



Universitat de Girona

# PRODUCCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE VARIANTS DE LA REGIÓ C-TERMINAL DE LA RIBONUCLEASA A. IMPORTÀNCIA D'AQUESTA REGIÓ SOBRE L'ESTABILITAT DE L'ENZIM

**M. Gràcia COLL CONSTANS**

**Dipòsit legal: Gi. 1797-2012**

<http://hdl.handle.net/10803/96338>



Producció i caracterització de variants de la regió C-terminal de la ribonucleasa A. Importància d'aquesta regió sobre l'estabilitat de l'enzim està subjecte a una llicència de [Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 3.0 No adaptada de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/)

© 2012, M. Gràcia Coll Constans

DILIGÈNCIA. Per fer constar que en compliment d'allò que es disposa l'art. 8.3 del Reial Decret 778/1998 i a l'art. 5.3 de la Normativa d'ordenació acadèmica dels programes de doctorat de la UdG, aprovada per la Junta de Govern de la Universitat de Girona el 3 de desembre de 1998, aquesta tesi, integrada per *1. Títol de la tesi: "El paper de la universitat en la societat" (A)* ha estat dipositada a la Secretaria General de la Universitat, a efectes d'examen, durant el període comprès entre el dia *14 de febrer de 2000* i el dia *14 de març de 2000*.

Girona, *17 de gener de 2000*

  
Universitat de Girona  
Secretaria General

El secretari general

DILIGÈNCIA. Per fer constar que en compliment d'allò que es disposa l'art. 10.6 del Reial Decret 778/1998 i a l'art. 5.5 de la Normativa d'ordenació acadèmica dels programes de doctorat de la UdG, aprovada per la Junta de Govern de la Universitat de Girona el 3 de desembre de 1998, el tribunal que ha jutjat aquesta tesi, en la sessió que ha tingut lloc el dia *31 de març de 2000* li ha atorgat la qualificació de *Excel·lent* per unanimitat.

Girona, *3 d'abril de 2000*

  
Universitat de Girona  
Departament de Gestió  
Acadèmica i Estudiantil  
El cap de la unitat administrativa

UNIVERSITAT DE GIRONA

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA  
LABORATORI D'ENGINYERIA DE PROTEÏNES  
ÀREA DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

Tesi Doctoral

**PRODUCCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE VARIANTS DE LA  
REGIÓ C-TERMINAL DE LA RIBONUCLEASA A.  
IMPORTÀNCIA D'AQUESTA REGIÓ SOBRE  
L'ESTABILITAT DE L'ENZIM.**

**M. Gràcia Coll Constans**

**1999**

UNIVERSITAT DE GIRONA

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA  
LABORATORI D'ENGINYERIA DE PROTEÏNES  
ÀREA DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

**PRODUCCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE VARIANTS DE LA  
REGIÓ C-TERMINAL DE LA RIBONUCLEASA A.  
IMPORTÀNCIA D'AQUESTA REGIÓ SOBRE  
L'ESTABILITAT DE L'ENZIM.**

Memòria presentada per adquirir el grau de  
Doctor en Ciències Biològiques, per

**M. Gràcia Coll Constans**

Vist-i-plau  
La Directora de Tesi

**Dra. Maria Vilanova Brugués**  
Professora Titular de Bioquímica i Biologia Molecular

Girona, desembre de 1999



A la meva família, als meus professors i als meus amics,  
pel seu suport, estímul i per la seva fidelitat.

Aquest treball s'ha realitzat al Laboratori d'Enginyeria de Proteïnes del Departament de Biologia de la Universitat de Girona i s'ha complementat amb dues estades de curta durada a l'estranger, les quals s'han desenvolupat a l'Institut Engelhardt de Biologia Molecular de l'Acadèmia de les Ciències Russa (Moscou, Rússia) sota la direcció del Dr. Alexander A. Makarov i al Laboratori de Dinàmica Biològica i Química de la Universitat Catòlica de Lovaina (Lovaina, Bèlgica) sota la direcció del Dr. Yves Engelborghs.

El treball ha estat subvencionat pels ajuts PB93-0872 i PB96-1172-CO2-02 de la DGES del Ministeri d'Educació i Cultura i pels ajuts INTAS-RFBR 95-1058 i INTAS-RFBR 97-245.

Agraeixo a tothom que ha col·laborat en la realització d'aquest treball, i de manera particular:

A la Dra. Maria Vilanova Brugués per l'acolliment al seu grup de recerca i per la direcció d'aquest treball.

Al Dr. Ronald T. Raines per facilitar-nos el gen que codifica la Ribonucleasa de pàncrees boví.

A la Universitat de Girona per la concessió d'una beca de curta durada per fer una estada al Laboratori d'Estabilitat Proteica del Dr. A.A. Makarov de l'Institut Engelhardt de Biologia Molecular de l'Acadèmia de les Ciències Russa.

Al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona per permetre'm realitzar els experiments de cinètica enzimàtica.

Al Servei de Biocomputació de l'Institut de Biologia Fonamental de la Universitat Autònoma de Barcelona per la seva ajuda en el modelatge molecular.

## ÍNDEX

Índex general .....	I
Índex de taules i figures .....	VII
Abreviatures .....	IX
<b>I. INTRODUCCIÓ</b> .....	1
<b>I.1. Les ribonucleases</b> .....	1
I.1.1. Classificació i funcions .....	1
<b>I.2. La Ribonucleasa A de pàncrees boví</b> .....	5
I.2.1. Estudis d'estructura i funció de la RNasa A .....	5
I.2.1.1. Estudis per cristal·lografia i difracció de raigs X i espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear (RMN) .....	5
I.2.2.2. Mecanisme de catàlisi .....	11
I.2.2.3. Especificitat de la reacció .....	13
I.2.2.4. Interacció RNasa A-RNA .....	14
<b>I.3. Estudis de clonatge, expressió i mutagènesi de la RNasa A</b> .....	18
I.3.1. El gen de la RNasa A .....	18
I.3.2. Expressió de la RNasa A en procarïotes .....	20
I.3.3. Variants obtingudes de la RNasa A per mutagènesi dirigida .....	23
<b>I.4. Estudis sobre el plegament de la RNasa A</b> .....	27
I.4.1. L'estat natiu .....	29
I.4.2. L'estat desplegat .....	29
I.4.3. Estudis del plegament/desplegament de la RNasa A amb els enllaços disulfur intactes: reaccions de plegament lent .....	32
I.4.4. Estudis del plegament/desplegament de la RNasa A reduïda-nativa: formació dels enllaços disulfur .....	40
I.4.5. Regions proposades com a centres de nucleació o regions iniciadores del plegament proteic de la RNasa A .....	46
<b>I.5. Estudis en cors hidrofòbics de proteïnes globulars</b> .....	52

<b>I.6. Objectius</b> .....	60
<b>II. MATERIAL I MÈTODES</b> .....	63
<b>II.1. Equipament i productes químics</b> .....	63
II.1.1. Equipament .....	63
II.1.2. Productes químics .....	64
<b>II.2. Material biològic i medis de cultiu</b> .....	65
II.2.1. Material biològic .....	65
II.2.2. Vectors .....	65
II.2.3. Medis de cultiu .....	69
II.2.4. Manteniment de les soques .....	71
II.2.5. Creixement dels cultius .....	71
II.2.5.1. Condicions generals aplicades al creixement dels cultius .....	71
II.2.5.2. Condicions de creixement dels cultius i inducció per a l'expressió de la RNasa A recombinant i variants en <i>E. coli</i> .....	72
<b>II.3. Mètodes de treball amb DNA</b> .....	74
II.3.1. Obtenció de DNA dels vectors .....	74
II.3.1.1. Minipreparacions de DNA plasmídic a partir de cultius d' <i>E. coli</i> .....	74
II.3.2. Manipulació del DNA .....	76
II.3.2.1. Electroforesi de DNA en gels d'agarosa .....	76
II.3.2.2. Purificació de fragments de DNA .....	78
II.3.2.3. Concentració del DNA .....	80
II.3.2.4. Estimació de la concentració del DNA .....	81
II.3.2.5. Amplificació de DNA mitjançant PCR .....	82
II.3.2.6. Tractament amb enzims de restricció .....	83
<b>II.4. Clonatge en plasmidis</b> .....	85
II.4.1. Reacció de lligament .....	85
II.4.2. Obtenció de cèl·lules competents .....	86
II.4.2. Transformació de cèl·lules competents .....	87

II.4.3. Selecció de colònies transformants .....	88
<b>II.5. Mutagènesi dirigida per oligonucleòtid</b> .....	89
II.5.1. Disseny d'oligonucleòtids .....	89
II.5.2. Mètode SDM per PCR .....	90
<b>II.6. Seqüenciació de DNA</b> .....	94
<b>II.7. Mètodes de treball amb proteïnes</b> .....	95
II.7.1. Obtenció de la Ribonucleasa A no recombinant .....	95
II.7.2. Purificació de les RNases A recombinants expressades en <i>E. coli</i> BL21(DE3) .....	97
II.7.2.1. Purificació de les rRNases A seguint el protocol A .....	97
II.7.2.2. Purificació de les rRNases A seguint el protocol B .....	101
II.7.2.3. Comprovació de la puresa i seguiment del procés de purificació de les rRNases A .....	104
II.7.3. Determinació de la concentració de proteïna .....	106
II.7.3.1. Mètode espectrofotomètric .....	106
II.7.3.2. Mètode de Bradford .....	107
II.7.4. Mètodes electroforètics .....	107
II.7.4.1. Electroforesi discontinua en gels de poliacrilamida-SDS .....	107
II.7.4.2. Electroforesi discontinua en condicions no desnaturalitzants .....	109
II.7.5. Mètodes de determinació de l'activitat ribonucleasa .....	111
II.7.5.1. Determinacions espectrofotomètriques .....	111
II.7.5.2. Determinació en placa d'agarosa .....	113
II.7.5.3. Mètode electroforètic en gels de poliacrilamida-SDS amb poli(C) revelats per activitat (Zimogrames) .....	114
II.7.6. Determinació del coeficient d'extinció molar .....	116
II.7.7. Estudi estructural per diroisme circular (DC) .....	119
II.7.8. Calorimetria d'escombrat diferencial (DSC) .....	121
II.7.9. Cromatografia de gel filtració pel sistema d'HPLC .....	127
II.7.10. Espectroscòpia de fluorescència de l'estat excitat i espectroscòpia de fluorescència de fase amb multifreqüència .....	127
<b>II.7. Models moleculars</b> .....	132

<b>III. RESULTATS I DISCUSSIÓ</b> .....	133
<b>III.1. Obtenció de les variants de la Ribonucleasa A</b> .....	133
III.1.1. Criteris seguits per a l'elecció de les mutacions .....	133
III.1.2. Construcció dels vectors pBXR+mutació .....	135
III.1.2.1. Construcció del vector pUC119.BPR .....	136
III.1.2.2. Construcció dels vectors pUC119.BPR+mutació .....	139
III.1.2.3. Subclonatge dels gens mutats al vector pET22b(+) .....	145
III.1.3. Expressió de la RNasa A i les seves variants en <i>E. coli</i> BL21(DE3) ...	147
III.1.3.1. Comparació de l'expressió de la RNasa A i les seves variants .....	147
III.1.3.2. Expressió de la RNasa A i les seves variants .....	149
III.1.4. Purificació de les rRNases A expressades en <i>E. coli</i> BL21(DE3) seguint el protocol A .....	150
III.1.4.1. Procés de solubilització de les rRNases A .....	151
III.1.4.2. Cromatografia de bescanvi catiónic a pressió atmosfèrica en presència d'agent desnaturalitzant i reductor .....	151
III.1.4.3. Plegament i oxidació .....	153
III.1.4.4. Cromatografia de bescanvi catiónic pel sistema d'HPLC .....	154
III.1.4.5. Comprovació de la puresa de les rRNases purificades .....	157
III.1.4.5.1. Cromatografia de bescanvi catiónic pel sistema d'HPLC .....	157
III.1.4.5.2. Cromatografia de fase inversa pel sistema d'HPLC .....	159
III.1.4.6. Seguiment del procés de purificació de les rRNases A .....	160
III.1.4.7. Rendiment del procés de purificació de les rRNases A .....	163
III.1.5. Purificació de les rRNases A expressades en <i>E. coli</i> BL21(DE3) seguint el protocol B .....	164
III.1.5.1. Trencament cel·lular i solubilització de les rRNases .....	164
III.1.5.2. Plegament i oxidació .....	165
III.1.5.3. Cromatografia de bescanvi catiónic pel sistema d'HPLC .....	165
III.1.5.4. Comprovació de la puresa de les rRNases purificades .....	166
III.1.5.5. Seguiment del procés de purificació de les rRNases A .....	166
III.1.5.6. Rendiment del procés de purificació de les rRNases A .....	168

<b>III.2. Caracterització de la rRNasa A i comparació amb la</b>	
<b>RNasa A comercial</b> .....	170
III.2.1 Anàlisi espectrofotomètrica .....	170
III.2.2. Estudi de l'espectre de DC .....	171
III.2.3. Propietats catalítiques .....	172
<b>III.3. Caracterització de les variants senzilles de la RNasa A</b> .....	175
III.3.1. Determinació del coeficient d'extinció molar .....	175
III.3.2. Anàlisi espectrofotomètrica .....	176
III.3.3. Estudi de l'espectre de DC .....	177
III.3.4. Propietats catalítiques .....	181
<b>III.4. Caracterització de l'estat desnaturalitzat de les variants</b>	
<b>senzilles de la RNasa A per DC</b> .....	183
<b>III.5. Desnaturalització tèrmica de la rRNasa A i les seves variants</b>	
<b>senzilles seguida per DC</b> .....	185
<b>III.6. Desnaturalització tèrmica de la rRNasa A i les seves variants</b>	
<b>senzilles seguida per DSC</b> .....	187
III.6.1. Comparació de l'estabilitat de les variants senzilles de la RNasa A	
en relació a la proteïna salvatge .....	191
III.6.2. Estimació del nombre d'unitats cooperatives per a cada una	
de les RNases A estudiades .....	198
III.6.3. Correlació entre els canvis d'estabilitat de les variants de la	
RNasa A i la hidrofobicitat de les posicions alterades .....	200
<b>III.7. Comprovació de la presència de dímers en variants de la RNasa A</b> .....	206
<b>III.8. Caracterització de les variants dobles de la RNasa A i comparació</b>	
<b>amb la variant senzilla Y115W</b> .....	209
III.8.1. Determinació del coeficient d'extinció molar .....	209
III.8.2. Anàlisi espectrofotomètrica .....	209
III.8.3. Estudi de l'espectre de DC .....	209
III.8.4. Propietats catalítiques .....	210



<b>III.9. Estudi de la fluorescència de l'estat estacionari i fluorescència de fase amb multifreqüència de les variants dobles de la RNasa A.</b>	
<b>Propietats dinàmiques d'aquestes proteïnes .....</b>	<b>212</b>
<b>IV. DISCUSSIÓ GENERAL .....</b>	<b>219</b>
<b>V. CONCLUSIONS .....</b>	<b>233</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>235</b>



## ÍNDEX DE TAULES

TAULA II.1	Equipament utilitzat en aquest treball .....	63
TAULA II.2	Enzims de restricció utilitzats en aquest treball .....	84
TAULA III.1	Oligonucleòtids utilitzats per a l'obtenció de les variants de la RNasa A .....	139
TAULA III.2	Comparació dels paràmetres cinètics de les rRNases A WT amb la comercial .....	173
TAULA III.3	Comparació dels paràmetres cinètics de les variants senzilles amb la RNasa A .....	182
TAULA III.4	Paràmetres termodinàmics de la desnaturalització de RNasa A i variants per DSC ..	190
TAULA III.5	Valors de l'àrea accessible al solvent de residus de la RNasa A i variants .....	201
TAULA III.6	Valors del % de $\Delta\Delta G_d$ (cal)corr. per grup metil/metilè eliminat en mutar .....	204
TAULA III.7	Comparació dels paràmetres cinètics de les variants dobles amb la Y115W .....	211
TAULA III.8	Rendiments quàntics i Temps de vida de les variants que contenen W115 .....	216
TAULA III.9	Anàlisi de la relaxació de la fluorescència de les variants que contenen W115 .....	217

