0 g	L-Val	7,5 g
L-Thr	10,0 g	L-Ser	18,75 g

Segons si el medi ha de ser deficient en triptòfan o leucina es deixa d'afegir l'un o l'altra. D'aquesta pols d'aminoàcids se n'afegeix com s'ha descrit per 1 litre de medi mínim, 1,30 g abans d'autoclavar-lo.

Medi ric per llevat: YEPD (també anomenat YPD)

El medi ric per llevat s'ha utilitzat en aquest treball pel creixement de la soca de *S.cerevisiae* BJ2168, així com pel creixement de transformants per a l'expressió de ribonucleasa de pàncreas humana recombinant.

Material i Mètodes

Composició del medi YEPD per 1 litre:

Bactopeptona	20g
Extret de llevat	10g
Glucosa 2% (p/v)	20g
Aigua destil.lada	1litre

També en aquest cas, per a l'obtenció de medi sòlid per cultiu en placa cal afegir 20 g d'agar (2,0% final).

II.B.4. Manteniment de les soques

Pel manteniment a curt termini de les soques d'*E.coli* esmentades anteriorment, com a tals o bé portadores dels vectors originals i els seus derivats, s'han mantingut sembrades en plaques de Petri amb el medi adequat i guardades a 4°C. Per al seu manteniment a llarg termini s'han guardat en forma de glicerinat. El procés que s'ha seguit per a l'obtenció d'un glicerinat ha estat el següent:

1. Inocular una colònia de la soca desitjada en 3ml del medi de cultiu adequat.
2. Incubar a 37°C en agitació (250-300 r.p.m.) entre 12 i 18 hores.
3. Prendre una alíquota del cultiu, transferir-la a un tub i afegir 0,315 ml d'una solució de glicerol 87% esterilitzada per filtració (20% final).
4. Mesclar invertint el tub i desar a -80°C.

En el cas de la soca de llevat, així com dels clons portadors del vector original o els seus derivats, el criteri d'emmagatzament ha estat el mateix, amb la diferència que els glicerينات s'obtenen amb un 30% final de glicerol i els medis i els temps de creixement són els propis de llevat.

II.C. MÈTODES DE DNA

Els mètodes de DNA comprenen el conjunt de metodologies, tècniques i material que han estat utilitzats en aquest treball per la construcció, clonatge i anàlisi d'un gen sintètic que codifica per la ribonucleasa de pàncreas humana.

II.C.1. Mètodes generals de DNA recombinant

En aquest apartat es descriuen els mètodes generals emprats en l'obtenció i manipulació del DNA plasmídic. Si bé alguns dels protocols estan lleugerament modificats, en general, són els que es troben en els manuals de Sambrook i col., (1989) i Ausbel i col., (1989). Com a metodologia sistemàtica en els treballs amb DNA recombinant, cal fer esment de l'esterilitat del material i la cura de l'operador, per tal d'evitar la contaminació amb nucleases o amb altres vectors.

II.C.1.a. OBTENCIÓ DE DNA PLASMÍDIC

II.C.1.a.(1). Obtenció minipreparativa de DNA plasmídic a partir de cultius d'*E.coli*

Les anomenades minipreparacions de DNA plasmídic ens permeten obtenir de forma relativament ràpida, quantitats que oscil·len entre 5-10µg de DNA plasmídic. D'entre les diverses modalitats existents, en aquest treball s'ha utilitzat el procediment de la lisi alcalina que és una modificació dels mètodes de Birnboim i Doly (1979) i Ish-Horowicz i Burke (1981). El procediment seguit és el que es detalla a continuació:

1. Inocular una colònia de la soca desitjada, que ha estat prèviament transformada i sembrada en placa, en 3-5 ml de LB amb l'antibiòtic adequat. Incubar entre 12 i 15 hores a 37°C amb agitació a 250 r.p.m.
2. Distribuir el cultiu en tubs eppendorf, en al·lquotes de 1,5 ml. Centrifugar a 12.000 xg durant 5 minuts en una centrífuga de taula. Alternativament es poden realitzar diverses centrifugacions d'un mateix cultiu en un mateix tub, per tal d'acumular el vector en una única mostra (màxim 10 ml).
3. Eliminar el sobrenedant per aspiració i deixar el sediment format per les cèl·lules bacterianes el més sec possible.
4. Resuspendre el sediment en 100 µl de solució I agitant vigorosament en vòrtex. Mantenir 5 minuts en gel picat.
5. Afegir 200 µl de solució II acabada de preparar. Barrejar les fases que es formen invertint el tub ràpidament diverses vegades. És molt important no agitar amb el vòrtex. Mantenir en gel 5 minuts.
6. Afegir 150 µl de la solució III refredada a 4°C. Agitar amb vòrtex amb el tub invertit durant 20-30 segons. Mantenir el tub en gel durant 5 minuts.
7. Centrifugar a 12.000 xg (en minifuga) durant 15 minuts per aconseguir la formació d'un sediment sòlid. El sobrenedant es transfereix a un nou tub estèril, anant amb compte de no arrossegar part del sediment.
8. Afegir un volum igual de fenol:cloroform:alcohol isoamílic (25:24:1). Barrejar agitant en vòrtex fins formar una emulsió i centrifugar a 12.000 xg durant 2 minuts. Transferir la fase aquosa (superior) a un nou tub estèril.
9. Afegir-hi un volum igual de cloroform:alcohol isoamílic (24:1). Barrejar agitant amb vòrtex per a formar una emulsió. Centrifugar a 12.000 xg en minifuga durant 30 segons. Transferir la fase aquosa (superior) a un nou tub.
10. Precipitar el DNA plasmídic afegint-hi 2,5 volums d'etanol fred (-20°C). Mesciar agitant en vòrtex i guardar el tub a -20°C durant 15 minuts.
11. Centrifugar a 12.000 xg durant 10 minuts en minifuga.
12. Eliminar el sobrenedant per aspiració.
13. Afegir-hi 1 ml d'etanol 70% refredat prèviament a -20°C. Decantar 2-3 vegades el tub.
14. Centrifugar a 12.000 xg durant 5 minuts.
15. Eliminar el sobrenedant. Tornar a centrifugar a 12.000 xg en minifuga durant 5-10 segons per concentrar les restes de líquid. Eliminar per aspiració utilitzant la punta d'una pipeta pasteur.

Material i Mètodes

- Deixar assecat el sediment en un recipient connectat a una trampa de buit durant 2-3 minuts o bé posant el tub invertit sobre un paper en la taula i deixar assecat durant 5-10 minuts.
- La resuspensió del sediment es fa en volums variables (10-50 μ l) de TE o aigua destil·lada, en tots dos casos havent-los prèviament autoclavats. Agitar breument en vòrtex i escalfar 10 minuts a 70°C per tal d'eliminar possibles restes de nucleases i alhora facilitar la resuspensió del sediment. Si no està previst fer-ne un ús immediat és millor guardar el DNA a -20°C.

Solucions necessàries:

Solució I : S'autoclava a 120°C durant 20 minuts i s'emmagatzema a 4°C.

Glucosa	50 mM
Tris-HCl (pH8,0)	25 mM
EDTA (pH8,0)	10 mM

Solució II : La solució II cal preparar-la immediatament abans d'emprar-la, per la qual cosa es parteix d'una solució 2 N NaOH i d'una solució 10% SDS. Aquestes solucions no han d'estar imprescindiblement autoclavades.

NaOH	0,2 N
Dodecil sulfat sòdic (SDS)	1 %

Solució III : La solució resultant és 3 M respecte el potassi i 5 M respecte l'acetat. S'autoclava (20 minuts a 120°C) i es desa a 4°C.

Acetat potàssic 5 M	60 ml
Àcid acètic glacial	11,5 ml
Aigua destil·lada	28,5 ml

Solució fenol:cloroform:alcohol:isoamílic (25:24:1)

- Dissoldre 0,5 g de 8-hidroxiquinoleïna (agent antioxidant) en 500 ml de fenol redestil·lat.
- Afegir-hi 500 ml de Tris-HCl 500 mM (pH 8,0) i barrejar-ho en un embut de decantació. Deixar separar les fases.
- Recuperar la fase fenòlica i barrejar-la amb 500 ml de Tris-HCl 100 mM (pH 8,0). Deixar separar les fases. Recuperar totes dues fases i mesurar el pH de la fase aquosa.
- Repetir el procés del pas 3 fins que el pH de la fase aquosa sigui igual o superior a 7,6. Preferentment hauria de ser pH 8,0.
- Recuperar la fase fenòlica, afegir-hi uns 200 ml de Tris-HCl 100 mM (pH 8,0) i guardar-la a 4°C protegint-la de la llum.
- Preparar el cloroform:isoamílic barrejant 24 volums de cloroform amb 1 volum d'alcohol isoamílic.

7. Preparar el fenol:cloroform:isoamílic barrejant volums iguals de les solucions de fenol i cloroform:alcohol isoamílic preparades com s'ha explicat.

Solució TE

La solució TE és un amortidor d'ús general per la dissolució de DNA. La seva composició és 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA. Per a preparar-la es mescla 1 ml d'una solució 1 M Tris (pH 8,0) amb 0,4 ml d'una solució 0,25 M EDTA i enrasant amb aigua fins a 100 ml, autoclavant-se posteriorment. Cal comentar que l'ús de TE com a amortidor per la dissolució de DNA no ha estat, durant aquest treball, igualment reeixit en tots els casos. Per exemple, s'ha observat que quan s'havien de dur a terme digestions amb determinats enzims de restricció, l'ús de TE provocava talls de forma inespecífica o absència de digestió, la qual cosa podia observar-se electroforèticament amb l'aparició de llapissades o amb la no alteració del patró electroforètic respecte un control no sotmès a digestió.

El rendiment d'aquest mètode per l'extracció de plasmidis d'elevat número de còpia, com els emprats en aquest treball, és per terme mig d'uns 3-5 µg de DNA per ml de cultiu original. El DNA que s'ha obtingut per aquest procediment pot ésser emprat per a transformacions i digestions amb enzims de restricció, seguides d'electroforesi en gels d'agarosa analítica o preparativa. Atès que per aquest sistema no pot evitar-se la co-purificació de certa quantitat de RNA juntament amb el DNA plasmídic a l'hora de sotmetre'l a digestions amb enzims de restricció, és convenient afegir RNAasa per tal d'eliminar-lo.

Ocasionalment, per a l'obtenció de pTZ19U.HPR de cara a la seqüenciació, s'utilitzà com a mètode alternatiu per l'obtenció de DNA plasmídic, el sistema de purificació de DNA Magic Minipreps™ (Promega, Madison-WI, EEUU). Aquest sistema de purificació de DNA en petita escala, va proporcionar un mètode senzill i ràpid per l'aïllament de fins a 10 µg de DNA plasmídic, lliure d'extraccions orgàniques i precipitacions amb etanol i net de RNA o DNA genòmic.

II.C.1.a.(2). Obtenció preparativa de DNA plasmídic a partir de cultius d'*E.coli*

El protocol seguit per a l'obtenció de DNA plasmídic en grans quantitats està basat en el descrit a Promega ; *Protocols and Applications Guide* (1991) 2nd Edition, amb algunes modificacions. Aquest sistema permet obtenir entre 0,5 i 2,5 mg de DNA plasmídic.

1. Inocular una colònia d'una placa de la soca desitjada en 3 ml de LB (de forma alternativa es pot fer servir 2xTY) que contenen 50 µg/ml d'ampicil·lina. Fer créixer les cèl·lules a 37°C durant 8 hores en agitació a 250 r.p.m.
2. Afegir 2,5 ml del pre-inòcul a 250 ml del mateix medi. Deixar créixer les cèl·lules a 37°C entre 12 i 15 hores en agitació constant, a unes 250 r.p.m.
3. Centrifugar les cèl·lules a 5.000 xg i 4°C, durant 30 minuts.

4. Resuspendre el sediments de cèl.lules en 6 ml de Solució I de lisi freda (apartat II.C.1.a.(1)). Un cop ben resuspeses, deixar-les en gel picat durant 10 minuts.
5. Afegir 12 ml de la Solució II (apartat II.C.1.a.(1)) acabada de preparar. Invertir el tub amb cura i incubar en gel durant 10 minuts. És important no agitar amb vòrtex.
6. Addicionar 7,5 ml de Solució III (apartat II.C.1.a.(1)). Amb cura agitar lentament amb vòrtex i incubar en gel picat durant 20 minuts.
7. Centrifugar a 12.000 xg durant 15 minuts. Transferir el sobrenedant a un altre tub i descartar el precipitat.
8. Afegir RNAasa lliure de DNAasa a una concentració final de 20 µg/ml i incubar a 37°C durant 30 minuts.
9. Fer una extracció amb un volum de fenol:cloroform:isoamílic (25:24:1), agitant en vòrtex durant 1 minut i centrifugar durant 5 minuts a 12.000 xg
10. Repetir el pas 9
11. Transferir la fase aquosa a un altre tub i afegir un volum de cloroform:isoamílic (24:1), agitar en vòrtex i centrifugar com en el pas 9.
12. Transferir la fase aquosa a un tub estèril. Afegir 2,5 volums d'etanol i deixar a -70°C durant 30 minuts o bé tota la nit a -20°C. Centrifugar a 12.000 xg durant 20 minuts.
13. Extreure el sobrenedant i rentar el sediments amb 5 ml de 70% etanol i centrifugar durant 5 minuts a 12.000 xg.
14. Assecar al buit i dissoldre en un volum adequat d'aigua o TE.
15. Mesurar la quantitat de DNA i la seva qualitat mitjançant espectrofotometria. Es fa una lectura d'absorbància entre 320 i 220 nm prenent lectures puntualment, a 280, 260 i 230 nm [una $A_{260} = 1$, amb un pas de llum de 1 cm, equival a una concentració de DNA de doble cadena de 50 µg/ml; la relació A_{260}/A_{280} és d'aproximadament 1,8 en preparacions de DNA pur, mentre els valors superiors indiquen contaminació per RNA i valors inferiors contaminació per fenol o proteïna; una relació $A_{260}/A_{230} > 2.2$ indica un bon grau de desproteïnitació]. També és convenient digerir una alíquota amb algun enzim de restricció i analitzar el resultat conjuntament amb una mostra no digerida, per electroforesi en gels d'agarosa. Si la restricció fallés, i a més observéssim valors pel quocient A_{260}/A_{280} inferiors a 1,8, fóra convenient fer un tractament de la solució de DNA amb 1 volum de cloroform:isoamílic (24:1, v/v) i reprecipitar-lo amb 2,5 volums d'etanol en presència de 0,3 M acetat sòdic pH 5,0, ja que possiblement el DNA es troba contaminat amb sals o fenol.

II.C.1.a.(3). Obtenció de DNA plasmídic a partir de cultius de llevat

Aquest protocol s'utilitzà per recuperar el vector YEpHPR a partir de cultius de llevat amb la finalitat de comprovar que no s'hagués produït cap reordenació en la zona d'unió del pèptid senyal amb la HPRNAasa. La solució d'extracció del DNA plasmídic s'utilitzà per tornar a transformar cèl.lules competents d'*E.coli* i amplificar el DNA plasmídic. El protocol que s'utilitzà és el que es descriu a continuació:

Material i Mètodes

1. Es parteix de 10 ml de cultiu de la soca desitjada (*S.cerevisiae* BJ2168-[YEpHPR.1]), preferentment crescuda en medi mínim S4%D-leu per afavorir el manteniment del plasmidi, amb una D.O. a 600 nm de 1,0.
2. Recollir les cèl.lules centrifugant 5 minuts a 5000 r.p.m.
3. Resuspendre les cèl.lules amb 1 ml d'amortidor TE i passar-ho a un tub eppendorf.
3. Centrifugar en minifuga a velocitat màxima durant 10-15 segons i tornar a rentar el sediment cel.lular amb 1 ml d'amortidor TE.
4. Afegir al sediment cel.lular 0,25 ml de la solució d'extracció [50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA, 0,2 M NaCl, 0,2% (v/v) Tritó-X-100].
5. Addicionar-hi boles de vidre fins uns 2 mm per sota del menisc de la suspensió cel.lular.
6. Agitar vigorosament en vòrtex durant 90 segons.
7. Centrifugar 15 segons a velocitat màxima en microfuga i recollir el sobrenedant en un nou tub eppendorf estèril.
8. Afegir 0,2 ml d'amortidor TE.
9. Fer una extracció doble amb fenol:cloroform (1:1, v:v).
10. Tractament amb RNAasa A: S'afegeixen 5 µl d'una solució 10 mg/ml i s'incuba durant 30 minuts a 37°C.
11. Fer una extracció amb un volum igual de fenol.
12. Centrifugar 1 minut a velocitat màxima i recuperar el sobrenedant.
- 13 Fer una extracció amb un volum igual de cloroform:isoamílic (24:1, v:v).
14. Recuperar la fase aquosa per centrifugació 1 minut a velocitat màxima.
15. Precipitar el DNA amb 1/10 del volum d'acetat d'amoni 3 M i 2 volums d'etanol.
16. Deixar 30 minuts a -70°C.
17. Centrifugar 15 minuts a 12.000 xg i retirar el sobrenedant.
18. Rentar el sediment amb 1 ml d'etanol al 70%.
19. Centrifugar 5 minuts a 12.000 xg i retirar el sobrenedant.
20. Assecar el sediment i resuspendre en 20 µl d'aigua o amortidor TE.

Les solucions que s'han emprat per a l'extracció del DNA plasmídic a partir de cultius de llevat han estat les mateixes que les descrites i utilitzades en les extraccions de DNA plasmídic a partir de cultius d'*E.coli*.

II.C.1.b. MANIPULACIO ENZIMÀTICA DEL DNA

II.C.1.b. Tractament amb enzims de restricció

La tecnologia del DNA depèn actualment en gran mesura de la capacitat per tallar molècules de DNA per punts específics amb les endonucleases de restricció. Els enzims de restricció de tipus II reconeixen com a diana una seqüència concreta en una molècula de DNA de doble cadena i el digereixen en aquest punt per donar lloc a fragments de DNA de longitud i seqüència definides. Durant aquest treball s'han utilitzat aquest

Material i Mètodes

tipus d'enzim per obtenir fragments visualitzables en gels d'agarosa, els quals, així digerits, poden purificar-se i unir-se per donar lloc a molècules de DNA quimèriques.

L'activitat dels enzims de restricció es troba directament relacionada amb el pH, la força iònica i la temperatura a la qual la reacció es duu a terme. Els requeriments respecte als tres factors esmentats són variables dependent de l'enzim i les condicions a les quals aquest presenta el seu màxim d'activitat. Tant els enzims de restricció com els seus amortidors s'han guardat a -20°C.

Els enzims de restricció utilitzats es presenten a continuació, indicant-ne l'amortidor aconsellable i la casa comercial de la qual s'han obtingut:

<u>Enzim</u>	<u>Casa comercial</u>	<u>Amortidor</u>
<i>Kpn</i> I	Boehringer Mannheim	L
<i>Acc</i> 65 I	Promega	D
<i>Sal</i> I	Boehringer Mannheim	H
<i>Bam</i> H I	Promega	C
<i>Eco</i> R I	Boehringer Mannheim	H
<i>Xho</i> I	Promega	D
<i>Hind</i> III	Boehringer Mannheim	B
<i>Pst</i> I	Boehringer Mannheim	H
<i>Msc</i> I	New England Biolabs	4

Tot i que són subministrats en solucions concentrades 10x, a continuació s'especifica la concentració 1x:

Amortidor **L** de BM: 10 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM Ditioeritrol; pH 7,5

Amortidor **D** de P: 6 mM Tris-HCl; 6 mM MgCl₂; 150 mM NaCl; 1 mM DTT; pH 7,9

Amortidor **H** de BM: 50 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 1 mM Ditioeritrol; pH 7,5

Amortidor **C** de P: 10 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; 1 mM DTT; pH 7,9

Amortidor **B** de P: 6 mM Tris-HCl; 6 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; 1 mM DTT; pH 7,5

Amortidor **4** de NEB: 50 mM Acetat potàsic; 20 mM Tris acetat; 10 mM Acetat de magnesi; 1 mM DTT; pH 7,9.

En aquest treball s'ha comprovat que alguns amortidors, com per exemple el D de Promega i el H de Boehringer Mannheim, són intercanviables.

En les digestions, la quantitat de DNA que es va fer anar fou variable, entre 0,5 i 10 µg, dependent de si el propòsit de la digestió era analític o preparatiu, i de la mida esperada dels fragments.

Material i Mètodes

En qualsevol dels casos, el volum d'enzim de restricció addicionat a la reacció no fou mai superior al 10% del volum final de la digestió. Això és degut a què els enzims de restricció són subministrats en solucions al 50% de glicerol i per a molts d'ells, una concentració de glicerol superior al 5% en la barreja de reacció els fa perdre l'especificitat de reconeixement. Aquesta pèrdua d'especificitat es coneix amb el nom d'activitat estrella (star activity). Aquesta activitat inespecífica també es pot manifestar, si la concentració d'enzim respecte la de DNA és massa elevada (> 25 U activitat / µg de DNA).

Les barreges de restricció es varen incubar a 37°C entre 2-6 hores, en el cas de restriccions analítiques en les quals no era imprescindible una digestió completa o exhaustiva del DNA, o bé entre 6-12 hores quan es duen a terme digestions preparatives amb la finalitat de purificar algun fragment o dobles digestions. En aquest darrer cas, l'addició dels enzims era simultània quan tots dos presentaven activitat òptima en les mateixes condicions, és a dir, en el mateix amortidor. En cas que les condicions òptimes no coincidissin o no fossin compatibles per tots dos enzims, la segona digestió va anar precedida d'una extracció amb fenol:cloroform:alcohol isoamílic (25:24:1) i precipitació amb etanol. Aquest procediment que sovint s'empra després de sotmetre el DNA a una manipulació enzimàtica, com per exemple, una digestió amb nucleases, fosforilació, defosforilació, etc..., abans de sotmetre'l a una nova manipulació, consta dels passos següents:

1. Afegir TE o aigua a la solució que conté la reacció fins un volum de 100 µl.
2. Addicionar-hi 100 µl de la solució de fenol:cloroform:alcohol isoamílic (25:24:1), agitar-ho en vòrtex i centrifugar a 12.000 xg en una minifuga durant 5 minuts.
3. Recuperar la fase aquosa i transferir-la a un nou tub estèril. De manera opcional, es poden afegir 100 µl de TE o aigua a la fase orgànica del pas anterior, repetir el procediment i en acabat reunir totes dues fases aquoses. En alguns casos s'ha vist que millora el rendiment de l'extracció.
4. A la fase obtinguda anteriorment, s'hi barreja un volum igual de cloroform:alcohol isoamílic (24:1). Es mescla en vòrtex i es centrifuga a 12.000 xg en minifuga uns 30 segons. Transferir la fase aquosa a un nou tub eppendorf.
5. A continuació s'afegeixen 0,1 volums de solució d'acetat sòdic 3 M, pH 5,8, prèviament autoclavada, i 2 volums d'etanol fred (-20°C). Mesclar agitant en vòrtex uns segons per homogeneïtzar les fases i mantenir a -70°C durant 1 hora com a mínim.
6. Centrifugar a 12.000 xg en minifuga durant 10-15 minuts a 4°C (també funciona a temperatura ambient) i descartar el sobrenedant.
7. Afegir 1 ml d'etanol 70% fred (-20°C) i invertir l'eppendorf per tal de netejar el sediment. Centrifugar a 12.000 xg durant 2-5 minuts en minifuga. Descartar el sobrenedant.
8. El sediment, en el qual es troba el DNA, s'asseca al buit durant 2 minuts o bé sobre la taula amb el tub invertit durant 5-10 minuts. Resuspendre el sediment en el volum necessari per a la següent manipulació.

II.C.1.b.(2). Tractament amb altres enzims

II.C.1.b.(2).a. Reaccions de lligament amb la DNA lligasa del bacteriòfag T4

El lligament de fragments de DNA és una tècnica clau en la tecnologia de DNA recombinant. Aquesta tècnica permet inserir fragments de DNA foranis en vectors plasmídics o bé unir molècules de DNA per tal d'obtenir construccions per a un determinat propòsit.

Les condicions d'un lligament depenen del tipus d'experiment que es dugui a terme, dels extrems que posseïxin el vector i l'insert linealitzats, i la concentració disponible del DNA a inserir. Les variables més importants que cal tenir en compte són les concentracions de DNA del vector i de l'insert o dels fragments a unir i, la duració i la temperatura i la duració del lligament.

Pel que fa referència a les concentracions amb les quals treballem, es poden plantejar dues problemàtiques:

- si la relació vector/insert és molt elevada, es veuran afavorides les reaccions intramoleculares i per tant la recircularització del vector, sobretot en el cas dels extrems llisos,
- si la relació vector/insert és massa baixa, s'obtidran clons que contenen múltiples inserts.

Una altra consideració rellevant a fer és que quan es calculen les concentracions de DNA per un lligament, és important treballar en termes de concentracions d'extrems lliures i no en concentració de massa total de DNA. Tampoc és interessant treballar amb concentracions massa baixes de DNA, en termes de massa total, atès que aquestes afavoreixen les reaccions intramoleculares i per tant la recircularització del vector.

La temperatura i la duració dels lligaments ve determinada, en primer lloc per la naturalesa dels extrems presents en la reacció. Com a regla general s'assumeix que com menor sigui la distància a hibridar menor ha de ser la temperatura i major el temps de reacció del lligament, llevat dels lligaments d'extrems llisos els quals no depenen tant fortament del factor temperatura. També de forma general, s'acostuma a sacrificar el fet que la T4 DNA lligasa treballi a la seva temperatura òptima (37°C), per guanyar en una millor complementació dels extrems. Així s'acostuma a baixar la temperatura de lligament que sol oscil·lar entre 12 i 25 °C. El procediment seguit en les reaccions de lligament ha estat el següent:

1. Digerir el vector i el DNA forani amb els enzims de restricció, nucleases o dur a terme qualsevol altra manipulació enzimàtica que fos necessària abans del lligament i purificar-los, preferentment a partir d'electroforesi en gels d'agarosa.
2. En amortidor de lligasa, es barregen els fragments de DNA que es volen lligar. Idealment s'aconsella, que la concentració sigui 1 pmol/ml de DNA de vector per 4 pmol/ml de DNA d'insert, quan els extrems són cohesius i 0,5 pmols/ml quan els extrems són llisos. L'amortidor que s'utilitza pel lligament pot ser variable

Material i Mètodes

pel que respecta a les concentracions dels components i fins i tot en la composició. En aquest treball es va utilitzar durant la unió dels oligonucleòtids en la construcció del gen sintètic, un amortidor amb la següent composició:

- 25 mM Tris-HCl, pH 7,6
- 10 mM MgCl₂
- 1 mM DTT

Aquest amortidor es pot preparar concentrat 10x i guardar en alíquotes a -20°C.

En posteriors manipulacions sobre el gen sintètic i subclonats en altres vectors s'ha utilitzat l'amortidor que proporciona Boehringer Mannheim amb la lligasa de T4. Aquest amortidor és també recomanable guardar-lo en alíquotes de 5-10 µl a -20°C.

3. La mescla de lligament s'escalfa a 65°C durant 10 minuts i a continuació es deixa en gel. Aquest segon pas, consistent en escalfar lleugerament la mostra amb la finalitat de desenganxar els possibles concatàmers, no s'ha de realitzar si s'està utilitzant un amortidor en el qual, com en el cas del de Boehringer Mannheim, el ATP ja s'hi troba inclòs.
4. Afegir ATP si s'escau, a una concentració final 2 mM i la lligasa de DNA de T4 (Boehringer Mannheim) en una proporció de 0,1-0,5 Unitats/µg de DNA.
5. Incubar la reacció de lligament a 15 °C durant 15-20 hores. Sovint, degut al fet que se sol treballar amb concentracions més elevades de lligasa (fins a 5 Unitats/µg de DNA), es pot optar, sobretot en lligaments d'extrems cohesius, per incubacions de 2-4 hores a temperatura ambient. Aquestes s'ha constatat durant el treball, que funcionen igualment bé alhora que es redueix el risc de degradació dels components de la mescla.
6. La reacció s'atura per escalfament a 65°C durant 10-15 minuts i a continuació es refreda en gel. En el cas d'un lligament vector-insert que no requereixi manipulacions posteriors, aquesta mescla pot utilitzar-se directament per a transformar cèl·lules competents. S'aconsella no utilitzar mai tota la mescla de lligació en una única transformació. En el cas que no es pensi utilitzar immediatament, es pot guardar a -20°C.
7. Si el lligament que s'ha realitzat requereix posteriors manipulacions enzimàtiques, és recomanable dur a terme una desproteïnitació aplicant el procediment descrit en l'apartat II.C.1.b.(1). Alternativament es pot optar per purificar el fragment desitjat a partir de gels d'agarosa (apartat II.C.1.d.)

II.C.1.b.(2).b. Digestió amb la nucleasa de Mung Bean

Molt sovint en clonats o subclonats, hom es troba amb la necessitat de generar extrems llisos davant la impossibilitat d'aconseguir les dianes cohesives desitjades, ja sigui perquè les dianes de clonatge en el vector es trobin també en l'interior de l'insert que volem clonar o perquè els fragments que volem lligar no disposen de les mateixes dianes.

Hi ha bàsicament, dues alternatives per generar aquests extrems llisos:

Material i Mètodes

1. Omplir o sintetitzar la cadena complementària en l'extrem cohesiu
2. Eliminar els nucleòtids que romanen en l'extrem de cadena senzilla

En aquest treball s'ha triat la segona possibilitat i s'ha utilitzat amb aquesta finalitat, la nucleasa de *Phaseolus aureus* o nucleasa de mung bean. La nucleasa de mung bean hidrolitza DNA o RNA de cadena senzilla alliberant 5'-nucleòtids. Precisament per aquesta raó, és convenient netejar el DNA, si per exemple prové d'una minipreparació, de qualsevol remanent de RNA, atès que aquest podria saturar la nucleasa. Una manera convenient d'aconseguir-ho és purificar el fragment que es vol digerir a partir de gels d'agarosa.

El protocol seguit per a aquestes digestions ha estat adaptat del de Hasan i col., (1986) i es detalla a continuació:

1. A un volum de 10 µl que conté 1-2 µg del DNA que es vol sotmetre a digestió, se li afegeixen:

Amortidor de nucleasa 10x	5 µl
Nucleasa mung bean (2,5 U/µl)	1 µl
Aigua	34 µl

Aquests volums es poden modificar dependent de les necessitats de l'experimental.

La composició de l'amortidor de la nucleasa 10x és:

300 mM acetat sòdic, pH 4,6
500 mM NaCl
10 mM acetat de zenc

Aquesta solució s'autoclava i se li afegeix Tritó X-100 fins a una concentració final de 0,01%.

2. Incubar aquesta barreja 1 hora a 30 °C.
3. Suplementar-ho fins una concentració final 0,2 M NaCl, abans d'afegir-hi 50 µl de fenol:cloroform (1:1).
4. Agitar en vòrtex i centrifugar 2 minuts a 12.000 xg en minifuga.
5. Recuperar la fase aquosa i afegir-hi 0,1 volums d'acetat sòdic 3 M, pH 5,5-6,0 i 2,5 volums d'etanol fred.
6. Deixar 1 hora com a mínim a -70°C i centrifugar a 12.000 xg.
7. Resuspendre en el volum que hom consideri oportú per a la seva posterior manipulació.

II.C.1.c. ELECTROFORESI ANALÍTICA DE DNA EN GELS D'AGAROSA

L'anàlisi de les diferents preparacions de DNA, mesclades de restricció, lligament, etc..., s'ha dut a terme mitjançant electroforesi horitzontal en gels d'agarosa. Per a la preparació dels gels s'utilitzà agarosa de baixa electroendòsmosi (Ecogen) i els equips d'electroforesi foren els models Mini-subcell, Wide Mini-subcell i Sub-cell (Bio-Rad). La concentració d'agarosa va dependre de les necessitats experimentals oscil·lant entre un 0,75% i un 2% d'agarosa en amortidor Tris-acetat-EDTA (amortidor TAE).

Material i Mètodes

La composició d'aquest amortidor TAE és:

Amortidor TAE 50x (1 litre):

Tris-base	242 g
Àcid acètic glacial	57,1 ml
EDTA	18,6 g
Aigua destil.lada	fins a 1 litre

No és necessari ajustar el pH. La solució de treball (1x) té la composició final següent: Tris-acetat 40 mM, EDTA 2mM, pH 8,0.

Procediment per a la preparació del gel:

1. Pesar la quantitat necessària d'agarosa d'acord amb el percentatge final desitjat del gel i ficar-ho en un contenidor de tipus erlen-meyer.
2. Afegir-hi aigua destil.lada igual al volum final del gel menys el volum d'amortidor concentrat que cal afegir després de l'ebullició. Bullir-ho per fondre l'agarosa. Aquest pas es duu a terme o bé sobre un encenedor bunsen o bé en un microones. En qualsevol cas és important que tota l'agarosa estigui fosa i no quedin partícules en suspensió.
3. Afegir-hi l'amortidor concentrat i, si s'escau, el bromur d'etidi, a una concentració final de 0,5 µg/ml. Mesclar bé i esperar fins que la temperatura sigui inferior als 50°C abans d'abocar-ho en el motllo. En aquest procés d'abocar l'agarosa, prèviament al qual haurem col.locat la pinta per la formació de les butxaques, cal anar amb compte que no es formin bombolles que podrien interferir en el posterior corriment de les mostres.
4. Un cop abocat es deixa gelificar l'agarosa, procés que pren més temps com menor sigui el percentatge del gel. Mentre està gelificant es prepara l'amortidor d'elució diluint l'amortidor concentrat utilitzat en la preparació del gel i afegint si s'escau, bromur d'etidi.

Els volums de gel i amortidor d'electroforesi utilitzats foren:

Equip	Volum de gel	Volum d'amortidor
Mini sub-cell	25-30 ml	250 ml
Wide Mini-subcell	100 ml	500 ml
Subcell	150 ml	1500 ml

Càrrega del gel i condicions d'electroforesi:

1. Afegir a les mostres que es volen carregar 1/10 (v/v) d'amortidor de càrrega. Opcionalment les mostres es poden escalfar a 65°C durant 10 minuts refredant-les a continuació en gel picat.

Composició de l'amortidor de càrrega 10x (100 ml):

Ficoll-400 (Sigma)	15 g
Blau de bromofenol (BPB) (Merck)	250 mg

Material i Mètodes

Xilen cianol (XC) (Eastman kodak) 250 mg

Aigua destil.lada fins a 100 ml

La concentració final és 15% Ficoll-400, 0,25% BPB i 0,25% XC.

2. Carregar les mostres en les butxaques. Juntament amb les mostres s'han carregat els marcadors de massa molecular adequats segons els requeriments de cada cas. Els marcadors emprats foren els subministrats per Boehringer Mannheim i New England Biolabs. L'ús d'uns o altres s'indicarà convenientment en cada cas. En tots dos casos són subministrats dissolts sense amortidor de càrrega per la qual cosa es diluïren en un volum igual d'amortidor de càrrega i 8 volums d'aigua destil.lada. De la dissolució resultant se n'aplicaren 10 µl.
3. Per a l'electroforesi s'utilitzà un voltatge de 60-80 mV quan es feren servir cubetes Mini-subcell i Wide Mini-subcell o 120-140 mV quan s'utilitzà la cubeta Subcell. L'electroforesi es va prolongar fins que el primer colorant (BPB) assolí els 3/4 del recorregut del gel.
4. La tinció dels àcids nucleics s'ha dut a terme emprant bromur d'etidi, de dues maneres diferents. En el primer cas s'ha afegit directament a l'agarosa, abans d'abocar-la al motllo, i a l'amortidor d'electroforesi, bromur d'etidi a una concentració final de 0,5 µg/ml. D'aquesta manera els àcids nucleics es tenyeïxen durant el procés electroforètic, la qual cosa permet seguir la migració de les bandes durant la realització del mateix.
El procediment alternatiu consisteix en submergir el gel durant 15-30 minuts en 200 ml de bromur d'etidi 0,5 µg/ml en el mateix amortidor d'electroforesi. A continuació, per tal d'eliminar l'excés de bromur d'etidi se submergeix el gel durant 15-30 minuts en 200 ml d'una dissolució de MgSO₄ 1 mM o senzillament en aigua destil.lada.
5. Els gels situats sobre un transil.luminador UV (UltraViolet Products model TM 36, EEUU) es varen fotografiar amb una Polaroid MP-4 equipada amb un filtre taronja Wratten 23A i una pel.lícula Polaroid 665. De forma rutinària s'utilitzà una obertura de diafragma 5,6 i un temps d'exposició de 50-60 segons.

II.C.1.d. ESTIMACIÓ DE CONCENTRACIONS DE DNA

Per a fer un estimació de la quantitat de DNA present en una dissolució, es poden emprar dos sistemes: la determinació espectrofotomètrica i l'estimació per electroforesi en gel.

Determinació espectrofotomètrica: Aquest mètode és senzill i ràpid i consisteix en mesurar l'absorbància a 260 nm de la dissolució de DNA de la qual es vol determinar la concentració o d'una dilució de la mateixa.

S'accepta de forma general, que una unitat de densitat òptica a 260 nm equival a una concentració de 50 µg/ml de DNA de doble cadena, a 40 µg/ml per un DNA de cadena senzilla i a 20 µg/ml per un oligonucleòtid. Partint d'aquestes equivalències i de la mesura d'absorbància de la solució es pot dur a terme una estimació de la concentració de DNA per una dissolució determinada.

Estimació per electroforesi en gels d'agarosa: Sovint els volums de les dissolucions de DNA purificat són massa petits o aquestes estan massa diluïdes i es fa difícil estimar la seva concentració espectrofotomètricament. En altres casos la poca quantitat de mostra i la necessitat de determinar la massa molecular d'un fragment fan més pràctic l'estimació de la concentració a partir d'electroforesi en gels d'agarosa. Aquest mètode és molt indicat per analitzar mostres que contenen fragments lineals de DNA de cadena doble. Per dur a terme aquest tipus d'estimació cal, prèviament, realitzar una electroforesi analítica (apartat II.C.1.c.), per una banda de la dissolució de DNA de la qual es vol fer l'estimació de concentració i per altra de marcadors de massa molecular adequats. Atès que es pot calcular quina quantitat de DNA hi ha en cada una de les bandes dels marcadors, es pot inferir la quantitat de DNA present en la banda de la dissolució problema-tenint en compte el volum aplicat- per comparació de la seva intensitat amb la de les bandes dels marcadors més propers.

II.C.1.e. PURIFICACIÓ DE FRAGMENTS DE DNA PER ELECTROFORESI EN GELS D'AGAROSA

L'aïllament d'un fragment de DNA de doble cadena lineal derivat de la digestió d'un vector per digestió amb enzims de restricció, esdevé un pas imprescindible per a moltes manipulacions posteriors com ara digestions amb nucleases, defosforilacions, lligaments, subclonatsges, etc...

L'elució, ja sigui de vectors linealitzats amb enzims de restricció o de fragments que contenen el gen sintètic, a partir de gels d'agarosa s'ha dut a terme utilitzant com a eina el Gene clean™ (BIO101 Inc. La Jolla) i seguint les instruccions del proveïdor que s'exposen a continuació:

1. Carregar les mostres en un gel d'agarosa utilitzant TAE com a amortidor d'elució de l'electroforesi. L'ús de TBE com a amortidor s'ha vist que repercuteix negativament en el rendiment de recuperació.
2. Es tenyeix el gel amb bromur d'etidí com s'ha descrit en l'apartat anterior (II.C.1.d.).
3. Il·luminar el gel amb llum ultraviolada d'ona llarga i un cop localitzada la banda d'interès, retallar-la amb una ganiveta estèril i introduir-la en un tub eppendorf que prèviament s'haurà pesat. S'ha de procurar agafar la menor quantitat d'agarosa innecessària i evitar temps d'exposició massa llargs del DNA a la llum ultraviolada.
4. Tornar a pesar l'eppendorf que conté la banda i afegir-hi 3 ml de la solució saturada de NaI per a cada g de banda d'agarosa.
5. Submergir l'eppendorf en un bany escalfat anteriorment a 55°C, fins que tota l'agarosa es fongui (5-10 minuts).
6. Per recomanació de la casa comercial és aconsellable, afegir 10 µl d'una solució al 10% (v/v) d'àcid acètic glacial un cop l'agarosa està fosa, quan es volen eluir fragments de DNA amb longituds compreses entre els 250 i 500 pb. Aquest fet millora el rendiment d'unió del fragment de DNA a les boles de vidre.
7. Afegir a continuació 1 µl de solució de la suspensió de boles de vidre. Agitar en vòrtex uns segons i tot seguit incubar en gel picat durant 5 minuts, agitant en vòrtex cada 1-2 minuts.

8. Centrifugar 5 segons a 12.000 xg en minifuga. Descartar el sobrenedant per aspiració amb una pipeta pasteur.
9. A continuació es renta 3 cops el precipitat amb 0,6 ml de la solució alcohòlica que haurà estat guardada en gel durant tot el procés. En cada rentat resuspendre el precipitat pipetejant amunt i avall per a seguidament centrifugar durant 5 segons en minifuga i descartar el sobrenedant.
10. Després del tercer rentat afegir al sediment 10-20 µl d'amortidor TE o aigua destil·lada autoclavada. Resuspendre amb cura amb una pipeta automàtica i incubar a 45-55°C durant 2-3 minuts. No és aconsellable agitar en vòrtex perquè el sediment es pot distribuir per la paret la qual cosa fa la seva recuperació molt difícil degut al petit volum que es manipula.
11. Centrifugar durant 2-3 minuts en minifuga a 12.000 xg. El sobrenedant, on es troba el DNA es transvasa a un nou tub eppendorf estèril.
12. Opcionalment, es poden repetir els punts 10 i 11.

II.C.1.f. OBTENCIÓ I TRANSFORMACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS D'*E.coli*.

El procés d'incorporació del DNA forani present en el medi per part de les cèl·lules bacterianes, és el que es coneix com transformació. La introducció de vectors plasmídics, que poden ser portadors d'inserts, en cèl·lules de les soques emprades d'*E.coli* es realitza mitjançant la transformació de cèl·lules competents d'aquestes soques. Durant aquest treball s'ha seguit una variació del protocol descrit per Cohen i col., (1972), basat en el tractament de les cèl·lules bacterianes amb solucions de CaCl₂ fredes. Cal fer esment que les cèl·lules bacterianes només incorporen de forma estable per transformació, molècules de DNA de doble cadena circulars.

II.C.1.f.(1). Preparació de les cèl·lules competents

En el protocol que es descriu a continuació cal fer especial esment de la necessitat que el procés s'ha de dur a terme amb les màximes garanties d'esterilitat.

1. Incubar 5 ml de LB líquid, inoculats a partir d'una colònia de la soca desitjada crescuda en placa, durant tota la nit a 37°C i 250 r.p.m.
2. L'endemà, inocular 20 ml de medi LB líquid fresc amb 200 µl de cultiu de nit. Incubar a 37°C i 250 r.p.m fins que el cultiu assoleixi un valor d'absorbància a 550 nm d'aproximadament 0,5 unitats de densitat òptica, la qual cosa per la majoria de les soques equival a 4-5 hores d'incubació a 37°C i 250 r.p.m.
3. Transferir el cultiu a un tub de centrifuga autoclavable estèril i mantenir en gel durant 15 minuts.
4. Centrifugar 10 minuts a 3.000 xg a 4°C.
5. Descartar el sobrenedant. Resuspendre el sediment cel·lular en 10 ml de CaCl₂ 100 mM estèril i refredat en gel. És convenient afegir primer 1-2 ml de la dissolució de CaCl₂, resuspendre pipetejant amunt i avall de forma lenta i afegir els ml restants i mesclar suaument.

Material i Mètodes

6. Deixar en gel durant 15 minuts.
7. Centrifugar novament durant 10 minuts a 3.000 xg i 4°C.
8. Decantar el sobrenedant. Resuspendre el sediment en 1 ml de CaCl₂ 100 mM estèril que s'haurà guardat en gel.
9. Distribuir en tubs eppendorf (prèviament refredats en gel) en al·lquotes de 50 o 100 µl i guardar-les en gel.

Les cèl·lules conserven les seves propietats de competents durant unes 48 hores. L'eficiència de transformació s'incrementa de 4 a 6 vegades entre les 12 i les 24 hores després de la preparació de les cèl·lules competents (Dagert i Ehrlich, 1979) per la qual cosa és recomanable fer-les servir durant el període comprès entre aquestes hores.

Aquest protocol pot ésser escalat per obtenir una major quantitat de cèl·lules competents amb la finalitat d'emmagatzemar les al·lquotes per temps llargs a -70°C.

1. Inocular 1 ml del cultiu de nit en 100 ml de medi LB líquid fresc. Aquest cultiu es deixa créixer fins assolir una Abs_{550 nm} de 0,5 unitats de densitat òptica, per agitació constant a 250 r.p.m. a 37°C.
2. Deixar reposar el cultiu en gel durant 30 minuts.
3. Centrifugar a 5.000 xg a 4°C durant 10 minuts.
4. Resuspendre el sediment cel·lular en 100 mM CaCl₂, amb la meitat del volum original (en aquest cas 50 ml) i deixar reposar en gel picat durant 1 hora.
5. Centrifugar a 5.000 xg i 4°C durant 10 minuts.
6. Resuspendre les cèl·lules en 1/4 del volum original amb dissolució de CaCl₂ 50 mM refredada a 0°C. Deixar una altra hora en gel.
7. Centrifugar a 5.000 xg i 4°C durant 10 minuts.
8. Resuspendre les cèl·lules en 1/15 del volum original (aproximadament 6,7 ml) amb dissolució de CaCl₂ 50 mM refredada a 0°C. Deixar una altra hora en gel.
9. Afegir glicerol fins arribar a una concentració final del 15% (1,2 ml de glicerol 87%). Distribuir en al·lquotes de 50 o 100 µl en tubs eppendorf refredats prèviament i congelar a -70°C.

Aquest segon protocol permet obtenir unes 70 al·lquotes de 100 µl i encara es pot escalar a partir de volums de cultiu més grans. En qualsevol cas el volum de dissolució de CaCl₂ utilitzat en les diferents resuspensions ha de mantenir les proporcions exposades respecte el volum de cultiu original.

II.C.1.f.(2). Transformació de cèl·lules competents d'*E.coli*

Les cèl·lules competents, preparades com s'ha descrit en l'apartat anterior, poden ésser transformades amb DNA provinent d'un lligament o obtenció minipreparativa. El procediment seguit fou el que es descriu a continuació:

Material i Mètodes

1. Si es fan servir cèl.lules competents congelades a -70°C es descongelen les al·quotes que s'hagin de menester segons el número de transformacions que es vulguin fer, transferint els tubs eppendorf a gel picat.
2. Afegir a cada fracció de cèl.lules competents ($100\ \mu\text{l}$), un màxim de $50\ \text{ng}$ de DNA en un volum que no sobrepassi $1/10$ del volum de la fracció o al·quota. Agitar suaument per tal de mesclar bé la solució del DNA amb la de les cèl.lules.
3. Incubar en gel durant 30 minuts.
4. Transferir els tubs eppendorf a un bany a 42°C durant 2 minuts.
5. Incubar els tubs en gel durant 10 minuts.
6. A continuació, afegir $1\ \text{ml}$ de medi LB líquid fresc a cada tub eppendorf i incubar a 37°C en agitació suau com a mínim durant 45 minuts. Si el volum de cèl.lules competents és de $50\ \mu\text{l}$ cal afegir només $0,5\ \text{ml}$ de medi. En les transformacions de MC1061 amb pIN11ompA1 i els seus derivats el medi utilitzat fou M9CAS i la incubació per la recuperació del fenotip es prolongà fins 90 minuts.
7. Sembrar al·quotes de $0,1\ \text{ml}$ en plaques de LB-agar o el medi escaient, suplementades amb l'antibiòtic pel qual el vector que s'està manipulant proporcioni resistència. En tots els casos aquest antibiòtic fou l'ampicil·lina.
8. Incubar les plaques en estufa a 37°C fins que s'observin les colònies transformants (12-15 hores). Cal evitar incubacions massa llargues per tal que no apareguin colònies satèl·lit que dificultarien la selecció dels transformants.

En totes les transformacions realitzades es varen incloure dos controls:

- D'una banda una al·quota de cèl.lules competents a la qual es va afegir $10\ \mu\text{l}$ d'aigua o TE i que se sembrà en una placa de medi suplementada amb antibiòtic. En aquesta placa no hi ha d'aparèixer cap colònia. En cas contrari indicaria contaminació de les cèl.lules competents.
- En segon lloc, una al·quota a la qual s'afegiren $10\ \mu\text{l}$ de TE o aigua destil·lada i que se sembrà en una placa de medi sense antibiòtic. Hi ha d'aparèixer una capa confluent de cèl.lules bacterianes. Altrament significaria que les cèl.lules competents estaven mortes.

En el cas de transformacions amb mescles de lligament es varen incloure dos controls addicionals:

- Una al·quota de cèl.lules competents transformada amb vector sense tallar, circular, i que se sembrà en medi amb antibiòtic. Han d'aparèixer nombroses colònies transformants. En cas contrari voldrà dir que les cèl.lules que estem utilitzant tenen un nivell baix de competència.
- Una al·quota transformada amb mescla de lligament sense el DNA forani i sembrada amb medi amb antibiòtic. Hi hauria d'aparèixer un número significativament menor de colònies transformants que en la transformació amb mescla de lligament del vector amb DNA forani. En cas contrari ens indicarà que el

vector emprat no estava correctament defosforilat o no estava correctament digerit (en el cas de lligaments amb extrems cohesius diferents provinents de la digestió amb dos enzims diferents).

II.C.1.f.(3). Selecció de les colònies transformants

Un cop obtingudes les colònies transformants, s'han de seleccionar aquelles que porten el vector amb l'insert, ja que és possible que algunes portin només el vector. Amb aquesta finalitat es fa una extracció minipreparativa del DNA plasmídic d'algunes colònies aparegudes en el medi amb l'antibiòtic. Tot seguit aquest DNA es va sotmetre a digestió amb els enzims de restricció per a comprovar la presència de l'insert de DNA forani i, una alíquota de la mescla de restricció es va carregar en un gel d'agarosa juntament amb els marcadors de massa molecular i una digestió del vector sense insert digerit amb els mateixos enzims de restricció.

II.C.1.g. OBTENCIÓ I TRANSFORMACIÓ DE CÈL·LULES COMPETENTS DE *G.cerevisiae*

Els primers mètodes emprats per la transformació de *S.cerevisiae* implicaven l'eliminació enzimàtica de la paret cel·lular per produir esferoplasts, els quals es feien competents pel tractament amb calci i polietilenglicol (Beggs, 1978; Hinnen i col., 1978). Els transformants eren aleshores sembrats en placa en un medi isotònic i selectiu per permetre la recuperació de la paret cel·lular. Posteriorment es va desenvolupar una metodologia més convenient, en la qual, cèl·lules intactes del llevat es feien competents per tractament amb ions de liti (Ito i col., 1983). Aquest mètode és actualment més utilitzat, malgrat que presenta un menor rendiment que la transformació d'esferoplasts, per la major comoditat. Més recentment Meiloch i col., (1990), han aplicat una tercera aproximació, l'electroporació, que presenta un rendiment de transformació encara més elevat.

Durant aquest treball s'ha seguit una variant del mètode de transformació amb acetat de liti descrita per Hill i col., (1991) en el qual s'utilitza DMSO.

1. Es pren 1 ml d'un cultiu estacionari de BJ2168 crescut en medi YPD líquid i es fa servir per inocular 100 ml de YPD en un flascó estèril.
2. Les cèl·lules s'incuben a 30°C amb agitació (200 r.p.m.) fins que s'assoleix una densitat òptica a 650 nm al voltant de 1,0 unitats.
3. Es transfereixen les cèl·lules a tubs estèrils de 30 ml i es centrifuguen a 4.000 r.p.m. durant 2 minuts a temperatura ambient.
4. Els sediments cel·lulars es renten en 10 ml totals d'una solució d'acetat de liti i es reuneixen en un sol tub. La composició de la solució de liti és: 0,1 M actat de liti, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA.

5. La suspensió se centrifuga com anteriorment i es torna a resuspendre molt suaument el sediment cel.lular per addició de 1 ml de la solució d'acetat de liti.
6. S'afegeixen 100 µl de la suspensió de cèl.lules de llevat a un tub de centrifuga on hi ha continguts 10 µl (0,1 µg/µl) de DNA del vector que es vol transformar.
7. S'afegeixen 280 µl de la solució de polietilenglicol (50% PEG en solució d'acetat de liti) i el contingut es mescla per inversió del tub, després de la qual cosa, s'incuba 45 minuts a 30°C sense agitació.
8. S'afegeixen 43 µl de DMSO per aconseguir aproximadament un 10% (v/v) en el tub. Els componets novament es barregen per inversió.
9. Incubar 5 minuts a 42°C.
10. Sedimentar les cèl.lules amb un pols de centrifuga a 12.000 xg (3-5 segons) i el sediment així aconseguit es renta amb 1 ml d'aigua per eliminar les restes de DMSO i polietilenglicol.
11. Repetir el pas 10.
12. A continuació es sembren en plaques S4%D-trp, 100 µl del volum de transformació
13. Incubar les plaques en una estufa a 30°C durant 48 hores com a mínim.

En totes les transformacions de llevat que s'efectuaren es varen incloure els següents controls:

- Una alíquota de cèl.lules competents transformades amb 10 µl de TE que es va sembrar en una placa S4%D-trp. En aquesta placa no hi ha d'aparèixer cap colònia atès que les cèl.lules BJ2168 són auxotrófiques per triptòfan.
- Una alíquota de cèl.lules competents transformades amb el vector YEpWL, sense cap insert forani que es va sembrar també en plaques S4%D-trp. Aquest control funcionava com a control positiu de transformació i després es va utilitzar com a control negatiu en l'expressió. Al cap de 48 hores havien d'aparèixer els transformants.
- El tercer control consistia en transformar una alíquota de cèl.lules competents BJ2168 amb el vector YEpBPR, el qual era portador del gen de la ribonucleasa de pàncreas boví. Aquest vector, derivat de l'anterior pels mateixos autors, s'utilitzà tant en la transformació com en l'expressió, com a control positiu.

Un cop aparegueren els transformants en les plaques de S4%D-trp, alguns dels clons es tornaren a sembrar per esgotament en plaques de S4%D-leu, les quals s'incubaren durant 48 hores en una estufa a 30°C fins l'aparició de transformants. D'entre els transformants que també eren capaços de créixer en medis sense leucina es prengueren alguns clons i s'inocularen 5 ml de medi S4%D-trp líquid amb cada un. Després de 48 hores en agitació (250 r.p.m.) a 30°C, 50 µl d'aquells cultius que presentaven creixement, s'inocularen en 5 ml de medi S4%D-leu líquid i es deixaren en agitació (250 r.p.m.) a 30°C durant 48 hores més. Els transformants seleccionats després d'aquest procés foren els que es varen avaluar per l'expressió de HPRNAasa en cultiu en placa, tal i com s'ha descrit en l'apartat II.E.2.c.(2).

Un factor important a considerar en l'expressió de gens foranis en llevat és la freqüent i àmplia variació existent en quant a productivitat entre diferents transformants (Loison i col., 1989; Purvis i col., 1987) quan s'utilitzen vectors derivats del μ . Això sembla ser degut a una inexplicable variació en el número de còpies de plasmidi entre diferents transformants. És per això que quan s'avalua l'expressió, és convenient analitzar diversos transformants.

II.C.2. Construcció d'un gen sintètic de la Ribonucleasa de Pàncreas Humà

II.C.2.a. SÍNTESI DELS OLIGONUCLEÒTIDS

El gen per la HPRNAasa s'ha construït a partir de 8 nucleòtids denominats #1, #1c, #2c, #3, #3c, #4 i #4c la longitud dels quals variava entre 92 i 113 residus nucleotídics. Aquests oligonucleòtids se sintetitzaren mitjançant el mètode de la fosforamidita en fase sòlida (Atkinson i Smith, 1984) en un sintetizador Applied Biosystems 392 al laboratori del Dr Ronald T. Raines.

En la síntesi automàtica, el DNA es construeix de 3' a 5'. Abans d'iniciar-se la síntesi, es parteix d'un dels quatre nucleòsids (A, C, G o T) amb un grup dimetoxitritil (DMT) protegint el 5' hidroxil, unit al suport d'una columna de sílica, i és aquest nucleòsid el que constituirà l'extrem 3' de la seqüència. En cada cicle d'addició d'una base es repeteixen quatre etapes:

1. Detritilació, consistent en eliminar el DMT de l'extrem 5' per donar lloc a un grup 5' hidroxil capaç de reaccionar amb la següent fosforamidita.
2. Aparellament, consistent en la unió d'una fosforamidita, la qual es troba bloquejada en el 5' hidroxil amb un grup DMT, pel 3' foror d'aquesta amb el grup 5'hidroxil alliberat en el pas anterior.
3. Bloqueig, consistent en acetillar els grups 5' hidroxil que no hagin reaccionat amb la fosforamidita. Encara que aquest pas no és imprescindible per a la síntesi del DNA, és altament recomanat per minimitzar la longitud de les impureses de la síntesi.
4. Oxidació, consistent en oxidar el fosfor internucleotídic a la seva forma fosfotrièster més estable.

Aquestes quatre etapes es repeteixen tantes vegades com sigui necessari per a completar l'elongació desitjada de l'oligonucleòtid. Un cop finalitzada la síntesi, l'oligonucleòtid s'allibera del suport incubant de 8 a 15 hores en una estufa a 55°C amb hidròxid amònic concentrat. Aquest tractament a més, treu els grups protectors de les amines exocíclics de les bases.

II.C.2.b. PURIFICACIÓ DELS OLIGONUCLEÒTIDS

Abans de poder ésser utilitzats per la construcció del gen sintètic calia purificar els oligonucleòtids. Tot i que els oligonucleòtids sintetitzats com s'ha exposat en l'apartat anterior són sovint prou purs i en un 90% dels

Material i Mètodes

casos sencers, és necessari purificar-los de productes de síntesi incomplets els quals, poden interferir en processos de mutagènesi o reaccions d'aparellament de forma significativa. En un primer terme es varen utilitzar els cartutxos de purificació d'oligonucleòtids OPC (Oligonucleotide Purification Cartridge, Applied Biosystem) seguint una millora del protocol tradicional publicada en el User Bulletin (DNA Synthesizers Applied Biosystems (1991) n°59, March).

En una segona aproximació, més reeixida, es repurificaren els oligonucleòtids per electroforesi preparativa en gels desnaturalitzants de poliacrilamida-urea. El procediment seguit es basa en el descrit per Maxam i Gilbert:

1. Si el DNA es té com a sediment sec, cal dissoldre'l en TE a una concentració de 0,2 $\mu\text{mol} / \text{ml}$.
2. Es transfereixen 300 μl d'oligonucleòtid cru, tal com s'obté del sintetitzador, l'equivalent a uns 100 nmols, a un tub de microcentrifuga estèril i s'hi afegeixen 100 μl d'acetat d'amoni 7 M, 30 μl de MgCl_2 1 M i 1 ml d'etanol.
3. Es mescla bé i es deixa a -70°C un mínim de 15 minuts. Es centrifuga a 12.000 xg durant 10 minuts.
4. Es decanta l'etanol i amb cura es neteja amb una solució d'etanol 90%.
5. L'oligonucleòtid precipitat es resuspèn en 25 μl d'amortidor de càrrega. La composició de l'amortidor de càrrega utilitzat és:

95% (v/v) de formamida desionitzada
20 mM EDTA
0,05% (p/v) de Xilen cialol
0,05% (p/v) de Blau de bromofenol

6. Es prepara un gel de 9x6 cm amb separadors de 1 mm al 6% d'acrilamida i 7 M urea. La recepta per 15 ml és la següent:

Acrilamida 29%, bisacrilamida 0,8%	3,1 ml
Amortidor TBE (x5)	3 ml
Urea	6,9 g

Després de dissoldre l'urea escalfant i amb agitació, s'ajusta a 15 ml amb aigua destil.lada. Per polimeritzar el gel s'hi afegeixen 30 μl de persulfat amònic 10% i 15 μl de TEMED.

La composició de l'amortidor TBE 5x és la següent:

Àcid bòric	27,5 g
EDTA	1,86 g
Tris-HCl	54,0 g
Aigua destil.lada	fins a 1 litre

7. Després de polimeritzat el gel s'afegeix l'amortidor d'electroforesi, TBE. La mostra es carregà en una única butxaca la qual s'havia convenientment i prèvia, netejat amb una xeringa per treure les restes d'urea que podrien destorbar la migració de l'oligonucleòtid.
8. L'electroforesi es dugué a terme en un equip Mini-Protean II (Bio-Rad), a 30 mA.

Material i Mètodes

9. Un cop realitzada l'electroforesi, es prengué el gel i es col·locà sobre una placa de cel·lulosa F254 (Merck) la qual s'ha cobert prèviament de paper transparent (Glad). A continuació s'il·luminà amb llum UV de 254 nm mitjançant una font UVatom 70 (Atom). La banda corresponent a l'oligonucleòtid desitjat, que sol correspondre's amb la majoritària, es va retallar amb una ganiveta estèril.

10. L'elució es duagué a terme pel mètode de "crush & soak". Consisteix en triturar el gel, amb la punta d'una pipeta pasteur tancada a la flama, fins aconseguir una pasta el més homogènia possible, o bé una mena de pols, dependent de si treballem amb un gel de baix o alt percentatge d'acrilamida respectivament.

Un cop s'ha triturat el gel s'hi afegeix 0,5 ml d'amortidor d'elució, la composició del qual és:

Acetat d'amoni	0,5 M
EDTA (pH 8,0)	1 mM
SDS	0,1 %
Acetat de magnesi	10 mM

11. S'incuba en una estufa de 37°C durant 15 hores amb agitació i 3-4 hores a 55°C. Es centrifuga 10 minuts a 12.000 xg i el sobrenedant es transfereix a un nou tub estèril.

12. S'afegiren una altra vegada 0,5 ml de l'amortidor d'elució tot resuspendent el sediment de la centrifugació anterior i s'incubà unes altres 4 hores a 55°C en agitació. El sobrenedant de la centrifugació s'afegeix a l'anterior.

13. L'oligonucleòtid es precipità afegint-hi 3 volums d'etanol i 0,1 volums de 1 M MgCl₂ i deixant reposar la barreja 1 hora a -70°C. Se centrifugà i el sediment es rentà amb 1 ml d'etanol 90%.

14. El sediment es va resuspendre en 100 µl d'aigua destil·lada prèviament autoclavada.

15. Es va determinar l'absorbància d'una dilució 1/100 de cada fracció. Per determinar la quantitat de cada oligonucleòtid cal:

Multiplicar la DO₂₆₀ pel factor de dilució de la mesura presa

Es divideix la DO₂₆₀ corregida per la suma dels coeficients d'extinció de la composició en bases obtenint-se la concentració de l'oligonucleòtid en µmol/ml

II.C.2.c. LLIGAMENT DELS FRAGMENTS I, II, III I IV

Un cop purificats els 8 oligonucleòtids, que en conjunt constitueixen les dues cadenes d'un DNA que codifica per la HPRNAasa, calia construir aquest gen. Atès que els oligonucleòtids tal i com varen ésser sintetitzats no es trobaven fosforilats en el seu extrem 5', calia dur a terme aquest pas de forma prèvia al seu lligament, d'altra banda impensable, llevat en aquells oligonucleòtids (#1 i #4c) que constitueixen els extrems 5' del DNA dúplex, per tal d'evitar la formació de concatàmers.

Després de la fosforilació en segueix l'aparellament, el qual és convenient realitzar-lo lentament per a que es formin els aparellaments desitjats i finalment cal lligar les diferents parelles o fragments, constituïts per un oligonucleòtid i el seu complementari (per exemple: Fragment I constituït per l'aparellament dels oligonucleòtids #1/#1c) per a obtenir el gen. L'estratègia seguida per al lligament dels diferents fragments fou extreta del treball de Guillemette i col., (1991).

Material i Mètodes

1. Es prengueren 30 pmols de les solucions d'oligonucleòtids purificats com s'ha descrit en l'apartat anterior i es fosforilaren per separat durant 90 minuts per l'addició de 5 U de Polinucleòtid Quinasa de T4 (T4PNK, New England Biolabs) en presència de 100 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT i ATP 5 mM, a excepció del oligonucleòtids que han de constituir els extrems 5' del DNA dúplex, és a dir el #1 i el #4c.
2. La mescla de reacció s'escalfà 10 minuts a 65°C per inactivar la T4PNK. Els oligonucleòtids es reuniren i precipitaren afegint-hi 3 volums d'etanol i 0,1 volums de 1 M MgCl₂ i deixant reposar la barreja 1 hora a -70°C. Se centrifugà 15 minuts a 12.000 xg i el sediment es rentà amb 1 ml d'etanol 90%.
3. El sediment es va resuspendre en 10 µl d'aigua més 1 µl d'amortidor de lligasa [25 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT]. A continuació es va escalfar a 90°C durant 3 minuts la barreja i es deixà refredar fins assolir la temperatura ambient. En aquest pas es busca l'aparellament dels oligonucleòtids (#1, #1c), (#2, #2c), (#3, #3c) i (#4, #4c)
4. Un cop refredat s'afegiren 4 µl de 50 mM ATP, 1 µl de lligasa de T4 (10 unitats) i 4 µl d'aigua destil·lada i la mostra es deixa incubant a 16°C durant 15 hores, per tal d'aconseguir el lligament dels quatre fregments I, II, III i IV. Un cop es té la mostra en aquestes condicions es pot guardar a -20°C.

II.C.2.d. Amplificació del gen sintètic mitjançant l'ús de la Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Les bases teòriques de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) foren probablement exposades per primer cop en un article per Kleppe i col., (1971). Tanmateix, aquesta tècnica no provocà un interès general entusiasta fins a meitat dels anys vuitanta, quan Kary Mullis i els seus col.laboradors desenvoluparen a Cetus, la PCR com una tècnica que podia ésser utilitzada per generar grans quantitats de gens de còpia única a partir de DNA genòmic. (Mullis i col., 1986; Saiki i col., 1985, 1986; Embury i col., 1987).

La reacció en cadena de la polimerasa, és un procediment ràpid per l'amplificació "in vitro" d'un segment específic de DNA. Així com el clonatge molecular, la PCR ha permès un gran nombre d'experiments i troballes que, prèviament, eren impossibles. El nombre d'aplicacions de la PCR sembla, a parer del creixement d'aquestes, infinit. Entre aquestes s'inclouen, el clonatge directe a partir de DNA genòmic o cDNA, "in vitro" mutagènesi i enginyeria del DNA, empremta genètica de mostres forenses, assaigs per la presència d'agents infecciosos, diagnòsi pre-natal de malalties genètiques, anàlisi de variacions al·lèliques, empremta genòmica (genomic footprinting), seqüenciació directa de DNA genòmic, així com d'altres tipus de DNA, i darrerament en vessants (de vegades un xic fantasioses) de la paleogenètica. La base teòrica de la PCR es presenta esquematitzada en la figura II.C.2.d.1.

Cada element de la PCR pot afectar l'èxit de l'amplificació. Així, la puresa dels reactius, la distància, la complementarietat, la longitud i la seqüència dels oligonucleòtids, la quantitat i puresa del DNA motllo, l'enzim i la concentració de sals, la concentració del deoxiribonucleòsids trifosfat (dNTPs) i les temperatures de desnaturalització, aparellament i extensió del cicle tèrmic, són paràmetres que cal avaluar i programar amb cura abans de dur a terme qualsevol intent d'amplificar un fragment de DNA.

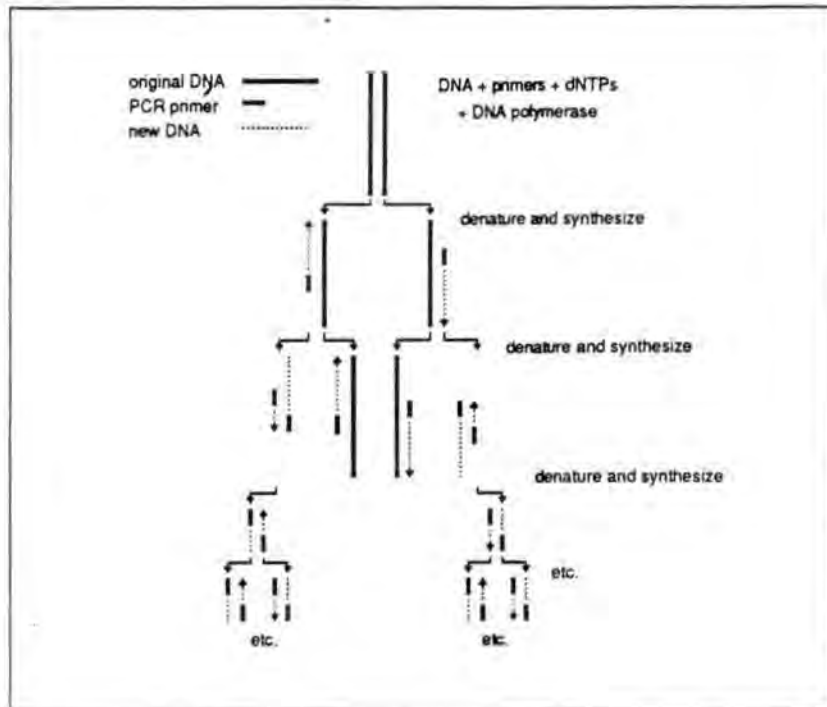


Figura II.C.2.d.1. : El DNA que es vol amplificar és desnaturalitzat per escalfament. En presència de la DNA polimerasa i un excés dels quatre deoxiribonucleòsids trifosfat (dNTPs), els oligonucleòtids encebadors s'aparellen amb el DNA motllo de manera específica i es duu a terme la síntesi del nou DNA en sentit 5'---->3'. Mentre el primer cicle es caracteritza per un producte de longitud indeterminada, el segon cicle produeix el producte discret que s'acumula de forma exponencial en els cicles successius.

Durant aquest treball s'ha utilitzat la reacció en cadena de la polimerasa per amplificar el producte de lligament dels quatre fragments I, II, III i IV, que constitueixen el fragment de DNA que codifica pel gen sintètic de la HPRNAasa unit a un fragment del pèptid líder del factor α .

El producte d'aquest lligament (descriu en l'apartat II.C.2.c.) es va carregar en una electroforesi de 1.5% agarosa i el fragment de 421 pb es va purificar a partir del gel per Gene-Clean (apartat II.C.1.e.). Els oligonucleòtids que es varen sintetitzar per a ésser utilitzats com a encebadors foren els següents:

Oligonucleòtid 1d (complementari a Oligo # 1c) : 5' cgactg**gggtac**cttggataaaagaaa 3'

Oligonucleòtid 4d (complementari a Oligo # 4) : 3' caactctaagaatt**cagctc**gtcagc 5'

En negreta s'ha indicat la part de la seqüència dels oligonucleòtids que restituïa les dianes dels enzims de restricció *Kpn* I (oligonucleòtid 1d) i *Sa*I (oligonucleòtid 4d).

Material i Mètodes

En el primer intent es varen assajar tres concentracions diferents (1,5, 2,0 i 2,5 mM) de sals i, com sempre cal fer en aquest tipus de proves, un blanc, en el qual el DNA motllo era substituït per aigua, per conèixer si hi havia reaccions inespecífiques per contaminació de la mostra. El protocol seguit és el que es descriu a continuació:

1. En les reaccions de la PCR és convenient preparar un barreja de tots els components abans de fer les diverses reaccions ja que així es disminueix l'error en al·liquotar les diverses mesures. La barreja es preparà per 5 reaccions i va consistir en:

47,5 µl d'amortidor 10x

80 µl de la barreja que conté els quatre dNTPs en una concentració 2 mM per cada un

9 µl de l'oligonucleòtid 1d (0,1 µg/µl)

9 µl de l'oligonucleòtid 4d (0,1 µg/µl)

Composició de l'amortidor de la PCR 10x:

15 mM MgCl₂

500 mM KCl

100 mM Tris-HCl, pH 8,5

0,1% Gelatina

1,0% Tritó X-100

2. S'afegeixen 29,1 µl d'aquesta barreja a cada un dels tubs de la reacció. En tres dels tubs es dugueren a terme les reaccions amb les diferents concentracions de MgCl₂ mentre el quart tub era utilitzat com a blanc.
3. Així, en els tubs 2 i 3 s'addicionaren respectivament, 5 i 10 µl de 10 mM MgCl₂ per tal d'aconseguir unes concentracions finals de 2,0 i 2,5 mM de MgCl₂.
4. A continuació s'afegiren 5 µl de la solució de DNA motllo (1 ng), és a dir, el DNA producte del lligament dels quatre fragments (apartat II.C.2.c.), purificat per Gene-Clean a cada reacció, a excepció del blanc on s'hi afegiren 5 µl d'aigua destil·lada.
5. Aquesta barreja s'escalfa 5 minuts a 90 °C i seguidament es posa en gel, centrifugant-se al cap de 10 minuts, durant 5 segons a 12.000 xg.
6. El següent pas consisteix a diluir l'enzim amb l'amortidor d'amplificació 1x sense MgCl₂. S'afegeixen 0,5 unitats de polimerasa Taq de *Thermus aquaticus* (Promega) diluïda a cada reacció.
7. S'ajusta la reacció fins a 100 µl amb aigua destil·lada autoclavada.
8. La reacció es segella amb una parella de gotes d'oli de parafina per tal d'evitar l'evaporació durant els successius cicles tèrmics d'amplificació.
9. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR): Emprant un aparell de Perkin-Elmer (Cetus, EEUU) els cicles tèrmics emprats per la PCR foren:
S₁: 10 segons de temperatura ambient a 94°C
S₂: 1 minut a 94°C

Material i Mètodes

Aquest cicle només es dugué a terme un cop i serveix per desnaturalitzar inicialment el DNA motllo.

S₁: 1,5 minuts a 94°C (DESNATURALITZACIÓ)

S₂: 10 segons de 94°C a 48°C

S₃: 45 segons a 48°C (APARELLAMENT)

S₄: 10 segons de 48°C a 72°C

S₅: 2 minuts a 72°C (EXTENSIÓ)

Aquest cicle es repetí durant 40 vegades, i en el darrer cicle l'etapa d'extensió s'allargà fins a 5 minuts per assegurar la finalització completa de la síntesi del nou DNA i finalment es baixà la temperatura a 4°C on es mantingué de forma indefinida.

En posteriors intents d'amplificació, s'ha utilitzat l'aparell bio-med Thermocycler 60 B. Braun (RFA). En aquests casos també es va substituir la polimerasa Taq per la polimerasa Vent de *Thermococcus litoralis* (New England Biolabs). Això implicà utilitzar MgSO₄, la concentració de la qual es fixà a 2,0 mM, que substituïa el MgCl₂, i l'amortidor requerit per la Vent i subministrat per New England Biolabs. Les concentracions de dNTPs i dels oligonucleòtids encebadors es mantingueren tal i com s'ha descrit anteriorment.

10. Un cop finalitzades les reaccions de la PCR, s'extreu la solució de reacció intentant no endur-se l'oli de parafina i s'analitza el rendiment carregant-ne un 5-10% en un gel d'agarosa al 2%. Si no es vol utilitzar de forma immediata, és convenient desar les mostres a -20°C.
11. Analitzada electroforèticament la reacció de la PCR, es procedí a concentrar el producte amplificat. La concentració es dugué a terme per precipitació del DNA emprant acrilamida com a agent co-precipitant, la qual s'ha vist que no interfereix en posteriors reaccions de manipulació del DNA com podrien ser lligaments, digestions enzimàtiques i reaccions de seqüenciació, entre altres.
12. La precipitació del DNA amb acrilamida com a co-precipitant fou tal i com es descriu a continuació:
 - 12.1. En un tub eppendorf es barreja la solució que contenia el DNA amb solució salina 3M d'acetat sòdic, pH 5,5 fins aconseguir un volum final de 400 µl 0,3 M acetat sòdic.
 - 12.2. S'afegeixen 5 µl d'una solució 0,25% d'acrilamida. Agitar fortament en vòrtex.
 - 12.3. S'addicionen 2,5 volums d'etanol fred i es barreja invertint el tub diverses vegades.
 - 12.4. Aquesta mescla es deixa 30 minuts a -70°C i a continuació se centrifuga 15 minuts a 12.000 xg
 - 12.5. El sobrenedant s'elimina per aspiració i el sediment es renta amb una solució d'etanol al 70% per inversió del tub diverses vegades.
 - 12.6. La barreja es torna a centrifugar 5 minuts a 12.000xg, s'elimina el sobrenedant i el sediment s'asseca bé al buit o bé sobre la taula de treball durant uns 5 minuts.
 - 12.7. El sediment obtingut d'aquesta manera, es va resuspendre en 1/3 o 1/4 del volum inicial de la solució de reacció, amb aigua destil·lada autoclavada.

Degut a la potència de la tècnica i per tal d'evitar la més mínima contaminació del DNA motllo, és imprescindible mantenir al màxim les condicions d'esterilitat dels reactius i l'instrumental fins al punt que

s'aconsella destinar un joc de pipetes automàtiques per a l'ús exclusiu de la PCR. No cal dir que s'ha d'aplicar el màxim de cura i atenció en la manipulació dels diferents components de la reacció de PCR.

II.C.3. Manipulació dels vectors derivats de M13

Els bacteriòfags derivats de M13, com ara M13mp18 i M13mp19 (Yanisch-Perron i col., 1985) tenen com a hoste cèl.lules d' *E.coli* i presenten l'avantatge davant dels altres vectors plasmídics utilitzats en aquest treball, que el seu material genètic es pot obtenir tant en forma de cadena senzilla (ssDNA) en els virions, com en forma de doble cadena o forma replicativa (RFDNA) dins de les cèl.lules infectades. Així doncs, mitjançant el clonatge en aquests bacteriòfags del DNA forani, és possible obtenir quantitats relativament elevades de ssDNA, el qual pot ésser emprat per a la seqüenciació mitjançant el mètode dideoxi o per a la mutagènesi dirigida per oligonucleòtid. L'ús dels vectors derivats de M13 implica una sèrie de tècniques particulars que es detallaran en aquest apartat.

II.C.3.a. INTRODUCCIÓ

El fag M13 és un fag filamentós d'*E.coli* el material genètic del qual és DNA de cadena senzilla (ssDNA) (+) de 6400 pb. Només és capaç d'infectar aquelles cèl.lules que posseeixen filaments F. Un cop dins de la cèl.lula el DNA víric passa a DNA doble cadena, el que s'anomena forma replicativa (RF) i origina durant els primers 15-20 minuts d'infecció unes 100-200 còpies de RF DNA circular. A continuació aquestes comencen a produir cadena senzilla (+) pel sistema del cercle rodant. Aquestes cadenes de DNA travessen la membrana de la cèl.lula bacteriana hoste on s'encapsulen per proteïnes víriques. La unió d'aquestes proteïnes a les molècules de DNA de cadena senzilla constitueixen el que s'anomenen virions, els quals surten al medi. Atès que el genoma viral no s'inserta en una estructura preformada, com succeeix en altres fags, com és el cas del fag lambda, teòricament, no hi ha un límit estricte pel tamany del ssDNA que pot ésser encapsulat i d'aquesta manera ens trobem que la longitud de la partícula vírica filamentosa és variable segons la quantitat de DNA que contingui.

La replicació dels fags filamentosos es produeix en harmonia amb la de la cèl.lula hoste, la qual excreta virions de forma continuada i no és en general lisada sinó que segueix creixent, encara que amb una taxa de replicació menor que la de cèl.lules no infectades. Aquest mecanisme particular possibilita l'acumulació d'un gran nombre de partícules fàgiques en el medi. En cultius confluents els bacteriòfags derivats de M13 no produeixen calves de lisi sinó de retard en el creixement, per la qual cosa presenten certa terbolesa.

Durant aquest treball s'ha utilitzat un dels vectors derivats de M13 descrit per Yanisch-Perron i col.laboradors el 1985 : M13mp19 (Figura II.B.2.). Aquest vector té un DNA de 7,25 kb, consistent en el DNA de M13 al qual s'ha introduït un segment de l'operó lac que conté les regions reguladores del mateix i els 146 primers codons del gen de la β -galactosidasa (gen *lacZ*), que codifiquen per un fragment inactiu de l'enzim

anomenat α . En l'extrem 5' de l'esmentada seqüència es troba un lloc de clonatge múltiple situat en el mateix marc de lectura, i que possibilita la inserció de fragments de DNA foranis.

La soca d'*E.coli* que s'emprà en aquest treball fou la soca TG1 i presenta diverses característiques remarcables:

- Posseeix en el seu genoma una delecció de l'operó *lac* i de gen veïns que són necessaris pel metabolisme de síntesi de la prolina: $\Delta(lac-proAB)$.
- Duen un episoma F' portador dels gens *proAB* i un gen *lacZ* amb les seves regions reguladores que està mancat dels codons pels aminoàcids N-terminals de la β -galactosidasa, codificant un fragment inactiu de l'enzim anomenat ω .

Les soques amb aquestes característiques es cultiven en plaques de medi mínim com ara M9 (apartat II.B.3.). Aquest medi està mancat de prolina la qual cosa assegura el manteniment del factor F' i per tant totes les cèl.lules que creixin en cultiu tindran el filament F', el qual és indispensable per possibilitar la infecció pels fags M13mp19.

Les cèl.lules hoste per M13mp19 han de ser *lac*⁻. Així quan són infectades per un bacteriòfag derivat de M13 resulten *lac*⁺ perquè els fragments α i ω de la β -galactosidasa, que són codificats pel fag i pel filament F' respectivament, són capaços d'unir-se i formar una proteïna amb activitat β -galactosidasa. Aquest fenomen es coneix com α -complementació. Si es fa créixer sobre una placa de LB un tapet de cèl.lules confluents infectades per un bacteriòfag del tipus M13mp19 i a més, s'ha afegit al medi IPTG (inductor gratuït de l'operó *lac*) i X-gal (substrat que adquireix coloració blavosa en ésser processat per la β -galactosidasa), s'observà que les calves de retard produïdes per aquest bacteriòfag tindran coloració blavosa. En canvi, si l'esmentat M13mp19 porta un fragment clonat en el lloc múltiple de clonatge que interromp el marc de lectura del fragment α , aleshores s'impossibilita la posterior α -complementació amb el fragment ω i les calves són blanquinoses. Aquesta estratègia permet diferenciar els clons M13 portadors d'un insert d'aquells que no en duen.

II.C.3.b. PROPAGACIÓ DELS VECTORS DERIVATS DE M13

La propagació del vector M13mp19 tant en cultiu líquid com en placa requereix condicions sensiblement diferents a les dels altres vectors utilitzats en aquest treball, però tenen en comú el requeriment d'esterilitat en les condicions de treball.

II.C.3.b.(1). Cultiu en placa

Per al cultiu en placa que facilita l'obtenció de clons aïllats de M13mp19 s'ha seguit el protocol que es detalla a continuació:

1. Es fa créixer un cultiu de nit de 5 ml de LB inoculat a partir d'una colònia de TG1 crescuda en plaques de M9.
2. S'escalfa fins a fondre'l, agar tou o de cobriment prèviament preparat i esterilitzat. Es distribueixen 3,5 ml d'aquest agar tou en una sèrie de tubs estèrils (tants com transfeccions es vulguin fer) i es guarden en un bloc tèrmic a 47°C per evitar la solidificació de l'agar.
3. En cada tub s'afegeixen:

- IPTG 20 mg/ml (en TE) 20 µl
- X-gal 20 mg/ml (en dimetilformamida) 20 µl
- Cultiu de nit de TG1 150 µl

- Un volum variable de la dissolució que conté el bacteriòfag. Tan pot ser una mescla de transformació de la soca hoste amb RF DNA (apartat II.C.3.d.(1). com una dilució d'una dissolució de partícules fàgiques (apartat II.C.3.b.(2).).

La dissolució de IPTG es prepara dissolent 200 mg de IPTG en 7-8 ml de TE (o aigua), ajustant-ho a 10 ml un cop dissolt i esterilitzant-la per filtració. Aquesta solució es pot guardar aliquidada i congelada a -20°C. No és recomanable conservar-la massa temps d'aquesta manera ja que el IPTG és força inestable en dissolució.

La dissolució de X-gal es prepara dissolent en un tub de vidre o propilè X-gal en dimetilformamida per obtenir una concentració final de 20 mg/ml. La solució s'aliquota en eppendorf i degut a la fotosensibilitat del X-gal és recomanable embolicar-los en paper d'alumini. Es guarda a -20 °C. No és necessari esterilitzar la solució per filtració.

4. Barrejar suaument, però sense entretenir-se i abocar sobre una placa de LB-1,5% agar atemperada prèviament. Es fa girar la placa suaument per aconseguir una distribució uniforme de l'agar de cobriment.
5. Deixar reposar les plaques uns minuts a temperatura ambient, fins que l'agar solidifiqui. Incubar les plaques a 37°C en posició invertida. A partir de les 8-12 hores les calves provocades pel fag han de ser sensiblement visibles. Cada calva aïllada deriva d'una única molècula de DNA viric inicial.

II.C.3.b.(2). Cultiu líquid

Pel cultiu líquid de M13mp19 cal començar d'un únic clon, ja sigui una calva d'un cultiu en placa com s'ha explicat en l'apartat immediatament anterior o bé d'una solució de virions obtinguda anteriorment a partir d'un clon. El protocol que s'ha seguit és el que es detalla a continuació:

Material i Mètodes

1. Créixer durant la nit anterior un cultiu de 3 ml de LB inoculat a partir d'una colònia de TG1 crescuda en plaques de M9.
2. Barrejar en un tub estèril 3 ml de medi LB líquid i afegir-hi 30 μ l (1:100) del cultiu de nit de TG1. Amb un escuradent estèril tocar la superfície de la calva que es vulgui cultivar o mullar-lo en la solució de partícules fàgiques.
3. Aquesta barreja es deixa créixer incubant-la a 37°C amb agitació. Per tal de minimitzar la possibilitat de deleccions espontànies en el DNA del fag és convenient no deixar-ho créixer més de 5 hores.
4. Passat aquest temps el cultiu es distribueix de forma estèril en tubs eppendorf en al·iquotes de 1,5 ml. Centrifugar en minifuga 10 minuts a 12.000 xg.
5. Retirar estèrilment el sobrenedant a nous tubs eppendorf amb cura de no arrossegar sediment que conté les cèl.lules. Aquest sediment es pot emprar per extreure'n el RF DNA del fag.
6. El sediment es torna a centrifugar 10 minuts a 12.000 xg i es passa novament el sobrenedant a altres tubs eppendorf de forma estèril. La solució de virions que s'ha obtingut d'aquesta manera pot guardar-se indefinidament a -20°C sense perdre la capacitat d'infecció, o bé pot servir per obtenir-ne el ssDNA del fag.

Les partícules fàgiques de M13 i els seus derivats són bastant resistents a les condicions ambientals i poden dispersar-se fàcilment. Per això és convenient, quan es treballa amb aquest tipus de bacteriòfags, prendre el màxim de mesures de precaució per tal d'evitar els riscos de contaminació. Així, apart de les mesures d'esterilitat que ja s'han emfatitzat en apartats anteriors, és convenient submergir les puntes de les pipetes que s'han emprat durant la manipulació, uns 10-15 minuts en una solució de dietilpirocarbonat al 0,1% per alliberar-les de possibles partícules fàgiques. Degut al caràcter tòxic i a la volatilitat del dietilpirocarbonat aquest tractament és aconsellable dur-lo a terme en una campana d'extracció de gasos.

II.C.3.c. OBTENCIÓ DEL DNA DE VECTORS DERIVATS DE M13

A partir d'un cultiu líquid establert com s'ha descrit en l'apartat anterior és possible obtenir tant la forma de doble cadena (RF DNA) com la forma de cadena senzilla (ssDNA).

II.C.3.c.(1). Obtenció de RF DNA

1. Establir un cultiu líquid del clon de M13mp desitjat tal i com s'ha descrit en l'apartat II.C.3.b.(2) i centrifugar-lo 10 minuts a 12.000 xg per tal d'obtenir el sediment cel.lular.
2. Resuspendre les cèl.lules en 100 μ l totals de la Solució I de lisi alcalina (apartat II.C.1.a.(1)). És convenient de reunir-les totes en un sol tub perquè la densitat cel.lular és menor que la d'un cultiu de cèl.lules transformades amb un altre plasmidi.
3. El RF DNA del fag s'extreu seguint el mateix protocol de lisi alcalina descrit en l'apartat II.C.1.a.(1).

II.C.3.c.(2). Obtenció del ssDNA a petita escala

Per a l'obtenció de DNA de cadena senzilla dels bacteriòfags amb la finalitat de seqüenciar-lo es fa servir el protocol que es descriu a continuació, el qual es basa en precipitar els virions amb polietilenglicol (PEG) i el posterior alliberament del DNA de la seva càpsula proteica per desproteïnitació amb fenol.

1. Establir un cultiu líquid del clon de M13mp19 desitjat tal i com s'ha descrit en l'apartat II.C.3.b.(2) i centrifugar-lo dues vegades durant 10 minuts a 12.000 xg per tal d'obtenir la solució de virions lliure de cèl·lules.
2. Prendre 1,2 ml d'aquesta solució i afegir-hi 0,3 ml de la solució de PEG8000 al 20%, 2,5 M NaCl. Barrejar-ho bé per inversió del tub. La solució de PEG i NaCl s'esterilitza per filtració i es pot guardar a temperatura ambient.
3. Deixar reposar durant 30 minuts a temperatura ambient.
4. Centrifugar durant 15 minuts a 12.000 xg. Retirar i descartar el sobrenedant en el qual hi romandran aquelles partícules fàgiques que no hagin precipitat.
5. Tornar a centrifugar durant 2 minuts i eliminar tot el sobrenedant amb una pipeta pasteur estirada. Un cop eliminat tot el sobrenedant, ha de fer-se visible un petit sediment de virions. En cas que això no sigui així, no és necessari continuar amb el procés d'extracció.
6. Afegir 100 µl de TE i resuspendre el sediment mitjançant agitació vigorosa en vòrtex.
7. Afegir 50 µl de fenol amortit (apartat II.C.1.a). Barrejar amb vòrtex durant 15-30 segons. De manera opcional, es pot mantenir a temperatura ambient durant 10 minuts i barrejar novament amb vòrtex 15-30 segons.
8. Centrifugar en minifuga a 12.000 xg durant 5 minuts. Transferir la fase aquosa a un nou tub.
9. Afegir a la fase aquosa 50 µl de cloroform. Barrejar amb vòrtex.
10. Centrifugar en minifuga a 12.000 xg durant 5 minuts. Transferir la fase aquosa a un nou tub.
11. A continuació cal precipitar el ssDNA per tal de concentrar-lo, per la qual cosa s'afegeix 0,1 volums d'acetat sòdic 3 M (pH 5,5-6,0) i 2,5 volums d'etanol absolut fred. Manténir a -70°C com a mínim 1 hora o bé alternativament durant tota la nit a -20°C.
12. Centrifugar en minifuga 15 minuts a 12.000 xg, preferentment a 4°C.
13. Rentar el precipitat amb 1 ml d'etanol absolut fred. Sovint aquest sediment no és visible.
14. Assecar el sediment i resuspendre'l en TE. De forma rutinària es va resuspendre en un volum de 22 µl dels quals 2 µl foren carregats en un gel d'agarosa al 0,8% amb bromur d'etidi. Si l'extracció ha funcionat correctament, s'ha d'apreciar una clara banda corresponent al ssDNA. Es aconsellable quan es fa aquesta extracció, treballar de forma simultània amb un clon del vector original el qual pot ésser emprat com a marcador de massa molecular en el gel d'electroforesi. Aquest protocol permet obtenir entre 5-10 µg de ssDNA per ml de cultiu original, i pot utilitzar-se directament per les reaccions de seqüenciació

II.C.3.c.(3). Obtenció del ssDNA a gran escala

La quantitat de ssDNA obtinguda segons el protocol que s'acaba de descriure no és suficient quan la finalitat és realitzar mutagènesi dirigida per oligonucleòtid, motiu pel qual, en aquests casos, se segueix el següent.

1. Es fa créixer durant la nit anterior un cultiu de 3 ml de LB líquid inoculat amb una colònia d'*E.coli* TG1 que ha estat crescuda en una placa de medi mínim M9.
2. Es barregen en un flascó de 250 ml estèril, 50 ml de medi LB líquid i 0,5 ml del cultiu de nit de TG1, i s'hi afegeixen 300 µl de la solució de virions del clon escollit obtinguda com s'ha descrit en l'apartat II.C.3.b.(2).
3. Aquesta barreja s'incuba a 37°C en agitació constant (250 r.p.m.) durant 5 hores.
4. Centrifugar a 5.000 xg durant 30 minuts a 4°C en una centrífuga Sorvall.
5. Transferir el sobrenedant a un nou tub. Afegir-hi 0,2 volums de la solució de PEG8000 20% i 2,5 M NaCl, mesclar-ho bé i deixar durant 1 hora a 4°C.
6. Centrifugar a 5.000 xg durant 20 minuts a 4°C en una centrífuga Sorvall i descartar el sobrenedant.
7. Tornar a centrifugar en les mateixes condicions durant 5 minuts i procurar que el tub estigui orientat de la mateixa manera. Altrament, el sediment es dispersarà per les parets del tub de centrifuga dificultant-ne la recuperació. Retirar el sobrenedant amb una pipeta estirada.
8. Resuspendre el sediment en 500 µl de TE acuradament per tal de recuperar el màxim de sediment i transferir-ho a un tub eppendorf.
9. Centrifugar en minifuga 5 minuts a 12.000 xg i transferir el sobrenedant a un nou tub eppendorf procurant no arrossegar part del sediment cel.lular.
10. Afegir 0,2 volums de la solució de PEG8000 20%, 2,5 M NaCl. Barrejar amb el vòrtex, suaument i deixar 15 minuts a temperatura ambient o tota la nit a 4°C.
11. Centrifugar durant 15 minuts a 12.000 xg. Retirar i descartar el sobrenedant en el qual hi romandran aquelles partícules fàgiques que no hagin precipitat.
12. Tornar a centrifugar durant 2 minuts i eliminar tot el sobrenedant amb una pipeta pasteur estirada. Un cop eliminat tot el sobrenedant ha de fer-se visible un petit sediment de virions. En cas que això no sigui així, no és necessari continuar amb el procés d'extracció.
13. Addicionar 500 µl de TE i resuspendre el sediment mitjançant agitació vigorosa en vòrtex.
14. Afegir 200 µl de fenol amortit (apartat II.C.1.a.). Barrejar amb vòrtex durant 15-30 segons. Mantenir a temperatura ambient durant 10 minuts i barrejar novament amb vòrtex 15-30 segons.
15. Centrifugar en minifuga a 12.000 xg durant 5 minuts. Transferir la fase aquosa a un nou tub.
16. Repetir 14 i 15.
17. Afegir a la fase aquosa 200 µl de cloroform. Barrejar amb vòrtex.
18. Centrifugar en minifuga a 12.000 xg durant 5 minuts. Transferir la fase aquosa a un nou tub.
19. Repetir els passos 17 i 18.

Material i Mètodes

20. A continuació cal precipitar el ssDNA per tal de concentrar-lo, per la qual cosa s'afegeix 0,1 volums d'acetat sòdic 3 M (pH 5,5-6,0) i 2,5 volums d'etanol absolut fred. Mantenir a -70°C com a mínim 1 hora o bé alternativament durant tota la nit a -20°C.
21. Centrifugar en minifuga 15 minuts a 12.000 xg, preferentment a 4°C.
22. Rentar el precipitat amb 1 ml d'etanol absolut fred. Sovint aquest sediment no és visible.
23. Assecar el sediment i resuspendre'l en 30 µl de TE.

El ssDNA obtingut d'aquesta manera pot ésser emprat per dur a terme les reaccions de mutagènesi, després de comprovar-ne la presència i la puresa en un gel de 0,8% agarosa amb bromur d'etidi d'una al·lquota de 0,5 µl. La concentració de ssDNA present en la solució i la puresa del mateix es pot estimar realitzant un espectre entre 220 i 300 nm d'una dilució 1:100 en aigua i tenint en compte que 1 U.D.O. a 260 nm és equivalent a 40 µg/ml de ssDNA.

II.C.3.d. MANIPULACIÓ DEL RF DNA

Tal i com hem vist en l'apartat II.C.3.c.1., és possible obtenir la forma replicativa dels vectors derivats de M13, que no és sinó el DNA de doble cadena circular. Per a la manipulació dels vectors derivats de M13 es segueixen els mateixos protocols que els emprats pels vectors plasmídics que ja han estat descrits en l'apartat II.C.1, llevat de les transformacions per a les quals es varià el protocol degut a la diferent naturalesa de propagació de tots dos tipus de vectors.

II.C.3.d.(1). Transformació de cèl.lules competents d'*E.coli* amb RF DNA de bacteriòfags

L'obtenció de cèl.lules competents es realitzà segons el que ja s'ha descrit en l'apartat II.C.1.f. El procediment que es va seguir per a la seva transformació amb RF DNA de vectors derivats de M13 és el que es descriu a continuació:

1. Si es fan servir cèl.lules competents guardades a -70°C, deixar-les descongelar en gel picat.
2. Afegir a cada mostra de cèl.lules competents un màxim de 50 ng de RF DNA dissolt en un volum que sigui com a màxim 1/10 del volum de les cèl.lules. Agitar amb molta suavitat.
3. Incubar en gel durant 30 minuts.
4. Transferir els eppendorf a un bany de 42°C durant 2 minuts. Tornar els tubs al gel i deixar-ho uns 5 minuts.
5. Afegir 0,5 ml de medi LB líquid i addicionar-ho a la barreja que conté IPTG, X-gal i cèl.lules d'un cultiu de nit que es prepara com s'ha descrit en l'apartat II.C.3.b.(1) i se sembra en una placa de LB-agar. El volum sembrat és variable dependent del número de transformants esperats.
6. Incubar les plaques a 37°C, de forma invertida, fins que s'observin les calves.

II.C.3.e. SEQÜENCIACIÓ DE ssDNA PEL MÈTODE DE SANGER

El gen sintètic de la ribonucleasa de pàncreas humà fou clonat en M13mp19 amb la finalitat de realitzar mutagènesi dirigida per oligonucleòtid i posterior seqüenciació. Les seqüenciacions amb M13mp19 i les construccions que es varen derivar d'aquest durant el treball que es presenta, es realitzaren d'acord amb el mètode de Sanger, que es passa a descriure a continuació.

II.C.3.e.(1). Introducció

El mètode de seqüenciació de Sanger, o del dideoxi (Sanger i col., 1977; Sanger i Coulson, 1978), es basa en la síntesi d'una de les cadenes de DNA fent servir com a motllo la cadena complementària (aquella que volem seqüenciar), mitjançant l'ús d'una DNA polimerasa. La síntesi s'inicia a partir d'un lloc prefixat, que correspon al lloc on ha hibridat prèviament, un oligonucleòtid que actuarà com a encebador o iniciador per a la polimerasa. Aquesta síntesi s'interromp, en una segona fase mitjançant l'addició de nucleòtids modificats que impedeixen la polimerasa de proseguir la síntesi d'aquesta cadena.

Els nucleòtids modificats que s'utilitzen són els 2',3'-dideoxinucleòsid 5'-trifosfat (ddNTPs), als quals els manca el grup 3'-OH de la desoxiribosa, la qual cosa impedeix la formació de l'enllaç fosfodièster i per tant la polimerització de la cadena que s'està sintetitzant. Si s'utilitza una mescla adequada de dNTPs en la qual, un dels quatre dNTPs ha estat substituït pel seu corresponent ddNTP, en un cert nombre de casos la polimerasa aturarà la síntesi per addició del ddNTP, cosa que permet obtenir una població de cadenes sintetitzades de nou amb diferents longituds. Si aquest procés es realitza pels quatre dNTPs en quatre reaccions separades, en cada una de les quals s'ha substituït exclusivament un dels dNTP pel seu ddNTP corresponent, obtindrem la informació completa sobre tota la seqüència del DNA motllo.

Les cadenes de diferents longituds que es generen amb aquest mètode poden ésser separades en una electroforesi d'alta resolució i es visualitzen per autoradiografia. Això és possible si en la primera part de la síntesi s'afegeix un dNTP marcat radioactivament. En aquest treball s'utilitzà tant deoxiadenosina 5'-(α [^{35}S]tio) trifosfat o [α - ^{35}S]dATP, com deoxicitidina 5'-(α [^{35}S]tio) trifosfat o [α - ^{35}S]dCTP.

El mètode de seqüenciació de Sanger permet utilitzar com a motllo per a la reacció tan ssDNA com dsDNA, tot i que, com s'ha comprovat en aquest treball, la seqüenciació amb ssDNA genera una millor resolució.

El mètode de seqüenciació dideoxi es pot subdividir en quatre etapes, que s'examinaran a continuació: aïllament del DNA motllo que es vol seqüenciar, reaccions de seqüenciació que inclouen el marcatge i l'extensió, electroforesi dels productes d'aquestes reaccions i la detecció per autoradiografia.

II.C.3.e.(2). Etapas de la seqüenciació

Aïllament del DNA motllo

Durant aquest treball, com ja s'ha comentat, el DNA motllo emprat per a seqüenciar fou tant de doble cadena, obtingut com s'ha descrit en l'apartat II.C.1.a.(1), com de cadena senzilla d'un vector derivat de M13 l'obtenció del qual es fonamenta en el protocol descrit en l'apartat II.C.3.c.(2).

Reaccions de seqüenciació

Per a les reaccions de seqüenciació s'ha emprat el sistema "T7 Sequencing Kit" manufacturat per Pharmacia. El dNTP marcat fou [α - 35 S]dATP o [α - 35 S]dCTP d'activitat específica 1000-1500 Ci/mmol en dissolució aquosa 10 mCi/ml (subministrat per Amersham).

A. Aparellament de l'oligonucleòtid encebador

1. Barrejar en un eppendorf: (un per cada reacció d'aparellament)

Dissolució de ssDNA o dsDNA (aproximadament 0,1-0,2 µg/ml)	10 µl
Dissolució d'oligonucleòtid encebador ("primer")	2 µl
Amortidor d'aparellament o hibridació	2 µl

Quan el DNA que es vol seqüenciar és de doble cadena cal desnaturalitzar-lo prèviament a l'aparellament amb l'oligonucleòtid, per a la qual cosa es segueix el següent protocol:

- La concentració del DNA motllo s'ha d'ajustar, de forma aproximada a 0,15-0,25 µg/ml
- Per la desnaturalització es barregen 8µl de la solució de dsDNA i 2 µl de 2 M NaOH. S'agita breument en vòrtex i es deixa 10 minuts a temperatura ambient.
- S'addicionen 3 µl de 3 M acetat sòdic pH 5,5-6,0, 7 µl d'aigua destil.lada i 60 µl d'etanol absolut, es barreja i es deixa a -70°C durant 15 minuts.
- El DNA precipitat es col.lecta per centrifugació 10 minuts a 12.000 xg. Es descarta el sobrenedant i es fa un rentat amb 70% etanol fred.
- Es torna a centrifugar durant 10 minuts i el sediment s'asseca al buit durant un parell de minuts.
- Finalment es redissol en 10 µl d'aigua destil.lada. El DNA obtingut d'aquesta manera està preparat per dur a terme la reacció d'aparellament.

L'oligonucleòtid encebador que s'utilitzà durant les reaccions de seqüenciació varià segons els requeriments experimentals. Així, en la seqüenciació del dsDNA inicial s'utilitzaren el "reverse primer" i "l'universal primer". Per a la seqüenciació del ssDNA s'empraren com a encebadors, "l'universal primer", de forma rutinària, i en successius treballs els mateixos oligonucleòtids que han estat emprats per

Material i Mètodes

mutagènesi dirigida. Aquests oligonucleòtids corresponen a seqüències internes del gen i complementen la cadena del gen clonada en la cadena (+) dels vectors derivats de M13.

2. Un cop s'han barrejat el DNA motllo i l'encebador en amortidor d'aparellament, s'agita suaument en vòrtex i es centrifuga per reunir el que pugui haver quedat en les parets del tub.
3. Si el DNA és de doble cadena s'incuba a 70°C durant 15 minuts i es deixa que el bany on s'ha incubat el tub es refredi fins aproximadament 30°C. A continuació es deixa 10 minuts a temperatura ambient. D'aquesta manera s'aconsegueix un aparellament lent i específic.

Si altrament, el DNA motllo és de cadena senzilla, s'incuba a 70° durant 15 minuts i seguidament es deixa 10 minuts a temperatura ambient.

La mescla d'aparellament que s'ha obtingut es pot utilitzar immediatament o bé guardar a -20°C.

B. Preliminars de les reaccions de seqüenciació

4. Mentre el tub eppendorf amb la mescla d'aparellament està incubant-se a temperatura ambient es preparen quatre eppendorf, per cada motllo de DNA que es vol seqüenciar o bé per cada encebador que s'utilitzi per un únic motllo, i es marquen amb les lletres G, A, T i C. S'hi afegeixen 2,5 µl de les solucions de lectura curta "Read short" corresponents i es col·loquen en un bany a 37°C. En el supòsit que només es volgués seqüenciar amb una de les bases del DNA (Single-Track sequencing), es prepara només un tub amb la solució corresponent a aquesta base.
5. Utilitzant l'amortidor de dilució de l'enzim DNA polimerasa de T7, es dilueix una solució concentrada d'aquest enzim a 1,5 U/µl. El volum necessari és variable dependent del número de reaccions que es vulguin dur a terme, i a l'hora de calcular-lo cal tenir en compte que són necessaris 2 µl de la solució d'enzim diluït per cada motllo de DNA que es vulgui seqüenciar.

C. Reacció de marcatge

6. La barreja d'aparellament es desa en gel.
7. S'afegeix, preferentment per aquest ordre:

Barreja de marcatge dATP ("labelling mix A") o dCTP ("labelling mix C")	3 µl
DNA polimerasa de T7 (1,5 U/µl)	2 µl
[α- ³⁵ S]dATP o [α- ³⁵ S]dCTP (10 µCi/µl, 1000-1500 Ci/mmol)	0,5-1 µl

8. Centrifugar breument, seguit d'agitació en vòrtex suau i incubar a temperatura ambient durant 2-3 minuts. Durant la reacció de marcatge la polimerasa sintetitza, a partir de l'encebador, una cadena complementària a la del DNA motllo amb la particularitat que es troba marcada radioactivament amb [α-³⁵S]dATP o [α-³⁵S]dCTP. La longitud de les cadenes un cop finalitzada la reacció de marcatge, varia entre 10-15 a 100-200 nucleòtids.

D. Reaccions de finalització

9. Es transfereixen 4,5 µl de la barreja de reacció de marcatge a cada un dels quatre tubs de finalització que han estat preincubats a 37°C. Afegir la gota de reacció de marcatge de forma que es barregi immediatament amb la de la barreja de finalització. Incubar a 37°C durant 4-5 minuts. Cada barreja de finalització conté els quatre dNTPs a 80 µM i a més el ddNTP, que atura la síntesi i que dona nom a la reacció, a una concentració menor (8 µM).
10. Afegir a cada tub 5 µl de dissolució d'aturada de manera que la barreja es dugui a terme de la manera més ràpida possible. Aquesta solució d'aturada és també alhora, un amortidor de càrrega pel gel.
11. Donar un breu pols de centrifuga. Guardar les mostres a -20°C si es volen utilitzar immediatament per carregar un gel de seqüenciació.

Durant la reacció de finalització, la polimerasa va allargant les cadenes que havien començat a ésser sintetitzades en la reacció de marcatge. Atesa la gran concentració de dNTPs aquesta elongació és molt ràpida. Quan l'enzim incorpora un ddNTP, la síntesi de la cadena s'atura.

Les condicions descrites en aquest protocol són adequades per a poder seqüenciar des d'uns 20-30 nucleòtids de l'encebador fins a uns 400 nucleòtids.

II.C.3.e.(3). Gel de seqüenciació

Per tal de separar les diferents cadenes sintetitzades i poder determinar la seqüència del DNA mitjançant autoradiografia, les mostres provinents de les reaccions de seqüenciació han d'ésser sotmeses a electroforesi. En aquest treball, s'ha utilitzat per tal de realitzar l'electroforesi, el sistema Macrophor de la casa Pharmacia-LKB.

A. Preparació de la dissolució del gel

Els gels que es fan servir en la seqüenciació són 8% acrilamida, 7 M urea. Tots els reactius emprats en la preparació del gel han de ser del major grau de puresa possible. Durant aquest treball s'ha emprat acrilamida de Serva cristallitzada 4x i la urea, també de Serva, de grau de puresa per biologia molecular. Com que l'acrilamida no polimeritzada és un potent neurotòxic, és convenient treballar amb guants durant tot el procés de preparació del gel.

1. Es prepara una solució 19% acrilamida-1%bisacrilamida en aigua Mono-Q™. D'aquesta solució se'n pot preparar per diversos gels i guardar-se a 4°C protegida de la llum.

Material i Mètodes

2. Es barreja en un vas de precipitat de vidre:

Dissolució d'acrilamida:bisacrilamida 19:1	10 ml
Amortidor TBE 5x	20 ml
Urea	21 g

3. Dissoldre la urea escalfant la solució alhora que es barreja amb un agitador magnètic. Anar amb cura per evitar l'evaporació d'aigua.
4. Ajustar la dissolució a 50 ml amb aigua Mono-Q™ en un matrau aforat.
5. Filtrar la solució amb un filtre de 0,22 µm de diàmetre de porus.
6. Degasificar la solució amb una bomba de buit durant 5-10 minuts.

B. Preparació dels vidres d'electroforesi

El sistema MacroPhor fa servir vidres de 0,5 m, un dels quals constitueix alhora la paret d'una placa termostatitzadora. Aquests vidres són sotmesos a un pretractament amb Repel-Silane™ (Pharmacia-LKB) el que constitueix la placa termostatitzadora, i amb Bind-Silane™ (Pharmacia-LKB) el vidre lliure al qual quedarà adherit el gel d'electroforesi.

C. Preparació del gel

1. Es col·loca la placa termostatitzadora sobre el suport proporcionat per l'equip, amb el vidre tractat amb Repel-Silane cara amunt. Posar sobre aquest, a ambdós costats, els espaiadors de 0,2 mm i mantenir-los fixes i el més rectes possible per mitjà d'unes pinces metàliques. És important que els espaiadors no formin ondulacions i estiguin completament enganxats al vidre per tal que, en posar-hi l'altre vidre no es generin bombolles.
2. Inclinar el suport amb la placa termostatitzadora col·locada sobre aquest. Situar sobre la part inferior de la placa el vidre d'electroforesi amb la cara tractada amb Bind-Silane cara avall.
3. Addicionar a la dissolució del gel preparada com s'ha descrit en l'apartat A, 400 µl d'una solució de persulfat amònic al 10% i 40 µl de TEMED. Agitar suaument en horitzontal procurant de no fer bombolles.
4. Abocar immediatament la solució entre els vidres, al mateix temps que es fa pujar el vidre sobre la placa fins dalt de tot, que els vidres queden alineats. Evitar la formació de bombolles en el gel.
5. Un cop s'ha abocat el gel, es posa el suport en posició completament horitzontal i es col·loquen les pinces per fixar amdós vidres i situar la pinta de dents de tauró en la part superior del gel per la seva cara sense dents de manera que en treure-la es formarà una única butxaca.
6. Es deixa reposar com a mínim 1 hora. Per exigències de l'experimental i de forma alternativa es pot deixar polimeritzar durant tota la nit a temperatura ambient.

D. Electroforesi

1. Es netegen bé amb un paper mullat amb aigua la cara del vidre que quedarà en contacte amb els tancs d'electroforesi.
2. Preparar 3 litres d'amortidor TBE a partir de TBE 5x.
3. Situar les cubetes superior i inferior en la capella d'electroforesi. Col·locar el gel amb la placa termostatitzadora cap a fora. Col·locar els elèctrodes i connectar els conductes de la capella amb un bany circulant.
4. Abocar l'amortidor a les cubetes. Amb una xeringa de punta fina, netejar la butxaca única de la urea, restes d'acrilamida i bombolles d'aire que puguin quedar.
5. Fer una electroforesi prèvia del gel ("pre-run") a 2500-3000 V durant 30 minuts a 55°C. Aquesta temperatura s'assoleix fixant-la en el bany que es troba connectat a la placa termostatitzadora.
6. Netejar de nou la butxaca i introduir-hi la pinta de dents de tauró, de tal manera, que la punta d'aquestes penetri mínimament el gel. Durant aquest treball s'ha comprovat que, si prèviament s'ha fet un tractament de les dents amb silicona, en el moment de carregar les mostres aquestes no difonen amb tanta facilitat.
7. Escalfar les mostres a 80°C durant, com a mínim, 2 minuts abans de carregar-les en el gel. Carregar 2 µl de cada mostra i desar-ne la resta a -20°C.
8. Realitzar l'electroforesi a 2500-3000 V i 55°C durant 2-2,5 hores. Això permet llegir a partir d'uns 30-40 nucleòtids a partir de l'encebador.

II.C.3.e.(4). Autoradiografia

1. Col·locar el vidre que porta el gel adherit en una safata amb acètic al 10% durant 15 minuts.
2. Treure el vidre amb el gel i deixar-lo en una estufa a 80°C durant un temps mínim de 1 hora.
3. Un cop el gel està sec, en una habitació a les fosques il·luminada amb llum vermella, col·locar directament sobre el gel una placa d'autoradiografia (Hyperfilm β-max, Amersham) i a sobre un altre vidre d'electroforesi. Unir tots tres components amb unes pinces. Per evitar l'entrada de llum s'embolica el conjunt amb paper d'alumini i bosses opaques.
4. Deixar que l'exposició es dugui a terme per 12 hores.
5. Revelar la placa en una cambra fosca i llegir la seqüència de DNA. Si la marca que s'observa és molt feble es pot posar una altra placa d'autoradiografia a contactar i perllongar el temps d'exposició fins a 48 hores.

II.C.3.f. MUTAGÈNESI DIRIGIDA PER OLIGONUCLEÒTID

II.C.3.f.(1). Introducció

La mutagènesi dirigida per oligonucleòtid és una tècnica que permet introduir qualsevol mutació que es desitgi en una seqüència de DNA coneguda. Existeixen diverses variants de la tècnica, de les quals , en

aquest treball s'ha emprat la desenvolupada per Eckstein i col.laboradors (Taylor, 1985a; Taylor i col., 1985b; Nakamaye i Eckstein, 1986; Sayers i col., 1988). Aquesta variant ha estat comercialitzada per Amersham International en forma d'un sistema anomenat "Oligonucleotide-directed *in vitro* mutagenesis system version 2.1" i que ha estat la que hom a emprat per a l'obtenció dels diferents mutants durant el treball. Aquest sistema presenta una sèrie d'avantatges com són el fet que no requereix cap soca bacteriana especialitzada i és possible de forma rutinària obtenir eficiències de mutagènesi de fins el 95%, àdhuc en el cas d'insercions i delecions.

Les etapes de què consta el mètode de Eckstein es descriuen a continuació i es troben representades en la figura II.C.3.f.(1).1:

1. **Disseny i síntesi de l'oligonucleòtid:** Es dissenya un oligodeoxiribonucleòtid de seqüència complementària a aquella que voldríem modificar llevat d'aquell punt que constitueix la mutació que volem aconseguir.
2. **Aparellament:** L'oligonucleòtid portador de la mutació s'ha d'aparellar amb el DNA motillo, per a l'obtenció del qual se segueix el protocol per a l'obtenció de ssDNA a gran escala descrit en l'apartat II.C.3.c.(3).
3. **Extensió i lligament:** L'oligonucleòtid hibridat amb el motillo s'extén emprant la polimerasa Klenow en presència de lligasa T4, amb la finalitat de generar un DNA de doble cadena, una de les cadenes del qual, és portadora de la mutació. L'extensió es realitza en presència del tionucleòtid dCTP α S en lloc de dCTP, de tal manera que aquest tionucleòtid és incorporat en la cadena mutant.
4. **Filtració:** La solució anterior es passa a través d'un filtre de nitrocel·lulosa en presència de 0,5 M NaCl. D'aquesta forma s'eliminen les molècules de DNA de cadena senzilla que no han estat convertides en heterodúplex i queden retingudes en el filtre.
5. **Selecció de la cadena mutant:** L'heterodúplex de DNA és incubada en presència de l'enzim de restricció *Nci* I el qual posseeix com a seqüència de tall CC(G/C)GG. Com que és incapaç de tallar la cadena de DNA amb tiocitidines, aquest tractament genera un tall només en la cadena no mutant en la diana de tall d'aquest enzim.
6. **Digestió amb exonucleasa:** El tractament amb exonucleasa III, la qual digereix el DNA des del tall generat per *Nci* I i en sentit 3'→5', afecta només la cadena no mutant. El temps de digestió s'escull de manera que s'asseguri l'eliminació de la seqüència no mutant de la regió on es vol generar el canvi.
7. **Repolimerització:** La cadena mutant s'utilitza com a motillo per reconstruir el DNA de doble cadena, creant així, una molècula de DNA de doble cadena que ha incorporat la mutació en ambdues cadenes. El fragment de la cadena que ha estat digerida per l'exonucleasa actua com a encebador de la repolimerització.
8. **Transformació i selecció de mutants:** El dsDNA obtingut de la repolimerització s'empra per transformar una soca adequada d'*E.coli*. Alguns dels transformants obtinguts són analitzats per detectar la incorporació de la mutació per seqüenciació.

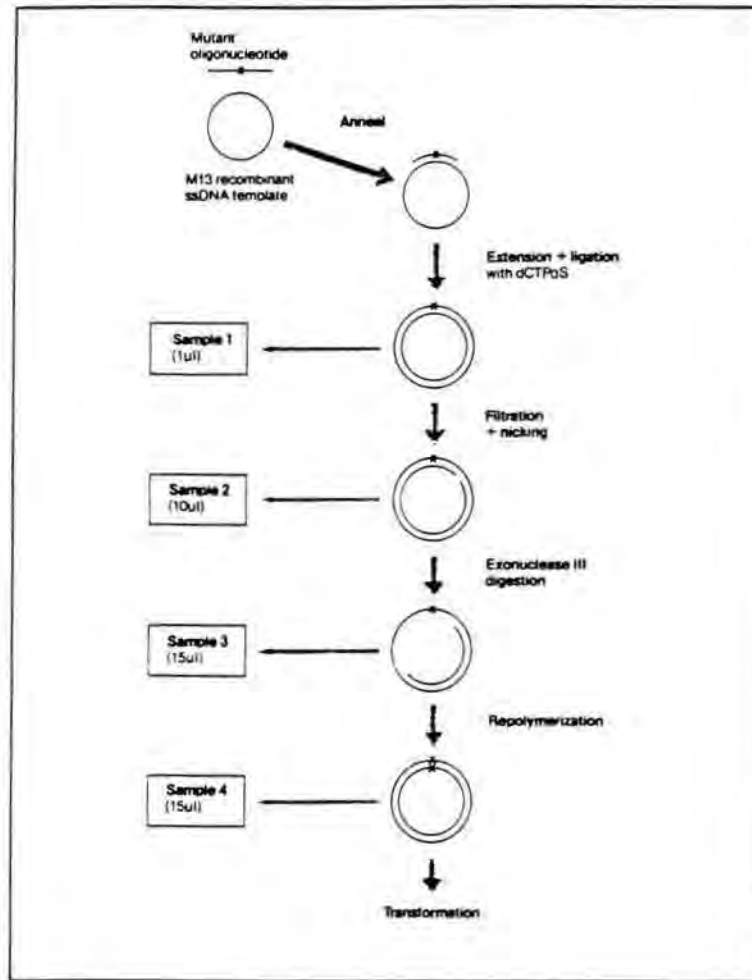


Figura II.C.3.f.(1).1. Esquema on es visualitzen les diferents etapes del mètode d'Eckstein de la mutagènesi dirigida per oligonucleòtid.

II.C.3.f.(2). Obtenció dels oligonucleòtids

L'obtenció de l'oligonucleòtid escaient és el primer pas amb què hom s'enfronta per a poder dur a terme una mutagènesi dirigida per oligonucleòtid. Disseny, síntesi i fosforilació de l'oligonucleòtid són les etapes que implica l'obtenció de l'oligonucleòtid.

Un disseny acurat és convenient per tal de garantir una eficiència òptima de mutagènesi. Durant aquest treball totes les mutagènesis es realitzaren sobre fragments de DNA clonats en M13mp19. Per al disseny dels oligonucleòtids s'ha pres com a motlle la seqüència de la cadena del fragment que passa a les partícules víriques i s'han sintetitzat complementaris a aquesta seqüència introduint-hi però, les mutacions desitjades.

Material i Mètodes

Referent a la longitud de l'oligonucleòtid, si la mutació consisteix en el canvi d'una única base per una altra, és suficient que l'oligonucleòtid tingui una longitud de 21 bases amb la mutació en el centre de l'oligonucleòtid. En el cas d'insercions, delecions o canvis de més d'una base consecutiva, els oligonucleòtids han de tenir com a mínim una longitud de 15 bases a cada costat de la regió de mutació. La longitud de cada braç s'ajusta de manera que la temperatura teòrica d'hibridació sigui aproximadament 42°C d'acord amb la fórmula:

$$T_H = 4 \times (n^\circ \text{ de G} + \text{C}) + 2 \times (n^\circ \text{ de A} + \text{T}) - 3$$

Els oligonucleòtids utilitzats en les reaccions de mutagènesi dirigida foren adquirits a Clontech o sintetitzats en el laboratori del Dr. R. T. Raines. En tots els casos, la síntesi es basà en el mètode de la fosforamidita en fase sòlida descrit per Atkinson i Smith, 1984.

Durant aquest treball s'han utilitzat els oligonucleòtids sense purificar i no s'ha observat una pèrdua, que pogués considerar-se significativa, de l'eficiència de mutagènesi.

Els oligonucleòtids que es varen utilitzar no estaven fosforilats en l'extrem 5' i aquest pas cal dur-lo a terme abans de realitzar les reaccions de mutagènesi dirigida:

1. Diluir la solució de l'oligonucleòtid en aigua Milli-Q™ fins aconseguir una concentració aproximada de 0,1 µg/µl.

2. Barrejar en un eppendorf:

Solució d'oligonucleòtid 0,1 µg/µl	2,5 µl
Amortidor quinsa 10x	3 µl
ATP 10 mM	3 µl
Aigua	22 µl
Polinucleòtid quinasa T4 (10 U/µl)	1 µl

L'amortidor quinasa 10x té la següent composició:

1 M Tris-HCl, pH 8
100 mM MgCl ₂
70 mM DTT

Un cop preparat s'esterilitza per filtració.

3. Incubar 30 minuts a 37°C.

4. Escalfar 10 minuts a 70 °C per inactivar la quinasa. Si no s'ha d'utilitzar de forma immediata és convenient guardar-ho a -20°C.

II.C.3.f.(3). Reaccions de mutagènesi

Per a les reaccions de mutagènesi es va seguir el protocol descrit en el catàleg inclòs en el sistema subministrat per Amersham International. És convenient durant tot el procés anar prenent mostres en les etapes crítiques, la qual cosa permetrà analitzar electroforèticament la marxa de les reaccions. Aquestes mostres han d'ésser conservades a -20°C i analitzades conjuntament amb els controls escaients. El protocol seguit per la mutagènesi fou el que es descriu a continuació:

1. Aparellament de l'oligonucleòtid amb el ssDNA motllo:

1.1. Barrejar:

ssDNA motllo (1 µg/ µl)	5 µl
Oligonucleòtid fosforilat	2,5 µl
Amortidor 1	3,5 µl
Aigua	6 µl

Per a l'obtenció de ssDNA a gran escala s'ha seguit el protocol descrit en l'apartat II.C.3.c.(3).

- 1.2. Incubar el tub eppendorf en un bany a 70°C durant 10 minuts. A continuació transferir-lo a un bany a 37°C on s'incuba durant 30 minuts. Un cop transcorregut aquest temps es posa en gel.

2. Síntesi i lligament de la cadena mutant:

2.1. Afegir a la barreja d'aparellament:

Dissolució de MgCl ₂	5 µl
Solució barreja de nucleòtids 1	19 µl
Aigua	6 µl
Fragment Klenow	6 U
Ligasa de DNA de T4	6 U

Barrejar pipetejant amunt i avall.

- 2.2. Incubar durant tota la nit a 16°C.

- 2.3. Es guarda 1 µl de la barreja de reacció per analitzar-la en un gel d'agarosa (Mostra control 1).

- 2.4. El volum de la Mostra control 1 s'ajusta fins a 20 µl amb aigua i se n'analitzen 10 µl en un gel 1% agarosa i amb bromur d'etidi. Juntament, es carreguen una mostra del ssDNA de partida i una altra del RF DNA. En la Mostra control 1 ha d'aparèixer una banda de dsDNA covalentment tancat. A més també és possible observar altres bandes corresponents a ssDNA que no ha polimeritzat i a dsDNA que no ha estat tancat per la lligasa.

3. Filtració per eliminar el ssDNA:

- 3.1. A la barreja de reacció del pas 2 s'hi afegeix:

Aigua	170 µl
NaCl 5M	30 µl

Barrejar-ho bé.

Material i Mètodes

3.2. Afegir la mostra (uns 250 μ l) a la unitat de filtració subministrada pel sistema. Centrifugar a 500 xg durant 10 minuts a temperatura ambient en una centrífuga Sorvall.

3.3. Addicionar 100 μ l d'una solució de NaCl 500 mM a la part superior de la unitat de filtració i centrifugar de nou en les mateixes condicions.

3.4. En el tub inferior de la unitat de filtrat s'hi afegeix:

Acetat sòdic 3 M, pH 5,5	28 μ l
Etanol fred (-20°C)	700 μ l

Es deixa a -70°C com a mínim 1 hora.

3.5. Centrifugar durant 10 minuts a 4°C a 10000 xg. Retirar el sobrenedant amb una pipeta Pasteur estirada.

3.6. Rentar el sediment amb 1 ml d'etanol fred. Retirar l'etanol amb molta cura amb una pipeta Pasteur estirada. Assecar el sediment.

3.7. Resuspendre el sediment en 25 μ l de l'amortidor 2.

4. Selecció de la cadena mutant per digestió amb *Nci* I de la cadena no mutant:

4.1. Es prenen 10 μ l de la solució del pas anterior i es passen a un nou tub eppendorf. La resta de la mostra es pot guardar a -20°C.

4.2. Afegir 65 μ l d'amortidor 3 i 5 U de *Nci* I. Incubar a 37°C durant 90 minuts.

4.3. Es desen 10 μ l de la barreja de reacció a -20°C per a la seva posterior anàlisi electroforètica. (Mostra control 2).

5. Digestió de la cadena no mutant amb exonucleasa III:

5.1. Immediatament abans d'utilitzar-la, es pren 1 μ l de la solució d'exonucleasa III i s'afegeixen 9 μ l d'amortidor 4. Aquesta dilució, 25 U d'exonucleasa III / μ l s'utilitza en el següent pas.

5.2. Afegir a la barreja de reacció del pas 4:

NaCl 500 mM	12 μ l
Amortidor 4	10 μ l
Dilució d'exonucleasa III	2 μ l

5.3. Incubar a 37°C durant 45 minuts. A questa temperatura, 50 U d'exonucleasa III digereixen unes 3000 b en 30 minuts. En M13mp19 la diana *Nci* I més propera al lloc de clonatge múltiple es troba a 556 pb.

5.4. Incubar a 60°C durant 15 minuts per inactivar l'exonucleasa III i centrifugar breument en minifuga per recollir l'aigua condensada.

5.5. Prendre 15 μ l de barreja de reacció per la seva posterior anàlisi en gel d'agarosa i guardar-la a -20°C (Mostra control 3).

6. Repolimerització i lligament:

6.1. Afegir a la barreja de reacció del pas anterior:

Mescla de nucleòtids 2	13 μ l
Dissolució de MgCl ₂	5 μ l
Dissolució de DNA polimerasa I	3 U
Dissolució de lligasa de DNA de T4	2 U

6.2. Incubar de 3 hores a tota la nit en un bany a 16°C.

6.3. Prendre 15 µl de la barreja de reacció per a la seva anàlisi posterior en un gel d'agarosa (Mostra control 4).

7. Transformació de cèl.lules competents

La soca utilitzada per a les transformacions fou TG1. L'obtenció de cèl.lules competents i la seva transformació es va realitzar com es descriu en l'apartat II.C.3.d.(1). El volum de barreja de reacció de l'etapa 6 emprat en les transformacions fou de 10-20 µl, i el de cèl.lules competents 100-200 µl. Com a controls s'utilitzaren cèl.lules competents transformades amb TE i amb una solució de M13mp19.

II.C.3.f.(4). Anàlisi de les reaccions de mutagènesi

Abans de la transformació és convenient realitzar l'anàlisi de les diferents mostres control que s'han estat recollint al llarg de les reaccions de mutagènesi. L'anàlisi es dugué a terme en un gel 1% agarosa contenint 20 µl de 5 mg/ml de bromur d'etidi per cada 100 ml de gel. Com a amortidor d'elucio s'utilitzà TAE i s'hi afegiren 300 µl de 2-mercaptoetanol per cada litre d'amortidor, per tal de prevenir la ruptura puntual d'una de les cadenes de DNA per acció de metalls pesats durant l'electroforesi.



Figura II.C.3.f.(4).1: Electroforesi de les Mostres control de les reaccions de mutagènesi MR4 i MR5. 1. Marcadors II (Boehringer Mannheim); 2. ssDNA abans de les reaccions; 3. i 4. Mostres control 1 de MR4 i MR5; 5. i 6. Mostres control 2 de MR4 i MR5; 7. i 8. Mostres control 3 de MR4 i MR5; 9. i 10. Mostres control 4 de MR4 i MR5; 11. M13mp8; 12. M13mp19; 13. Marcadors II (Boehringer Mannheim) SS, DNA de cadena senzilla; N, DNA oscat; ccc DNA covalentment tancat.

L'aspecte d'un gel que conté tots els controls que s'han recollit durant les reaccions de mutagènesi es presenta en la figura II.C.3.f.(4).1. Si les reaccions de mutagènesi s'han desenvolupat correctament, com és el cas de la figura II.C.3.f.(4).1, en la mostra control 1 (després de l'extensió i el lligament), ha d'aparèixer una banda de dsDNA circular covalentment tancat (dsDNAccc). També hi poden aparèixer restes de ssDNA i dsDNA que no ha estat lligat. En la mostra control 2 (després de la filtració i de provocar una osca en el DNA heterodúplex), hi ha d'aparèixer una banda de DNA oscat majoritària. En la mostra control 3 (després de la digestió amb exonucleasa III) hi apareix una banda amb una mobilitat major que la de la mostra 2 i un llapissat per dessota d'aquesta. Després de la repolimerització s'ha de detectar una banda de mobilitat equivalent a la de dsDNAccc en la mostra control 4. No obstant això, de vegades aquesta darrera banda no és visible.

II.C.3.f.(5). Selecció de mutants

Un cop s'obtingueren les calves resultants de la transformació, s'analitzaren per seleccionar les que havien incorporat la mutació desitjada. Per a aquesta anàlisi es va purificar el ssDNA com s'ha descrit en l'apartat II.C.3.c.(2), d'un mínim de 5 clons. En un primer pas es realitzà una seqüenciació d'una de les bases ("single-track"), dels inserts de DNA emprant el ssDNA motllo de partida per la mutagènesi com a control. La base seqüenciada s'escollí en funció de la mutació esperada. En un segon pas l'insert d'un dels mutants detectat en la seqüenciació "single-track", es va seqüenciar en la seva totalitat per comprovar que no havia incorporat altres mutacions no desitjades. Aquests mutants, la seqüència dels quals ha estat comprovada per seqüenciació són els utilitzats en el treball posterior. Quan les mutacions que es buscaven afectaven a més d'una base es seqüenciaren totes quatre bases directament.

II.D. MÈTODES D'EXPRESSIÓ

Durant aquest treball, com s'explicarà en l'apartat de resultats i discussió, s'ha construït un gen sintètic que codifica per la ribonucleasa de tipus secretori de pàncreas humana, el qual s'ha clonat en diferents vectors per tal d'avaluar-ne l'expressió en diferents sistemes.

En aquest apartat es descriuen les condicions de cultiu dels diferents microorganismes i les diverses soques utilitzades en l'expressió de la ribonucleasa recombinant així com, el protocol emprat per a separar les diferents fraccions d'aquests cultius.

II.D.1. **Condicions de cultiu per a l'expressió de la ribonucleasa recombinant en *S.cerevisiae***

Colònies de la soca BJ2168 de *S.cerevisiae* transformades amb els plasmidis YEpHPR.1 i YEpHPR.2 que havien estat seleccionades com s'ha descrit en l'apartat II.C1.g, s'han fet créixer en tots els casos en medi S4%D-leu enlloc de YPD, degut a què presenta un medi més net, la qual cosa té avantatges de cara a les

posteriors etapes de purificació i també al fet que manté millor la pressió selectiva sobre el plasmidi. La determinació, directament a partir de les colònies, de la presència d'activitat ribonucleasa expressada es dugué a terme a partir d'un assaig en placa que es troba descrit en l'apartat II.E.2.a.(2).

Per al creixement d'aquesta soca en medi líquid de cara a l'expressió, primer s'ha fet créixer un cultiu de nit inoculant 2-10 ml de medi S4%D-leu líquid, bé a partir d'una colònia acabada de seleccionar en placa, o bé a partir d'un glicerinat guardat a -70°C.(apartat II.B.4.). L'endemà s'inoculà el volum desitjat de S4%D-leu fresc amb 1/100 d'aquest volum provinent del cultiu de nit. El cultiu es deixà créixer a 30°C, en agitació constant a 225 r.p.m. durant 96 hores. Un cop transcorregut aquest temps el cultiu es centrifugà per tal d'obtenir-ne el sobrenedant.

II.D.2. Condicions de cultiu per a l'expressió de la ribonucleasa recombinant en *E.coli*

Les cèl.lules d'*E.coli* portadores del plasmidi pNIIIompA1.HPR es varen fer créixer en tots els casos en medi M9CAS (apartat II.B.3) utilitzant com a font de carboni glicerol al 0,5% i suplementant el medi amb 50 µg/ml d'ampicil.lina. El creixement es realitzà a 37°C i amb una agitació de 250-300 r.p.m.

La soca MC1061 transformada amb pNIIIompA1.HPR es va conservar gliceritada a -70°C. Els gliceritats es realitzaren directament a partir de les colònies obtingudes per transformació. Pel creixement d'aquestes soques en medi líquid, es va realitzar, en primer lloc un cultiu de nit de la soca desitjada inoculant, a partir d'un glicerinat, entre 1 i 5 ml de M9CAS + Ap. L'endemà s'inoculà el volum desitjat de medi fresc amb 1/100 d'aquest volum provinent del cultiu de nit. Entre 2 i 4 hores d'haver-se iniciat el cultiu s'afegí IPTG fins a una concentració final entre 0,2 i 2 mM a partir d'una dissolució 200 mM. L'addició del IPTG es duu a terme per induir l'expressió del gen de la rHPR, atès que en aquest vector, pNIIIompA1.HPR, el gen es troba fusionat a un pèptid senyal que en dirigeix l'exportació a l'espai periplàsmic i l'expressió del qual és controlada per un promotor-operador *lac* (apartat II.B.2.). Aproximadament unes 15 hores després del moment de la inducció del cultiu aquest es centrifugà i es processà com s'explica en l'apartat II.D.4.

D'altra banda s'ha treballat també amb la construcció pET22.HPR i pET17.HPR, la qual s'ha utilitzat per transformar cèl.lules competents BL21(DE3). Els gliceritats d'aquesta soca es realitzaren directament a partir de cultius crescuts d'inòculs fets amb les colònies provinents de la transformació. Per a un cultiu de medi TB 50µg/ml Amp fresc (apartat II.B.3.), s'inoculà el volum desitjat de cultiu amb 1/100 d'aquest volum provinent d'un cultiu en fase de creixement exponencial (1-5 ml), en medi TB suplementat amb ampicil.lina 400µg/ml i es deixà en agitació constant a 25°C. A les 4-6 hores d'haver-se iniciat el cultiu (DO₅₅₀ entre 1 i 2) s'afegí IPTG fins aconseguir una concentració final de 1 mM a partir d'una solució 200 mM com s'ha comentat en l'apartat II.C.3.b. Aproximadament unes 15 hores després del moment de la inducció del cultiu aquest es centrifugà i es processà com s'explica en l'apartat II.D.4.

II.D.3. Obtenció de fraccions de cultiu de *S.cerevisiae* -[YEphPR.1] i *S.cerevisiae* -[YEphPR.2]

Amb la finalitat d'esbrinar la localització de la ribonucleasa recombinant en cultius de *S.cerevisiae* portadors dels vectors YEphPR1 i YEphPR2 (reHPR.Y), es varen obtenir les fraccions corresponents a sobrenedant i fracció soluble cel.lular segons el protocol que es descriu a continuació:

1. Es fa créixer un cultiu de 50-100 ml a 30 °C i agitació durant 96 hores i es mesura la D.O.₆₀₀ (Es considera normalment que una D.O.₆₀₀ = 1,0, equival a un volum cel.lular de 2-3 ml).
2. Recollir les cèl.lules per centrifugació 5 minuts a 1.500 xg, a 4°C, en tubs de centrifuga prèviament pesats.
3. El sobrenedant es sotmet a una precipitació amb acetona al 60% (v/v), es resuspèn el sediment amb aigua i es dialitza també contra aigua. Tot seguit es liofilitza i es resuspèn en 1/10 del volum original.
4. El sediment cel.lular es resuspèn en 2 volums d'aigua que s'ha mantingut entre 0° i 4°C i immediatament es centrifuga 5 minuts a 1.500 xg a 4°C. En aquest cas el sobrenedant es pot descartar.
5. Resuspendre les cèl.lules en 1 volum d'amortidor de disrupció.
La composició de l'amortidor de disrupció és : 20 mM Tris-HCl, pH 7,9; 10 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 5% Glicerol; 1 mM DTT; 0,3 M sulfat amònic; 1 mM PMSF
En aquest punt les cèl.lules poden congelar-se i ésser guardades a -70°C. Un cop congelades i abans de prosseguir cal descongelar-les en gel durant una nit.
6. Si es vol seguir el protocol, afegir 2 volums més d'amortidor de disrupció.
7. A continuació afegir 4 volums de boles de vidre rentades amb àcid i refredades prèviament. És important que les boles de vidre siguin del tamany adequat (0,45-0,55 mm) per aconseguir un trencament homogeni i eficient. D'altra banda cal fer un tractament previ consistent en rentar-les durant 1 hora en àcid nítric concentrat, esbandir-les amb aigua abundant i assecar-les en una estufa. Un cop fet aquest tractament es poden guardar a 4°C fins que s'hagin d'utilitzar. Puix que la ruptura mecànica de les cèl.lules allibera calor, és necessari que les següents etapes es duguin a terme a 4°C, i que en les etapes en les quals calgui utilitzar el vòrtex, aquestes agitacions s'intercalin amb temps de repòs de les mostres en gel.
8. Si el volum cel.lular de partida és menor de 10 ml, transferir la suspensió cel.lular a un tub que es pugui centrifugar i amb tap de rosca. La suspensió no hauria d'ocupar més d'un 70% de la capacitat del tub.
9. Agitar en vòrtex durant 30-60 segons i a 4°C. Deixar reposar el tub 1-2 minuts. Repetir aquest procés 5 vegades.
10. Deixar sedimentar les boles de vidre i decantar el sobrenedant.
11. Afegir entre 2 i 4 volums d'amortidor de disrupció al sediment que conté les boles de vidre i invertir el tub 10 vegades. Deixar sedimentar les boles de vidre i decantar el sobrenedant tot reunint-lo amb el del pas 10.
12. Centrifugar els sobrenedants 60 minuts a 12.000 xg i 4°C. Recollir-ne el sobrenedant. Aquest es pot guardar en alíquotes a -70°C fins que calgui fer-lo servir.

II.D.4. Obtenció de fraccions de cultius d'*E.coli* : MC1061-[pIN1llompA1.HPR], BL21(DE3)-[pET22.HPR]

El protocol seguit per tal d'esbrinar la localització de la RNAasa recombinant en cultius d'*E.coli*, per a qualsevol de les soques o construccions utilitzades, consisteix en obtenir les fraccions corresponents a medi extracel·lular, espai periplàsmic i medi intracel·lular (o fracció insoluble) fou el que es detalla a continuació:

1. Centrifugar el cultiu durant 20 minuts a 12.000 xg. Guardar el sobrenedant, que correspon al medi extracel·lular, i amb el sediments cel·lular continuar els passos que segueixen d'acord amb el que fou descrit per Blanchin i Masson (1989). Aquest protocol està pensat per realitzar-lo en tubs eppendorf, per al qual cosa, si la centrifugació s'ha realitzat en un altre tipus de tubs, el sediments o part d'aquest, s'ha de transferir a un eppendorf.
2. Rentar el sediments amb 1,5 ml de NaCl 0,9%.
3. Resuspendre el sediments en 1,5 ml d'una dissolució de sacarosa 25%, EDTA 1 mM.
4. Agitar durant 10 minuts a temperatura ambient.
5. Centrifugar durant 10 minuts en minifuga a 12.000 xg.
6. Resuspendre ràpidament el precipitat en 1,5 ml d'aigua a 0°C. Agitar durant 10 minuts a 4°C.
7. Centrifugar a 12.000 xg durant 10 minuts a 4°C en minifuga. Recollir el sobrenedant, en el qual es troba continguda la fracció soluble de l'espai periplàsmic.
8. Resuspendre el precipitat del pas anterior en 0,5 ml d'amortidor 10 mM Tris-Cl, pH 7.5 i ultrasonificar-lo 10 minuts a 1,0 D.C. mA. Aquesta darrera operació permet que es trenquin les cèl·lules i s'alliberi el seu contingut.
9. Centrifugar a 12.000 xg durant 15 minuts. En el sobrenedant hi ha continguda la fracció soluble intracel·lular.

II.E. MÈTODES DE PROTEÏNES

II.E.1. Mètodes cromatogràfics

En aquest apartat es descriuen els diferents mètodes cromatogràfics que s'han desenvolupat en aquest treball per tal de dur a terme l'aïllament de la ribonucleasa de pàncreas humana (HPRNAasa), la ribonucleasa de pàncreas humana recombinant produïda en *S.cerevisiae* i la ribonucleasa de pàncreas humana recombinant produïda en cèl·lules d' *E.coli*.

Tots els reactius foren de grau analític. Els amortidors emprats en HPLC i FPLC s'han preparat utilitzant aigua Milli-Q, i foren filtrats amb membranes de 0,22 µm i degasificats immediatament abans d'utilitzar-los. Totes les cromatografies es varen dur a terme a temperatura ambient. Abans d'injectar les mostres foren filtrades

amb filtres Millex-GV (Millipore, EEUU) de 0,22 µm, els quals presenten una baixa capacitat d'adsorció de proteïnes.

La fracció corresponent a la ribonucleasa A s'ha obtingut a partir de la ribonucleasa pancreàtica bovina comercial (Sigma, EEUU) seguint una modificació establerta per Alonso i col., (1986), del mètode descrit per Taborsky (1959). La fracció de RNAasa A purificada segons aquest mètode ha estat utilitzada com a marcador en electroforesi en gels d'acrilamida, en gels d'activitat, com a patró en diferents cromatografies i en general com a control positiu de diferents processos i metodologies.

Les diàlisis s'han efectuat en tubs de diàlisi Spectre-Por (Spectrum Medical Industries, EEUU) amb un límit de porus de 3.500 Da. Els tubs de diàlisi es renten exhaustivament amb aigua destil·lada per eliminar les restes de glicerol i azida sòdica abans d'ésser utilitzats.

II.E.1.a. PURIFICACIÓ DE LA RIBONUCLEASA DE TIPUS SECRETORI A PARTIR DE PÀNCREAS HUMÀ

En la literatura precedent al treball que es presenta, només hi havia descrit un mètode per a l'obtenció de la ribonucleasa de pàncreas humà homogènia (Weickmann i col., 1981). La troballa, descrita en l'apartat corresponent de Resultats i Discussió, de nivells de glicosilació més extensos que els descrits en el treball de Weickmann i col.laboradors, ha portat a desenvolupar mètodes alternatius per a l'aïllament de la ribonucleasa de pàncreas humà que permetessin una millor caracterització de l'enzim. Per a processar inicialment el teixit, s'han utilitzat dos tipus d'extracció diferents: l'extracció neutra i l'extracció àcida. A partir dels homogenats que s'obtenen després d'aquests tractaments preliminars s'ha seguit però, un mateix mètode cromatogràfic.

Procediment d'extracció neutra

Els pàncreas humans foren proporcionats per la Unitat de Trasplantament de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona (Drs. Mañalich i Cabré) i procedien de donants sans d'òrgans, morts en accident. No es va dur a terme cap selecció en base a l'edat, el sexe o la raça dels donants. Els òrgans foren proporcionats perfosos i exhaustivament netejats amb sèrum fisiològic la qual cosa eliminava la presència de RNAases contaminants provinents d'altres fluids biològics. El procés de purificació es dugué a terme immediatament després d'eliminar el teixit adipós envoltant.

En un experiment tipus, aproximadament 8 g de pols acetònica, equivalent a un pàncreas i obtinguts segons el protocol descrit per Pascual i col., (1989), es varen dissoldre en 300 ml de 10 mM Tris-Cl pH 8,0 per agitació durant 2-3 hores a 4°C. Transcorregut aquest període, la dissolució es va homogeneïtzar mecànicament amb un Potter-Elvehjem i un èmbol de tefló. Tot seguit la mostra es va centrifugar a 9.000 xg durant 30 minuts i a 4°C. El sobrenedant es va portar a un 75% de saturació amb sulfat amònic (516 g/l) i es mantingué en agitació

suau durant tota una nit a 4°C. El precipitat se separà per centrifugació a 26.900 xg durant 30 minuts a 4°C i es va redissoldre en aigua (1/6 del volum original). Es deixà dialitzant tota una nit a 4°C en amortidor 25 mM acetat sòdic, pH 5,5, abans de dur a terme el procediment cromatogràfic.

Procediment d'extracció àcida

En aquest cas, s'utilitzà el procediment descrit per Weickmann i col., (1981), basat en la solubilització o homogeneïtzació del teixit emprant àcid sulfúric 0,25 M seguit d'una precipitació fraccionada amb acetona. La fracció provinent de la precipitació amb 30-60% acetona es va redissoldre en l'amortidor 25 mM acetat sòdic, pH 5,5 i es dialitzà contra aquest amortidor abans de dur a terme el procediment cromatogràfic.

Procediment cromatogràfic

El procés cromatogràfic utilitzat per a la purificació de la ribonucleasa de pàncreas humana a partir dels homogenats obtinguts ja sigui a través d'una extracció neutra o bé mitjançant una extracció àcida, es fonamenta en dos passos: una cromatografia en una columna de bescanvi catiònic i una cromatografia en una columna de fase inversa.

Equipament

El sistema cromatogràfic utilitzat per a la cromatografia de bescanvi catiònic fou un FPLC (Pharmacia, Suècia). Aquest estava constituït per un controlador de bombes i gradients, model LCC-500 Plus, dues bombes d'alta precisió P-500, una bomba peristàltica per a la injecció automàtica P-1, un detector Rapid Spectral Detector, model 2140, amb funcions similars a les d'un detector de fotodiodes, un injector automàtic dotat amb una vàlvula MV-8, un injector manual dotat amb una vàlvula MV-7 i un col·lector de fraccions FRAC-200. El sistema d'emmagatzemament de dades i integració el constituïen un ordinador Tandon model PAC 386x amb 1Mb de RAM i monitor en color, un impressor gràfic (plotter) Hewlett-Packard model 7475-A i el software NELSON (Perkin -Elmer) per a la integració dels cromatogrames.

El sistema cromatogràfic emprat per a la cromatografia en fase inversa, fou un HPLC de Waters Assoc, EEUU, amb un controlador de gradients i flux model 680, dues bombes d'alta pressió model 6000A, un injector manual model U6K, un injector automàtic WISP 710B, un detector puntual model 440, i un registrador Data Module M730.

Material i Mètodes

Obtenció de la HPRNAasa per FPLC de bescanvi catiónic

Els homogeneïtzats obtinguts segons els dos sistemes d'extracció comentats, es varen cromatografiar en primer lloc en una columna Mono-S de bescanvi catiónic amb la qual cosa s'aconsegueix una purificació parcial de la HPRNAasa.

<u>Dissolvents:</u>	A) Amortidor 25 mM acetat sòdic, pH 5,5; B) A + 1 M NaCl
<u>Flux:</u>	1,0 ml/minuts
<u>Columna:</u>	Mono-S (Pharmacia, Suècia)
<u>Detecció:</u>	214-280 nm
<u>Gradient:</u>	0-20% B en 60 minuts; 20-100% B en 10 minuts; 100% B durant 10 minuts

La fracció amb activitat ribonucleasa es va col·lectar, dialitzar contra aigua i liofilitzar. Es guardà a -20°C fins la seva utilització.

Purificació de la HPRNAasa per HPLC de fase inversa

La fracció activa provinent de la cromatografia de bescanvi iònic es va resuspendre en el mínim volum possible de TFA 0,1%, es va centrifugar 5 minuts a 12.000 xg en un centrífuga eppendorf i s'injectà a l'equip de HPLC.

<u>Dissolvents:</u>	A) TFA 0,1% en H ₂ O; B) acetonitril + TFA 0,09%
<u>Flux:</u>	0,5 ml/min
<u>Columna:</u>	Vydac C-4 (0,48 x 25 cm, 10 µm, 100 Å)
<u>Detecció:</u>	280 nm
<u>Gradient:</u>	10% B durant 20 minuts; 10-20% B en 15 minuts; 20-35% B en 60 minuts; 35-100% B en 5 minuts; 100% B en 15 minuts

Les fraccions corresponents a la HPRNAasa es varen col·lectar, congelar i liofilitzar. Els diferents pics corresponents a les diferents fraccions es varen guardar a -20°C per a estudis posteriors.

El procés de purificació es va seguir estimant la concentració de proteïnes després de cada pas mitjançant el mètode de Bradford (apartat II.E.2.b.) i mesurant l'activitat de ribonucleasa per mètodes espectrofotomètrics (apartat II.E.2.a.(1)).

II.E.1.b. PURIFICACIÓ DE LA RIBONUCLEASA DE PÀNCREAS HUMÀ RECOMBINANT PRODUÏDA EN *S.cerevisiae* (reHPR.Y)

La ribonucleasa de pàncreas humà recombinant (reHPR.Y), s'ha aïllat a partir d'un cultiu de 1 litre de medi S4%D-leu líquid (establert com s'ha descrit en l'apartat II.D.1.), de cèl.lules de *S.cerevisiae* BJ2168 portadores del vector YEphPR.2 que havia estat creixent durant 96 hores a 30°C en agitació constant. Per a l'obtenció de la fracció activa de la reHPR.Y el sobrenedant es va filtrar amb filtres de 0,22 µm Millex-GV de baixa adsorció proteica, concentrar per ultrafiltració tangencial, es va dur a terme una precipitació amb acetona i, finalment, la mostra es va cromatografiar en una columna de bescanvi catiònic.

Processament del cultiu

Les cèl.lules es varen recollir per centrifugació a 3.000 xg, durant 10 minuts a 4°C. El sobrenedant fou concentrat fins a 70 ml per ultrafiltració tangencial amb l'equip Minitan™ Ultrafiltration System (Millipore, MA, EEUU), emprant una membrana de polisulfona de 5.000 Da de mida d'exclusió. Un cop concentrat el sobrenedant es va dur fins a un 60% acetona per tal de precipitar-ne la fracció proteica.

El precipitat es va recollir per centrifugació a 26.900 xg durant 30 minuts a 4°C, redissoldre en un volum mínim d'aigua i liofilitzar per eliminar les possibles restes d'acetona. El liofilitzat es va resuspendre en un volum mínim d'amortidor 25 mM acetat sòdic, pH 5,5, i dialitzat durant tota la nit contra el mateix amortidor abans de dur a terme el procediment cromatogràfic.