## ÍNDEX DE FIGURES

FIGURA I.1	Representació esquemàtica de la RNasa A a partir de l'estructura cristal·lina .....	7
FIGURA I.2	Estructura tridimensional de la RNasa A en solució per <sup>1</sup> H-RMN .....	10
FIGURA I.3	Etapas de degradació de l'RNA i mecanisme catalític de la RNasa A .....	11
FIGURA I.4	Esquema de la interacció d'un fragment d'RNA amb la RNasa A .....	16
FIGURA I.5	Seqüència nucleotídica del gen de la RNasa A .....	19
FIGURA I.6	Model proposat pel desplegament de la RNasa A .....	39
FIGURA II.1	Vectors utilitzats en aquest treball .....	68
FIGURA II.2	Cromatograma (CM-Sepharose) a P atmosfèrica de la RNasa A comercial .....	96
FIGURA II.3	Termograma de DSC per a la desnaturalització de la RNasa A .....	123
FIGURA III.1	Representació esquemàtica de la RNasa A mostrant els residus a alterar .....	135
FIGURA III.2	Construcció del vector pUC119.BPR .....	137
FIGURA III.3	Seqüència nucleotídica del cDNA que codifica la RNasa A .....	138
FIGURA III.4	Esquema general pel procés d'SDM per PCR .....	141
FIGURA III.5	Electroforesi en gel d'agarosa del procés d'SDM per PCR .....	143
FIGURA III.6	Subclonatge del gen BPR+mutació al vector pET22b(+) .....	146
FIGURA III.7	Prova d'expressió de la rRNasa A i variants: SDS-PAGE i zimograma .....	149
FIGURA III.8	Cromatograma (CM-Sepharose) a P atmosfèrica de la rRNasa A (protocol A) .....	152

FIGURA III.9	Cromatograma (Mono-S) per HPLC de la rRNasa A (protocol A) .....	154
FIGURA III.10	Cromatograma (Mono-S) per HPLC de dues variants de la RNasa A (protocol A) ..	156
FIGURA III.11	Cromatograma (Mono-S) per HPLC de la rRNasa A pura i la comercial .....	158
FIGURA III.12	Cromatograma (Vydac C4) per HPLC de la rRNasa A pura .....	159
FIGURA III.13	Anàlisi de la purificació de la rRNasa A (protocol A): SDS-PAGE i zimograma ....	161
FIGURA III.14	Espectres de DC de la rRNasa A no cromatografiada per HPLC i la comercial .....	162
FIGURA III.15	Anàlisi de la purificació de la rRNasa A (protocol B): SDS-PAGE i zimograma ....	167
FIGURA III.16	Espectres a l'UV de les rRNases A WT i la comercial .....	170
FIGURA III.17	Espectres DC de les rRNases A WT i la comercial a l'estat natiu .....	171
FIGURA III.18	Espectres a l'UV de la RNasa A i la variant Y115W .....	177
FIGURA III.19	Espectres DC de la RNasa A i la variant V108G a l'estat natiu .....	178
FIGURA III.20	Espectres DC de la RNasa A i la variant Y115W a l'estat natiu .....	180
FIGURA III.21	Espectres DC de la RNasa A i la variant V108G a l'estat desnaturalitzat .....	183
FIGURA III.22	Seguiment de la desnaturalització de la RNasa A i la variant V108G per DC .....	186
FIGURA III.23	Termogrames de DSC de la desnaturalització de la RNasa A i variants .....	188
FIGURA III.24	Correlació entre $\Delta H_{vH}$ i $T_d$ de la RNasa A i variants .....	193
FIGURA III.25	Correlació entre $\Delta\Delta G_{d(cal)}$ i $\Delta\Delta G_{d(press)}$ de la RNasa A i variants .....	196
FIGURA III.26	Correlació entre $\Delta\Delta G_{d(cal)}$ i $\Delta A$ de la RNasa A i variants .....	202
FIGURA III.27	Electroforesi en condicions no desnaturalitzants de la RNasa A i algunes variants ..	206
FIGURA III.28	Cromatograma (gel filtració) per HPLC de la RNasa A .....	207
FIGURA III.29	Representació esquemàtica de la regió del W115 en la variant Y115W .....	214
FIGURA III.30	Espectres d'emissió associats a la relaxació de les variants que contenen W115 .....	215
FIGURA III.31	Representació esquemàtica de les interaccions entre V108 i F8 en la RNasa A .....	228
FIGURA III.32	Representació esquemàtica de les interaccions entre A/G108 i F8 en dues variants ..	230

## ABREVIATURES

Abs	Absorbància
A	Adenina
Å	Amstrong
Amp, Ap	Ampicil·lina
Amp <sup>r</sup>	Soca resistent a Ampicil·lina
ATP	Adenosina-5'-trifosfat
b	Bases
B <sub>n</sub>	subseti fixador de base nitrogenada
BrEt	Bromur d'etidi
BPB	Blau de bromofenol
BPR	gen de la RNasa A de pàncrees bovi
BPR+mutació	gen mutat de la RNasa A de pàncrees bovi
BSA	Albúmina de sèrum bovi
C	Citidina
cal	Caloria
cCMP	Citidina 2',3'-fosfat cíclic
CM	Carboximetil
C <sub>p</sub>	Capacitat calorífica
C-terminal	Carboxi-terminal
D	Conformació desnaturalitzada
Da	Daltons
DC	Dicroisme circular
dCTP	Desoxicitosina 5'-trifosfat
DNA	Àcid desoxiribonucleic
cDNA	DNA còpia
dsDNA	DNA de doble cadena
dsDNA <sub>ccc</sub>	DNA de doble cadena covalentment tancat
ssDNA	DNA de cadena senzilla
DNasa	Desoxiribonucleasa
dNTP	Desoxiribonucleòtid 5'-trifosfat
ddNTP	Dideoxiribonucleòtid 5'-trifosfat
D.O.	Densitat òptica
DSC	Calorimetria d'Escombrat Diferencial
DTT	1,4-ditio-DL-treitol
ε	Coefficient d'extensió molar
EDTA	Àcid etilendiamina-tetraacètic
FUP	Forward Universal Primer (d'M13)
φ	Temps de correlació rotacional
g	Força centrífuga relativa
G	Guanina
G	Energia lliure
g, mg, µg	grams, mil·ligrams, micrograms
Gnd·HCl	Clorur de guanidini
GSH	Glutatió reduït
GSSG	Glutatió oxidat
h	Hores
H	Entalpia
H <sub>cal</sub>	Entalpia calorimètrica
H <sub>vH</sub>	Entalpia efectiva o de van't Hoff

<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida d'alta resolució
<b><i>I</i></b>	Intensitat de la fluorescència
<b>IPTG</b>	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosid
<b>K</b>	Kelvin
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>kcal</b>	Kilocalories
<b><i>k<sub>cat</sub></i></b>	Constant catalítica
<b><i>K<sub>m</sub></i></b>	Constant de Michaelis Menten
<b>λ</b>	Longitud d'ona
<b>L, mL, μL</b>	litre, mil·lilitre, microlitre
<b>LacZ</b>	gen de la β-galactosidasa
<b>LB</b>	Medi Lúria-Bertrani
<b>M, mM, μM, nM</b>	Molar, mil·limolar, micromolar, nanomolar
<b>M9</b>	Medi mínim
<b>mA</b>	mil·liamper
<b>min</b>	Minuts
<b>mS</b>	Mil·lisiemens
<b>N</b>	Conformació nativa
<b>nm</b>	nanometres
<b>N-terminal</b>	Amino-terminal
<b>PAGE</b>	Electroforesi en gel de poliacrilamida
<b>pb</b>	Parells de bases
<b>PCR</b>	Reacció en cadena de la polimerasa
<b>PMSF</b>	Feniletilsulfonyl, fluorur
<b>Pn</b>	subseti fixador de fosfat
<b>poli(C)</b>	Àcid policitidílic
<b>poli(U)</b>	Àcid poliuridílic
<b>p/p</b>	relació pes/pes
<b>p/v</b>	relació pes/volum
<b><i>Q</i></b>	Rendiment quàntic
<b><i>r</i></b>	Anisotropia
<b><i>R</i></b>	Relació entre $\Delta H_{ca}$ i $\Delta H_{vH}$
<b>RMN</b>	Ressonància magnètica nuclear
<b><sup>1</sup>H-RMN</b>	RMN de protó
<b>R<sub>n</sub></b>	subseti fixador de ribosa
<b>RNA</b>	Àcid ribonucleic
<b>mRNA</b>	Àcid ribonucleic missatger
<b>tRNA</b>	Àcid ribonucleic de transferència
<b>RNasa</b>	Ribonucleasa
<b>RNasa A</b>	Ribonucleasa de pàncrees boví
<b>rRNasa A</b>	Ribonucleasa de pàncrees boví recombinant
<b>RNAasa S</b>	complex format per dos fragments, inactius per separat, el S-peptid (1-20) i la S-proteïna (21-124), generats a partir de la digestió controlada de la RNAasa A amb subtilisina
<b>r.p.m.</b>	Revolucions per minut
<b>S</b>	Entropia
<b><i>S<sub>cal</sub></i></b>	Entropia calorimètrica
<b>SDM</b>	Mutagènesi dirigida per oligonucleòtid
<b>SDS</b>	Dodecil sulfat sòdic
<b>s, seg</b>	Segons
<b>T</b>	Timina

<i>T</i>	Temperatura
$T_d$	Temperatura de desnaturalització
$\tau$	Temps de vida
TAE	Amortidor Tris/àcid acètic/EDTA
TB	Medi de cultiu ( <i>terrific broth</i> )
TBE	Amortidor Tris/àcid bòric/EDTA
TE	Amortidor Tris/HCl/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamida
TFA	Àcid trifluoracètic
Tris	Tris-hidroximetil-aminometà
U.A.	Unitats d'Absorbància
U.D.O.	Unitats de densitat òptica
UV	Ultraviolat
$V_{m\grave{a}x}$	Velocitat màxima
v/v	relació volum/volum
WT	tipus salvatge <i>Wild-type</i>
XC	Xilen cianol

## Nomenclatura dels vectors (construccions)

### pET22b(+)

<b>pBXR</b>	Vector d'expressió en <i>E. coli</i> de la RNasa A sota el control del promotor de T7 on el gen (cDNA) de la RNasa A es troba fusionat darrera del pèptid senyal <i>pe/B</i>
<b>pBXR+mutació</b>	Vector d'expressió en <i>E. coli</i> de la variant senzilla o doble de la RNasa A sota el control del promotor de T7 on el gen que codifica la variant de la RNasa A es troba fusionat darrera del pèptid senyal <i>pe/B</i>

### pUC119

<b>pUC119.BPR</b>	Vector de clonatge que porta incorporat el gen de la RNasa A
<b>pUC119.BPR+mutació</b>	Vector de clonatge que porta incorporat el gen de la RNasa A mutat

## Nomenclatura de les soques

### *Escherichia coli*

<i>E. coli</i> BL21(DE3)-[]	Soca BL21(DE3) d' <i>Escherichia coli</i> portadora de plasmidi
<i>E. coli</i> TG1-[]	Soca TG1 d' <i>Escherichia coli</i> portadora de plasmidi

## Nomenclatura de les variants de la RNasa A

<b>I106L</b>	Ribonucleasa A amb la substitució Isoleucina 106 per Leucina
<b>I106V</b>	Ribonucleasa A amb la substitució Isoleucina 106 per Valina
<b>I106A</b>	Ribonucleasa A amb la substitució Isoleucina 106 per Alanina
<b>I107L</b>	Ribonucleasa A amb la substitució Isoleucina 107 per Leucina
<b>I107V</b>	Ribonucleasa A amb la substitució Isoleucina 107 per Valina
<b>I107A</b>	Ribonucleasa A amb la substitució Isoleucina 107 per Alanina
<b>V108A</b>	Ribonucleasa A amb la substitució Valina 108 per Alanina
<b>V108G</b>	Ribonucleasa A amb la substitució Valina 108 per Glicina
<b>A109G</b>	Ribonucleasa A amb la substitució Alanina 109 per Glicina
<b>Y115W</b>	Ribonucleasa A amb la substitució Tirosina 115 per Triptòfan
<b>V116A</b>	Ribonucleasa A amb la substitució Valina 116 per Alanina
<b>V116G</b>	Ribonucleasa A amb la substitució Valina 116 per Glicina
<b>V118A</b>	Ribonucleasa A amb la substitució Valina 118 per Alanina
<b>V118G</b>	Ribonucleasa A amb la substitució Valina 118 per Glicina
<b>I106V+Y115W</b>	Ribonucleasa A amb les substitucions I106V i Y115W
<b>I106A+Y115W</b>	Ribonucleasa A amb les substitucions I106A i Y115W
<b>I107L+Y115W</b>	Ribonucleasa A amb les substitucions I107L i Y115W

# **INTRODUCCIÓ**

## I.1. Les ribonucleases

Les ribonucleases (RNases) són enzims que catalitzen la degradació dels àcids ribonucleics (RNA) i es troben àmpliament distribuïdes a quasi tots els teixits, animals i vegetals, i també a microorganismes.

### I.1.1. Classificació i funcions

Les RNases intervenen en processos de digestió, recanvi i maduració de diferents tipus d'RNA. En funció de com aquests enzims actuen sobre el seu substrat natural, l'RNA, es poden classificar en *exoribonucleases* si catalitzen la formació de mononucleòtids a partir d'un extrem lliure, específicament l'extrem 5' o 3' d'una cadena d'RNA, de manera successiva, o bé en *endoribonucleases* si catalitzen l'escisió d'enllaços fosfodiester a l'interior d'una cadena d'RNA, alliberant oligonucleòtids.

Atenent a l'especificitat mostrada pel substrat, es pot distingir entre ribonucleases *inespecífiques*, que catalitzen la degradació de tot tipus de molècules d'RNA, i que poden presentar certa especificitat per les bases presents en els punts de tall, i les ribonucleases *específiques*, que tenen la capacitat d'actuar sobre una subpoblació de molècules d'RNA i catalitzar reaccions més específiques, i que solen estar involucrades en el procés de recanvi i processament de l'RNA.

Depenent del lloc on es produeix la seva actuació, les ribonucleases també es poden classificar en *extracel·lulars*, si actuen a fora de la cèl·lula on s'han sintetitzat, o en *intracel·lulars* si actuen a l'interior de les cèl·lules i participen en la maduració, modificació i recanvi dels diferents tipus d'RNA cel·lular. Les ribonucleases extracel·lulars són les més estudiades (pancreàtica, seminal, ...) i solen ser força inespecífiques i de massa molecular molt baixa, al contrari que les intracel·lulars, les quals són molt més específiques i estructuralment complexes.

No es coneix, en molts casos, la funció concreta de les ribonucleases extracel·lulars. La més estudiada, la RNasa pancreàtica, intervé activament en la digestió de rumugants i herbívors (Barnard, 1969). Altres, com ara l'angiogenina, la RNasa de plasma seminal boví, la proteïna catiónica d'eosinòfil (ECP) i la neurotoxina derivada d'eosinòfil (EDN) i la proteïna P-30 o onconasa presenten propietats biològiques importants que s'esmentaran més endavant. La relació entre l'activitat RNasa d'aquestes proteïnes i la



seva funció biològica presenta controvèrsia. Alguns autors consideren que les RNases extracel·lulars podrien participar en el control del creixement i desenvolupament en organismes superiors. La hipòtesi de "l'RNA missatger extracel·lular" proposa una combinació d'RNA, RNases i inhibidors d'RNases com a reguladors de processos biològics als organismes superiors. L'RNA realitzaria la funció de transmissor en els processos de comunicació cel·lular per a distàncies curtes, complementant la funció dels esteroides per a distàncies llargues, i la dels polipeptids per a distàncies intermèdies (Benner, 1988; Benner i Alleman, 1989).