Procediment cromatogràfic

L'equipament utilitzat per a l'aïllament de la reHPR.Y fou el FPLC descrit ja en l'apartat anterior (apartat II.E.1.a). El procés cromatogràfic utilitzat es fonamenta en un únic pas, consistent en una cromatografia de bescanvi catiònic les condicions de la qual es detallen a continuació:

<u>Dissolvents:</u>	A) Amortidor 25 mM acetat sòdic, pH 5,5; B) A + 1 M NaCl
<u>Flux:</u>	1,0 ml/min
<u>Columna:</u>	Mono-S (Pharmacia, Suècia)
<u>Detecció:</u>	214-280 nm
<u>Gradient:</u>	0-35% B en 60 minuts; 35-100% B en 10 minuts; 100% B durant 10 minuts

Les fraccions recollides es varen assajar per determinar la presència d'activitat ribonucleasa i es va procedir a la seva caracterització.

II.E.1.c. PURIFICACIÓ DE LA RIBONUCLEASA DE PÀNCREAS HUMÀ RECOMBINANT PRODUÏDA EN *E.coli* (reHPR.B).

La ribonucleasa de pàncreas humà recombinant (reHPR.B), s'ha aïllat a partir de cultius de cèl.lules d'*E.coli* BL21(DE3) transformades amb el vector pET22.HPR i el vector pET17.HPR que havien estat creixent en medi TB + Amp 50 µg/ml durant 6-8 hores a partir del moment de la inducció amb 1 mM IPTG tal i com s'ha descrit en l'apartat II.D.2. Així per a la producció i purificació de reHPR.B (produïda per clons d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR]) i de Met-Ala-reHPR.B (produïda per clons d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET17.HPR]) es va partir respectivament de 2 i 0,5 litres. Les dades dels reactius o solucions utilitzades en el processament es proporcionen per litre de cultiu establert.

Processament del cultiu

Degut al fet que la localització de la reHPR.B es va trobar que es repartia entre l'espai periplàsmic i la fracció citosòlica o insoluble, es va decidir iniciar la purificació partint del sediment cel.lular el qual comprenia totes dues fraccions cel.lulars.

1. Les cèl.lules es varen recollir per centrifugació a 10.000 xg a 4°C durant 20 minuts.
2. El sediment que s'obté es dissol en 200 ml d'amortidor de solubilització utilitzant un homogeneïtzador mecànic Potter-Elvehjem i un èmbol de tefló. La composició de l'amortidor de solubilització és:
 - 20 mM Tris-HCl, pH 7,8
 - 6 M Urea
 - 1 mM EDTA
 - 0,2 mM PMSF
 - 20 mM DTT
3. Un cop completament resuspès el sediment s'incubà durant 1 hora a 37°C i agitació constant.
4. Centrifugar novament a 10.000 xg a 4°C durant 20 minuts.
5. El sobrenedant anomenat S1 es reservà i el sediment es va resuspendre novament en 200 ml d'amortidor de solubilització.
6. Un cop resuspès es va dur a terme una segona incubació durant 1 hora a 37°C i agitació constant.
7. La solució es va centrifugar a 10.000 xg a 4°C durant 20 minuts.
8. El sobrenedant que s'anomenà S2 s'ajuntà amb el sobrenedant S1 per a constituir la mostra que havia d'ésser sotmesa a cromatografia de bescanvi catiònic.

Procediment cromatogràfic

El procés cromatogràfic utilitzat per a la purificació de la reHPR.B i de la Met-Ala-reHPR.B es fonamenta en dues etapes cromatogràfiques en columnes de bescanvi catiònic, l'una a pressió atmosfèrica i l'altra en

Material i Mètodes

HPLC. Com a material de partida s'han utilitzat els sobrenedants S1 i S2 que contenen tant el material corresponent a l'espai periplàsmic com les fraccions soluble i insoluble cel·lular. L'equipament utilitzat en la cromatografia d'elevada resolució per a l'aïllament de la ribonucleasa recombinant ha estat descrit anteriorment (apartat II.E.1.a).

Aïllament de la reHPR.B per cromatografia de bescanvi catiònic en presència d'urea.

Com a primer pas es va dur a terme una cromatografia de bescanvi catiònic en reïna CM-Sepharose CL-6B (Pharmacia, Suècia) a pressió atmosfèrica i a temperatura ambient. Les condicions i característiques d'aquesta cromatografia es descriuen a continuació:

<u>Volum de reïna:</u>	100 ml
<u>Dissolvents:</u>	A) Tris-HCl, pH 7,8, Urea 6M, 2 mM DTT _{red} B) A + 0,5 M NaCl
<u>Flux:</u>	30 ml/min
<u>Fraccions:</u>	5 ml
<u>Detecció:</u>	280 nm
<u>Volum de mostra:</u>	500 ml
<u>Rentat:</u>	Un cop acabada de carregar la mostra es passen 200 ml d'amortidor A per tal de rentar tot allò que no hi queda retintut
<u>Gradient:</u>	L'elució es va dur a terme amb un gradient de 0 a 0,5 M de NaCl en Tris-HCl, pH 7,8, Urea 6M, 2 mM DTT _{red} (250 +250)

Un cop acabat al gradient la reïna es renta amb 20 mM Tris-HCl, pH 7,8, 1 M NaCl. Es torna a equilibrar amb 20 mM Tris-HCl, pH 7,8 i es desa a 4°C amb 0,05% d'azida sòdica.

Les fraccions amb activitat ribonucleàsica es varen detectar per electroforesi en gels de poliacrilamida-SDS amb poli(C) revelats per activitat, es reuniren i diluïren a la meitat i es dialitzaren en dues etapes per tal de facilitar la renaturalització i reoxidació de la reHPR.B desnatuaritzada i reduïda que s'hagués pogut produir durant les etapes de solubilització:

En primer lloc una diàlisi contra l'amortidor 20 mM Tris-HCl, pH 7,8, 0,1 M NaCl, 1 mM GSH (glutatió reduït) i GSSG (glutatió oxidat). Aquesta diàlisi permetia eliminar la urea alhora que facilitava el procés de reoxidació dels ponts disulfurs que estiguessin reduïts deguts al procés de solubilització. Temps de diàlisi: 24 hores amb un canvi de 2 litres.

En segon lloc una diàlisi contra 20 mM Tris-HCl, pH 7,8 per tal d'acabar d'eliminar la urea i la sal, i permetre la finalització de la reoxidació. Temps de diàlisi: 24 hores amb un canvi de 2 litres.

Material i Mètodes

Finalment i com que el volum de mostra és molt gran, es va dialitzar contra aigua destil·lada per tal de poder-la concentrar per liofilització. Temps de diàlisi: 6 hores amb canvis cada 2 hores. Un cop la mostra estava liofilitzada es va resuspendre i dialitzar contra 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, prèviament a la seva cromatografia en HPLC.

Purificació de la reHPR.B per HPLC de bescanvi catònic

El liofilitzat un cop resuspès i dialitzat es va centrifugar 15 minuts a 12.000 xg en un centrifuga eppendorf i s'injectà a l'equip de HPLC. Les condicions de la cromatografia es descriuen a continuació:

<u>Dissolvents:</u>	A) Amortidor 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 B) A + 1 M NaCl
<u>Flux:</u>	1,0 ml/min
<u>Columna:</u>	Protein-pak CM-8HR A-1 (Millipore, EEUU)
<u>Detecció:</u>	214-280 nm
<u>Gradient:</u>	0-20% B en 60 minuts; 20-100% B en 5 minuts; 100% B durant 10 minuts.

II.E.2. Mètodes analítics

II.E.2.a. DETERMINACIÓ DE LA QUANTITAT DE PROTEÏNA

II.E.2.a.(1). Determinació de la concentració de proteïna pel mètode de Bradford

En el cas de mesclures de proteïnes, la concentració es va mesurar pel mètode de Bradford (1976). Aquest mètode es basa en l'existència d'un canvi en les propietats d'absorció del colorant Coomassie Blue G-250 quan s'uneix a proteïna. La reacció és molt ràpida i tot el color es desenvolupa en els primers 5 minuts, mantenint-se estable durant 1 hora.

Preparació del reactiu (1 litre)

Coomasie Brilliant Blue G-250	100 mg
Etanol (95%)	50 ml
Àcid fosfòric 85% (p/v)	100 ml
Aigua destil·lada	fins a 1 litre

Les concentracions finals dels diferents components són: Coomassie Brilliant Blue G-250 0,01% (p/v); etanol 4,7% (p/v) i àcid fosfòric 8,5% (p/v). Aquesta dissolució es convenient filtrar-la a través d'un vidre freat n°4, per eliminar petites partícules sòlides de colorant.

Mètode d'assaig

Es va preparar una recta patró d'albumina de sèrum boví (BSA) amb els següents nivells de concentració: 10, 20, 50 i 100 µg de proteïna en 100 µl d'amortidor (el mateix amb el que es prepara la mostra) i a cada un es va afegir 5 ml del reactiu. Després d'agitar en un vòrtex i esperar 10 minuts es va mesurar l'absorció a 595 nm, en front d'un blanc preparat amb 100 µl d'amortidor i 5 ml de reactiu. Amb les mostres reals cal fer dilucions fins que el valor d'absorbància es trobi dintre el marge comprès per la recta patró i interpolar aquest valor d'absorbància en la recta patró. Les fraccions de la recta de calibració es preparen normalment per duplicat així com les mostres es solen preparar per triplicat. Cal tenir en compte que una solució de 1 mg/ml de BSA en aigua té una $A_{280\text{ nm}}$ de 0,66.

Micromètode d'assaig

En aquest cas, els nivells de la recta de calibrat contenien les següents quantitats de BSA : 1, 2, 5 i 10 µg en 100 µl d'amortidor. El volum de reactiu en tots els casos era de 1 ml.

Mètode de Bradford en placa d'ELISA

En els casos en els quals el volum de mostra era petit, es va adaptar el mètode de Bradford fins a un volum final de 200 µl i les mostres es varen dipositar en una placa d'ELISA. A la taula II.E.2.a.(1) es presenta la recta patró i els nivells de concentració emprats amb aquest protocol. La solució de BSA inicial era de 0,1 mg/ml. Alternativament s'ha utilitzat com a reactiu, el reactiu de Bradford subministrat per Bio-Rad, el qual s'ha de diluir 1:4 amb aigua destil·lada.

Quantitat de proteïna (µg)	Volum de proteïna (µl)	Volum d'amortidor (µl)	Volum de reactiu (µl)
0	0	40	160
0,4	4	36	160
0,8	8	32	160
1,2	12	28	160
1,6	16	24	160
2,0	20	20	160
2,4	24	16	160
2,8	28	12	160
3,2	32	8	160
3,6	36	4	160
4,0	40	0	160

Taula II.E.2.a.(1). Nivells de concentració de la recta patró pel mètode de Bradford en placa d'ELISA

II.E.2.b. MÈTODES ELECTROFORÈTICS

Electroforesi discontinua en gels de poliacrilamida en presència de SDS

Les electroforesis en gels de poliacrilamida s'han emprat com a principal mètode analític en la determinació de la puresa de les fraccions i en l'anàlisi dels processos de purificació.

En aquest treball s'ha utilitzat el mètode d'electroforesi discontinua descrit per Laemmli (1970) consistent en un gel superior que té la funció de concentrar les proteïnes abans que aquestes entrin en el gel inferior que permet la separació de les proteïnes. En tots els casos s'ha emprat l'equipament d'electroforesi Mini-Protean II (Bio-Rad) que permet preparar gels de 9 x 6 x (0,075 o 0,15) cm.

Els gels de poliacrilamida-SDS es van preparar a partir de les següents dissolucions:

Dissolució A: Acrilamida 30%-bisacrilamida 0,8%

Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0,8 g
Aigua Milli-Q	fins a 100 ml

Dissolució B: Amortidor del gel separador (4x)

SDS	0,4 g
Tris	18,2 g
Aigua Milli-Q	fins a 100 ml

Ajustar el pH de la solució a 8,6-8,8 amb HCl.

La composició de la solució preparada concentrada 4x és: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; SDS 0,4%.

Dissolució C: Amortidor del gel concentrador (4x)

SDS	0,4 g
Tris	6,0 g
Aigua Milli-Q	fins a 100 ml

El pH s'ajusta a 6,8 amb HCl

La composició de la solució preparada concentrada 4x és: 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; SDS 0,4%

Per a la preparació dels gels de separació amb un determinat percentatge cal combinar en proporcions diferents les solucions A, B i aigua Milli-Q.

El gel de concentració es va preparar barrejant les següents dissolucions:

Dissolució A (acrilamida 30%-bisacrilamida 0,8%)	0,6 ml
Dissolució C: Amortidor del gel concentrador	1,5 ml
Aigua Milli-Q	3,9 ml
TEMED	6 µl
Persulfat amònic (Na ₂ S ₂ O ₈) 10% (p/v)	60 µl

Dissolució D: Amortidor d'elució

L'amortidor d'elució d'electroforesi es prepara concentrat 10x:

Tris	30,3 g
Glicina	144,1 g
SDS	10 g
Aigua Milli-Q	fins a 1 litre

Aquesta barreja sol donar un pH al voltant de 8,3-8,5 i no s'ha d'ajustar amb HCl.

La composició de la solució preparada concentrada 10x és: 0,025 M Tris; 0,192 M glicina, pH 8,3-8,5; SDS 0,1%. Un cop els gels han polimeritzat, l'amortidor d'elució 10x es dissol 1/10 amb aigua Milli-Q i s'omple la cubeta d'electroforesi evitant la formació de bombolles en l'extrem inferior dels gels, perquè aquestes podrien afectar el corrent electroforètic de les mostres.

Dissolució E: Amortidor d'aplicació de mostres (4x)

Tris	15,0 g
Glicerol 87%(v/v)	40 ml
SDS	8 g
Blau de Bromofenol	0,05 g
Aigua Milli-Q	fins a 100 ml

El pH s'ajusta a 6,8 amb HCl.

Si es volia que l'amortidor d'aplicació de mostres tingués caràcter reductor s'hi afegiren 7,5 ml de β -mercaptoetanol. La composició final de l'amortidor d'aplicació de mostres 4x és: 120 mM Tris-HCl, pH 6,8; 40% (v/v) glicerol; 8% (p/v) SDS; 7,5% (v/v) β -mercaptoetanol (opcional); 0,05% (p/v) blau de bromofenol.

Per preparar les mostres s'afegia 1 volum d'amortidor d'aplicació de mostres per cada 3 volums de mostra. Les mostres s'escalfaven durant 5 minuts a 90-100°C abans d'èsser carregades en el gel.

Les electroforesis es varen córrer rutinàriament a temperatura ambient i amb una intensitat de corrent de 10-20 mA per gel.

Tincions

A continuació es detallen les dissolucions i els protocols que es varen utilitzar per a les diferents tincions dels gels d'electroforesi

Tinció de proteïnes en gels de poliacrilamida amb blau de Coomassie: [límit de detecció: 0,3-1 μ g per banda de proteïna]

Material i Mètodes

Totes les etapes es varen dur a terme a temperatura ambient amb agitació suau.

1. Submergir el gel en una solució 50% metanol, 10% àcid acètic (dissolució fixadora) durant un mínim de 30 minuts.
2. Retirar la solució fixadora i cobrir el gel amb una dissolució de blau de Coomasie durant un mínim de 15 minuts.
3. Eliminar la solució de tinció i dur a terme diversos rentats amb 7% àcid acètic. Els gels poden conservar-se per temps prolongats en aquesta solució. També aquesta solució permet la decoloració total del gel. El procés de decoloració es pot accelerar submergint el gel en una dissolució de metanol al 30%, àcid acètic al 12% i incubant-ho en una estufa.

Dissolució de blau de Coomasie:

45% (v/v) metanol
10% (v/v) àcid acètic
45% aigua destil.lada
0,1% (p/v) Coomasie Blue R-250 (Sigma)

Cal dissoldre el Coomasie en el metanol abans d'afegir l'aigua i l'àcid acètic.

Tinció de proteïnes en gels de poliacrilamida amb nitrat d'argent: [límit de detecció: aprox. 2-5 ng per banda de proteïna]

Per a la tinció de les proteïnes en gels de poliacrilamida-SDS es va seguir el mètode desenvolupat per Bloom i col., (1987). Tots els passos de la tinció es varen dur a terme a temperatura ambient i amb agitació constant i suau.

1. Submergir el gel en una dissolució de metanol al 50%, àcid acètic al 12% que contingui 0,5 ml de formaldehid 37% (v/v), durant un mínim d'una hora.
2. Rentar el gel amb etanol al 50% (v/v) per a la qual cosa es fan 3 rentats de 20 minuts cada un.
3. Cobrir el gel amb una dissolució de tiosulfat sòdic ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a una concentració de 0,2 g/l durant, exactament, 1 minut.
4. Rentar amb aigua destil.lada durant 20 segons. Repetir el rentat dues vegades més.
5. El gel es submergeix durant 20 minuts per a la seva impregnació, en una dissolució de nitrat d'argent (AgNO_3) que es troba a una concentració de 2 g/l i que conté, per cada litre, 0,75 ml de formaldehid al 37% (v/v).
6. Fer dos rentats amb aigua destil.lada de 20 segons cada un.
7. El gel es revela durant un temps màxim de 10-15 minuts amb una dissolució de carbonat sòdic (Na_2CO_3) de concentració 60 g/l que contingui per cada litre, 0,5 ml de formaldehid 37% (v/v) i 4 mg de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Material i Mètodes

8. Rentar dues vegades durant 2 minuts amb aigua destil·lada.
9. La reacció de revelat s'atura cobrint el gel amb una dissolució de metanol al 50%, àcid acètic al 12% durant 10 minuts.
10. Rentar amb metanol al 50% durant un mínim de 20 minuts. Els gels poden conservar-se en aquesta dissolució a 4°C i protegits de la llum.

Els gels tenyits amb nitrat d'argent/carbonat sòdic poden destenyir-se totalment o parcial submergint-los en una dissolució de 1% àcid cítric que contingui 0,1 volums de permanganat potàssic concentrat. A continuació es renten exhaustivament amb aigua destil·lada fins que quedin totalment transparents. Posteriorment, aquests gels poden tornar a ésser tenyits, per exemple, amb blau de Coomassie.

Els gels tenyits per qualsevol dels sistemes detallats es varen fotografiar amb una càmera Polaroid MP-4 i una pel·lícula Polaroid 665, emprant una obertura de diafragma de 5,6-8-11 i un temps d'exposició entre 1/8 i 1/11.

Els marcadors moleculars que s'han utilitzat durant aquest treball per les electroforesis de poliacrilamida-SDS foren els del Combithek Kit de Boehringer Mannheim [fosforilasa b (97.000 Da) glutamat deshidrogenasa (55.400 Da), lactat deshidrogenasa (36.500 Da), inhibidor de tripsina de soja (STI) (20.100 Da)] i els pretenyits de Bio-Rad (EEUU) [fosforilasa b (106.000 Da), albúmina sèrica bovina (80.000 Da), ovoalbúmina (49.500 Da), anhidrasa carbònica (32.500 Da), inhibidor de tripsina (27.500 Da) i lisozim (18.500 Da)].

II.E.2.c. DETERMINACIO DE L'ACTIVITAT RIBONUCLEASA

Per a la determinació de l'activitat ribonucleasa ja sigui de forma quantitativa o de forma qualitativa, s'han emprat diferents mètodes basats en diverses tècniques, substrats i suports:

- (i) Mesura espectrofotomètrica de l'increment d'absorbància a 260 nm emprant poli(C) com a substrat
- (ii) Mesura dels paràmetres cinètics per determinació de l'activitat amb poli(C) i C>p
- (iii) Plaques d'activitat basades en la tinció amb toluidina d'àcids nucleics no hidrolitzats
- (iv) Plaques d'activitat per a la determinació de l'expressió de l'activitat ribonucleàsica
- (v) Gels de poliacrilamida-SDS amb poli(C) revelats per activitat (zimogrames)

II.E.2.c.(1). Determinacions espectrofotomètriques

Per als assajos espectrofotomètrics d'activitat es va utilitzar un espectrofotòmetre Cary 1E UV-Visible Spectrophotometer (Varian, Austràlia) o bé un espectrofotòmetre Hewlett Packard HP 8452 A tots dos amb cambra de cubetes termostatitzada.

Material i Mètodes

Mesura espectrofotomètrica de l'increment d'absorbància a 260 nm emprant poli(C) com a substrat

L'activitat ribonucleàsica de les fraccions de les cromatografies realitzades per a l'aïllament de la HPRNAasa, s'ha determinat mitjançant el seguiment de l'increment de l'absorbància a 260 nm que es produeix quan s'hidrolitza el poli(C).

1. Preparar una solució 0,1 mg/ml de poli(C) (Sigma, EEUU) en 0,1 M Tris HCl, pH 8,0, tenint en compte que per a cada mostra es fa servir 1 ml d'aquesta solució de substrat. Per a facilitar la dissolució del poli(C) la dissolució s'incuba durant 15 minuts a 45-50°C i seguidament es deixa reposar durant 30 minuts a 37°C abans de dur a terme les mesures cinètiques.

2. En una cubeta de quars es barregen:

Dissolució de substrat	1 ml
Mostra	2-50 µl

La quantitat de mostra és variable dependent de la concentració de ribonucleasa i de la linealitat que presenti la cinètica que s'està duent a terme.

3. Barrejar els diferents components invertint la cubeta, tapada amb parafilm, dues o tres vegades, i seguir immediatament l'absorbància durant 2 minuts. La unitat d'activitat arbitrària que es va considerar, es defineix com la quantitat d'enzim que causa un increment en l'absorbància a 260 nm de 1,0 unitats de densitat òptica.

Determinació de l'activitat amb citidina 2',3'-fosfat cíclic (C>p)

Els paràmetres cinètics de les diferents ribonucleases expressades en *E.coli* i de la ribonucleasa de pàncreas humana es van determinar utilitzant C>p com a substrat pel mètode espectrofotomètric de Crook i col., (1960) amb les modificacions incorporades per Herries i col., (1962). En aquest mètode la hidròlisi del substrat C>p, segona etapa del mecanisme catalític de la ribonucleasa, es mesura seguint l'increment d'absorbància a 296 nm produït pel trencament de l'enllaç cíclic i la formació de 3'-CMP. Les condicions d'assaig utilitzades foren les següents:

Amortidor: 0,2 M acetat sòdic, pH 5,5

Temperatura: 25°C

Substrat: Es varen assajar 8 dilucions de C>p entre 0,1 i 2,5 mM en amortidor 0,2 M acetat sòdic, pH 5,5. Les concentracions de les diferents solucions es varen comprovar a partir del coeficient d'extinció molar del C>p a 268 nm: $\epsilon_{268} = 8650 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Wigler, 1968).

Enzim: La concentració final d'enzim fou de 0,1 µM per tots els casos assajats.

Volum de reacció: 1 ml de la solució de substrat + 20 µl d'enzim. Les cubetes utilitzades eren de quars i amb 1 cm de pas de llum.

Temps de reacció: La reacció és lineal durant 3-5 minuts a partir dels 10-20 segons. Es varen prendre mesures de 100 segons.

Unitats: V_{max} en mM/min, K_m en mM i k_{cat} en minuts^{-1} . S'ha emprat l'increment d'absorció del 3'-CMP respecte el C>p a 296 nm: $\Delta\epsilon_{296} = 516,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Arús, 1981).

Determinació de l'activitat amb poli(C)

Els paràmetres cinètics de les ribonucleases expressades i de la ribonucleasa de pàncreas humà es varen determinar espectrofotomètricament, utilitzant poli(C) com a substrat, pel seguiment de la disminució de l'absorbància a 294 nm. L'elecció d'aquesta longitud d'ona es basa en un estudi de l'evolució en el temps de l'espectre d'absorbàncies entre 230 i 320 nm, en el qual es va observar que hi havia una regió de disminució màxima d'absorbància entre 292 i 296 nm (Boix, 1993). La determinació de l'activitat utilitzant com a substrat poli(C) permet estudiar el mecanisme catalític de les ribonucleases davant de substrats d'elevada massa molecular. Les condicions de l'assaig es descriuen a continuació:

Amortidor: 0,2 M acetat sòdic, pH 5,5

Temperatura: 25°C

Substrat: Es varen assajar 8 dilucions de poli(C) entre 0,1 i 2,5 mg/ml en amortidor 0,2 M acetat sòdic, pH 5,5.

Enzim: La concentració final d'enzim fou de 5 nM per tots els casos assajats.

Volum de reacció: 500 μl de la solució de substrat + 12,5 μl d'enzim. Les cubetes utilitzades eren de quarz i amb 0,2 cm de pas de llum i rentades amb mescla cròmica.

Temps de reacció: La reacció és lineal durant 2-3 minuts. Es varen prendre mesures de 120 segons.

Unitats: V_{max} en disminució de Abs/min, K_m en mg/ml i $V_{max\text{relativa}}/[E_0]$ en %. $[E_0]$ és la concentració final de l'enzim.

Per al càlcul de les constants cinètiques K_m i V_{max} tant en els assajos amb poli(C) com en els assajos amb C>p, s'ha utilitzat el programa d'anàlisi de dades per regressió no lineal ENZFITTER, "A non-linear regression data analysis program" (Leatherbarrow, 1987). Les velocitats inicials es varen calcular a partir de la tangent des de l'origen de la progressió cinètica amb el programa HP-89531 A de l'espectrofotòmetre Hewlett Packard HP 8452 A.

II.E.2.c.(2). Determinacions en placa

Determinació de la presència d'activitat en plaques d'agarosa

Les plaques d'activitat constitueixen una tècnica molt útil i ràpida per acotar les zones d'una cromatografia que presenten activitat ribonucleasa. La tècnica es basa en determinar les regions on hi ha hagut digestió del substrat que hem disposat en l'agarosa abans que aquesta gelifiqui, per tinció del substrat que no ha estat digerit. Per a preparar 10-12 plaques s'ha seguit el següent protocol:

1. Es pesen les següents quantitats dels components que han de constituir les plaques d'activitat:

Tris	3,0 g
RNA (Torula Yeast, tipus VI, Sigma, EEUU)	125 mg
Agarosa baixa EEO (Ecogen)	2,0 g

La concentració final en la placa és: 0,8-1% agarosa (p/v); 0,5 mg/ml RNA; 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0.

2. Els 2 g d'agarosa es dissolen en 200 ml d'aigua destil·lada i es fon l'agarosa en el microones.
3. Els 3,0 g de Tris es dissolen en 50 ml d'aigua destil·lada i s'ajusta el pH a 8,0 amb HCl.
4. Es dissolen els 125 mg del RNA en els 50 ml de Tris-HCl i un cop la temperatura de la dissolució d'agarosa ha baixat de 50°C, es mesclen totes dues dissolucions. S'agita bé i tot seguit s'aboca sobre plaques de petri que es troben en una superfície plana procurant dispensar uns 15-20 ml per placa.
5. Les plaques es deixen solidificar i assecar a temperatura ambient. Un cop seques es poden guardar en una bossa de plàstic a 4°C per períodes llargs de temps (2-3 mesos). En cas que es vulguin utilitzar de nou cal atemperar-les i deixar-les assecar prèviament.
6. Per a dur a terme la determinació d'activitat es col·loca la placa sobre una quadrícula numerada la qual cosa ens permet dipositar, de forma ordenada, sobre la placa, 1-2 µl de cadascuna de les fraccions que es vulguin assajar. El número de mostres que es poden assajar és variable i depèn del número de requadres que hom vulgui incloure en la quadrícula.
7. Un cop dipositades les mostres, la placa es tanca i s'incuba a 37°C durant períodes de temps que han variat en aquest treball entre les 2 i les 15 hores. Períodes d'incubació de 4 hores han permès detectar concentracions de fins a 10 ng/µl de RNAasa
8. Després del temps d'incubació escollit, el RNA no digerit es tenyeix amb una solució de toluidina 0,1% (p/v) en 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 durant 10 minuts. S'ha constatat, durant aquest treball que la tinció efectuada simultàniament amb agitació de la placa dona lloc a tincions poc homogènies per la qual cosa és recomanable efectuar la tinció amb la placa immòbil.
9. L'eliminació de l'excés de colorant es duu a terme amb diferents rentats amb aigua corrent, fins la detecció de les àrees d'activitat les quals apareixen com a taques blanques sobre un fons blau. Si es vol accelerar el procés de destinció es poden efectuar rentats amb 7% àcid acètic.
10. Situant la placa sobre la quadrícula es poden determinar quines fraccions presenten activitat ribonucleasa.

Aquest sistema s'ha utilitzat, com s'ha esmentat, per a localitzar l'activitat ribonucleàsica d'entre les fraccions d'una cromatografia i de les diverses fraccions resultants d'un fraccionament o processament d'una mostra. Atès que permet assajar un elevat nombre de fraccions en un temps relativament curt - comparat amb els mètodes espectrofotomètrics - i l'elevada sensibilitat de la tècnica, l'anàlisi de l'activitat en placa d'agarosa permet establir ràpidament quines són les fraccions que han de sotmetre's a posteriors assajos.

Assaig d'activitat en placa per a la detecció de l'expressió de l'activitat ribonucleàsica

En qualsevol estudi d'expressió d'una proteïna recombinant és imprescindible un sistema de detecció que permeti conèixer si la proteïna d'interès s'està expressant o no, i encara més, si aquesta ho està fent en una forma correctament plegada o plenament funcional. En el cas que ens afecta, en tractar-se d'un enzim, es buscava que l'expressió heteròloga de la HPRNAasa es concretés en una forma activa. Per tal de seleccionar aquells clons en els quals s'expressava la HPRNAasa activa es va dur a terme un assaig en placa de medi-agar que portava a més a més RNA. Les colònies replicades en aquest tipus de placa que presenten activitat ribonucleasa es detecten com un halo clar sobre un fons més fosc en precipitar amb àcid perclòric el RNA d'alt pes molecular que no ha estat digerit. A continuació es detalla el procediment emprat per dur a terme aquest assaig:

1. Les plaques per a la determinació de l'expressió es preparen com s'ha descrit en l'apartat II.B.3., YEPD-2% agar (p/v) si s'està treballant amb *S.cerevisiae* i LB-1,5% agar (p/v) si s'està treballant amb *E.coli*, però afegint-hi 50 ml d'una solució 40 mg/ml de RNA (Torula Yeast RNA tipu VI, Sigma), que s'esterilitza per filtració. La concentració final és 2 mg/ml de RNA.
- 2.a. En estudis d'expressió en llevat, 1-2 µl d'un cultiu de BJ2168 portador de YEpHPR1 o YEpHPR2 crescut la nit abans en S4%D-leu es dipositaren sobre la placa de YEPD2%D-2% agar (p/v)-2 mg/ml de RNA. Les plaques s'incubaren durant 72 hores a 30°C. Els cultius dels quals s'ha partit per sembrar aquestes plaques es poden guardar, per períodes curts de temps a 4°C o alternativament fer-ne glicerinars (apartat II.B.4.). Aquests assajos en placa es poden dur a terme directament després de la selecció dels transformants descrita en l'apartat II.C.1.g.
- 2.b. En estudis d'expressió en *E.coli*, 1 µl d'un cultiu de nit es va dipositar en una placa de LB-1,5% agar (p/v), Amp 50 µg/ml, RNA 2 mg/ml de RNA i 1 mM IPTG. La placa s'incubà durant 8 hores a 37°C. Aquestes plaques són vàlides per a qualsevol de les construccions amb les quals s'ha treballat, puix que en ambdues l'expressió és induïble per IPTG, i sempre i quan el sistema d'expressió direccioni la secreció de la proteïna a l'espai periplàsmic. Els cultius de nit utilitzats deriven de colònies seleccionades com s'ha descrit en l'apartat II.C.1.g. Aquests mateixos cultius (3-5 ml) poden ésser utilitzats per a l'obtenció de glicerinars, obtenció mini-preparativa de DNA plasmídic i per a establir rèpliques de les colònies assajades en plaques de LB-1,5% agar, 50 µg/ml de Ap.

3. L'expressió d'activitat ribonucleasa es va revelar rentant les colònies amb aigua destil·lada, seguit d'un rentat amb 10% (v/v) d'àcid perclòric, el qual té la funció de precipitar el RNA d'elevat pes molecular que no hagi estat digerit. Quan les zones de digestió es fan aparents com un halo clar en un entorn més fosc, les plaques es renten amb aigua corrent i es poden fotografiar com s'ha descrit en l'apartat II.E.2.b.

Quan es varen realitzar aquests assaigs, es varen introduir sempre en la mateixa placa on s'avaluaven colònies suposadament capaces d'expressar la reHPR, un control negatiu constituït per cèl·lules transformades amb el mateix vector sense insert i un control positiu format pel mateix vector i que portava com a insert el cDNA codificant per la ribonucleasa de pàncreas boví recombinant (reBPR). Aquests controls permetien conèixer de forma simultània, si s'estava donant un fals positiu i verificar si la tècnica estava funcionant.

II.E.2.c.(3). Gels de poliacrilamida-SDS amb poli(C) revelats per activitat, zimogrames

Un altre sistema que s'ha emprat per a la detecció i seguiment de l'activitat ribonucleàsica és el gel d'activitat o zimograma, el qual es basa també en una tinció negativa. Aquest sistema s'ha utilitzat per al seguiment de les cromatografies, per a la detecció de les bandes d'activitat que constitueixen cadascuna de les fraccions d'una purificació, el seguiment d'una inducció i també per a l'anàlisi de la glicosilació. El sistema que es descriu en aquest treball, apart de l'elevada sensibilitat i especificitat, presenta l'avantatge respecte altres mètodes de detecció d'activitat ribonucleasa que, alhora que determina si una fracció és o no activa, permet visualitzar quina o quines espècies moleculars són responsables d'aquesta activitat.

El mètode de tinció negativa de gels de poliacrilamida-SDS amb poli(C) que es detalla a continuació (Bravo i col., 1994), és una modificació del mètode descrit per Blank i col., (1982).

Essencialment, la tècnica es caracteritza perquè el gel separador conté com a element addicional un substrat d'elevat pes molecular de la RNAasa (poli(C)), que és afegit durant el procés d'entrecreuament de les cadenes d'acrilamida. Després de separar mitjançant una electroforesi convencional les proteïnes, el SDS s'elimina del gel amb uns rentats amb isopropanol aquós. Això permet la renaturalització completa de les proteïnes i entre elles les que presenten activitat ribonucleasa. Un cop plegades, aquestes degraden localment el substrat que estava immers en el gel i es poden visualitzar per tinció negativa quan es submergeix el gel en colorants que tenyeixen els àcids nucleics. El protocol seguit és el que es detalla a continuació:

És imprescindible que el material estigui molt net per la qual cosa els vidres, separadors i pintes s'han de netejar exhaustivament amb etanol 70%, abans de l'electroforesi. Tots els gels d'activitat s'han realitzat emprant separadors de 0,75 mm.

Material i Mètodes

1. Es prepara un gel del percentatge desitjat segons s'ha descrit anteriorment en l'apartat II.E.2.b, amb lleugeres modificacions:
 - a. Es dispensa en un vas de precipitats l'aigua i en un altre l'amortidor del gel de separació i la solució d'acrilamida.
 - b. En el vas de precipitat que conté l'aigua es dissol el poli(C) [prèviament s'haurà pesat utilitzant dues pinces fetes netes submergint-les un parell de minuts en àcid nítric diluït i esbandides amb aigua destil·lada] que ha de tenir una concentració final en el gel de 0,3 mg/ml de gel.
 - c. Aquesta dissolució s'incuba tapada amb paper d'alumini, en una estufa a 55°C durant 10 minuts. Aquest pas facilita la dissolució del poli(C).
 - d. Un cop dissolt el poli(C), s'aboca sobre el vas que el conté la barreja de solució d'acrilamida i d'amortidor del gel separador.
 - e. S'afegeixen les quantitats de TEMED i 10% persulfat amònic que pertoquin i s'agita la solució fent girar el vas sobre una superfície plana, sempre d'una forma suau.
 - f. S'aboca la dissolució del gel separador en el suport i s'hi afegeix una capa d'aigua que facilita la polimerització i permet que el front del gel no es deformi. El gel es deixa polimeritzar com a mínim durant 30 minuts.
2. El gel concentrador es prepara com s'ha descrit en l'apartat II.E.2.b.
3. Les mostres es preparen amb amortidor d'aplicació de mostres 4x sense β -mercaptoetanol com s'ha indicat en l'apartat de mètodes electroforètics (II.E.2.b.)
4. Les condicions d'electroforesi han estat les mateixes que les d'una electroforesi discontinua de poliacrilamida-SDS. Es va córrer l'electroforesi a 20 mA fins que el colorant blau de Bromofenol va eixir del gel.
5. Tot seguit es procedí a revelar el gel:
 - a. El SDS és eliminat del gel submergint aquest en amortidor 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20% isopropanol, amb agitació suau. Es fan dos rentats de 15 minuts cada un utilitzant uns 50-100 ml per a cada rentat.
 - b. L'isopropanol s'elimina incubant el gel en amortidor 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, amb agitació suau. Aquest rentat de 15 minuts es fa dues vegades i en cada rentat s'utilitzen 50-100 ml.
 - c. El gel s'incuba, en agitació suau, a temperatura ambient en amortidor 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0. El temps d'incubació és variable dependent de la concentració de la mostra i ha oscil·lat durant el treball, entre 30 minuts-1 hora a temperatura ambient fins a tota la nit a 4°C. Aquesta incubació és interessant dur-la a terme amb agitació molt suau per evitar al màxim la difusió.
 - d. Incubar el gel durant 10 minuts amb agitació, en amortidor 10 mM Tris-HCl, pH 8,0.
 - e. Els gels es tenyeixen per un període de 10-15 minuts, submergint-los en una dissolució de blau de toluídina 0,1% (p/v), 10 mM Tris-HCl, pH 8,0. Aquest pas tenyeix el poli(C) que no ha estat digerit. Les zones o bandes d'activitat apareixen, després d'eliminar l'excés de colorant, com a bandes clares sobre un fons blau.
 - g. Per a eliminar l'excés de colorant el gel es renta, fent-ne diversos canvis, amb aigua corrent. Si es vol accelerar el procés de decoloració el gel se submergeix en una dissolució d'àcid acètic al 7%. El gel es

Material i Mètodes

pot tornar a tenyir emprant la tinció amb nitrat d'argent/carbonat sòdic descrita en l'apartat II.E.2.b, ja que la tinció amb nitrat d'argent havia estat descrita com una tinció per a àcids nucleics per Somerville i Wang, (1981). Aquest sistema que incrementa la resolució de les bandes, permet en alguns casos, detectar la presència d'altres proteïnes sense activitat que també queden tenyides pel nitrat d'argent.

Alternativament als sistemes de tinció que s'han descrit, l'aparició de les bandes d'activitat es pot seguir col·locant el gel sobre una placa de capa fina de cel·lulosa amb l'indicador fluorescent F254 (Merck), la qual ha estat embolicada amb paper transparent (Glad). Tot seguit s'il·lumina amb llum ultraviolada de 254 nm mitjançant una font UVatom 70 (Atom). Les bandes d'activitat s'observen com zones clares en un entorn més fosc. Aquest sistema presenta l'avantatge que permet seguir l'aparició de les bandes d'activitat a mesura que aquestes es van generant alhora que pot ésser fotografiat en les mateixes condicions amb què es fotografia el DNA en un gel d'agarosa. S'utilitzà una obertura de diafragma de 4,5 i un temps d'exposició de 2 minuts i 30 segons.

II.E.2.d. ANÀLISI DE LA GLICOSILACIÓ

II.E.2.d.(1). Digestions enzimàtiques amb glicohidrolases

Amb la finalitat d'esbrinar si l'heterogeneïtat que s'ha observat per la ribonucleasa de pàncreas humà era deguda a diferents nivells de glicosilació, quin tipus de cadena o cadenes generaven aquesta heterogeneïtat i per veure si hi havien diverses cadenes que podien originar-la, es varen dur a terme un seguit de digestions amb diferents glicohidrolases.

Digestió a diferents temps amb endo-F

Es va voler establir si existia més d'una diana de glicosilació via asparagina (Asn-X-Ser/Thr) i per això s'afegiren 0,5 unitats d'endo- β -N-acetilglucosaminidasa F a 25 μ l d'una dissolució que contenia 20 unitats de la fracció altament glicosilada de HPRNAasa dissoltes en amortidor 25 mM acetat sòdic, pH 5,5. La incubació es dugué a terme a 37°C i es prengueren al·lotes de 5 μ l a diferents temps. La reacció s'aturà per l'addició de l'amortidor d'aplicació de mostres no reductor (apartat II.E.2.b) i congelació immediata de les mostres. Les digestions es varen visualitzar carregant-les en un zimograma (II.E.2.c.(3).)

Digestió de les fraccions altament glicosilades obtingudes en la cromatografia de fase inversa

Quantitats variables (entre 2-10 unitats de HPRNAasa) de les fraccions fortament glicosilades trobades després de la cromatografia de fase inversa es varen dissoldre en 10 μ l d'amortidor 25 mM acetat sòdic, pH 5,5, afegint-hi 0,1 unitats d'endo-F, i s'incubaren durant 20 hores a 37°C. La reacció fou aturada per l'addició

de l'amortidor d'aplicació de mostres sense β -mercaptoetanol i escalfant-les durant 1 minut en un bany amb aigua bullint.

Les glicohidrolases utilitzades en aquest apartat foren subministrades per Boehringer Mannheim, Alemanya, i es varen seguir les condicions d'incubació recomanades pel proveïdor (Glycohydrolases, Biochemicals Catalogue, (1987) Boehringer Mannheim, Alemanya).

Una unitat (U) d'endo- β -N-acetilglucosaminidasa F es defineix com la quantitat d'enzim capaç d'hidrolitzar 1 μ mol de dansil-Asn-(GlcNac)₂-(Man)₅ en 60 minuts a 37°C i pH 5,0.

Una unitat d'endo- β -N-glucoaminidasa H (U) es defineix com la quantitat d'enzim que durà a terme la hidròlisi de 1 μ mol de dansil-Asn-(GlcNac)₂-(Man)₅ en 60 minuts a 37°C i a pH 5,5.

Les unitats de ribonucleasa han estat definides en l'apartat II.E.2.c.(1).

II.E.2.d.(2). Digestions enzimàtiques amb proteases

Les digestions amb proteases que es descriuen a continuació es varen dur a terme amb la finalitat d'aïllar els pèptids que es trobaven glicosilats i posteriorment estudiar-ne la composició en sucres.

Es va seguir l'estratègia dissenyada en el treball de Beintema i col., (1988) per a l'aïllament dels pèptids provinents de la digestió amb tripsina i quimotripsina de la ribonucleasa de tipus secretori d'urina humana amb lleugeres modificacions.

En primer lloc es varen combinar les diverses fraccions de HPRNAasa provinents de la cromatografia de fase inversa, en dues altres fraccions que s'anomenaren HG i LG en funció del contingut en sucres de les fraccions de fase inversa que les constituïen. Aquestes fraccions HG i LG es varen liofilitzar. Un cop liofilitzades es va procedir a la seva digestió segons el següent protocol:

1. Preparació de l'àcid perfòrmic:

H ₂ O ₂ 30% (v/v)	50 μ l
àcid fòrmic	950 μ l

Aquesta solució 5% (v/v) H₂O₂; 95% (v/v) àcid fòrmic, es deixa reposar a temperatura ambient durant 2 hores i 30 minuts abans d'utilitzar-la.

2. Afegir per cada 50 μ g de proteïna, 10 μ l d'àcid fòrmic i 20 μ l d'àcid perfòrmic. Aquesta dissolució s'incuba durant 2 hores en gel picat per aconseguir l'oxidació de les cisteïnes i les metionines.
3. Donar un pols de centrifuga a 12.000 xg, congelar i liofilitzar.
4. Es fa un rentat amb 100 μ l d'aigua per eliminar les restes d'àcid fòrmic i de perfòrmic que poguessin romandre i liofilitzar de nou.

Material i Mètodes

5. Dissoldre la proteïna a 5mg/ml amb 0,2 M NH_4HCO_3 , pH 8,0.
6. Afegir tripsina (tractada amb N-tosil-L-fenilalanilclorometil cetona (TPCK), Worthington) dissolta en el mateix amortidor 0,2 M NH_4HCO_3 , pH 8,0, fins a una relació final 1:100 (p/p) [tripsina : HPRNAasa]. Incubar 2 hores en un bany a 37°C.
7. Afegir quimotripsina (tractada amb N-tosil-L-lisilclorometil cetona (TLCK), Worthington) dissolta en el mateix amortidor 0,2 M NH_4HCO_3 , pH 8,0, fins a una relació final 1:100 (p/p) [quimotripsina : HPRNAasa]. Incubar 2 hores en un bany a 37°C. Després de les digestions, centrifugar breument a 12.000 xg, 5 segons i posar la mostra a liofilitzar.

II.E.2.d.(3). Aïllament dels glicopèptids

Les barreges de digestió obtingudes com s'ha descrit en l'apartat II.E.2.d.(2), varen ser el punt de partida per al procediment cromatogràfic que va permetre aïllar, entre altres, els pèptids glicosilats.

El procediment cromatogràfic va consistir en una cromatografia de gel filtració seguida d'una cromatografia de fase inversa. L'estratègia cromatogràfica escollida es basa en què els pèptids glicosilats presenten temps d'elució curts en la cromatografia de gel filtració, degut a l'efecte d'augment de mida que provoquen els sucres, i que en la cromatografia de fase inversa es poden separar dels pèptids no glicosilats que puguin co-eluir, degut a la disminució de caràcter hidrofòbic provocat pels mateixos sucres i al fet que aquest caràcter difereix per la pròpia composició i longitud dels pèptids del digerit.

Les condicions de les cromatografies que es varen dur a terme es descriuen a continuació:

Cromatografia de gel filtració

Les preparacions de HPRNAasa (0,2 mg) foren oxidades i digerides amb tripsina i quimotripsina com s'ha descrit anteriorment (apartat II.E.2.d.(2)). Es varen dissoldre en 0,2 M acètic abans de dur a terme la cromatografia a pressió atmosfèrica en les següents condicions:

<u>Dissolvent:</u>	0,2 M àcid acètic
<u>Columna:</u>	Pipeta de 1 ml amb Sephadex G-25 Superfine (Pharmacia)
<u>Detecció:</u>	Anàlisi per HPLC de fase inversa en columna Nucleosil 10 C18 (4,6 x 300 mm) del 10% de les fraccions recollides en la gel filtració
<u>Gradient:</u>	Isocràtic
<u>Volum / fracció</u>	0,15 ml

Com s'ha esmentat, la detecció de la presència dels pèptids fou duta a terme analitzant un 10% (v/v) de cada fracció mitjançant una cromatografia en fase inversa. Això va permetre reunir les diferents fraccions de la gel

filtració segons el patró cromatogràfic trobat en l'anàlisi en HPLC i fer injeccions preparatives per tal de separar els diferents pèptids del digerit.

Cromatografia de HPLC de fase inversa

Les fraccions agrupades després de la cromatografia de gel filtració es varen cromatografiar en una columna de fase inversa. L'equipament utilitzat fou essencialment el descrit en l'apartat II.E.1.a.

<u>Dissolvents:</u>	A) TFA 0,1% en H ₂ O; B) acetonitril 66% (v/v)+ TFA 0,09%
<u>Flux:</u>	1 ml/min
<u>Columna:</u>	Nucleosil 10 C18 (0,46 x 30 cm)
<u>Detecció:</u>	214 nm
<u>Gradient:</u>	0-90% B en 54 minuts; 90-100% en 1 minut; 100% B durant 10 minuts

Les fraccions corresponents als pèptids es varen recollir manualment, liofilitzats i s'utilitzaren per a dur a terme les anàlisis de seqüenciació i determinació de la composició glucídica.

II.E.2.d.(4). Anàlisi d'aminoàcids i seqüenciació dels pèptids

L'anàlisi d'aminoàcids i la seqüenciació automàtica dels pèptids es va dur a terme amb un analitzador d'aminoàcids Hewlett Packard, model Amino Quant 1090M i en un seqüenciador Applied Biosystems 477 A respectivament, a les instal·lacions de l'Institute BIOSON i Eurosequence de la Universitat de Gröningen (The Netherlands).

La seqüenciació i l'anàlisi d'aminoàcids va permetre identificar els pèptids aïllats per cromatografia en fase inversa i per tant quins eren els pèptids portadors d'una diana consens de N-glicosilació susceptible de trobar-se glicosilada.

La determinació de la seqüència de l'extrem N-terminal de la reHPR.B es dugué a terme en les instal·lacions de l'Institut de Biologia Fonamental " V. Villar i Palasi" de la Universitat Autònoma de Barcelona.

II.E.2.d.(5). Anàlisi dels sucres

L'anàlisi quantitativa de monosacàrids alliberats dels glicopèptids per metanòlisi fou dut a terme en els laboratoris del Prof. J.F.G. Vliegenhart, de la Universitat de Útrech, segons el mètode descrit per Kamerling i col., (1975).

Aquestes anàlisis han permès la determinació de la composició glucídica dels diferent glicopèptids de la HPRNAasa.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

III.A. OBTENCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE LA RIBONUCLEASA DE TIPUS SECRETORI A PARTIR DE PÀNCREAS HUMÀ (HPRNAasa)

En aquest apartat es presenten els resultats obtinguts en el desenvolupament d'un mètode de purificació de la HPRNAasa que s'aparta dels protocols utilitzats anteriorment, buscant un mètode més ràpid i resolutiu que, en definitiva, ha permès l'aïllament i caracterització de la HPRNAasa. Aquest mètode pot ésser aplicat també, a la descripció d'altres sistemes que presentin microheterogeneïtat glucídica

III.A.1. Aïllament de la HPRNAasa mitjançant cromatografia líquida d'elevada resolució (HPLC i FPLC)

El component ribonucleàsic majoritari de pàncreas humà s'ha purificat a partir d'extrets del teixit humà mitjançant un procediment consistent en una extracció àcida o neutra, una cromatografia de bescanvi iònic i una cromatografia de fase inversa. Els protocols detallats per a cada una de les etapes han estat descrits en l'apartat II.E.1.a.

La purificació de la HPRNAasa utilitzant l'extracció neutra^a es troba resumida en la Taula III.A.1.1.

	Volum	Activitat ^b	Proteïna	Activitat Específica	Activitat Total	Rendiment	Purificació
	(ml)	(U/ml)	(mg/ml)	(U/mg)	(U)	(%)	(vegades)
Homogeneïtzat	300	270	15,7	17	81000	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	50	652	32,8	19,9	32000	40,3	1,17
MONO-S ^c	30	920	0,083	11084	27600	34,0	652
VYDAC C4 ^c	10	1810	0,009	201000	18100	22,3	11380

Taula III.A.1.1. Resum de la purificació de la HPRNAasa. **a:** En cada procés es va utilitzar un únic organ. **b:** Per a determinar l'activitat es va emprar el mètode espectrofotomètric amb poli(C), descrit en l'apartat II.E.2.c.(1). **c:** Els valors que s'han donat en aquests apartats corresponen a la suma de totes les fraccions amb activitat ribonucleasa.

Durant aquest treball s'han provat dos sistemes per a l'extracció del component ribonucleàsic a partir del pàncreas humà. Amb el procediment neutre es pretenia fer un tractament més suau que preservés la glicosilació la qual, constituïa l'objecte d'aquest estudi. Tanmateix es va observar, en gels d'activitat i per determinació del percentatge de proteïna glicosilada, que l'extracció àcida permetia recuperar una major quantitat de proteïna activa sense afectar, de forma detectable, el patró de glicosilació observat utilitzant el procediment d'extracció neutra.

Els rendiments globals de les purificacions realitzades utilitzant el sistema d'extracció neutra oscil·laren entre el 20% i el 30% de l'activitat ribonucleasa inicial amb purificacions al voltant de 10.000 vegades respecte l'homogeneïtzat. L'activitat específica final, 2×10^5 unitats/mg de proteïna, és equivalent a la de la RNAasa de pàncreas boví comercial repurificada utilitzant el mateix assaig.

El procediment d'extracció amb àcid sulfúric no va mostrar diferències detectables respecte el sistema d'extracció neutra, excepte que l'extracció àcida va proporcionar millors rendiments generals (250-300 µg determinats pel mètode de Bradford), indicant que els motius glucídics de les diverses fraccions no eren afectades pel tractament acídic. Així doncs, l'ús de l'extracció àcida constitueix un avantatge significatiu -permet recuperar entre un 100% i un 200% més de proteïna activa- atesa la baixa concentració d'enzim present en el pàncreas humà. Puix que l'extracció àcida permetia una millor recuperació de la HPRNAasa, aquest procediment fou el que s'utilitzà per a l'obtenció del material per a dur a terme els estudis de seqüenciació i anàlisi de la glicosilació, els resultats dels quals s'exposen en els apartats següents (III.A.2. i III.A.3.)

L'etapa de cromatografia de bescanvi catiónic partint d'un extremitat obtingut utilitzant el procediment àcid (figura III.A.1.1), només permetia una purificació parcial de la proteïna d'interès per la qual cosa era necessària una altra etapa cromatogràfica. En la figura III.A.1.1, s'observa que després de la cromatografia de fase inversa i la recromatografia de les fraccions actives (figura III.A.1.1, cromatogrames B i C) se separen diverses fraccions amb activitat ribonucleasa. En cada fracció s'han detectat diverses bandes amb activitat, tant per electroforesi discontinua en gels de poliacrilamida-SDS tenyits amb blau de Coomassie (figura III.A.1.2.A) com en gels revelats per activitat (figura III.A.1.2.B). Les masses moleculars de les bandes que presentaven activitat estaven compreses entre 14.000 i 40.000 aproximadament, segons s'ha determinat per electroforesi discontinua en gels de poliacrilamida -SDS.

El procediment de purificació de la ribonucleasa pancreàtica humana utilitzat és un mètode simple amb un elevat poder resolutori. Aquest fet juntament amb l'ús d'un material de partida sense massa possibilitats de deteriorament ha proporcionat una eina fonamental per elucidar l'heterogeneïtat que mostra la HPRNAasa.

L'ús de la cromatografia de fase inversa en HPLC ha proporcionat un sistema que separa les fraccions ribonucleàsiques en funció de la seva hidrofobicitat en bandes de masses moleculars diferents. Aquesta separació pot explicar-se pel caràcter polar dels sucres els quals incrementarien el caràcter hidrofílic de la proteïna. Aquest augment del caràcter polar de la proteïna degut a una modificació secundària, disminuiria el grau d'interacció de la proteïna amb la matriu de la columna i consegüentment el seu temps de retenció.

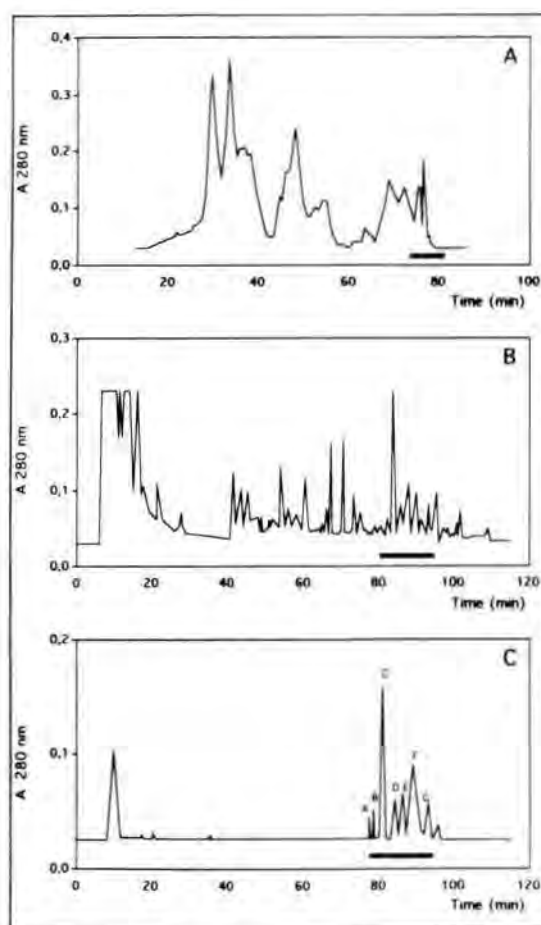


Figura III.A.1.1: Purificació de la HPRNAasa. Cromatograma **(A)**: Cromatografia de bescanvi iònic en columna MONO-S. La columna fou equilibrada amb 20 mM acetat sòdic, pH 5,5 i eluïda amb un gradient lineal de 0-0,2 M NaCl en amortidor d'equilibrat durant 60 min i de 0,2-1 M NaCl en amortidor d'equilibrat durant 15 min a un flux de 1 ml/min. Cromatograma **(B)**: Cromatografia en fase inversa en una columna Vydac 214 TP de les fraccions recollides amb activitat després de la cromatografia de bescanvi. La columna fou equilibrada en 90% de solvent A (0,1% TFA) i 10% de solvent B (CH₃CN, 0,1% TFA). Es va rentar amb 10% de B durant 20 min, es va dur a 22% de B en 20 min i de 22% a 33% de B en 60 min, a un flux de 0,5 ml/min. Cromatograma **(C)**: Recromatografiat de les fraccions actives de la fase inversa. S'utilitzà el mateix gradient que l'emprat en B. Les fraccions que contenien activitat han estat indicades amb una barra negra.

En la figura III.A.1.2.A. es mostra una electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS tenyida amb blau de Coomassie de les fraccions eluïdes de la cromatografia en fase inversa en la columna Vydac 214-TP C4 que presentaven activitat ribonucleasa (els carrers 3-7 de l'electroforesi corresponen a les fraccions C-G del cromatograma C representat en la figura III.A.1.1). S'observa que algunes de les fraccions presenten diverses bandes de proteïna, indicant que hi ha una possible contaminació entre pics veïns. L'anàlisi de les mateixes fraccions en gels revelats per activitat enfront de poli(C) (figura III.A.1.2.B), mostra també activitat en dues altres fraccions (carrers 1 i 2 corresponents als

pics A i B del cromatograma C de la figura III.A.1.1) que elueixen a temps de retenció menors. Aquestes fraccions que es trobaven més glicosilades no apareixen en el gel tenyit per proteïna (figura III.A.1.2.B) ja que no es varen poder detectar. Això és degut al fet que es troben en concentracions menors, fet que s'agreuja perquè els motius glucídics interfereixen amb la tècnica de tinció emprada, com s'havia constatat anteriorment en el nostre grup (Osset i col., 1989).

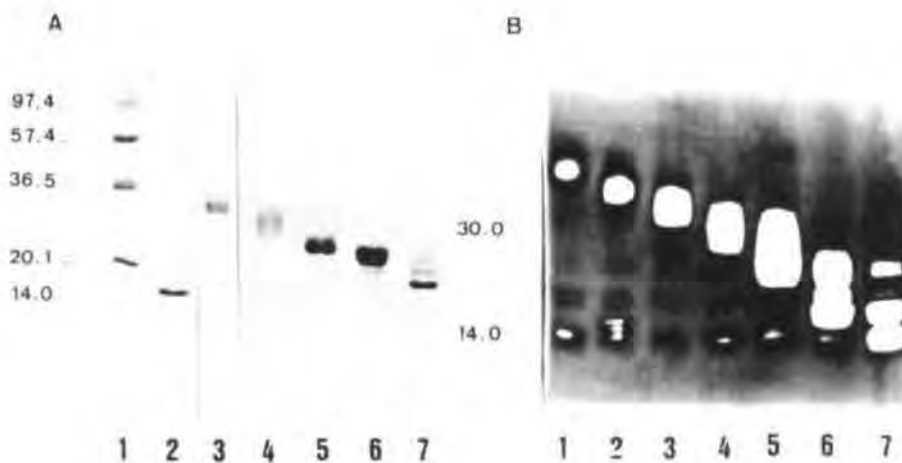


Figura III.A.1.2: **A.** Anàlisi electroforètica en un gel de poliacrilamida-SDS al 15% tenyit amb blau de Coomassie (apartat II.E.2.b.), de les diferents fraccions després de la cromatografia de fase inversa : **1.** Marcadors de massa molecular [fosforilasa b (97.000 Da) glutamat deshidrogenasa (55.400 Da), lactat deshidrogenasa (36.500 Da), inhibidor de tripsina de soja (STI) (20.100 Da), del Combithek Kit de Boehringer Mannheim]; **2.** RNAasa de pàncreas de bou (13.680 Da); **3.** fracció C; **4.** fracció D; **5.** fracció E; **6.** fracció F; **7.** fracció G. **B.** Anàlisi electroforètica en gel de poliacrilamida-SDS-poli(C) de les fraccions amb activitat que eluïren de la cromatografia de fase inversa : **1.** fracció A; **2.** fracció B; **3.** fracció C; **4.** fracció D; **5.** fracció E; **6.** fracció F; **7.** fracció G. Les lletres de les fraccions estan referides als pics del cromatograma C de la figura III.A.1.1.

La quantificació proteica de les fraccions eluïdes en la cromatografia de fase inversa posa de manifest que entre el 80 i el 90% de la HPRNAasa es troba glicosilada. Aquesta dada està corroborada pel fet que no es va detectar el pèptid T7 (Asn-34-->Arg-39) en la seva forma lliure de carbohidrats (apartat III.A.2.b).

El gel tenyit per activitat enfront de poli(C) de la figura III.A.1.2.B, mostra la presència de diverses bandes (carrers 1-5) amb masses moleculars aparents d'entre 25.000 i 40.000 Da, les quals no havien estat descrites prèviament en pàncreas humà.

La separació de les diverses formes tant en electroforesi en gels de poliacrilamida-SDS com en zimograma sembla estar afavorida pel comportament anòmal de les fraccions glicosilades en gels de poliacrilamida-SDS (Grefrath i col., 1974; Leach i col., 1980a,b), fet que pot ésser atribuït a la unió de menys quantitat de SDS degut a una disminució del caràcter hidrofòbic de les glicoproteïnes. La resolució es pot millorar quan s'utilitzen gels del 15% o 18% i l'electroforesi es segueix amb l'ajut de marcadors pre-tenyits. En les electroforesis estàndards es va utilitzar un amortidor de càrrega o aplicació de mostres que contenia 2-mercaptoetanol. En els zimogrames però, s'utilitzà un amortidor no reductor per tal de conservar els enllaços disulfur intactes i facilitar el procés de renaturalització la qual cosa va permetre que els temps d'incubació fossin menors. La no reducció dels enllaços disulfur pot tenir una importància cabdal en la renaturalització de fraccions altament glicosilades perquè evita una possible interferència estèrica en el replegament de la proteïna.

III.A.2. Estudi de la glicosilació

III.A.2.a. CARACTERITZACIÓ AMB GLICOHIDROLASES

Prèviament a l'aïllament dels glicopèptids i l'anàlisi de sucres, era imprescindible determinar a què era deguda l'heterogeneïtat observada. La combinació de dues tècniques, com són la digestió amb glicohidrolases i l'anàlisi d'aquestes digestions en gels revelats per activitat, ha permès aclarir diferents dubtes preliminars com eren esbrinar si l'heterogeneïtat era deguda a la presència de carbohidrats, si aquests es trobaven units via O-glicosilació (units a Ser o Thr) o via N-glicosilació (units a Asn) i si aquesta unió es relitzava en un únic punt o en diferents dianes de la cadena polipeptídica.

L'heterogeneïtat glucídica desplegada per la HPRNAasa fou caracteritzada per tractament amb glicohidrolases sobre les fraccions A, B, C, i D (segons la nomenclatura establerta en la figura III.A.1.1., cromatograma C). S'escolliren aquestes fraccions perquè eren les fraccions més abundants i amb una massa molecular aparent més elevada. Les digestions es varen dur a terme com s'ha descrit en l'apartat II.E.2.d.(1).

En primer lloc calia determinar si l'heterogeneïtat que presentava la HPRNAasa era deguda o no a diferents graus de glicosilació per la qual cosa es varen sotmetre les fraccions més fortament glicosilades a digestió amb endo-F.

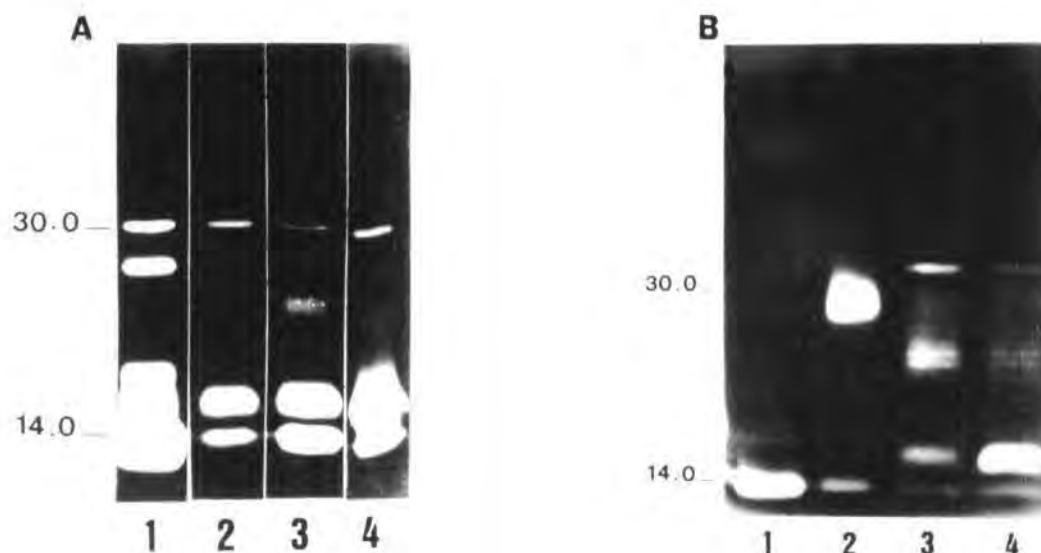


Figura III.A.2.1.: (A) Anàlisi electroforètica de 2-10 unitats de RNAasa de les quatre fraccions més fortament glicosilades [A, B, C i D] que es corresponen amb els carrers 1-4 de la figura III.A.1.2.B., després d'ésser tractades amb 0,1 unitats de endo-F en 10 μ l d'amortidor 25 mM acetat sòdic, pH 5,5, a37°C durant 20 hores, en un gel de poliacrilamida -SDS al 15% amb poli(C) revelat per activitat. 1. Fracció A + endo-F; 2. Fracció B + endo-F; 3. Fracció C + endo-F; 4. Fracció D + endo-F. (B) Anàlisi electroforètica de la fracció C tractada a diferents temps amb endo-F en un gel al 18% de poliacrilamida-SDS amb poli(C) a una concentració de 0,3 mg/ml revelat per activitat. 1. RNAasa A bovina; 2. fracció C; 3. fracció C després de 45 min de tractament amb endo-F; 4. fracció C després de 75 min de tractament amb endo-F.

En la figura III.A.2.1.A es visualitza el seguiment en gels revelats per activitat del tractament de les fraccions A, B, C, i D de la HPRNAasa amb endo-F i mostra que l'heterogeneïtat en masses moleculars aparents és deguda a diferents graus o nivells de glicosilació d'una mateixa cadena polipeptídica. S'observa, després de la digestió, que aquestes quatre fraccions més fortament glicosilades es redueixen a bandes de massa molecular aparent menor. L'aparició de dues bandes amb una mobilitat electroforètica lleugerament menor que la del control RNAasa A bovina pot explicar-se per una lleu contaminació de l'endo-F comercial amb glicopeptidasa F (PNGasa F)

segons advertència del mateix proveïdor (Boehringer Mannheim, Glycohydrolases.Biochemicals Catalogue, 1987). L'acció d'aquests dos enzims difereix només en la N-acetil-glucosamina remanent unida a asparagina en el cas de la digestió amb endo-F, la qual es digereix però, per la PNGasa F. Els productes de digestió d'ambdós enzims són distingibles en gels de poliacrilamida-SDS quan s'usa un percentatge igual o superior al 15%.

En segon lloc es va estudiar si l'heterogeneïtat era deguda a la glicosilació d'una única diana o si pel contari podia existir més d'una diana glicosilada. La HPRNAasa té tres possibles dianes consens (Asn-Xaa-Ser/Thr) de N-glicosilació via Asn (residus 34, 76 i 88). Fins el treball que es presenta, només la Asn-34 s'havia descrit que estava glicosilada en la HPRNAasa (Beintema i col., 1984). La incubació amb endo-F a diferents temps de la mateixa quantitat de la fracció C de HPRNAasa eluïda de la cromatografia de fase inversa (massa molecular aparent estimada 33.000 Da) va servir per a demostrar que la glicosilació tenia lloc a través de més d'una diana. Si la fracció C hagués estat glicosilada en una única diana d'entre les tres possibles, després de la digestió, fins i tot a temps curts, s'observarien només les bandes corresponents a la forma glicosilada i la banda corresponent a la proteïna lliure de sucres, però mai bandes de massa molecular intermitja. Tanmateix però, si la fracció C tingués més d'una cadena glucídica unida aleshores s'observarien en la digestió, especialment a temps curts, l'aparició de bandes de massa molecular intermitges.

Com es pot observar en la figura III.A.2.1.B, carrer 3, abans de ésser completament deglicosilada, es formen bandes de masses moleculars intermitges, que es revelen com a bandes actives en el zimograma, indicant que existeix més d'un lloc d'ancoratge de la glicosilació amb carbohidrats units. Tanmateix aquest experiment no permet fer una estimació de quin és el número exacte de dianes glicosilades.

III.A.2.b. AÏLLAMENT DELS GLICOPÈPTIDS I DETERMINACIÓ DE LA COMPOSICIÓ GLUCÍDICA I DE L'EXTREM C-TERMINAL.

Amb la finalitat d'aïllar els pèptids que contenen les dianes susceptibles d'ésser glicosilades, i posteriorment, analitzar si efectivament es troben glicosilades i determinar quina és la composició en monosacàrids d'aquests pèptids, les fraccions amb activitat ribonucleasa es varen agrupar, degut a la poca quantitat de mostra de què es disposava, en dues altres fraccions anomenades HG i LG segons l'aparent nivell de glicosilació observat en gels d'activitat (figura III.A.1.2.B). En la fracció HG es varen combinar les fraccions A, B, C i D (carrers 1, 2, 3 i 4 de la figura III.A.1.2.B) mentre en la fracció LG, es combinaren les fraccions E, F i G (carrers 5, 6 i 7 de la figura III.A.1.2.B). Les lletres de les fraccions estan referides als pics del cromatograma C de la figura III.A.1.1.

Aquestes fraccions glicosilades foren oxidades amb àcid perfòrmic i digerides amb tripsina i quimotripsina. Els pèptids resultants de la digestió foren purificats per filtració en gel i les fraccions que n'elueixen (0,15 ml) foren analitzades per HPLC de fase inversa. El perfil cromatogràfic d'aquestes injeccions analítiques va permetre agrupar les fraccions de la gel filtració segons la seva composició aparent en els diferents polipèptids. Aquestes noves fraccions es varen sotmetre a una cromatografia de fase inversa que va permetre l'aïllament de diferents pèptids, la identitat dels quals fou assignada per seqüenciació automàtica i anàlisi d'aminoàcids. Finalment els pèptids que contenien les dianes consens de N-glicosilació foren sotmesos a anàlisi per a la determinació de la seva composició glucídica. Per a una descripció més detallada del protocol seguit veure apartat II.E.2.d.(3). La nomenclatura emprada per a designar els diferents pèptids fou la utilitzada prèviament per Beintema i col., (1988a).

La composició en carbohidrats dels pèptids es presenta en la taula III.A.2.b.1. La recuperació dels pèptids tenint en compte tant les formes glicosilades com les formes lliures de sucres fou del 25%.

Monosacàrid	HPRNAasa			HUA RNAasa				RNAasa Seminal	HK-2B	
	Asn-34	Asn-76		Asn-34	Asn-76	Asn-88	Total			
		HG	LG	(HG)						
fucosa	4,4	4,3	3,4	8,7	1,0	1,3	1,0	3,3	4,3	2,5
manosa	6,0	3,6	3,5	9,6	2,7	3,2	3,0	8,9	3,2	3,0
galactosa	3,5	4,0	3,1	7,5	2,1	6,0	2,7	10,8	3,4	+
N-acetil glucosamina	6,2	5,1	4,6	11,3	3,2	8,0	5,5	16,7	4,1	2,3
àcid siàlic	-	-	-	-	0,7	1,6	1,2	3,5	-	-
Total				37,1				43,2	15,0	7,8

Taula III.A.2.b.1: Composició en carbohidrats dels glicopèptids de la ribonucleasa de pàncreas humà (dades d'aquest treball) i de les ribonucleases seminal, d'orina i de ronyó del tipus secretori, també d'humà. La quantitat de monosacàrids es dona en mol/mol de pèptid o proteïna. La quantitat de N-acetilglucosamina ha estat corregida pel trencament incomplet de l'enllaç N-glicosídic durant la metanòlisi. Les dades de la ribonucleasa d'orina (HUA) són de Beintema i col., (1988a), les de la ribonucleasa seminal són de De Prisco i col., (1984) i les dades per la ribonucleasa de ronyó (HK-2B) són de Yasuda i col., (1990).

Els glicopèptids T7, T11 i T12, d'acord amb la nomenclatura de Beintema i col., (1988a), i que corresponen als pèptids que contenen les Asn susceptibles d'ésser glicosilades, elueixen en les fraccions 6 i 7 de la cromatografia de filtració en gel en Sephadex G-25, molt properes al volum d'exclusió i abans dels altres pèptids. El pèptid T7 (Asn₃₄-Met₃₅-Thr₃₆-Glu₃₇-Gly₃₈-Arg₃₉) es trobà com a glicopèptid tant en la preparació HG com en la preparació LG mostrant una composició de sucres molt semblant tant si fou aïllat de la digestió de HG com si procedia de l'aïllament de la

digestió de LG. És per això que en la taula III.A.2.b.1, es presenta el valor promig de la composició en sucres del pèptid T7 de les dues fonts de procedència. No es va determinar el pèptid T7 en la seva forma lliure de sucres, ni dels pèptids aïllats de la digestió de la fracció HG ni dels aïllats de la digestió de LG, en fraccions d'elució posterior de la cromatografia de filtració en gel. El pèptid T11 (Ser₇₅-Asn₇₆-Ser₇₇-Ser₇₈-Met₇₉-His₈₀-Ile₈₁-Thr₈₂-Asp₈₃-Cys₈₄-Arg₈₅) fou aïllat com a glicopèptid de la cromatografia en fase inversa de les fraccions 6 i 7 de la filtració en gel i en la seva forma lliure de sucres de les fraccions 8 i 9 de la filtració en gel de totes dues preparacions de ribonucleasa HG i LG en una proporció 1 : 1,5. El glicopèptid que s'obtingué de la preparació LG conté, com es pot observar en la taula III.A.2.b.1, lleugerament menys carbohidrats (15 %) que el mateix glicopèptid T11 obtingut a partir de la preparació HG. Només en el digerit de la preparació HG de ribonucleasa, una petita quantitat del glicopèptid T12 (Leu₈₆-Thr₈₇-Asn₈₈-Gly₈₉-Ser₉₀-Arg₉₁) es va trobar com a contaminant del pèptid T7. La resta d'aquest pèptid fou aïllada en la seva forma lliure de carbohidrats a partir de la cromatografia en fase inversa de les fraccions 9 i 10 provinents de la cromatografia de filtració en gel. La relació pel pèptid T12 de glicopèptid:pèptid sense sucres en la fracció HG fou aproximadament 1:6.

En cap dels pèptids aïllats de la HPRNAasa es va poder determinar la presència d'àcid siàlic. Amb tot, cal contemplar la possibilitat que aquest hagi estat destruït durant l'oxidació amb àcid perfòrmic degut a les quantitats analítiques tant de HPRNAasa com de pèptids que s'han utilitzat en aquest estudi.

També es va estudiar la seqüència aminoacídica de l'extrem C-terminal de la HPRNAasa. En ambdues preparacions, HG i LG, el pèptid T16C3 corresponent a l'extrem C-terminal, fou aïllat després de la cromatografia en fase inversa de la fracció 9 de la columna de filtració en gel en dues formes diferents que diferien en el número de residus: Asp₁₂₁-Ala₁₂₂-Ser₁₂₃-Val₁₂₄-Glu₁₂₅-Asp₁₂₆-Ser₁₂₇ com ja havia estat descrit anteriorment per Beintema i col., (1984) per a la HPRNAasa i una segona forma amb la seqüència Asp₁₂₁-Ala₁₂₂-Ser₁₂₃-Val₁₂₄-Glu₁₂₅-Asp₁₂₆-Ser₁₂₇-Thr₁₂₈ com havia estat descrit anteriorment per a les ribonucleases seminal i d'orina d'humà per Beintema i col., (1988a). Aquests resultats confirmen la suposició feta amb anterioritat que, degut a petites restes de carboxipeptidasa, la Thr C-terminal pot ésser eliminada fàcilment (Beintema i col., 1988a).

En estudis previs als estadis preliminars d'aquest treball, s'acceptava, basant-se en els treballs més acurats fets fins aleshores de purificació de la HPRNAasa (Weickmann i col., 1981) i de determinació de la seqüència peptídica (Beintema i col., 1984) que només el 50% de les molècules d'enzim purificat presentaven N-glicosilació i que aquesta es donava només en la seqüència Asn₃₄-Met₃₅-Thr₃₆. D'altra banda dos treballs independents, en els quals es va descriure que les ribonucleases que es trobaven en suc pancreàtic presentaven més

heterogeneïtat de masses moleculars (Kurihara i col., 1982) i que la proporció de molècules de HPRNAasa glicosilades en pàncreas era més elevada (93%) (Yamashita i col., 1986), posaven en dubte les conclusions anteriors.

Fóra possible, com comenten Yamashita i col.laboradors que, en els estudis previs als quals s'ha fet referència, només s'obtingués part de la HPRNAasa total i que aquesta part estigués enriquida en la forma no-glicosilada. Un altre factor determinant podria haver estat el fet que les mostres utilitzades per a la purificació de la HPRNAasa no es trobessin en el mateix estat, pel fet de provenir d'autòpsies, que les utilitzades per a aquest treball i fos el deteriorament de les mostres, el que hauria impossibilitat de trobar l'heterogeneïtat que posseeix la HPRNAasa.

Gavel i von Heijne (1990) varen recollir i analitzar estadísticament, les dianes Asn-Xaa-Ser/Thr glicosilades i no glicosilades de proteïnes eucariotes i de les dades obtingudes varen concloure que les dianes no glicosilades tendeixen a trobar-se més freqüentment en l'extrem C-terminal de les proteïnes. Ells expliquen aquesta observació basant-se en el fet que l'extrem N-terminal, i per tant les dianes de glicosilació que s'hi puguin trobar, resta més temps aprop de la membrana del reticle endoplasmàtic, on l'oligosacaril transferasa sembla estar localitzada, mentre l'extrem C-terminal és més ràpidament conduït cap a l'interior de l'estructura quasi plegada o senzillament esdevé menys accessible i per tant és menys probable que es glicosili. En el cas que es descriu en aquest treball, la glicosilació de la Asn-34 pràcticament en la seva totalitat, la presència de carbohidrats ancorats en la Asn-76 en aproximadament la meitat i en la Asn-88 en una menor part de les molècules de la HPRNAasa es troba en concordança perfecte amb les propostes de Gavel i von Heijne.

Les propietats de les preparacions de HPRNAasa que es presenten són més semblants a les de la ribonucleasa d'orina humana (veure taula III.A.2.b.1 i Beintema i col., 1988a), que no pas les descrites anteriorment per la HPRNAasa (Beintema i col., 1981 i 1984). No només el comportament en gels de poliacrilamida-SDS, amb masses moleculars d'aproximadament 35.000 Da, sinó també el contingut en carbohidrats (al voltant de 40 residus glucídics per molècula) és semblant entre la HPRNAasa i la ribonucleasa d'orina de tipus secretori. La utilització d'òrgans que no hagin entrat en un estat de deteriorament i l'eficiència en el procés de purificació, hom entén, que han estat factors de gran importància en l'obtenció de mostres menys degradades. No obstant, les composicions en carbohidrats de la ribonucleasa de tipus secretori de pàncreas i orina presenten, segons aquest treball, un seguit de diferències:

1. En la ribonucleasa d'orina cadascun del llocs de glicosilació posseeix carbohidrats ancorats en totes les molècules, mentre en l'enzim pancreàtic la Asn-34 es troba glicosilada en la major part

de les molècules i les Asn-76 i Asn-88 es troben glicosilades en la meitat i en una petita part de les molècules, respectivament.

2. En la ribonucleasa de tipus secretori d'orina, els motius o estructures glucídiques són del tipus N-acetil-lactosamina. Les tres manoses ancorades en la Asn-76 de la HPRNAasa (taula III.A.2.b.1) indicarien també la presència d'un oligosacàrid del tipus N-acetil-lactosamina i per tant glicosilació del tipus complex. Tanmateix però, les sis manoses en el glicopèptid T7 que conté la Asn-34 indicarien la presència d'una cadena de tipus híbrid (Strecker i Mountreil, 1979).
3. La tercera diferència a considerar seria que la ribonucleasa de tipus secretori d'orina presenta en els seus motius glucídics aproximadament un residu de fucosa per cadena, probablement unida a la N-acetilglucosamina més interna. La HPRNAasa, conté en els motius glucídics, 3-4 residus de fucosa per cadena glucídica la qual cosa indicaria que la fucosilació s'ha produït també en altres punts de la cadena (Strecker i Mountreil, 1979).

Les ribonucleases de tipus secretori d'altres òrgans o fluids biològics humans també han estat estudiades. Yasuda i col., (1990) presentaren l'anàlisi de carbohidrats de dos components ribonucleàsics de tipus secretori en ronyó humà de la qual, es desprenia que ambdós contenien el mateix contingut en fucoses, manoses i N-acetilglucosamina (es trobaren només petites quantitats de galactosa), però no se n'ha dut a terme l'estudi a partir dels pèptids. De l'anàlisi de sucres i de la massa molecular que es desprenia de l'anàlisi en gels de poliacrilamida-SDS es podia concloure, que la ribonucleasa de tipus secretori d'orina no s'originava en el ronyó. De Prisco i col., (1984) varen estudiar la ribonucleasa seminal i trobaren com en el cas de la ribonucleasa d'orina que hi havia una Thr-128 en l'extrem C-terminal, però el valor observat pel contingut total en carbohidrats, així com la composició de monosacàrids, difereix sensiblement tant del valor i composició de la ribonucleasa d'orina com del valor i composició presentada en aquest treball per la HPRNAasa.

Tots els treballs que s'han comentat giren entorn de dues qüestions: quin és l'origen de les ribonucleases dels fluids biològics (sèrum, orina, fluid cerebrospinal, etc...) i, poden les ribonucleases ésser utilitzades com a marcadors per a la diagnòsi de les disfuncions d'alguns òrgans?. Acceptant que els diferents òrgans han seleccionat vies de maduració de les cadenes glicosídiques diferents i que per tant, la glicosilació és un procés òrgano-específic, la resposta a aquestes dues qüestions passa necessàriament per esbrinar quina és la composició i la seqüència de les ribonucleases dels diferents òrgans i poder establir una correspondència entre aquestes i les que es troben presents en els fluids biològics. Finalment, caldria veure si hi ha variacions respecte l'estat normal, dels nivells d'una espècie en algun dels fluids biològics, quan es produeix una disfunció orgànica o bé si s'ha produït una glicosilació aberrant fruit d'aquesta disfunció.

Si la resposta a la primera de les qüestions és difícil perquè les quantitats d'enzim que es poden recuperar en els processos de purificació són molt minses, així com també s'esdevé en l'estudi d'altres fluids que no siguin l'orina, la resposta a la segona de les qüestions, atès que depèn en gran mesura de la resposta a la primera, és encara més difícil, ja que tampoc es coneix amb certesa quina és la funció biològica exacta de les ribonucleases en l'espècie humana i cal considerar la possibilitat que en algunes disfuncions ens trobem davant de glicosilacions anormals que haurien de ser prèviament caracteritzades.

Durant aquest treball s'ha determinat en els estudis fets amb la HPRNAasa de tipus secretori, l'existència d'una Thr-128 en l'extrem C-terminal de la proteïna resultat que està d'acord amb el fet que per anàlisi de transferència Southern, Breukelmann i col., (1993) hagin descrit l'existència d'un únic gen per la ribonucleasa de tipus secretori. S'ha descrit també que aquest enzim es troba poliglicosilat en, com a mínim, dues de les dianes consens que posseeix trobant-se que la glicosilació podria ser de tipus híbrid per a la cadena unida a la Asn-34 i de tipus complex per a la cadena unida a la Asn-76. Si bé és cert que no s'ha pogut determinar quina era la glicosilació a través de la Asn-88, hom considera més plausible, fixant-se en els nivells de glicosilació total, en la mobilitat en gels de poliacrilamida-SDS, en les estructures proposades per la ribonucleasa de tipus secretori d'orina per Hitoi i col., (1987) i en el fet que la glicosilació i la maduració de les cadenes glucídiques és un procés lligat a la membrana cel·lular i no té lloc després de la secreció de la proteïna al medi extracel·lular, la hipòtesi que la HPRNAasa sigui la font majoritària de les ribonucleases de tipus secretori presents en sèrum i en orina.

El contingut relativament baix de HPRNAasa que hom podia obtenir de l'extracció d'un pàncreas i d'altra banda la cada vegada més aleatòria i espaiada possibilitat d'obtenció d'òrgans va forçar la recerca de vies alternatives per a aconseguir una font segura i més fiable de l'enzim en qüestió. Es va triar intentar dur a terme l'expressió de la proteïna recombinant per tal d'assegurar una producció que possibilités aportar dades sobre la relació i estructura funció en els quals està interessat el nostre grup.

seqüències de DNA que codifiquen per la HPRNAasa foren sotmeses a anàlisi pel programa "SILENT" del Genetics Computer Group (Universitat de Madison) amb la finalitat de trobar tots els possibles llocs de restricció. Cinc de les dianes que no es trobaren en YEpWL foren incorporades en la seqüència del gen. Aquestes cinc dianes permetrien dur a terme reaccions de mutagènesi en bloc ("cassete mutagenesis"). Finalment, tots els codons del gen excepte aquells necessaris per incorporar les cinc dianes, són els d'ús més freqüent en *Saccharomyces cerevisiae* d'acord amb Bennetzen i Hall (1982). Al final de la seqüència codificant per a la HPRNAasa es va afegir un codó de finalització de la traducció. La seqüència que es va dissenyar contenia, a més a més de la part codificant per la HPRNAasa i en el seu extrem 5', la seqüència codificant per l'extrem C-terminal del pèptid líder del factor α . El gen sintètic finalment dissenyat es pot observar en la figura III.B.1.2, en la qual es queden reflectides les particularitats descrites des del punt de vista del disseny, a les quals s'ha fet referència en aquest apartat.

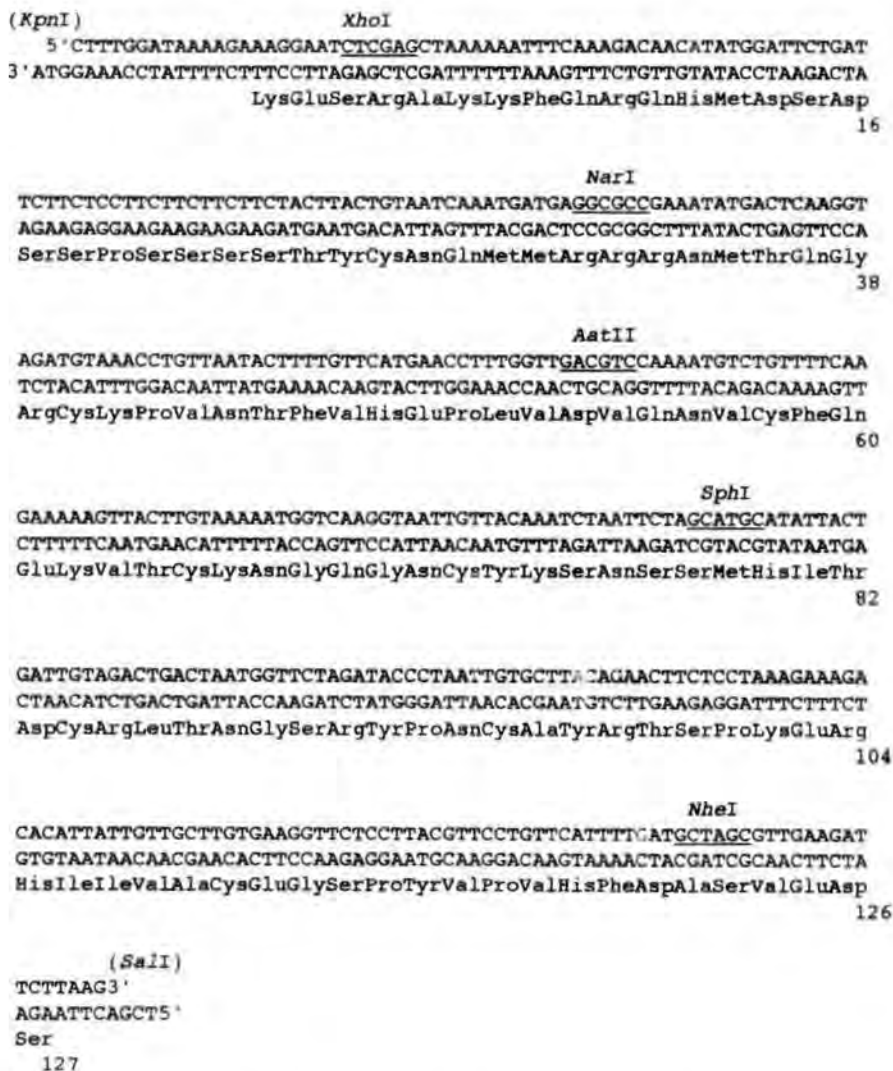


Figura III.B.1.2: Gen dissenyat per a la ribonucleasa de tipus secretori de pàncreas humà (HPRNAasa) i seqüència d'aminoàcids corresponents. S'indiquen els punts de digestió amb els diversos enzims de restricció únics.

II.B.2. Disseny, síntesi i purificació dels oligonucleòtids per a la construcció del gen de la HPRNAasa

A partir de la seqüència dissenyada prèviament per al gen sintètic de la HPRNAasa, calia definir quins serien els oligonucleòtids de cadena senzilla que s'emprarien per a la construcció del gen. Per a dividir el gen en els oligonucleòtids es va tenir en compte la fiabilitat per a sintetitzar oligonucleòtids d'una determinada longitud de què eren capaços els sintetitzadors en aquell moment disponibles. A més es va buscar que els oligonucleòtids que havien d'hibridar a l'hora de fer el gen complet havien de presentar el màxim de regió complementària i que en qualsevol cas, aquesta havia de tenir més de 6 o 7 bases. Una altra característica important a tenir en compte és que els oligonucleòtids que no han d'hibridar entre ells han de posseir la mínima complementarietat possible entre ells. A més qualsevol oligonucleòtid ha de presentar la mínima complementarietat possible amb ell mateix.

Els oligonucleòtids que finalment es dissenyaren i posteriorment foren sintetitzats es poden veure en la figura III.B.2.1.

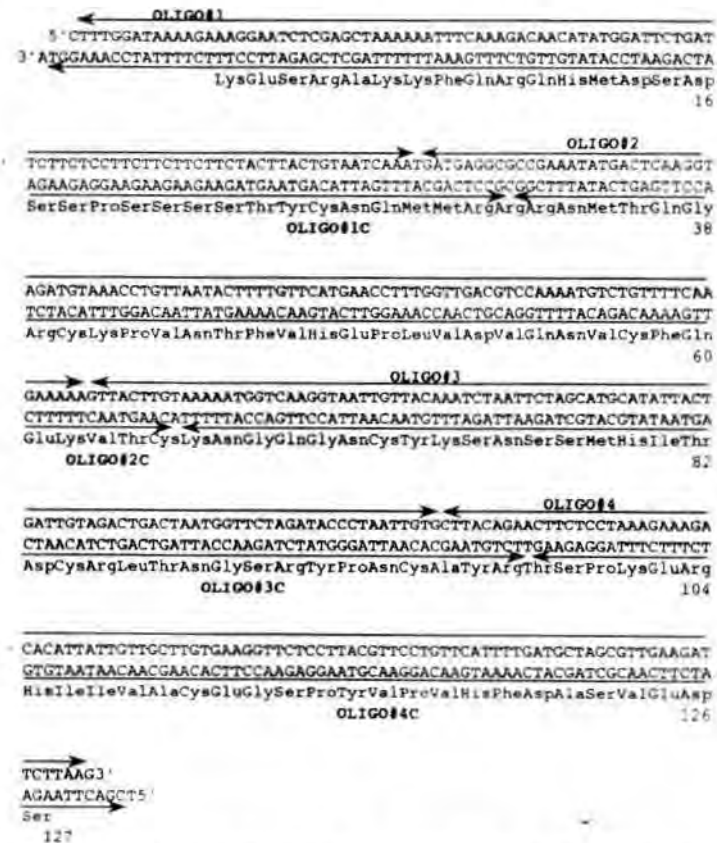


Figura III.B.2.1: Seqüència de nucleòtids del gen sintètic de la HPRNAasa amb la seqüència d'aminoàcids corresponent. Els oligonucleòtids dissenyats i sintetitzats, anomenats #1, #1c, #2, #2c, #3, #3c, #4 i #4c s'assenyalen en la figura amb fletxes horitzontals. Els oligonucleòtids es purificaren electroforèticament, s'aparellaren 2 a 2 i es lligaren els fragments FI, FII, FIII i FIV per a construir el gen sencer de la HPRNAasa.

El gen per la HPRNAasa s'ha construït a partir de 8 oligonucleòtids denominats #1, #1c, #2, #2c, #3, #3c, #4 i #4c la longitud dels quals variava entre 92 i 113 residus nucleotídics. Aquests oligonucleòtids se sintetitzaren mitjançant el mètode de la fosforamidita en fase sòlida (Atkinson i Smith, 1984) en un sintetizador Applied Biosystems 392.

Per tal d'evitar la formació d'aparellaments no desitjats entre diferents oligonucleòtids es va decidir que la construcció del gen es realitzaria en tres etapes:

- En una primera etapa els oligonucleòtids s'hibridarien per parelles #1/#1c, #2/#2c, #3/#3c, i #4/#4c per a donar lloc als fragments FI, FII, FIII i FIV.
- En una segona fase es duria a terme el lligament dels diferents fragments per a donar el gen sencer.
- La tercera etapa constituïria l'amplificació del producte format pels quatre fragments mitjançant l'ús de la PCR.

Un cop sintetitzats els oligonucleòtids, tot i que es pot intentar dur a terme la construcció del gen sense efectuar cap pas de purificació, és convenient aïllar el producte majoritari provinent de la síntesi perquè, els productes incomplets d'aquesta poden interferir en les reaccions d'aparellament i lligament posteriors.

III.B.3. Construcció del gen de la HPRNAasa per hibridació dels oligonucleòtids sintètics i lligament dels fragment FI, FII, FIII i FIV

Un cop sintetitzats i purificats els oligonucleòtids dissenyats, es fosforilaren tots en reaccions separades, a excepció dels oligonucleòtids #1 i #4c que constitueixen els extrems 5' del DNA dúplex per a evitar la formació de concatàmers en les reaccions de lligament. Un cop fosforilats s'hibridaren per parelles (#1/#1c, #2/#2c, #3/#3c, i #4/#4c) per a formar respectivament els fragments FI, FII, FIII i FIV.

La barreja dels diferents fragments fou sotmesa a una reacció de lligament com s'ha descrit en l'apartat II.C.2.c. El producte d'aquest lligament es va carregar en una electroforesi de 1,5% agarosa (figura III.B.3.1) i el fragment de 421 pb corresponent al DNA que codifica pel gen sintètic de la HPRNAasa unit a un fragment del pèptid líder del factor α es va purificar a partir del gel, per Gene-Clean (apartat II.C.1.e).

En la figura III.B.3.1 es pot observar com en la barreja de lligament es produeixen quatre tipus de bandes corresponents a la unió de 1, 2, 3 o 4 dels fragments i que la quantitat de cadascuna de les bandes decreix a mesura que el número de fragments que la componen es més gran.



Figura III.B.3.1: Anàlisi electroforètica en gel d'agarosa 1,5% en amortidor TAE d'aproximadament 5-10 pmols del lligament dels fragments FI, FII, FIII i FIV. **1 i 3:** Marcadors de massa molecular λ *Hind* III (23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 i 125 pb) + Φ x174 *Hae* III (1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234 i 194 pb) (Stratagene); **2:** Barreja de lligament de FI, FII, FIII i FIV.

La banda de massa molecular més elevada correspon al gen sencer. Si bé és cert que en aquesta banda hi podien ser presents subproductes de lligament no desitjats, aquests quedarien descartats durant l'amplificació del gen per la PCR. Una via alternativa que es podria anomenar més clàssica, s'hauria basat en el lligament seqüencial i purificació dels quatre fragments a partir de gels d'agarosa. De qualsevol de totes dues maneres el producte que s'obtenia era convenient obtenir-lo en grans quantitats per a la qual cosa es va procedir a la seva amplificació per PCR.

III.B.4. Amplificació del gen sintètic mitjançant l'ús de la PCR i el seu posterior clonatge en pTZ19U

Així doncs la banda corresponent per la seva massa molecular al gen sencer (421 pb) es va purificar del gel d'agarosa per Gene-Clean. L'amplificació de la seqüència mitjançant la PCR es va dur a terme segons les condicions descrites en l'apartat II.C.2.d. Els oligonucleòtids que es varen sintetitzar per a ésser utilitzats com a encebadors foren els següents:

Oligonucleòtid 1d (complementari a Oligo # 1c) : 5' cgact**gggtac**cttggataaaagaaa 3'
 Oligonucleòtid 4d (complementari a Oligo # 4) : 3' caacttctaagaatt**cagctc**gtcagc 5'

En negreta s'ha indicat la part de la seqüència dels oligonucleòtids que restituïa les dianes pels enzims de restricció *Kpn* I (oligonucleòtid #1d) i *Sal* I (oligonucleòtid #4d).

En un primer intent es varen assajar tres concentracions diferents (1,5, 2,0 i 2,5 mM) de sals i un blanc, en el qual el DNA motllo era substituït per aigua, per conèixer si hi havia reaccions inespecífiques per contaminació de la mostra. En la figura III.B.4.1 s'observa en els carrer 1, corresponent al blanc de la reacció, com no hi ha cap contaminació aparent. En els carrers 3, 4 i 5 es carregaren les mostres (10% de les reaccions de PCR) dels assajos amb diferents concentracions de $MgCl_2$. Es veu clarament que les concentracions 2,0 i 2,5 mM són les que produeixen una millor amplificació de la banda corresponent, segons la massa molecular, al gen sencer.

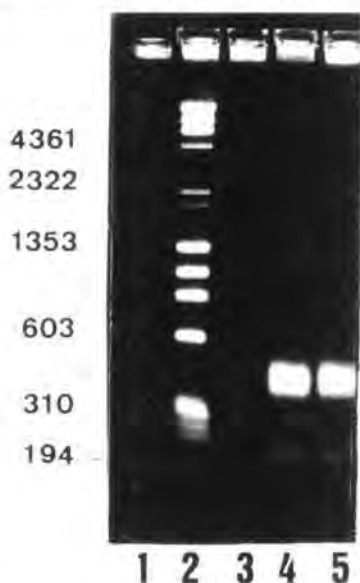


Figura III.B.4.1: Anàlisi electroforètica en gel d'agarosa 1,2% en amortidor TAE del 10% de les reaccions de PCR segons les condicions descrites en l'apartat II.C.2.d: 1. Blanc de la reacció; 2. Marcadors de massa molecular λ *Hind* III (23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 i 125 pb) + Φ x174 *Hae* III (1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234 i 194 pb) (Stratagene, EEUU); 3. Reacció de PCR amb 1,5 mM $MgCl_2$; 4. Reacció de PCR amb 2,0 mM $MgCl_2$; 5. Reacció de PCR amb 2,5 mM $MgCl_2$.

Un cop es disposà de quantitats relativament elevades de l'insert calia introduir-lo en un vector per a la seva manipulació i amplificació. Aquesta etapa requeria el lligament del gen en el vector escollit i la transformació d'una soca bacteriana escaient. Com a vector per a aquest primer clonatge s'escollí el vector pTZ19U (Genescribe-Z™ de U. S. B., Cleveland, EEUU) perquè és un plasmidi ben conegut, que presenta un elevat número de còpies i és poc susceptible a patir reordenacions i conté com a dianes de restricció úniques *Kpn* I i *Sal* I necessàries per al clonatge del gen sintètic. A més a més conté el gen *lac Z'* el qual permet la selecció de putatius recombinants positius de forma visual. Respecte a la soca hoste s'utilitzà la soca d'*E.coli* TG1, ja que possibilita el creixement a gran escala i la purificació dels plasmidis i a més és *lac I^q* i *lac Z ΔM15*, per tal de permetre la identificació visual dels recombinants.

Per tal de dur a terme el lligament del gen de la HPRNAasa directament amb el plasmidi pTZ19U, es realitzà en primer lloc un cultiu de nit d'*E. coli* TG1-[pTZ19U] en LB + Ap, a partir del qual es va extreure mitjançant el mètode de lisi alcalina el plasmidi pTZ19U. Un cop purificat es va digerir amb *Kpn* I i *Sal* I. El vector linealitzat es va purificar a partir de la banda corresponent d'un gel d'agarosa. El gen sintètic que havia estat obtingut per amplificació amb PCR es va haver de digerir també amb tots dos enzims de restricció ja que la reacció en cadena de la polimerasa reconstituïa les dianes de *Kpn* I i *Sal* I. La digestió, que es va dur a terme simultàniament a la del vector, permetia generar els extrems cohesius necessaris per al lligament del vector i del gen sintètic. Un cop digerits el vector i l'insert, quantitats equimoleculares d'ambdós components es varen reunir en una barreja de lligament, la qual s'utilitzà per a transformar cèl·lules competents d'*E. coli* TG1 que se sembraren en plaques que contenien LB-XGal-IPTG-Ap. S'obtingueren 5 possibles transformants que es podien distingir com a colònies blanques, ja que en aquests transformants s'interromp la α -complementació. Aquests putatius transformants es cultivaren en 3 ml de LB + Amp i a partir d'aquests cultius se'n realitzà una extracció del DNA plasmídic per lisi alcalina.

La dificultat d'aquest clonatge va raure principalment en la dificultat de treballar amb l'enzim de restricció *Kpn* I. Aquest enzim que presenta la seva màxima activitat en solucions de baixa concentració de sals va provocar en nombroses ocasions la digestió inespecífica tant del vector com de l'insert, impedit-ne el posterior lligament. Com s'ha pogut comprovar en aquest treball en digestions posteriors, un isoèsquizòmer de *Kpn* I, *Acc 65* I, és molt més fiable i per tant recomanable, que no pas *Kpn* I.

Amb la finalitat de comprovar la presència del gen de la HPRNAasa es va realitzar una primera anàlisi de restricció dels plasmidis pTZ19U.HPR amb els enzims *Eco* RI i *Pst* I. Aquests dos enzims tallen la construcció pTZ19U.HPR molt a la vora de les dianes *Kpn* I i *Sal* I però fora de l'insert de manera que la banda que es genera quan es duu a terme la digestió és molt similar, en quant a mobilitat, a la del gen sintètic de la HPRNAasa. Com que el clonatge s'havia dissenyat a través de dos extrems

cohesius i per tant de manera direccional, només era possible esperar una orientació. En la figura III.B.4.2, s'observa el resultat de l'electroforesi en gel de 1% agarosa amb amortidor TAE de les digestions dels diferents clons amb *Eco* RI i *Pst* I.

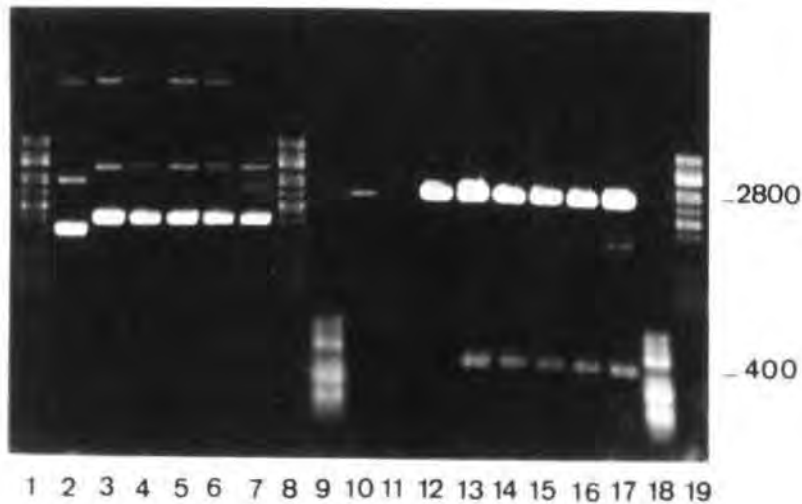


Figura III.B.4.2: Electroforesi en gel d'agarosa 1,0% en amortidor TAE de les anàlisis de restricció del DNA plasmídic obtingut a partir dels cultius de nit de colònies transformants resultants de transformar cèl·lules competents d'*E.coli* TG1 amb la barreja de lligament del gen sintètic de la HPRNAasa amb el vector pTZ19U. 1. Marcadors de massa molecular λ -*BstE* II (8454, 7242, 6369, 5686, 4822, 4324, 3675, 2323, 1929, 1371, 1264, 702, 224 i 117 pb); 2. pTZ19U; 3-7. pTZ19U-HPRNAasa 1, 2, 3, 4 i 5; 8. Marcadors de massa molecular λ -*BstE* II; 9. Marcadors de massa molecular pBR322-*Msp* I (622, 527, 404, 309, 242, 238, 217, 201, 190, 180, 160, 160, 147, 147, 123, 110, 90, 76, 67, 34, 34, 26, 26, 15, 9 i 9 pb); 10. pTZ19U-*Kpn* I-*Sal* I; 11. Gen HPR-*Kpn* I-*Sal* I; 12. pTZ19U-*Eco* RI-*Pst* I; 13-17. pTZ19U.HPR 1, 2, 3, 4 i 5 digerits amb *Eco* RI i *Pst* I; 18. Marcadors de massa molecular pBR322-*Msp* I; 19. Marcadors de massa molecular λ -*BstE* II.

En els clons pTZ19U.HPR 1, 2, 3 i 4 es veu com després de la digestió (carrers 13-16) apareixen només les bandes corresponents al vector linealitzat (carrer 10) i a l'insert que es va clonar (carrer 11). La presència del gen també es va comprovar per digestió del DNA amb l'enzim *Xho* I. Aquest enzim presenta en la construcció pTZ19U.HPR un únic lloc de tall en l'interior de la seqüència que codifica per a la HPRNAasa i no té diana en el vector pTZ19U. Dels diferents clons que es varen analitzar només els clons pTZ19U.HPR 1, 2, 3 i 4 es varen linealitzar quan es digeriren amb *Xho* I. Les dues anàlisis efectuades indicaren la presència d'un insert amb una massa molecular corresponent a la del gen sencer i que aquesta contenia una diana pròpia d'aquest insert.

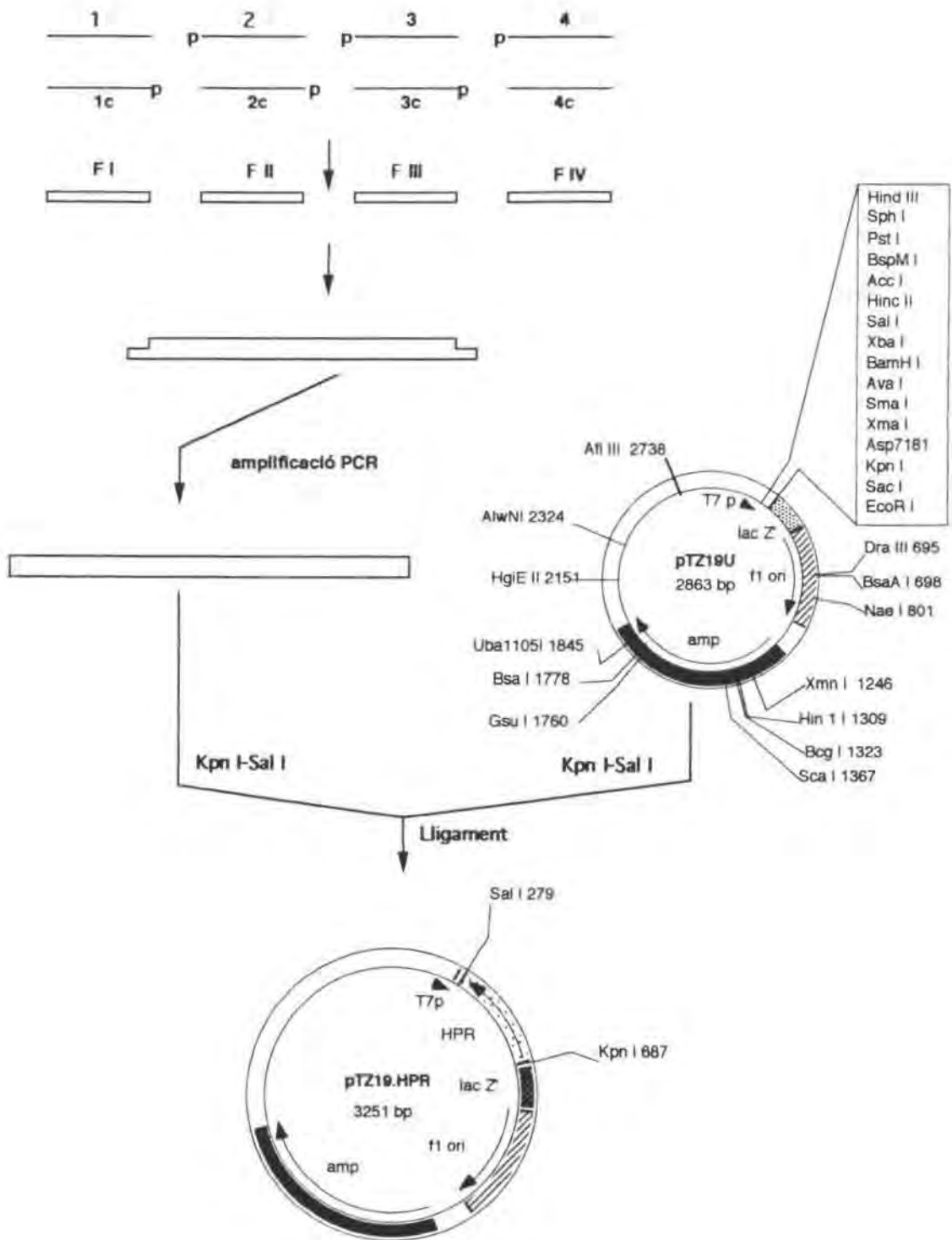


Figura III.B.4.3: Construcció del gen de la HPRNAasa i clonatge en el vector pTZ19U. HPR: gen de la HPRNAasa; T7p: promotor de la RNA polimerasa de T7; lac Z'gen pel fragment a de la β -galactosidasa; FA ori: origen de replicació del fagèmid; amp: ampicil.lina.

III.B.5. Seqüenciació i reparació del gen HPR

Després de clonar el gen HPR en pTZ19 U calia comprovar si realment la seqüència era la que s'havia dissenyat. Així es va dur a terme la seqüenciació del ds DNA de dos dels clons dels quals s'havia confirmat per restricció, la presència de l'insert. El DNA plasmídic dels dos clons es va purificar amb el sistema Magic Mini-Prep™ DNA Purification System de Promega (Madison, EEUU). La seqüenciació es va realitzar seguint el protocol pel T7 Sequencing Kit (Pharmacia, Suècia) amb lleugeres modificacions. L'aparellament dels "primers" (2µl) de "universal" o de "reverse" es varen afegir a 8 µl de la solució de DNA plasmídic i es va escalfar a 70°C durant 10 min. Es va deixar refredar el bany fins que la temperatura va assolir aproximadament els 30°C, i després es va deixar 10 min a temperatura ambient. Després d'aquest aparellament lent es varen dur a terme les reaccions de marcatge i extensió amb [α -³⁵S]dCTP.

El dsDNA dels vectors pTZ19UHPR.1 i pTZ19UHPR.2 es va seqüenciar en totes dues direccions i es va posar de manifest que la seqüència del gen HPR insertat en aquests vectors era exactament la del gen dissenyat llevat que presentava tres canvis: els parells de bases 57 (T-A), 111 (C-G) i 249 (A-T), prenent com a posició +1 el primer pb del triplet que codifica per a la Lys1, havien estat canviats per (A-T), (T-A) i (G-C), respectivament. Aquests canvis podien procedir directament d'errors en la síntesi o bé haver aparegut durant el procés d'amplificació del gen mitjançant la PCR.

Va caldre doncs, reparar aquests errors. Amb aquesta finalitat el gen HPR es va clonar en primer lloc en el vector M13mp19 (veure figura III.B.5.1). Això permetia obtenir el DNA en forma de cadena senzilla i dur a terme les reaccions de mutagènesi dirigida per oligonucleòtids.

La seqüència de passos efectuats en la correcció del gen s'exposa breument a continuació:

Purificació del gen HPR: a partir d'un cultiu de nit d'*E.coli* TG1-[pTZ19U.HPR] es va realitzar una extracció de DNA plasmídic sobre el qual es va dur a terme una digestió amb *Kpn* I i *Sal* I. El vector així digerit va permetre purificar a partir d'electroforesi en gel d'agarosa, el fragment de 421 pb corresponent al gen HPR.

Obtenció de M13mp19: a partir d'un cultiu de M13mp19 que s'obtingué inoculant LB fresc amb un cultiu de nit de *E.coli* TG1 i una alíquota de solució de virions de M13mp19, i al cap de 5 hores, es va realitzar una extracció de RF DNA (apartat II.C.3.c.(1). El RFDNA es va sotmetre a digestió amb *Kpn* I i *Sal* I i el vector linealitzat es va purificar a partir d'electroforesi en gel d'agarosa.

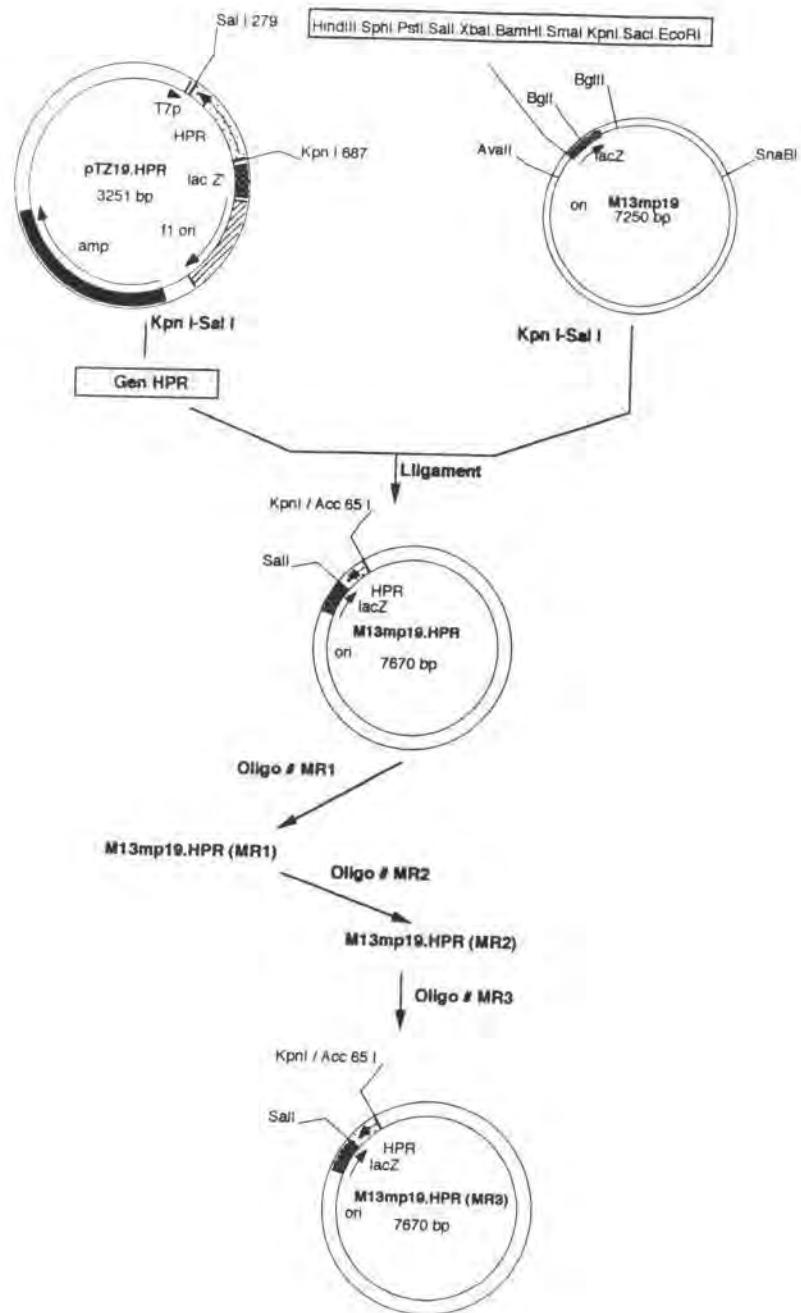


Figura III.B.5.1: Clonatge del gen sintètic de la HPRNAasa en M13 mp19 i reparació del gen. El vector pTZ19U-HPR es va digerir amb *Kpn I* i *Sal I*, i el fragment resultant d'uns 420 pb, corresponent al gen HPR, es va lligar amb el vector M13mp19 que prèviament havia estat sotmès a digestió amb els mateixos enzims. Per a reparar les tres mutacions se sintetitzaren 3 oligonucleòtids amb els quals es realitzaren tres reaccions consecutives de mutagènesi dirigida sobre el gen obtenint-se així finalment, una construcció amb el gen HPR correcte i amb una seqüència idèntica a la del gen que s'havia dissenyat.

Lligament i transformació: es va realitzar un lligament del M13mp19-*Kpn* I-*Sal* I i la mescla de lligament es va utilitzar per a transformar cèl.lules competents *E.coli* TG1. Es varen obtenir diverses colònies blanques, corresponents a clons de fag que presuntament eren portadors del gen HPR inserat.

Selecció de transformants: de 6 dels clons es varen créixer cultius per tal d'obtenir-ne el ssDNA i el RFDNA. Aquest darrer es va sotmetre a digestió amb els enzims de restricció esmentats en l'apartat III.B.4 per tal de confirmar la presència de l'insert en els diferents clons. Els 6 clons assajats varen resultar positius, amb el gen HPR orientat en la direcció contrària al gen *lacZ* de M13mp19. S'anomenaren M13mp19.HPR1, 2, 3, 4, 5 i 6.

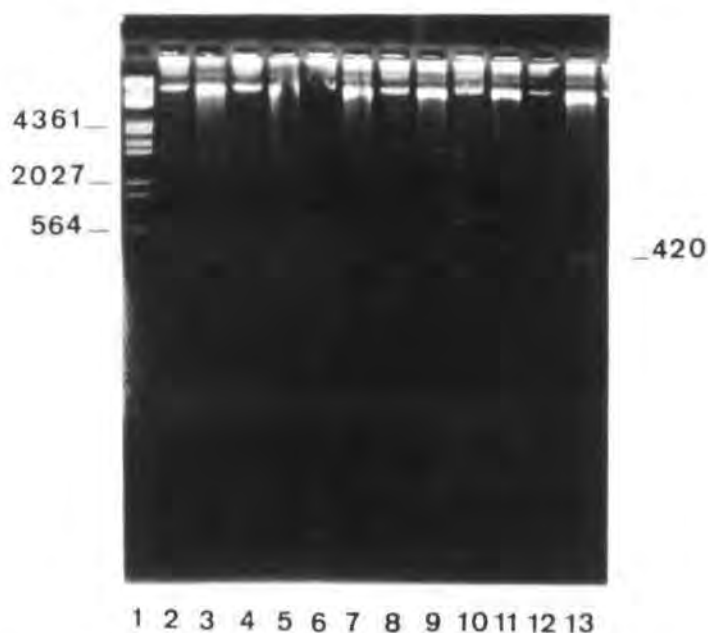


Figura III.B.5.2: Electroforesi en gel d'agarosa 1,0% en amortidor TAE de les anàlisis de restricció del RFDNA obtingut a partir dels cultius de colònies transformants resultants de transformar cèl.lules competents d'*E.coli* TG1 amb la barreja de lligament del gen sintètic de la HPRNAasa amb el vector M13mp19. 1. Marcadors de massa molecular λ -*Hind* III (23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 i 125pb) de Boehringer Mannheim (Alemanya); Carrers 2, 4, 6, 8, 10 i 12. RFDNA dels clons M13mp19-HPR 1, 2, 3, 4, 5 i 6; Carrers 3, 5, 7, 9, 11 i 13. RFDNA dels clons M13mp19.HPR 1, 2, 3, 4, 5 i 6 digerits amb *Kpn* I i *Sal* I.

Reacció de mutagènesi: per tal de corregir les mutacions que havia incorporat el gen HPR es varen dissenyar tres oligonucleòtids que permetien la correcció dels errors observats. La base que es pretenia canviar es va substituir per la base subratllada en cada oligonucleòtid:

oligo #MR1: 5'-aca tat gga ttc tga ttc ttc-3'

oligo #MR2: 5'-taa ttc tag cat gca tat tac-3'

oligo #MR3: 5'-gat gag gcg ccg aaa tat gac-3'

Els oligonucleòtids sintetitzats es varen utilitzar directament, sense cap pas previ de purificació, per a realitzar les reaccions de mutagènesi dirigida sobre el vector M13mp19.HPR.1 d'acord amb els protocols descrits en l'apartat II.C.3.f. Després de cada reacció de mutagènesi que es va realitzar, es varen analitzar 5-6 clons per seqüenciació mitjançant la tècnica "single-track" dels ssDNA que s'havia extret dels cultius provinents de colònies resultants de transformar cèl.lules competents amb la resultant de les reaccions de mutagènesi. El rendiment de les reaccions de mutagènesi segons l'anàlisi per seqüenciació, va oscil.lar entre un 80 i un 100% d'eficiència a l'hora d'incorporar la mutació desitjada. Després de la tercera reacció de mutagènesi un dels clons que es va obtenir, anomenat M13mp19.HPR(MR3), es va seqüenciar completament i es va comprovar que la seqüència del gen HPR inserat coincidia amb la seqüència prèviament dissenyada (Figura III.B.1.2).

III.C. OBTENCIÓ DE LA HPRNAasa RECOMBINANT PRODUÏDA EN LLEVAT (reHPR.Y)

Un cop es va obtenir el gen HPR plenament correcte es podia intentar dur a terme la seva expressió heteròloga amb la finalitat d'obtenir la ribonucleasa de pàncreas humà recombinant (reHPR). Com a organisme per a l'expressió es va escollir inicialment el llevat *Saccharomyces cerevisiae*. El llevat *S.cerevisiae* s'ha demostrat que pot ésser un organisme experimental útil per a l'expressió i l'estudi d'una àmplia varietat de productes de gens eucariotes tant per a la recerca bàsica com per a les aplicacions industrials i farmacèutiques. Pel fet de ser microorganismes unicel.lulars, moltes de les manipulacions que habitualment es fan anar en procariotes poden ser ràpidament aplicades als llevats. Aquests a més, presenten un ritme de creixement relativament ràpid i es poden fer créixer fins a densitats elevades, ésser propagats en medis senzills i definits i poden transformar-se amb vectors plasmídics amb autonomia de replicació o amb capacitat d'integrar-se. A diferència dels sistemes d'expressió procariotes, els llevats pel fet de ser organismes eucariotes, posseeixen bona part de la complexitat de les cèl.lules d'organismes típicament multicel.lulars, incloent un elevat grau de compartimentació de l'organització intracel.lular i una via de secreció força elaborada que participa en el plegament, la secreció i la modificació secundària de moltes de les proteïnes hoste.

Els dos obstacles més grans amb què hom s'havia trobat en treballs de producció de ribonucleases de forma heteròloga eren d'una banda la mateixa expressió, atès que el seu plegament requereix de la formació correcta de quatre enllaços disulfur i la ribonucleasa desnaturalitzada és altament susceptible a l'atac de proteases i de l'altra, l'activitat del propi enzim que pot ésser citotòxica (Newton i col., 1992). Calia doncs, que el vector que s'emprés per a l'expressió proporcionés un sistema per a direccionar la proteïna a l'exterior. El vector d'expressió que s'utilitzà i en funció del qual es dissenyà el gen per a facilitar-ne el clonatge fou el vector YEpWL.

El plasmidi YEpWL és un vector llançadera dissenyat per facilitar les manipulacions requerides en enginyeria genètica i que fou construït en el laboratori del Dr. R. T. Raines a Madison (del Cardayré, i col., 1994). El plasmidi, que pertany a la família dels vectors episomals de llevat (Yeast Episomal Plasmids), és portador de regions suficients per a la replicació (ori) i empaquetament com un fagèmid de cadena senzilla (f1) en *E.coli*, i per la replicació en soques [cir⁺] de *S.cerevisiae* (2 μ). Cèl.lules competents d'*E.coli* transformades amb YEpWL poden ésser seleccionades per resistència a ampililina (Amp^r). Quan es transforma *S.cerevisiae* amb el vector episomal de llevat pWL, es pot seleccionar per la recuperació de la prototrofia per triptòfan (TRP1) i/o leucina (LEU2-d). La presència d'aquests dos gens de *S.cerevisiae* facilita la transformació perquè una única còpia del gen TRP1 és suficient per conferir la prototrofia per triptòfan, mentre un número de còpies elevat, atès que el gen LEU2-d es troba escapçat en 5', es fa necessari per conferir la prototrofia per leucina (Erhart i col., 1983, Futcher i Cox 1984). La inserció d'un gen, en el marc de lectura, entre les dianes de restricció *Kpn*I i *Sal*I de YEpWL dona com a resultat la producció d'una proteïna fusionada al pèptid líder de 85 residus, factor- α , el qual possibilita que la proteïna madura sigui secretada al medi (Fuller i col., 1989). La producció de proteïnes de fusió de YEpWL es troba sota el control transcripcional del promotor híbrid ADH2-GAPDH (Cousens i col., 1987), el qual és desreprimat per la reducció de fonts de carboni fermentables en el medi, i pel finalitzador GAPDH (De Baetselier i col., 1991).

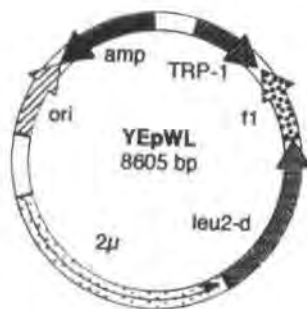


Figura III.C.: Representació esquemàtica del vector YEpWL. TRP-1: gen per la recuperació de prototrofia de triptòfan; Leu2-d: gen per la recuperació de prototrofia per leucina; amp: gen de resistència a ampililina; ori: origen de replicació.

El vector que s'ha utilitzat per a l'expressió de la HPRNAasa en llevat havia estat construït amb la finalitat d'expressar la ribonucleasa de pàncreas boví. Gràcies al Dr. Ronald T. Raines i al Dr. Steve B. del Cardayré i a les facilitats que ens varen proporcionar, fou possible no només intentar l'expressió de la ribonucleasa humana en llevat sinó disposar del vector portador del cDNA de la RNAasa bovina que ha estat utilitzat com a control positiu en les diferents etapes de manipulació del gen sintètic i la seva expressió en llevat.

III.C.1. Construcció del vector YEpHPR.1

El primer pas per a dur a terme l'expressió del gen HPR en llevat, consistia en clonar la seqüència que s'havia dissenyat i confirmat després d'ésser corregida mitjançant mutagènesi dirigida en el vector YEpWL.RNAasa A que contenia el cDNA codificant per la ribonucleasa de pàncreas boví.

III.C.1.a. OBTENCIÓ DEL VECTOR YEpHPR.1

Per a l'obtenció del vector YEpHPR.1 que portés com a insert fusionat al peptid líder del factor α , el gen sintètic HPR construït en aquest treball, es va seguir l'esquema que es descriu, breument, a continuació (figura III.C.1.a.1).

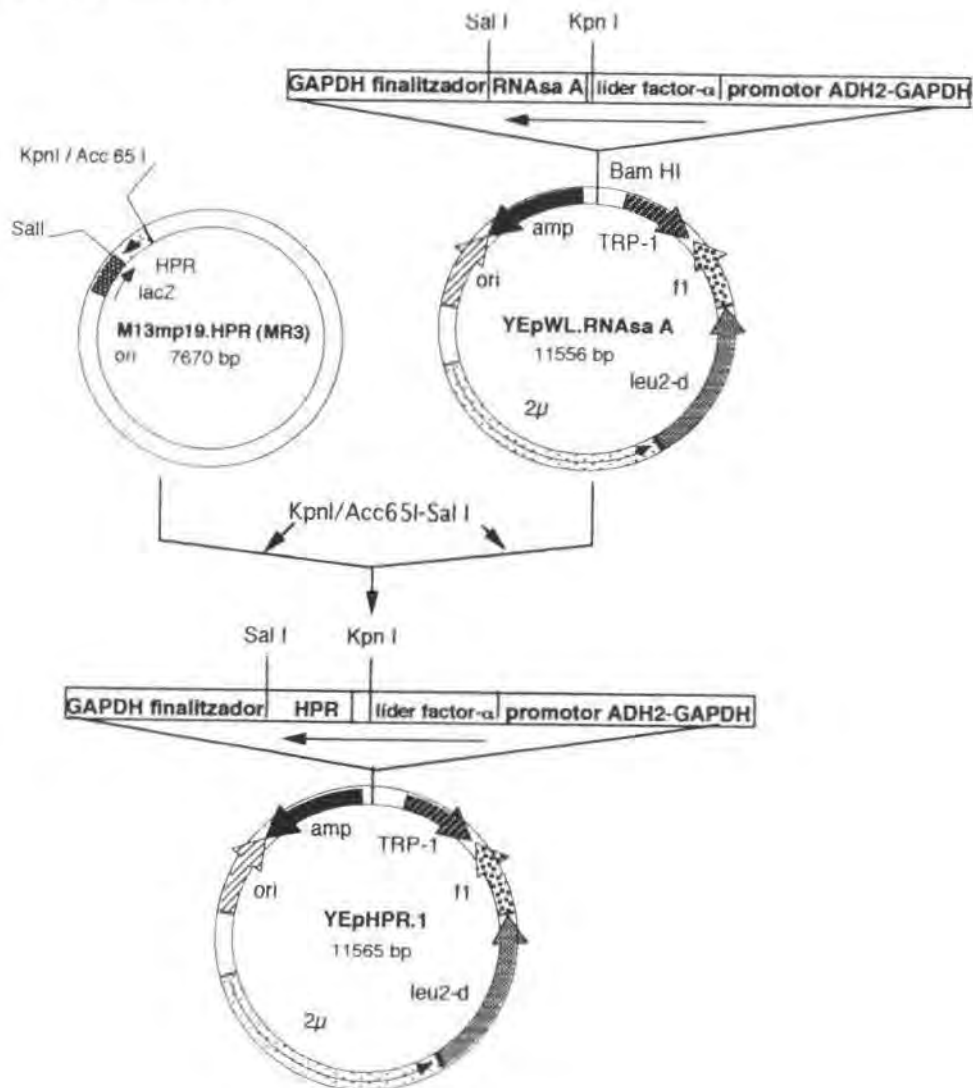


Figura III.C.1.a.1: Esquema de la construcció del vector YEpHPR.1. El gen HPR del vector M13mp19.HPR(MR3) es va digerir amb *Acc 65 I* i *Sal I* i es va subclonar en el vector YEpWL.RNAasa del qual s'havia extret, per digestió amb els mateixos enzims la seqüència codificant per a la ribonucleasa de pàncreas boví.

Obtenció del gen de la HPRNAasa: es va realitzar un cultiu de 20 ml d'*E.coli* TG1-[M13mp19.HPR(MR3)] del qual es va fer una extracció del RFDNA pel sistema de lisi alcalina. Part d'aquest DNA es va digerir amb *Acc 65 I* i *Sal I* i el fragment de 421pb corresponent al gen de la HPRNAasa, es va purificar per electroforesi en gel d'agarosa.

Obtenció del vector YEpWL-*Acc 65 I* i *Sal I*: a partir d'un cultiu de 250 ml d'*E.coli* TG1-[YEpWL.RNAasa A] es va dur a terme una extracció preparativa (apartat II.C.1.a.(2)) del plasmidi YEpWL.RNAasa A del qual se n'obtingueren uns 0,4 mg. La finalitat d'aquest DNA a més a més de constituir la font de YEpWL-*Acc 65 I* i *Sal I*, era proporcionar prou vector YEpWL.RNAasa A per a ésser utilitzat en controls de digestions, transformacions, etc....

Lligament: es va realitzar el lligament direccional entre YEpWL-*Acc 65 I*-*Sal I* i el gen obtingut a partir de la digestió del RFDNA de M13mp19.HPR(MR3) amb *Acc 65 I* i *Sal I*. La barreja de lligament s'utilitzà per a transformar cèl.lules *E.coli* TG1 competents que se sembraren en plaques de LB + Amp. De les colònies resistents a Amp que s'obtingueren, se'n cultivaren diverses en medi líquid per a obtenir-ne el DNA plasmídic. Aquest es va sotmetre a digestió i el resultat, que es presenta en la figura III.C.1.a.2, fou que el 80% dels clons que es varen analitzar presentaven l'insert corresponent en longitud al gen de la HPRNAasa.

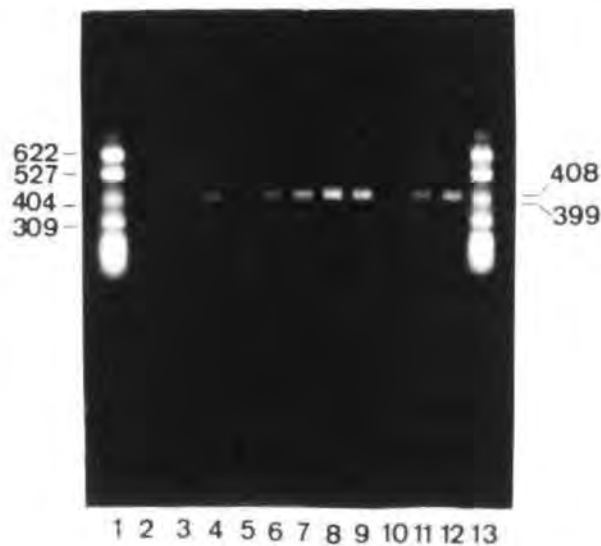
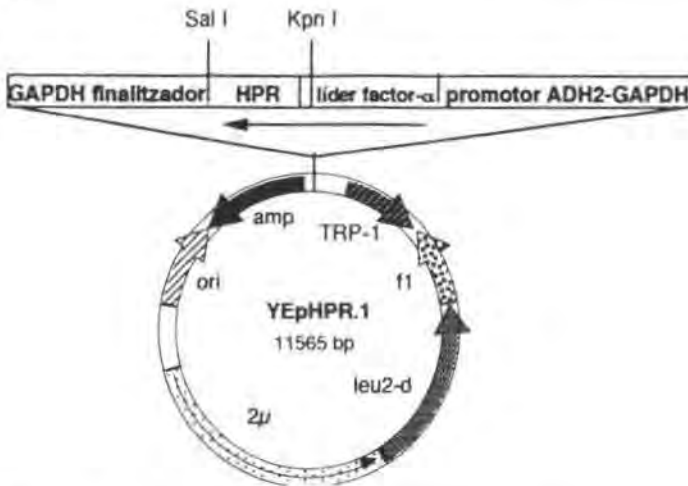


Figura III.C.1.a.2: Electroforesi en gel d'agarosa al 0,8% en amortidor TAE. Detall del gel en el qual s'observa, només, la zona corresponent a la banda de massa molecular que hom esperaria pel gen HPR i pel cDNA de la BPRNAasa. **1 i 13.** Marcadors de massa molecular pBR322-*Msp I* (622, 527, 404, 309, 242, 238, 217, 201, 190, 180, 160, 160, 147, 147, 123, 110, 90, 76, 67, 34, 34, 26, 26, 15, 9 i 9 pb); **2.** YEpWL.RNAasa A-*Acc 65 I*-*Sal I*; **3-12.** Diferents clons YEpHPR.1 digerits amb *Acc 65 I*-*Sal I*; La diferència entre la massa molecular del cDNA de la BPRNAasa (carrer 2) i la del gen sintètic HPR (carrers 4,6,7,8,9,10,11 i 12) permet distingir ambdues construccions en una electroforesi.

a)



b)

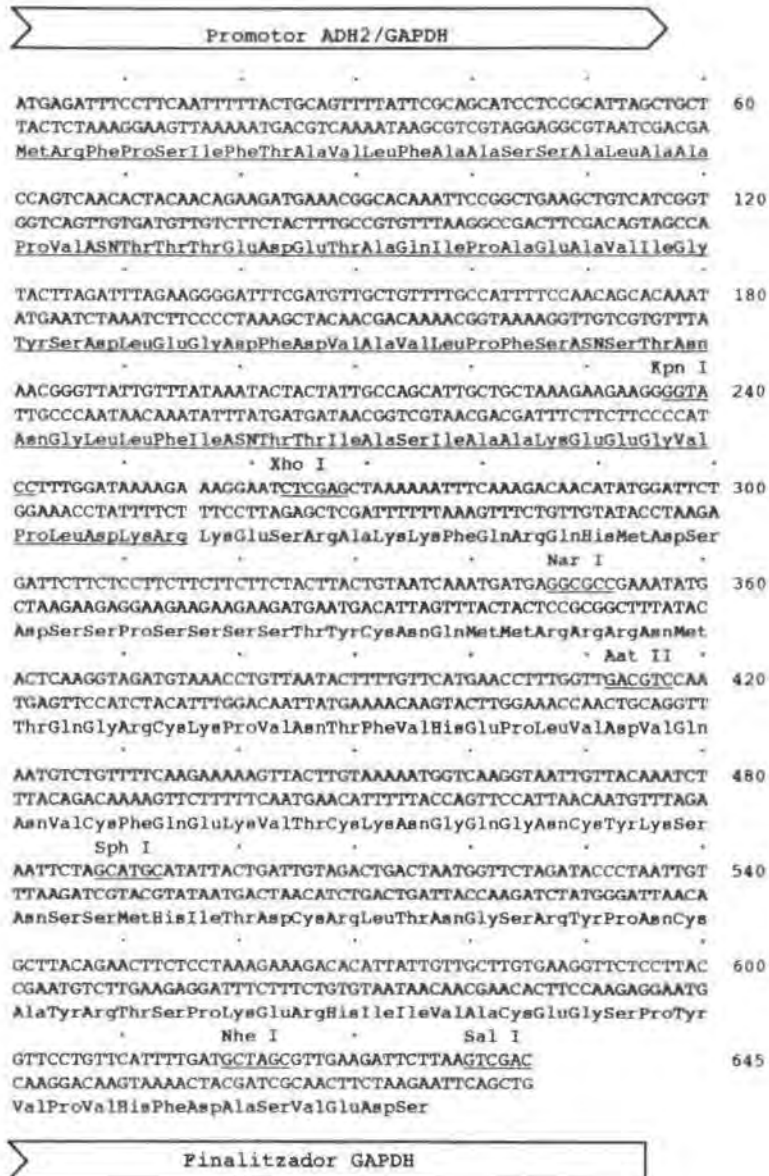


Figura III.C.1.a.3: YEpHPR.1. (a) Mapa del vector YEpHPR.1 en el qual s'indiquen les diferents regions característiques d'aquest vector. (b) Seqüència nucleotídica i de la proteïna de fusió pèptid líder del factor α -HPRNAasa.

III.C.1.b. COMPROVACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE reHPR.Y EN CÈL.LULES DE LA SOCA *S.cerevisiae* BJ2168 TRANSFORMADES AMB YEPhPR.1

Un cop feta la construcció del vector YEPhPR.1 calia intentar l'expressió de la reHPR.Y, per tal de veure si era convenient seguir treballant amb aquest vector. El vector YEPhPR.1, com es veu en la figura III.C.1.a.3, posseeix, si no s'havia produït cap recombinació o reordenació durant la darrera etapa de clonatge, el gen HPR inserat en fase després del pèptid senyal del factor α . Aquest sistema havia estat concebut per a expressar una proteïna de fusió formada pel pèptid senyal i la HPRNAasa que podia ésser processada pel propi llevat, alliberant-se la proteïna recombinant madura al medi extracel.lular.

Per a una primera anàlisi de l'expressió de la reHPR.Y a partir de YEPhPR.1 es varen seguir les etapes que s'exposen breument a continuació.

Obtenció i transformació de cèl.lules competents *S.cerevisiae* BJ2168 (apartat II.C.1.g): cèl.lules de la soca de llevat *S.cerevisiae* BJ2168 fetes competents pel mètode d'acetat de liti-DMSO foren transformades amb 1-5 μ g dels vectors plasmídics YEPhWL, YEPhWL.RNAasa A i YEPhPR.1, extrets del cultius d'*E.coli* TG1 portadores dels diferents vectors.

Selecció dels transformants: un cop aparegueren els transformants en les plaques de S4%D-trp, alguns dels clons es tornaren a sembrar per esgotament en plaques de S4%D-leu, les quals s'incubaren durant 48 hores en una estufa a 30°C fins l'aparició de transformants. D'entre els transformants que també eren capaços de créixer en medis sense leucina es prengueren alguns clons i s'inocularen 5 ml de medi S4%D-trp líquid amb cada un. Després de 48 hores en agitació (250 r.p.m.) a 30°C, 50 μ l d'aquells cultius que presentaven creixement, s'inocularen en 5 ml de medi S4%D-leu líquid i es deixaren en agitació (250 r.p.m.) a 30°C durant 48 hores més. Detecció de l'expressió de HPRNAasa en cultiu en placa (apartat II.E.2.c.(2)): 1-2 μ l d'un cultiu de BJ2168 portador de YEPhPR.1 crescut la nit abans en S4%D-leu es diposità sobre la placa de YEPD2%D-2% agar (p/v)-2 mg/ml de RNA. Les plaques s'incubaren durant 72 hores a 30°C. El resultat de l'anàlisi en plaques d'activitat de l'expressió de RNAasa (figura III.C.1.b.1) demostra que cultius de *S.cerevisiae* BJ2168 produïen HPRNAasa activa, la qual es trobava probablement, plegada de forma correcta i que podia ésser detectada a partir del medi de cultiu. Tanmateix s'observa que hi ha diferències entre la mida de les zones de digestió produïdes per colònies BJ2168-[YEPhWL.RNAasa A] i la mida de les zones de digestió produïdes per colònies BJ2168-[YEPhPR.1], denotant uns nivells d'expressió aparents més elevats en el cas de la ribonucleasa de pàncreas boví (RNAasa A o BPR). Es comprovà també que en el control negatiu emprat, *S.cerevisiae* BJ2168-[YEPhWL], no es detectava activitat RNAasa.

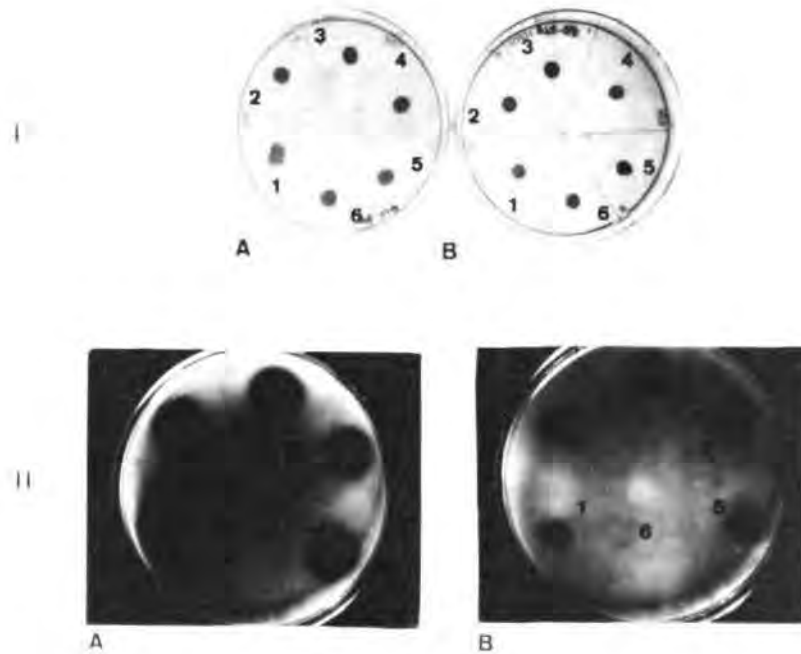


Figura III.C.1.b.1: Assaig d'activitat en placa per a la detecció de l'expressió d'activitat ribonucleasa. Després de la transformació i de la selecció de transformants per recuperació de prototrofies per *trp* i *leu*, 1 μ l dels cultius de BJ2168 portador de YE_pWL, YE_pWL.RNAasa A i YE_pHPR.1 crescuts la nit abans en S4%D-leu es diposità sobre la placa de YE_pD2%D-2% agar (p/v)-2 mg/ml de RNA. Les plaques s'incubaren durant 72 hores a 30°C. Les colònies es rentaren amb aigua destil·lada i el RNA no digerit es precipità amb una solució diluïda d'àcid perclòric. Les colònies que estan expressant una proteïna amb activitat RNAasa donen lloc a zones clares produïdes per la digestió, enmig de la terbolesa provocada pel RNA precipitat. (I) Plaques d'activitat per a la detecció de l'activitat abans de rentar les colònies amb aigua destil·lada. Placa A : 1, 2, 3, 4 i 5: *S.cerevisiae* BJ2168-[YE_pWL.RNAasa A]; 6: *S.cerevisiae* BJ2168-[YE_pWL]. Placa B : 1, 2, 3, 4 i 5: *S.cerevisiae* BJ2168-[YE_pHPR.1]; 6: *S.cerevisiae* BJ2168-[YE_pWL]. (II) Plaques després de precipitar el RNA no digerit amb àcid perclòric. Placa A : 1, 2, 3, 4 i 5: *S.cerevisiae* BJ2168-[YE_pWL.RNAasa A]; 6: *S.cerevisiae* BJ2168-[YE_pWL]. Placa B : 1, 2, 3, 4 i 5: *S.cerevisiae* BJ2168-[YE_pHPR.1]; 6: *S.cerevisiae* BJ2168-[YE_pWL].

La presència d'activitat RNAasa també es va analitzar assajant les fraccions cel·lulars corresponents al sobrenedant i a la fracció soluble cel·lular (apartat II.D.3). Amb aquesta finalitat, 50 ml de S4%D-leu, es varen inocular amb 0,5 ml de cultiu S4%D-leu líquid de 24 hores de cadascuna de les construccions (*S.cerevisiae* BJ2168-[YE_pWL], *S.cerevisiae* BJ2168-[YE_pWL.RNAasa A] i *S.cerevisiae* BJ2168-[YE_pHPR.1]), i es varen incubar durant 96 hores a 30°C.

La determinació espectrofotomètrica de l'activitat RNAasa emprant poli(C) com a substrat (apartat II.E.2.c.(1)), només va permetre detectar activitat en el sobrenedant dels clons portadors de la reBPR.Y i de la reHPR.Y. D'aquests assajos (Taula III.C.1.b.1) es desprèn, assumint que tots dos enzims posseeixen la mateixa activitat específica, que els nivells d'expressió de reHPR.Y

constitueixen al voltant d'un 10% dels nivells que es detecten de reBPR.Y. L'elevada quantitat de proteïna present en la fracció soluble cel·lular no va permetre la detecció de cap mena d'activitat ja que provocava interferències en l'assaig cinètic i mostres molt diluïdes no varen donar senyals d'activitat. Finalment cal fer esment que no es varen observar diferències significatives en el creixement de la soca transformada amb una o altra construcció com es desprèn de les mesures de densitat òptica dels cultius al cap de 96 hores.

Construcció	Abs ₆₀₀ final	Activitat RNAasa A ^a		Concentració Proteïna Total ^b
		ΔAbs ₂₆₀	Unitats/ml	mg/ml
YEpWL	5,9	0,0000	0,000	0,25
YEpWL.RNAasa A	5,6	0,0809	404,5	0,18
YEpHPR.1	5,3	0,0063	31,50	0,20

Taula III.C.1.b.1: Determinació d'activitat ribonucleasa emprant poli(C) com a substrat (apartat II.E.2.c.(1)) del sobrenedant de cultius de *S.cerevisiae* BJ2168 portadors de YEpWL (control negatiu d'expressió), YEpWL.RNAasa A (control positiu d'expressió) i YEpHPR.1. **a:** Determinació de l'activitat RNAasa pel mètode espectrofotomètric emprant poli(C) com a substrat. L'increment d'absorbància a 260 nm és una mesura de la concentració de nucleòtids obtinguts per la digestió del poli(C). **b:** Determinació de la concentració de proteïna utilitzant el mètode de Bradford (1976).

També es varen analitzar les mostres en gels d'activitat (apartat II.E.2.c.(3)). En aquest tipus d'assaig es va detectar la presència d'activitat RNAasa en els clons *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpWL.RNAasa A] que expressaven el control positiu reBPR.Y i en els clons *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpHPR.1] que expressaven la HPRNAasa recombinant (reHPR.Y). Es va apreciar com ja s'havia vist en les determinacions espectrofotomètriques i de cultiu en placa, que existien uns nivells d'expressió aparents més elevats en el cas de la ribonucleasa bovina que de la ribonucleasa humana. L'anàlisi en gels d'activitat posava de manifest també l'existència d'heterogeneïtat de masses moleculars en tots dos casos i alhora, que els patrons de bandes actives entre la reBPR.Y i la reHPR.Y era diferent. Com es pot veure en la figura III.C.1.b.2, les bandes d'activitat que s'observen en els carrers 2, 3, i 4, corresponents a sobrenedants de cultius de diferents clons de *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpHPR.1] tenen una mobilitat diferent a les bandes d'activitat que es veuen en el carrer 5, en el qual es va sotmetre a electroforesi sobrenedant de cultiu d'un clon de *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpWL.RNAasa A]. No es va detectar activitat en el cas dels clons *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpWL], que constituïen el control negatiu i no eren portadors de cap insert. Les mostres assajades havien estat igualades per concentració de proteïna total, la qual es va determinar segons el mètode de Bradford (1976).

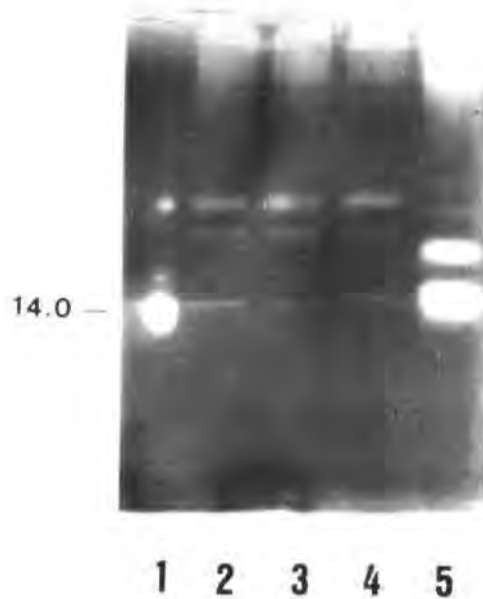


Figura III.C.1.b.2: Electroforesi en gel de 15% poliacrilamida-SDS amb poli(C) revelada per activitat, dels sobrenedants de cultius de *S.cerevisiae* BJ2168-[YE_pHPR.1] i *S.cerevisiae* BJ2168-[YE_pWL.RNAasa A]; **1**, RNAasa A comercial; **2, 3 i 4**, Sobrenedant del cultiu de diferents clons de *S.cerevisiae* BJ2168-[YE_pHPR.1], precipitat amb 60% acetona; **5**, Sobrenedant del cultiu de *S.cerevisiae* BJ2168-[YE_pWL.RNAasa A], precipitat amb 60% acetona. Les mostres es varen igualar respecte la concentració de proteïna total abans de carregar-se en el gel.

L'heterogeneïtat de masses moleculars observada per a la reBPR.Y ha estat demostrat, que és deguda en part al processament incorrecte del pèptid senyal i, sobretot, a glicosilació via Asn (del Cardayré i col., 1994). Malgrat que el patró de bandes observat en el cas de la reHPR.Y és diferent del de la reBPR.Y, especialment en les formes de massa molecular baixes, la qual cosa podria ser deguda al fet que la reHPR.Y presenta tres dianes consens de glicosilació via Asn mentre la reBPR.Y només en presenta una, l'existència de bandes d'activitat amb massa molecular molt elevada (>100.000 Da) feia pensar que també en el cas de la reHPR.Y existia una problemàtica similar.