És difícil fer una classificació general ja que no s'aconsegueixen agrupacions homogènies de ribonucleases, perquè tant al grup de les endoribonucleases com al de les exoribonucleases s'hi troben diferents formes d'actuació sobre el substrat i diferents graus d'especificitat.

Sierakowska i Shugar (1977) van dividir les endoribonucleases de mamífer pirimidina específiques en dos grans grups anomenats *tipus secretori* i *tipus no secretori*. Aquesta nomenclatura no fa referència a la capacitat de les RNases de ser o no secretades al medi extracel·lular per realitzar les seves funcions, sinó que prové de la característica dels òrgans a partir dels quals es van purificar i caracteritzar cinèticament les primeres ribonucleases humanes: *ribonucleases de tipus secretori* si eren semblants a la ribonucleasa produïda pel pàncrees o *ribonucleases de tipus no secretori* si eren semblants a la ribonucleasa purificada a partir del fetge. És per això que s'ha suggerit la nomenclatura *de tipus pancreàtic i no pancreàtic* en lloc de la de secretor i no secretor (Sorrentino i Libonati, 1994).

Les ribonucleases de tipus pancreàtic es localitzen majoritàriament en òrgans secretors, com el pàncrees, el ronyó i les vesícules seminals, així com també en òrgans no secretors com el cervell i el cor, i en fluids com la llet, la saliva, l'orina, el sèrum i el fluid seminal. Aquestes ribonucleases es caracteritzen per presentar la següent preferència per a la hidròlisi de substrat: poli(C)>RNA>poli(U). Tenen una activitat òptima propera a pH 8 i una capacitat de ser inhibides per  $Zn^{2+}$  i  $Cu^{2+}$ . Hidrolitzen l'intermediari 2',3'-fosfat cíclic i poden actuar sobre l'RNA de doble cadena, depenent aquesta activitat de la càrrega neta i del grau de glicosilació de la proteïna.

Les ribonucleases de tipus pancreàtic s'han pogut aïllar en quantitats considerables, però molt variables, de pàncrees d'alguns mamífers i d'uns pocs rèptils (Barnard,

1969a,b). Aquest autor, va proposar que un nivell elevat de RNasa pancreàtica en els remugants, en relació a altres mamífers, és la resposta evolutiva per facilitar la digestió de l'RNA derivat de la flora microbiana de l'estómac d'aquests mamífers i poder-lo utilitzar com a font de nitrogen i fòsfor. Aquests microorganismes es troben al rumen i passen a continuació al quall (estómac veritable dels remugants) on són lisats, alliberant-se gran quantitat d'RNA que és degradat a l'intestí per la RNasa provinent del pàncrees. L'autor va suggerir també que la presència de ribonucleasa al pàncrees de mamífers no remugants pot ser un vestigi evolutiu. Tanmateix, l'expressió de la ribonucleasa pancreàtica i altres ribonucleases de tipus secretori en altres òrgans indica que l'enzim podria tenir altres funcions a part de la digestiva (Beintema i col., 1988c). La funció de les RNases de tipus secretori com la del cervell boví es manté desconeguda per bé que s'ha descrit una possible acció antitumoral (Matousek, 1973), mentre que a la RNasa de plasma seminal boví se li han atribuït diverses funcions, com es veurà més endavant.

Les ribonucleases de tipus no pancreàtic són enzims intracel·lulars que s'han identificat en òrgans tals com el fetge, la melsa, el pulmó, el ronyó, l'estómac i la placenta i també en leucòcits i fluids com el serum i l'orina. Presenten la següent preferència per a la hidròlisi de substrat: RNA>poli(U)>poli(C). Tenen una activitat òptima propera a pH 7 i una baixa capacitat de ser inhibides per  $Zn^{2+}$  i  $Cu^{2+}$ . Aquests enzims degraden els dinucleòtids molt lentament i no s'ha observat activitat d'hidròlisi de cUMP i cCMP ni sobre l'RNA de doble cadena. S'ha proposat que poden participar en la degradació de l'RNA missatger, en la defensa contra RNAs víriques i en la digestió intracel·lular de l'RNA (Barnard, 1969b).

A mesura que es van anar aïllant i seqüenciant altres tipus de ribonucleases va sorgir la necessitat de fer una nova agrupació que, sense arribar a desfer del tot la classificació d'endoribonucleases de mamífer pirimidina específiques, fos capaç de relacionar-les millor amb altres tipus de ribonucleases, atenent a criteris d'homologia de seqüències i similitud de plegament. Així és com va néixer la Superfamília de les ribonucleases pirimidina específiques (Beintema i col., 1988), que inclou RNases de tipus secretori i no secretori de vertebrats aparentment tant heterogènies com ara l'angiogenina, l'ECP i l'EDN, la RNasa de plasma seminal boví i la proteïna P-30 o onconasa, entre altres. Dins d'aquesta superfamília hi han membres amb activitats biològiques importants que en els darrers anys han situat l'estudi de les ribonucleases en un primer pla. A

continuació se n'indiquen alguns exemples:

L'angiogenina participa en el procés de neovascularització i va ser aïllada per primera vegada d'una línia de cèl·lules tumorals (Strydom i col., 1985; Shapiro i col., 1986). Segons Matousek i col. (1995) té una activitat immunosupressora que ha d'actuar conjuntament amb la neovascularització del teixit tumoral i d'aquesta manera contribuir al seu desenvolupament.

La RNasa de plasma seminal boví (BS-RNasa) és l'únic membre conegut de la superfamília de les RNases que és un dímer. Consta de dues cadenes idèntiques de 124 residus, presentant una homologia del 80% amb la RNasa de pàncrees boví. Posseeix tres propietats biològiques específiques: és antiespermatogènica (Matousek i Grozdanovic, 1973), immunosupressora (protegeix l'esperma del sistema immunitari femení) i antitumoral (Matousek, 1973b; Vescia i Tramontano, 1980; Kim i col., 1995a,b). A més, se li ha atribuït una funció embriotòxica (Matousek, 1973a; Matousek i col., 1973a,b) i una acció antivírica (Youle i col., 1994).

L'ECP i l'EDN són proteïnes amb activitat RNasa característica de les RNases no secretores (Sorrentino i Glitz, 1991), a més, actuen com a neurotoxines amb activitat citotòxica selectiva que provoca la degeneració de determinats tipus cel·lulars del teixit nerviós (Gleich i col., 1986).

La proteïna P-30 o onconasa presenta una activitat RNasa limitada i propietats antitumorals, fou aïllada dels oòcits de *Rana pipiens* (Ardelt i col., 1991) i posseeix una estructura tridimensional, obtinguda per raigs X, similar a la de la RNasa pancreàtica bovina (Mosimann i col., 1994).

S'inclouen en aquesta superfamília altres proteïnes com la proteïna de la medulla òssia de pollastre (RSFR) (Klenova i col., 1992), una lecitina que reconeix àcid siàlic (SLB) de *Rana catesbeiana* (Nitta i col., 1993).

En conjunt, són proteïnes amb estructures primàries homòlogues, però tenen una activitat ribonucleàsica específica diferent i funcions biològiques també diferents.

Zhou i Strydom (1993) van proposar una nomenclatura molt útil i que cada vegada s'utilitza més, fonamentada en la comparació de les estructures primàries de les diferents ribonucleases humanes que han estat aïllades i seqüenciades. Aquests investigadors anomenen RNasa 1 a la ribonucleasa de pàncrees o de tipus secretori, RNasa 2 a la neurotoxina derivada d'eosinòfil o de tipus no secretori, RNasa 3 a la proteïna catiónica d'eosinòfil, RNasa 4 a la ribonucleasa aïllada de plasma i RNasa 5 a l'angiogenina.

## **I.2. La ribonucleasa A de pàncrees boví**

La ribonucleasa A de pàncrees boví (RNasa A; EC 3.1.27.5.), que correspon a la forma predominant de l'enzim al pàncrees de *Bos taurus*, ha estat una de les proteïnes més àmpliament estudiades i potser l'enzim més estudiat del segle XX, molt probablement a causa dels avantatges que presenta respecte d'altres proteïnes, com ara que és de fàcil purificació, abundant en el pàncrees, de gran estabilitat i petita massa molecular. Aquests avantatges han permès que fos objecte de gran part dels estudis realitzats sobre estructura de proteïnes i mecanismes d'activitat enzimàtica. Aquests estudis es recullen en nombroses revisions: Anfinsen i White (1961); Scheraga i Rupley (1962); Barnard (1969a); Richards i Wickoff (1971); Blackburn i Moore (1982); Eftink i Biltonen (1987); Parés i col. (1991); Nogués col. (1995); Cuchillo i col. (1997); Raines (1998).

### **I.2.1. Estudis d'estructura i funció de la RNasa A**

La RNasa A fou el primer enzim i la tercera proteïna (després de la insulina i l'hemoglobina) per la qual es va obtenir una seqüència d'aminoàcids completa (Hirs i col., 1960; Smyth i col., 1963). L'enzim madur, secretat per les cèl·lules exocrines del pàncrees boví, consta d'una única cadena polipeptídica de forma globular formada per 124 residus, que conté 19 dels 20 aminoàcids naturals, llevat del triptòfan. Té una massa molecular de 13683 daltons i un pI de 9,3 (Anfinsen i col., 1952; Smyth i col., 1963). En la seva seqüència s'hi troben vuit residus de cisteïna que formen quatre ponts disulfur entre les posicions, 26-84, 40-95, 58-110 i 65-72, els quals, es mantenen en totes les ribonucleases pancreàtiques de mamífer.

#### **I.2.1.1. Estudis per cristal·lografia i difracció de raigs X i espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear (RMN)**

##### Estudis per cristal·lografia i difracció de raigs X

L'estructura tridimensional de la RNasa A es va determinar a partir d'estudis per cristal·lografia i difracció de raigs X (Kartha i col., 1967) a una resolució de 0,2 nm. El mapa obtingut va permetre traçar la cadena principal de la proteïna, la localització dels ponts disulfur i la determinació de les dimensions aproximades de la molècula. La



RNasa A té una forma similar a un ronyó amb una profunda depressió on se situen els residus del centre actiu. Consta de tres zones amb estructura de full plegat  $\beta$  antiparal·lela formada per tres cadenes llargues i només un 19 % de la seva estructura és d'hèlix  $\alpha$ .

Estudis posteriors han permès afinar l'estructura de la RNasa A a 1,45 Å (Borkakoti i col., 1982) i posteriorment a 1,26 Å (Wlodawer i col., 1988). S'observa una estructura en forma de U i de dimensions aproximades: 3,5 x 4,5 x 3,1 nm. En l'extrem N-terminal es descriu un segment llarg d'hèlix  $\alpha$  i dues regions d'hèlix  $\alpha$  més curtes (24-33 i 50-60) empaquetades enfront d'una regió tipus full plegat  $\beta$  formada per tres cadenes antiparal·leles (42-48, 71-90 i 94-110) (Wlodawer i col., 1982; Borkakoti i col., 1982; Svenson i col., 1986 i Wlodawer i col., 1988) (FIGURA I.1). Wlodawer i Sjölin (1983) complementaren l'estudi per difracció de raigs X amb la difracció per neutrons que va permetre definir amb precisió l'orientació d'algunes cadenes laterals.

La ribonucleasa S, formada pels dos fragments resultants de la digestió controlada de la RNasa A amb subtilisina, anomenats S-pèptid (residus 1-20) i S-proteïna (residus 21-124), té una estructura tridimensional molt similar a la de la RNasa 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 RNasa S es troben desorganitzats, fet que també s'observa en la RNasa A, ja que un S-pèptid format per tan sols els 15 primers residus és suficient per a obtenir la unió amb la S-proteïna, i una estructura gairebé equivalent a la RNasa A, amb la mateixa activitat catalítica (Richards i Wyckoff, 1971; Blackburn i Moore, 1982). Es considera que els residus hidrofòbics Phe8 i Met13 són importants per a la interacció de l'S-pèptid (Simonson i Brünger, 1992; Kim i col., 1992; Varadarajan i Richards, 1992; Goldberg i Baldwin, 1999).

Una contribució important per a la comprensió del mecanisme d'unió de la RNasa A al seu substrat natural, l'RNA, ha estat la determinació de l'estructura de complexos cristal·lins entre l'enzim i àcids nucleics que actuen com a anàlegs del substrat o del producte. Estructures amb oligonucleòtids inclouen d(pA)<sub>4</sub> (McPherson i col., 1986a,b), d(pT)<sub>4</sub> (Birdsall i col., 1992) i d(ApTpApApG) (Fontecilla-Camps i col., 1994) i amb dinucleòtids d(CpA) Zegers i col., 1994), d(CpG) (Aguilar i col., 1991), entre altres. Les estructures de la RNasa A i els seus complexos, obtingudes per anàlisis de difracció de

raigs X i per RMN han estat objecte de recents revisions (Gilliland, 1997; González i col. 1997).

Darrerament, Liu i col. (1998) han determinat l'estructura cristal·lina del dímer de la RNasa A a una resolució de 2,1 Å. La formació del dímer té lloc per un mecanisme d'intercanvi de dominis, el qual ha estat descrit, a partir d'estructures cristal·lines, per a dímers de més de 10 proteïnes diferents. En el dímer de la RNasa A, té lloc l'intercanvi de l'hèlix  $\alpha$  N-terminal (residus 1-15) de cada subunitat. L'estructura dimèrica la BS-RNasa ja havia mostrat aquest tipus d'intercanvi (Mazzarella i col., 1993). Tanmateix, la interfase entre les dues subunitats del dímer de la RNasa A difereix de manera substancial de la de la BS-RNasa. En el dímer de la RNasa A, aquesta interfase està formada per dos fulls plegats  $\beta$  antiparal·lels (residus 97-103 de cada subunitat), amb sis ponts d'hidrogen entre els dos fulls plegats  $\beta$ , mentre que a la BS-RNasa, està formada principalment entre dues hèlixs  $\alpha$  (residus 24-33) connectades per mitjà de dos ponts disulfur.

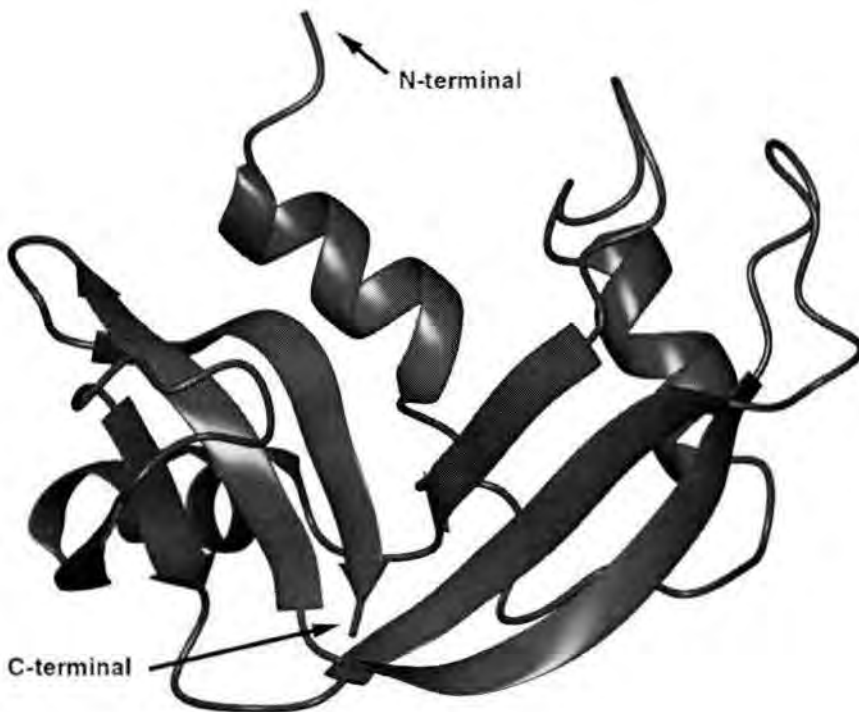


FIGURA 1.1

Representació esquemàtica de la molècula de la RNasa A a partir de l'estructura cristal·lina. Les fletxes representen les zones d'estructura de full plegat  $\beta$  i les espirals les zones d'hèlix  $\alpha$ . Reproduït de Wlodawer i col. (1988).