En el llevat *S.cerevisiae*, la glicosilació via Asn consisteix en un nucli de Man₈GlcNAc₂ que pot continuar la seva maduració per a donar lloc a estructures d'elevat contingut en manoses del tipus Man₉₋₁₃GlcNAc₂. En les proteïnes de secreció l'estructura del nucli pot ésser substituïda per una cadena externa de mida variable (de fins a 200 residus manosil) consistent en un esquelet de manoses unides α -1,6 amb substitucions de cadenes de manose unides α -1,2 i α -1,3. A més

poden presentar, també com a part del procés de maduració, residus de manosa units al nucli (Herscovics i Orleans, 1993).

El pèptid senyal del factor α que s'ha utilitzat per a direccionar la secreció tant de la reBPR.Y com de la reHPR.Y, presenta tres dianes consens de glicosilació via Asn. El processament incomplet, la glicosilació extensiva de totes les dianes de glicosilació, tant del pèptid senyal com de les proteïnes recombinants, juntament amb la mobilitat electroforètica anòmala causada pels sucres (Osset i col., 1989), permeten explicar l'aparició d'espècies amb una massa molecular aparent superior als 100.000 Da.

Els assajos d'activitat realitzats amb els sobrenedants de cultius de *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpHPR.1] i *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpWL.RNAasa A], comparant els nivells d'expressió de reHPR.Y i reBPR.Y respectivament, indicaven que existia una relació 10:90 entre ambdós enzims. Si els nivells d'expressió de reBPR.Y oscil·len entre 1-5 mg/litre de cultiu (del Cardayré i col., 1994 i aquest treball), els de reHPR.Y oscil·len entre 0,01-0,05 mg/litre de cultiu. Si a més es té en compte que hi havia una heterogeneïtat de bandes d'activitat, es podia preveure que la purificació de la reHPR.Y esdevindria una tasca, si més no, força costosa. D'altra banda la possibilitat de processar la proteïna expressada, de cara a reduir l'heterogeneïtat i per tant a augmentar la concentració de la forma no glicosilada, tampoc hauria donat lloc a uns rendiments d'expressió, i de purificació, interessants des del punt de vista quantitatiu.

III.C.1.c. COMPROVACIÓ DEL MARC DE LECTURA EN LA UNIÓ DEL GEN SINTÈTIC AMB LA REGIÓ CODIFICANT PEL PÈPTID SENYAL DEL FACTOR α

Atesos els resultats que s'havien obtingut fins al moment, utilitzant diferents mètodes de detecció de l'activitat, els quals indicaven que hi havia una diferència apreciable entre els nivells d'expressió del control positiu, la reBPR.Y, i la reHPR.Y, amb desavantatge clar per a aquesta darrera, es va contemplar la possibilitat que s'hagués produït una reordenació en la zona de fusió amb el pèptid senyal i que aquesta estigués afectant l'expressió de la proteïna d'interès. Per això es va subclonar el fragment *Bam* H I-*Sal* I (veure figura III.C.1.c), que comprenia la seqüència que es volia determinar, en M13mp19 per tal de disposar del DNA de cadena senzilla.

Les etapes que es varen seguir s'exposen a continuació de forma resumida:

Obtenció del fragment *Bam* H I-*Sal* I: per tal de comprovar realment la seqüència, es varen retro-transformar cèl·lules competents *E.coli* TG1 amb una solució que contenia una extracció de DNA plasmídic (YEpHPR.1) de llevat realitzada segons el protocol descrit en l'apartat II.C.1.a.(3). Transformants resultants d'aquesta retro-transformació es varen fer créixer en cultius a petita escala

i part del DNA plasmídic obtingut es va carregar en una electroforesi per analitzar la digestió amb *Acc 65 I-Sal I* i verificar la presència del gen HPR. Un cop comprovat que realment existia l'insert es va procedir a l'aïllament del fragment *Bam H I-Sal I* de 1800 pb a partir d'electroforesi en gel d'agarosa del digerit *Bam H I* i *Sal I* de YEphPR1. Aquest aïllament es va realitzar en dues etapes degut a la incompatibilitat d'amortidors entre ambdós enzims.

Obtenció del vector digerit: es va realitzar un cultiu en medi líquid de M13mp19 utilitzant com a hoste *E.coli* TG1. D'aquest se'n féu una extracció minipreparativa del RFDNA i es digerí amb *Bam H I* i *Sal I*. El M13mp19-*Bam H I-Sal I* es va purificar a partir d'electroforesi en gel d'agarosa.

Lligament i transformació: el fragment *Bam H I* i *Sal I* provinent de YEphPR.1 i que s'anomenà BSHPR es va lligar al vector linealitzat M13mp19-*Bam H I-Sal I*. Les barreges de lligament s'utilitzaren per transformar cèl.lules competents de la soca TG1. Com a producte d'aquestes transformacions es varen obtenir calves blaves i calves blanques, aquestes últimes, suposadament, amb insert.

Selecció de transformants: cinc de les calves blanques resultants de les transformació anterior es varen cultivar en medi líquid emprant *E.coli* TG1 com a hoste i d'aquests cultius se'n féu una extracció del RFDNA. El RFDNA es va sotmetre a digestió amb *Eco R I* i *Pst I* i la restricció es va analitzar en una electroforesi 1,5% agarosa en amortidor TAE observant-se en tots els casos la presència d'una banda de 1800 i una altra de 600 pb, aproximadament, que era el que hom esperava de digerir la construcció resultant del lligament, que s'anomenà M13mp19BSHPR, amb *Eco R I* i *Pst I*.

Seqüenciació: a partir de cultius líquids utilitzant TG1 com a soca hoste, es va aïllar el ssDNA de M13mp19BSHPR per tal de seqüenciar-lo. La seqüenciació va donar com a resultat que no hi havia cap reordenació en la zona on convergeixen l'extrem 3' de la seqüència codificant pel pèptid senyal i l'extrem 5' de la seqüència codificant per la HPRNAasa de manera que tampoc s'havia perdut la fase del marc de lectura. A més a més es va tornar a comprovar la seqüència sencera del gen trobant-se que aquesta coincidia amb la prèviament dissenyada (figura III.B.1.2).

Per a aquest procediment de comprovació que s'ha descrit s'utilitzà com a control i per tant es varen realitzar totes les etapes des de l'aïllament del fragment BSHPR, el vector YEphPR.1 que s'havia utilitzat anteriorment per a transformar cèl.lules competents de *S.cerevisiae* BJ2168. No es varen trobar diferències respecte la seqüència en la regió de fusió entre el pèptid senyal i la HPRNAasa, quan el fragment BSHPR es va obtenir a partir de plasmidi recuperat de llevat o de plasmidi que no havia entrat en contacte amb llevat.

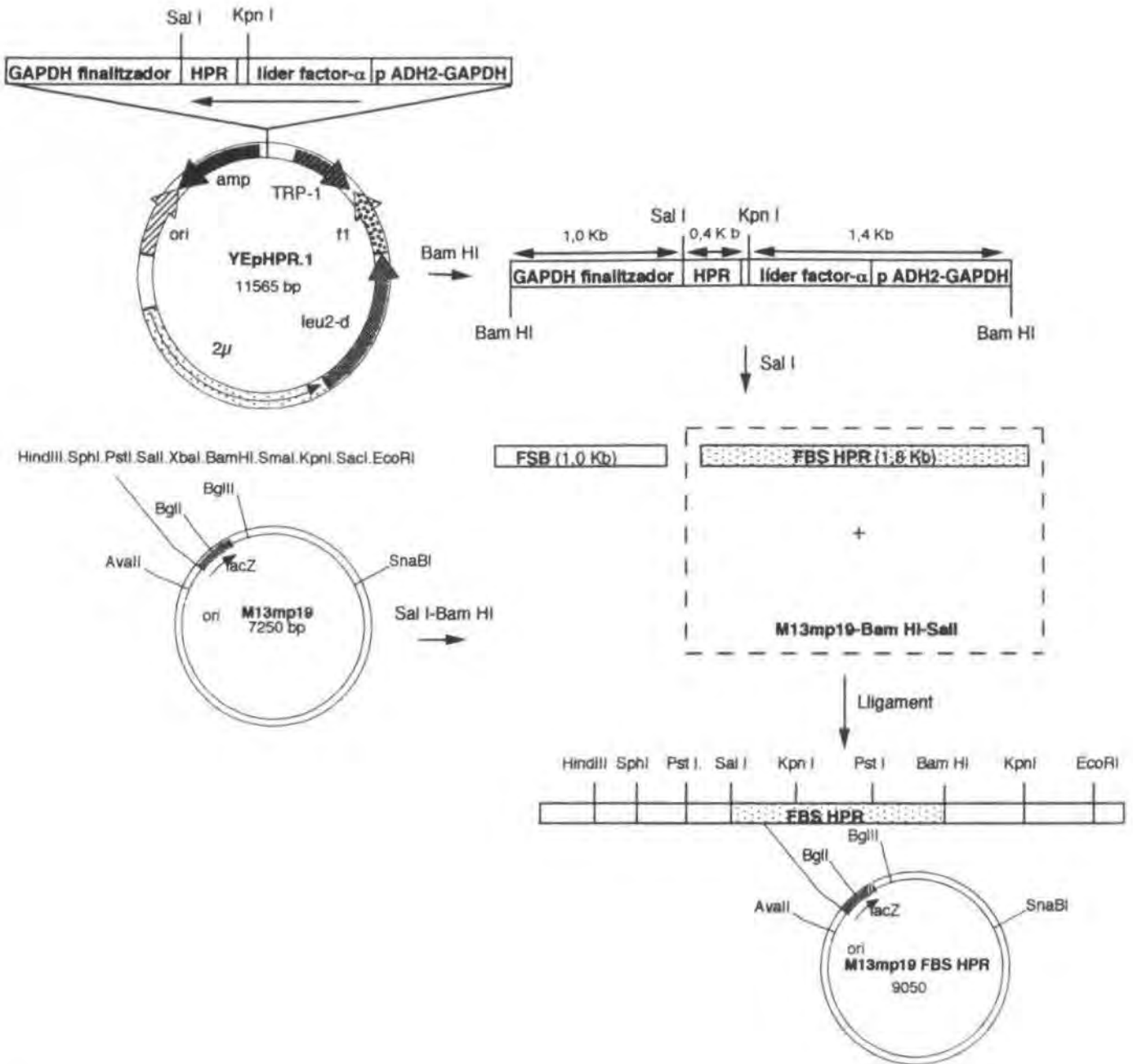
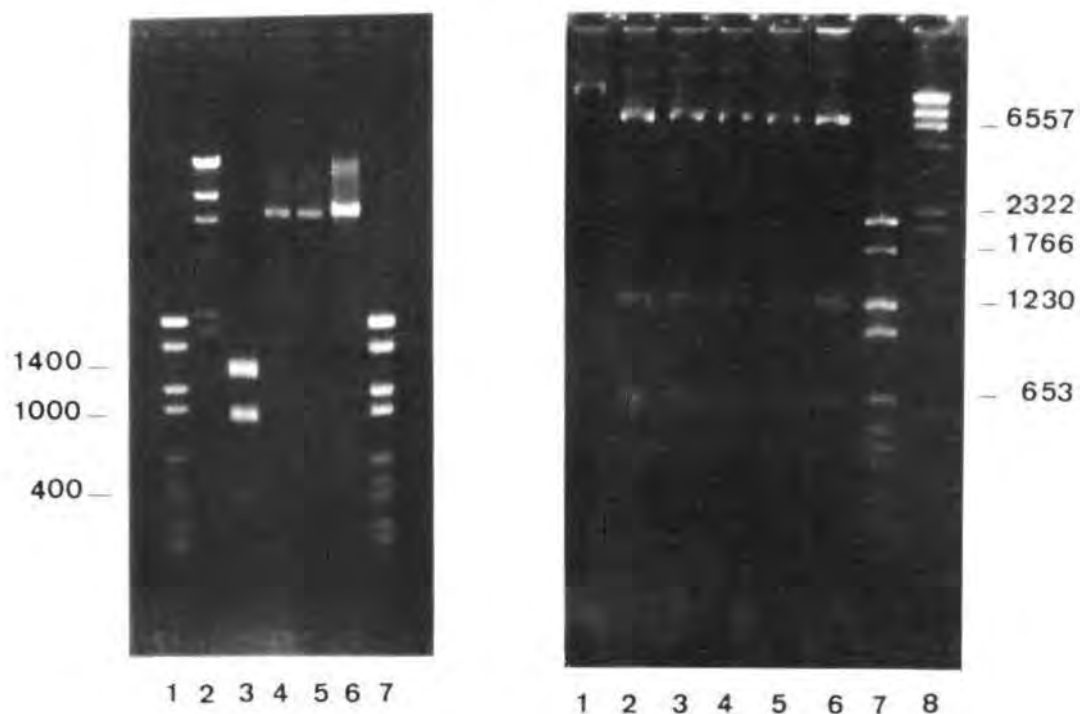


Figura III.C.1.c: (a) Esquema del subclonatge del fragment BSHPR en M13mp19-Bam HI-Sal I per obtenir el vector M13mp19BSHPR el qual s'utilitza per obtenir ssDNA i seqüenciar la regió corresponent a la fusió entre el pèptid senyal del factor α i la HPRNAasa.



(b) Electroforesi en gel d'agarosa 0,8% en amortidor TAE. Aquesta electroforesi va permetre comprovar per digestió del fragment BSHPR amb *Acc 65 I*, que aquest contenia l'insert corresponent al gen de la HPRNAasa. **1.** Marcadors de massa molecular VI (*pBR328-Bgl I-Hinf I* de Boehringer Mannheim, Alemanya) (2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234, 220 i 154 pb); **2.** Marcadors de massa molecular II (*λ-Hind III* de Boehringer Mannheim, Alemanya) (23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 i 125 pb); **3.** Fragment BSHPR i fragment FSB (apartat (a) d'aquesta mateixa figura) digerits amb *Acc 65 I*; **4 i 5.** M13mp19-*Bam H I-Sal I*; **6.** M13mp19-*Sal I*; **7.** Marcadors de massa molecular VI (*pBR328-Bgl I-Hinf I* de Boehringer Mannheim, Alemanya) (2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234, 220 i 154 pb). (c) Electroforesi en gel d'agarosa 1,5% en amortidor TAE corresponent a l'anàlisi per restricció amb *Eco R I* i *Pst I* dels clons de M13mp19BSHPR per comprovar la presència del fragment BSHPR: **1.** M13mp19BSHPR; **2-6.** Clons M13mp19BSHPR 1, 2, 3, 4 i 5 digerits parcialment amb *Eco R I* i *Pst I*; **7.** Marcadors de massa molecular VI (*pBR328-Bgl I-Hinf I* de Boehringer Mannheim, Alemanya) (2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234, 220 i 154 pb); **8.** Marcadors de massa molecular II (*λ-Hind III* de Boehringer Mannheim, Alemanya) (23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 i 125 pb).

III.C.2. Construcció del vector YEpHPR.2

De cara a intentar optimitzar l'expressió de la reHPR.Y, com a etapa prèvia a qualsevol intent de purificació, es va procedir a la construcció del vector plasmídic YEpHPR.2. La diferència d'aquest respecte la construcció analitzada anteriorment YEpHPR.1, es basa en diferències en la regió d'unió del pèptid senyal del factor α i la HPRNAasa.

Diverses seqüències líder han estat emprades per a dirigir la secreció de proteïnes en llevats. Probablement la seqüència líder natural de llevat més utilitzada és la que deriva del precursor de la feromona peptídica de llevat anomenada factor α . Aquesta feromona és un pèptid de 13 residus secretat per cèl.lules haploides del tipus α per a l'aparellament de cèl.lules haploides α i a per a formar els individus diploides (Thorner, 1981). El gen estructural principal (MF α 1) codifica una proteïna de 165 residus (prepro-factor α) que conté una seqüència líder de 85 residus amb tres dianes per N-glicosilació. Aquest líder es troba seguit d'una construcció repetida quatre vegades, que està formada per la seqüència de la feromona, precedida per un pèptid espaiador amb la seqüència Lys-Arg-(Glu/Asp-Ala)₂₋₃. El processament del prepro-factor α , implica l'acció de quatre enzims proteolítics diferents, els quals intervenen durant la seva transició a través de la via de secreció del llevat (Ernter i col., 1983; Julius i col., 1984).

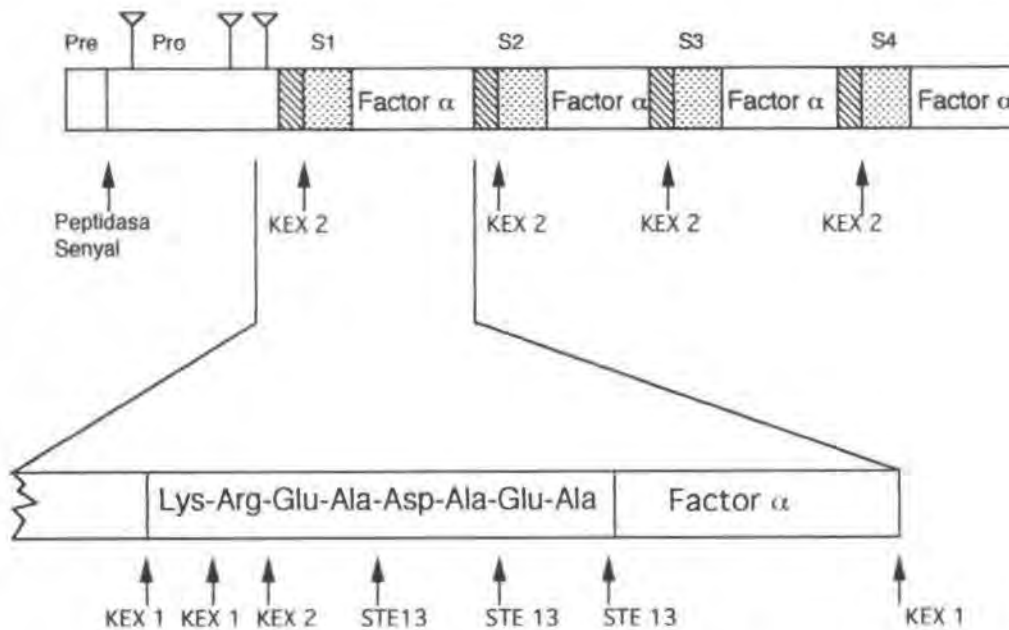


Figura III.C.2.1: Esquema representant l'estructura i el processament del prepro-factor α .

La peptidasa senyal (PS) catalitza la ruptura de l'enllaç peptídic entre els residus 19 i 20 i és responsable del processament del prepro-factor α a pro-factor α . L'endoproteïnasa producte del gen KEX2 digereix en l'extrem C-terminal de la seqüència Lys-Arg que precedeix el pèptid

espaiador. La tercera proteasa que participa en la maduració del factor α , és una dipeptidil aminopeptidasa, producte del gen STE13, i és la responsable d'eliminar els pèptids espaiadors en l'extrem N-terminal de cada seqüència repetida. Finalment també intervé en la maduració una carboxipeptidasa, producte del gen KEX1, la qual elimina els residus arginil i lisil en l'extrem C-terminal de cadascuna de les tres primeres estructures repetides.

En la construcció amb la qual s'havia treballat fins ara, YEpHPR.1 (veure figura III.C.1.a.2), el pèptid senyal estava directament unit a la reHPR.Y pels residus Lys-Arg. Tot i que un determinat nombre de proteïnes de fusió mancades del pèptid espaiador (Glu/Asp-Ala)₂₋₃ són correctament processades i secretades de forma eficient, altres resulten en una elevada proporció de proteïna de fusió no processada i hiperglicosilada. En estudis recents, Zsebo i col., (1986), havien observat en treballs d'expressió d'un interferó consens, que quan es va incloure el pèptid espaiador en les fusions, aleshores la proteïna produïda era correctament processada i curiosament, es trobava menys glicosilada. Puix que els resultats trobats durant la comprovació de l'expressió de reHPR.Y emprant el vector YEpHPR.1 (apartat III.C.1) indicaven, d'una banda nivells baixos d'expressió i de l'altra, desvetllaven l'existència d'una més que probable hiperglicosilació sobre la reHPR.Y, es va procedir a la introducció del pèptid espaiador en la proteïna de fusió, entre els residus Lys-Arg de l'extrem C-terminal del pèptid senyal i la Lys-1 de la reHPR.Y.

III.C.2.a. OBTENCIÓ DEL VECTOR YEpHPR.2

L'esquema del procediment seguit per a l'obtenció del vector YEpHPR.2 i la diferència respecte la construcció YEpHPR.1 es presenta en la figura III.C.2.a.1.

El seguit d'etapes que es varen dur a terme per a l'obtenció del vector YEpHPR.2 es descriuen breument a continuació:

Reaccions de mutagènesi: la inserció de la seqüència nucleotídica codificant pel pèptid espaiador (Glu-Ala)₃ s'aconseguí en un únic pas de mutagènesi dirigida per oligonucleòtid. El DNA motllo utilitzat per dur a terme aquesta reacció de mutagènesi fou el ssDNA de M13mp19.HPR(MR3) (veure apartat III.B.5)

L'oligonucleòtid que es va dissenyar consta de 50 nucleòtids on entre uns braços de 17 i 15 nucleòtids hi ha els 18 que codifiquen pel pèptid espaiador que es volia introduir. La seqüència corresponent a aquests 18 nucleòtids s'ha tret de Brake i col., (1984):

oligo #MR5: 5'-tac ctt tgg ata aaa gag agg ctg aag ctg aag cta agg aat ctc gag ct-3'

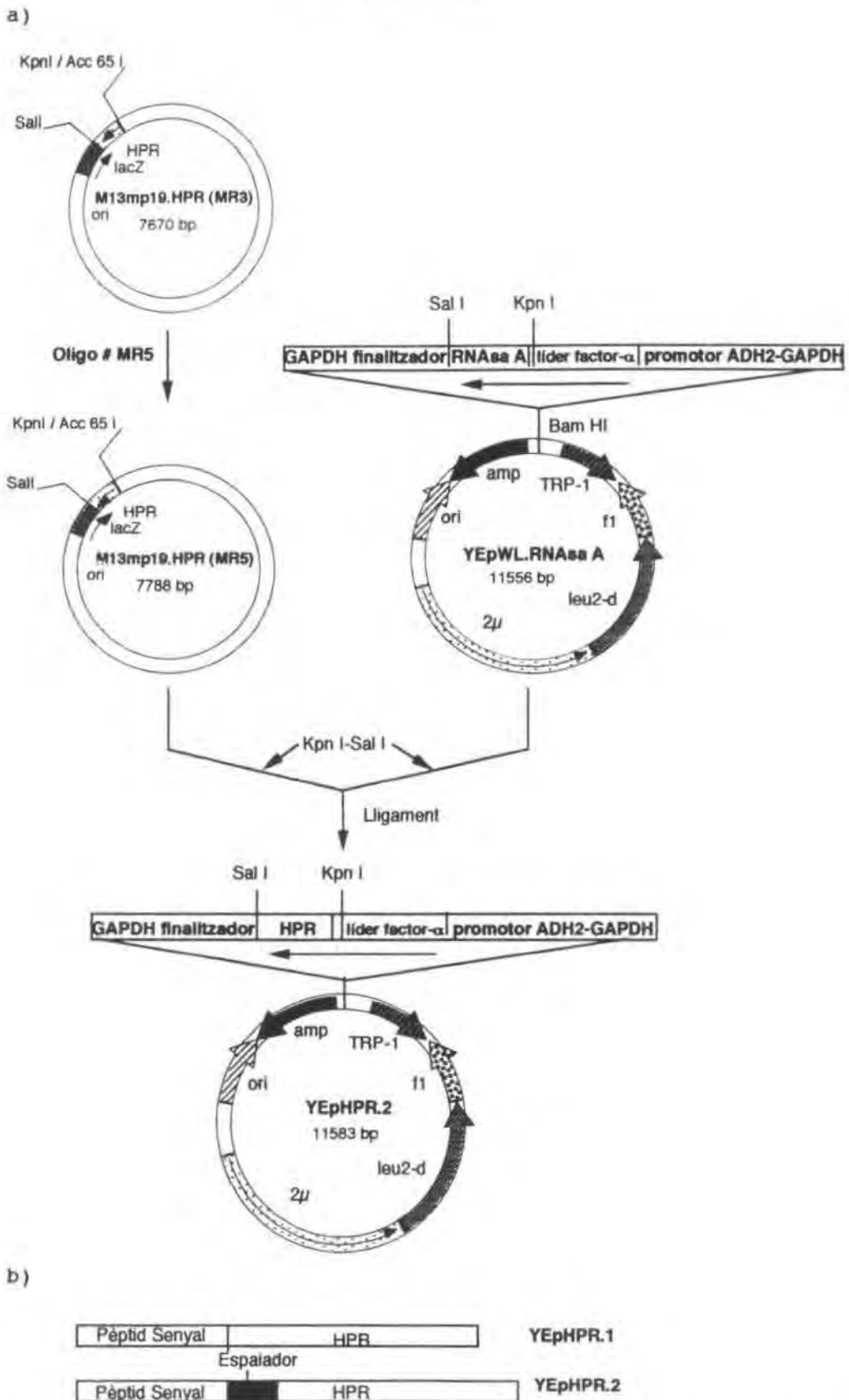


Figura III.C.2.a.1: (a) Esquema de la construcció de YEphPR.2. (b) Esquema en el qual es posa de manifest la diferència existent entre les construccions YEphPR.1 i YEphPR.2 i s'indica la localització del pèptid espaiador (Glu-Ala)₃

Aquest oligonucleòtid sintètic es va utilitzar directament, és a dir sense cap pas previ de purificació per a realitzar les reaccions de mutagènesi dirigida sobre el vector M13mp19.HPR(MR3) d'acord amb els protocols descrits en l'apartat II.C.3.f. Després de la reacció de mutagènesi es varen analitzar 6 clons per la tècnica de "single track" dels ssDNA que s'havien extret dels cultius provinents de colònies resultants de transformar cèl.lules competents amb la resultant de les reaccions de mutagènesi. El rendiment de les reaccions de mutagènesi segons l'anàlisi dels clons que havien incorporat la mutació desitjada fou del 80%. Els clons obtinguts s'anomenaren M13mp19.HPR(MR5).

Obtenció del gen de la HPRNAasa: es va realitzar un cultiu de 20 ml d'*E. coli* TG1-[M13mp19.HPR(MR5)] del qual se'n féu una extracció de RFDNA pel sistema de lisi alcalina. Part d'aquest DNA es va digerir amb *Acc 65 I* i *Sal I* i el fragment de 438 pb corresponent al gen de la HPRNAasa més la inserció realitzada es va purificar per electroforesi en gel d'agarosa.



Figura III.C.2.a.2: Electroforesi en gel d'agarosa del 2,0% en amortidor TAE de les restriccions efectuades sobre DNA plasmídic de diferents clons de les construccions YEpWLRNAasa A, YEpHPR.1 i YEpHPR.2. **2-6.** YEpHPR.1 de diferents clons digerit amb *Acc 65 I-Sal I*; **8 i 19.** Marcadors de massa molecular VI (pBR328-*Bgl I-Hinf I* de Boehringer Mannheim, Alemanya) (2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234, 220 i 154 pb); **7 i 15.** Marcadors de massa molecular V (pBR322-*HaeIII* de Boehringer Mannheim, Alemanya) (587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124, 123, 104, 89, 80, 64, 57, 51, 21 i 18 pb); **1 i 14.** Marcadors de massa molecular II (λ -*Hind III* de Boehringer Mannheim, Alemanya) (23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 i 125 pb); **9-13.** YEpHPR.2 de diferents clons digerit amb *Acc 65 I-Sal I*; **16.** YEpWLRNAasa A-*Acc 65 I-Sal I*; **17.** YEpHPR.1-*Acc 65 I-Sal I*; **18.** YEpHPR.2-*Acc 65 I-Sal I*. La diferència entre la massa molecular del cDNA de la BPRNAasa (carrer 16), la del gen sintètic HPR (carrer 17) i la del gen sintètic amb la inserció del fragment corresponent al pèptid espaiador (carrer 18) permet distingir-les en una electroforesi d'agarosa al 2%.

Obtenció del vector YEpWL-Acc 65 I-Sal I: a partir d'un cultiu de 250 ml d'*E.coli* TG1-[YEpWL.RNAasa A] es va dur a terme una extracció preparativa (apartat II.C.1.a.(2)) del plasmidi YEpWL.RNAasa A del qual se n'obtingueren uns 0,4 mg. La finalitat d'aquest DNA a més a més de constituir la font de YEpWL-Acc 65 I i SaI I, era proporcionar prou vector YEpWL.RNAasa A per a ésser utilitzat en controls de digestions, transformacions, etc....

Lligament: es va realitzar el lligament direccional entre YEpWL-Acc 65 I-Sal I i el gen obtingut a partir de la digestió del RFDNA de M13mp19.HPR(MR5) amb Acc 65 I i SaI I. La barreja de lligament s'utilitzà per a transformar cèl.lules *E.coli* TG1 competents que se sembraren en plaques de LB + Ap. De les colònies resistents a la Amp que s'obtingueren, se'n cultivaren diverses en medi líquid per a obtenir-ne el DNA plasmídic. Aquest es va sotmetre a digestió i el resultat, que es presenta en la figura III.C.2.a.2, fou que el 90% dels clons que es varen analitzar presentaven l'insert corresponent en massa molecular al gen de la HPRNAasa amb la inserció esperada.

III.C.2.b. COMPROVACIÓ DE L'EXPRESSIONI DE reHPR.Y EN *S.cerevisiae* BJ2168 TRANSFORMADES AMB YEPhPR.2

Després d'obtenir la construcció YEPhPR.2, era convenient analitzar l'expressió que, amb aquesta construcció, s'obtenia de reHPR.Y. El vector YEPhPR.2 era portador, tal com s'havia dissenyat en l'apartat anterior de la proteïna de fusió pèptid líder del factor α -HPRNAasa amb la particularitat que s'havia introduït en la zona d'unió d'ambdues, el pèptid espaiador que naturalment es troba en llevat i és substrat d'una de les quatre proteases que intervenen en la maduració del factor α (producte del gen STE13). Una vegada més la proteïna de fusió tenia tots els requisits per a ésser secretada a l'exterior i fer-ho en una forma madura.

Per a una primera anàlisi de la expressió de la reHPR.Y utilitzant el vector plasmídic YEPhPR.2 es varen seguir les mateixes etapes que s'han descrit en l'anàlisi de la producció utilitzant el vector YEPhPR.1 (apartat III.C.1.b). Així doncs després de l'obtenció i transformació de cèl.lules competents de llevat *S.cerevisiae* BJ2168 amb YEPhPR.2 (paral.lelament es transformaren les construccions YEpWL, que funcionava com a control negatiu, YEpWL.RNAasa A, que s'emprà com a control positiu, i YEPhPR.1 per tal de poder comparar la producció amb la nova construcció), es varen seleccionar els transformants i la detecció de l'expressió de reHPR.Y es dugué a terme en cultiu en placa. Dels resultats que es deriven de l'anàlisi de la producció dels cultius en plaques d'activitat destaquen essencialment tres aspectes: (a) el control negatiu YEpWL no va donar senyal d'activitat, (b) el control positiu YEpWL.RNAasa A estava produint activitat ribonucleasa i (c) la nova construcció YEPhPR.2 era capaç de produir activitat ribonucleasa però els nivells de producció aparents eren indistingibles dels que s'observaven amb la construcció YEPhPR.1, i sensiblement

menors que els que mostrava el control positiu YEpWL.RNAasa A. Aquests resultats es mostren en la figura III.C.2.b.1.

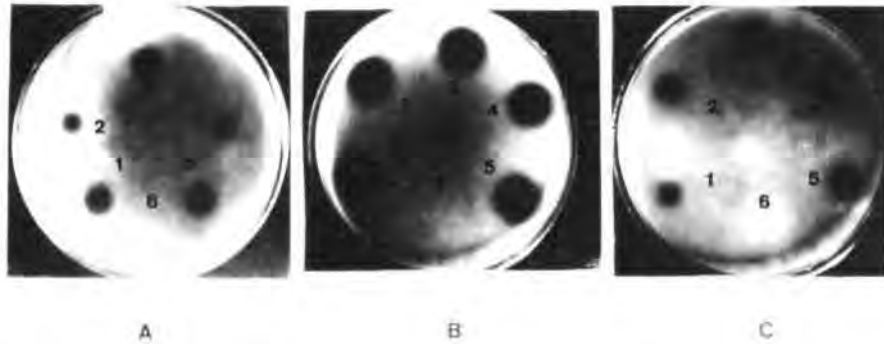


Figura III.C.2.b.1: Assaig d'activitat en placa per a la detecció de l'expressió d'activitat ribonucleasa. Després de la transformació i de la selecció de transformants per recuperació de prototrofies per *trp* i *leu*, 1 μ l dels cultius de BJ2168 portador de YEpWL, YEpWL.RNAasa A, YEpHPR.1 i YEpHPR.2 crescuts la nit abans en S4%D-leu es diposità sobre la placa de YEPD2%D-2% agar (p/v)-2 mg/ml de RNA. Les plaques s'incubaren durant 72 hores a 30°C. Les colònies es rentaren amb aigua destil·lada i el RNA no digerit es precipità amb una solució diluïda d'àcid perclòric. Les colònies que estan expressant una proteïna amb activitat RNAasa donen lloc a zones clares produïdes per la digestió, enmig de la terbolesa provocada pel RNA precipitat. Placa **A** : 1, 2, 3, 4 i 5: *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpHPR.1]; Placa **B** : 1, 2, 3, 4 i 5: *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpWL.RNAasa A]; 6: *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpWL]; Placa **C** : 1, 2, 3, 4 i 5: *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpHPR.2].

III.C.3. Expressió de la reHPR.Y en cèl·lules de *S.cerevisiae* BJ2168 transformades amb YEpHPR.1 i YEpHPR.2

Un cop comprovat, mitjançant els assaigs d'activitat de cultiu en placa, que cèl·lules *S.cerevisiae* BJ2168 transformades amb YEpHPR.2 eren capaces d'expressar la reHPR.Y, es procedí a la comparació entre els nivells de producció d'activitat ribonucleasa existents en aquests clons i els existents en cèl·lules *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpHPR.1]. Simultàniament, com ja és habitual en aquest estudi s'emprà la construcció YEpWL.RNAasa A com a control positiu d'expressió i YEpWL com a control negatiu de la mateixa.

Tots els experiments d'expressió de HPRNAasa recombinant en llevat es varen dur a terme en medi S4%D-leu. L'ús d'aquest medi, com a alternativa a fer servir medi ric YPD, està justificat pel fet que garanteix la selecció del plasmidi alhora que, degut a què la seva composició és més senzilla, ha d'afavorir la purificació de l'enzim recombinant que es troba majoritàriament en el medi extracel·lular. Així doncs, per al creixement d'aquesta soca en medi líquid de cara a l'expressió, primer es va fer créixer un cultiu de nit inoculant 2-10 ml de medi S4%D-leu líquid, bé a partir d'una colònia acabada de seleccionar en placa, o bé a partir d'un glicerinat guardat a -70°C. (apartat II.B.4). L'endemà s'inoculà el volum desitjat de S4%D-leu fresc amb 1/100 d'aquest volum provinent del cultiu de nit. El cultiu es deixà créixer a 30°C, en agitació constant a 225 r.p.m. durant 96 hores. Un cop transcorregut aquest temps el cultiu es centrifugà per tal d'obtenir-ne el sobrenedant.

En particular, i per aquesta prova, en la qual hom volia comparar els nivells de producció d'activitat ribonucleasa en ambdues construccions, s'inocularen per separat 500 ml de medi S4%D-leu fresc amb 1/100 d'aquest volum provinent d'un cultiu de nit de *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpWL.RNAasa A], *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpWL], *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpHPR.1] i *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpHPR.2]. Els cultius es varen incubar durant 96 hores a 30°C i amb agitació constant a 225 r.p.m.. Els sobrenedants obtinguts per centrifugació es concentraren per ultrafiltració tangencial fins a 80 ml i es varen dialitzar enfront d'amortidor 50 mM acetat sòdic, pH 5,5, durant tota una nit a 4°C.

Es va determinar la concentració de proteïna utilitzant el mètode de Bradford (1976) de totes quatre mostres i se'n va assajar l'activitat en placa d'activitat 1% agarosa (p/v), 0,5 mg/ml RNA en 0,1 M Tris-HCl pH 8,0, al mateix temps que s'incubà en la mateixa placa una sèrie de dilucions de RNAasa A comercial de concentració coneguda. Assumint que l'activitat específica de tots tres enzims, RNAasa A, reBPR.Y i reHPR.Y, és la mateixa, es pot fer una estimació de la concentració en equivalents d'activitat RNAasa A a partir d'interpol·lar el diàmetre de l'halo de digestió de les mostres en la recta construïda amb els diàmetres dels halos de digestió produïts per les dilucions de RNAasa A. En la figura III.C.3.1 es pot visualitzar el resultat d'aquests assajos.

La comparació de les determinacions d'activitat RNAasa en sobrenedant dels clons portadors dels vectors YEpHPR.1 i YEpHPR.2 (Taula III.C.3.1) mostra que els nivells de producció d'activitat RNAasa en ambdós casos es troben dins del mateix ordre de magnitud alhora que difereixen sensiblement (entre 15 i 60 vegades menys) dels nivells de producció determinats per clons portadors del vector YEpWL.RNAasa A que expressen la reBPR.Y. Si bé sembla que hi hagi una lleugera millora, de l'ordre de quatre vegades, en la producció de reHPR.Y a partir de la construcció YEpHPR.2, aquesta no es pot considerar que realment constitueixi una millora important en l'optimització de la producció.

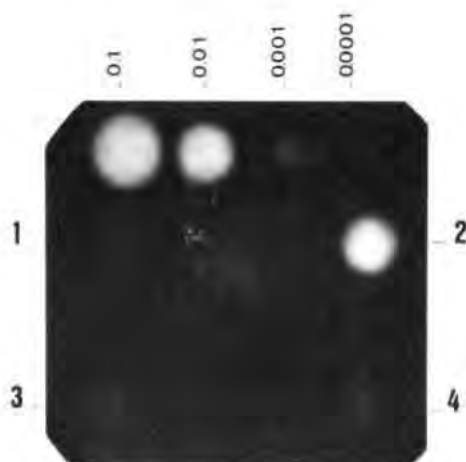


Figura III.C.3.1.: Assaig d'activitat en placa dels sobrenedants de cultius de: **1** *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpWL]; **2** *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpWL.RNAasa A]; **3** *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpHPR.1]; **4** *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpHPR.2]. En la placa es va dipositar 1 µl dels sobrenedants concentrats i dialitzats dels clons esmentats i 1 µl de solucions de RNAasa A de concentracions 0,1 µg/µl, 0,01 µg/µl, 0,001 µg/µl i 0,0001 µg/µl i es va incubar 4 hores a 37°C. Passat aquest temps la placa es va teyir amb una solució de 0,1% toluídina (p/v) en 10 mM Tris-HCl pH 8,0, i destenyida amb diversos rentats amb aigua corrent.

Construcció	Proteïna Total ^a (mg/ml)	Concentració d'equivalents d'activitat RNAasa A (mg/l) ^b	% Respecte Proteïna Total
YEpWL	0,22	0,00	0,00
YEpWL.RNAasa A	0,18	2,52	1,4
YEpHPR.1	0,22	0,042	0,019
YEpHPR.2	0,19	0,160	0,080

Taula III.C.3.1: Anàlisi de l'expressió d'activitat ribonucleasa en el sobrenedant de cultius dels clons *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpWL.RNAasa A], *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpWL], *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpHPR.1] i *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpHPR.2]. **a:** Determinada segons Bradford (1976). **b:** Valors calculats interpolant en una recta de concentracions de RNAasa A el diàmetre de l'àrea de digestió de les diferents mostres, assumint que l'activitat específica és la mateixa en tots els casos.

A partir d'aquestes dades hom pot concloure que la presència de la seqüència codificant pel nonapèptid (Glu-Ala)₃, entre la seqüència codificant pel pèptid senyal i la seqüència codificant per la HPRNAasa, no millora ostensiblement els nivells de producció de reHPR.Y assolits amb la construcció original. Aquest augment en la producció pot ésser atribuït al fet que aquesta seqüència peptídica constitueix una diana pel producte del gen STE13, alternativa o

complementària a la diana que és reconeguda pel producte del gen KEX2. L'acció conjunta d'ambdues proteases podria afavorir el processament de la proteïna de fusió i l'alliberament de la proteïna madura. Segons Zsebo i col., (1986), la funció d'aquest nonapèptid seria la de constituir un colze hidrofílic entre el pèptid senyal i el factor α que afavoriria l'accessibilitat de les proteases producte dels gens KEX2 i STE13. És probable, que el caràcter hidrofílic de l'extrem N-terminal, tant de la reBPR.Y com de la reHPR.Y, faci disminuir aquest efecte estèric i no permeti un processament prou eficient,

III.C.4. Purificació de la reHPR.Y

Les condicions de cultiu que s'han utilitzat per a l'expressió de la reHPR.Y, ja sigui per a la comparació dels nivells d'expressió de totes dues construccions, com per a la seva purificació han estat les establertes prèviament per a la reBPR.Y (del Cardayré i col., 1994).

Per tal d'establir un sistema de purificació de la reHPR.Y es varen fer estudis previs utilitzant *S.cerevisiae* BJ2168-[YE_pWL.RNAasa A] perquè els nivells d'expressió d'aquests clons eren més elevats i permetien un millor seguiment de l'activitat ribonucleasa. La semblança entre ambdues proteïnes pel que respecta al seu comportament cromatogràfic, feia preveure una ràpida aplicació del sistema d'aïllament que s'establís per a la reBPR.Y, a l'aïllament de la reHPR.Y.

Per a la purificació de reHPR.Y s'utilitzà com a material de partida el medi extracel·lular de cultius de *S.cerevisiae* BJ2168-[YE_pHPR.2], ja que, com s'ha vist en l'apartat anterior, els nivells d'expressió d'aquesta construcció eren quatre vegades superiors als de la construcció *S.cerevisiae* BJ2168-[YE_pHPR.1]

Per a l'obtenció del medi extracel·lular es va fer créixer un cultiu de nit inoculant 10 ml de medi S4%D-leu líquid a partir d'un glicerinat guardat a -70°C.(apartat II.B.4.) i l'endemà s'inoculà 1 litre de medi S4%D-leu fresc amb el cultiu de nit. El cultiu es deixà créixer a 30°C, en agitació constant a 225 r.p.m., durant 96 hores. Les cèl·lules es varen recollir per centrifugació a 3.000 xg, durant 10 min a 4°C. El sobrenedant fou filtrat a través de membranes de 0,22 μ m i concentrat fins a 70 ml per ultrafiltració tangencial amb l'equip Minitan™ Ultrafiltration System (Millipore, MA, EEUU), emprant una membrana de polisulfona de 5.000 Da de mida d'exclusió.

Un cop concentrat el sobrenedant es va dur fins a un 60% acetona per tal de precipitar-ne la fracció proteica. Aquest pas era imprescindible ja que l'anàlisi electroforètica del sobrenedant sense dur a terme la precipitació donava lloc a una llapissada que no permetia discriminar les bandes corresponents a proteïnes de baixa massa molecular.

El precipitat es va recollir per centrifugació a 26.900 xg durant 30 min a 4°C, redissolt en un volum mínim d'aigua i liofilitzat per eliminar les possibles restes d'acetona. El liofilitzat es va resuspendre en un volum mínim d'amortidor 25 mM acetat sòdic, pH 5,5, i dialitzat durant tota la nit contra el mateix amortidor abans de dur a terme el procediment cromatogràfic.

El procés cromatogràfic utilitzat es fonamenta en un únic pas, consistent en una cromatografia de bescanvi catiónic les condicions de la qual s'han descrit en l'apartat II.E.1.b, i el perfil d'elució a 280 nm de la qual es presenta en la figura III.C.4.1.

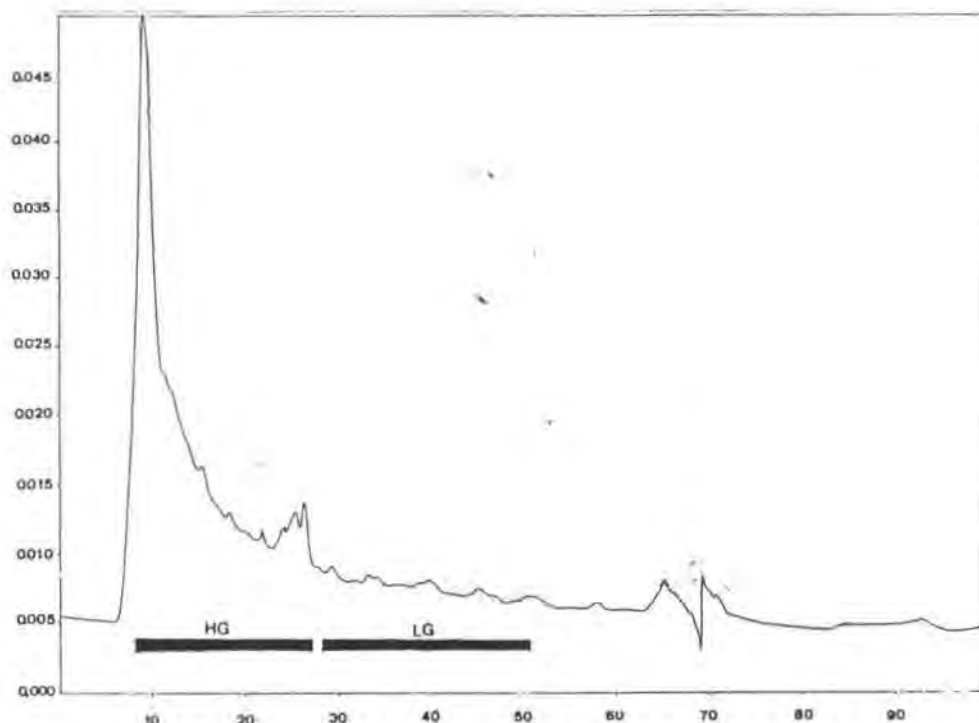


Figura III.C.4.1: Purificació de la reHPR.Y. Cromatografia de bescanvi catiónic en columna MONO-S. La columna fou equilibrada amb 20 mM acetat sòdic, pH 5,5 i eluïda amb un gradient lineal de 0-0,35 M NaCl en amortidor d'equilibrat durant 60 min i de 0,35-1 M NaCl en amortidor d'equilibrat durant 10 min a un flux de 1 ml/min. Es recolliren fraccions de 2 ml i s'assajà l'activitat ribonucleasa en placa i en gel revelat per activitat. Les fraccions que presentaren activitat han estat indicades amb una barra negra i es varen agrupar en dues mostres diferents anomenades reHPR.Y-HG i reHPR.Y-LG.

L'anàlisi en gel revelat per activitat de diverses fraccions en les quals s'havia detectat activitat en l'assaig en placa es presenta en la figura III.C.4.2.a. S'observa, com ja s'havia vist en l'assaig en placa, que l'activitat ribonucleasa es troba distribuïda pràcticament en totes les fraccions eluïdes de la cromatografia. El zimograma permet comprovar que aquesta distribució respon a una heterogeneïtat d'espècies amb masses moleculars diferents, totes elles amb activitat ribonucleasa.

Les masses moleculars aparents d'aquestes espècies oscil·len entre els aproximadament 14.000 Da que correspondrien a la reHPR.Y i que es trobarien en les fraccions d'elució més tardanes, i els més de 100.000 Da que posseirien les formes que elueixen a forces iòniques més baixes.

L'anàlisi electroforètica en gel de poliacrilamida-SDS (figura III.C.4.2.b) ens mostra que aquesta etapa de purificació, si bé no permet separar completament la reHPR.Y, si que possibilita la seva purificació en un grau elevat i permet de distingir entre dues poblacions amb activitat ribonucleasa: l'una, formada per espècies d'elució primerenca i amb una massa molecular elevada i l'altra d'elució més tardana i amb masses moleculars més petites.

Aquestes dues poblacions s'han considerat per separat en estudis posteriors i corresponen a les fraccions que s'han assenyalat en la figura III.C.4.1. com a reHPR.Y-HG i reHPR.Y-LG.

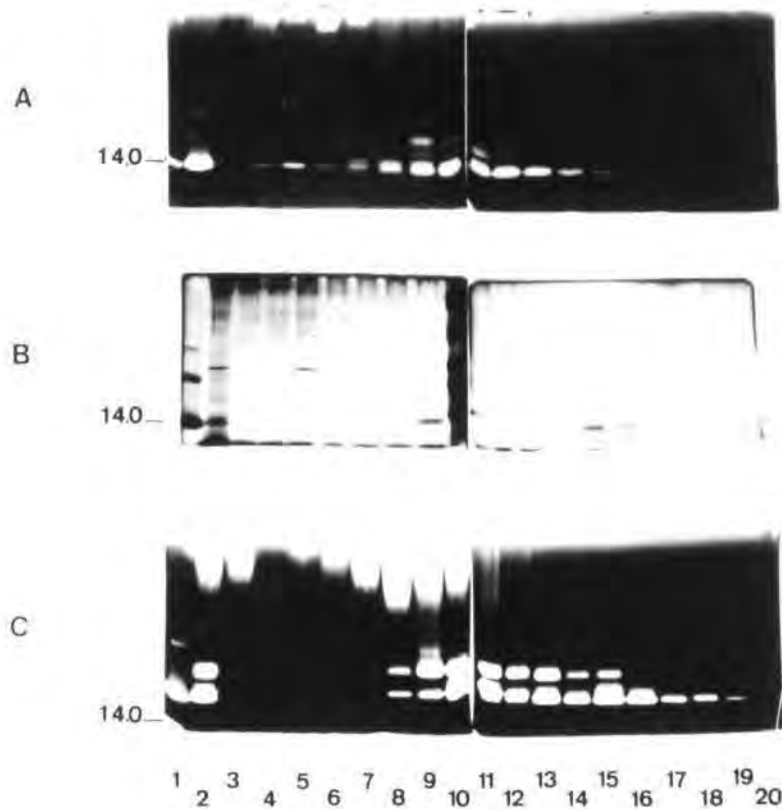


Figura III.C.4.2: (A) Anàlisi electroforètica en gel de poliacrilamida-SDS al 15% amb poli(C) revelat per activitat de les fraccions obtingudes en la cromatografia de bescanvi catiònic que es mostra en la figura III.C.4.1; (B) Anàlisi electroforètica en gel de poliacrilamida-SDS al 15% revelat per tinció argèntica, de les fraccions obtingudes en la cromatografia de bescanvi catiònic que es mostra en la figura III.C.4.1. (C) Anàlisi electroforètica en gel de poliacrilamida-SDS al 15% amb poli(C) revelat per activitat de les fraccions obtingudes en la cromatografia de bescanvi catiònic quan la mostra era la ribonucleasa de pàncreas boví recombinant també produïda en llevat. S'observa que en ambdós casos l'heterogeneïtat es distribueix al llarg de diverses fraccions de la cromatografia de bescanvi catiònic.

Els resultats de la purificació s'han resumit en la taula III.C.4.a.:

	Proteïna total (mg) ^a	reHPR.Y total (mg) ^b	Activitat específica ^c	Purificació (vegades)	Rendiment (%)
Medi extracel.lular	219 mg	0,175	$7,99 \times 10^{-4}$	----	100
Precipitació Acetona 60%	60	0,130	$2,16 \times 10^{-3}$	2,70	74,28
Mono-S					
reHPR.Y-HG	0,074	0,062	0,84	388	35,43
reHPR.Y-LG	0,033	0,030	0,90	416	17,14

Taula III.C.4.a: Resum de la purificació de la reHPR.Y a partir del medi extracel.lular de 1 litre de cultiu de *S.cerevisiae* BJ2168-[YEpWL.HPR.2] en S4%D-leu. ^aLa determinació de la quantitat de proteïna es dugué a terme emprant el mètode de Bradford. ^bLa quantitat de reHPR.Y s'ha determinat a partir de l'activitat ribonucleasa en placa utilitzant com a patró RNAasa A bovina comercial i assumint la mateixa activitat específica. ^cActivitat específica en mg de reHPR.Y / mg de proteïna total.

III.C.5. Caracterització bioquímica

III.C.5.a. HOMOGENEÏTAT

La quantitat de reHPR.Y present en les mostres anomenades reHPR.Y-HG i reHPR.Y-LG, les quals s'obtingueren després de la cromatografia de bescanvi catiónic en columna Mono-S, es va calcular a partir de l'activitat ribonucleasa utilitzant com a patró RNAasa A bovina comercial i emprant la determinació d'activitat en placa d'agarosa amb RNA com a substrat. L'activitat específica, tal i com s'ha definit en la taula III.C.4.a indica que la reHPR.Y s'ha obtingut, després de l'etapa cromatogràfica amb una puresa del 87% considerant ambdues mostres, reHPR.Y-HG i reHPR.Y-LG, conjuntament. Aquest valor és molt acceptable si considerem que les diverses fraccions de reHPR.Y elueixen en un ventall de forces iòniques ampli amb la qual cosa la possibilitat que hi hagués contaminació amb altres proteïnes era, en principi, força elevada. Aquesta possibilitat però s'ha vist reduïda en gran part, degut a l'ús de medi sintètic en el creixement dels clons.

Tanmateix no es pot parlar d'un producte d'expressió homogeni atesa la variabilitat de masses moleculars observada en les diferents fraccions eluïdes de la cromatografia.

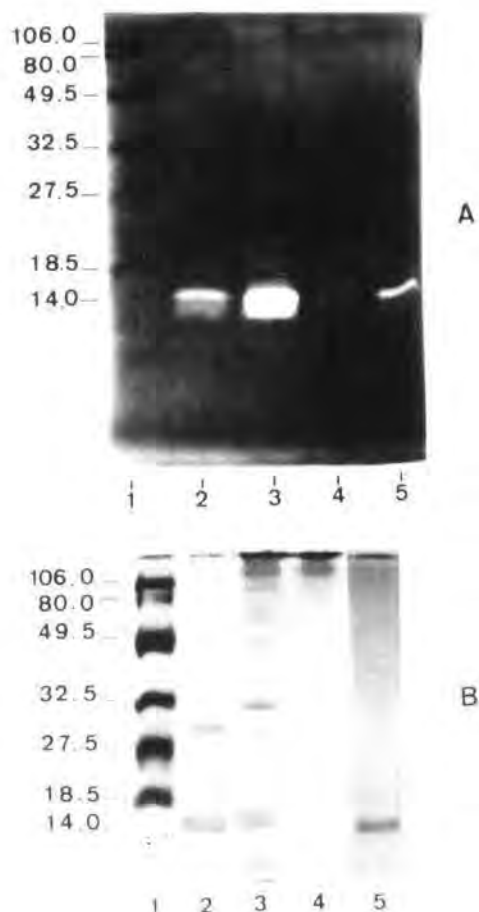


Figura III.C.5.a.1: (A) Anàlisi electroforètica en gel de poliacrilamida-SDS al 15% amb poli(C) revelat per activitat de les fraccions reHPR.Y-LG i reHPR.Y-HG. **1.** Marcadors de massa molecular pretenyits [fosforilasa b (106.000 Da), albúmina sèrica bovina (80.000 Da), ovoalbúmina (49.500 Da), anhidrasa carbònica (32.500 Da), inhibidor de tripsina (27.500 Da) i lisozim (18.500 Da)] de Bio-Rad (EEUU); **2.** RNAasa A; **3.** reHPR.Y abans de la cromatografia de bescanvi catiònic en Mono-S; **4.** reHPR.Y-HG; **5.** reHPR.Y-LG. **(B)** Anàlisi electroforètica en gel de poliacrilamida-SDS al 15% revelat per tinció argèntica, de les fraccions reHPR.Y-LG i reHPR.Y-HG. **1.** Marcadors de massa molecular pretenyits [fosforilasa b (106.000 Da), albúmina sèrica bovina (80.000 Da), ovoalbúmina (49.500 Da), anhidrasa carbònica (32.500 Da), inhibidor de tripsina (27.500 Da) i Lisozim (18.500 Da)] de Bio-Rad (EEUU); **2.** RNAasa A; **3.** reHPR.Y abans de la cromatografia de bescanvi catiònic en Mono-S; **4.** reHPR.Y-HG; **5.** reHPR.Y-LG.

Com es pot observar en la figura III.C.5.a.1, la mostra reHPR.Y-LG (carrer 5) apareix homogènia i com una única banda amb una massa molecular aparent de 14.000 Da, atenent estrictament el criteri electroforètic i la tinció amb nitrat d'argent. En el carrer 4 de la mateixa figura, la fracció reHPR.Y-HG també es manifesta com una única banda d'elevada massa molecular que no ha estat possible de concretar. En la fracció corresponent a la mostra abans d'ésser cromatografiada (carrer 3), ambdues bandes ja apareixen com a majoritàries d'entre una major heterogeneïtat de bandes proteiques. Part d'aquesta heterogeneïtat és deguda a formes de reHPR.Y, com es posa de

manifest en la detecció d'altres bandes amb activitat ribonucleàsica en el zimograma (figura III.C.5.a.1.A, carrer 3). En l'anàlisi electroforètica en gel revelat per activitat s'observa també que les bandes visualitzades en el gel tenyit amb nitrat d'argent en reHPR.Y-HG i en reHPR.Y-LG són el component ribonucleàsic actiu majoritari. És possible pensar que la resta de bandes que s'observa en la mostra abans d'ésser cromatografiada poden haver-se repartit, i per tant diluït, entre ambdues fraccions així com durant els processos de manipulació de la mostra efectuats.

Així doncs, tot i que la nova construcció YEpHPR.2 no ha permès eliminar l'heterogeneïtat glucídica ja observada amb la construcció YEpHPR.1, ha possibilitat una millora en les nivells de producció. La reHPR.Y, produïda a raó de 0,1-0,2 mg/litre, és una proteïna amb diferents graus de glicosilació que fan que aquesta es manifesti en bandes de massa molecular que oscil·len entre els 14.000 i els més de 100.000 Da de les formes amb un contingut en sucres més elevat.

III.D. OBTENCIÓ DE LA HPRNAasa RECOMBINANT PRODUÏDA EN *E.coli* (reHPR.B)

L'expressió de reHPR.Y a partir de cèl·lules de llevat portadores del plasmidi YEp.HPR.1 o YEp.HPR.2 va donar com a resultat, com s'ha vist en l'apartat III.C, una producció mitjana de 0,1 mg/l. A més a més es va observar que aquesta producció es distribuïa en una heterogeneïtat de masses moleculars deguda probablement a diferents graus de glicosilació i a un processament incorrecte del pèptid senyal al qual es trobava fussionada la HPRNAasa per tal que es dugués a terme la seva secreció. Els nivells de reHPR.Y obtinguts i la diversitat de formes observades no eren els òptims per a produir la proteïna homogènia que és necessària per a dur a terme estudis cinètics, determinacions estructurals o estudis immunològics.

D'entrada s'havia de veure si era convenient continuar amb el mateix sistema d'expressió, intentar una nova optimització o canviar de sistema. Atesa l'heterogeneïtat de formes trobada en la reHPR.Y produïda en llevat es va pensar en intentar l'expressió en procariotes, ja que com a mínim, en sistemes d'expressió procariotes podríem evitar la gran heterogeneïtat deguda a glicosilació.

Dels sistemes descrits fins al moment que havien assolit la producció d'alguna ribonucleasa, destacava el sistema pINIII (Ghrayeb i col., 1984, Masui i col., 1984) que havia funcionat bé per a la producció de la RNAasa T1 de *Aspergillus oryzae* (Quaas i col., 1988). Aquest sistema fou escollit perquè és un sistema de secreció que permetria, en el cas que s'aconegués l'expressió, obviar els potencials efectes citotòxics de l'activitat ribonucleasa, la susceptibilitat a l'atac de proteases (quan no es formen cossos d'inclusió), la modificació N-terminal (encara que aquest seria un problema menor) i el fet que cal recuperar l'estructura terciària de la proteïna en els sistemes d'expressió citosòlics, amb la dificultat que això pot comportar en proteïnes amb quatre ponts disulfur.

Els vectors de la sèrie pNIIIompA posseeixen un origen de replicació del tipus ColE1, un gen de resistència a ampicil.lina, el gen repressor *lac I* i un promotor *lpp-lacZpo*, induïble amb IPTG, que controla l'expressió de la seqüència codificant pel pèptid senyal de secreció OmpA al qual es fussionen els gens foranis (figura III.D.1). Els vectors pNIIIompA posseeixen després de la seqüència codificant pel pèptid senyal OmpA tres dianes de restricció (*Eco RI*, *Hind III* i *Bam HI*) en les quals es poden clonar seqüències de DNA forani. Els tres vectors de la sèrie, pNIIIompA1, pNIIIompA2 i pNIIIompA3, difereixen en la posició dels punts de tall esmentats respecte el marc de lectura, de tal manera que, entre tots tres vectors generen els tres marcs de lectura possibles per a cada una de les dianes de restricció. L'expressió d'un gen forani clonat en un vector pNIIIompA origina una proteïna recombinant que es troba fussionada pel seu extrem N-terminal al pèptid senyal ompA. Aquest guia la proteïna a l'espai periplàsmic on el pèptid senyal és processat per una proteasa de la membrana plasmàtica d'*E.coli*.

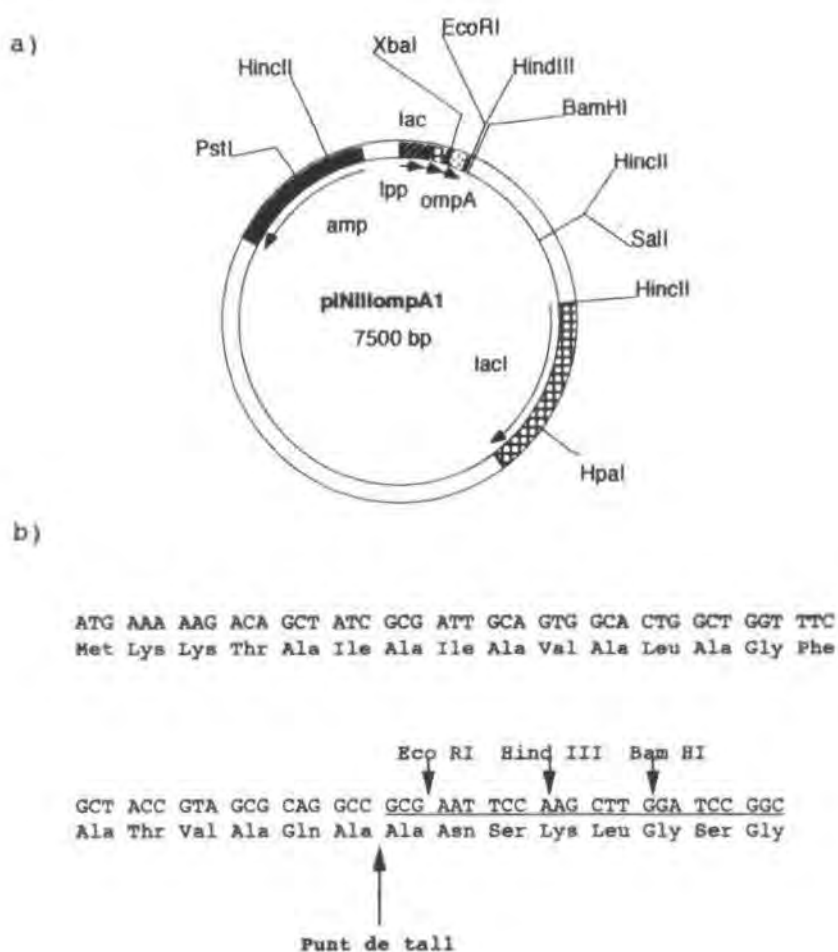


Figura III.D.1: (a) Representació esquemàtica del vector de secreció pNIIIompA1. *lpp*, promotor *lpp*; *lac*, promotor operador *lac*; *ompA*, seqüència per al pèptid senyal OmpA; *amp*, gen de resistència a l'ampicil.lina. (b) Representació esquemàtica de les seqüències d'unió al vector de secreció pNIIIompA1. La seqüència del lloc de clonatge múltiple s'ha subratllat. El aminoàcids corresponen als del pèptid senyal OmpA. S'ha indicat també el punt de reconeixement i tall de la peptidasa senyal.

Amb aquest sistema doncs, es buscava la producció de HPRNAasa en la seva forma madura, sense modificacions en el seu extrem N-terminal ni altres modificacions secundàries i si les condicions d'expressió ho permetien, amb la seva estructura terciària correcta i per tant activa.

III.D.1. Construcció del vector pNIIIompA1.HPR

Els vectors de la sèrie pNIIIompA només posseeixen punts de tall *Eco* RI, *Hind* III i *Bam* HI per al clonatge d'inserts foranis amb la finalitat d'expressar-los. Cap d'aquestes dianes es troba dins de la seqüència del gen sintètic que s'havia construït. Tampoc es troben però, en els extrems del gen, en els quals les dianes eren *Kpn* I / *Acc65* I i *Sal* I.

En una primera aproximació per a intentar la producció de HPRNAasa es va optar per treballar amb una construcció que possibilitava l'estudi de l'expressió en aquest sistema i que permetia evitar momentàniament la problemàtica de les dianes de restricció. Aquesta solució va consistir en subclonar el gen sintètic HPR present en la construcció M13mp19HPR(MR3), (figura III.C.1.a.1), a través de les dianes *Eco* RI i *Hind* III que es troben a ambdós extrems del gen. El següent pas era veure quin dels tres vectors de la sèrie pNIIIompA generava, quan era digerit amb *Eco* RI, un extrem que lligat al fragment *Eco* RI-*Hind* III provinent de M13mp19HPR(MR3), mantingués un marc de lectura correcte. El vector escollit fou el pNIIIompA1.

III.D.1.a. OBTENCIO DEL VECTOR pNIIIompA1.HPR

L'obtenció del vector pNIIIompA1.HPR es va dur a terme de la manera que es resumeix a continuació i que s'esquematitza en la figura III.D.1.a.1:

Purificació de gen HPR: es va realitzar un cultiu de 10 ml de TG1-[M13mp19HPR(MR3)] a partir del qual es va fer l'extracció del RF DNA del vector per lisi alcalina. Aquest DNA es va digerir amb *Hind* III. La barreja de digestió es va tractar amb fenol:cloroform (24:1) i el DNA es va precipitar amb etanol. El DNA resuspès es va digerir a continuació amb *Eco* RI i el fragment de 441 pb corresponent al gen es va purificar per electroforesi en gel d'agarosa.

Obtenció del pNIIIompA1 digerit amb *Eco* RI-*Hind* III: a partir d'un glicerinat de HB101-[pNIIIompA1] es va fer créixer un cultiu de nit del qual se'n va extreure el DNA plasmídic per lisi alcalina. Aquest DNA es va digerir amb *Eco* RI i *Hind* III i el DNA linealitzat es va purificar per electroforesi en gel d'agarosa.

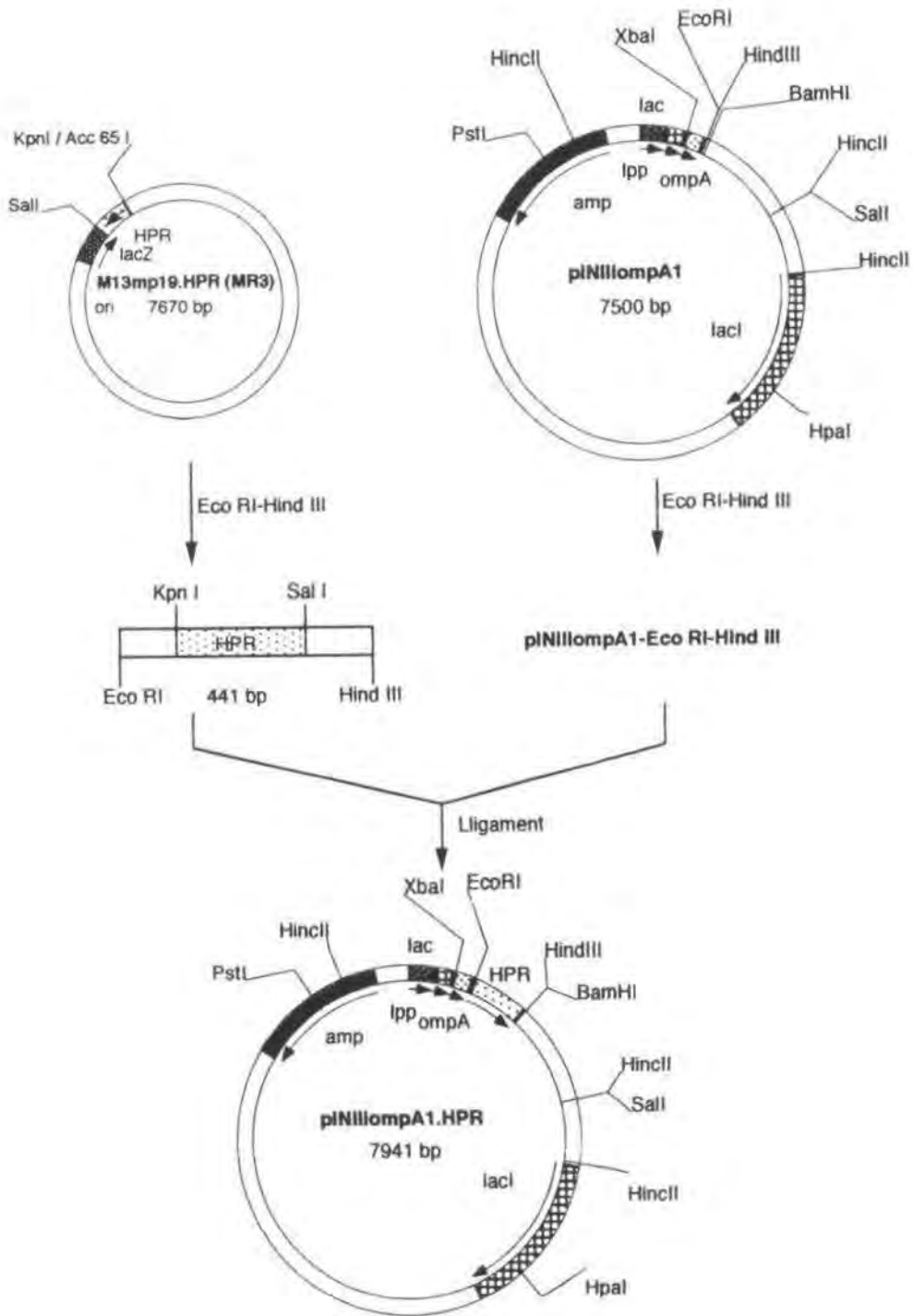


Figura III.D.1.a.1: Construcció del vector pN11lompA1.HPR. El gen HPR del vector M13mp19HPR(MR3) es va obtenir per digestió amb *Eco*RI i *Hind*III. L'insert un cop purificat es va clonar en al vector pN11lompA1 que havia estat tallat amb *Eco*RI i *Hind*III per donar lloc al vector pN11lompA1.HPR. *amp* gen de resistència a l'ampicil·lina; *lpp*, promotor de lipoproteïna; *lac*, promotor operador lac; *ompA*, seqüència codificant pel pèptid senyal OmpA; *lac I*, gen codificant del repressor lac; *lac Z*, darrera part del gen lacZ; *ori*, origen de replicació; *HPR*, gen sintètic de la HPRNAasa.

Lligament i selecció de transformants: el fragment *Eco* RI-*Hind* III que contenia el gen HPR es va lligar amb el vector pNIIIompA1 digerit amb *Eco* RI-*Hind* III i la barreja de lligament es va utilitzar per a transformar cèl.lules competents MC1061 que es varen sembrar en plaques de M9CAS +Ap. De les diverses colònies resistents a l'ampicil.lina que s'obtingueren, se'n cultivaren algunes en medi líquid per extreure'n el DNA plasmídic i sotmetre'l a digestió amb *Eco* RI i *Pst* I.

El resultat d'una digestió completa amb *Eco* RI i *Pst* I de la construcció que es volia aconseguir, pNIIIompA1.HPR, havia de donar com a resultat l'aparició de dues bandes de 1200 pb i 450 pb, la segona de les quals havia de contenir el gen HPR. Si la digestió havia estat incompleta es podia observar a més, una banda corresponent al fragment *Pst* I-*Pst* I de 1650 pb tal com succeïa en algun dels clons analitzats per restricció (figura III.D.1.a.2).

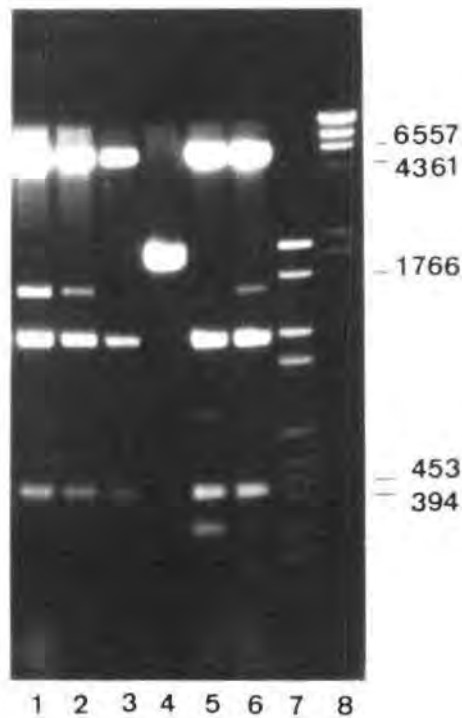


Figura III.D.1.a.2: Electroforesi en gel d'agarosa al 1,5 % en amortidor TAE de les anàlisis de restricció amb *Pst* I i *Eco* RI del DNA obtingut a partir de cultius de clons resistents a Amp resultants de transformar cèl.lules competents d'*E.coli* MC1061 amb la barreja de lligament del fragment *Eco* RI-*Hind* III del vector M13mp19HPR(MR3) i del vector pNIIIompA1 tallat amb *Eco* RI i *Hind* III. **1, 2, 3, 4, 5 i 6:** DNA de diferents clons digerit amb *Eco* RI i *Hind* III. S'observaren digestions parcials en el DNA en els carrers 1, 2 i 6, digestió completa en el carrer 3 i construccions anòmales en els carrers 4 i 5; **7:** Marcadors de massa molecular VI (pBR328-*Bgl* I-*Hinf* I de Boehringer Mannheim, Alemanya) (2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234, 220 i 154 pb); **8:** Marcadors de massa molecular II (λ -*Hind* III de Boehringer Mannheim, Alemanya) (23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 i 125 pb).



Figura III.D.1.a.3: Vector pNIIIompA1.HPR. (a) Mapa del vector pNIIIompA1.HPR. *amp*, gen de resistència a l'ampicil·lina; *lpp*, promotor de lipoproteïna; *lac*, promotor operador lac; *ompA*, seqüència codificant pel pèptid senyal OmpA; *lac I*, gen codificant del repressor lac; *ori*, origen de replicació; *HPR*, gen sintètic de la HPRNAasa. (b) Seqüència de bases i aminoacídica de la regió corresponent al pèptid senyal OmpA i la HPRNAasa. Es pot observar que el codó per al primer aminoàcid de la HPRNAasa no segueix directament el codó pel darrer residu del pèptid senyal Omp A sinó que entre tots dos hi ha onze codons addicionals.

III.D.1.b. COMPROVACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE reHPR.B EN CÈL·LULES D'*E.coli* MC1061 TRANSFORMADES AMB pNIIIompA1.HPR

El vector pNIIIompA1.HPR construït com s'ha descrit en l'apartat anterior, havia de posseir el gen HPR inserat en pNIIIompA1 situat en el marc de lectura i l'orientació correctes darrera la seqüència codificant per al pèptid senyal OmpA seguida de 11 residus aminoacídics addicionals (figura III.D.1.a.3). Era possible doncs, intentar l'expressió de HPRNAasa recombinant a partir de pNIIIompA1.HPR, expressió que havia de produir una HPRNAasa amb 11 residus addicionals en l'extrem N-terminal i que s'anomenaria reHPR.B+11. De fet era lògic pensar en intentar aquesta expressió abans de dur a terme altres transformacions sobre el vector pNIIIompA1.HPR.