### Estudis per espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear

La RNasa A fou una de les primeres proteïnes estudiades per RMN. (Saunders i col., 1957). Hahn i Rüterjans (1985) van realitzar el primer estudi de la RNasa A per  $^1\text{H}$ -RMN bidimensional i van assignar les ressonàncies corresponents a 21 residus. Rico i col. (1989) i Robertson i col. (1989) van assignar l'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN de l'enzim en solució aquosa i van identificar els elements de l'estructura secundària. Els dos estudis van donar lloc a resultats similars llevat d'algunes discrepàncies discutides per Rico i col. (1991). Posteriorment Santoro i col. (1993) van obtenir per RMN una estructura tridimensional d'elevada resolució de la RNasa A en solució a partir d'un afinament mitjançant càlculs de dinàmica molecular amb restriccions imposades per les dades experimentals. Els autors van obtenir 16 estructures independents, la superposició de les quals va permetre identificar les zones més mòbils de la proteïna, la més mòbil de les quals correspon a la zona N-terminal. Comparant els resultats amb les estructures obtingudes per cristal·lografia i difracció de raigs X, es confirma l'estructura global de la proteïna, la majoria de ponts d'hidrogen i les posicions de les cadenes laterals de la majoria de residus. Prèviament, Bello i Nowoswiat (1965) havien observat que els cristalls de RNasa A mantenien el 75% de l'activitat catalítica, fet que va suggerir que l'estructura de l'enzim cristal·litzat i la de l'enzim en solució són molt similars.

En resoldre l'estructura de la RNasa A en solució pel grup de Rico i col·laboradors es confirma que aquesta estructura és molt similar a l'estructura cristal·lina. Els elements d'estructura secundària queden ben definits a partir d'una anàlisi dels angles diedres i els patrons de ponts d'hidrogen. En la FIGURA 1.2 es mostren els ponts d'hidrogen en els que participen els àtoms de la cadena principal de la RNasa A en solució. La primera hèlix  $\alpha$  entre els residus Ala4 i Met13 està molt ben definida i regular, amb ponts d'hidrogen del tipus  $\text{CO}_i\text{-HH}_{i+4}$  al llarg de l'hèlix. Contràriament, la segona hèlix  $\alpha$ , compresa entre els residus Asn24 i Arg33, és altament irregular. Aquesta hèlix comença amb un pont d'hidrogen del tipus  $\text{CO}_i\text{-HH}_{i+3}$  entre Asn24 i Asn27 i el grup CO d'aquest darrer residu no sembla estar involucrat en cap pont d'hidrogen. La tercera hèlix  $\alpha$  s'exten entre els residus Leu51 i Ser59, amb angles diedres fortament restringits. Comença per un gir hèlix  $\alpha$  i continua per dos girs del tipus hèlix  $3_{10}$ .

Més d'una tercera part dels residus de la RNasa A es troben formant estructura de full plegat  $\beta$ . Es poden distingir set cadenes individuals que inclouen els residues Pro42 a His48 ( $\beta_1$ ), Lys61 a Ala64 ( $\beta_2$ ), Asn71 a Glu74 ( $\beta_3$ ), Met79 a Thr87 ( $\beta_4$ ), Ala96 a

Lys104 ( $\beta_5$ ), His105 a Glu111 ( $\beta_6$ ) i Val116 a Val124 ( $\beta_7$ ). Aquestes cadenes estan disposades de forma antiparal·lela mostant els patrons següents:  $\beta_1$  és antiparal·lela a  $\beta_4$ , la qual és, a la vegada, antiparal·lela a  $\beta_5$ ,  $\beta_2$  és antiparal·lela a  $\beta_3$ , la qual és, a la vegada, antiparal·lela a  $\beta_6$  i aquesta darrera ho és, a la vegada, a  $\beta_7$ .

Es troben diversos girs a la RNasa A en solució. A la regió compresa entre els residus 14 i 23, que connecta les dues primeres hèlixs  $\alpha$ , s'hi troba un gir  $\beta$  del tipus III seguit per un canvi abrupte de la cadena polipeptídica al residu 18 i per un gir  $\beta$  del tipus I format pels residus 22-25, just a l'inici de la segona hèlix  $\alpha$ . Els residus 65-68 formen un gir  $\beta$  del tipus I molt ben definit amb el pont d'hidrogen  $\text{CO}_i\text{-HH}_{i+3}$  característic.

La RNasa A conté 4 residus de prolina: Pro42, Pro93, Pro114 i Pro117, dels quals, l'enllaç peptídic que precedeix a la Pro93 i a la Pro114 adopta una conformació *cis* a l'estat natiu. Aquests dos residus es troben en girs  $\beta$  del tipus VI. Concretament, el segment 91-94 forma un gir  $\beta$  del tipus VIa i el segment 112-115 forma un gir  $\beta$  del tipus VIb sense ponts d'hidrogen  $\text{CO}_{i+3}$ .



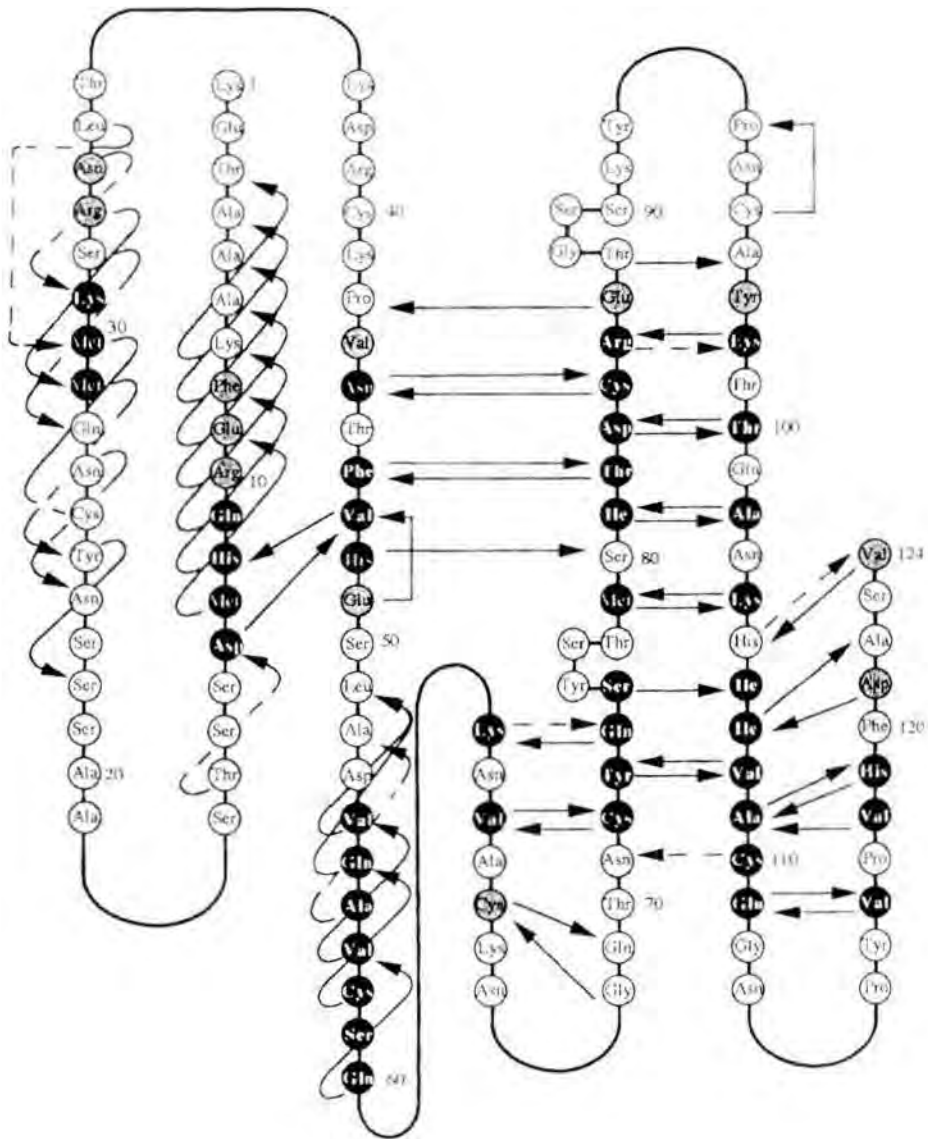


FIGURA 1.2

Estructura tridimensional de la RNasa A en solució per espectroscòpia de  $^1\text{H}$ -RMN a pH 4 i  $35^\circ\text{C}$ . Representació esquemàtica dels ponts d'hidrogen en els quals participen els àtoms de la cadena principal. Les fletxes no discontinües corresponen als ponts d'hidrogen observats en 15 o 16 de les estructures, mentre que les fletxes discontinües corresponen als observats en com a mínim 10 d'elles. Els cercles negres corresponen als protons de grups amida amb una velocitat d'intercanvi inferior a  $1,5 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ , els cercles blancs corresponen a valors superiors a  $1,5 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  i els cercles grisos a valors intermedis. Reproduït de Santoro i col. (1993).

### I.2.1.2. Mecanisme de catàlisi

Tradicionalment, s'ha considerat que la RNasa A catalitza la hidròlisi dels enllaços 3',5'-fosfodiester de les cadenes senzilles d'RNA mitjançant una reacció en dues etapes (Richards i Wyckoff, 1971; Eftink i Biltonen, 1987). La primera etapa és una reacció de transfosforilació des de la posició 5' d'un nucleòtid a la posició 2' del nucleòtid adjacent amb la formació d'un extrem 2',3'-fosfodiester cíclic i un extrem 5'-OH lliure (FIGURA I.3.A). Durant la segona etapa té lloc la reacció d'hidròlisi del 2',3'-fosfodiester cíclic i es forma un grup 3'-fosfat terminal. La base nitrogenada de la posició 3' de l'enllaç que s'hidrolitza ha de ser una pirimidina (C o U) mentre que la base de la posició 5' pot ser tant una pirimidina com una purina. La reacció de transfosforilació es produeix a una velocitat molt superior a la d'hidròlisi i és reversible.

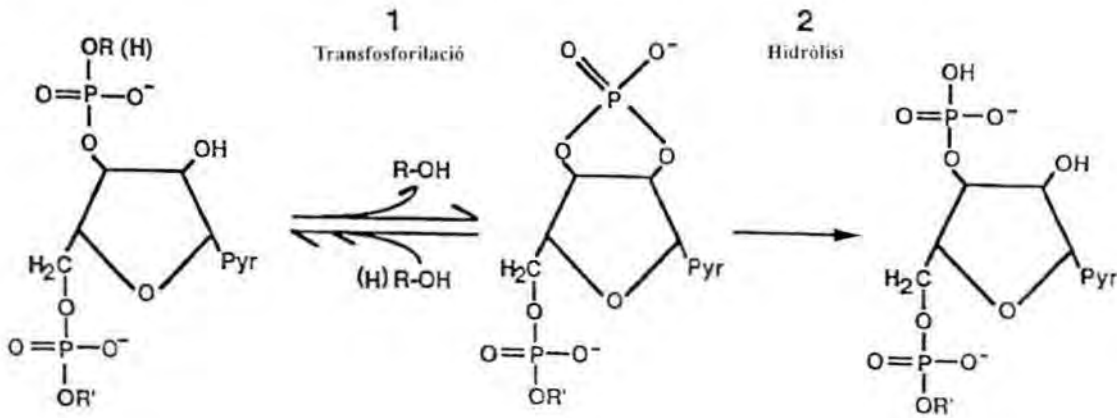


FIGURA I.3.A

Esquema de les dues etapes de degradació de l'RNA. Reproduït de Cuchillo i col. (1993). R i R': cadenes de polinucleòtid; Pyr: pirimidina.

La descripció de la reacció de degradació de l'RNA ha estat font d'ambigüitat, especialment pel que fa al paper dels grups 2',3'-fosfodiester cíclics. La descripció clàssica de la reacció, com es descriu en la FIGURA I.3.A, pot ser interpretada com un mecanisme seqüencial en el qual R-OH és el primer producte i 3'-fosfomonoester és el segon producte d'una reacció de doble desplaçament, i en la qual l'intermediari 2',3'-fosfodiester es trobaria unit a l'enzim. Aquesta interpretació seqüencial de la reacció es troba, per exemple, en els mecanismes proposats per Hammes (1968), Roberts i col.

(1969) i Rabin i col. (1970).

Cuchillo i col. (1993) van mostrar que els grups 2',3'-fosfodiester cíclics no són intermediaris units a l'enzim, sinó productes veritables de la reacció, la hidròlisi dels quals té lloc només en solució aquosa una vegada s'han utilitzat pràcticament tots els substrats poli- o oligonucleòtids. D'aquesta manera, els autors indiquen que no és correcte considerar la reacció com un procés seqüencial, sinó que les dues etapes, transfosforilació i hidròlisi, s'han de considerar com dos processos catalítics separats. La hidròlisi dels enllaços 2',3'-fosfodiester s'hauria de considerar com un procés equivalent a la reacció inversa de la transfosforilació dels enllaços 3',5'-fosfodiester (FIGURA I.3.A). Els autors suggereixen un canvi en la classificació de la RNasa A: l'enzim s'hauria de catalogar com una transferasa i no com una hidrolasa. La naturalesa veritable dels productes 2',3'-fosfodiester cíclics formats durant la reacció ha estat també demostrada pel grup de Raines (Thompson i col., 1994) per altres RNases a més de la RNasa A.

Han estat proposats diversos mecanismes de catàlisi per a la RNasa A. El mecanisme de catàlisi més 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.3.B). En l'etapa de transfosforilació, la His12 actua de base, desprotonant el grup O2' i la His119 actua d'àcid, protonant el grup O5'R que s'allibera i debilitant l'enllaç P-O5', facilitant així l'atac del O2' sobre el fòsfor. Aquestes funcions s'inverteixen en l'etapa d'hidròlisi: la His119 actua de base, capta un protó d'una molècula d'aigua, mentre que la His12 actua d'àcid, protonant el grup O2'. En les dues etapes es forma un complex intermediari pentacovalent, on el fosfat adopta una configuració de bipiràmide trigonal, estabilitzada principalment per la Lys41 (Allewel i col., 1973; Borkakoti i col., 1983; Wlodawer i col., 1983). Marchiori i col. (1974) indicaren que el residu Lys7 podria també 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., 1970a,b,1972).

Estudis posteriors sobre el mecanisme de catàlisi van confirmar el model inicial de catàlisi àcid/base on participen els grups imidazole dels residus His12 i His119 (Eftink i Biltonen, 1983,1987; Herschlag, 1994).

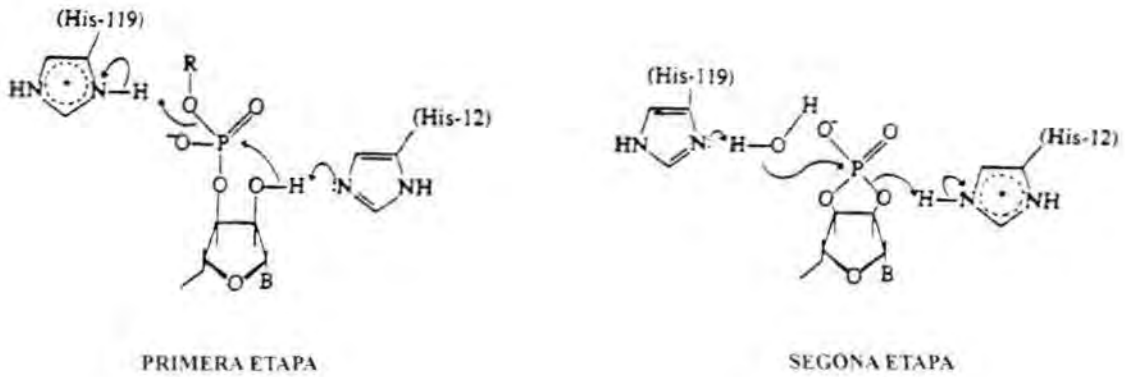


FIGURA I.3.B

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

### I.2.1.3. Especificitat de la reacció

L'enzim presenta una especificitat primària per la base nitrogenada del nucleòtid en posició 3' en relació a l'enllaç fosfodiester que s'escindeix, la qual ha de ser una pirimidina ja que malgrat s'ha vist que l'especificitat de la reacció de transfosforilació no és absoluta, la hidròlisi de nucleòtids de purina 2',3'-fosfat cíclic és extremadament lenta (Beers, 1960; Imura i col., 1965). Paral·lela a aquesta especificitat primària, s'ha observat que la composició dels nucleòtids adjacents té una gran influència en l'eficiència catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) d'aquest enzim. S'ha descrit una especificitat "secundària" per la base del nucleòtid en posició 5' en relació a l'enllaç fosfodiester que s'escindeix, seguint l'ordre A>G>C>U (Rushizky i col., 1961; Witzel i Barnard, 1962; Follman i col., 1967).

D'altra banda, s'ha descrit un increment de l'eficiència catalítica en funció de la longitud del substrat (Beers, 1960; Irie i col., 1984b). Darrerament, Moussaoui i col. (1996) han observat a partir del trencament del poli(C) una preferència de l'enzim per unir-se i escindir molècules de substrat llargues de manera que a mesura que la reacció procedeix s'acumulen oligonucleòtids de 6-7 residus.

L'enzim pot associar-se tant a desoxiribonucleòtids com a ribonucleòtids, però només pot hidrolitzar els darrers, ja que el grup 2'-OH de la ribosa és necessari pel mecanisme catalític. La configuració de la ribosa ha de ser  $\beta$ -D-ribofuranosa. La possibilitat

d'associar-se a desoxiribonucleòtids permet la seva utilització en estudis estructurals com l'anàlisi per cristal·lografia dels complexos RNasa A-desoxiribonucleòtids per a la identificació de les interaccions enzim-substrat i la caracterització dels aminoàcids implicats en la interacció.

#### **1.2.1.4. Interacció RNasa A-RNA**

La formació del complex enzim-substrat és una etapa bàsica en la catàlisi enzimàtica. En el cas dels enzims que catalitzen el trencament de substrats polimèrics, com ara les RNases, aquesta interacció és més complexa a causa de la necessitat d'una alineació correcta entre l'enzim i les regions del substrat que flanquegen el centre actiu.

A partir de nombrosos estudis estructurals i cinètics sobre el procés d'interacció i catàlisi de l'RNA per part de la RNasa A, utilitzant diferents metodologies, s'ha proposat que en la interacció d'aquesta amb el seu substrat natural, l'RNA, participen, a més del centre actiu, altres subsetis. La recopilació d'aquests estudis es troba en els treballs de revisió següents: Richards i Wyckoff (1971); Blackburn i Moore (1982); Eftink i Biltonen (1987); Parés i col. (1991); Nogués i col. (1995); Cuchillo i col. (1997); Gilliland (1997); Nogués i col. (1998).

Richards i Wyckoff (1971) van introduir la nomenclatura pels 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 fosfodiester que s'escindeix i  $B_1R_1$  com a seti principal específic per pirimidines. A més, arran que aquest enzim mostra preferència per nucleòtids de purina en posició 5' en relació a l'enllaç fosfodiester que s'escindeix, s'ha definit un subseti secundari d'unió de purines  $B_2R_2$ .

Estudis estructurals per difracció de raigs X de complexos de la RNasa A amb varis anàlegs de substrat, mono-, di- i oligonucleòtids, han mostrat els aminoàcids que participen a  $B_1$ ,  $R_1$ ,  $p_1$ ,  $B_2$ , i  $R_2$ . L'especificitat de  $B_1$  està mitjançada principalment per les cadenes laterals dels residus Thr45 i Phe120. La Thr45 estableix ponts d'hidrogen amb la base pirimidínica i exclou estèricament les bases púriques i la Phe120 estableix contactes de van der Waals amb la base pirimidínica i amb la Thr45. S'ha indicat que la cadena lateral de la Ser123 també formaria part de  $B_1$ . L'especificitat de  $B_1$  per a nucleòtids de pirimidina no és absolutament estricta. En el seti catalític  $p_1$ , la His12, la



His119 i la Lys41 són els aminoàcids que participen en el procés catalític. En el subseti d'unió B<sub>2</sub>, s'han descrit interaccions amb els residus Glu111, Gln69 i Asn71 i una interacció d'apilament de la base púrica amb la His119. La caracterització d'aquests subsetis es troba recopilada en els treballs de revisió esmentats.

També s'han proposat altres subsetis d'unió de grups fosfats, els més ben caracteritzats dels quals són p<sub>0</sub> i p<sub>2</sub>, que es troben adjacents al seti catalític en la direcció 5' i 3', postulats per Mitsui i col. (1978) i Parés i col. (1980), respectivament. Mitsui i col. van proposar a més la participació de la Lys66 a p<sub>0</sub>. Richardson i col. (1990) van postular la presència dels residus Lys7 i Arg10 a p<sub>2</sub>.

El complex RNasa A-RNA ha estat imitat mitjançant la unió de 4 oligòmers de tetradesoxifosfoadenosina [d(pA)<sub>4</sub>] a una sola molècula de RNasa A (McPherson i col., 1986). Els 12 grups fosfat de la cadena d'RNA virtual, començant per l'extrem 5', s'unirien a 9 residus bàsics, (Lys7, Lys41, Lys66, Arg85, Arg39, Lys91, Lys98, Arg33 i Lys31) a través d'interaccions electrostàtiques. Fontecilla-Camps (1994) van resoldre l'estructura del complex RNasa A-d(ApTpApApG), la qual va contribuir a la caracterització de diferents subsetis d'unió, sobretot p<sub>0</sub>, B<sub>1</sub>R<sub>1</sub>p<sub>1</sub> i B<sub>2</sub>R<sub>2</sub>p<sub>2</sub>.

D'altra banda, es va identificar un altre subseti de fixació de bases nitrogenades (B<sub>3</sub>) amb certa preferència per purines a partir d'estudis cinètics (Rushizky i col., 1961; Irie i col., 1984) i de modificació química i determinació de l'estructura cristal·logràfica de derivats obtinguts per modificació química (Parés i col., 1980; Boqué i col., 1994) i es va proposar la presència de la Lys-1 en aquest subseti.

Estudis cinètics amb oligonucleòtids (Irie i col., 1984a,b) van suggerir que p<sub>0</sub>, p<sub>1</sub> i p<sub>2</sub> són els subsetis d'unió a fosfats importants per a la catàlisi o per la unió a substrat. Tanmateix, estudis cinètics amb poli(U) (Irie i col., 1984b) van demostrar que l'eficiència catalítica per aquest anàleg de l'RNA era més elevada, cosa que indicava que interaccions enzim-substrat addicionals havien de contribuir a la unió d'aquest substrat polimèric. Moussaoui i col. (1996) van analitzar el patró de formació d'oligonucleòtids, a través de la seva separació per HPLC, quan la RNasa A utilitza poli(C) com a substrat i van observar que l'enzim no actua a l'atzar sinó que mostra preferència per la unió i trencament de molècules de substrat més llargues. A partir del patró de la formació de producte i la preferència de substrat s'ha demostrat que l'escisió d'una cadena d'RNA

està basada en l'estructura d'unió cooperativa de la RNasa A i els fosfats del polinucleòtid (Parés i col., 1991).

A partir de tots aquests resultats s'ha proposat un model per a la interacció de la RNasa A amb el seu substrat natural, l'RNA, (FIGURA I.4).

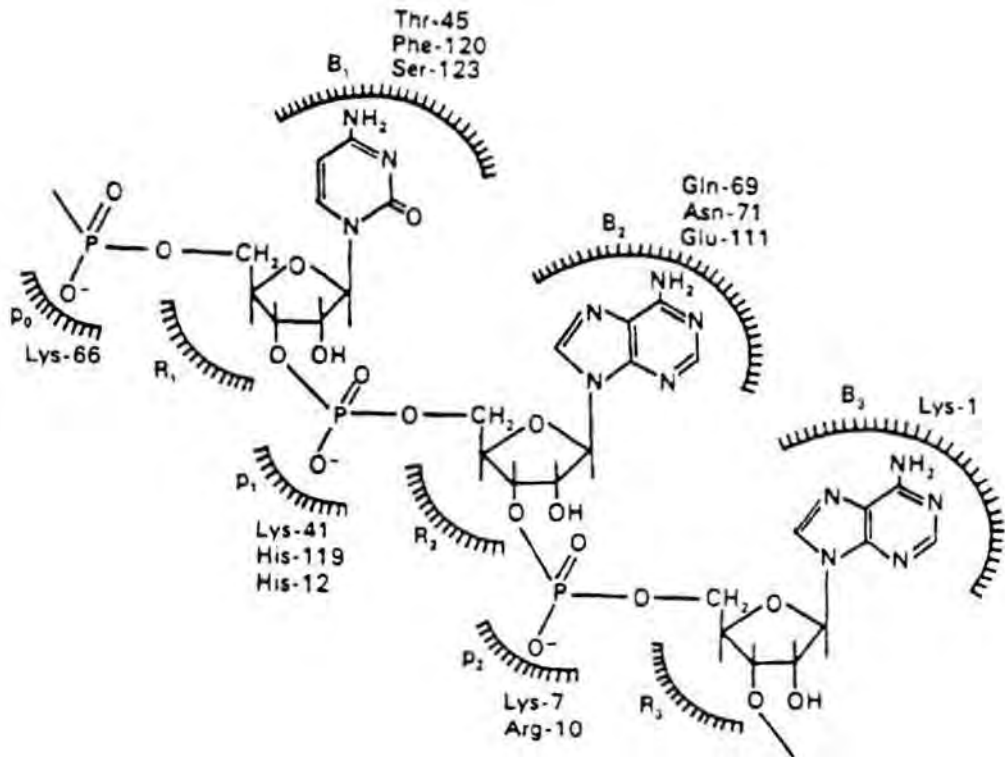


FIGURA I.4

Representació esquemàtica de la interacció d'un fragment d'RNA amb la RNasa A. B, R i p fan referència als subseccions per a la fixació de bases, riboses i fosfats, respectivament. Els mononucleòtids 3'-pirimidines interaccionen a  $B_1R_1p_1$  i els 3'-AMP a  $B_2R_2p_2$ . S'indiquen els residus que podrien participar en cada subsecció. Reproduït de Parés i col. (1991).

S'ha proposat que els subseccions d'unió de fosfat adjacents al seti catalític en la direcció 5' i 3',  $p_0$  i  $p_2$ , respectivament, participen en el procés catalític de la RNasa A. A partir d'estudis cinètics amb cCMP i poli(C) com a substrats i emprant RNases variants que presenten modificacions en els aminoàcids que participen a  $p_0$  i  $p_2$  (veure apartat I.3.3), el procés de despolimerització del poli(C), es proposa que les interaccions

electrostàtiques a  $p_2$  tenen un paper indirecte en el mecanisme catalític i en l'activitat endonucleasa de l'enzim. La interacció electrostàtica a  $p_0$  sembla contribuir només a la unió dels polímers, atès que s'observa un augment del valor de la  $K_m$  pel poli(C), en relació a la proteïna salvatge, sense efecte aparent ni en el mecanisme catalític ni en la formació del producte (veure apartat I.3.3). Aquests estudis es troben detallats en el treball de revisió de Nogués i col. (1998).



### 1.3. Estudis de clonatge, expressió i mutagènesi de la RNasa A

La dificultat d'obtenir quantitats considerables de determinats tipus de ribonucleases, així com l'interès a realitzar estudis d'estructura i funció de la RNasa A o altres RNases, ha portat a diferents autors a considerar el clonatge del gen i l'expressió heteròloga de la proteïna en qüestió.

La producció de la RNasa A de manera heteròloga ha estat problemàtica. La dificultat s'ha degut principalment a dos obstacles. Primer, el cDNA de la RNasa A és difícil de clonar perquè el corresponent RNA ha de ser aïllat intacte del pàncrees, el qual és un òrgan ric en ribonucleasa (Chirgwin i col., 1979). Segon, nivells elevats de RNasa A nativa són citotòxics. Aquests fets van limitar els estudis funcionals i estructurals d'un dels enzims dels quals es disposava de més informació. La comprovació d'alguna de les hipòtesis, com ara la participació de determinats residus aminoacídics en la catàlisi, la interacció enzim-substrat o el procés de plegament, no ha estat possible fins que no s'han pogut obtenir sistemes de clonatge i expressió de la RNasa A apropiats.