Per a la realització d'una primera anàlisi de l'expressió de HPRNAasa recombinant a partir de pNIIIompA1.HPR es va posar un cultiu de nit de M9CAS +Amp amb 6 clons diferents d'*E.coli* MC1061-[pNIIIompA1.HPR]. L'endemà s'inocularen 10 ml de medi fresc amb 0,1 ml dels cultius de nit. A les dues hores el cultiu es va induir amb IPTG a una concentració final de 2 mM. Com a controls es varen fer créixer paral·lelament, cultius d'*E.coli* MC1061-[pNIIIompA1] i *E.coli* MC1061. Després de 24 hores d'incubació a 37 °C es varen centrifugar els cultius i s'obtingueren les fraccions extracel·lular, periplàsmica i citoplasmàtica segons s'ha descrit en l'apartat II.D.4.

La presència de HPRNAasa recombinant es va analitzar en les diferents fraccions electroforèticament en gels de poliacrilamida-SDS i en gels d'activitat o zimogrames. En cap fracció de tots els clons que es varen assajar no es va detectar activitat ribonucleasa. Tampoc es va observar en els assajos electroforètics després de l'inducció, l'aparició de cap banda d'expressió que pogués correspondre a la reHPR.B+11. D'aquests resultats es pot concloure que o bé no s'expressava la reHPR.B+11, o bé s'expressava a nivells baixos i hi havia un problema de plegament provocat pels 11 aminoàcids addicionals o per les característiques intrínseques de la cadena polipeptídica de la HPRNAasa.

Els mateixos resultats es varen obtenir quan en lloc de HPRNAasa es va intentar expressar la BPRNAasa. Posteriorment s'ha tingut coneixement d'un altre intent d'expressió de la BPRNAasa en el mateix sistema que va resultar també infructuós (Miranda, 1990).

Atès que gens d'origen diferent (sintètic i cDNA) varen donar els mateixos resultats d'expressió hom creu que l'explicació d'aquest comportament cal buscar-la a nivell de la cadena polipeptídica més que no pas a nivell del DNA o d'una possible estructura secundària del missatger. La diferència més clara existent entre la HPRNAasa, la BPRNAasa i la RNAasa T1 que Quas i col. varen aconseguir expressar utilitzant el sistema pNIIIompA es troba en l'extrem N-terminal de les proteïnes. Mentre la RNAasa T1 no presenta cap residu bàsic en els deu primers residus del seu

extrem N-terminal, la BPRNAasa i la HPRNAasa en presenten respectivament 3 i 5. La presència de càrregues positives degudes a residus bàsics en l'extrem N-terminal de les proteïnes a expressar, s'ha descrit (MacIntyre i Henning, 1990), com un dels factors que pot produir, juntament amb agrupacions de diversos residus hidrofòbics, efectes inhibitoris en la secreció. La no secreció de la proteïna sintetitzada facilitaria la degradació d'aquesta per part de les proteases i en conseqüència la no detecció de l'expressió d'aquesta.

III.D.2. Construcció dels vectors pET22.HPR i pET17.HPR

Diferents sistemes d'expressió que funcionaven bé per a la BPRNAasa s'han desenvolupat durant la realització d'aquest treball i s'han comentat en la introducció. D'entre aquests sistemes destaca el que utilitza el promotor de la T7 RNA polimerasa desenvolupat per Studier i col., (1990), sistema que ha estat aplicat exitosament en la producció de la BPRNAasa (del Cardayré i col., 1994) així com en la producció de la ribonucleasa seminal bovina (BSRNAasa) (Kim i Raines, 1993). Els nivells d'expressió observats en ambdós casos (50 mg/l i 100 mg/l respectivament) depassaven de llarg les millors expectatives previstes inicialment tot i que s'havien utilitzat dues variants del mateix sistema: l'expressió a través de la secreció en el cas de la BPRNAasa i l'expressió citosòlica en el cas de la BSRNAasa.

La possibilitat d'obtenir una proteïna madura, activa i en gran quantitat va resultar encoratjador a l'hora d'intentar la producció de la HPRNAasa emprant aquest sistema.

Els vectors originals de la sèrie pET i les soques hostes adequades foren desenvolupades per Studier i col., (1986). El vector pET22b(+) conté un origen de replicació d'*E.coli* (*ori*), un gen de resistència a l'ampicil·lina i un origen de replicació f1 el qual permet la producció de DNA plasmídic de cadena senzilla per infecció de soques hoste F' amb la presència d'un fag de suport o "helper phage". El vector pET22b(+) conté un promotor del tipus T7/*lac* la qual cosa significa que existeix un operador *lac* just darrera del promotor de la T7 RNA polimerasa. A més a més, el pET22b(+) és portador del promotor natural i de la seqüència codificant pel repressor *lac* (*lac I*), orientat en el sentit oposat al promotor T7/*lac*. Quan aquest vector s'utilitza en lisògens del tipus DE3 per l'expressió de gens foranis, el repressor *lac* actua tant sobre el promotor *lac* UV5 per a reprimir la transcripció de la RNA polimerasa de T7, com per bloquejar la transcripció del gen forani per qualsevulla RNA polimerasa de T7 que es pugui trobar.

El sistema descrit serveix per a regular l'expressió de la seqüència senyal pelB de 63 pb i que codifica per un pèptid senyal d'exportació. Darrera d'aquesta seqüència es poden inserir els gens foranis a través de les dianes *Msc I* i *Nco I* produint-se la proteïna per la qual codifiquen fusionada al

pèptid líder pelB. Aquest líder està dissenyat per exportar les proteïnes heteròlogues al periplasma de la cèl.lula bacteriana (Better i col., 1988).

El vector també comprèn un terminador propi de la RNA polimerasa de T7 necessari per impedir la transcripció de tot el vector.

Pel que fa al vector pET17b(+), la diferència principal respecte al pET22b(+) a efectes del que ens interessa per al present treball, rau en l'absència d'una seqüència senyal que pugui ésser reconeguda *in vivo*. Aquest vector doncs, s'ha utilitzat per intentar l'expressió citosòlica de la HPRNAasa.

III.D.2.a. OBTENCIÓ DEL VECTOR pET22.HPR

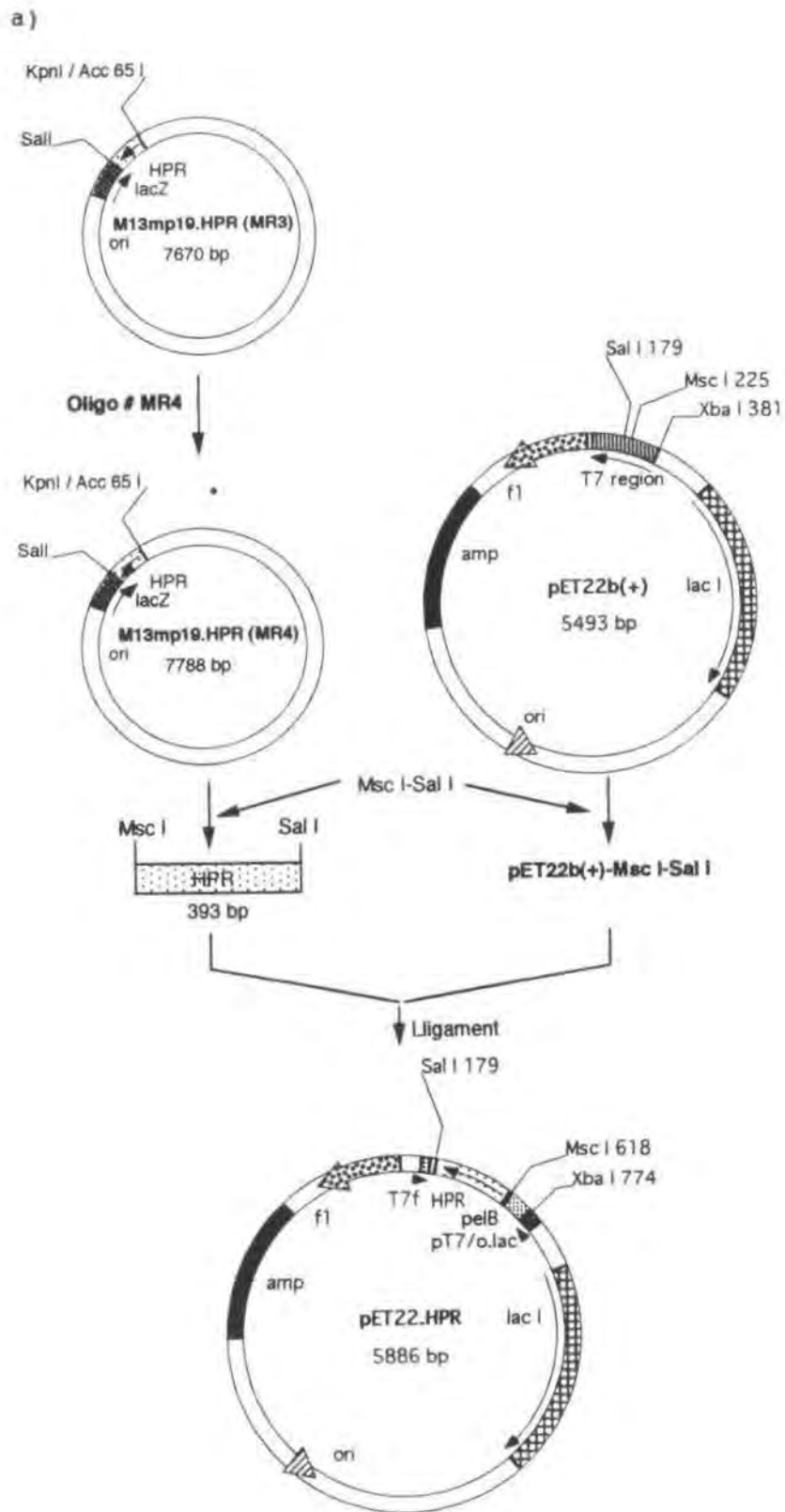
Com ja s'ha comentat anteriorment la inserció de gens foranis en el vector pET22b(+) es pot dur a terme a través de les dianes *Msc I* i *Nco I* produint-se la proteïna per la qual codifiquen fusionada al pèptid líder pelB. Els extrems del gen sintètic eren *Kpn I* i *Sal I* i no existia la possibilitat d'efectuar cap clonatge directe que permetés esbrinar a curt termini si era o no possible la producció de la HPRNAasa utilitzant aquest sistema. L'estrategia de clonatge que es va fer servir per tal d'inserir el gen HPR en el vector pET22b(+) es resumeix breument a continuació i és el que es pot seguir en l'esquema de la figura III.D.2.a.1.

Reaccions de mutagènesi: la inserció de la diana *Msc I* que havia de permetre el clonatge del gen HPR es va aconseguir en un únic pas de mutagènesi dirigida per oligonucleòtid. El DNA motllo utilitzat per a dur a terme aquesta reacció de mutagènesi fou el ssDNA de M13mp19.HPR(MR3) (apartat III.B.5).

L'oligonucleòtid que es va dissenyar constava de 35 nucleòtids, on entre uns braços de 15 nucleòtids hi havia els 5 a modificar (en negreta) que eren necessaris per a la creació de la diana *Msc I*:

oligo #MR4: 5'-cgg tac ctt tgg ata **tgg cca** agg aat ctc gag ct-3'

Aquest oligonucleòtid sintètic es va utilitzar sense cap pas previ de purificació per a realitzar les reaccions de mutagènesi dirigida sobre el vector M13mp19.HPR(MR3) d'acord amb els protocols descrits en l'apartat II.C.3.f. Després de la reacció de mutagènesi es va analitzar el RF DNA de diferents clons per restricció amb *Msc I* i els ssDNA d'aquells clons on la restricció havia estat positiva, es varen seqüenciar per la tècnica de seqüenciació d'una única base (single-track). El rendiment de les reaccions de mutagènesi segons l'anàlisi dels clons que havien incorporat la mutació desitjada fou del 80%. Els clons obtinguts s'anomenaren M13mp19.HPR(MR4).



Resultats i Discussió

b)

```

                                promotor T7                                operador Lac
AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACA
                                rbs
ATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT   ATG AAA
                                                           Met Lys

TAC CTG CTG CCG ACC GCT GCT GCT GGT CTG CTG CTC CTC GCT GCC
Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala
Seqüència senyal pelB
                                XhoI
CAG CCG GCG ATG GCC AAG GAA TCT CGA GCT AAA AAA TTT CAA AGA
Gln Pro Ala Met Ala Lys Glu Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln Arg
                                HPRNAasa

CAA CAT ATG GAT TCT GAT TCT TCT CCT TCT TCT TCT TCT ACT TAC
Gln His Met Asp Ser Asp Ser Ser Pro Ser Ser Ser Ser Thr Tyr

                                NarI
TGT AAT CAA ATG ATG AGG CGC CGA AAT ATG ACT CAA GGT AGA TGT
Cys Asn Gln Met Met Arg Arg Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys

                                AatII
AAA CCT GTT AAT ACT TTT GTT CAT GAA CCT TGT GTT GAC GTC CAA
Lys Pro Val Asn Thr Phe Val His Glu Pro Leu Val Asp Val Gln
                                HPRNAasa

AAT GTC TGT TTT CAA GAA AAA GTT ACT TGT AAA AAT GGT CAA GGT
Asn Val Cys Phe Gln Glu Lys Val Thr Cys Lys Asn Gly Gln Gly

                                SphI
AAT TGT TAC AAA TCT AAT TCT AGC ATG CAT ATT ACT GAT TGT AGA
Asn Cys Tyr Lys Ser Asn Ser Ser Met His Ile Thr Asp Cys Arg

CTG ACT AAT GGT TCT AGA TAC CCT AAT TGT GCT TAC AGA ACT TCT
Leu Thr Asn Gly Ser Arg Tyr Pro Asn Cys Ala Tyr Arg Thr Ser
                                HPRNAasa

CCT AAA GAA AGA CAC ATT ATT GTT GCT TGT GAA GGT TCT CCT TAC
Pro Lys Glu Arg His Ile Ile Val Ala Cys Glu Gly Ser Pro Tyr

                                NheI
GTT CCT GTT CAT TTT GAT GCT AGC GTT GAA GAT TCT TAAG
Val Pro Val His Phe Asp Ala Ser Val Glu Asp Ser Stop

```

Figura III.D.2.a.1: (a) Construcció del vector pET22.HPR. (b) Regió corresponent a la unió del pèptid líder pelB i la HPRNAasa en la construcció pET22.HPR.

Obtenció del fragment HPR-Msc I-Sal I: es va realitzar un cultiu de 20 ml d'*E.coli* TG1-[M13mp19.HPR(MR4)] del qual se'n féu una extracció de RFDNA pel sistema de lisi alcalina. Part d'aquest DNA es va digerir amb *Msc I* i *Sal I* i el fragment de 393 pb corresponent al gen de la HPRNAasa es va purificar per electroforesi en gel d'agarosa.

Obtenció del vector pET22b(+)-Msc I-Sal I: a partir d'un cultiu de 20 ml d'*E.coli* XL1-Blue-[pET22b(+)] es va extreure el DNA plasmídic i es va sotmetre a digestió amb *Msc I* i *Sal I*. El fragment corresponent al vector linealitzat es va purificar per electroforesi en gel d'agarosa.

Lligament: es va realitzar el lligament direccional entre pET22b(+)-*Msc*I-*Sal*I i el fragment HPR-*Msc*I-*Sal*I obtingut a partir de la digestió del RF DNA de M13mp19.HPR(MR4). La barreja de lligament s'utilitzà per a transformar cèl.lules *E.coli* BL21(DE3)competents que se sembraren en plaques LB + Ap. De les colònies resistents a Ap que s'obtingueren se'n cultivaren diverses en medi líquid. D'aquests cultius líquids se'n guardaren 0,5 ml en forma de glicerinat (20% final de glicerol) i la resta va servir per a dur a terme una mini-preparació de DNA plasmídic i la posterior anàlisi per restricció (figura III.D.2.a.2). Aquesta anàlisi mostrà que tots els clons assajats eren portadors del fragment que s'havia volgut clonar i que per tant s'havia obtingut la construcció pET22.HPR.

Com a controls es varen transformar els vectors pET22b(+) i pBXR. Ambdues construccions poden utilitzar-se com a controls positius de transformació i, respectivament, com a control negatiu i positiu d'expressió. Això és així perquè la construcció pBXR és la resultant d'insertar el cDNA de la BPRNAasa entre les dianes *Msc*I i *Sal*I. El resultat de tenir aquest cDNA en fase amb la seqüència codificant pel pèptid líder pelB és l'expressió de la BPRNAasa a l'espai periplàsmic (del Cardayré i col., 1994)

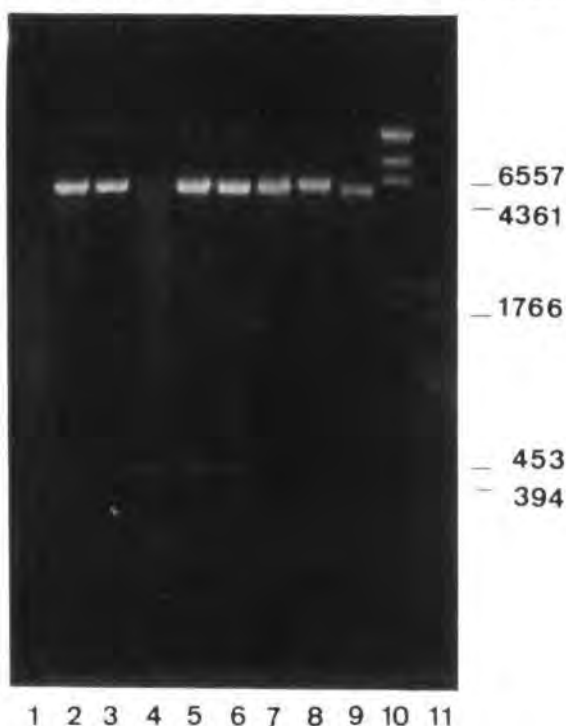


Figura III.D.2.a.2: Electroforesi en gel d'agarosa 1,2 % en amortidor TAE de les anàlisis de restricció amb *Msc*I-*Sal*I del DNA obtingut a partir de cultius de clons resistents a Amp resultants de transformar cèl.lules competents d'*E.coli* BL21(DE3) amb la barreja de lligament del fragment HPR-*Msc*I-*Sal*I obtingut a partir de la digestió del RF DNA de M13mp19.HPR(MR4) i del vector pET22b(+)-*Msc*I-*Sal*I. 1, 2, 3, 4, 5 i 6. DNA de diferents clons pET22.HPR digerit amb *Msc*I-*Sal*I; 7 i 8. DNA de dos clons pET22b(+) digerit amb *Msc*I-*Sal*I; 9. DNA d'un clon de pBXR digerit amb *Msc*I-*Sal*I; 10. Marcadors de massa molecular II (λ -*Hind*III de Boehringer Mannheim, Alemanya) (23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 i 125 pb); 11. Marcadors de massa molecular VI (pBR328-*Bgl*I-*Hinf*I de Boehringer Mannheim, Alemanya) (2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234, 220 i 154 pb).

III.D.2.b. OBTENCIÓ DEL VECTOR pET17.HPR

El vector pET17b(+) és un vector pensat per a dur a terme l'expressió citosòlica de proteïnes forànies. Comparteix en essència les mateixes característiques que el vector pET22b(+):

El vector pET17b(+) conté un origen de replicació d'*E.coli* (*ori*) i un gen de resistència a l'ampicil·lina. El vector pET17b(+) conté un promotor del tipus T7. Quan aquest vector s'utilitza en lisògens del tipus DE3 per l'expressió de gens foranis, el repressor *lac* actua només sobre el promotor *lac* UV5 per a reprimir la transcripció de la RNA polimerasa de T7.

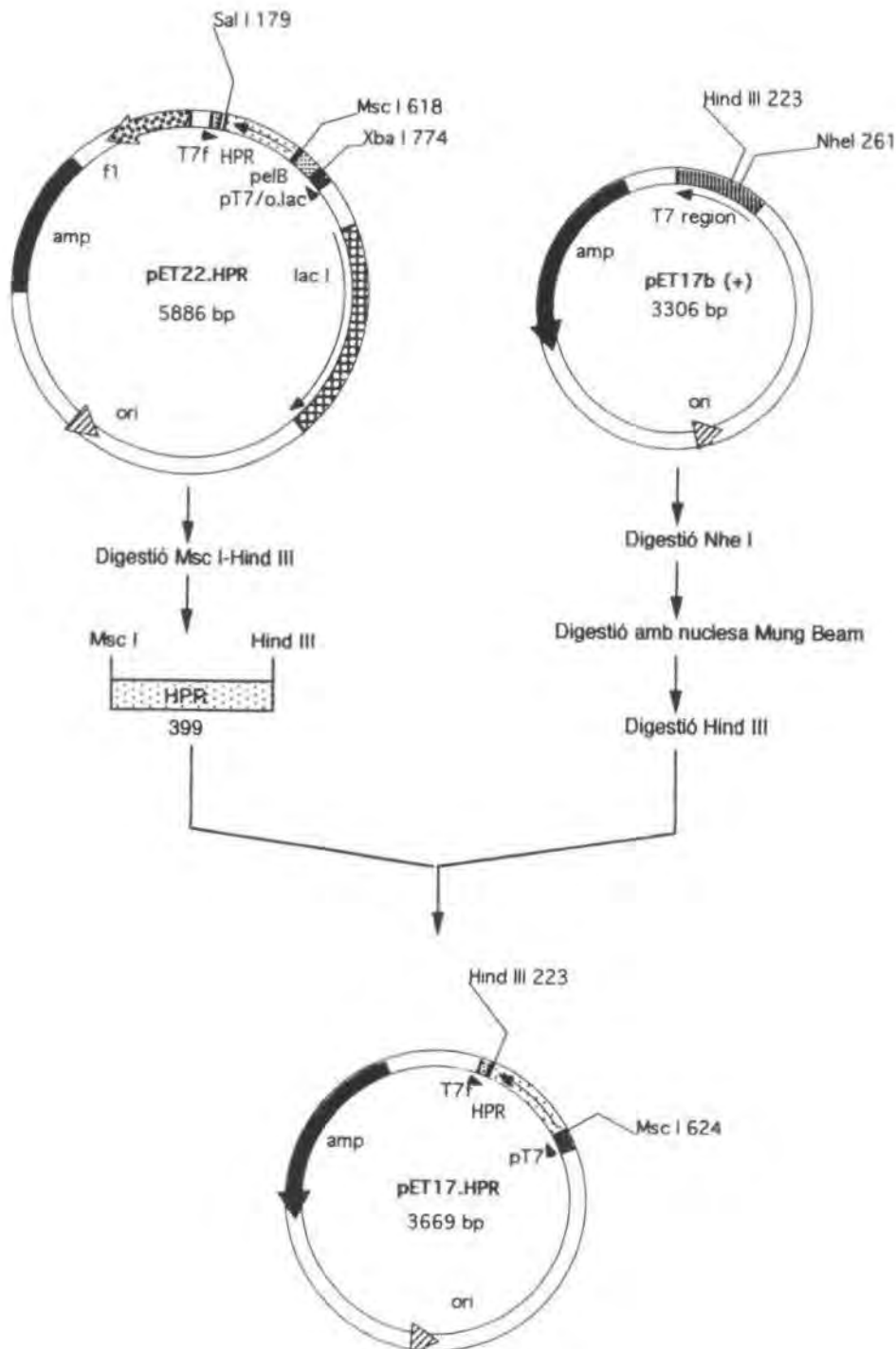
Es poden inserir els gens foranis a través de les dianes *Nde* I i *Nhe* I produint-se la proteïna per la qual codifiquen amb una Met addicional en l'extrem N-terminal. El vector també comprèn un terminador propi de la RNA polimerasa de T7 necessari per impossibilitar la transcripció de tot el vector. Les dianes de restricció que hi ha en aquest vector per a dur a terme la fusió de l'extrem 3' del gen, no inclouen la diana *Sal* I que és la que posseïa el gen HPR.

L'estrategia de clonatge que es va dissenyar per a l'obtenció del vector pET17.HPR s'ha representat en la figura III.D.2.b.1 i es descriu a continuació:

Obtenció del fragment *Msc* I-*Hind* III: com ja s'ha comentat en la descripció del vector pET17b(+), aquest no disposa en la seva regió de clonatge múltiple d'una diana *Sal* I, que és la que posseeix el gen HPR. Tanmateix la construcció pET22.HPR, que va ésser la utilitzada per a l'obtenció del fragment *Msc* I-*Hind* III, disposa de la diana *Hind* III (just després de la diana *Sal* I) la qual sí que es troba en la regió de clonatge múltiple del vector pET17b(+). Es va realitzar un cultiu de 20 ml d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR] del qual se'n féu una extracció de DNA plasmídic pel sistema de lisi alcalina. Part d'aquest DNA es va sotmetre a digestió amb els enzims *Msc* I i *Hind* III i el fragment de 399 pb corresponent al gen es va purificar per electroforesi en gel d'agarosa.

Obtenció del vector pET17 per al clonatge del fragment *Msc* I-*Hind* III: a partir d'un cultiu de 20 ml d'*E.coli* XL1-Blue-[pET17b(+)] en LB + Amp se'n va fer una extracció de DNA plasmídic i aquest es va sotmetre a digestió amb *Nhe* I. Per tal de generar extrems llisos i permetre el lligament amb l'extrem, també llis, generat per *Msc* I en el fragment *Msc* I-*Hind* III que es volia clonar, el vector pET17 linealitzat amb *Nhe* I, es va purificar per electroforesi en gel d'agarosa i es va tractar amb nucleasa Mung Bean. Posteriorment es va digerir amb *Hind* III resultant així una molècula de vector amb un extrem llis i un altre *Hind* III que possibilitava el clonatge direccional del fragment *Msc* I-*Hind* III obtingut a partir de la construcció pET22.HPR i que contenia el gen HPR.

Lligament: es va realitzar el lligament direccional entre el fragment *Msc I-Hind III* obtingut a partir de la construcció pET22.HPR i el vector pET17 digerit amb *Nhe I*, *Mung Bean* i *Hind III*. La barreja de lligament s'utilitzà per a transformar cèl·lules competents d'*E.coli* XL1-Blue i es va sembrar en plaques LB + Ap. De les colònies resistents a Amp que s'obtingueren se'n cultivaren diverses en medi líquid. D'aquests cultius líquids se'n guardaren 0,5 ml en forma de glicerinat (20% final de glicerol) i la resta va servir per a dur a terme una mini-preparació de DNA plasmídic i la posterior anàlisi per restricció (figura III.D.2.b.2). Aquesta anàlisi mostrà que tots els clons assajats eren portadors del fragment que s'havia volgut clonar i que per tant s'havia obtingut la construcció pET17.HPR.



b)

```

                                promotor T7
AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCC
                                rbs
TCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT  ATG GCT AAG GAA
                                                Met Ala Lys Glu

XhoI
TCT CGA GCT AAA AAA TTT CAA AGA CAA CAT ATG GAT TCT GAT TCT
Ser Arg Ala Lys Lys Phe Gln Arg Gln His Met Asp Ser Asp Ser
                                HPRNAasa
                                NarI
TCT CCT TCT TCT TCT TCT ACT TAC TGT AAT CAA ATG ATG AGG CGC
Ser Pro Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Cys Asn Gln Met Met Arg Arg

CGA AAT ATG ACT CAA GGT AGA TGT AAA CCT GTT AAT ACT TTT GTT
Arg Asn Met Thr Gln Gly Arg Cys Lys Pro Val Asn Thr Phe Val

                                AatII
CAT GAA CCT TTG GTT GAC GTC CAA AAT GTC TGT TTT CAA GAA AAA
His Glu Pro Leu Val Asp Val Gln Asn Val Cys Phe Gln Glu Lys
                                HPRNAasa

GTT ACT TGT AAA AAT GGT CAA GGT AAT TGT TAC AAA TCT AAT TCT
Val Thr Cys Lys Asn Gly Gln Gly Asn Cys Tyr Lys Ser Asn Ser

SphI
AGC ATG CAT ATT ACT GAT TGT AGA CTG ACT AAT GGT TCT AGA TAC
Ser Met His Ile Thr Asp Cys Arg Leu Thr Asn Gly Ser Arg Tyr

CCT AAT TGT GCT TAC AGA ACT TCT CCT AAA GAA AGA CAC ATT ATT
Pro Asn Cys Ala Tyr Arg Thr Ser Pro Lys Glu Arg His Ile Ile
                                HPRNAasa
                                NheI
GTT GCT TGT GAA GGT TCT CCT TAC GTT CCT GTT CAT TTT GAT GCT
Val Ala Cys Glu Gly Ser Pro Tyr Val Pro Val His Phe Asp Ala

AGC GTT GAA GAT TCT TAAG
Ser Val Glu Asp Ser Stop

```

Figura III.D.2.b.1: (a) Construcció del vector pET17.HPR. (b) Detall de la regió corresponent a la unió del vector i el gen HPR en la construcció pET17.HPR.

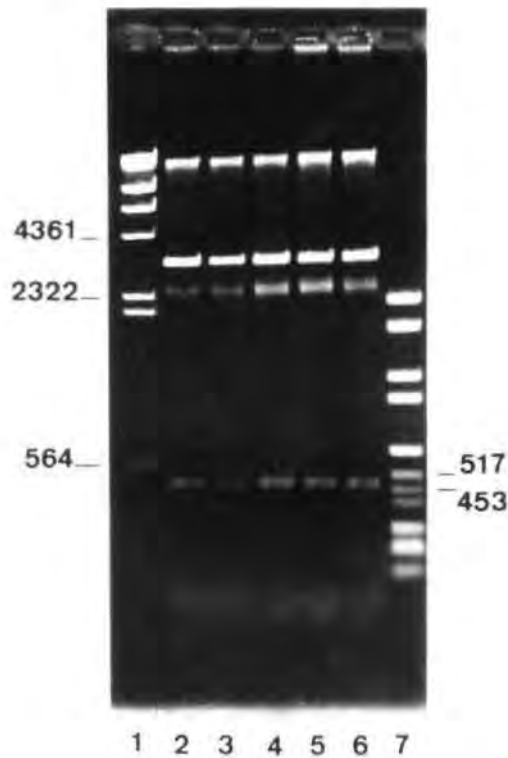


Figura III.D.2.b.2: Electroforesi en gel d'agarosa 1,2 % en amortidor TAE de les anàlisis de restricció amb *Xho* I del DNA obtingut a partir de cultius de clons resistents a Amp resultants de transformar cèl.lules competents d'*E.coli* XL1-Blue amb la barreja de lligament del fragment HPR-*Msc* I-*Hind* III obtingut a partir de la digestió de DNA de pET22.HPR i del vector pET17b(+)-*Nhe* I-Mung Bean-*Hind* III. 1. Marcadors de massa molecular II (λ -*Hind* III de Boehringer Mannheim, Alemanya) (23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 i 125 pb); 2, 3, 4, 5 i 6. DNA de diferents clons pET17.HPR digerit amb *Xho* I; 7. Marcadors de massa molecular VI (pBR328-*Bgl* I-*Hinf* I de Boehringer Mannheim, Alemanya) (2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234, 220 i 154 pb). La digestió amb *Xho* I es va escollir perquè produïa un tall en el vector i un altre proper a l'extrem 5' del gen HPR però dins del mateix gen alliberant un fragment d'una mida aproximada a la del gen.

III.D.2.c. COMPROVACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE reHPR.B EN CÈL.LULES *E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR] I *E.coli* BL21(DE3)-[pET17.HPR]

El vector pET22.HPR posseïa el gen HPR insertat en el vector pET22b(+) situat, en marc de lectura i orientació correctes, darrera la seqüència codificant pel pèptid senyal pel B sense que interposés entre ambdues cap seqüència addicional (figura III.D.2.a.1). Era possible doncs intentar l'expressió de la HPRNAasa recombinant a partir de pET22.HPR, expressió que havia de produir una HPRNAasa madura i completa.

Com a primer pas per a determinar l'expressió de HPRNAasa recombinant, es va dur a terme un assaig d'activitat del cultiu en placa (apartat II.E.2.c.(2)). Amb aquesta finalitat 1 µl d'un cultiu de nit es va dipositar en una placa de LB-1,5% agar (p/v), Amp 50 µg/ml, RNA 2 mg/ml i IPTG 1 mM. Es varen assajar diferents clons *E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR] i paral·lelament es varen sembrar els controls negatiu, *E.coli* BL21(DE3)-[pET22b(+)], i positiu *E.coli* BL21(DE3)-[pBXR]. Els resultats d'aquest assaig es presenten en la figura III.D.2.c.1. Es pot observar que tant el control negatiu com el control positiu varen donar els resultats esperats. Pel que fa referència als clons d'interès, pET22.HPR, es va comprovar que presentaven activitat i que per tant la HPRNAasa s'estava expressant. Tanmateix però, una altra vegada s'observaven diferències significatives entre els nivells d'expressió de reHPR.B i els nivells d'expressió de reBPR.B.

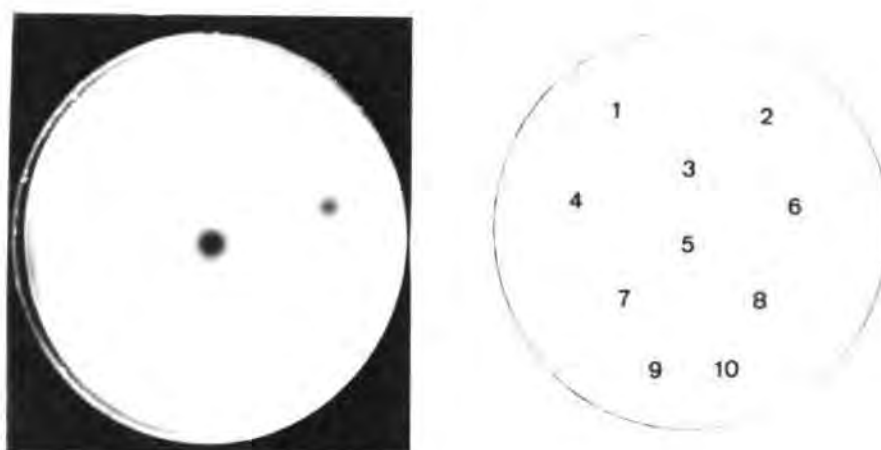


Figura III.D.2.c.1: Assaig d'activitat en placa per a la detecció de l'expressió d'activitat ribonucleasa. Després de la transformació i de la selecció de transformants per resistència a Ap, 1 µl dels cultius d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR], *E.coli* BL21(DE3)-[pET22b(+)] i *E.coli* BL21(DE3)-[pBXR] es diposita sobre la placa de LB-1,5% agar (p/v), Amp 50 µg/ml, RNA 2 mg/ml i IPTG 1 mM. Les plaques s'incubaren durant 8 hores a 37°C. Les colònies es rentaren amb aigua destil·lada i el RNA no digerit es precipità amb una solució diluïda d'àcid perclòric al 10%. Les colònies que estan expressant una proteïna amb activitat RNAasa donen lloc a zones clares produïdes per la digestió, enmig de la terbolesa provocada pel RNA precipitat. (I) Placa després de precipitar el RNA no digerit amb àcid perclòric. 1, 2, 3: *E.coli* BL21(DE3)-[pET22b(+)]; 4, 5 i 6: *E.coli* BL21(DE3)-[pBXR]; 7, 8, 9 i 10: *E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR]

El vector pET17.HPR posseïa el gen HPR insertat en pET17b(+) situat en marc de lectura i orientació correctes, de manera que era possible intentar l'expressió de la HPRNAasa a partir de pET17.HPR. Aquesta expressió havia de produir una HPRNAasa amb una Met i una Ala addicionals en l'extrem N-terminal (Met-Ala-reHPR.B) (figura III.D.2.b.1). Era interessant efectuar aquest intent

per saber si valia la pena de seguir treballant amb el vector pET17.HPR. Com a control negatiu de l'expressió es va utilitzar el vector pET17b(+).

L'expressió en cultius d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET17.HPR], es va seguir mitjançant anàlisi electroforètica en gel revelat per activitat (figura III.D.2.c.2). En aquest cas no era possible dur a terme l'assaig d'activitat en placa dels cultius perquè aquest sistema no estava pensat per a exportar la proteïna recombinant. L'anàlisi en zimograma permeté veure que el control negatiu havia funcionat bé i el que era més important, es detectava activitat RNAasa en els diferents clons pET17.HPR. Les bandes d'activitat no eren massa clares, fet que podia molt bé ser degut a que l'expressió en el sistema pET17, per ser citosòlica, implicava un plegament incorrecte de la cadena polipeptídica o una conformació no definida. El plegament correcte s'assoliria durant els diferents rentats que s'efectuen en el revelat del gel i això permetria la detecció d'activitat. Si bé l'activitat observada demostrava que la construcció pET17.HPR era capaç de produir HPRNAasa no donava una idea clara de la producció real

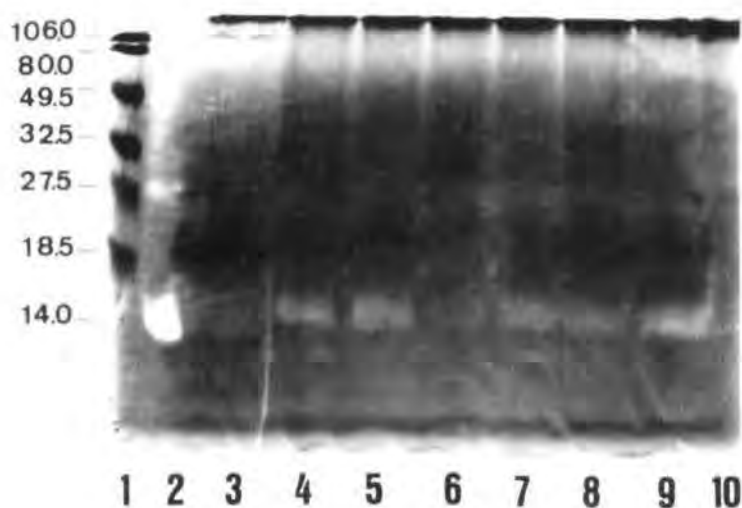


Figura III.D.2.c.2: Anàlisi electroforètica en gel de poli(acrilamida)-SDS amb poli(C) revelat per activitat de cultius d' *E.coli* BL21(DE3)-[pET17.HPR]. 0,5 ml d'un cultiu de nit de diferents clons d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET17.HPR] es varen centrifugar a 12.000 xg i el sediment cel.lular es va resuspendre en 100 µl d'amortidor d'aplicació de mostres. Un cop resuspeses, les mostres es varen bullir durant 10 min i s'aplicaren (20µl) al gel d'activitat. El gel es va revelar com s'ha descrit en l'apartat II.E.2.c.(3). **1.** Marcadors de massa molecular pretenyits [fosforilasa b (106.000 Da), albúmina sèrica bovina (80.000 Da), ovoalbúmina (49.500 Da), anhidrasa carbònica (32.500 Da), inhibidor de tripsina (27.500 Da) i lisozim (18.500 Da)] de Bio-Rad (E.E.U.U.); **2.** RNAasa A; **3.** *E.coli* BL21(DE3)-[pET17b(+)]; **4-10.** Diferents clons *E.coli* BL21(DE3)-[pET17.HPR]

III.D.3. Expressió de la reHPR.B en cèl.lules d'*E.coli* BL21(DE3) transformades amb pET22.HPR

El vector pET22.HPR, tal i com s'ha obtingut en l'apartat III.D.2.a, constituïa una construcció definitiva perquè el codó que codifica pel primer aminoàcid de la HPRNAasa (Lys-1), segueix directament al codó que codifica pel darrer aminoàcid del pèptid senyal pelB. És després d'aquest aminoàcid que es produeix el tall per una proteasa d'*E.coli* un cop el pèptid senyal ha completat la seva funció d'exportar la proteïna a l'espai periplàsmic (veure figura III.D.2.a.1). Per tant era d'esperar que l'expressió del gen HPR en pET22.HPR produís una ribonucleasa recombinant sense aminoàcids addicionals (reHPR.B).

Un cop aconseguit el vector pET22.HPR es va procedir a l'expressió de HPRNAasa a partir de la soca d'*E.coli* BL21(DE3). Pel fet de ser aquesta una soca amb unes característiques poc comunes degut a la presència del fag DE3 integrat en el genoma, i no disposar d'altres soques lisogèniques, no es va assajar l'expressió en cap altra soca. L'anàlisi efectuat sobre diferents clons no va mostrar diferències de producció de reHPR.B.

En les proves d'expressió efectuades s'ha pogut utilitzar com a control positiu de l'expressió la construcció pBXR, resultant del clonatge de la seqüència del cDNA de la BPRNAasa darrera la seqüència codificant pel pèptid líder pelB, per gentilesa de S.B. del Cardayré i en R.T. Raines de la Universitat de Madison.

III.D.3.a. CONDICIONS GENERALS D'EXPRESSIÓ

En aquest apartat s'exposen de manera breu les condicions generals emprades en els diferents experiments d'expressió de HPRNAasa que s'han dut a terme per tal d'estudiar diversos aspectes de la producció.

Tots els experiments d'expressió de HPRNAasa es varen realitzar en medi TB suplementat amb glucosa o glicerol (0,1-2%) i 50 µg/ml d'ampicil.lina. En les diferents proves d'expressió de la HPRNAasa recombinant en procariota es va partir d'un cultiu de nit de 2-3 ml d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR] en TB + Amp (400 µg/ml) que es va incubar en agitació constant a 37°C. L'endemà, alíquotes d'entre 3 a 10 ml de medi TB fresc s'inocularen 1/100 a partir del cultiu de nit. Posteriorment aquests cultius s'induiren amb IPTG a una concentració 0,05-1 mM. La incubació d'aquests cultius es realitzà a 37°C i agitació constant. A temps variables després de la inducció els cultius es centrifugaren per analitzar la producció de HPRNAasa.

L'anàlisi de la producció de la reHPRNAasa es va dur a terme mitjançant zimograma, és a dir: electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS amb poli(C) i revelat per activitat. Aquesta anàlisi permetia detectar la presència d'activitat RNAasa i alhora determinar la mobilitat electroforètica de la banda responsable de l'activitat. Es va escollir aquest sistema d'anàlisi perquè es va pensar, en primer lloc, que l'existència de les endoribonucleases extracel·lulars, RNAasa I (Meador i col., 1990) i RNAasa M (Cannistraro i Kennell, 1989), ribonucleases que són pròpies d'*E.coli*, podia interferir en les anàlisis espectrofotomètriques d'activitat que es volien dur a terme. La determinació en gels d'activitat permet distingir quin aport existeix a l'activitat enzimàtica total quan aquesta pot tenir diverses fonts amb masses moleculars diferents. Això és el que succeeix en aquest cas ja que ambdues endoribonucleases d'*E.coli* tenen una massa molecular d'aproximadament 27.000 Da, que es pot distingir perfectament en un gel, dels aproximadament 14.000 Da que té la HPRNAasa.

D'altra banda, aquest sistema d'anàlisi permet comparar qualitativament les mostres que han estat assajades en els mateixos gels, perquè ho hauran estat en front de la mateixa concentració de substrat i durant els mateixos temps d'incubació i digestió. Això és vàlid sempre i quan el creixement dels cultius, o el que és el mateix la proteïna total, sigui el mateix. Certament no es pot utilitzar com a sistema quantitatiu de determinació de l'activitat, però sí que permet de visualitzar si existeixen diferències realment significatives entre dues condicions diferents a les quals es pogués sotmetre la producció de HPRNAasa.

III.D.3.b. LOCALITZACIÓ DE LA reHPR.B

Per a la realització d'una primera anàlisi de l'expressió de HPRNAasa recombinant a partir de pET22.HPR es va posar un cultiu de nit de TB +Amp d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR]. L'endemà s'inocularen 5 ml de medi TB fresc amb 0,1 ml dels cultius de nit. A les 6 hores el cultiu es va induir amb IPTG a una concentració final de 0,4 mM. Com a controls es varen fer créixer paral·lelament, cultius d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR] i d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET22b(+)]. Després de 24 hores d'incubació a 37 °C es varen centrifugar els cultius i s'obtingueren les fraccions extracel·lular, periplàsmica i citoplasmàtica segons s'ha descrit en l'apartat II.D.4.

La presència de HPRNAasa recombinant es va analitzar en les diferents fraccions electroforèticament en gels revelats per activitat o zimogrames. El resultat fou que l'activitat ribonucleasa es localitzava repartida entre la fracció periplàsmica i la fracció citoplasmàtica. No es va detectar activitat en la fracció corresponent al sobrenedant o medi extracel·lular.

Això féu que en els assajos que es varen dur a terme posteriorment, el tractament de les mostres fos el següent: es va partir de 0,5 ml de cultiu; les cèl·lules es recolliren per centrifugació, es

resuspengueren en amortidor d'aplicació de mostres (100 μ l) i es bulliren abans d'ésser aplicades a l'electroforesi. D'aquesta manera s'evitava haver d'analitzar en cada prova i per a cada condició d'assaig dues fraccions: la corresponent a l'espai periplàsmic o fracció soluble i la corresponent a la fracció citosòlica o insoluble.

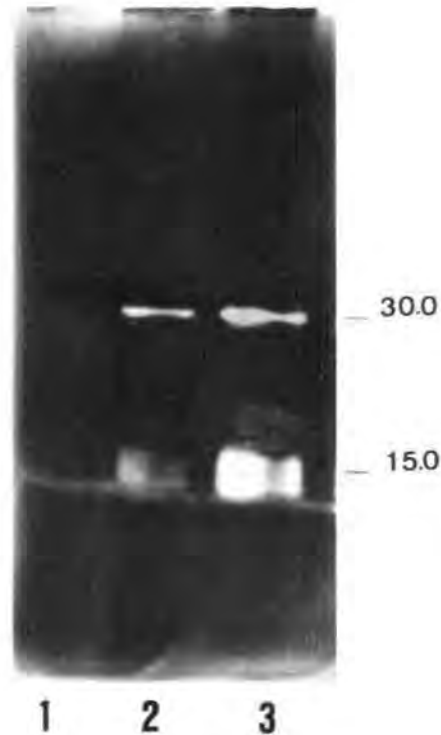


Figura III.D.3.b: Anàlisi electroforètica en gels de poliacrilamida-SDS amb poli(C) revelat per activitat de les diferents fraccions cel·lulars: **1.** Sobrenedant; **2.** Espai periplàsmic; **3.** Fracció insoluble.

El plasmidi pET22.HPR està dissenyat de tal manera que la HPRNAasa produïda sigui exportada a l'espai periplàsmic com a proteïna soluble. Tanmateix com demostren les anàlisis realitzades de les diferents fraccions cel·lulars, la HPRNAasa recombinant produïda no és totalment recuperada amb el xoc osmòtic sinó que es presenta també en la fracció insoluble.

La menor mobilitat electroforètica observada de la reHPR.B respecte la mobilitat electroforètica de la BPRNAasa podria fer pensar en una manca de processament del pèptid senyal, encara que aquest resultat també es podria explicar pel fet que el grau de plegament de la proteïna podria afectar la seva mobilitat electroforètica, com s'ha vist en la producció d'altres proteïnes recombinants i mutants d'aquestes. Una altra dada que contrasta amb la possibilitat que la proteïna no hagi estat processada és el fet que l'anàlisi de l'extrem N-terminal de la proteïna purificada que es va dur a terme posteriorment (apartat III.D.5), establí que el N-terminal coincidia amb el de la reHPR.B madura i per tant processada.

Era doncs com a mínim intrigant i incert el fet que la reHPR.B produïda es trobés en la fracció insoluble i fos alhora la forma madura. Inicialment hom podria pensar que la proteïna formés cossos d'inclusió la formació dels quals, es creu que resulta de la traducció en poliribosomes i s'accentua per nivells de transcripció elevats i insolubilitat de la proteïna. Els cossos d'inclusió però, s'haurien de formar en el citoplasma. La proteasa encarregada de processar el pèptid senyal és però, una proteïna integral de membrana que hom creu que duu a terme el processament de les seqüències senyal en la cara periplàsmica de la membrana interna (Phillips i col., 1990). Aquestes premisses suggereixen que o bé la reHPRNAasa forma cossos d'inclusió en el periplasma o bé es manté d'alguna manera unida a la membrana després de l'alliberament del pèptid senyal per la peptidasa senyal. Atesos els nivells de producció detectats per la reHPR.B, significativament menors als detectats per la reBPR.B a partir del vector pBXR, i la seva basicitat la segona possibilitat esdevé més plausible.

III.D.3.c. BREU ESTUDI PER A L'OPTIMITZACIÓ DE LA PRODUCCIÓ DE reHPR.B

Un cop comprovada l'expressió de reHPR.B en cèl.lules d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR] i establerta la seva ubicació en la fracció cel.lular corresponent, es va procedir a fer un breu estudi de les condicions que podien afectar la producció de cara a intentar optimitzar-la. En tots els casos es va analitzar l'activitat ribonucleasa en gels de poliacrilamida-SDS amb poli(C) revelats per activitat. El tractament de les mostres fou com s'ha descrit en l'apartat anterior, el següent: es va partir de 0,5 ml de cultiu; les cèl.lules es recolliren per centrifugació, es varen resuspendre en amortidor d'aplicació de mostres (100 µl) i es bulliren abans d'ésser aplicades a l'electroforesi. Les condicions de cultiu han estat descrites en l'apartat III.D.3.a.

Aquest estudi de l'expressió de reHPR.B es va dur a terme analitzant alguns aspectes o factors que poden afectar-ne la producció com ara la font de carboni utilitzada, la temperatura de cultiu, el temps d'inducció i la concentració de l'inductor (IPTG) i la corba de producció i creixement.

Font de carboni

Es va estudiar l'efecte en la producció de reHPR.B d'un clon d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR] segons si la font de carboni era glicerol o glucosa a concentracions entre 0,1 i 2% (p/v). Els cultius es varen induir amb 0,4 mM IPTG al cap de 6 hores d'establir l'inòcul. Els resultats de l'anàlisi electroforètica es presenten en la figura III.D.3.c.1. Aquests resultats no es consideren massa rellevants perquè el medi utilitzat no era un medi mínim en el qual la influència de la font de carboni i la seva concentració pot ser més influent. Tanmateix se'n desprèn que l'ús de glucosa a concentracions superiors a 1% disminueix significativament la producció de HPRNAasa recombinant. La resta de concentracions de qualsevol de totes dues fonts de carboni varen donar resultats similars. Les D.O.₅₅₀ finals dels cultius oscil.laren entre 4,10 i 4,85 a excepció del cultiu

crescut amb 2% de glucosa. Atès que no es varen observar diferències significatives es va decidir utilitzar, en experiments posteriors, la concentració de 0,4% glicerol que és la recomanada pels autors que varen desenvolupar el sistema de la T7 (Studier i col., 1990).



Figura III.D.3.c.1: Anàlisi electroforètica en gel de poliacrilamida-SDS amb poli(C) revelat per activitat de cultius d' *E. coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR] crescuts amb fonts de carboni i concentracions diferents. 0,5 ml dels cultius de nit d'un clon d'*E. coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR] que es va fer créixer sota concentracions variables de glucosa i glicerol, es varen centrifugar a 12.000 xg i el sediment cel·lular es va resuspendre en 100 µl d'amortidor d'aplicació de mostres. Un cop resuspeses, les mostres es varen bullir durant 10 min i s'aplicaren (20µl) al gel d'activitat. El gel es va revelar com s'ha descrit en l'apartat II.E.2.c.(3). 1. Glicerol 0,1%; 2. Glicerol 0,2%; 3. Glicerol 0,4%; 4. Glicerol 1%; 5. Glicerol 2%; 6. Glucosa 0,1%; 7. Glucosa 0,2%; 8. Glucosa 0,4%; 9. Glucosa 1%; 10. Glucosa 2%.

Inducció

Cultius del mateix clon d'*E. coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR] es varen induir a diferents temps (0 a 10 hores després d'iniciar el cultiu) i utilitzant diverses concentracions de l'inductor gratuït IPTG (0,05 a 1 mM). Els resultats de l'anàlisi electroforètica es presenten en la figura III.D.3.c.2

Els resultats s'han agrupat segons el moment en el qual es va produir la inducció (0, 2, 4, 6, 8 i 10 hores després que s'iniciés el cultiu) i en cada grup s'ha analitzat una concentració d'inductor diferent (0,05, 0,1, 0,5 i 1 mM IPTG). Segons es desprèn dels resultats dels zimogrames hi ha dos efectes clars que caldria remarcar. En primer lloc que a temps curts d'inducció és important la concentració final de l'inductor perquè la presència d'activitat clara es detecta a partir de concentracions superiors a 0,5 mM IPTG. També s'observa en aquests temps (0-4 hores) que la producció és irregular, probablement degut al fet que en el moment d'induir la densitat del cultiu és

massa baixa, tot i que la D.O.₅₅₀ final divergis molt poc entre tots els cultius (3,32 a 4,76). El segon fet a destacar és que la producció màxima s'assoleix quan els cultius s'indueixen a partir de les 6 hores del seu establiment. També sembla ser que a partir d'aquests temps d'inducció no hi hagi un efecte significatiu en la producció de reHPR.B malgrat varïi la concentració d'inductor.

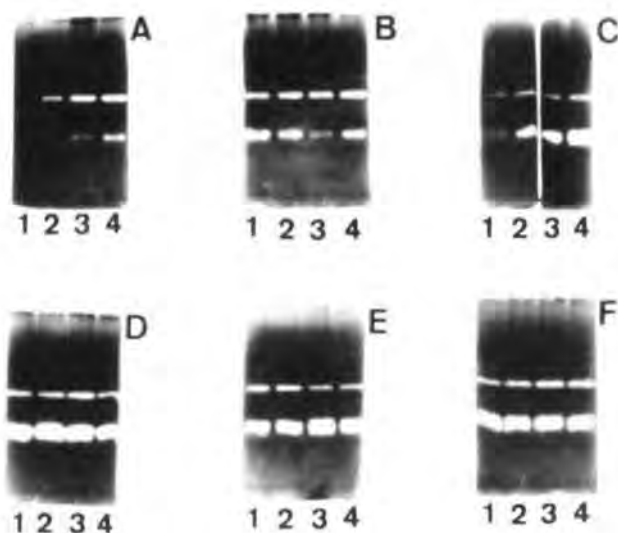


Figura III.D.3.c.2: Anàlisi electroforètica en gel de poliacrilamida-SDS amb poli(C) revelat per activitat de cultius d' *E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR] induïts a diferents temps i amb diferents concentracions d'inductor. 0,5 ml de cultius induïts a diferents temps després d'establir l'inòcul (0 a 10 hores) i amb diferents concentracions (0,05 a 1 mM) de IPTG d'un clon d' *E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR], es varen recollir l'endemà, es varen centrifugar a 12.000 xg i el sediment cel.lular es va resuspendre en 100 µl d'amortidor d'aplicació de mostres. Un cop resuspeses, les mostres es varen bullir durant 10 min i s'aplicaren (20µl) al gel d'activitat. El gel es va revelar com s'ha descrit en l'apartat II.E.2.c.(3). **A, B, C, D, E i F** representen les mostres dels grups de cultius induïts a les 0, 2, 4, 6, 8 i 10 hores d'establir el cultiu. Els carrers **1, 2, 3 i 4** corresponen a les concentracions d'inductor emprades: 0,05, 0,1, 0,5 i 1 mM IPTG.

Davant d'aquests resultats es va decidir que en experiments posteriors s'induirien els cultius d' *E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR] amb una concentració 0,5-1 mM IPTG atès que són les concentracions que donen una producció màxima de reHPR.B i que la inducció es duria a terme entre les 4 i les 6 hores després de l'establiment del cultiu ja que és a partir d'aquest temps que l'efecte de la inducció sembla ser regular.

Temperatura

Per a avaluar l'efecte de la temperatura es varen establir cultius del mateix clon d' *E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR] a diferents temperatures (25, 30, 37 i 42°C). Al cap de 4 hores es varen induir els cultius amb 0,5 mM IPTG. Es va assajar la producció de reHPR.B per electroforesi en gel de

poliacrilamida-SDS amb poli(C) revelat per activitat, els resultats de la qual es mostren en la figura III.D.3.c.3:

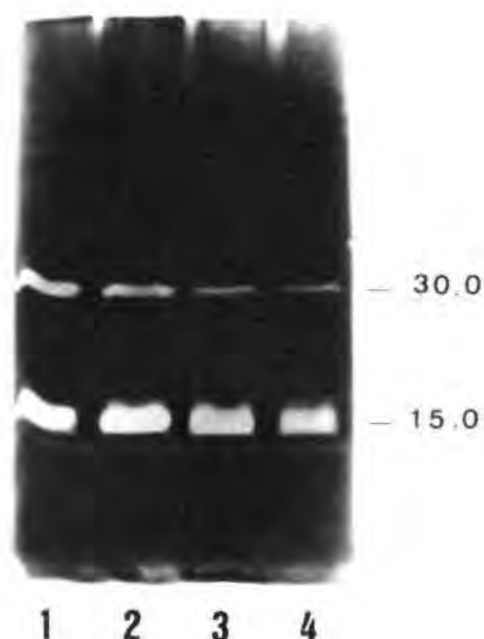


Figura III.D.3.c.3: Anàlisi electroforètica en gel de poliacrilamida-SDS amb poli(C) revelat per activitat de cultius d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR] crescuts a diferents temperatures. 0,5 ml de cultius d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR] crescuts a 25, 30, 37 i 42°C i induïts amb 0,5 mM IPTG a les 4 hores d'establir-se el cultiu, es varen centrifugar a 12.000 xg i el sediment cel·lular es va resuspendre en 100 µl d'amortidor d'aplicació de mostres. Un cop resuspeses, les mostres es varen bullir durant 10 min i s'aplicaren (20µl) al gel d'activitat. El gel es va revelar com s'ha descrit en l'apartat II.E.2.c.(3). 1. Mostra del cultiu crescut a 25°C; 2. Mostra del cultiu crescut a 30°C; 3. Mostra del cultiu crescut a 37°C; 4. Mostra del cultiu crescut a 42°C.

Temperatura de cultiu	DO ₅₅₀ final dels cultius
25°C	2,48-2,56
30°C	5,48-6,48
37°C	5,47-6,47
42°C	4,62-5,22

Taula III.D.3.c.1: Determinació de les densitats òptiques a 550 nm dels cultius crescuts a diferents temperatures

Segons es desprèn del zimograma no hi ha diferències significatives en quant a producció d'activitat RNAasa entre els cultius crescuts a diferents temperatures. Les úniques diferències es varen observar a nivell de creixement (taula III.D.3.c.1). Es va veure que el major creixement es

produïa tant a 30 com a 37°C, amb poca diferència respecte el creixement observat a 42°C però amb una gran diferència respecte al que s'observava a 25°C.

D'aquests resultats es va decidir que en posteriors experiments d'expressió els cultius es creixerien a 25°C perquè amb un menor creixement s'aconseguia la mateixa producció d'activitat HPRNAasa recombinant que a 37°C, la qual cosa implicava una major proporció de la proteïna recombinant en els cultius crescuts a 25°C. De fet diferents autors han provat que el creixement a temperatures menors als 37°C pot afavorir la secreció de proteïnes forànies degut a què s'afavoreix una demanda menor de factors que participen en la secreció i/o s'incrementi la solubilitat de la proteïna heteròloga (Olins i Lee, 1993). En aquest treball s'havia observat alhora de comprovar l'expressió de reHPR.B (apartat III.D.2.c i figura III.D.2.c.1), que la producció d'aquesta a partir de clons d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR], era sensiblement menor a l'observada de reBPR.B a partir de clons d'*E.coli* BL21(DE3)-[pBXR]. Si una de les causes podia ser una major dificultat en ésser secretada, el creixement a una temperatura menor als 37°C podia compensar en cert grau aquesta diferència.

Corba de creixement d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR]

Es va obtenir la corba de creixement d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR] seguint l'absorbància a 550 nm d'un cultiu de la soca esmentada durant 24 hores. Es prengueren mostres del cultiu a diferents temps per ésser analitzades electroforèticament i avaluar-ne la producció de reHPR.B. La inducció es va dur a terme a les 4 hores d'iniciar el cultiu amb una concentració final de 0,5 mM IPTG. Els resultats es presenten en la figura III.D.3.c.4.

La corba de creixement que es presenta en la figura III.D.3.c.4 mostra que el creixement cel·lular no es veu afectat per l'addició de l'inductor, com succeeix en el cas d'altres proteïnes recombinants com és el cas de la reBPR.B en el qual el creixement es veu interromput durant un cert temps. La producció de reHPR.B es detecta al cap de 30 min d'induir el cultiu i segueix el creixement cel·lular fins les quatre hores després de la inducció, dues hores abans que el cultiu assoleixi la seva fase estacionària. La quantitat d'activitat reHPR.B es manté fins les 6 hores després de l'inducció moment en el qual, el cultiu s'atura degut a què assoleix la fase estacionària. Finalment la mostra presa al cap de 24 hores indica que l'activitat ribonucleasa disminueix sensiblement, resultat del qual se'n desprèn que la reHPR.B pateix processos de degradació significatius durant temps de cultius llargs.

El fet que s'assoleixi el màxim de producció abans d'aconseguir el màxim de creixement contrasta amb el fet que s'observa producció d'activitat reHPR.B a temps curts (30 min) després de la inducció i pot estar indicant que les característiques del gen i/o de la reHPR.B estan topant amb un

factor limitant en un dels diversos nivells que intervenen en la producció de la reHPR.B, des de la transcripció del gen a l'exportació de la proteïna.

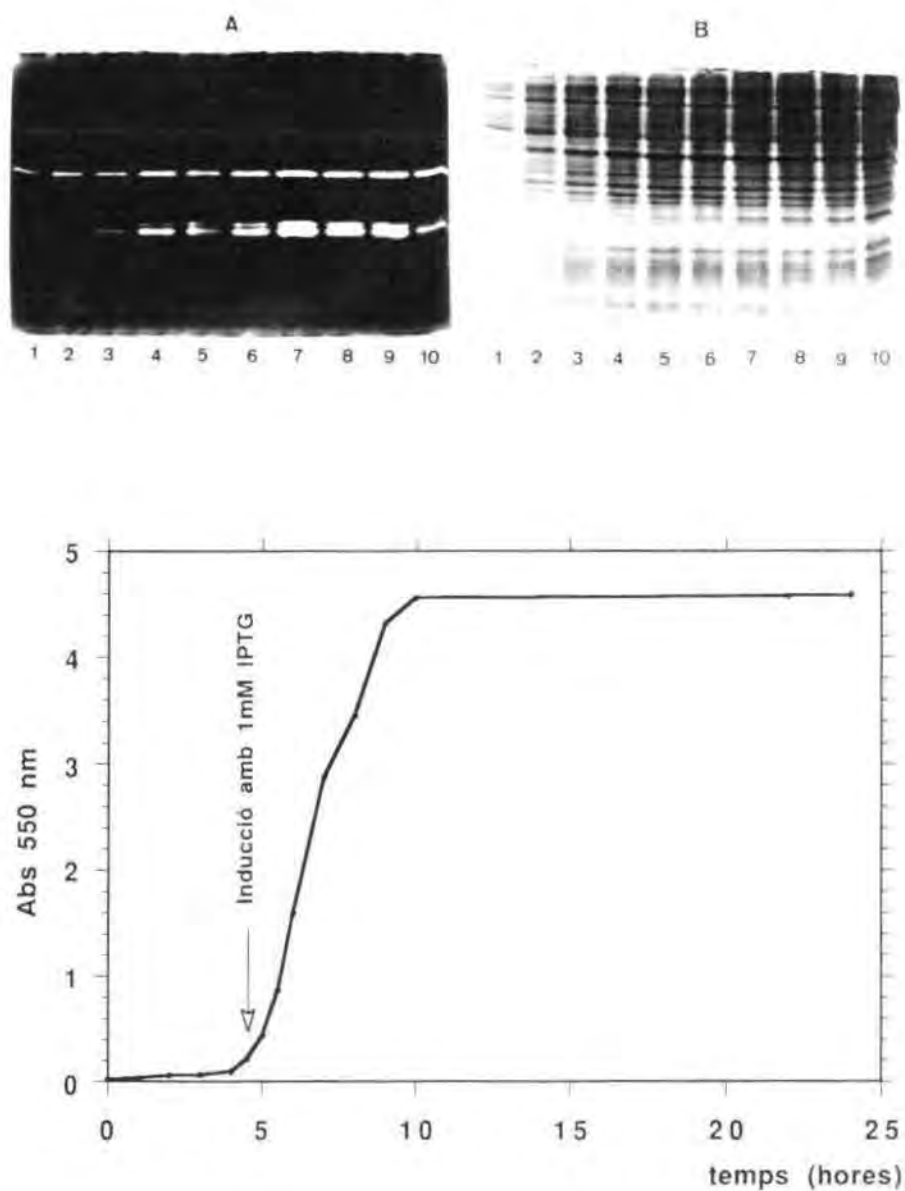


Figura III.D.3.c.4: (A) Electroforesi en gel de 15% poliacrilamida-SDS amb poli(C) revelat per activitat. Carrers 1-10: mostres corresponents a temps de 0, 30 min, 1h, 1h 30 min, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h i 24 h després del moment de la inducció. (B) Electroforesi en gel de 15% poliacrilamida-SDS tenyit amb Blau de Coomassie. Carrers 1-10: mostres corresponents a temps de 0, 30 min, 1h, 1h 30 min, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h i 24 h després del moment de la inducció. (C) Corba de creixement d'un cultiu d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR]. La soca es cultivava en medi TB suplementat amb 0,4% de glicerol i 50 µg/ml de Ap. Quatre hores després d'establir l'inòcul (1:100) es va afegir IPTG a una concentració final de 0,5 mM..

Un altre fet remarcable el constitueix la detecció de dues bandes amb activitat ribonucleasa amb una mobilitat electroforètica molt semblant a l'esperada per la reHPR.B i lleugerament menor a la corresponent a la reBPR.B. S'observa en el gel revelat per activitat (A) de la figura III.D.3.c.4 que inicialment només és present la banda amb una mobilitat més gran i es manté en major quantitat fins que s'assoleix el màxim de producció total (4 hores després de la inducció), moment en el qual ambdues bandes es troben aproximadament en la mateixa proporció. A temps de cultiu llarg (24 hores) es torna a trobar en major proporció la banda amb major mobilitat indicant que és més resistent a una suposada degradació que no pas la banda amb menor mobilitat electroforètica, o bé que existeix una conversió entre ambdues formes.

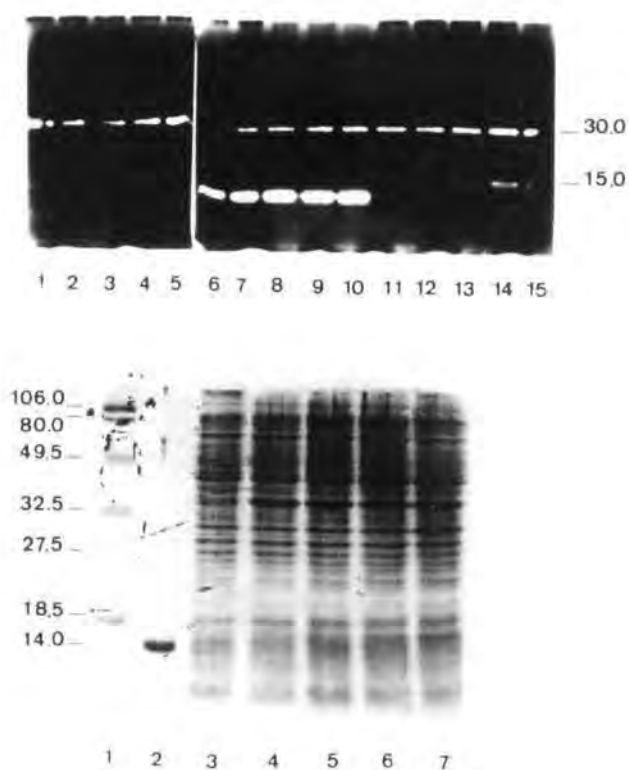


Figura III.D.3.c.5: (A). Anàlisi electroforètica en gels de poliacrilamida-SDS amb poli(C) revelats per activitat de mostres preses als 30 min, 1 hora, 2 hores, 3 hores i 4 hores després de la inducció de cultius d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET22b(+)] (carrers 1 a 5), d'*E.coli* BL21(DE3)-[pBXR] (carrers 6 a 10) i d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR] (carrers 11 a 15). **(B).** Electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS tenyit amb blau de Coomassie de mostres preses als 30 min, 1 hora, 2 hores, 3 hores i 4 hores després de la inducció de cultius d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET.HPR] (carrers 3 a 7). En els carrers 1 i 2 es varen córrer marcadors de massa molecular (Bio-Rad) i RNAasa A bovina respectivament.

L'anàlisi de la producció d'activitat ribonucleasa d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET22b(+)], d'*E.coli* BL21(DE3)-[pBXR] i d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR] es presenta en la figura III.D.3.c.5.

S'observa que en cultius d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET22b(+)], que correspondria al vector sense cap insert fusionat darrera el pèptid senyal, només es produeix l'activitat ribonucleasa corresponent a les RNAases I i M d'*E.coli*. En canvi en cultius d'*E.coli* BL21(DE3)-[pBXR], que correspondria al vector portador del cDNA de la BPRNAasa, s'observa activitat RNAasa a l'alçada esperada per la reBPR.B, activitat que es manifesta ja a temps curts (30 min) després de la inducció i que assoleix el seu màxim a les dues hores després de la inducció. Els nivells d'activitat observats en cultius de clons d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR] són sensiblement menors als observats en els clons productors de reBPR.B. L'anàlisi electroforètica de cultius d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR] permet visualitzar clarament una banda a partir de les 3 hores d'ençà de la inducció i amb una mobilitat electroforètica semblant a la de les bandes d'activitat observades en el zimograma.

Atesos doncs, els resultats obtinguts en l'estudi de la producció de reHPR.B en cultius induïts d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET.HPR], es varen fixar les següents condicions per a la producció de l'esmentada producció, les quals serien les emprades en experiments posteriors:

- Creixement dels cultius en TB + Amp emprant com a font de carboni glicerol al 0,4% de concentració final.
- Es va escollir com a temperatura de cultiu 25°C. Tot i que suposa un creixement més lent i menor, per aquest mateix motiu fa que la proteïna recombinant s'enriqueixi respecte la proteïna total. A més a més com ja s'ha comentat, ha estat descrit que temperatures de cultiu inferiors a 37°C semblen afavorir la secreció. D'aquesta manera també s'allunyen els cultius de temperatures elevades que poden arribar a posar les cèl.lules en condicions d'estrés i desencadenar una resposta "heat-shock". La consideració d'aquestes dues possibilitats està justificada pel fet que s'havien detectat uns nivells de producció de reHPR.B menors que els observat per reBPR.B.
- Inducció dels cultius entre les 4 i les 6 hores després d'iniciar el cultiu, amb una concentració final de IPTG de 0,5-1 mM.
- També es va decidir que per a inocular cultius destinats a la producció de reHPR.B no es partiria de cultius de nit, que es troben ja en la fase estacionària, sinó de cultius que es trobessin en la fase inicial del creixement logarímic. D'aquesta manera si l'inòcul previ havia estat crescut en presència d'una forta selecció (400 µg/ml de Ap), s'aconseguia que un percentatge més elevat de les cèl.lules en el moment d'ésser induïdes fossin portadores del plasmidi.

III.D.4. Purificació de la ribonucleasa de pàncreas humà recombinant expressada en *E.coli*

En aquest apartat es presenten els resultats obtinguts en el desenvolupament d'un mètode de purificació per a la reHPR.B i la Met-Ala-reHPR.B que ha permès l'aïllament i caracterització d'ambdues proteïnes recombinants. Aquest mètode es basa en una solubilització de la proteïna recombinant i dues cromatografies de bescanvi catiònic: la primera atmosfèrica i la segona en HPLC.

Les condicions del cultiu que s'han utilitzat per a l'expressió de la reHPR.B i la Met-Ala-reHPR.B i la seva posterior purificació són les que es varen establir en l'estudi per a l'optimització de la producció de reHPR.B (apartat III.D.3.c).

La ribonucleasa de pàncreas humà recombinant, s'ha aïllat a partir de cultius de cèl.lules d'*E.coli* BL21(DE3) transformades amb el vector pET22.HPR i el vector pET17.HPR que havien estat creixent en medi TB + Amp 50 µg/ml durant 6-8 hores a partir del moment de la inducció amb 1 mM IPTG tal i com s'ha descrit en l'apartat II.D.2. Així per a la producció i purificació de reHPR.B (produïda per clons d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR]) i de Met-Ala-reHPR.B (produïda per clons d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET17.HPR]) es va partir respectivament de 2 i 0,5 litres.

Per a un cultiu de medi TB 50 µg/ml Amp fresc (veure apartat II.B.3.), s'inoculà el volum desitjat de cultiu amb 1/100 d'aquest volum provinent d'un cultiu en fase de creixement exponencial (1-5 ml), en medi TB suplementat amb ampicil.lina 400µg/ml i es deixà en agitació constant a 25°C. A les 4-6 hores d'haver-se iniciat el cultiu (DO₅₅₀ entre 1 i 2) s'afegí IPTG fins aconseguir una concentració final de 1 mM a partir d'una solució 200 mM com s'ha comentat en l'apartat II.C.3.b. Aproximadament unes 15 hores després del moment de la inducció del cultiu aquest es centrifugà i es processà com s'ha descrit en l'apartat II.D.4.

La purificació s'inicià partint del sediment cel.lular el qual comprenia la fracció corresponent a l'espai periplàsmic i la fracció citosòlica. Aquesta aproximació, en el cas de la reHPR.B, és a dir el sistema de secreció, permetia recollir totes dues fraccions cel.lulars on s'havia detectat l'activitat ribonucleasa i era compatible amb la solubilització de la Met-Ala-reHPR.B produïda en el sistema d'expressió directa o citosòlica

La mostra que es va sotmetre a cromatografia de bescanvi catiònic a pressió atmosfèrica en una columna de CM-Sepharose CL-6B la constituïen els sobrenedants de dues extraccions amb amortidor de solubilització. Ambdues proteïnes recombinants Met-Ala-reHPR.B i reHPR.B presentaren el mateix comportament cromatogràfic diferenciant-se només en els valors

d'absorbància degut a què el volum de mostra del qual es va partir era diferent. Les fraccions que presentaven activitat ribonucleasa es varen determinar assajant-les en zimograma i s'han indicat amb una barra negra en el cromatograma que es presenta en la figura III.D.4.1. Es va utilitzar aquest mètode d'assaig d'activitat perquè l'anàlisi de l'activitat en placa d'agarosa-RNA o l'anàlisi espectrofotomètrica no permetien una detecció clara de quines eren les fraccions actives. La causa d'aquesta indeterminació la constituïen molt probablement la presència d'urea i de DTT tant en l'amortidor de solubilització com durant la cromatografia. La fiabilitat de la detecció de l'activitat en gel venia donada pel fet que l'electroforesi permet l'eliminació de la urea i els posteriors rentats durant el revelat faciliten la reoxidació i el plegament de l'enzim.

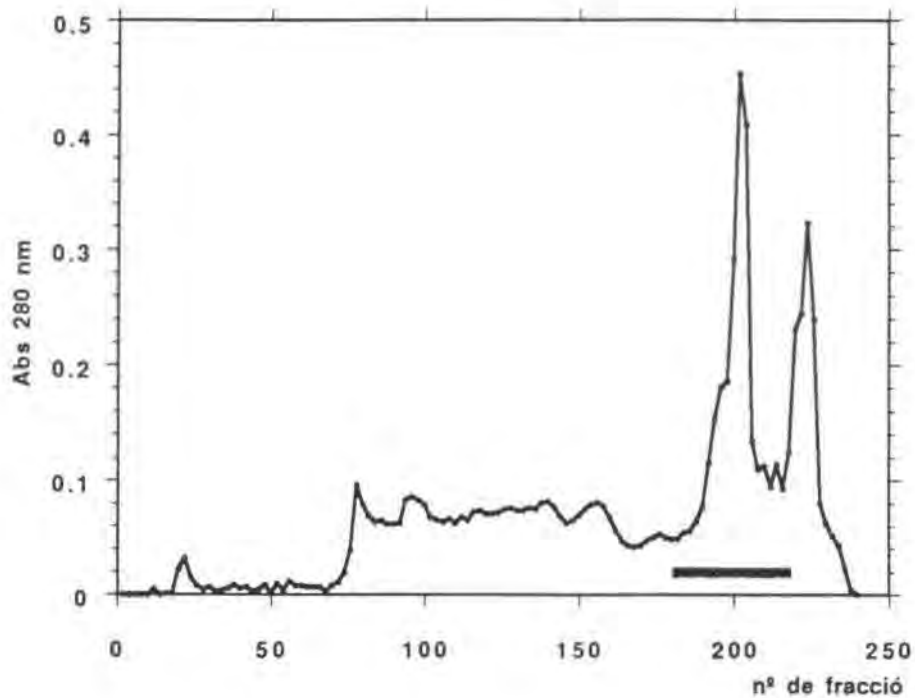


Figura III.D.4.1: Cromatografia de bescanvi catiónic en CM-Sepharose CL-6B del sobrenedant (400 ml) de les extraccions realitzades amb amortidor de solubilització del sediment d'un cultiu d'*E.coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR] establert per a la producció de la reHPR.B. La reina es va equilibrar amb l'amortidor 20 mM Tris-HCl, pH 7,8, 6 M urea, 2 mM DTT i s'aplicà un gradient de 0 a 0,5 M NaCl. Es recolliren fraccions de 5 ml. Les fraccions que presentaven activitat ribonucleasa es varen determinar assajant-les en zimograma i s'han indicat amb una barra negra sota el cromatograma. En aquest cromatograma s'ha indicat només el perfil d'elució de proteïna a 280 nm de la regió corresponent al gradient.