#### 1.3.1. El gen de la RNasa A

Carsana i col. (1988) van clonar i analitzar l'estructura del gen que codifica la RNasa A (FIGURA I.5). 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'elements reguladors. L'estructura del gen suggereix que la seqüència codificadora per a la RNasa A s'expressa sota el control de dos promotors diferents. El pèptid senyal de la RNasa A està constituït per 26 residus i és molt hidrofòbic (77 % de residus apolars), té una càrrega positiva a l'extrem N-terminal (Lys5) i una glicina a l'extrem C-terminal. L'estudi de l'expressió del gen en diferents teixits bovins indica que la majoria de teixits sintetitzen, a diferents nivells, l'mRNA corresponent a la RNasa A (Confalone i col., 1989). També s'observa en altres RNases pancreàtiques de mamífer, a diferència de la majoria d'enzims pancreàtics, l'expressió en el pàncrees i, a més a més, en altres teixits (Beintema i col., 1988a). En la FIGURA I.5 es numeren els aminoàcids en relació al primer residu de la proteïna nativa. Les capses CAAT i TATA es marquen amb creus. La seqüència del mRNA es troba subratllada. Les senyals d'*splicing* en 5' es marquen amb rodones plenes. Les senyals de polipirimidines i la senyal d'*splicing* en 3' es

Introducció

1 45 90  
TCCAGGCCAGAATACTGGATGGATAGCCTTTCCCTTCTCCAGGATCTTCCGATCCGAGTCTCCACATTGCAGGCAGATTCTTTACC  
135 180  
AGCTGAGCCGCAAGGAAGCCCAAGAATACTGGAGTGGTAGCCTATCACTTCTCCAGAGGATCTTCTGATCTAGGAATTGAACCCGGGT  
225 270  
CTCCTGCACCTGAGGGGATTTCTTTACCAACTGAGCTATCAGGGT CACAAAGAGTCAGATACAACCTGAAGCCACTTAGCACACATGCCTG  
315 360  
GGCTATTTAGTATGGAAACATGGATTTGGTTGGAGTTTGAGGATCAATACTATAGTGGCTTTCTCTGCTGCTTTATAGAGAGAAAAGTTCT  
405 450  
TATCAGCAAAGGCTCAGTATCCCCAGGAGTCCCCCAAAGGGTGTGCGTGTATGCTCAATTGTGTGGACTGTGCTGCCAGGCTTCT  
495 540  
CTGTCCATGGAAATTTCTAGCCAAAGATETGGAGTGGTGGTATTTCTCTCCAAAGGATCTTCCCACCCAGGGACAGAACCCGGAGTC  
585 630  
TGATGAATAGGCAGGCATACTACCAGGCCAGGTGTCTGGCAATTCCTCCCAAGCTTCTCTGGCTTGACCTTGTTTTCTCTGGACTGAGAC  
675 720  
CAAGATGCCCTCCACCTTCTTGGAGCCAAAGCCCTTTCCAGGTATAAGGTCCACACCTCTGGAAGAAATGATTGCAGAAACTG  
765 810  
CCTTCTCTCTCAGACATCAAACCTAGAGACCCAGGTAAGCAGCCCAAGAAGTGGTCTCAGGAGCTGCTTCTGCTTGAGGGTTTGAGAGG  
855 900  
GAGGATCCTAGGTGAGTGAGACTAGCCTGAGAATGGGCTGGCCAGACAGGGCCAGGGAGCAGAGCTGGGTCAGGAATGGACACACAG  
945 990  
GCTGCAGAGAGCCACAGGDTTGGAGAAGGAGAAGCCTCCAGGTTGGGGAGGCTTGAATCTCTCATAGGAATACAATGGTGTCTTTAT  
1035 1080  
GGTATGGGGTCAGACACAGGACAGGACTGAGTTTCCCTTGTGCTGGAGGACAACAGGGCTCTGTCAACTGTGATCCGGATGAATACTGG  
1125 1170  
TGGTATTTTGGGGTACAACTTAGCTTATTCAAAATCTGACTTTTTTATTTAGTGGTTATTCAAAGGATCCCTAATGAGCTGCATG  
1215 1260  
AGTCTGGGTACAAAAGTATTTTATTTCCAAATGATTTTCATATCAAAAAGACTTTCTGTATTCAAAGACAGGACTGCTAGGATTTTAGA  
1305 1350  
TCATTTTGGGGTCAACCCCAAAGGGAGGACGACCTCTGTACGGAGTGGGAGTCAAATGTTTGTGGGAAGGATATATGTGTCTCT  
1395 1440  
TACCTAGGAAAGCTTTAGGAACAGGACATCTTTCTGGTTGACCGGCAGGAGACTGTAAAGCAGGGAGGCTACAGGTGGGAGCTGGGG  
1485 1530  
TTCTTTTGAAGGGGATGCTTTTCTCTTCTCCCTTTTCTCATTGAGGTTTCTCCAGGGAGTGGGTCATCATGGCTCTGAAAGTCC  
1575 1620  
CTGCTCTGTTGTGCTGTTGCTCTGCTGCTGCTGGTGGCGCTCCACCTTCCCTGGCCAAAGGAACTGCAGCAGCCAAAGTTTGG  
LeuValLeuLeuSerLeuLeuValLeuValLeuLeuValArgValGlnProSerLeuGlyLysGluThrAlaAlaAlaLysPheGlu  
1665 1710  
CGCCAGGCATGGACTCCGACCTTCCCTGCCAGGAGTCCAACCTACTGTAACAGATGATGAAGCCCGGAACCTGACCAAGATCGA  
ArgGlnHisMetAspSerSerThrSerAlaAlaSerSerSerAsnTyrCysAsnGlnMetMetLysSerArgAsnLeuThrLysAspArg  
1755 1800  
TCCAAGCCAGTGAACACCTTTGTGCAGGAGTCCCTGGCTGATGTCCAGGCCGTGTGCTCCGAGAAAATGTTGCCCTGCAAGAATGGGCAG  
CysLysProValAsnThrPheValHisGluSerLeuAlaAspValGlnAlaValCysSerGlnLysAsnValAlaCysLysAsnGlyGln  
1845 1890  
ACCAATTGCTACCAGAGCTACTCCACCATGAGCATCAGCGACTGGCGTGAGACCGGCAGCTCCAAGTACCCCAACTGTGCTACAAGACC  
ThrAsnCysTyrGlnSerTyrSerThrMetSerIleThrAspCysArgGluThrGlySerSerLysTyrProAsnCysAlaTyrLysThr  
1935 1980  
ACCCAGGCCAATAAACACATCATTGTGGCTTGTGAGGGAAACCCGTACGTGCCAGTCCACTTTGATGCTTCACTGATAGTCTCTAGCTAA  
ThrGlnAlaAsnLysHisIleIleValAlaCysGluGlyAsnProTyrValProValHisPheAspAlaSerVal  
2025 2070  
GGCCAGACCAGCAAGATGCACCCTTCATCACAAAGCCACTCCCTCTCCCTCATGTTTCTCTGCTGGGGGCAATAGCTCAAGTTAG  
2115 2160  
TTAGGGCTCTTATCTCTGCCACCTTACCAGAAACACACAGACAGGATTCCTGGCATGAAAGCAATRACTCAAGCTAGTTAAGTCTTCT  
2205 2250  
ATCCAACCCACACTTGGTCCCTGCCCTGAGTCTTCCCTTGGTGGTTTGGGGGTGAGGACTGGGTTGTGAGGTGGGACTGTGTTAAC  
2295  
CAATCAGTCTTCTTTCAATAAACATACTTGAACCCACC

FIGURA 1.5

Seqüència nucleotídica del gen de la RNasa A reproduït de Carsana i col. (1988) (veure text per a més detalls)

marquen amb rodones buides. Les senyals de poliadenilació s'indiquen amb rombes negres. Les seqüències repetitives es troben emmarcades.

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

### **1.3.2. Expressió de la RNasa A en procariotes**

Els avenços i les millores en la tecnologia de l'ADN recombinant, l'expressió heteròloga de gens i la renaturalització de proteïnes han contribuït a superar els obstacles que dificultaven la producció heteròloga de la RNasa A i han portat al desenvolupament de varis sistemes d'expressió de la RNasa A.

El primer d'aquests sistemes va ser descrit pel grup de Benner i col·laboradors, els quals van sintetitzar el gen que codifica la proteïna S, corresponent a la fracció inactiva de la RNasa A (residus 21-124), i el van expressar en *Escherichia coli* (Nambiar i col., 1984). El gen es va dissenyar de manera que incorporava 25 setis específics de restricció, facilitant la seva possible utilització posterior en l'obtenció de variants de l'enzim per tècniques de mutagènesi modular. Posteriorment, Nambiar i col. (1987) van expressar en *E. coli* un gen sintètic que codifica la RNasa A com a proteïna de fusió associada a la  $\beta$ -galactosidasa. Purificar la RNasa A a partir d'aquest sistema d'expressió, el qual redueix la degradació intracel·lular per proteòlisi i evita la seva activitat citotòxica, va ser laboriós i poc eficient, atès que va presentar rendiments molt baixos (aprox. 200  $\mu\text{g/L}$  de cultiu) i la producció de la proteïna en forma intracel·lular insoluble.

Més endavant, Mc Geehan i Benner (1989) van millorar el rendiment de la producció de la RNasa A de Nambiar i col. (1987) eliminant la fusió amb la  $\beta$ -galactosidasa. Els autors van clonar el mateix gen sintètic que codifica la RNasa A (Nambiar i col., 1987) en *E. coli* darrera del promotor  $\lambda$  controlat per un repressor sensible a la temperatura. La inducció es va realitzar augmentant la temperatura del cultiu a 42°C durant 30 minuts.

La proteïna expressada es trobava en cossos d'inclusió, en forma insoluble, i, per tant, s'havia de desnaturalitzar i renaturalitzar. Malgrat això el rendiment d'aquest mètode va resultar superior a l'anterior (aprox. 2 mg/L de cultiu). La RNasa A produïda presentava un residu de formilmetionina en el seu extrem N-terminal. Tant aquest sistema com els anteriors requerien la desnaturalització de la RNasa A i la posterior renaturalització en presència d'agent oxidant.

Tautwein i Benner (1991a) van optimitzar el protocol anterior mitjançant dues estratègies: 1) la utilització de la soca *lon*<sup>-</sup> d'*E. coli*, la qual és deficitària en la proteasa La, i 2) l'eliminació de la diana de restricció Not I (GCG GCC) en la regió N-terminal (codons núm. 4 i 5) substituint-la pels codons GCA GCA. D'aquesta manera s'impedeix que es doni un aparellament estable entre aquesta seqüència i la seqüència Shine-Dalgarno i permet que aquesta última es trobi accessible. Gràcies a l'optimització d'aquest protocol, els autors van obtenir 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 permet expressar la proteïna en un medi <sup>15</sup>N M9, utilitzant com a única font de nitrogen el <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl. La proteïna incorpora aminoàcids marcats amb <sup>15</sup>N i pot ser estudiada per <sup>3</sup>D-RMN

El mateix equip d'investigadors va expressar el mateix gen sintètic que codifica la RNasa A en *E. coli*, utilitzant la seqüència senyal Omp A i una seqüència senyal sintètica corresponent al pèptid senyal per a la β-lactamasa. Es va obtenir només un rendiment màxim de 100 µg/L (Presnell, 1988).

Schein i col. (1992) van utilitzar la seqüència senyal de la RNasa pancreàtica de ratolí per expressar el mateix gen sintètic de la RNasa A en *E. coli lon*<sup>-</sup>*htpr*<sup>-</sup> sota el control del promotor de l'operador del triptòfan. Això va ser possible atès que hi ha un elevat grau d'homologia entre les seqüències senyal i codificadora de les RNases pancreàtiques bovina i de ratolí. Aquest sistema d'expressió va permetre obtenir la proteïna recombinant directament en forma soluble a l'espai periplasmic i no agregada en cossos d'inclusió. Boix i col. (1994) van optimitzar aquest sistema d'expressió de la RNasa A i van obtenir, mitjançant un procés de purificació que inclou una etapa de lisi cel·lular i tres cromatografies, la secreció de 3-6 mg de proteïna activa per litre de cultiu. Aquest sistema és el que va tenir el rendiment més elevat descrit fins al moment.

Vasantha i Filpula (1989) van expressar un gen sintètic de la RNasa A en *Bacillus*



*subtilis* emprant el promotor i la seqüència senyal del gen *apr[BamP]* d'una proteasa alcalina de *B. subtilis*. Van obtenir una proteïna de fusió per inserció d'un gen sintètic per a la RNasa A darrera el gen que codifica la proteasa alcalina. Aquest sistema va permetre la secreció de la RNasa A correctament processada al medi de cultiu. Ara bé, l'acumulació de la RNasa A en el medi de cultiu es va veure limitada, a causa dels nivells elevats de proteòlisi causats per les proteases que aquest bacteri secreta al medi extracel·lular. Això va fer que els nivells d'acumulació fossin de l'ordre de 1-5 mg/L de cultiu.

Schultz i Baldwin (1992) van expressar el mateix gen sintètic de la RNasa A (Vasanthi i Filpula, 1989) en *E. coli* utilitzant el sistema d'expressió de la T7 RNA polimerasa. La proteïna expressada s'acumulava en cossos d'inclusió i contenia un residu metionina addicional en l'extrem N-terminal i els ponts disulfur formats incorrectament. Mitjançant un procés posterior que consisteix en una primera etapa de preparació dels cossos d'inclusió, a partir del sediment obtingut en lisar les cèl·lules, i una segona etapa de reducció i oxidació dels ponts disulfur, aquest sistema va permetre l'obtenció de 0,5-2 mg de RNasa A per litre de cultiu, però no pura. Els autors posteriorment purifiquen la proteïna mitjançant un procés que inclou dues precipitacions amb sulfat amònic i una cromatografia.

Tarragona-Fiol i col. (1992) van clonar i produir en *E. coli* el precursor de la RNasa A, en el qual cDNA de la RNasa A es troba darrera del de la seva seqüència senyal, sota control del promotor *tac*. A més, van inserir, mitjançant la tècnica de la PCR, una seqüència que codifica per un hexapèptid davant de l'extrem 5' de la pre-RNasa A, per tal de minimitzar la formació d'estructures secundàries de l'mRNA. La pre-RNasa A era secretada cap a l'espai periplasmic i durant la translocació s'eliminava la seqüència senyal. Aquest sistema d'expressió, seguit d'un procés de purificació posterior de la RNasa A de la fracció periplàsmica, consistent bàsicament en una etapa de lisi cel·lular i dues cromatografies, va permetre la producció de RNasa A pura i totalment activa en un temps molt curt (48 h), però amb un rendiment considerablement baix (0,1 mg/L de cultiu).

Laity i col. (1993) van expressar el gen sintètic de la RNasa A (Vasanthi i Filpula, 1989) en *E. coli* com a proteïna de fusió amb el gen de la proteïna 10-II de T7, utilitzant el sistema d'expressió de la T7 RNA polimerasa. La proteïna s'expressava a nivell

Boix i col. (1994) van estudiar l'efecte de l'eliminació de les càrregues positives dels residus Lys7 i Arg10 postulats de formar part dels substei d'unió de fosfat p<sub>2</sub>, mitjançant la substitució per Gln, en les propietats d'interacció i catalisi de la RNasa A. A partir de l'estudi de les dues variants senzilles K7Q i R10Q i de la variant doble K7Q+R10Q, els autors van suggerir, que la Lys7 i l'Arg10, a més de participar en la fixació de fosfat de la molècula de substrat, RNA, participaven indirectament en el procés catalític. Aquest suggeriment es va fer a partir de l'observació de la disminució de l'eficiència catalítica en les variants senzilles i de manera més pronunciada, en la variant doble per a tots els substrats assajats, fins i tot pels de massa molecular baixa. Els valors de la  $K_m$  pels substrats de massa molecular petita no variaven, però pel poli(C) van resultar significativament superiors. Els valors de la  $k_{cat}$  van ser inferiors en tots els casos. L'activitat sintètica, és a dir, la inversió de la reacció de transfosforilació, era reduïda per les variants senzilles i anul·lada en la variant doble, en substitució d'una activitat exonucleasa (Moussaoui i col., 1996).

delCardayré i col. (1994) van utilitzar la mutagènesi dirigida per crear variants senzilles de la RNasa A que escindissin eficientment després d'un residu de purina i per això van substituir els residus Thr45 o Phe120 pels 20 aminoàcids naturals. Es va observar que la substitució de la Thr45 per Gly o Ala permetia a la RNasa A escindir el poli(A) i de manera processal i no distributiva. Les variants T45G i T45A mostraven un increment de  $10^5$  i  $10^3$  vegades, respectivament, de l'especificitat de poli(A) sobre poli(C) i cap canvi pel que fa a l'eficiència catalítica. Induir la RNasa A a degradar poli(A) de manera processal requereix només un canvi en l'especificitat del substei B<sub>1</sub>. Tanmateix, cap substitució de la Phe120 va donar lloc a un enzim que catalitzés el trencament de l'RNA després de residus de purina de manera eficient.

Thompson i Raines (1994) van produir variants senzilles de la RNasa A en les quals la His12 i la His119 va ser substituïda per Ala. Analitzant el comportament d'aquestes variants enfront de diferents substrats van corroborar el paper de la His119 com agent protonant del grup sortint durant el trencament de l'RNA.

delCardayré i Raines (1995) per demostrar que la interacció per pont d'hidrogen entre els residus Asp83 i Thr45 també afecta l'especificitat de la RNasa A, van caracteritzar cinèticament les variants T45G, D83A i T45G+D83A. Els resultats van indicar que tant la interacció de la Thr45 amb el substrat com la interacció entre Thr45 i Asp83

proporcionen un augment de la capacitat de la RNasa A per escindir substrats que continguin uridines a través de l'estabilització selectiva de l'estat de transició. Els autors van concloure que una interacció entre dos grups funcionals d'un enzim pot també contribuir a l'especificitat del substrat, d'igual manera que ho fa una interacció directa entre l'enzim i el substrat.

delCardayré i col. (1995) van substituir el residu Gln11 per una Ala, Asn i His per tal d'estudiar el paper d'aquest residu. Els paràmetres cinètics de les variants enzimàtiques, obtinguts per a diferent tipus de substrats, van indicar que la Gln11 no estabilitza l'estat de transició limitant de la velocitat durant la catàlisi de la RNasa A, sinó que el paper principal d'aquest residu és incrementar l'energia lliure del complex enzim-substrat i d'aquesta manera evitar les unions no productives del substrat.