Un cop determinades les fraccions amb activitat ribonucleasa aquestes es varen reunir i dialitzar amb la finalitat de reoxidar i permetre el plegament de la proteïna recombinant.

La cromatografia de bescanvi iònic atmosfèrica només permetia una purificació parcial de la proteïna recombinant (figura III.D.4.4, carrer 2) per la qual cosa era necessària una altra etapa cromatogràfica. D'altra banda si fins aquest punt de la purificació no s'havien observat diferències entre la reHPR.B i la Met-Ala-reHPR.B, el procés cromatogràfic posterior si que en va presentar per la qual cosa es comentaran per separat a partir d'aquest punt.

El perfil d'elució de la mostra reHPR.B cromatografiada en una columna de bescanvi catiònic Protein-Pak CM-8HR A-1 per HPLC es presenta en la figura III.D.4.2.A. L'anàlisi d'activitat ribonucleasa de les diverses fraccions eluïdes es va dur a terme utilitzant plaques d'agarosa-RNA i les fraccions en les quals es va detectar activitat s'han assenyalat amb una barra negra en el cromatograma. En aquesta cromatografia es pot observar que existeixen dues zones amb activitat ribonucleasa. La primera corresponent a la fracció que elueix aproximadament en el minut 30, la qual coincidiria amb el temps d'elució de la RNAasa A bovina, i una segona corresponent a la fracció eluïda ja en la zona del rentat de la columna.

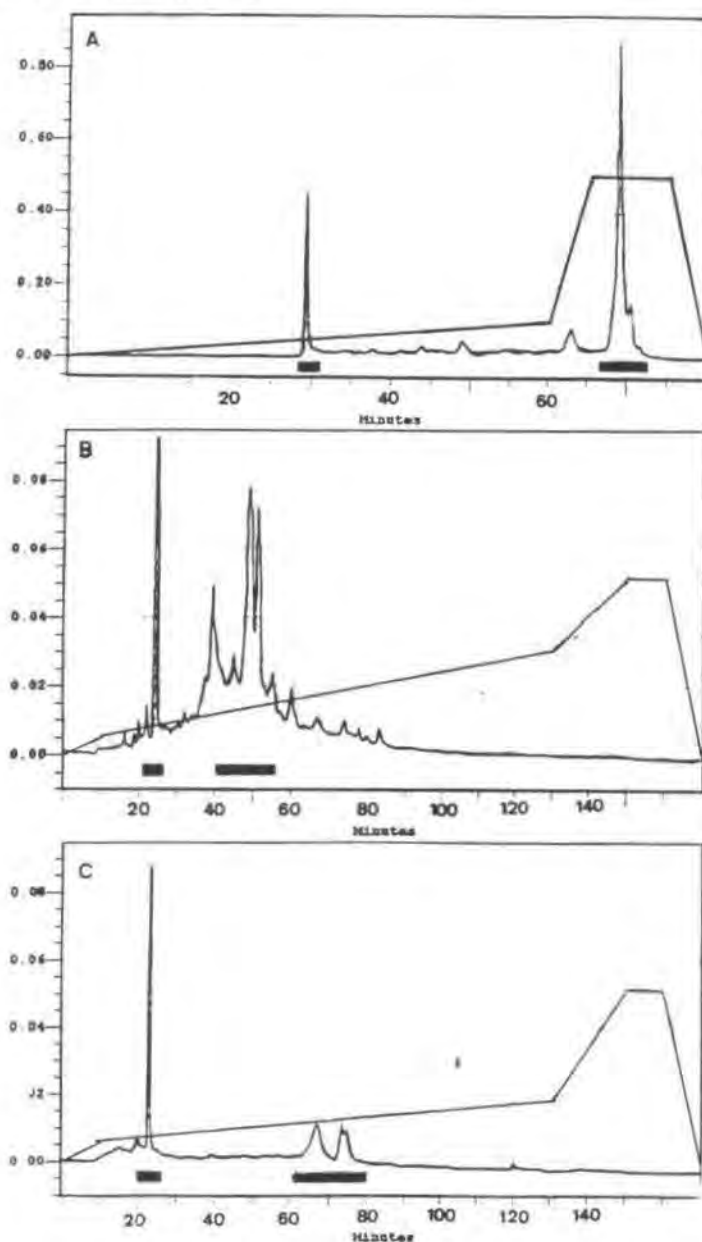


Figura III.D.4.2: Purificació de la reHPR.B. **Cromatograma (A):** Cromatografia de bescanvi catiònic en columna Protein-Pak CM-8HR A-1 per HPLC. La mostra la constituïen les fraccions amb activitat eluïdes de la cromatografia de bescanvi catiònic a pressió atmosfèrica un cop dialitzades (figura III.D.4.1). La columna fou equilibrada amb 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 i eluïda amb un gradient lineal de 0-0,2 M NaCl en amortidor d'equilibrat durant 60 min i de 0,2-1 M NaCl en amortidor d'equilibrat durant 5 min a un flux de 1 ml/min. **Cromatograma (B):** Cromatografia de bescanvi catiònic en columna Protein-Pak CM-8HR A-1 per HPLC. La mostra la constituïen les fraccions amb activitat eluïdes en la zona final del gradient de la cromatografia de bescanvi catiònic representada en el cromatograma A. La columna fou equilibrada amb 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 i eluïda amb un gradient lineal de 0-0,1 M NaCl en amortidor d'equilibrat durant 10 min, de 0,1-0,6 M NaCl en amortidor d'equilibrat durant 120 min i de 0,6-1 M en 20 min a un flux de 1 ml/min. **Cromatograma (C):** Cromatografia de bescanvi catiònic en columna Protein-Pak CM-8HR A-1 per HPLC. La mostra que es va aplicar la constituïen les fraccions amb activitat eluïdes a concentracions salines més elevades de la cromatografia de bescanvi catiònic representades en el cromatograma B. La columna fou equilibrada amb 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 i eluïda amb un gradient lineal de 0-0,1 M NaCl en amortidor d'equilibrat durant 10 min, de 0,1-0,35 M NaCl en amortidor d'equilibrat durant 120 min i de 0,35-1 M en 20 min a un flux de 1 ml/min. Les fraccions amb activitat es varen detectar pel mètode d'assaig en placa d'agarosa-RNA i s'han indicat amb una barra negra en els diferents cromatogrames.

Les fraccions eluïdes en la zona final del gradient del cromatograma A es varen reunir liofilitzar, dialitzar i s'aplicaren de nou en la mateixa columna però utilitzant un gradient diferent representat en el cromatograma B de la figura III.D.4.2. Utilitzant el mateix sistema de detecció d'activitat es varen observar altra vegada dues zones, indicades amb una barra negra, amb activitat ribonucleasa. La primera zona correspon a un pic ben definit i elueix a una concentració de NaCl similar a l'observada en la cromatografia anterior (cromatograma A de la figura III.D.4.2). La segona zona sembla presentar més complexitat i elueix a una concentració de NaCl més elevada.

Novament, les fraccions corresponents a aquesta segona zona d'activitat es varen reunir, liofilitzar, dialitzar i s'aplicaren per tercera vegada en la mateixa columna però utilitzant un gradient més lent. El perfil d'elució de proteïna a 280 nm i el gradient emprat es presenten en el cromatograma C de la figura III.D.4.2. Una vegada més es podien distingir dues zones d'activitat diferenciades pel temps d'elució. Així es trobà una primera zona en la qual apareixia un pic ben definit i una segona més complexa cromatogràficament i més retinguda, ambdues indicades amb una barra negra en el cromatograma.

Semblava doncs, com si a mesura que s'anaven repetint els processos de reunió, concentració per liofilització i diàlisi de les fraccions actives que apareixien amb una elució a concentracions salines més elevades i es tornaven a cromatografiar, aquestes es convertien parcialment en la fracció activa que es recollia a una força iònica més baixa. Aquesta fracció eluïda a baixa força iònica i que apareix

com un pic definit en tots tres cromatogrames de la figura III.D.4.2, es va reunir en una única fracció i es va tornar a cromatografiar utilitzant el gradient descrit en l'apartat II.E.1.c. El perfil d'elució de proteïna enregistrat a 280 nm es presenta en la figura III.D.4.3.A i va permetre observar l'aparició d'un únic pic que coincidia en temps d'elució, utilitzant el mateix gradient, amb el de l'estàndard RNAasa A.

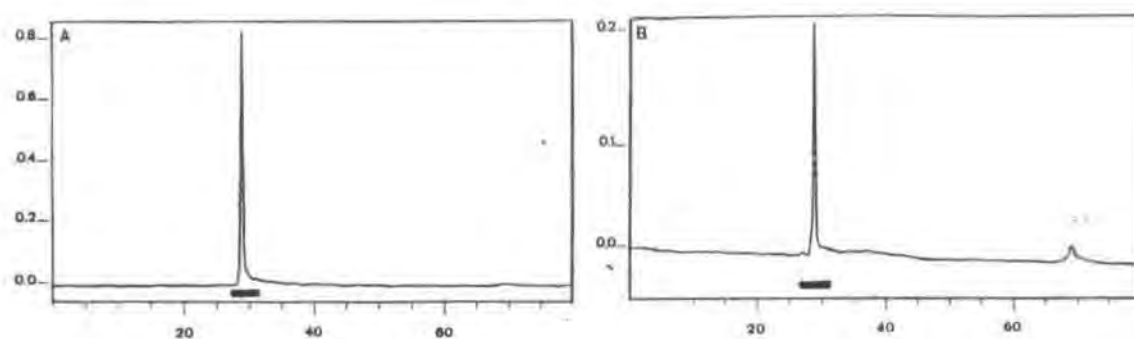


Figura III.D.4.3: Purificació de la reHPR.B i la Met-Ala-reHPR.B. Cromatograma (A): Purificació de la reHPR.B mitjançant cromatografia de bescanvi catiónic en columna Protein-Pak CM-8HR A-1 per HPLC. La mostra la constituïen les fraccions amb activitat eluïdes en la zona inicial del gradient de la cromatografia de bescanvi catiónic representada en els cromatogrames A,B i C de la figura III.D.4.2. La columna fou equilibrada amb 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 i eluïda amb un gradient lineal de 0-0,2 M NaCl en amortidor d'equilibrat durant 60 min i de 0,2-1 M NaCl en amortidor d'equilibrat durant 5 min a un flux de 1 ml/min. Cromatograma (B): Purificació de la Met-Ala-reHPR.B mitjançant cromatografia de bescanvi catiónic en columna Protein-Pak CM-8HR A-1 per HPLC de les fraccions amb activitat eluïdes de la cromatografia de bescanvi catiónic a pressió atmosfèrica un cop dialitzades (figura III.D.4.1). La columna fou equilibrada amb 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 i eluïda amb un gradient lineal de 0-0,2 M NaCl en amortidor d'equilibrat durant 60 min i de 0,2-1 M NaCl en amortidor d'equilibrat durant 5 min a un flux de 1 ml/min. Les fraccions amb activitat s'han indicat amb una barra negra.

En el cas de la segona proteïna recombinant produïda en *E.coli*, la Met-Ala-reHPR.B, s'observà un comportament cromatogràfic molt més senzill. Així les fraccions amb activitat ribonucleasa, determinada per zimograma, que eluïren de la cromatografia de bescanvi catiónic a pressió atmosfèrica en CM-Sepharose CL-6B de la mostra Met-Ala-reHPR.B, es varen aplicar a la columna de bescanvi catiónic Protein-Pak CM-8HR A-1 per HPLC. El perfil d'elució de la proteïna a 280 nm es mostra en el cromatograma B de la figura III.D.4.3. La detecció de l'activitat ribonucleasa es va dur a terme utilitzant plaques d'agarosa-RNA. Només es va trobar, en aquest cas, una única zona d'activitat ribonucleasa corresponent a l'únic pic que s'observa en el cromatograma, i el temps

d'elució del qual coincidí amb el temps d'elució determinat per la reHPR.B (cromatograma A de la mateixa figura). La proteïna eluïda de la columna Protein-Pak CM-8HR A-1 s'ha utilitzat per als estudis cinètics i la determinació de la seqüència N-terminal.

L'anàlisi electroforètica en gels de poliacrilamida-SDS i en zimograma de les fraccions purificades per cromatografia de bescanvi catiónic per HPLC tant de la reHPR.B com de la Met-Ala-reHPR.B, es presenta en les figures III.D.4.4 i III.D.4.5.

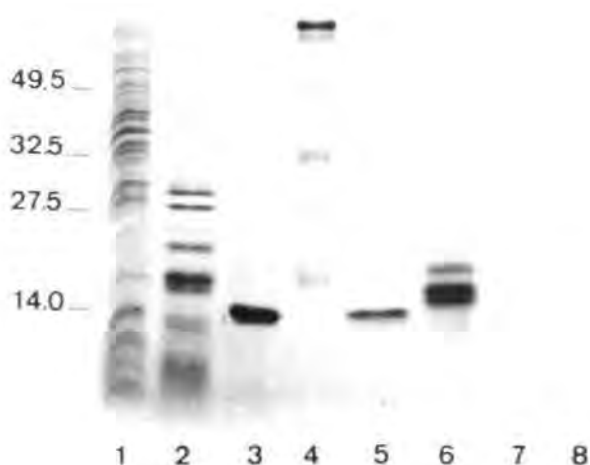


Figura III.D.4.4: Anàlisi electroforètica en gel de poliacrilamida-SDS al 15% tenyit amb blau de Coomassie (apartat II.E.2.b.): 1. Extret abans de la cromatografia de bescanvi catiónic en CM-Sepharose CL-6B; 2. Mostra abans de la cromatografia de bescanvi catiónic en Protein-Pak CM-8HR A-1; 3. RNAasa A; 4. Marcadors de massa molecular pretenyits [fosforilasa b (106.000 Da), albúmina sèrica bovina (80.000 Da), ovoalbúmina (49.500 Da), anhidrasa carbònica (32.500 Da), inhibidor de tripsina (27.500 Da) i lisozim (18.500 Da)] de Bio-Rad (EEUU); 5. reHPR.B; 6. HPRNAasa; 7. Met-Ala-reHPR.B; 8. reHPR.B eluïda a força iònica elevada de la cromatografia de bescanvi catiónic en Protein-Pak CM-8HR A-1.

S'observa com després d'aquesta etapa cromatogràfica ambdues proteïnes recombinants són electroforèticament homogènies detectant-se una única banda de proteïna. Tanmateix però es varen detectar diferències en quant a mobilitat electroforètica entre ambdues. Així mentre la reHPR.B, produïda en el sistema d'expressió que utilitza el pèptid senyal pelB per a la seva secreció, es presentava com una única banda electroforètica idèntica a la de la ribonucleasa purificada de pàncreas humà i també a la de la RNAasa A de pàncreas boví, la Met-Ala-reHPR.B, produïda en el sistema d'expressió directa, presentava una mobilitat electroforètica lleugerament menor a la dels dos enzims esmentats i a la reHPR.B.

També es va analitzar electroforèticament (figura III.D.4.4, carrer 8) la mostra de reHPR.B provinent de la fracció activa que presentava una elució a força iònica més elevada tal i com es va obtenir en la cromatografia representada en la figura III.D.4.2.C. S'observa que la mobilitat electroforètica d'aquesta mostra de reHPR.B és semblant a la de la Met-Ala-reHPR.B (figura III.D.4.4, carrer 7) però diferent de la mateixa reHPR.B que s'havia obtingut a temps d'elució corresponents a concentracions salines menors (figura III.D.4.4, carrer 5).

L'anàlisi de les mateixes mostres en zimograma (figura III.D.4.5) va permetre comprovar que existia una correlació entre les bandes d'activitat observades segons aquest assaig i les bandes de proteïna detectades en l'electroforesi en gels de poliacrilamida-SDS.

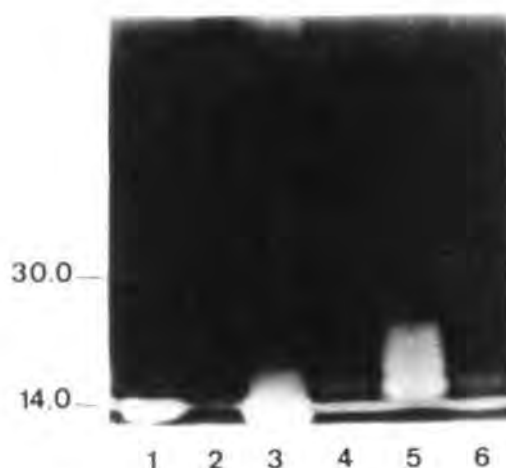


Figura III.D.4.5: Anàlisi electroforètica en gel de poliacrilamida-SDS amb poli(C) revelat per activitat en la qual es varen aplicar les mateixes fraccions que en el gel de poliacrilamida-SDS: **1.** Extret abans de la cromatografia de bescanvi catiònic en CM-Sepharose CL-6B; **2.** Mostra abans de la cromatografia de bescanvi catiònic en Protein-Pak CM-8HR A-1; **3.** RNAasa A; **4.** Marcadors de massa molecular pretenyits [fosforilasa b (106.000 Da), albúmina sèrica bovina (80.000 Da), ovoalbúmina (49.500 Da), anhidrasa carbònica (32.500 Da), inhibidor de tripsina (27.500 Da) i lisozim (18.500 Da)] de Bio-Rad (EEUU); **5.** reHPR.B; **6.** HPRNAasa; **7.** Met-Ala-reHPR.B; **8.** reHPR.B eluïda a força iònica elevada de la cromatografia de bescanvi catiònic en Protein-Pak CM-8HR A-1.

El rendiment de l'expressió i la purificació d'ambdues proteïnes recombinants (reHPR.B i Met-Ala-reHPR.B) es va determinar en mg de proteïna per litre de cultiu a partir de la fracció obtinguda després de la darrera etapa de purificació. Segons l'estimació de la quantitat de proteïna utilitzant el mètode de Bradford (1976), s'obtinguren 0,96 mg/litre de reHPR.B i 0,87 mg/litre de Met-Ala-reHPR.B. Aquests resultats indiquen que ambdós sistemes tenen uns nivells d'expressió i de recuperació molt semblants.

III.D.5. Caracterització de la reHPR.B

III.D.5.1. DETERMINACIÓ DE LA SEQÜÈNCIA N-TERMINAL

L'anàlisi dels 5 primers residus (KESRA) de la seqüència N-terminal de la reHPR.B purificada a partir del sediment cel·lular indicà que l'escissió entre el pèptid senyal i la proteïna recombinant es produïa de forma correcta en coincidir aquests amb els de la ribonucleasa de pàncreas humà.

III.D.5.2. PROPIETATS CATALÍTIQUES

Els paràmetres cinètics de la reHPR.B, la Met-Ala-reHPR.B s'han determinat pel mètode espectrofotomètric per als substrats citidina 2',3'-fosfat cíclic i poli(C), i s'han comparat amb els que s'obtenen per a la ribonucleasa purificada de pàncreas humà i la ribonucleasa purificada de pàncreas boví.

Per al substrat 2',3'-fosfat cíclic (C>p) s'ha utilitzat el mètode espectrofotomètric de Crook i col., (1960) modificat per Herries i col., (1962). La hidròlisi del substrat C>p i formació 3'CMP es mesura a partir de l'increment d'absorbància a 296 nm.

Per al substrat poli(C) s'ha seleccionat la longitud òptima de lectura a partir del registre de l'evolució en el temps de l'espectre d'absorbància entre 230 i 320 nm en el qual es va observar una regió de disminució lineal màxima entre 292 i 296 nm. Com a longitud òptima de lectura es va seleccionar 294 nm (Boix, 1993).

Els assaigs es varen realitzar en amortidor 0,2 M acetat sòdic, pH 5,5 a 25°C. Les concentracions d'enzim i substrat utilitzades s'indiquen en la taula III.D.5.2.

C>p			
	K_m (mM)	K_{cat} (min ⁻¹)	K_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)x10 ⁻³
reHPR.B	0,83	165	3,31
Met-Ala-reHPR.B	0,79	169	3,56
HPRNAasa	0,80	175	3,65
RNAasa A	0,84	184	3,65

poli(C)			
	K_m (mg/ml)	V_{max} relativa/[E ₀] (%)	Rel. V_{max} /[E ₀]/ K_m
reHPR.B	0,35	97	256,4
Met-Ala-reHPR.B	0,43	95	220,9
HPRNAasa	0,45	99	220,0
RNAasa A	0,39	100	256,4

Taula III.D.5.2: Comparació dels paràmetres cinètics de les ribonucleases reHPR.B, Met-Ala-reHPR.B, ribonucleasa de pàncreas humà (HPRNAasa) i ribonucleasa de pàncreas boví (RNAasa A). Els assaigs es varen realitzar en amortidor 0,2 M acetat sòdic, pH 5,5 a 25 °C. Per al substrat C>p s'ha utilitzat una concentració final d'enzim de 0,2 µM i de substrat entre 0,1 i 2,5 mM, mentre que per al substrat poli(C), s'ha utilitzat una concentració d'enzim de 5 nM i de substrat de 0,1-2,5 mg/ml.

Tant la reHPR.B com la Met-Ala-reHPR.B s'han aconseguit expressar en cèl.lules d'*E.coli* BL21(DE3) i purificar fins l'homogeneïtat assolint una producció final de 1 mg/litre de cultiu, aproximadament. Per totes dues proteïnes recombinants s'han calculat els paràmetres cinètics i s'han comparat amb els de la ribonucleasa de pàncreas humà i la RNAasa A de pàncreas boví, trobant-se que eren pràcticament idèntics. Aquestes dades indiquen que probablement el plegament d'ambdues proteïnes recombinants és correcte i adopten una conformació nativa molt semblant a la de la proteïna obtinguda a partir del pàncreas. A més a més en el cas de la reHPR.B s'ha comprovat per seqüenciació de l'extrem N-terminal que l'escissió del pèptid senyal de la ribonucleasa és correcta.

El sistema de purificació establert per a l'aïllament de la reHPR.B, que és aplicable també a al Met-Ala-reHPR.B, estava condicionat d'entrada pel fet que els estudis per determinar la localització de l'enzim recombinant (apartat III.D.3.b), indicaven que aquest es trobava repartit entre la fracció cel.lular corresponent a l'espai periplàsmic i la fracció insoluble. Per a la solubilització de la reHPR.B continguda en ambdues fraccions es va utilitzar com a agent desnaturalitzant la urea i s'afegí DTT com a agent reductor per tal de desfer possibles agregats estabilitzats per ponts disulfur.

La necessitat de purificar parcialment prèvia al procés de replegament va venir forçada perquè els intents de provocar la renaturalització per eliminació de la urea i la reoxidació dels ponts disulfur, resultaven infructuosos provocant la formació d'agregats insolubles. Es va procedir doncs a la purificació parcial de la reHPR.B utilitzant una cromatografia de bescanvi catiónic en columna CM-Sepharose CL-6B. L'anàlisi electroforètica en gel de poliacrilamida-SDS amb poli(C) revelat per activitat mostrava en el conjunt de fraccions que presentaven activitat, una única banda de mobilitat electroforètica menor a la de l'estàndard RNAasa A. Segons aquest resultat doncs, semblaria que

només una forma és present després de desnaturalitzar i reduir la reHPR.B i indicaria que les dues bandes observades en els diferents aspectes avaluats per a l'optimització de l'expressió correspondrien a diferents conformacions de la reHPR.B.

Un cop purificada parcialment la mostra calia dur a terme els processos de replegament i reoxidació. Les condicions d'aquests processos són molt variables però el que sembla clar és que la formació dels ponts disulfur és convenient efectuar-la simultàniament al procés de replegament perquè d'aquesta manera s'afavoreix l'estabilització de les estructures natives. La formació dels ponts disulfur durant el procés de replegament de la proteïna es pot dur a terme per oxidació de l'aire (Afinsen i col., 1961) o per la presència d'una barreja d'un compost amb un grup tiol que pot trobar-se en estat reduït o en estat oxidat (Saxena i Wetlaufer 1970).

Així per a aquesta etapa es varen escollir les condicions de replegament i reoxidació que s'han demostrat funcionen perfectament per a la ribonucleasa de pàncreas boví recombinant produïda en altres sistemes (Laity i col., 1993; Rothwarf i Scheraga 1993 a, b, c i d) i la produïda emprant el mateix sistema basat en la RNA polimerasa de T7 i que han permès obtenir fins a 30 mg/litre de reBPR.B. La renaturalització de la reHPR.B s'ha buscat a través de la diàlisi de la urea que contenia la mostra de forma simultània a la formació dels ponts disulfur en presència de la parella redox GSSG/GSH, la qual incrementava la velocitat de reoxidació.

Durant aquest procés de renaturalització es va observar la formació d'agregats de proteïna, fet que pot haver afectat la recuperació de proteïna recombinant activa. La formació d'aquests agregats insolubles depèn de la concentració de proteïna, de la velocitat de diàlisi per tal d'eliminar la urea i de les concentracions del parell redox conjugat. La concentració de proteïna total abans d'iniciar la diàlisi era de 0,5 mg/ml i juntament amb les concentracions de la parella reductor/oxidant, poden haver estat els causants d'observar en les cromatografies de bescanvi catiònic per HPLC posteriors una interconversió de formes amb activitat ribonucleasa fruit d'un replegament incorrecte o parcial de la proteïna recombinant.

La producció de reHPR.B obtinguda (1 mg/litre) es troba en el mateix ordre de producció que molts dels sistemes d'expressió de ribonucleases descrits en la introducció. Una anàlisi de la renaturalització a diferents concentracions de proteïna i amb diferents proporcions d'agent oxidant i reductor han de permetre una millora del rendiment de producció de la ribonucleasa de pàncreas humà recombinant en la seva forma activa.

De fet, el procés de diàlisi per tal de recuperar la Met-Ala-reHPR.B es va iniciar a una concentració de proteïna deu vegades inferior a la de la reHPR.B. Aquesta menor concentració sembla haver influenciat positivament el procés de replegament, ja que no s'han observat els processos

d'interconversió de formes que ha patit la reHPR.B. Els nivells d'expressió assolits de Met-Ala-reHPR.B es troben en el mateix ordre que els de reHPR.B, però la primera presenta l'inconvenient de posseir una Met i una Ala addicionals en l'extrem N-terminal. Per aquesta raó el sistema recomanat per a la producció de ribonucleasa de pàncreas humà recombinant és el basat en la secreció de la proteïna a l'espai periplàsmic perquè la proteïna produïda, la reHPR.B, presenta el seu N-terminal idèntic al de la ribonucleasa purificada del pàncreas humà, fruit de l'escissió correcta del pèptid senyal peIB.

La determinació dels paràmetres cinètics de les ribonucleases recombinants i la semblança d'aquests amb els de les ribonucleases purificades de pàncreas humà i l'estàndard RNAasa A bovina, fan pensar que aquest sistema permet assolir la producció d'una proteïna, si no idèntica, molt semblant estructuralment a l'enzim salvatge.

És destacable el fet, ja observat en l'expressió de reHPR.Y en llevat, que l'expressió de la reHPR.B és sensiblement inferior a l'observada per a la seva homòloga, la ribonucleasa de pàncreas boví recombinant. L'aproximadament 70% d'identitat existent entre les estructures proteïques primàries d'ambdós enzims pancreàtics no feia preveure unes diferències tant evidents en els nivells de producció observats per totes dues proteïnes recombinants. L'estudi o anàlisi de quines són les causes que provoquen aquestes diferències pot possibilitar l'optimització de l'expressió del gen sintètic construït per a l'expressió de la ribonucleasa de pàncreas humà recombinant.

III.E. DISCUSSIÓ GENERAL

Els interessos generals del grup de recerca en el qual s'integra el treball que s'ha presentat, es centren en la ribonucleasa de pàncreas humà tant en els aspectes de la relació existent entre estructura i funció com en la possible utilització d'aquesta com a eina útil en la diagnòsi de disfuncions pancreàtiques.

El creixent interès per trobar marcadors sèrics que possibilitin una detecció del càncer de pàncreas en estadis primerencs i la detecció de nivells anòmals d'activitat ribonucleasa associats a aquest estat, varen desencadenar una gran quantitat d'estudis per discernir aquesta possibilitat.

Tanmateix però, la major part dels treballs realitzats, tant aquells basats exclusivament en mesures d'activitat ribonucleasa en sèrum com els resultants de la combinació de tècniques immunològiques amb determinacions d'activitat han prescindit de dues dades abastament contrastades: en primer lloc que les ribonucleases, incloses les de tipus secretori, presents en sèrum humà són glicoproteïnes i en segon lloc que en sèrum humà coexisteixen ribonucleases de tipus diferents i, dins d'un mateix tipus, d'origens diferents, que poden proporcionar una resposta

immunològica o d'activitat promig no diferenciable ni pels sistemes d'activitat aplicats ni per l'ús d'anticossos policlonals.

La resposta a si la ribonucleasa de pàncreas humà pot tenir algun valor diagnòstic com a marcador sèric de disfuncions pancreàtiques passa per la identificació de forma inequívoca, de la ribonucleasa de pàncreas humà en sèrum. Segons l'enfoc que ha donat el grup en el qual s'integra aquest treball, caldrien dues aproximacions: d'una banda la caracterització a nivell glucídic de la ribonucleasa de pàncreas humà ja que, d'acord amb el treball de Yamashita i col., (1986) realitzat amb ribonucleases parcialment purificades de diferents teixits, la glicosilació és un fenomen característic de cada òrgan o teixit i de l'altra, el desenvolupament d'anticossos monoclonals dirigits a discriminar la ribonucleasa de tipus secretori d'entre els diferents tipus que coexisteixen en sèrum.

La comparació de la ribonucleasa de pàncreas humà i la seva glicosilació, amb la ribonucleasa que es produïx associada a estats pancreàtics anòmals i la seva identificació en sèrum hauria de permetre avaluar les possibilitats reals de la ribonucleasa humana de pàncreas com a maracador de disfuncions pancreàtiques.

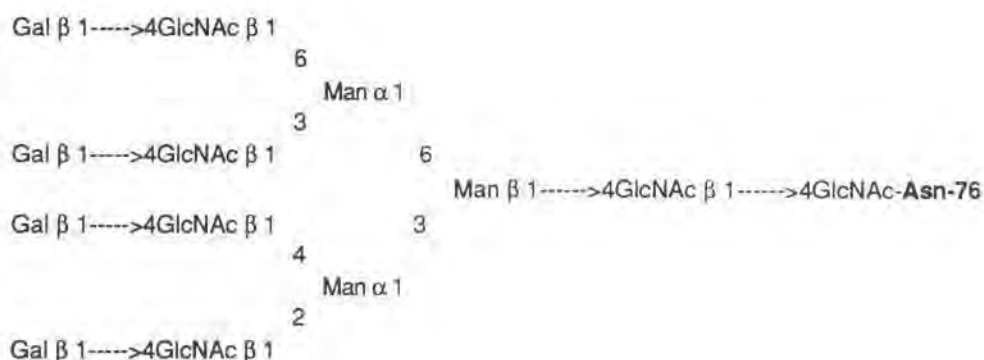
En aquest sentit va caldre establir un sistema de purificació de la ribonucleasa pancreàtica humana que fos ràpid i repetitiu alhora que respectés l'heterogeneïtat glucídica per a la seva posterior caracterització.

Els diferents sistemes de purificació de la ribonucleasa humana de pàncreas existents o bé constaven d'un número molt elevat d'etapes de purificació o bé provocaven una pèrdua de part de l'heterogeneïtat (Delaney, 1963; Ukita i col., 1964; Bardon i col., 1976; Weickmann i col., 1981; Osset, 1991). Els treballs de Kurihara i col., (1982) i Yamashita i col., (1986) posaven en entredit els nivells de glicosilació descrits fins aleshores per a la ribonucleasa de pàncreas humà.

Probablement el fet que els òrgans utilitzats en els treballs de purificació esmentats, provinguessin d'autòpsies i no de donants de transplantament, com han estat els teixits utilitzats en aquest treball, va contribuir a què la detecció de l'heterogeneïtat real de la ribonucleasa de pàncreas humà no fos possible.

La comparació entre l'extracció àcida i l'extracció neutra no altera, si més no de forma detectable en zimograma, el patró de glicosilació. Treballs realitzats sobre la ribonucleasa de tipus no secretori procedent de diferents teixits publicats recentment (Lawrence i col., 1993 a i b), confirmen que el tractament àcid no malmet l'estructura glucídica alhora que incrementa el rendiment de l'extracció.

Resultats i Discussió



En cadascuna d'aquestes estructures hi caldria afegir les fucoses en número de 3-4, i si hi haguessin siàlics aquests estarien units a les galactoses més externes.

Una anàlisi més detallada permetria la identificació d'estructures tri-, bi- i monoantenàries com a productes resultants de la síntesi incompleta o de la degradació d'aquestes estructures més completes.

Una característica remarcable que s'observa a partir de la composició en carbohidrats determinada és l'elevat contingut en fucoses per cadena la qual cosa implicaria que no es trobaria unida només a la N-acetilglucosamina més interna sinó que també apareixerien fucosilades N-acetilglucosamines més externes. Aquestes 3-4 unitats de residus fucosil no han estat detectats en cap de les altres ribonucleases de les quals s'ha dut a terme un estudi de la composició glucídica i poden jugar un paper clau en la identificació de la ribonucleasa de pàncreas humà present en sèrum.

Les proporcions amb què les diferents Asn de les dianes de N-glicosilació es varen trobar glicosilades estan d'acord amb la proposta de Gavel i von Heijne (1990) segons la qual la probabilitat de trobar una diana Asn-Xaa-Ser/Thr glicosilada disminueix com més lluny aquesta es trobi de l'extrem N-terminal de la cadena polipeptídica.

El pèptid corresponent a l'extrem C-terminal es va aïllar en dues formes que diferien en la presència de la Thr-128 com a residu final. Aquest resultat confirmaria la suposició efectuada anteriorment que aquesta Thr C-terminal podia ésser fàcilment eliminada per restes de carboxipeptidasa (Beintema i col., 1988) i està d'acord amb els resultats obtinguts per transferència Southern per Breukelmann i col., (1993) segons els quals existiria un únic gen per a la ribonucleasa de tipus secretori. També indicaria que el fet de treballar amb òrgans procedents de donants per a transplantament garanteix una millor preservació de la ribonucleasa de pàncreas humà.

La composició en sucres determinada per a la ribonucleasa de pàncreas humà es troba en concordança amb el postulat de Yamashita i col., (1986) que la glicosilació de les ribonucleases de

tipus secretori depèn que en un teixit determinat se seleccionin unes o altres vies de maduració de les cadenes de carbohidrats en ser diferent de la composició d'altres ribonucleases publicades. Així s'observa que les cadenes glicosilades per al ribonucleasa de pàncreas humana difereixen sensiblement de la glicosilació determinada per la ribonucleasa de tipus secretori d'orina, la qual conté un menor número de fucoses per cadena i presenta només estructures del tipus N-acetilglucosamina, és a dir cadenes del tipus complexe, mentre en la ribonucleasa de pàncreas humana s'hi troben tant cadenes del tipus complexe com del tipus híbrid.

Aquestes característiques peculiars de les cadenes glucídiques de la ribonucleasa pancreàtica humana, si bé deixen per resoldre quina pot ser la font o l'origen de la ribonucleasa de tipus secretori present en orina, han de permetre la identificació en el sèrum, mitjançant el reconeixement combinat de la cadena polipeptídica amb anticossos monoclonals i dels motius glucídics per l'ús de lectines o anticossos específics, de la fracció provinent del pàncreas.

D'altra banda, el desenvolupament d'aquest sistema de purificació ha permès l'aïllament i la caracterització parcial de la ribonucleasa secretada per la línia cel·lular d'adenocarcinoma pancreàtic humana CAPAN-1 (Fernández, 1994). La determinació en detall de quines són les estructures glucídiques de les ribonucleases secretades per aquestes i altres línies de cèl·lules tumorals ha de permetre establir quin és el valor real de la ribonucleasa de pàncreas humana com a marcador de disfuncions pancreàtiques especialment en el cas de neoplàsies.

Malgrat la poca quantitat de ribonucleasa que es produeix en pàncreas (5 µg / g de teixit), l'heterogeneïtat amb la qual es presentava i la cada vegada més difícil possibilitat d'obtenció d'òrgans, s'havia pogut caracteritzar la ribonucleasa de pàncreas humana a nivell glucídic. Tanmateix, aquestes mateixes quantitats i la irregularitat amb què s'obtenien els òrgans, esdevenien insuficients per a dur a terme els estudis sobre la relació estructura-funció i l'obtenció d'anticossos monoclonals, metodologia aquesta darrera que anava encaminada a permetre la identificació de la ribonucleasa de pàncreas humana en sèrum.

Així doncs, amb la finalitat d'obtenir una producció més elevada i més regular de la cadena polipeptídica s'havia pres la determinació de clonar el gen i aconseguir-ne l'expressió. Si bé l'obtenció d'anticossos monoclonals s'hauria pogut dur a terme utilitzant com a antígen un pèptid sintetitzat químicament, aquesta solució no permetia realitzar els estudis sobre la relació estructura-funció ja esmentats.

Per tal d'obtenir el gen que codifiqués per a la ribonucleasa de pàncreas humana es va escollir el disseny i la construcció d'un gen sintètic a partir d'oligonucleòtids monohebra atesa la mida

relativament petita de la proteïna. L'èxit en la construcció del gen demostrava la validesa del disseny i l'estratègia seguida per a la seva construcció.

L'elecció del llevat com a organisme hoste per a la producció heteròloga de la ribonucleasa de pàncreas humà recombinant es va fonamentar en el fet que com a organisme eucariota, posseeix una via de secreció força elaborada que participa en el plegament i l'export de les proteïnes de secreció hoste. Aquesta singularitat havia de permetre el plegament i la formació dels quatre enllaços disulfur alhora que s'evitava el potencial efecte citotòxic.

El gen sintètic codificant per a la ribonucleasa de pàncreas humà que s'havia construït, es va expressar en el llevat *Saccharomyces cerevisiae* utilitzant el vector episomal de llevat YEpWL. L'expressió de la ribonucleasa recombinant produïda en llevat es duia a terme en aquest sistema com a fusió del pèptid senyal de la feromona de llevat factor α , el qual dirigia la seva secreció al medi extracel·lular. La proteïna expressada presentava un nivell de glicosilació força elevat i de manera simultànea un processament incomplet del pèptid senyal. La inserció d'una regió codificant per una dina reconguda per una proteasa diferent, mitjançant mutagènesi dirigida sobre el gen sintètic, va permetre millorar el rendiments d'expressió, però no va evitar que la ribonucleasa humana de pàncreas recombinant produïda en llevat presentés encara uns nivells de glicosilació molt elevats. El sistema d'expressió YEpWL utilitzant el llevat com a organisme hoste, no resulta òptim per a la producció de la proteïna recombinant homogènia necessària per als estudis de la relació entre estructura i funció. Tanmateix, pot resultar útil, combinat amb l'anàlisi de la producció en gels revelats per activitat, en l'estudi d'aspectes relacionats amb la biologia cel·lular, com ara la resposta de la glicosilació de la proteïna hoste sota diferents condicions de creixement o cultiu, o quan es sotmet aquest creixement a la presència de determinats efectors com ara desacobllants de la glicosilació com la tunicamicina.

L'intent d'expressar el gen sintètic codificant per a la ribonucleasa de pàncreas humà en *E.coli*, com a alternativa per millorar els nivells obtinguts en llevat i assolir un producte més homogeni, utilitzant el vector de secreció pNIIIompA1 va resultar infructuós. Aquest sistema s'ha demostrat vàlid per a l'expressió de la ribonucleasa T1 d'*Aspergillus oryzae* i altres proteïnes de mida petita i amb ponts disulfur com són el l'inhibidor pancreàtic secretori de tripsina (Maywald i col., 1988) i l'inhibidor de carboxipeptidasa de patata (Molina i col., 1992).

Emprant aquest sistema tampoc es va aconseguir expressar la ribonucleasa bovina de pàncreas. Una de les condicions necessàries, encara que no suficients, que MacIntyre i Henning (1990) proposaren que una proteïna havia d'acomplir per a poder ésser secretada un cop fusionada a un pèptid senyal, és que l'extrem N-terminal de la proteïna recombinant no presenti una càrrega positiva important la qual cosa provocaria un fort efecte inhibitori en la secreció.

Altres autors consideren que com a mínim els 14 primers aminoàcids participen en el procés de translocació (Summers i col., 1989a). Les proteïnes de secreció procariotes presenten en general pocs residus bàsics en l'extrem N-terminal, o inclouen residus àcids que contraresten les càrregues positives, mentre en el cas dels organismes eucariotes es troben regions N-terminals especialment bàsiques (Watson, 1984; von Heijne, 1986). L'addició de residus Arg o Lys en l'extrem N-terminal de proteïnes procariotes pot determinar l'acumulació del precursor en l'interior de les cèl·lules d'*E.coli* (Yamane i Mizushima, 1988). Summers i col., (1989b) observaren també com la substitució d'un únic residu Lys per una Arg o modificacions en la posició relativa dels aminoàcids bàsics, poden inhibir la secreció de proteïnes eucariotes en *E.coli*, fenomen que també ha estat observat per Struyvré i col., (1993). Andersson i von Heijne (1991), extingueren el domini adjacent a la seqüència senyal que podia afectar a 30 residus i postulaven que una agrupació de diversos residus Lys dins d'aquesta regió bloquejava completament la translocació.

La ribonucleasa de pàncreas boví posseeix 3 residus bàsics entre els 10 primers aminoàcids (Lys-1, Lys-7 i Arg-10) mentre la ribonucleasa de pàncreas humana en aquesta mateixa regió en posseeix 5 de residus bàsics (Lys-1, Arg-4, Lys-6, Lys-7 i Arg-10). Aquesta densitat de càrrega positiva en l'extrem N-terminal en totes dues proteïnes pancreàtiques pot haver estat la causa que aquestes no s'hagin expressat utilitzant el sistema pN111ompA.

Quan el sistema d'expressió utilitzat ha estat el basat en el promotor de la RNA polimerasa de T7, s'ha aconseguit una producció al voltant de 1 mg/ litre tant si l'opció anava encaminada a secretar la proteïna recombinant a l'espai periplàsmic com si l'expressió era directa o citosòlica. Si bé aquest sistema d'expressió té uns nivells de producció lleugerament inferiors als publicats per Russo i col., (1993) presenta l'avantatge que la producció d'una proteïna recombinant en *E.coli* és molt més ràpida i menys costosa que no pas en cèl·lules CHO alhora que ha permès l'obtenció d'un producte final homogeni sense cap modificació secundària. Els sistemes de secreció redueixen en general els efectes citotòxics de la proteïna expressada, eviten la degradació de la proteïna per proteases intracel·lulars i afavoreixen el seu plegament, especialment en el cas de proteïnes amb ponts disulfur. Presenten a més a més l'avantatge que la proteïna expressada heteròlogament pot mantenir el seu N-terminal sense modificacions.

Quan s'ha emprat el sistema de secreció pET22b(+), per a expressar la ribonucleasa pancreàtica humana recombinant i se'n va estudiar la localització, es va determinar la presència d'activitat en la fracció insoluble i en la fracció corresponent al periplasma. D'altra banda s'ha comprovat que l'extrem N-terminal de la ribonucleasa recombinant corresponia a l'esperat quan es processava correctament i coincidia amb la purificada del pàncreas humà.

Hom podria pensar que la proteïna formés cossos d'inclusió si ens basem en la seva localització però la maduració o escissió del pèptid senyal, a càrrec d'una proteasa, es produeix en la cara periplàsmica de la membrana interna. Aquestes premisses suggereixen que, o bé la ribonucleasa humana recombinant expressada en cèl·lules d'*E.coli* pot estar formant cossos d'inclusió en el periplasma, o bé es manté d'alguna manera unida a la membrana després de la translocació. La segona possibilitat, atenent als nivells de producció detectats, esdevé més plausible.

La densitat de càrregues positives existents en l'extrem N-terminal no sembla afectar l'expressió, especialment en el cas de la ribonucleasa de pàncreas boví, quan s'utilitza el sistema pET, tot i que pot haver estat una de les causes dels diferents nivells d'expressió que es poden observar entre la ribonucleasa humana i la bovina.

El sistema d'expressió pET s'ha emprat amb èxit per a la producció de diverses proteïnes en *E.coli* (Studier i col., 1990). L'elevada selectivitat de la RNA polimerasa de T7 pel promotor T7 juntament amb la velocitat d'elongació a partir del promotor hauria de resultar en l'acumulació d'un elevat nombre de transcrits. Tanmateix però, una abundor de transcrits no assegura necessàriament, un ritme elevat de traducció atès que es pot produir un inici o elongació de la traducció deficient (Gold 1990). L'estructura secundària del mRNA s'ha proposat com un dels factors que juguen un paper important en l'inici de la traducció (Iserentant i Fiers, 1980; Hall i col., 1982). En particular, l'accessibilitat del codó d'iniciació i la seqüència de Shine-Dalgarno es pensa que pot ser crítica per assolir un inici de traducció eficient (Gheysen i col., 1982; Hermes i Knowles, 1987; Li i col., 1991).

Un altre factor que podria explicar la diferència observada entre els nivells d'expressió per la ribonucleasa de pàncreas humana i la de pàncreas boví podria haver estat els codons d'ús més freqüent en llevant utilitzats en la construcció del gen sintètic per la ribonucleasa de pàncreas humana. Aquests però, difereixen tant, o tant poc, dels codons que es troben en el cDNA de pàncreas boví, com dels codons d'ús més freqüent en *E.coli*. En qualsevol cas aquest factor hauria d'haver afavorit l'expressió de la ribonucleasa de pàncreas humana recombinant en llevant, respecte la producció de la ribonucleasa de pàncreas boví, la qual cosa no s'ha observat.

El redisseny de la regió codificant per l'extrem N-terminal i l'estudi de l'efecte dels diferents residus bàsics situats en l'extrem N-terminal podrien millorar els nivells d'expressió i explicar el perquè de les diferències de producció observades entre ambdós enzims pancreàtics.

Els paràmetres cinètics determinats, K_m i K_{cat} , confirmen que les ribonucleases humanes recombinants expressades ja sigui amb el sistema que busca la secreció (reHPR.B) com amb el sistema d'expressió directa (Met-Ala-reHPR.B), presenten propietats catalítiques equivalents a l'enzim salvatge i també a la RNAasa A de pàncreas boví quan s'utilitzen poli(C) i C>p com a

substrats. Aquests resultats, previsibles des del moment en què tots els residus que s'han postulat en estudis realitzats amb la ribonucleasa de pàncreas boví, que participen directament en la catàlisi o constituents dels subestis d'interacció amb el substrat, es troben presents en la ribonucleasa de pàncreas humana en les mateixes posicions. Aquesta similitud en el comportament cinètic indica que molt probablement, l'estructura de les ribonucleases humanes recombinants és, sinó idèntica, semblant a la conformació nativa de la ribonucleasa de pàncreas humana.

Magrat aquesta similitud a nivell cinètic en les formes purificades de les ribonucleases humanes recombinants, s'ha observat durant el procés de purificació, que en el cas de la reHPR.B es produïa una interconversió de formes que es podien separar en una cromatografia de bescanvi catiònic. La detecció d'una interconversió de formes no s'ha detectat quan s'han aplicat, en el nostre grup, les mateixes condicions de renaturalització i purificació per la ribonucleasa de pàncreas boví recombinant expressada amb el mateix sistema. Aquest comportament diferencial en el repliegament de la ribonucleasa de pàncreas boví respecte la ribonucleasa de pàncreas humana ofereix la possibilitat d'estudiar diversos aspectes de la renaturalització partint de dos models seqüencialment i estructuralment, molt semblants però que com s'ha dit presenten comportaments en la renaturalització diferents. L'estudi de com les diferències existents a nivell de seqüència poden afectar el plegament de totes dues ribonucleases ha de permetre aportar dades sobre el mecanisme de plegament de les proteïnes en general.

El treball que s'ha presentat ha permès incorporar en el grup de treball en el qual s'integra, la metodologia del DNA recombinant i constitueix, alhora que un final, un punt des del qual es poden desenvolupar línies de treball més obertes sobre la ribonucleasa de pàncreas humana que compreguin l'estudi de determinades propietats enzimàtiques mitjançant les tècniques de mutagènesi dirigida i enginyeria de proteïnes, estudis estructurals així com aspectes del seu plegament.

CONCLUSIONS

IV. CONCLUSIONS

1. S'ha desenvolupat un mètode de purificació per a la ribonucleasa de pàncreas humà per cromatografia líquida d'elevada resolució (HPLC) en columnes de bescanvi catiònic i fase inversa que preserva l'heterogeneïtat glucídica de la mateixa. L'ús d'òrgans provinents de donants per transplantament s'ha demostrat com a un factor clau per tal de garantir l'estabilitat de les estructures glucídiques de la ribonucleasa de pàncreas humà. Durant l'establiment d'aquesta metodologia s'ha comprovat també que l'extracció àcida no malmet, de forma detectable amb les tècniques d'anàlisi utilitzades, les esmentades estructures oligosacàrides.

2. La combinació de digestions amb glicohidrolases de les fraccions glicosilades eluïdes de la cromatografia en fase inversa, amb la posterior anàlisi en gels de poliacrilamida-SDS, ha permès determinar que l'heterogeneïtat observada per la ribonucleasa de pàncreas humà és deguda a diferents nivells de glicosilació via Asn i que aquesta és produïda en més d'una de les tres Asn susceptibles de glicosilació.

3. L'aïllament dels glicopèptids que contenen les dianes consens de N-glicosilació via Asn ha permès determinar que la Asn-34 es troba glicosilada en la totalitat de les molècules, mentre la Asn-76 i la Asn-88 es troben glicosilades en la meitat i una petita part de les molècules respectivament.

4. Les composicions de monosacàrids determinades pels diferents glicopèptids en mol/mol de pèptid indiquen que la glicosilació a través de la Asn-34 respon a una cadena de tipus híbrid mentre la glicosilació en la Asn-76 seria del tipus complex. La mateixa composició va desvetllar la presència d'un número de 3-4 fucoses per cadena que implicaria que residus de N-acetilglucosamina es trobessin fucosilats en posicions més externes a les determinades per altres ribonucleases.

5. S'ha dissenyat un gen sintètic per a la ribonucleasa de pàncreas humà amb els codons d'ús més freqüent en llevat per tal d'afavorir la seva expressió i facilitar la manipulació amb enzims de restricció, i el seu posterior clonatge en un vector d'expressió de llevat. La construcció del gen sintètic s'ha realitzat a partir d'oligonucleòtids sintetitzats químicament i purificats d'acord amb el protocol establert prèviament.

6. El gen sintètic de la ribonucleasa de pàncreas humà s'ha amplificat per PCR i un cop amplificat, s'ha clonat en el vector pTZ19U. A continuació s'ha subclonat en M13mp19, on s'ha seqüenciat detectant-se l'existència de canvis en tres de les bases. La reparació dels tres errors s'ha dut a terme mitjançant mutagènesi dirigida per oligonucleòtid sobre les construccions derivades de M13mp19.

Conclusions

7. El gen HPR s'ha subclonat en el vector episomal de llevat YEpWL, fusionat en marc de lectura amb el pèptid senyal del factor α per obtenir el vector YEpHPR.1. Cèl.lules del llevat *Saccharomyces cerevisiae* transformades amb YEpHPR.1 expressen la ribonucleasa de pàncreas humà recombinant reHPR.Y a raó de 0,03-0,05 mg/litre de cultiu. La proteïna expressada presenta un grau d'heterogeneïtat molt elevat degut a diferents nivells de glicosilació.

8. Mitjançant mutagènesi dirigida per oligonucleòtid s'ha introduït la regió codificant d'una diana reconeguda per la proteasa producte del gen STE13 de llevat per tal de millorar la producció i disminuir el grau d'heterogeneïtat del producte heteròleg. Cèl.lules de llevat transformades amb la nova construcció, YEpHPR.2, permeten millorar els rendiments d'expressió fins a 0,1-0,2 mg/litre de cultiu però no eviten que la reHPR.Y presenti uns nivells de glicosilació molt elevats i una gran heterogeneïtat glucídica.

9. El sistema de purificació establert després de concentrar el sobrenedant del cultiu, es fonamenta en un únic pas cromatogràfic per FPLC en columna de bescanvi catiònic. Aquest sistema permet la recuperació del 60% de la proteïna activa amb una homogeneïtat del 87%, en dues fraccions anomenades reHPR.Y-HG i reHPR.Y-LG que s'agruparen segons el contingut en sucres de les espècies que les composaven.

10. El subclonatge del gen HPR en el vector pN111ompA1 fusionat al pèptid senyal ompA no va permetre l'expressió de la ribonucleasa de pàncreas humà recombinant produïda en cèl.lules d'*E.coli* transformades amb el vector pN111ompA1.HPR.

11. El gen HPR s'ha subclonat també en el vector de secreció pET22b(+), fusionat a la seqüència senyal pelB, per a obtenir el vector pET22.HPR. Cèl.lules d'*E. coli* BL21(DE3) transformades amb el vector pET22.HPR produeixen la ribonucleasa de pàncreas humà recombinant (reHPR.B) amb l'extrem N-terminal esperat, indicant que el sistema escindeix correctament la seqüència senyal.

12. El gen HPR s'ha subclonat també en el vector d'expressió directa pET17b(+) per a obtenir el vector pET17. HPR. Cèl.lules d'*E.coli* BL21(DE3), transformades amb el vector pET17.HPR produeixen la ribonucleasa de pàncreas recombinant amb dos residus addicionals (Met-Ala-reHPR.B).

13. L'estudi de les condicions de cultiu d'*E. coli* BL21(DE3)-[pET22.HPR] amb la finalitat d'obtenir el màxim de rendiment de reHPR.B permet concloure que les condicions òptimes de cultiu són 0,4% glicerol, 25 °C com a temperatura de creixement i inducció dels cultius amb una concentració final de IPTG de 0,5-1 mM entre les 4 i les 6 hores després de l'inici del cultiu.

Conclusions

14. S'ha desenvolupat un procediment per a purificar la reHPR.B, aplicable també a la Met-Ala-reHPR.B, que permet obtenir ambdós enzims recombinants amb un rendiment final de 1 mg/l de cultiu. El mètode establert consisteix en la solubilització de la proteïna, una cromatografia de bescanvi catiònic atmosfèrica, la reoxidació i replegament de la proteïna mitjançant una sèrie de diàlisis i la purificació per HPLC també en una cromatografia de bescanvi catiònic. Aquest procediment permet l'obtenció d'un producte final homogeni, més escaient que no pas el producte heterogeni obtingut en llevat, per realitzar estudis del mecanisme catalític i de l'estructura de la ribonucleasa de pàncreas humà.

15. Els valors de K_m i K_{cat} determinats per les ribonucleases recombinants reHPR.B, Met-Ala-reHPR.B i la ribonucleasa purificada de pàncreas humà indiquen que tots tres enzims presenten propietats catalítiques equivalents. Així mateix, la comparació amb els paràmetres cinètics obtinguts per la RNAsa A de pàncreas boví permet afirmar que el comportament cinètic d'ambdós enzims pancreàtics és molt similar quan s'utilitzen substrats d'elevada massa molecular com el poli(C), o de massa molecular petita com ara el C>p.

Conclusions

BIBLIOGRAFIA

VI. BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, C. F., Thomas, P.J., Moss, D. S., Mills, A. i Palmer, R. A. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1118**, 6-20.
- Aguilar, C. F., Thomas, P. J., Mills, A., Moss, D. S. i Palmer, R. A. (1992) *J. Mol. Biol.* **224**, 265-267.
- Alonso, J., Nogués, M. V., i Cuchillo, C. M. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* **246**, 681-689.
- Altman, S. (1989) *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **62**, 10-36.
- Akagi, K., Murai, K., Hirao, N. i Yamanaka, M. (1976) *Biophys. Acta* **442**, 368-378.
- Akagi, Y., Yamanaka, M., Murai, K. i Omae, T. (1978) *Cancer Res.* **38**, 2163-2167.
- Allinquant, B., Musenger, C. Reboul, J., Hauw, J. J. i Schuller, E. (1987) *Neurochemical Res.* **12**, 1067-1076.
- Anderson, H. i Von Heijne, G. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9751-9754.
- Antfisen, C. B., Flavin, M. i Fansworth, J. (1952) *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 468.
- Antfisen, C. B. i White, J. H. F. (1961) *The Enzymes* (Boyer, P. D. et al. eds), Vol. 1, 2 ed., pp. 95-122. Academic Press. New York.
- Ardelt, W., Mikulski, S. i Shogen, K. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 245-251.
- Anús, C., Paolillo, L., de Llorens, R., Napolitano, R. i Cuchillo, C. M. (1982) *Biochemistry* **21**, 4290-4297.
- Atkinson, T. i Smith, M.:En Gait, J. M. (ed), (1984) *Oligonucleotide Synthesis: a practical approach*. IRL Press, Oxford. pp 35-81.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. i Struhl, K. (Eds) (1987): *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Bardon, A., Sierakowska, H. i Shigar, D. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **438**, 461-473.
- Barnard, E. A. (1969) *Nature* **221**,340-343.
- Beals, J. M., Haas, E., Krausz, S. i Scheraga, H. A. (1991) *Biochemistry* **30**, 7680-7692.
- Beggs, J. D. (1978) *Nature* **275**,104-109.
- Beintema, J. J., Wietzes, P., Weickmann, J. L. i Glitz, D. G. (1984) *Anal. Biochem.*, **136**, 48-64.
- Beintema, J. J., Fitch, W. M. i Carsana, A. (1986) *Mol. Biol. Evol.* **3**, 262-275.
- Beintema, J. J., Blank, A., Schieven, G. L., Dekker, C. A., Sorrentino, S. i Libonati, M. (1988a) *Biochem J.*, **255**, 501-505.
- Beintema, J. J., Hofsteenge, J., Iwama, M., Morita, T., Ohgi, K., Irie, M., Sugiyama, R. H., Schieven, G. L., Dekker, C. A. i Glitz, D. G. (1988b) *Biochemistry* **27**, 4530-4536.
- Beintema, J. J., Schüller, C., Irie, M. i Carsana, A. (1988c) *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **51**, 165-192.
- Bello, J., Ijima, H. i Kartha, G. (1979) *Peptide Protein Res.* **14**, 199-212.
- Benner, S. A. (1988) *FEBS Lett.* **233**, 225-228.
- Benner, S.A., i Allemann, R. K. (1989) *TIBS* **14**, 396-397.

Bibliografia

- Bernfield, M. R. (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 4753-4762.
- Better, M., Chang, C. P., Robinson, R. R. i Horwitz, A. H. (1988) *Science* **240**, 1041-1043.
- Birnboim, H. C. i Doly, J. (1979) *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Blackburn, P. i Moore, S. (1982) *The Enzymes* (Ed. Boyer P. D.) **15**, 317-433. Academic Press, New York.
- Blanchin-Roland, S. i Masson, J. M. (1989) *Prot. Engineering* **2**, 473-480.
- Blanck, A., Sugiyama, R. H. i Dekker, C. A. (1982) *Anal. Biochem.* **120**, 267.
- Blank, A. i Dekker, C. A. (1977) *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **36**, 907-911.
- Bloom, H., Beier, H. i Gross, H. J. (1987) *Electrophoresis* **8**, 93-97.
- Borkakoti, N., Moss, D. S. i Palmer, R. A. (1982) *Acta Crystallogr.* **38**, 2210-2217.
- Borkakoti, N., Palmer, R. A., Haneef, I. i Moss, D. S. (1983) *J. Mol. Biol.* **169**, 743-755.
- Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 248-252.
- Bravo, J., Ribó, M., Fernández, E., De Llorens, R. i Cuchillo, C. M. (1994). *Anal. Biochem.*, in press.
- Breslow, R. (1991) *Acc. Chem. Res.* **24**, 317-324.
- Breslow, R., Anslyn, E. i Huang, D.-L. (1991) *Tetrahedron* **47**, 2365-2376.
- Breukelman, H. J., Beintema, J. J., Confalone, E., Costanzo, C., Sasso, M. P., Carsana, A., Palmieri, M., i Furia, A. (1993) *J. Mol. Evol.* **37**, 29-35.
- Brown, D. M. i Todd, A. R. (1953) *J. Chem. Soc.* **52**, 2040-2049.
- Bruix, M., Rico, M., González, C., Neira, J. L., Santoro, J. i Rüterjans, H. (1991) *A Structure, Mechanism and Function of Ribonucleases* (Cuchillo i col eds) pp. 15-20, IBF Publicacions, U. A. B., Bellaterra.
- Cannistraro, V. J., i Kennell, D. (1989) *Eur. J. Biochem.* **181**, 363-370.
- Carlisle, C. H., Palmer, R. A. Mazumdar, S. K., Gorinsky, B. A. i Yates, D. G. R. (1974) *J. Mol. Biol.* **85**, 1-18.
- Carsana, A., Confalone, F., Palmieri, M., Libonati, M. i Furia (1988) *Nucl. Acids Res.* **16**, 5491-5502.
- Casadaban, M. J. i Cohen, S. N. (1980) *J. Mol. Biol.* **138**, 179-207.
- Chapman, A., Li, E. i Kornfeld, S. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 10243-10248.
- Chelladurai, B. S., Li, H. L. i Nicholson, A. W. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 1759-1766.
- Chen, S. M., Takiff, H. E., Barber, A. M., Dubois, G. C., Bardwell, J. C. i Court, D. L. (1990) *J. Biol. chem.* **265**, 2888-2895.
- Chu, F. K. i Maley, F. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 6392-6397.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. i Hsu, L. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci* **69**, 2110.
- Confalone, E., Carsana, A., Sasso, M. P., Palmieri, M., Sorrentino, S., Libonati, M. i Furia, A. (1989) *A Structure and Chemistry of Ribonucleases* (Pavlovsky A. & Polyakov, K. eds) pp. 110-117, Moscú.

Bibliografia

- Cuchillo, C. M. i Nogués, M. V. (1993) Chemistry, Biology, Biotechnology, 3rd International Meeting, Capri, Italy.
- Cuchillo, C. M., Parés, X., Guasch, A., Barman, T. E., Travers, F. i Nogués, M. V. (1993) FEBS Lett., **333**, 207-210.
- Coombes, E. J., Shakespeare, P. G. i Balstone, G. F. (1977) Clinica Chim. Acta **79**, 271-276.
- Cousens, S.L., Shuster, J. R., Gallegos, C., Ku, L., Stempien, M. M., Urdea, M. S., Sanchez-Pescador, R., Taylor, A. i Tekamp-Olson, P. (1987) Gene **61**, 265-275.
- Cranston, J. W., Perini, F., Crisp, E. R. i Hixson, C. W. (1980) Biochim. Biophys. Acta **616**, 239-258.
- Crouch, R. J. i Dirksen, M.-L. (1982) in Nucleases (Linn, S. M., i Roberts, R. J., eds) pp. 211-241, Cold Spring Harbor, NY.
- D'Aquila, R. T. i Summers, W. C. (1989) J. Acquired Immune Deficiency Syndromes **2**, 579-587.
- Dagert, M. i Ehrlich, S. D. (1974) Gene **6**, 23-28.
- Day, A. G., Parsonage, D., Ebel, S., Brown, T. i Fersht, A. R. (1992) Biochemistry **31**, 6390-6395.
- De Baetselier, A., Vasavada, A., Dohet, P., Ha-Thi, V., De Beukelaer, M., Epicum, T., De Clerck, L., Hanotier, J., i Rosenberg, S. (1991) Biotechnology **9**, 559-561.
- del Cardayre, S.B., Ribó, M., Quirk, D. J., Rutter, W. J., Raines, R. T. (1994) Biochemistry (en valoració).
- De Llorens, R., Arús, A., Parés, X. i Cuchillo, C. M. (1989) Protein Eng. **2**, 417-429.
- De Nigris, M., Russo, N., Picoli, R., D'Alessio, G. i Di Donato, A (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. **193**, 155-160.
- De Prisco, R., Sorrentino, S., Leone, E. i Libonati, M. (1984) Biochim. Biophys. Acta **788**, 356-363.
- Delaney, R. (1963) Biochemistry **2**, 438-444.
- Deutscher, M. P. (1988) TIBS **13**, 136-139.
- Deutscher, M. P. (1993) J. Biol. Chem. **268**, 13011-13014.
- Dickman, S. R., White, L. H. i Mason, J. O. (1958) Arch. Biochem. Biophys. **74**, 476-481.
- Doran, G., Allen-Mersh, T. G. i Reynolds, K. W. (1980) J. Clin. Pathol. **33**, 1212-1213.
- Doscher, M. S. i Richards, F. M. (1963) J. Biol. Chem. **238**, 2399-2406.
- Dubos, R. J. i Thompson, R. H.S. (1938) J. Biol. Chem. **124**, 501.
- Eftink, M. R. i Biltonen, R. L. (1983) Biochemistry **22**, 5123-5134.
- Eftink, M. R. i Biltonen, R. L. (1987) A Hydrolytic enzymes, Elsevier Science Publishers (Amsterdam, New York and Oxford) **7**, 333-375.
- Embury, S. H., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Gholson, M. A., Golbus, M., Arnheim, N. i Erlich, H. A. (1987) N. Engl. J. Med. **316**, 656-661.
- Erhart, E. i Hollenberg, C. P. (1983) J. Bact. **156**, 625-635.
- Fankuchen, I. (1941) J. Gen. Physiol. **24**, 315-316.

Bibliografia

- Fernández, E., Fallon, M.J.M., Frazier, M.L. de Llorens, R. i Cuchillo, C.M. (1994) *Cancer* **73**, 2285-2295.
- Findlay, D., Herries, D. G., Mathias, A. P., Rabin, B. R. i Ross, C. A. (1961) *Nature* **190**, 781-785.
- Findlay, D., Herries, D. G., Mathias, A. P., Rabin, B. R. i Ross, C. A. (1962) *Biochem. J.* **85**, 152-153.
- Fitch, W. M. i Beintema, J. J. (1990) *Mol. Biol. Evol.* **7**, 438-443.
- Francesconi, M., Meryn, S. i Moser, K. (1981) *J. Clin. Chem. Biochem.* **19**, 17-20.
- Frank, J. J. i Levy, C. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 5745-5751.
- Fujimura, T., Tanaka, T., Ohara, K., Morioka, H., Uesugi, S., Ikehara, M. i Nishikawa, S. (1990) *FEBS Lett.* **265**, 71-74.
- Fuller, R. S., Brake, A. i Thorner, J. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1434-1438.
- Gahl, W. A., Chesney, J. i Pitot, H. C. (1978) *Biochem. Med.* **19**, 294-297.
- Gavel, Y. i Von Heijne, G. (1990) *Protein Eng.* **3**, 433-442.
- Gheysen, D., Iserentent, D., Derom, C., i Fiers, W. (1982) *Gene* **17**, 55-63.
- Ghrayeb, J., Kimura, H., Takahara, M., Hsiang, H., Masui, Y. i Inouye, M. (1984) *EMBO J.* **3**, 2437-2442.
- Gibson, T. J. (1984) "Studies on the Epstein-Barr Virus Genome". Ph.D. Thesis, Cambridge University, England.
- Gleich, G. J., Loegering, D. A., Bell, M. P., Checkel, J. L., Ackerman, S. J. i McKean, D. J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3146-3150.
- Gold, L. (1990) *Methods Enzymol.* **185**, 11-14.
- Gordon-Beresford, R., Coulombeau, C. i Wodak, S. J. (1991) *A Structure, Mechanism and Function of Ribonucleases* (Cuchillo i col. eds) pp. 83-84, IBF Publicacions, U. A. B., Bellaterra.
- Grefrath, S. P. i Reynolds, J. A. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 3913-3916.
- Guasch, A., Travers, F., Barman, T., Fallon, M. J. M., de Llorens, R. i Cuchillo, C. M. (1989a) *A Structure and Chemistry of Ribonucleases* (Pavlovsky, A. ad Polyakov, K. eds) pp. 137-143, Moscú.
- Guasch, A., Barman, T., Travers, F. i Cuchillo, C. M. (1989b) *J. Chromatography* **473**, 281-286.
- Guillemette, J. G., Matsushima-Hibiya, Y., Atkinson, T. i Smith, M. (1991) *Prot. Engineering* **4**, 585-592.
- Gutte, B., i Merrifield, R.B. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 1922-1941.
- Haar, W., Maurer, W., i Rüterjans, H. (1985) *Eur. J. Biochem.* **44**, 201-211.
- Hahn, U., Desai-Hahn, R. i Rüterjans, H. (1985) *Eur. J. Biochem.* **146**, 705-712.
- Hahn, U. i Rüterjans, H. (1985) *Eur. J. Biochem.* **152**, 481-491.
- Hall, M. N., Gabay, J. Débarbouillé, M. i Schwartz M. (1982) *Nature* **295**, 616-618.
- Hartley, R. W. (1988) *J. Mol. Biol.* **202**, 913-915.
- Hasan, N., Kim, S. C., Podhajaska, A. J. i Szybalski, W. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 10352.

Bibliografia

- Haugg, M., Holliger, K.P., Hemmi, S. i Schein, C (1990) (Abst.) *Experientia* **46**, A15.
- Haugg, M., i Schein, C. H. (1992) *Nucleic Acid Res.* **20**, 612.
- Heppel, L.A., Whitfiel, P.R. i Markham, R. (1955) *Biochem J.* **60**, 8-15.
- Hermes, J. D. i Knowles, J. R. (1987) *Proceedings of the Robert A. Welch Foundation XXI, Design of Enzymes and Enzyme Models*, pp 207-226. Robert A. Welch Foundation, Houston, TX.
- Hersovics, A. i Orleans, P. (1993) *FASEB J.* **7**, 540-550.
- Hill, C., Dodson, G., Heinemann, U., Saenger, W., Mitsui, Y., Nakamura, K., Borisov, S., Tischenko, G., Polyakov, K. i Pavlovsky, S. (1983) *Trends Biochem. Sci.* **8**, 364-369.
- Hill, J., Donald, K. A. I. G. i Griffiths, D. E. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 5791.
- Hinnen, A., Hicks, J. B. i Fink, G. R. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1929-1933.
- Hirs, C. H. W. (1962) *Brokhaven Symposia in Biology* **15**, pp. 154-183.
- Hitoi, A., Yamashita, K., Niwata, Y., Irie, M., Kochibe, N. i Kobata, A. (1987) *J. Biochem.* **101**, 29-41.
- Houck, J. C., i Berman, L. B. (1958) *J. Appl. Physiol.* **12**, 473-480.
- Humphrey, R. L., Karpetsky, T. P., Neuwelt, E. A. i Levy, C. C. (1977) *Cancer Res.* **37**, 2015-2022.
- Irie, M., Mikami, F., Monma, K., Ohgi, K., Watanabe, H., Yamaguchi, R. i Nagase, H. ((1984) *J. Biochem. (Tokyo)* **96**, 89-96.
- Isaacs, P. (1981) *Digestion* **22**, 101-107.
- Iserentant, D. i Fiers, W. (1980) *Gene* **9**, 1-12.
- Ish-Horowicz, D. i Burke, J. F. (1981) *Nucleic Acid Res.* **9**, 2989
- Isobe, K. i Uchiyama, S. (1986) *J. Biochem. Biophys. Meth.* **12**, 299.
- Itaya M. i Kondo, K. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 4443-9.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. i Kimura, A. (1983) *J. Bacteriol.* **153**, 163-168.
- Iwama, M., Kunihiro, M., Ohgi, K. i Irie, M. (1981) *J. Biochem.* **89**, 1005-1016.
- Jensen, D. E. i von Hippel, P. H. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 7198-7214.
- Jones, W. (1920) *Am. J. Physiol.* **52**, 203-207.
- Kamerling, J.P., Gerwig, G.J., Vliegenthart, J.F.G. i Clamp, J.R. (1975) *Biochem. J.* **151**, 491-495.
- Karpetsky, T. P., Humphrey, R. L. i Levy, C. C. (1977) *J. Natl. Cancer Inst.* **58**, 875-880.
- Kartha, G., Bello, J. i Harker, D. (1967) *Nature* **213**, 862-865.
- Kim, E. E., Varadarajan, R., Wyckoff, H. W. i Richards, F. M. (1992) *Biochemistry* **31**, 12304-12314.
- Kim., J. S. i Raines, R. T. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 17392-17396.
- Klenova, E. M., Botezato, I., Laudet, V., Goodwin, G. H., Wallace, J. C. i Lobanenkov, V. V. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**, 231-239.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I. i Khorana, H. G. (1971) *J. Mol. Biol.* **56**, 341-361.

Bibliografia

- Kunitz, M. (1940) *J. Gen. Physiol.* **24**, 15-32.
- Kurihara, M., Ogawa, M., Ohta, T., Kurokawa, E., Kitahara, T., Kosaki, G., Watanabe, T. i Wada, A. (1982) *Cancer Res* **42**, 4836-4841.
- Kurihara, M., Ogawa, M., Ohta, T., Kurokawa, E., Kitahara, T., Murata, A., Matsuda, K., Kosaki, G., Watanabe, T. i Wada, H. (1984) *Cancer Res.* **44**, 2240-2247.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature*, **227**, 680-685.
- Laity, J. H., Shimotakahara, S. i Scheraga, H. A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 615-619.
- Lang, K., Wrba, A., Krebs, H., Schmid, F. X. i Beintema, J.J. (1986) *FEBS Lett.* **204**, 135-139.
- Lasater, L. S. i Eichler, D. C. (1984) *Biochemistry* **23**, 4367-4373.
- Lawrence, C. W., Little, P. A., Little, B. W., Miller, M. J., Bazel, S. i Alhadeff, J. A. (1993a) *Glycobiol.* **3** (3), 241-248.
- Lawrence, C. W., Little, P. A., Little, B. W., Glushka, J., van Halbeek, H. i Alhadeff, J.A. (1993b) *Glycobiology* **3** (3), 249-259.
- Leach, B. S., Collawn, J. F. Jr. i Fish, W. W. (1980) *Biochemistry* **19**, 5734-5741.
- Lennarz, W. J. (1987) *Biochemistry* **26**, 7205-7211.
- Lenstra, J. A., Hofsteenge, J. i Beintema, J. J. (1977) *J. Mol. Biol.* **109**, 185-193.
- Levy, A. L. i Rottino, A. (1959) *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **2**, 327-331.
- Levy, A. L. i Rottino, A. (1960) *Clin. Chimica Acta* **6**, 43-51.
- Li, X., Trinh, K. Y. i Hew, C. L. (1991) *Protein Enging.* **4**, 995-1002.
- Libonati, M., Furia A. i Beintema, J. J. (1976) *Eur. J. Biochem.* **69**, 445-451.
- Lorson, G., Vidal, A., Findeli, A., Roitsch, C., Balloul, J. M. i Lemoine, Y. (1989) *Yeast* **5**, 497-507.
- Marchiori, F., Borin, G. i Moroder, L. (1974) *Int. J. Peptide Res.* **6**, 419-434.
- Markham, R. i Smith, J. D. (1952a) *Biochem. J.* **52**, 552-557.
- Markham, R. i Smith, J. D. (1952b) *Biochem. J.* **52**, 552-565.
- Markham, R. i Smith, J. D. (1952c) *Biochem. J.* **52**, 565-571.
- Matheson, R. R. i Scheraga, H. A. (1978) *Macromolecules* **11**, 819-829.
- Matousek, J. (1973) *Experientia* **29**, 858-859.
- Mazzarella, L., Capasso, S., Demasi, D., Dilorenzo, G., Mattia, C. A. i Zagari, A. (1993) *Acta Crystallogr.* **D49**, 389-402.
- McDonald, M. R. (1948) *J. Gen. Physiol.* **32**, 33-37.
- McGeehan, G. i Benner, S. A. (1989) *FEBS Lett.* **247**, 55-56.
- Meador, J., III, Cannon, B., Cannistraro, V. J. i Kennell, D. (1990) *Eur. J. Biochem.* **187**, 549-553.
- Meadows, D. H. i Jardetzky, O. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **61**, 403-413.
- Meadows, D. H., Roberts, G. C. K. i Jardetzky, O. (1969) *J. Mol. Biol.* **45**, 491-511.