Messmore i col. (1995), per provar el paper de la Lys41 en la catàlisi van combinar les tècniques de mutagènesi dirigida i de semisíntesi per introduir aminoàcids no naturals a la posició 41 de la RNasa A. De manera específica, van substituir la Lys41 per una Cys, la qual va ser posteriorment alquilada amb cinc haloalquilamines diferents. A partir de la caracterització cinètica dels enzims resultants es va trobar una bona correlació entre valors elevats d'eficiència catalítica pel trencament del poli(C) i valors baixos de  $pK_a$  de la cadena lateral del residu 41 i van observar que la presència de grups que poguessin donar lloc a la formació d'un segon pont d'hidrogen no augmentava l'activitat catalítica de l'enzim. Aquests resultats van confirmar el paper proposat per a la Lys41 d'establir un sol pont d'hidrogen amb l'estat de transició durant la catàlisi.

Eberhardt i col. (1996) van construir tres variants de la Tyr97, Y97F, Y97A i Y97G, per examinar el paper d'aquest residu en la catàlisi i l'estabilitat tèrmica de la RNasa A. Les tres variants van presentar una disminució de l'activitat catalítica, la qual cosa va demostrar que, malgrat que la Tyr97 es troba distant del centre actiu de l'enzim, la seva cadena lateral contribueix a la catàlisi, possiblement establint un pont d'hidrogen que estabilitzaria la conformació en *trans* de l'enllaç peptídic Lys41-Pro42 i d'aquesta manera la cadena lateral de la Lys41 romandria en una posició tal que maximitzaria la catàlisi. Els resultats de l'estabilitat tèrmica de les variants van indicar que la Tyr97 és un residu important per a l'estabilitat tèrmica de la RNasa A, atès que s'observa una desestabilització de 3,5, 12,0 i 11,7 kcal mol<sup>-1</sup> per a les tres variants, respectivament, en relació a l'enzim salvatge.



Més recentment, Fisher i col. (1998) refermen la importància dels subsetis  $p_0$  i  $p_2$  de la RNasa A mitjançant l'estudi de les variants K66A, K7A+R10A i K7A+R10A+K66A d'aquesta. Per a cada una d'aquestes variants es mesura la cinètica de trencament del substrat poli(C) i la seva capacitat per unir-se a un DNA de cadena senzilla que és un anàleg del substrat. Els resultats confirmen que la Lys66 (residu postulat com a pertanyent a  $p_0$ ) no participa en el procés de catàlisi, però sí en la interacció amb el substrat. En canvi, la Lys7 i l'Arg10 (residus postulats com a pertanyents a  $p_2$ ) participen en el procés de catàlisi, la qual cosa corrobora els resultats de Boix i col. (1994).

Schultz i col. (1998) confirmen mitjançant l'estudi de les variants D121N, D121A i H119A de la RNasa A la importància del pont d'hidrogen que s'estableix entre els residus His119 i Asp121 per al correcte posicionament de la His119 per dur a terme la catàlisi àcid-base. A més a més, el residu Asp121 contribueix a l'estabilitat enzimàtica. Aquest residu és un dels pocs exemples en els quals un aminoàcid és important tant per a la catàlisi com per a l'estabilitat enzimàtica (Quirk i col., 1998).

L'aplicació de la mutagènesi dirigida a l'estudi del plegament/desplegament de la RNasa A ha estat encaminada principalment a l'estudi de la formació de ponts disulfur, alterant residus de cisteïna, o bé a l'estudi de reaccions de plegament lent, alterant residus de prolina. Aquests treballs es descriuen en detall en els següents apartats.

#### I.4. Estudis sobre el plegament de la RNasa A

El camí de plegament d'una proteïna és el procés cinètic que descriu els esdeveniments que ocorren quan una cadena polipeptídica desplegada, la qual no té estructura regular, procedeix a plegar-se cap al seu estat natiu, el qual està caracteritzat per una estructura altament ordenada. Les interaccions que governen aquest procés són estrictament aquelles que són definides per la seqüència d'aminoàcids de la proteïna (Anfinsen, 1973). Una cadena polipeptídica no pot assolir el seu estat natiu a través d'una recerca a l'atzar de l'espai conformacional a causa del llarg temps que s'hauria d'invertir per a una recerca d'aquest tipus (Levinthal, 1968). Per tant, els esdeveniments inicials en el plegament d'una proteïna han de restringir l'espai conformacional i han d'especificar el camí que la cadena hauria de seguir per aconseguir el seu estat natiu.

El plegament proteic continua essent encara avui un problema principal no resolt. La solució no és fàcil ja que requereix la determinació, a nivell de residus d'aminoàcids, de les interaccions necessàries per explicar les estructures de l'estat desplegat inicial i l'estat natiu final, així com també les de tots els intermediaris i els estats de transició presents en la reacció de plegament. Els intermediaris en el camí de plegament són generalment espècies transitòries, per tant, una caracterització completa del camí de plegament requerirà una anàlisi estructural a l'equilibri juntament amb informació cinètica.

La RNasa A ha estat un clàssic en els estudis de plegament/desplegament de les proteïnes (Blackburn i Moore, 1982; Kim i Baldwin, 1982,1990; Matthews, 1993; Cuchillo i col., 1997; Neira i col., 1997). Tanmateix, aquest enzim presenta algunes característiques estructurals, com ara la presència de 4 ponts disulfur i l'existència de dos enllaços peptídics X-prolina en conformació *cis* en l'estat natiu, que han complicat l'anàlisi del seu camí de plegament pel fet que l'estat desplegat és molt heterogeni. A la vegada, aquestes característiques fan que la RNasa A sigui un model molt interessant per aquests tipus d'estudis.

En exemples recents, s'han aplicat tècniques diverses com ara l'espectrometria de masses electroesprai per determinar quins ponts disulfur (nadius i no natius) es formen durant el plegament de la RNasa A reduïda (Ruoppolo i col., 1996) o d'un derivat en el qual els 8 residus de cisteïna estan formant enllaços disulfur mixtos amb glutatió (Ruoppolo i col., 1997). L'espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier

(FTIR), amb la seva senyal específica per als fulls plegats  $\beta$ , ha estat utilitzada per provar nous aspectes del plegament de la RNasa A (Seshadri i col., 1994). En aquests i altres estudis sobre el plegament de la RNasa A, l'enzim desplegat és obtingut a temperatures altes o baixes, pH's alts o baixos, o mitjançant l'ús d'agents caotrópics. El desplegament de la RNasa A a pressions altes ha cridat l'atenció i ha semblat que promet desvetllar-ne encara més aspectes (Zhang i col., 1995).

La majoria dels estudis de plegament de la RNasa A s'han realitzat o bé amb l'enzim reduït o oxidat (amb els 4 ponts disulfur nadius íntactes). Els estudis del plegament de l'enzim reduït s'han centrat en la formació dels ponts disulfur, mentre que els estudis amb l'enzim oxidat, bona part d'ells, s'han centrat en la isomerització dels enllaços peptídics X-Pro.

Així mateix, el que es coneix sobre els camins i intermediaris de plegament de la RNasa A prové, en gran part, dels treballs existents des de fa molt temps dels grups d'en Baldwin i Scheraga. Baldwin i col·laboradors foren pioners en la captura d'intermediaris de plegament de la RNasa A i establiren les bases dels experiments de bescanvi H/D per *quench-flow*. Scheraga i col·laboradors han fet gran ús de la tècnica de l'*stopped-flow* (*single-jump* i *double-jump*), amb detecció d'espècies primàries de plegament mitjançant l'absorbància a l'UV, DC o fluorescència, i han utilitzat variants senzilles de la RNasa A per tal de caracteritzar les múltiples espècies presents en l'heterogeni estat desplegat causat per diferents conformacions X-Pro *cis/trans*. Com a conseqüència, s'han fet avenços importants en la detecció de noves fases cinètiques i en la descripció de propietats globals dels intermediaris que poblen de manera transitòria el camí de replegament. Tot i això, encara no s'ha pogut obtenir una caracterització estructural detallada d'aquests intermediaris ni de l'estat de transició.

A continuació, primer es descriurà breument l'estat natiu de la RNasa A i el que es coneix sobre el seu estat desplegat. Posteriorment, es comentaran amb més detall els estudis existents sobre el plegament/desplegament de la RNasa A reduïda i amb els enllaços disulfur íntactes, posant especial èmfasi en els intermediaris de desplegament detectats i caracteritzats en el seguiment cinètic del camí de plegament/desplegament.

### 1.4.1. L'estat natiu

L'estructura tridimensional de la RNasa A nativa ha estat determinada a partir de l'estat cristal·lí (Wlodawer i col., 1988) i en solució aquosa (Santoro i col., 1993; González i col., 1997) tal com s'ha descrit en l'apartat 1.2.1.1.

A partir d'estudis de bescanvi H/D a l'equilibri (Santoro i col. 1993; Wang i col. 1995; Neira i col. 1999), s'ha vist que l'estructura de full plegat  $\beta$  entera (amb excepció de les protuberàncies) junt amb l'hèlix  $\alpha$  III són els segments més estables de la RNasa A. La regió de full plegat  $\beta$  compresa per les cadenes  $\beta$ 2,  $\beta$ 3,  $\beta$ 6 i  $\beta$ 7 mostra la densitat més elevada del bescanvi de protons amida més lent. L'hèlix  $\alpha$  III roman sobre d'aquesta regió amb els residus Val57-Cys58 en contacte amb els residus Tyr73-Ser75 i Ile106-Val108, d'aquesta manera es forma un cor hidrofòbic d'excel·lent estabilitat. La regió formada per les cadenes  $\beta$ 1,  $\beta$ 4 i  $\beta$ 5 presenta el bescanvi de protons amida més lent en els segments phe46-His48, Met79-Thr82 i Ala102-Ile106 i en els llocs d'unió del segment S-peptid mediat pels ponts d'hidrogen His12(CO) i Asp14(NH) al -NH i -CO de Val-47, respectivament. Aquesta regió és la segona regió més estable de la RNasa A. L'hèlix  $\alpha$  II està connectada a aquesta regió del full plegat  $\beta$  a través de l'enllaç disulfur 26-86. Les 3 hèlixs  $\alpha$  es troben entre les unitats més resistents a desplegar-se. L'hèlix  $\alpha$  II i l'hèlix  $\alpha$  III mostren les seves velocitats de bescanvi més baixes al centre de l'hèlix. L'hèlix  $\alpha$  I no és tan estable com les altres dues hèlixs. L'estabilitat conformacional màxima de la RNasa A és aproximadament 9 kcal mol<sup>-1</sup> a pH entre 7 i 9 i a 25°C (Pace i col. 1990).

### 1.4.2. L'estat desplegat

Recentment, l'estat desplegat de les proteïnes ha despertat l'interès de varis investigadors, pel fet que la determinació de la seva estructura residual i estabilitat pot ajudar a comprendre millor els mecanismes de plegament de les proteïnes. Wright i col. (1988) i Moulton i Unger (1991) van assenyalar que aquest estat pot semblar-se a intermediaris de plegament o servir com a regió iniciadora del plegament.

En el cas de la RNasa A, tant experiments de desnaturalització en equilibri com experiments de cinètica de desnaturalització demostren que l'estat desnaturalitzat de la RNasa A, ja sigui amb els 4 ponts disulfur intactes o reduïts, presenta un important grau

d'estructuració. A continuació es descriuen alguns treballs representatius:

Buckler i col. (1995) van aplicar la fluorescència resolta en el temps per determinar l'extensió d'estructura residual en tres estats desnaturalitzats de la RNasa A: l'estat desplegat amb els enllaços disulfur intactes (U), l'estat reduït sota condicions natives ( $R_N$ ) i l'estat reduït a elevada concentració d'agent desnaturalitzant (R). Els autors van observar que fins i tot en l'estat totalment desnaturalitzat (R) existeix certa estructura plegada residual. Tots els paràmetres determinats assenyalaren un replegament substancial que acompanya les transicions des de R cap a  $R_N$  o U. Comparant aquests resultats amb els obtinguts a partir de pèptids aïllats, es va concloure que l'estructura formada està estabilitzada tant per interaccions locals com no locals.

L'estat desnaturalitzat per temperatura de la RNasa A ha estat examinat per dispersió de raigs X de petit angle (SAXS) i per espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier i s'ha vist que és com a terme mitjà una estructura compacta que presenta estructura secundària residual (Sosnick i Trewhella, 1992; Seshadri i col., 1994; Zhou i col., 1998). Sota condicions fortament reductores, la proteïna es desplega més, en una estructura més flexible, però encara reté una quantitat d'estructura secundària comparable. Les dimensions dels estats desnaturalitzats tèrmicament i químicament de la proteïna reduïda són diferents, tanmateix són més compactes que el predit per un *random coil* de la mateixa longitud.

En els primers treballs de bescanvi d'hidrogens de grups amida per deuteri en la RNasa A desnaturalitzada per calor no s'observava protecció significativa dels hidrogens amida analitzats (Robertson i Baldwin, 1991). Estudis posteriors, en canvi, sí que permeten intuir regions protegides del bescanvi i proposen l'existència d'estructura residual en l'estat desplegat de la RNasa A amb els enllaços disulfur intactes (Santoro i col., 1993; Wang i col., 1995; Neira i col., 1999).

A partir d'una recopilació d'anàlisis de fragments de la RNasa A realitzats per diferents autors, Neira i Rico (1997) assenyalen que les interaccions de curt abast són importants per a la formació de poblacions baixes, per bé que significatives, d'elements estructurals nadius i que és raonable esperar que l'estabilització intrínseca de les estructures presents en aquests segments operi també en l'estat desplegat de la cadena polipeptídica sota condicions natives.



La majoria dels estudis que tracten amb desnaturalització proteica han estat duts a terme a pressió atmosfèrica utilitzant perturbacions fisicoquímiques, com ara la temperatura, pH o agents desnaturalitzants. A més, s'ha vist que aplicant altes pressions es pot investigar en detall les proteïnes desnaturalitzades per pressió i les desnaturalitzades per fred en solució aquosa. Jonas i Jonas (1994) van indicar que els estats desnaturalitzats de les proteïnes per pressió tenen més estructura secundària que els estats desnaturalitzats per temperatura i urea. Zhang i col. (1995) van utilitzar la  $^1\text{H}$  RMN combinada amb la tècnica de bescanvi d'hidrogens amida per estudiar la desnaturalització reversible de la RNasa A per pressió, fred i calor. Els autors van descriure que l'estat desnaturalitzat per pressió de la RNasa A, contràriament al que havien descrit Robertson i Baldwin (1991) per a l'estat desnaturalitzat per temperatura, conté alguna estructura secundària, ja que s'observen estructures amb ponts d'hidrogen estables que protegeixen els hidrogens amida de l'esquelet peptídic de ser bescanviats amb el solvent, i mostra les característiques d'un *molten-globule*. També van proposar que l'estat desnaturalitzat per fred de la RNasa A pot contenir estructura parcialment plegada. Posteriorment, Nash i col. (1996) van analitzar més detalladament aquest estat desnaturalitzat de la RNasa A, del qual en van determinar els factors de protecció d'hidrogens amida de 41 residus. El patró de protecció de l'estat desnaturalitzat per fred ( $P=3,0$  kbar,  $T=-17^\circ\text{C}$ ) és similar al de l'estat desnaturalitzat purament per pressió ( $P=4,2$  kbar,  $T=+10^\circ\text{C}$ ), però difereix substancialment del desnaturalitzat per calor. L'estat desnaturalitzat per fred de la RNasa A és, per tant, diferent del desnaturalitzat per calor i es comporta de manera substancialment diferent d'un *random coil*, probablement a causa que la distribució dels residus fortament protegits és poc uniforme, especialment fora de la principal regió de full plegat  $\beta$ . Aquest fet va suggerir que l'estructura secundària residual en la RNasa A desnaturalitzada per fred és severament desorganitzada, a diferència de, per exemple, l'estructura secundària en formes *molten-globule* de la proteïna.