Bibliografia

- Meilhoc, E., Masson, J.-M. i Tessie, J. (1990) *Bio Technology* **8**, 223-227.
- Migliarese, J. F. (1958) *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **2**, 327-331.
- Mizuta, K., Awazu, S., Yasuda, T. i Kishi, K. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.*, **281**, 144-151.
- Molina, M. A., Avilés, F. X. i Querol, E. (1992) *Gene* **116**, 129-138.
- Mossakowska, D., Nyberg, K. i Fersth, A. R. (1989) *Biochemistry* **28**, 3843-3850.
- Mu, J. i Kao, T. H. (1992), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 299-304.
- Mullis, K. B., Faloona, F., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Horn, G. T. i Erlich, H. A. (1986) *Cold spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-273.
- Nakamaye, K. i Eckstein, F. (1986) *Nucl. Acids Res.* **14**, 9679-9698.
- Nambiar, K. P., Stackhouse, J., Presnell, S. R. i Benner, S. A. (1987) *Eur. J. Biochem.* **163**, 67-71.
- Nambiar, K. P., Stackhouse, J., Stauffer, D. M., Kennedy, W. P., Eldredge, J. K. i Benner, S. A. (1984) *Science* **223**, 1299-1301.
- Naskalski, J. i Sznajd, J. (1967) *Nature* **215**, 414-415.
- Neuwelt, E. A., Frank, J. J. i Levy, C. C. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 5752-5758.
- Neuwelt, E. A., Schmuckler, M., Niziak, M. S., Jewett, P. B. i Levy, C. C. (1977) *Biochem. J.* **163**, 419-426.
- Neuwelt, E. A., Boguski, M. S., Frank, J. J. Procter-Appich, K. i Levy, C. C. (1978) *Cancer Res.* **38**, 88-93.
- Newton, D. L., Illercil, O., Laske, D. W., Oldfield, E., Rybak, S. M. i Youle, R. J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**:19572-8.
- Nitta, Y., Mizushima, M., Hiromi, K. i Ono, S. (1971) *J. Biochem. (Tokyo)* **69**, 567-576.
- Niwata, Y., Ohgi, K., Sanda, A., Takizawa, Y. i Irie, M. (1985) *J. Biochem. (Tokyo)* **97**, 923-934.
- Osset, M., Piñol, M., Fallon, M. J. M., De Llorens, R. i Cuchillo, C. M. (1989) *Electrophoresis*, **10**, 271-273
- Osset, M. (1991) *Tesi Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.*
- Osterman, H. L. i Walz, F. G. (1979) *Biochemistry* **18**, 1984-1988.
- Paddon, C. J. i Hartley, R. W. (1987) *Gene* **53**, 11-19.
- Palmer, R. A., Moss, D. S., Haneef, I. i Borkakoti, N. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **785**, 81-88.
- Palmieri, M., Carsana, A., Furia, A. i Libonati, M. (1985) *Eur. J. Biochem.* **152**, 275-277.
- Parés, X., Nogués, M. V., De Llorens, R. i Cuchillo, C. M. (1991) *Essays in Biochemistry* **24**, 89-103.
- Pascual, R., Burgos, F. J., Salvà M., Soriano, F., Méndez, E. i Avilés, F. X. (1989) *Eur. J. Biochem.* **179**, 609-616.
- Peterson, L. M. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 2630--2634.
- Plummer, T. H. i Hirs, C. H. W. (1964) *J. Biol. Chem.* **239**, 2250.
- Presnell, S. R. i Benner, S. A. (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**, 1693-1702.

Bibliografia

- Preuss, K. D., Wagner, S., Freudenstein, J. i Scheit, K. H. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 1057.
- Puett, D. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 3566-3572.
- Purvis, I. J., Bettany, A. J. E., Loughlin, L. i Brown, A. J. P. (1987) *Nucleic acids Res.* **15**, 7963-7974.
- Quass, R., McKeown, Y., Stanssens, P., Frank, R., Blöcker, H. i Hahn, U. (1988) *Eur. J. Biochem.* **173**, 617-622.
- Raines, R. T. i Rutter, W. J. (1989) *A Structure and Chemistry of Ribonucleases* (Pavlovsky, A. i Polyakov, K. eds) pp. 95-100, Moscú.
- Rabin, E. Z., Weinberger, V. i Tattrie, B. (1977) *Clin. Chimica Acta* **78**, 235-242.
- Reddi, K. K., (1966) *Procedures in Nucleic Acids Research* (Eds. Cantoni, G. L. i Davis, D. R., Harper and Row Publishers, New York, pp. 71-78.
- Reddi, K. K. i Hollan, J. F. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 2308-2310.
- Reddi, K. K. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **79** (2), 532-538.
- Reddi, K. K. i Dreiling, D. A. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104** (1), 14-21.
- Richards, F. M. i Wyckoff, H. W. (1971) *The Enzymes* (Ed. Boyer P.D.) **4**, 647-806. Academic Press, New York.
- Rico, M., Bruix, M., Santoro, J. González, C., Neira, J. L., Nieto, J. L. i Herranz, J. (1989) *Eur. J. Biochem.* **183**, 623-638.
- Roberts, G. C. K., Dennis, E. A., Meadows, D. H., Cohen, J. S. i Jardetzky, O. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **62**, 1151-1158.
- Robertson, A. D., Purisima, E. O., Eastman, M. A. i Scheraga, H. A., (1989) *Biochemistry* **28**, 5930-5938.
- Rothwarf, D. M. i Scheraga, H. A. (1993a) *Biochemistry* **32**, 2671-2679.
- Rothwarf, D. M. i Scheraga, H. A. (1993b) *Biochemistry* **32**, 2680-2689.
- Rothwarf, D. M. i Scheraga, H. A. (1993c) *Biochemistry* **32**, 2690-2697.
- Rothwarf, D. M. i Scheraga, H. A. (1993d) *Biochemistry* **32**, 2698-2703.
- Russo, N., De Nigris, M., Ciardiello, A., Di Donato, A., i D'Alessio, G. (1993) *FEBS Lett.* **318**, 242-244.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H. A. i Arnheim, N. (1985) *Science* **230**, 1350-1354.
- Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B. i Erlich, H. A. (1986) *Nature (Lond.)* **324**, 163-166.
- Salkowski, E. (1889) *Z. Physiol. Chem.* **13**, 506.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989, *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2^a Ed. CSH Lab. Press, New York.
- Sanger, F. i Coulson, A. R. (1978) *FEBS Lett.* **87**, 107-110.
- Sanger, F., Nicklen, S. i Coulson, a. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Santoro, J. González, C., Bruix, M., Neira, J. L., Nieto, J. L., Herranz, J. i Rico, M. (1993) *J. Mol. Biol.* **229**, 722-734.

Bibliografia

- Sasso, M. P., Carsana, A., Confalone, E., Cosi, C., Sorrentino, S., Viola, M., Palmieri, M., Russo, E. i Furia, A. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 6469-6474.
- Saxena, P. i Wetlanfer, D. B. (1970) *Biochemistry* **9**, 5010-5019.
- Sayers, J. r., Schmidt, W. i Eckstein, F. (1988) *Nucl. Acids Res.* **16**, 791-802.
- Schein, C. H., Boix, E., Haugg, M., Holliger, K. P., Hemmi, S., Frank, G. i Schwalbe, H. (1992) *Biochem. J.* **283**, 137-144.
- Scheraga, H. A. i Rupley, J. A. (1962) *Advances in Enzymology* (Nrod, F. F. ed.) vol. 24, pp. 161-261. John Wiley and Sons, New York.
- Schieven, G. L., Blank, A. i Dekker, C. A. (1982) *Biochemistry* **21**, 5148-5155.
- Schleich, H. G., Matzku, s. i weist, W. (1981) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **99**, A50-A51.
- Schmuckler, M., Jewett, P. B. i Levy, C. C. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 2206-2212.
- Schüller, C., Nijssen, H. M. J., Kok, R. i Beintema, J. J. (1990) *Mol. Biol. Evol.* **7**, 29-44.
- Schultz, D. A. i Baldwin, R. L. (1992) *Protein Science* **1**, 910-916.
- Shapiro, R., Fett, J. W., Strydom, D. J. i Vallee, B. L. (1986) *Biochemistry*, **25**: 7255-64.
- Shapiro, R., Harper, W., Fox, E. A., Jansen, H.-W., Hein, F. i Uhlmann, E. (1988) *Anal. Biochem.* **175**, 450-461.
- Shenkin, A., Citrin, D. L. i Rowan, R. M. (1976) *Clin. Chimica Acta* **72**, 223-231.
- Sierakowska, H. i Shigar, D. (1977) *Prog. Nucleic Acids Res. Molec. Biol.* **20**, 59-130.
- Simonson, T. i Brünger, A. T. (1992) *Biochemistry* **31**, 8661-8674.
- Sjölin, L., Wlodawer, A., Bergqvist, G., Holm, P., Loth, K., Malmström, H., Zaar, J., Svensson, L. A. i Gilliland, G. L. (1991) *J. Crystal Growth* **110**, 322-332.
- Smyth, D. G., Stein, W. H. i Moore, S. (1963) *J. Biol. Chem.* **238**, 227-234.
- Sommerville, L. L., i Wang, K. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **102**, 53.
- Sorrentino, S., Kapor Tucker, G i Glitz, D. G. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 16125-16131.
- Sorrentino, S. i Glitz, D. G. (1991) *FEBS Lett.* **288**, 23-26.
- Stevens, A. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 3080-3085.
- Steyaert, J., Hallenga, K., Wyns, L. i Stanssens, P. (1990) *Biochemistry* **29**, 9064-9072.
- Strecker, G. i Montreuil, J (1979) *Biochimie* **61**, 1199-1246.
- Struyvé, M., Bosch, D., Visser, J. i Tommassen, J. (1993) *FEMS Microbiology Letters* **109** (1993), 173-178.
- Strydom, D. J., Fett, J. W., Lobb, R. R., Alderman, E. M., Bethune, J. L., Riordan, J. F. i Vallee, B. I. (1985) *Biochemistry* **24**, 5486-5494.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. i Dudenorff, J. W. (1990) *Methods Enzymology* **185**, 60-89.
- Sugiyama, R. H. Blank, A. i Dekker, C. A. (1981) *Biochemistry* **20**, 2268-2274.
- Summers, R. G., Harris, Ch. R., i Knowlves, J. R. (1989a) *J. Biol. Chem.* **264**, 20082-20088.

Bibliografia

- Summers, R. G., i Knowles, J. R. (1989b) *J. Biol. Chem.* **264**, 20074-20081.
- Svensson, L. A., Sjölin, L., Gilliland, G. L., Finzel, B. C. i Wlodawer, A. (1986) *Struct. Funct. Genet.* **1**, 370-375.
- Sznajd, J. (1972) *Folia Med. Cracow* **14**, 297-333.
- Taborsky, G. (1959) *J. Biol. Chem.* **234**, 2652-2656.
- Takahashi, K. i Moore, S. (1982) *The Enzymes* (Boyer, P. D., ed) Vol. XV, part B, pp. 435-468, Academic Press, Orlando, F. L.
- Tarragona-Fiol, A., Taylorson, C. J., Ward, J. M. i Rabin, B. R. (1992) *Gene* **118**, 239-245.
- Taylor, J. W. et al. (1985), *Nucl. Acids, Res.*, pp. 8749-8764.
- Taylor, J. W., Ott, J. i Eckstein, F. (1985) *Nucleic Acids Res.* **13**, 8764-8785.
- Tilton, R. F., Dewan, J. C. i Petsko, G. A. (1992) *Biochemistry* **31**, 2469-2481.
- Trautwein, K. i Benner, S. A. (1991) *A Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering* (Elsevier Science Publishers, El-Gewely, W. R. ed.) pp. 53-61.
- Ukita, T., Takahashi, T., Waku, K. i Hoshino, O (1964) *J. Biochem. (Tokyo)* **55**, 293-300.
- Umeda, T., Morijama, T., Oura, H. i Tsukada, K. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* **171**, 260-265.
- Usher, D. A., Richardson, D. I. i Eckstein, F. (1970) *Nature* **228**, 663-665.
- Varadarajan, R. i Richards, F. M. (1992) *Biochemistry* **31**, 12315-12327.
- Vasanth, N. i Filpula, D. (1989) *Gene* **76**, 53-60.
- Vescia, S., Tramontano, D., Augusti-Tocco, G., D'Alessio, G. (1980) *Cancer Res.* **40**, 3740-3744.
- Vicentini, A. M., Hemmings, B. A. i Hofsteenge, J. (1994) *Protein Science* **3**, 459-466.
- Von Heijne, G. (1986) *J. Mol. Biol.* **192**, 287-290.
- Warshaw, A. L. i Lee, K. H. (1979) *Surgery* **86**, 227-229.
- Watson, M. E. E. (1984) *Nucl. Acids Res.* **12**, 5145-5164.
- Weickmann, J. L., Elson, M. S. i Glitz, D. G. (1981) *Biochemistry*, **20**, 1272-1278.
- Weickmann, J. L. i Glitz, D. G. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 8705-8710.
- Weickmann, J. L., Olson, E. M., i Glitz, D. G. (1984) *Cancer Res.* **44**, 1682-1696.
- Wieker, H. J. i Witzel, H. (1967) *Eur. J. Biochem.* **1**, 251-258.
- Witzel, H. i Barnard, E. A. (1962) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **7**, 289-294.
- Wlodawer, A., Bott, R. i Sjölin, L. (1982). *J. Biol. Chem.* **257**, 1325-1332.
- Wlodawer, A. i Sjölin, L. (1983) *Biochemistry* **22**, 2720-2728.
- Wlodawer, A., Svensson, L. A., Sjölin, L. i Gilliland, G. (1988) *Biochemistry* **27**, 2705-2717.
- Wodak, S. Y., Liu, M. Y. i Wyckoff, H. W. (1977) *J. Mol. Biol.* **116**, 855-875.
- Wyckoff, H. W., Hardman, K. D., Allewell, N. M., Inagami, T., Johnson, L. N. i Richards, F. M. (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 3984-3988.

Bibliografia

- Wyckoff, H., Tsernoglou, D., Hanson, A., Knox, J., Lee, B. i Richards, F. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 305-328.
- Yamane, K., i Mizushima, S. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 19690-19696.
- Yamashita, K., Hitoi, A., Irie, M. i Kobata, A. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.*, **250**, 263-266.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. i Messing, J. (1985) *Gene* **33**, 103-119.
- Yasuda, T., Mizuta, K. i Kishi, K. (1990a) *Arch. Biochem. Biophys.* **279**, 130-137.
- Yasuda, T., Mizuta, K., Sato, W. i Kishi, K. (1990b) *Eur. J. Biochem.* **191**, 523-9.
- Yasuda, T., Nadano, D., Takeshita, H., i Kishi, K. (1993) *Biochem. J.* **296**:617-625.
- Zhou, A., Hassel, B. A. i Silverman, R. H. (1993) *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* (1993) **34**, A2971.
- Zhou, H. M. i Strydom D. J. (1993) *Eur. J. Biochem.* **217**, 401-410.
- Zhu, L. Q., Gangopadhyay, T., Padmanabha, K. P. i Deutscher, M. P. (1990), *J. Bacteriol.* **172**, 3146-51.
- Zilhao, R., Camelo, L. i Arraiano, C. M. (1993) *Mol. Microbiol.* **8**, 43-51.
- Zittle, C. A. i Reading, E. H. (1945) *J. Biol. Chem.* **160**, 519-525.

APÈNDIX

Short Communication

Heterogeneity in the Glycosylation Pattern of Human Pancreatic Ribonuclease

Marc Ribó^{1,2}, Jaap J. Beintema^{3,*}, Miguel Osset¹, Ester Fernández¹, Jerónimo Bravo¹, Rafel De Llorens^{1,2} and Claudi M. Cuchillo^{1,2}

¹ Institut de Biologia Fonamental "V. Villar Palasí"

² Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

³ Biochemisch Laboratorium, Rijksuniversiteit, Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen, The Netherlands

* Corresponding author

Different molecular forms of ribonuclease were isolated from fresh human pancreas obtained from healthy transplant donors. The purification procedure consists of the preparation of an acetone powder, followed by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation and two chromatography steps (cationic exchange and reversed-phase). Protein bands in gel electrophoresis with RNAase activity were monitored using a negative-staining zymogram technique. Several glycosylated enzyme forms with apparent molecular masses ranging from 14 to 40 kDa were separated. Peptides containing the three Asn-Xaa-Thr/Ser acceptor sites for glycosylation were isolated and analysed. The site with Asn-34 was almost completely glycosylated, while the sites with Asn-76 and Asn-88 had carbohydrate in about half and a minor part of the molecules, respectively. The carbohydrate compositions of the glycopeptides are different from those of the same gene product isolated from human urine. C-Terminal threonine was present in part of the molecules, indicating partial degradation by carboxypeptidase.

Key words: Glycosylation / Human ribonuclease / Pancreatic ribonuclease.

There is a wealth of literature on the purification and characterization of ribonucleases (RNAases; EC 3.1.27.5) from different human organs, body fluids and cells (for reviews see Weickmann *et al.*, 1981, and Beintema *et al.*, 1988b). The first evidence that the primary structure of secretory RNAases from pancreas and other tissues are identical was obtained by Beintema *et al.* (1988a). Not only similar properties and structural characteristics, but also the fact that only one gene for secretory RNAase can be detected in human DNA by southern blotting (Breukelman *et al.*,

1993) indicates that all human secretory RNAases are products of the same gene. The amino acid sequence derived from the DNA sequence of this enzyme (Haugh and Schein, 1992) is identical to the previously determined protein sequence (Beintema *et al.*, 1984). However, differential posttranslational processing occurs. The enzyme from human pancreas was claimed to differ from those from urine and semen in the absence of the C-terminal threonine residue. The glycosylation pattern of the three Asn-Xaa-Thr/Ser sites in these proteins is also different (Beintema *et al.*, 1988a). Each of the three sites is glycosylated with complex-type oligosaccharide chains in the urine enzyme, while in the human pancreatic and seminal enzymes, carbohydrate attached to only one of the sites in about half of the molecules and with a low level of glycosylation was found (Beintema *et al.*, 1984). Carbohydrate analysis of the secretory kidney enzyme suggests a similar sugar content as occurs in the glycosylated component of the pancreatic enzyme, except for galactose, of which only a trace was found in the enzyme from human kidney (Mizuta *et al.*, 1990). While no carbohydrate-free RNAase was found in human kidney (Mizuta *et al.*, 1990), about half of the enzymes from seminal plasma (De Prisco *et al.*, 1984) and cerebrum (Yasuda *et al.*, 1993) are non-glycosylated.

Using isoelectric focusing, pancreatic juice was studied by Thomas *et al.* (1984), and multiple zones of RNAase activity in both acid and basic regions that reduced to a single band after treatment with neuraminidase were found at pH 9.5. These authors concluded that the bands were associated with different patterns of glycosylation specially with respect to the sialic acid content. Pancreatic RNAase from fresh tissue was also analyzed using lectin affinity chromatography (Yamashita *et al.*, 1986), and it was shown that 93% of human pancreatic RNAase is glycosylated though no specification about the extent of glycosylation was reported. Because of contradictory results about glycosylation, specially between human pancreatic juice RNAase and human RNAase from whole pancreas, we decided to re-investigate the heterogeneity of the human pancreas RNAase glycosylation pattern using fresh glands and to separate the different fractions as a function of their sugar content in order to analyse their chemical composition. Recently Russo *et al.* (1993) reported the expression of partially glycosylated human pancreatic RNAase in a heterologous eukaryotic system. For understanding the relevance of such studies we have to know the *in vivo* posttranslational modifications which

these proteins undergo in their natural surroundings, also if they can only be isolated in minute amounts.

The purification of a typical human pancreatic RNAase preparation is summarized in Table 1. Several purification runs were carried out all showing, essentially, the same pattern (Figure 1). Overall yields were about 20–25% of initial RNAase activity with purifications over 10 000 fold from the homogenate and a final specific activity (2×10^5

units/mg of protein), equivalent to that of re-purified commercial bovine pancreatic RNAase using the same assay. Reversed-phase rechromatography of fractions A to G (Figure 1B) under the same conditions showed that they are chromatographically homogeneous. However, several active bands are still detected in most of the fractions both in polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) stained with Co-

Table 1 Typical Purification of Human Pancreatic RNAase Using a Neutral Extraction Procedure.

Human pancreas were obtained from healthy transplant donors killed in accident (Transplantation Unit of the Hospital Clínic i Provincial de Barcelona) and no selection based on sex, race or age was made. The organs were perfused and intensively cleaned with physiological serum to avoid the presence of RNAases from contaminating biological fluids. The purification process was carried out immediately after removal of the adipose tissue. About 8 g of acetone powder (corresponding to one pancreas), was obtained as described (Pascual *et al.*, 1989) and dissolved in 300 ml of 10 mM Tris/HCl buffer pH 8.0, and gently stirred for 2–3 h at 4 °C. The precipitate was removed by centrifugation at $9,100 \times g$ for 30 min. The supernatant was brought to 75% saturation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (516 g/l) and gently stirred overnight at 4 °C. The precipitate was collected by centrifuging at $26,900 \times g$ for 30 min, redissolved in water (about 50 ml) and dialyzed overnight against 2×100 vol. of 25 mM sodium acetate buffer pH 5.5, using dialysis tubing (3500 Da cut-off) from Spectrapor (Spectrum, CA, USA). The dialyzed sample was centrifuged and filtered through a 0.22 μm filter and then loaded by means of several 1 ml injections onto a Mono-S column in a fast protein liquid chromatography (FPLC) system (LKB Bromma, Sweden). RNAase activity was eluted as shown in Figure 1A and further purified by reversed-phase chromatography on a Vydac C4 column in an HPLC system (Water Millipore, MA, USA) as shown in Figure 1B.

	Volume [ml]	Activity ^a [Units/ml]	Protein ^c [mg/ml]	Specific activity [Units/mg]	Total activity [Units]	Yield [%]	Purification [Fold]
Homogenate	300	270	15.7	17	81 000	100	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50	652	32.8	19.9	32 600	40.3	1.17
Mono-S ^d	30	920	0.083	11 084	27 600	34.0	652
Vydac C4 ^d	10	1810	0.009	201 100	18 100	22.3	11 830

^a A separate run was carried out for each organ. Yields and purification factors varied within $\pm 10\%$.

^b Spectrophotometric measurement of the increase in absorbance at 260 nm as a function of time, using 0.1 mg/ml polycytidylic acid [poly(C)] (Sigma, St. Louis, MO, USA) in 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0 as substrate. One enzyme unit is defined as the amount of enzyme that causes an increase in the absorbance at 260 nm of 1.0.

^c Protein concentration was measured using the method of Bradford (1976) with bovine serum albumin (Boehringer, Mannheim, Germany) as standard.

^d Sum of all the fractions with RNAase activity.

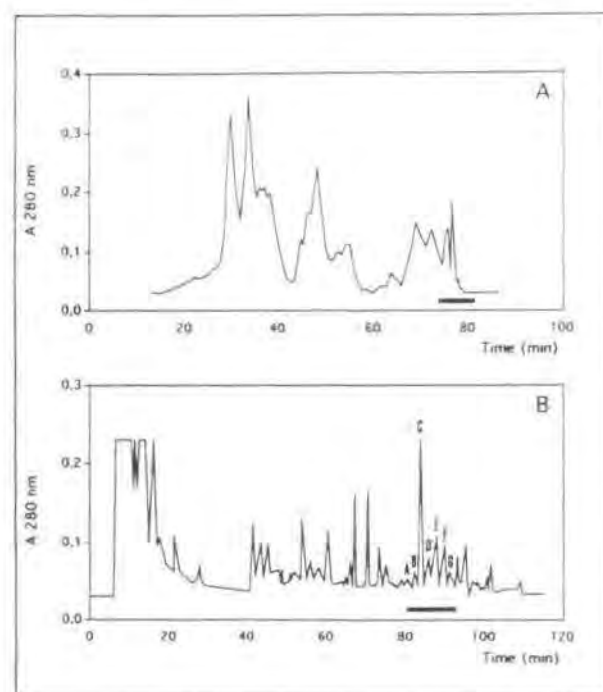
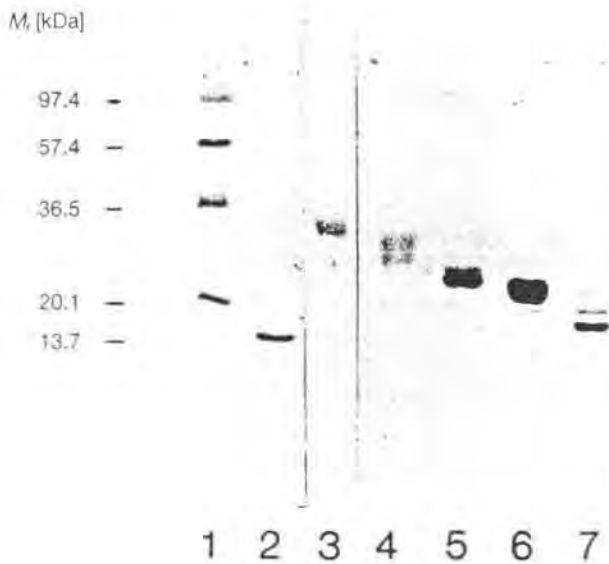


Fig. 1 Purification of RNAase from Human Pancreas.

(A) Chromatography on a Mono-S HR 5/5 column (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden). The column was equilibrated with 20 mM sodium acetate, pH 5.5, and eluted with a gradient of 0–0.2 M NaCl in equilibration buffer for 60 min and from 0.2–1 M NaCl in equilibration buffer for 15 min, at a flow rate of 1 ml/min. Fractions were pooled as indicated by the black bar, dialyzed against water, and freeze-dried.

(B) Re-chromatography of the pooled fractions from several runs on a Vydac 214-TP 54 C₄ reversed-phase column (Vydac, Hesperia, CA, USA). The column (4.6 × 250 mm) was equilibrated in 90% A and 10% B. The column was washed with 10% B over 20 min, brought to 22% B in 20 min and from 22% to 33% B in 60 min, at a flow rate of 0.5 ml/min. (A: Milli-Q grade water 0.1% TFA; B: CH₃CN 0.1% TFA in Milli-Q grade water). Fractions containing activity are indicated by a black bar.



massie blue (Figure 2, lanes 3 to 7) and in activity-stained gels (Figure 3), with apparent molecular masses ranging from 14 to 37 kDa. These heterogeneities result from different levels of glycosylation of the RNAase fractions.

The analysis of fractions in activity stained gels cast with poly(C) showed also activity in two earlier eluting fractions (lanes 1 and 2, Figure 3), which were more heavily glycosylated but were not detected by staining with Coomassie blue and thus were not included in Figure 2. This may be due either because they are in much lower concentrations, or because the sugar moiety interferes with the staining techniques used as reported before (Osset *et al.*, 1989), or both. Protein quantification of the fractions eluted after reversed-phase chromatography reveals that about 80% of secretory-type RNAase in human pancreas is glycosylated. The activity-stained gel on Figure 3 shows the presence of several heavily glycosylated active bands (lanes 1 to 4) which, to the best of our knowledge, have not been described in human pancreas heretofore. These fractions have apparent molecular masses ranging from 23 to 37 kDa. Due to the very small amounts present no further characterization of the individual bands was attempted.

The separation of the different glycosylated fractions either in normal SDS-PAGE or in activity-stained gels seems to be favoured by the anomalous behaviour of the different glycosylated RNAase fractions in the polyacrylamide-SDS gels (Grefrath and Reynolds, 1974; Leach *et al.*, 1980), a fact that can be attributed to less SDS binding due to a decrease of the hydrophobic character of the glycoprotein, with the corresponding reduction in the electrophoretic mobility. The resolution is also improved when 15% or 18% gels are run for two hours or three hours, respectively, instead of the standard time of 1–1.5 h, with a constant current of 20 mA. In standard SDS-PAGE a loading buffer containing 2-mercaptoethanol was used; however, in zymograms a non-reducing sample buffer was used. The conservation of intact disulphide bridges facilitates the renaturation process which implies

Fig. 2 Electrophoretic Analysis on a 15% Polyacrylamide-SDS (0.8 × 8 × 10 cm) Minigel of the RNAase Active Fractions after Reversed-Phase Chromatography.

Electrophoresis was carried out at room temperature according to Laemmli (1970) using a Bio-Rad Mini Protean II Dual Slab Cell Model apparatus at a constant current of 20 mA. Proteins were fixed with a methanol: 7% aqueous acetic acid solution (50:50 v/v). Gels were stained for 10 min at room temperature with 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in 50% (v/v) methanol and 10% (v/v) acetic acid in water and destained with several washes of 7% (v/v) acetic acid in water. Lane 1, Molecular mass markers (Combithek kit, Boehringer, Mannheim, Germany); Lane 2, Bovine RNAase A (Biozyme, Blaenavon, UK); Lane 3, Fraction C; Lane 4, Fraction D; Lane 5, Fraction E; Lane 6, F; Lane 7, Fraction G. Letters of the fractions refer to the peaks in the HPLC chromatography. (Figure 1B).

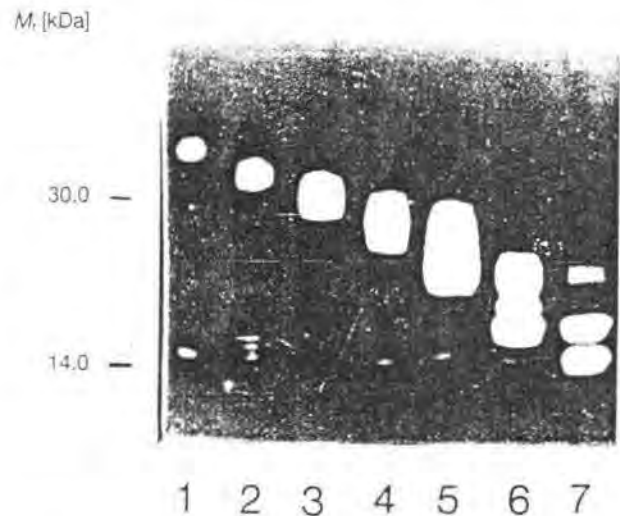


Fig. 3 Electrophoretic Analysis in a Poly(C) Cast SDS-Polyacrylamide Gel of the Active RNAase Fractions after Re-Chromatography in a C_4 Reversed-Phase Column was Carried out as Described (Sugiyama *et al.*, 1981) with Some Modification (Bravo *et al.*, 1992).

Separating 15% or 18% polyacrylamide-SDS gels were cast with 0.3 mg/ml high molecular mass 20S poly(C) (Pharmacia) as substrate. Electrophoresis using 0.8 mm spacers was carried out for 120 or 180 min, respectively, at a constant intensity of 20 mA. Pre-stained molecular mass markers (low range) (Bio-Rad, CA, USA) were used in order to follow the evolution of the run performance. SDS was removed from the gels by gentle agitation with 2 × 100 ml of 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, containing 20% (v/v) isopropanol for 30 min and then washed with 100 ml of 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, for 15 min. Enzymic digestion was allowed to proceed for 15 min at 37 °C in 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0 and 15 min in 10 mM Tris/HCl, pH 8.0. The gels were then stained with 0.2% (w/v) toluidine blue (Merck) in 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 for 10 min. The gels, both SDS-PAGE and activity gels, can also be silver-stained according to Bloom *et al.* (1987) if previously destained with a 7% acetic acid solution. In the case of zymograms no 2-mercaptoethanol was included in the loading buffer. Lane 1, Fraction A; Lane 2, Fraction B; Lane 3, Fraction C; Lane 4, Fraction D; Lane 5, Fraction E; Lane 6, F; Lane 7, Fraction G. Letters of the fractions refer to the peaks in the HPLC chromatography (Figure 1B).

shorter incubation times. This fact can be of major importance for the renaturation of the heavily glycosylated fractions because in this way a possible interference by steric hindrance produced by the sugar moieties is avoided.

As the main interest of the present work was to separate and characterize the different RNAase fractions of the human pancreas as a function of their sugar content and there was the possibility that acid treatment could modify the sugar moieties of the RNAase fractions a neutral extraction procedure starting with acetone powder was initially assayed. Nevertheless, comparison with an acid extraction with 0.25M sulphuric acid (Weickmann *et al.*, 1981), followed by acetone precipitation, showed no detectable differences, except that the acid extraction gave us better overall recovery, thus indicating that the sugar moieties of the different RNAase fractions were not affected by the acid treatment. Therefore, the use of the acid extraction procedure constitutes a significant advantage given the very low concentration of enzyme present in the human pancreas.

The use of reversed-phase HPLC provides a system that separates the RNAase fractions as a function of their hydrophobicity into bands of different molecular mass. This separation could be explained by the polar character of the sugar moieties which will increase the hydrophilic character of the protein and thus its interaction with the column matrix will decrease. The higher the sugar content the earlier its elution from the column. The purification procedure for human pancreatic RNAase described here is a simple method with a high resolution power. This, together with the use of fresh organs from transplant donors has provided the fundamental tool for elucidating the heterogeneity displayed by human pancreatic RNAase.

Glycopeptides were isolated from RNAase preparations obtained by pooling fractions A to D, and E to G (Fig-

ure 1B) separately. These two preparations were performic acid oxidized and digested with trypsin and chymotrypsin. Peptides were purified by gel filtration, followed by reversed-phase HPLC and characterized by amino acid analysis, automatic sequence determination and carbohydrate analysis. Total recoveries of peptides (glycosylated and carbohydrate-free forms) were about 25%.

Carbohydrate compositions of peptides are presented in Table 2. Glycopeptides T7, T11 and T12, according to the nomenclature previously used (Beintema *et al.*, 1988a), eluted in fractions 6 and 7 from the Sephadex G-25 column, close to the exclusion volume and ahead of the other peptides. Peptide T7 (Asn₃₄-Met₃₅-Thr₃₆-Glu₃₇-Gly₃₈-Arg₃₉) was found as glycopeptide in both RNAase preparations showing very similar carbohydrate compositions regardless of the analyzed preparation. No carbohydrate-free form of the peptide T7 could be identified in later eluting fractions from the gel filtration chromatography (fractions 8 to 10). Peptide T11 (Ser₇₅-Asn₇₆-Ser₇₇-Ser₇₈-Met₇₉-His₈₀-Ile₈₁-Thr₈₂-Asp₈₃-Cys₈₄-Arg₈₅) was isolated as glycopeptide from the reversed-phase HPLC of gel filtration fractions 6 and 7, and in a carbohydrate-free form in gel filtration fractions 8 and 9 from both RNAase preparations in a ratio 1:1.5. The glycopeptide obtained from the later eluting RNAase fractions contains slightly less carbohydrate than the same peptide obtained from the early eluting fractions. Average values of carbohydrate compositions of the peptides are presented in Table 2.

Only in the digest of the early eluting RNAase fractions, a small amount of glycopeptide T12 (Leu₈₆-Thr₈₇-Asn₈₈-Gly₈₉-Ser₉₀-Arg₉₁) was found as a contaminant of peptide T7. The rest of this peptide was isolated as carbohydrate-free form from fractions 9 and 10 of the Sephadex G-25 column. The glycopeptide carbohydrate-free peptide ratio in these RNAase fractions was about 1:6.

Table 2 Carbohydrate Compositions of Glycopeptides of Urine, Seminal, Pancreatic and Kidney RNAases.

RNAase preparations (about 0.2 mg each) were oxidized with performic acid and digested with trypsin for 2 h followed by chymotrypsin digestion for another 2 h at 37 °C. Because of the low quantities to be analyzed, a 1 ml pipette was used for gel filtration chromatography on Sephadex G-25 Superfine and fractions of about 0.15 ml were collected, freeze-dried, and investigated by HPLC on a Nucleosil 10 C₁₈ (4.6 × 300 mm) as described previously (Beintema *et al.*, 1988a). Amino acid analysis and automatic sequence determination of the peptides were carried out with a Hewlett Packard Amino Quant (1090 M) amino acid analyzer and an Applied Biosystems 477 A Sequencer, respectively (Eurosequence BV, Groningen). Quantitative analysis of monosaccharides released from glycopeptides after methanolysis was done as described by Kamerling *et al.* (1975). Due to the very small amounts of protein obtained no attempts could be made to determine the sialic acid content as this was destroyed by the performic acid treatment. The amount of monosaccharide is given in mol/mol peptide or protein. The amount of *N*-acetylglucosamine has been corrected for incomplete cleavage of the *N*-glycosidic bond during methanolysis. Peptides contained xylose and glucose, which probably are contaminants from the isolation procedures. The total carbohydrate content of pancreatic RNAase represents a component with glycosylated Asn₃₄ and Asn₇₅, and carbohydrate-free Asn₈₈. The data for urine ribonuclease (HU_AR) are from Beintema *et al.* (1988a) for seminal RNAase from De Prisco *et al.* (1984), and for kidney RNAase HK-2L from Mizuta *et al.* (1990).

Monosaccharide	Pancreatic RNAase			Urine RNAase				Seminal RNAase	Kidney RNAase
	Asn ₃₄	Asn ₇₅	Total	Asn ₃₄	Asn ₇₅	Asn ₈₈	Total		
Fucose	4.4	3.9	8.3	1.0	1.3	1.0	3.3	4.3	2.5
Mannose	6.0	3.6	9.6	2.7	3.2	3.0	8.9	3.2	3.0
Galactose	3.5	3.6	7.1	2.1	6.0	2.7	10.8	3.4	+
<i>N</i> -Acetylglucosamine	6.2	4.9	11.1	3.2	8.0	5.5	16.7	4.1	2.3
Sialic acid	—	—	—	0.7	1.6	1.2	3.5	—	—
Total			36.1				43.2	15.0	7.8

No sialic acid was found in the glycopeptides isolated in the purification procedure. The investigated RNAase fractions differ little in their sugar content. However, their elution positions on reversed-phase HPLC and apparent molecular masses, as shown by SDS-PAGE analysis differ considerably, probably caused by much variation in sialic acid content. This is in agreement with the findings of Thomas *et al.* (1984), who by isoelectric focusing of pancreatic juice found that multiple zones of RNAase activity reduced to a single band after treatment with neuraminidase. The performic acid oxidation procedure may have destroyed sialic acid although in our previous investigation of human urine RNAase – using identical methods (Beintema *et al.*, 1988a) – this sugar could be identified (Table 2). But the much smaller quantities used here may have caused more destruction of this sugar. These observations lead us to the conclusion that the sialic acid content may have been determinant for the observed reversed-phase elution pattern and electrophoretic behaviour of the RNAase fractions.

We also reinvestigated the C-terminal amino acid sequence of human pancreatic RNAase. In both RNAase preparations the C-terminal peptide was isolated from fraction 9 of the Sephadex column in two different forms differing in the number of residues: Asp₁₂₁-Ala₁₂₂-Ser₁₂₃-Val₁₂₄-Glu₁₂₅-Asp₁₂₆-Ser₁₂₇ as previously reported for human pancreatic RNAase (Beintema *et al.*, 1984) and a later eluting peptide in the reversed-phase chromatography with the sequence Asp₁₂₁-Ala₁₂₂-Ser₁₂₃-Val₁₂₄-Glu₁₂₅-Asp₁₂₆-Ser₁₂₇-Thr₁₂₈ (121–128) as it had been shown for human urine and seminal RNAase (Beintema, 1988a). The two forms were obtained in a ratio of about 2:1. This result confirms the assumption made earlier that traces of carboxypeptidase easily remove the C-terminal Thr from human pancreatic RNAase (Beintema *et al.*, 1988a), and demonstrates that the RNAase preparation used for the present work is less degraded than the previously investigated one (Beintema *et al.*, 1984).

Gavel and von Heijne (1990) have collected and statistically analyzed glycosylated and non-glycosylated Asn-Xaa-Ser/Thr sites in eukaryotic proteins and conclude from their data that non-glycosylated sites tend to be found more frequently towards the C-termini of proteins. They explain this observation from the fact that N-terminal sites spend more time near the membrane of the endoplasmic reticulum where the oligosaccharide transferase enzyme seems to be located, while C-terminal sites are more rapidly pulled into the almost completely folded structure. The almost complete glycosylation of Asn₃₄, the presence of carbohydrate attached to Asn₇₆ in about half and to Asn₈₈ in a minor part of the molecules in human pancreatic RNAase is in perfect agreement with these proposals of Gavel and von Heijne (1990).

The only other primate pancreatic RNAase of which the primary structure has been determined is that of the langur, *Presbytis entellus* (Beintema, 1990). The RNAase content in its pancreas (250 µg/g) is about 50 times higher than that observed in man. This is an adaptation to the

ruminant-like digestion occurring in the *Colobinae*, the primate family to which langur belongs. Species with ruminant-like digestion have less carbohydrate attached to their RNAases than other mammalian species. Probably glycosylation of RNAase is not advantageous for ruminants and species with ruminant-like digestion (Beintema *et al.*, 1976). Accordingly, langur has less carbohydrate attached to its RNAase than man. The mobility on SDS-PAGE indicates the presence of a simple type carbohydrate moiety. Only Asn₃₄ is glycosylated. No carbohydrate was found to be attached to Asn₈₈, while the glycosylation site with Asn₇₆ has disappeared as a result of the replacement of Ser₇₅ by arginine (Beintema, 1990).

The properties of the present human pancreatic RNAase preparation are more similar to those of human urine RNAase (Sugiyama *et al.*, 1981) than to those of previously described preparations (Weickmann *et al.*, 1981). Not only the behaviour on SDS-PAGE with apparent molecular masses of about 35 kDa, but also the carbohydrate contents are similar (about 40 residues per molecule). The use of freshly collected glands and the efficiency in the purification procedure have been of great importance in obtaining less degraded preparations. However, the carbohydrate compositions of pancreatic and urine RNAases are different (Table 2).

- 1) Each of the glycosylation sites of urine RNAase has carbohydrate attached to all molecules, while in the pancreatic enzyme Asn₃₄ has carbohydrate attached to almost all molecules and Asn₇₆ and Asn₈₈ to about half and only a minor part of them, respectively.
- 2) In urine secretory RNAase the carbohydrate moieties are of the *N*-acetylactosamine type. The three mannoses in the glycopeptides attached to Asn₇₆ in the pancreatic RNAase (Table 2) also indicate an *N*-acetylactosamine oligosaccharide. However, the six mannoses in the glycopeptide with Asn₃₄ indicate the presence of a hybrid type chain (Strecker and Montreuil 1979).
- 3) The urine RNAase carbohydrate moieties contain about one fucose residue per chain, probably linked to the innermost *N*-acetylglucosamine. The pancreatic RNAase carbohydrate moieties have 3–4 fucose residues per chain. This indicates that fucosylation has also occurred at other positions of the carbohydrate chains (Strecker and Montreuil, 1979).

Mizuta *et al.* (1990) have presented carbohydrate analyses of two human kidney secretory RNAase components with approximately equal contents of fucose, mannose and *N*-acetylglucosamine (only a trace of galactose was found). No peptide studies have yet been reported. These analyses, and also the carbohydrate composition of human seminal RNAase (De Prisco *et al.*, 1984), indicate more similarity with a pancreatic RNAase species only glycosylated on Asn₃₄ than with the urine enzyme (Table 2). This leaves us with a mystery about the origin of the major component of human urine RNAase. Mizuta *et al.* (1990) conclude from the carbohydrate analysis that the urine enzyme does not originate from the kidneys. Sugiyama *et al.* (1981) discuss that 60% of the RNAase activity in hu-

man urine and only about 20% of that in serum are due to the completely glycosylated secretory component and that the concentration of this component is seven times higher in urine than in serum. A likely organ source of this secretory RNAase component in human urine remains unknown.

The *N*-glycans of human non-secretory RNAase from kidney, liver and spleen are very similar and have rather unusual structures, which are also observed in other lysosomal enzymes (Lawrence *et al.*, 1993). These structures differ from those observed in the secretory RNAases. The similarity in *N*-glycan structure of non-secretory RNAases from different tissue may be explained by synthesis of these enzymes elsewhere, primarily in granulocytes (Glitz *et al.*, 1993).

Acknowledgements

Many thanks are due to Dr. G.W. Gerwig and Dr. J.P. Kamerling (Laboratorium voor Bio-Organische Chemie, Utrecht, The Netherlands) for performing the carbohydrate analyses of glycopeptides and to Dr. M. Mañalich and O. Cabré for providing us with human pancreas and Dr. R.N. Campagne for advice on the manuscript. This work was supported by grants from CICYT (PM 88/0109) from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia, from CIRIT (AR 88-5758), Generalitat de Catalunya, and Pre-doctoral Fellowship Grant PFPI to M. Ribó and E. Fernández from the Ministerio de Educación y Ciencia. We are also indebted to the Fundació M.F. de Roviraia, Barcelona, Spain.

References

- Beintema, J.J. (1990). The primary structure of langur (*Presbytis entellus*) pancreatic ribonuclease: adaptive features in digestive enzymes in mammals. *Mol. Biol. Evol.* **7**, 470–477.
- Beintema, J.J., Gaastra, W., Scheffer, A.J., and Welling, G.W. (1976). Carbohydrate in pancreatic ribonucleases. *Eur. J. Biochem.* **63**, 441–448.
- Beintema, J.J., Wietzes, P., Weickmann, J.L., and Glitz, D.G. (1984). The amino acid sequence of human pancreatic ribonuclease. *Anal. Biochem.* **136**, 48–64.
- Beintema, J.J., Blank, A., Schieven, G.L., Dekker, C.A., Sorrentino, S., and Libonati, M. (1988a). Differences in glycosylation pattern of human secretory ribonucleases. *Biochem. J.* **255**, 501–505.
- Beintema, J.J., Hofsteenge, J., Iwama, M., Monta, T., Ohgi, K., Irie, M., Sugiyama, R.H., Schieven, G.L., Dekker, C.A., and Glitz, D.G. (1988b). Amino acid sequence of the nonsecretory ribonuclease of human urine. *Biochemistry* **27**, 4530–4538.
- Bloom, H., Beier, H., and Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93–97.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–252.
- Bravo, J., Ribó, M., Fernández, E., De Llorens, R., and Cuchillo, C.M. (1994). A versatile negative-staining ribonuclease zymogram. *Anal. Biochem.*, in press.
- Breukelman, H.J., Beintema, J.J., Confalone, E., Costanzo, C., Sasso, M.P., Carsana, A., Palmieri, M., and Furia, A. (1993). Sequences related to the ox pancreatic ribonuclease coding region in the genomic DNA of mammalian species. *J. Mol. Evol.* **37**, 29–35.
- De Prisco, R., Sorrentino, S., Leone, E., and Libonati, M. (1984). A ribonuclease from human seminal plasma active on double-stranded RNA. *Biochim. Biophys. Acta* **788**, 356–363.
- Gavel, Y., and Von Heijne, G. (1990). Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng.* **3**, 433–442.
- Glitz, D.G., Kujawa, S., and Vosoghi, M. (1993). Immunogold localization of human non-secretory ribonuclease within cells and tissues. *Ribonucleases: Chemistry, Biology, Biotechnology, 3rd International Meeting, Capri (Italy) Abstract L36*.
- Grefrath, S.P., and Reynolds, J.A. (1974). The molecular weight of the major glycoprotein from the human erythrocyte membrane. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**, 3913–3916.
- Haug, M., and Schein, C.H. (1992). The DNA sequences of the human and hamster secretory ribonucleases determined with the polymerase chain reaction (PCR). *Nucleic Acid Res.* **20**, 612.
- Kamerling, J.P., Gerwig, G.J., Vliegthart, J.F.G., and Clamp, J.R. (1975). Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of trimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. *Biochem. J.* **151**, 491–495.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lawrence, C.W., Little, P.A., Little, B.W., Glushka, J., Van Halbeek, H., and Alhadeff, J.A. (1993). Human non-secretory ribonucleases. II. Structural characterization of the *N*-glycans of the kidney, liver and spleen enzymes by NMR spectroscopy and electrospray mass spectrometry. *Glycobiol.* **3**, 249–259.
- Leach, B.S., Collawn, J.F.Jr., and Fish, W.W. (1980). Behavior of glycopolypeptides with empirical molecular weight estimation methods. I. In sodium dodecylsulfate. *Biochemistry* **19**, 5734–5741.
- Mizuta, K., Awazu, S., Yasuda, T., and Kishi, K. (1990). Purification and characterization of three ribonucleases from human kidney: comparison with urine ribonucleases. *Arch. Biochem. Biophys.* **281**, 144–151.
- Osset, M., Piñol, M., Fallon, M.J.M., De Llorens, R., and Cuchillo, C.M. (1989). Interference of the carbohydrate moiety in Coomassie Brilliant Blue R-250 protein staining. *Electrophoresis* **10**, 271–273.
- Pascual, R., Burgos, F.J., Salvà, M., Soriano, F., Méndez, E., and Avilés, F.X. (1989). Purification and properties of five different forms of human procarboxypeptidases. *Eur. J. Biochem.* **179**, 609–616.
- Russo, N., De Nigris, M., Ciardiello, A., Di Donato, A., and D'Alesio, G. (1993). Expression in mammalian cells, purification and characterization of recombinant human pancreatic ribonuclease. *FEBS Lett.* **333**, 233–237.
- Strecker, G., and Montreuil, J. (1979). Glycoprotéines et glycoprotéinoses. *Biochimie* **61**, 1199–1246.
- Sugiyama, R.H., Blank, A., and Dekker, C.A. (1981). Multiple ribonucleases of human urine. *Biochemistry* **20**, 2268–2274.
- Thomas, J.M., Crisp, M., and Hodes, M.E. (1984). Sialic acid residues contribute to the heterogeneity of human serum ribonuclease: demonstration by isoelectric focusing and neuraminidase treatment of serum. *Clin. Chim. Acta* **142**, 73–81.
- Weickmann, J.L., Elson, M., and Glitz, D.G. (1981). Purification and characterization of human pancreatic ribonuclease. *Biochemistry* **20**, 1272–1278.

- ▶ Yamashita, K., Hitoi, A., Irie, M., and Kobata, A. (1986). Fractionation by lectin affinity chromatography indicates that glycosylation of most ribonucleases in human viscera and body fluids is organ specific. *Arch. Biochem. Biophys.* 250, 263–266.
- Yasuda, T., Nadano, D., Takeshita, H., and Kishi, K. (1993). Two distinct secretory ribonucleases from human cerebrum: purifica-

tion, characterization and relationships to other ribonucleases. *Biochem. J.* 296, 617–625.

Received November 19, 1993; accepted March 3, 1994

A Versatile Negative-Staining Ribonuclease Zymogram

Bravo,* E. Fernández,* M. Ribó,* R. de Llorens,*† and C. M. Cuchillo*†

*Institut de Biologia Fonamental V. Villar Palasí and †Department de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

Received October 6, 1993

A versatile negative-staining ribonuclease zymogram is described. The method has several advantages as it combines, by means of different staining procedures, high resolving power, sensitivity, and specificity with a rapid, reproducible, and simultaneous analysis of purity of ribonuclease samples on the same polyacrylamide gel. Activity bands can be visualized at any time during the incubation process without staining of the gel. This allows the choice of different staining procedures after incubation. Using poly(C) as substrate less than 1 pg of bovine pancreatic ribonuclease A was detected in less than 2 h after the electrophoretic run. An additional advantage with respect to other methods is that no refrigeration is needed during electrophoresis.

© 1994 Academic Press, Inc.

The study of tissue distribution and physiology of ribonucleases needs a versatile and sensitive technique capable of detecting different RNase activities both in crude extracts and in highly purified preparations. These qualities are provided by an activity-staining zymogram.

Several activity-staining ribonuclease zymogram techniques were described in the early 1980s (1,2). The methodologies used included (a) superimposing an agarose overlay, with embedded RNA substrate, on a normal SDS¹ electrophoresis gel (1), and (b) embedding the RNA substrate into the matrix of the gel before the electrophoresis was run using equipment provided with a complicated refrigeration system (2). In the former case a sensitivity of 10 pg of RNase A after a 20-h incubation was reported whereas in the latter a sensitivity of 1 pg of RNase A after a 48-h incubation was claimed. However, in spite of the renewed interest in the ribonuclease "su-

perfamily" due to the identification of many new members with ribonucleolytic activity, the technique was practically ignored for the last 10 years. Recently, two new zymograms using isoelectric focusing with reported sensitivities in the order of 60–100 pg have been published (3,4).

In the present work a versatile modification of the negative-staining zymogram (2), with the substrate included in the gel is described. The sensitivity of the method is better than 1 pg of RNase A, in less than 1 h in incubation buffer, using well-defined and stable substrates such as poly(C) and poly(U). The method is fast, uses standard electrophoresis materials, and is very reliable as it overcomes many of the technical difficulties of early methods. This technique also allows a fast screening of the heterogeneity of RNase samples as well as a preliminary carbohydrate analysis using a small amount of protein digested with different glycosidases.

MATERIALS AND METHODS

Acrylamide (4× cryst., analytical grade) was supplied by Serva (Heidelberg, Germany). *N,N'*-Methylenebisacrylamide (gel electrophoresis grade), Tris, SDS, and isopropanol (analytical grade) were from Fluka AG (Buchs, Switzerland). Bovine pancreatic RNase (3× cryst.) was from Biozyme (Blaenavon, UK). Toluidine blue, silver nitrate, and glycine were from Merck (Darmstadt, Germany). Ammonium persulfate was from BDH Chemicals Ltd. (Poole, UK). Temed was from Eastman Kodak (Rochester, NY). Ficoll-400 was from Sigma (St. Louis, MO). Poly(C) and poly(U) (high molecular mass, 20 S, ref. 27-4220-03 and 27-4440-02, respectively) were from Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden). Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase F (endo-F) from *Streptomyces meningosepticum* and endo- β -*N*-acetylglucosaminidase H (endo-H) from *Streptomyces plicatus* were from Boehringer Mannheim (Germany). Other chemicals were of analytical grade. As molecular mass standards a prestained Bio-Rad kit (Richmond, CA) with the following molecular markers was used: phosphorylase b (130,000 Da), bovine serum

¹Abbreviations used: bis-acrylamide, *N,N'*-methylenebisacrylamide; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; RNase, ribonuclease; RNase A, bovine pancreatic ribonuclease A; Temed, *N,N,N',N'*-tetramethylethyldiamine; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane; SDS, sodium dodecyl sulfate; TLC, thin-layer chromatography.

albumin (75,000 Da), ovalbumin (50,000 Da), carbonic dehydratase (39,000 Da), soybean trypsin inhibitor (27,000 Da), and lysozyme (17,000 Da). The molecular masses given take into account the effect of prestaining on the migration of the markers.

Enzyme Purification

RNase A was obtained from bovine pancreatic RNase according to the method of Alonso *et al.* (5). RNase fractions from Capan-1 (a human pancreatic adenocarcinoma cell line) conditioned medium were obtained as described by Fernández *et al.* (6).

Endoglycosidase digestions were carried out in the following way: A heavily glycosylated (apparent M_r 33,000) human RNase fraction (0.2–2.0 units) in 10 μ l of 25 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, was treated with either 2 units of endo F or 20 mU of endo H. The incubation was carried out at 37°C and samples were taken at different incubation times (7).

THE ZYMOGRAM

Electrophoresis

Electrophoresis was carried out at 25°C according to the method of Laemmli (8) using a Bio-Rad Mini-Protein II Dual Slab Gel model apparatus (0.8 \times 8 \times 10 cm).

In order to obtain reproducible results and because of the presence of epidermal RNase (9), the use of gloves is absolutely necessary for handling these materials. Best results are obtained when Milli-Q grade water is used throughout. The separating gel had 12, 15, or 18% acrylamide and 0.3% bis-acrylamide, while the stacking gel had 3% acrylamide and 0.08% bis-acrylamide. The RNase substrate, either poly(C) or poly(U), was included in the separating gel (0.3 mg/ml). The substrate was added to the water volume of the separating gel, gently shaken, and heated at 50°C for 5 min to facilitate aggregation and complete solubilization. The substrate solution was added immediately before the start of the polymerization process. The separating gel with embedded substrate may be stored at 4°C overnight without apparent damage or diminished resolving power. The samples were prepared in a solution containing 50 mM Tris/HCl, pH 6.8, 2% SDS, 0.001% bromophenol blue, and 5–15% of either ficoll or glycerol. Extreme care is needed to avoid RNase dilution along the top of the gel as these cause the appearance, after the electrophoretic run, of a narrow active band (at the RNase level) across all the gel (see Results and Discussion). When a 10-pocket comb with 0.8-mm spacers is used, samples should not exceed 15 μ l. It is a good precaution to load samples every two pockets when high RNase activity bands are expected. The electrophoresis is carried out at room temperature, applying a 30- to 40-mA current during the running on the stacking gel, and 20 mA in the separating gel. The run was stopped when the prestained lysozyme was near the bottom of the gel.

Incubation of the Gels

Removal of SDS from the gels was accomplished with two 15-min washes using 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, containing 20% isopropanol under gentle but continuous shaking, followed by two 15-min washes with 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, at room temperature. The incubation was in 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0, for as long as needed. The pH of these buffers is optimal for the enzymatic activity of bovine pancreatic RNase but can be changed according to the particular RNase being studied. In all cases the normal incubation time was 15–30 min at 25°C. Longer incubation times were used for the experiments designed to check the maximum sensitivity of the method. With poly(C) as substrate less than 1 μ g of RNase A activity was detected after 1 h in incubation buffer. With poly(U) as substrate less than 5 μ g of RNase A activity was detected after a 12-h incubation at 4°C in 10 mM Tris/HCl, pH 7.5–8.0.

Direct Visualization

The activity areas can be directly visualized after the electrophoretic run, or at any time during incubation, just by placing the gel on top of a 20 \times 20-cm Silicagel TLC plate with F_{254} fluorescent indicator (Merck), covered with Saran Wrap using a 256-nm uv lamp (10). The gel can be photographed with a Polaroid MP4 Land Camera provided with a yellow filter (Cokin 1A) and loaded with a black and white positive/negative instant pack 665 (or 667) Polaroid film. The usual exposure time was 2 min (for Polaroid 665). After the visualization the gel can be placed again in any of the buffers to continue incubation. This direct visualization can be made as many times as necessary in order to adjust the optimal time for any particular assay.

Staining Procedures

Once the activity picture is taken, the gel can be stained with a positive staining for all the protein bands with Coomassie blue or, for better contrast, with the negative activity staining with either toluidine blue or silver nitrate.

Coomassie blue staining. The gel is incubated for 5 min in 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 dissolved in 50% methanol–10% acetic acid. Successive washes in 7% acetic acid are made until maximum contrast. After Coomassie staining the same gel can also be directly stained, without previous destaining of the Coomassie, with toluidine blue as described below.

Toluidine blue staining. The staining procedure was carried out by incubating the gel (either directly or previously stained with Coomassie blue) in 10 mM Tris/HCl at the same pH as the incubation buffer (pH 7.5–8 in our case) for 10 min and with freshly prepared 0.2% toluidine blue in 10 mM Tris/HCl, pH 7.5–8, for 5 min. The gel was washed with 10 mM Tris/HCl, pH 7.5–8, until

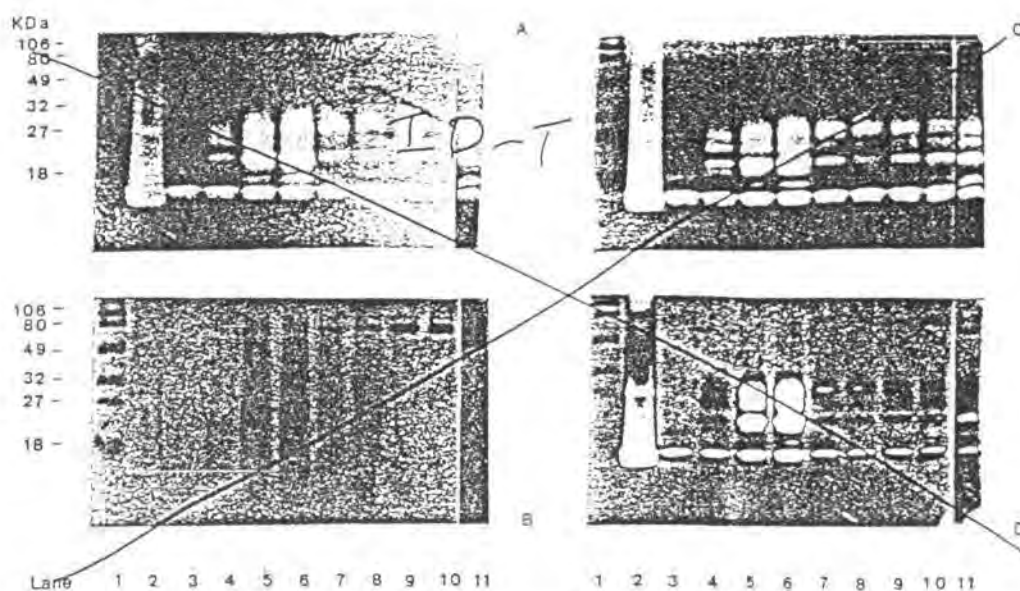


FIG. 1. Electrophoretic analysis in a poly(C) cast SDS-polyacrylamide gel of several active RNase fractions eluted from a DEAE-Sepharose L-6B column of conditioned medium from Capan-1, a human pancreatic adenocarcinoma cell line. Lane 1: prestained molecular mass markers. Lane 2: RNase A. Lanes 3 to 10: Successive fractions eluted from the column. Lane 11: Crude unfractionated conditioned media. The gel was directly visualized under uv light (A) and then successively stained with Coomassie blue (B), toluidine blue (C), and silver nitrate (D). The multiplicity of bands with RNase activity is due to the existence of RNase species with different degrees of glycosylation (6). See Materials and Methods for experimental details.

Optimum contrast was obtained and then was photographed. If desired, the same gel can be destained in 70% methanol-12% acetic acid and stained following the silver nitrate procedure.

Silver nitrate staining. This procedure can be applied to proteins and nucleic acids (11,12). The gel can be silver stained directly after uv visualization or after destaining the toluidine blue, or it can be Coomassie blue stained. In this way good contrast for negative staining is achieved. After destaining of toluidine blue the presence of other proteins without RNase activity can be detected with a positive staining while RNase is detected as a negative band. If several RNase bands with different activities are present in the same gel the most active appear as negative bands while the less active can appear as positive bands (see Fig. 1D and compare with Figs. 1A and 1C). At some given concentrations bands can appear as negative but with a positive tlo (see Fig. 1D).

Gels with poly(U) as a substrate are very poorly stained, if at all, with silver nitrate (13).

A semiquantitative analysis of RNase activity was made from negatives of pictures taken using the direct visualization procedure on a Shimadzu CS 9000 densitometer.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the activity areas of RNase A and different RNase samples obtained during the chromatographic separation of conditioned medium from Capan-

1 cells, as well as crude unfractionated conditioned medium. They were developed using poly(C) as substrate and visualized with the different techniques described above. The gel is first observed directly under uv light and photographed. Negative bands of activity appear on the gel (Fig. 1A). The same gel is then stained with Coomassie blue (Fig. 1B) for a positive staining of the bands. Then the gel is directly stained with toluidine blue for a negative staining. No destaining of the Coomassie is necessary (Fig. 1C). The same gel can be destained again and stained following the silver nitrate procedure (Fig. 1D). Although the sensitivity is about the same in all activity techniques, the direct visualization allows a quick examination of the samples. However, the gels stained either with toluidine blue or silver nitrate are better for storage, specially the latter. It is also much easier to obtain good pictures for record from the stained gels than from the direct visualization with uv light. No activity was detected with denatured RNase A (incubated in reducing buffers).

Samples of RNase A ranging from 1 to 125 pg were analyzed at several times of incubation by direct visualization. Although there is an increase in the size of the bands with time, in the case of secretory-type RNases incubations longer than 1 h in 0.1 M Tris/HCl, pH 7.5-8, do not significantly improve the sensitivity of the assay, which reaches at least 1 pg for RNase A in less than 1 h incubation, with a poly(C) cast gel; however, secretory-type RNases have to be incubated overnight (at 4°C and low ionic strength buffer) when the substrate is poly(U).

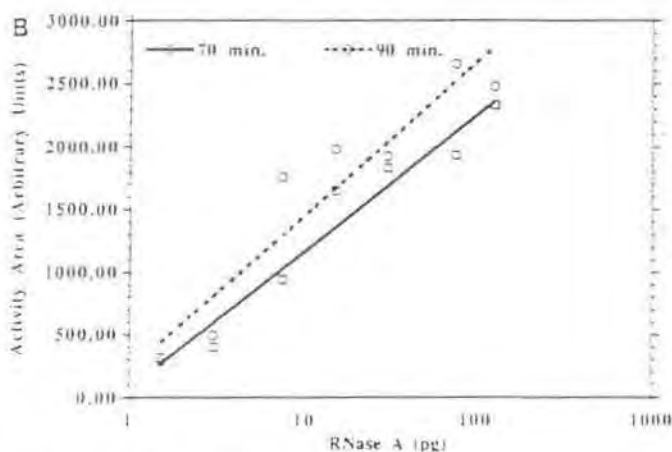
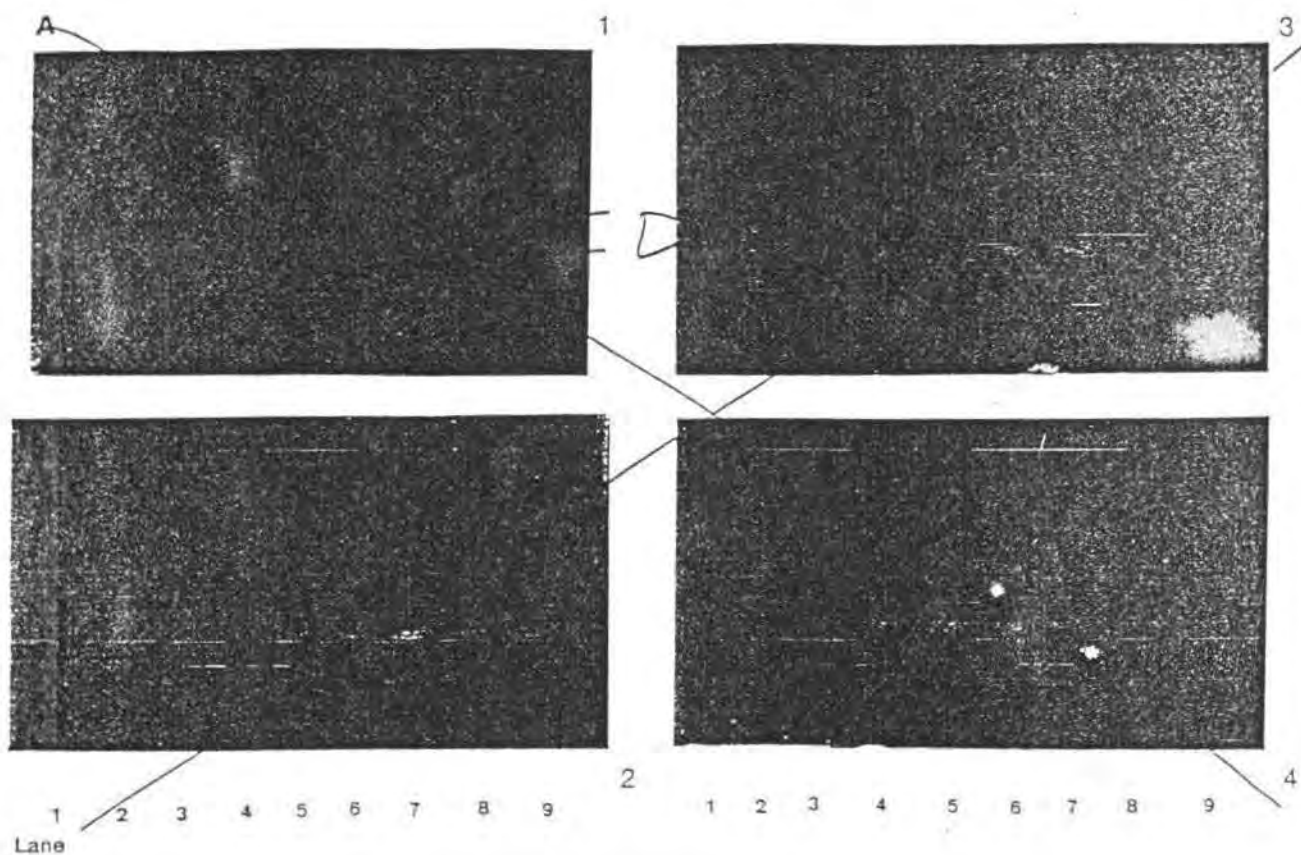


Fig. 2. (A) Ultraviolet visualization of a poly(C) cast gel at different times of incubation ($t = 0$, end of electrophoretic run) containing different quantities of RNase A. From lane 1 to 9: 1, 1.5, 3, 7.5, 15, 30, 75, 125, and 500 pg, respectively. (1) $t = 30$ min (10 mM Tris-HCl, 20% propanol, pH 8); (2) $t = 45$ min (15 min in 10 mM Tris-HCl, pH 8); (3) $t = 70$ min (10 min in 0.1 M Tris-HCl, pH 8); (4) $t = 90$ min (30 min in 0.1 M Tris-HCl, pH 8). (B) Relationship between area of the negative-stained bands and amount of RNase loaded. Bands from the poly(C) cast gels in (A) were integrated with a Shimadzu CS 9000 from negatives taken by the direct visualization technique at different times of incubation. Experimental points were adjusted to a straight line by linear regression analysis. The experiment done at an incubation time of 70 min had a slope factor of 0.97423 which, corresponding to 90 min, is 0.94278.

The reverse is also true for non-secretory-type RNases. Integration of the areas showed that there is a correlation between enzyme concentration and activity area, as shown in Fig. 2. Thanks to the direct visualization under ultraviolet light the digestion of the substrate can be followed during the incubation procedure and can be stopped when desired. It was also seen that RNase A is active

even in the early steps of incubation, after the electrophoresis run, when isopropanol buffers are used to remove the SDS.

The susceptibility of glycosylated RNases to different endoglycosydases (results not shown) can be used to assess the type of carbohydrate chain attached (7). Thanks to the sensitivity of the zymogram, carbohy-

strate analysis can be performed using picograms of glycosylated RNase.

The negative-staining zymogram described in this report has several features which can be very useful for several purposes, such as screening of RNase activity in biological samples, monitoring of RNase purification, analysis of homogeneity of RNase preparations, and analysis of the type of carbohydrate composition for a purified RNase. The method has several advantages worth mentioning with respect to other methods: (i) the use of direct visualization with uv light is a simple and convenient method to define the optimal incubation time of any particular assay. (ii) The use of separate poly(C) and poly(U) cast gels allows the identification of RNases with a preference for poly(C) or for poly(U) in complex mixtures (secretory, or pancreatic type, and nonsecretory, or liver type, respectively). However, when a poly(U) cast gel is used it must be taken into account that poly(U) is very poorly stained by silver nitrate (13). Results are more reliable due to the use of more homogeneous and well-defined substrates than NA. (iii) The sensitivity is less than 1 pg of RNase A, using poly(C) as substrate, or less than 5 pg using poly(U). (iv) When silver nitrate is used after toluidine blue as staining technique, it is possible to visualize simultaneously, onto the same gel, the activity bands corresponding to RNase as negative bands together with other proteins lacking RNase activity as positive bands. However, as discussed above, the capacity for discriminating in this way depends on the RNase activity. A similar effect is found using shorter silver nitrate incubation times or lower substrate concentration inside the gel. When silver nitrate is applied directly after incubation, good contrast, for negative staining, and good resolution for comparison and pictures are achieved. An additional advantage is the stability of the silver nitrate staining as compared not only with the stained gel but also with the toluidine blue, which fades by the formation of electrostatic interactions. (v) It can be a semiquantitative RNase activity assay. (vi) There is no need to refrigerate the electrophoretic run and thus, no special equipment is needed. (vii) When no mercaptoethanol is present in the sample buffer the renaturation process is greatly facilitated. This means shorter incubation times, probably a higher number of active molecules after SDS removal, and, for the highly glycosylated species, greatly enhanced probability for renaturation and activity as the high level of sugars can seriously interfere, by steric hindrance, with the renaturation process (14). This latter possibility is very important for detecting small amounts of highly glycosylated fractions. (viii) The polymerized gel can be stored at 4°C for at least 24 h before the electrophoretic run without apparent damage or loss of resolution. As mentioned in the description of the method, some cautions must be taken in order to avoid the appear-


ance of a narrow band, at the RNase A level, all across the gel. This is most likely caused by RNase itself as its width is proportional to the incubation time used during the development of activity. It was pointed out that this band, which had already been observed in early methods (15), might be due to a contamination of the RNA substrate used, but this does not seem likely as no band appears when a gel with poly(C) or poly(U) is run without injection of any sample. In the case of a contamination of the substrate, a general weakness of the staining across all the gel would be expected; however, this does not seem to be the case as only one narrow band can be seen. We think that its origin is the fouling by the reagents as it only appears when no extreme precautions, either in the preparation of the gel or in the sample loading, or both, are taken.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Grant PM88-0109 from the CICYT, Spain. We thank the Fundació M.F. de Roviralta for grants for the purchase of equipment. E.F. and M.R. had predoctoral fellowships (Ministerio de Educación y Ciencia, Spain).

REFERENCES

1. Thomas, J. M., and Hodes, M. E. (1981) *Anal. Biochem.* **113**, 343-351.
2. Blank, A., Sugiyama, R. H., and Dekker, C. A. (1982) *Anal. Biochem.* **120**, 267-275.
3. Yasuda, T., Nadano, D., Tenso, E., Takeshita, H., and Kishi, K. (1992) *Anal. Biochem.* **206**, 172-177.
4. Nadano, D., Yasuda, T., Sawazaki, K., Takeshita, H., and Kishi, K. (1993) *Anal. Biochem.* **212**, 111-116.
5. Alonso, J., Nogués, M. V., and Cuchillo, C. M. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* **246**, 681-689.
6. Fernandez, E., Ribo, M., Bravo, J., Osset, M., Fallon, M. J. M., de Llorens, R., and Cuchillo, C. M. (1992) in *Structure, Mechanism and Function of Ribonucleases* (Cuchillo, C. M., de Llorens, R., Nogués, M. V., and Parés, X., Eds.), pp. 163-168. I.B.F., Barcelona.
7. Ribo, M., Fernandez, E., Bravo, J., Osset, M., Fallon, M. J. M., de Llorens, R., and Cuchillo, C. M. (1992) in *Structure, Mechanism and Function of Ribonucleases* (Cuchillo, C. M., de Llorens, R., Nogués, M. V., and Parés, X., Eds.), pp. 157-162. I.B.F., Barcelona.
8. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
9. Melbye, S. W., Brant, B. A., and Freedberg, I. M. (1977) *Br. J. Dermatol.* **97**, 355-364.
10. Frank, R., Meyerhans, A., and Blöcker, H. (1987) *Methods Enzymol.* **154**, 221-249.
11. Somerville, L. L., and Wang, K. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **102**, 53-58.
12. Bloom, H., Beier, H., and Gross, H. J. (1987) *Electrophoresis* **8**, 93-97.
13. Clavaguera, A., Querol, E., Coll, D., Genescà, J., and Egozcue, J. (1983) *Cell Mol. Biol.* **29**, 255-259.
14. Beintema, J. J., Schüller, C., Irie, M., and Carsana, A. (1988) *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **51**, 165-192.
15. Blank, A., and Dekker, C. A. (1981) *Biochemistry* **20**, 2261-2267.


Universitat de Girona
Biblioteca