A més de l'observació que l'estat desnaturalitzat de la RNasa A per pressió mostra característiques d'un *molten-globule* (Zhang i col., 1995), també s'han detectat espècies *molten-globule* en el desplegament per clorur de guanidini de la RNasa A desplegada (Kiefhaber i col., 1995). Sembla ser un *molten-globule* sec (l'aigua no hauria penetrat encara en el cor hidrofòbic de la RNasa A), malgrat que la majoria de les cadenes laterals hagin esdevingut lliures de rotació) i no una espècie *molten-globule* "hidratada". S'ha proposat que aquesta espècie, el *molten-globule*, sigui un intermediari en el procés de desplegament de la RNasa A que precedeix l'etapa limitant de la velocitat.

### **1.4.3. Estudis del plegament/desplegament de la RNasa A amb els enllaços disulfur intactes: reaccions de plegament lent**

La RNasa A va ser la primera proteïna que es va trobar que presentava formes de plegament lent ( $U_S$ ) i formes de plegament ràpid ( $U_F$ ) de la proteïna desplegada, mostrant cinètiques de replegament multifàsiques, amb reaccions ràpides i lentes, aquestes últimes originades per la isomerització *cis/trans* de les prolines (Blackburn i Moore, 1982; Kim i Baldwin, 1990; Nall, 1994).

La RNasa A desplegada es replega en tres fases cinètiques diferents: dues fases principals de plegament lent (60-70% i 10-20% de l'amplitud total del replegament) (Schmid i Blaschek, 1981; Schmid, 1982,1983) i una reacció de plegament ràpid que representa el 18% de l'amplitud total del replegament. Sota algunes condicions s'ha detectat també una tercera fase lenta minoritària (7%) (Lin i Brandts, 1983b). Es creu que aquestes tres fases cinètiques principals s'originen a partir de com a mínim tres espècies desplegadas diferents, anomenades  $U_F$ ,  $U_{S,I}$ , i  $U_{S,II}$ , que representen aproximadament un 20%, 15% i 65% del total de les espècies desplegadas, respectivament (Schmid, 1983). També s'ha descrit una espècie minoritària addicional  $U_S$  (Lin i Brandts, 1987). S'ha proposat que cadascuna d'aquestes espècies es plega de manera independent fins assolir la conformació nativa, la qual es considera que és una sola espècie ben definida.

L'espècie  $U_F$  ha estat generalment considerada com un estat desplegat en el qual tots els residus de prolina es troben en la conformació nativa. Aquesta espècie es plega en una fase ràpida (Lin i Brandts, 1983b) a través d'una reacció que no comprèn la isomerització dels enllaços peptídics X-Pro, mentre que les espècies  $U_{S,I}$  i  $U_{S,II}$  són convertides a espècies intermediàries i finalment passen per una etapa d'isomerització.

És poc coneguda la naturalesa i el camí de replegament de l'espècie  $U_{S,I}$  a causa que la seva amplitud és molt baixa i la velocitat de replegament molt lenta. Mui i col. (1985) van postular l'existència d'un intermediari en el camí de plegament, anomenat I', basant-se en les anàlisis cinètiques de les dades presents a la literatura, malgrat que aquest intermediari no s'ha observat experimentalment.

El replegament de l'espècie  $U_{S,II}$  ha estat més ben caracteritzat. En el seu camí de



replegament s'hi troben dos intermediaris: un primer intermediari de formació ràpida amb ponts d'hidrogen ( $I_1$ ) (Udgaonkar i Baldwin, 1988,1990) i, posteriorment, un segon intermediari plegat de manera similar a la forma nativa ( $I_N$ ). Sembla que en aquest camí, el plegament precedeix la isomerització, és a dir, ambdós intermediaris tenen com a mínim una Pro en conformació no nativa, (Cook i col., 1979; Schmid i Blaschek, 1981; Schmid, 1983), encara que aquesta conclusió ha estat discutida per Lin i Brandts (1988). L'intermediari amb aparença nativa  $I_N$  ha estat ben estudiat (Cook i col., 1979, Schmid i Blaschek, 1981; Schmid, 1983; Schmid i col., 1986) i comparteix la major part de les propietats de la proteïna nativa. L'espècie  $I_1$  presenta propietats òptiques de la proteïna desplegada però, pel que fa als experiments de bescanvi d'hidrogens amida per deuteri, és altament estable i conté gran part de l'estructura de ponts d'hidrogen de la proteïna nativa, especialment en les regions del full plegat  $\beta$  i l'hèlix  $\alpha$  III (Udgaonkar i Baldwin, 1990).  $I_1$  semblaria una espècie *molten-globule* en el fet que té estructura secundària estable i li manca l'enterrament de cadenes laterals de residus de Tyr. En canvi,  $I_N$  és un intermediari amb aparença nativa que pot unir l'inhibidor específic 2'-CMP i té cadenes laterals de Tyr enterrades.

Posteriorment, Udgaonkar i Baldwin (1995) van portar a terme una nova caracterització de la naturalesa de l'intermediari  $I_1$ . Van concloure que  $I_1$  no és un intermediari amb característiques típiques d'un *molten-globule*, sinó que té una estructura terciària ben definida malgrat que les cadenes laterals de les seves Tyr no estan enterrades. Van arribar a aquesta conclusió a partir de la capacitat de  $I_1$  per unir 2'-CMP, que van deduir a partir d'experiments d'*stopped-flow* controlats pel canvi d'absorbància de 2'-CMP a 254 nm que acompanya la seva unió a la RNasa A. L'anàlisi de les propietats de bescanvi de protons amida protegits revela que tant el nombre com l'extensió de la protecció és similar en  $I_1$  i  $I_N$ . D'aquesta manera es confirma que  $I_1$  està altament estructurat i es deixa com a diferència principal entre els dos intermediaris el fet que les cadenes laterals de Tyr25, Tyr73, Tyr92 i Tyr97 es troben enterrades en  $I_N$  però no en  $I_1$ .

En la RNasa A nativa, la Pro93 i la Pro114 es troben en conformació *cis* (Richards i Wyckoff, 1971; Wlodawer i Sjölin, 1983) i, per tant, són els candidats idonis per produir les espècies de plegament lent. La conservació d'aquests dos residus de prolina en ribonucleases pancreàtiques de diferents vertebrats (Beintema i col., 1988), cosa que és particularment rara per residus presents en llaços superficials (Craik i col., 1982),

corroborar la importància d'un enllaç peptídic en *cis* en aquestes posicions (Grafl i col., 1986).

Cook i col. (1979) ja havien proposat que com a mínim la Pro93 es troba en conformació no nativa (*trans*) en l'espècie  $U_S,II$ . Aquest fet està actualment acceptat en base als estudis de replegament realitzats per Schmid i el seu grup en RNases homòlogues en les quals el residu Pro93 està conservat (Krebs i col., 1983; Schmid i col., 1986; Lang i col., 1986; Lang i Schmid, 1990).

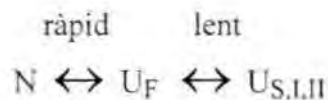
S'han portat a terme varis estudis per determinar si la isomerització de la Pro93 i/o Pro114 justifica la presència de les espècies  $U_S$  de la RNasa A desplegada, però s'han obtingut resultats contradictoris (Lin i Brandts, 1983a,1984; Adler i Scheraga, 1990; Biringer i Puntambekar, 1991). Una aproximació recent per solventar quin d'aquests residus de prolina és responsable de les espècies de plegament lent de la RNasa A utilitza RNases A recombinants que tenen un o dos residus de prolina substituïts, és a dir, variants senzilles o dobles (Schultz i Baldwin, 1992; Schultz i col., 1992). Els resultats amb la variant doble P39A+P114G són clars i indiquen que la substitució d'ambdós residus de prolina és suficient per eliminar l'espècie  $U_S$  principal ( $U_S,II$ ). Anàlisis cinètiques del plegament/desplegament de dues variants senzilles de la RNasa A (P114G i P114A), indiquen que les espècies de replegament lent ( $U_S$ ) es generen en l'estat desplegat d'aquestes variants. Aquestes espècies, però, donen lloc a un màxim de només 50-60% del total de les espècies desplegadas, en comparació amb el 80% de les espècies  $U_S$  trobades per a la RNasa A salvatge. Aquest resultat és consistent amb la idea que tant la Pro93 com la Pro114 generen espècies de replegament lent i que l'eliminació de la Pro114 fa disminuir la quantitat total d'espècies  $U_S$ , és a dir, només les espècies generades per la isomerització de *cis* a *trans* de la Pro93 es mantenen. La cinètica de plegament/desplegament de variants senzilles de la Pro93 de la RNasa A (P39A i P39S) és complexa, amb molts aspectes sense explicar. D'aquesta manera, la conclusió principal del treball de Schultz i col. (1992) va ser que els dos residus de prolina són responsables de les espècies  $U_S$  principals de la RNasa A, però es desconeix encara en quin grau són responsables de les espècies individuals,  $U_S,I$  i  $U_S,II$ .

El model del replegament de la RNasa A obtingut a partir dels estudis fins ara esmentats i generalment acceptat és el següent:

	<u>Amplitud</u>	<u>Velocitat</u>
$U_F \rightarrow N$	20%	ràpida
$U_{S,I} \rightarrow (I) \rightarrow N$	10-20%	molt lenta
$U_{S,II} \rightarrow I_I \rightarrow I_N \rightarrow N$	60-70%	lenta

L'intermediari I' no s'ha observat experimentalment. L'espècie  $U_F$  es creu que conté ambdós residus de prolina, 93 i 114, en conformació nativa (*cis*) i  $U_{S,I}$ ,  $U_{S,II}$ ,  $I_I$  i  $I_N$  es creu que tenen com a mínim un residu de prolina (Pro93) en la conformació no nativa (*trans*).

D'altra banda, el model del desplegament per a la RNasa A generalment acceptat és:

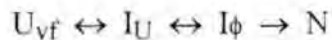


on la fase ràpida es considera que és una etapa de desplegament conformacional, mentre que la fase lenta s'ha proposat que és una etapa d'isomerització de prolina.

Estudis més recents han complicat aquests models. Houry i col. (1994) van proposar un nou model pel camí de plegament de la RNasa A, basat en la presència de dos processos d'isomerització independents: un per a la Pro93 i l'altre per a la Pro114. Aquest model ha estat proposat per explicar l'existència d'una nova espècie de plegament ( $U_{vf}$ ) que dona lloc a una nova fase de plegament molt ràpid que no havia estat detectada en treballs previs. Aquests estudis de replegament van ser duts a terme a valors de pH molt baixos i a varies concentracions de clorur de guanidini, condicions que alenteixen la fase de replegament de les espècies  $U_S$ . Mitjançant les anàlisis de les dades cinètiques basades en aquest nou model, els autors proposaren que en l'espècie  $U_{vf}$  ambdues prolines es troben en la seva conformació nativa; que la Pro114 es troba en la conformació no nativa en l'espècie  $U_F$ ; i que, com a mínim, la Pro93 es troba en la conformació no nativa en les espècies de plegament lent ( $U_S$ ). Aquestes espècies de plegament lent engloben, com a mínim, dues espècies:  $U_{S,\alpha}$ , amb la Pro93 en la conformació no nativa (*trans*), i  $U_{S,\beta}$ , amb la Pro93 i la Pro114 en la conformació no nativa (*trans*). No queda clar en aquest treball si aquestes dues espècies de plegament lent corresponen a les espècies  $U_{S,I}$  i  $U_{S,II}$  proposades en treballs anteriors. Malgrat que les isomeritzacions de la Pro93 i la Pro114 s'han proposat per explicar l'origen de les

espècies desplegadas, només s'ha suggerit la isomerització *cis/trans* de la Pro93 com a limitadora en la velocitat del camí de replegament de la RNasa A. L'estudi de les cinètiques de replegament de l'espècie  $U_{vf}$  (replegament de la RNasa A en absència d'efectes complicats d'isomerització *cis/trans* de prolines) indica que el camí procedeix a través de la formació d'un intermediari hidrofòbicament col·lapsat que presenta propietats similars a les del *molten-globule*,  $I_{\phi}$  (Houry i col., 1995). A més, els autors van suggerir que els estats de transició limitadors de la velocitat en el desplegament i replegament són substancialment diferents, presentant l'estat de transició del replegament propietats similars a les no natives.

Posteriorment, Houry i col. (1996), continuant amb l'estudi del camí de replegament de l'espècie  $U_{vf}$  per *stopped-flow* seguit per CD a 222 i 275 nm, van trobar que hi ha com a mínim dos intermediaris en el camí de replegament d'aquesta espècie. El primer intermediari, que anomenen  $I_U$ , es formaria directament a partir de  $U_{vf}$  i es trobaria en gran part desplegat. Llavors,  $I_U$  experimentaria un col·lapse hidrofòbic donant lloc a la formació del intermediari  $I_{\phi}$ , ja anteriorment descrit pels mateixos autors.



Els valors de CD obtinguts indiquen que  $I_U$  no presenta estructura secundària significativa i probablement es diferencia de  $U_{vf}$  per un reordenament estructural local, mentre que  $I_{\phi}$  mostra una població considerable d'estructures secundàries i terciàries de l'ordre del 52% i 39% de la RNasa A nativa, respectivament.

Les estructures de  $I_U$  i  $I_{\phi}$  han estat analitzades a partir d'experiments de *double-jump* combinats amb experiments de bescanvi H/D per Houry i Scheraga (1996b). No es va observar protecció en els 21 protons amida de l'esquelet polipeptídic analitzats de l'intermediari  $I_U$ . Els factors de protecció trobats per a aquest intermediari eren similars als de l'espècie  $U_{vf}$ , la qual cosa van indicar que  $I_U$  no té estructura secundària estable. Contràriament, en  $I_{\phi}$ , una gran part de la regió en full plegat  $\beta$ , així com també l'hèlix  $\alpha$  II, semblen estar ja formades mentre que la resta de la molècula roman desestructurada. En general, els factors de protecció de  $I_{\phi}$  són baixos, fet que indica que aquest intermediari té una estructura dinàmica, la qual és compatible amb què sigui un intermediari similar a un *molten-globule*. Els autors, a més, van comparar l'estructura de  $I_{\phi}$  amb la de l'intermediari  $I_1$  descrita per Udgaonkar i Baldwin (1995) en el camí de



plegament de la principal espècie desplegada  $U_{S,II}$ . En general, l'estructura regular formada en  $I_\phi$  és molt menor que en l'intermediari  $I_I$ . A més, l'estructura de  $I_\phi$  té molta menys estabilitat que la de  $I_I$ , els factors de protecció de  $I_I$  són de com a mínim un ordre de magnitud més grans que els de  $I_\phi$ . Per tant, una velocitat de replegament més lenta dona lloc a la formació d'intermediaris més estables durant el procés de plegament. Segons els autors,  $I_\phi$  és un *molten-globule* més típic que  $I_I$ , atès que  $I_I$  té una estructura més regular i probablement té alguns contactes terciaris fixats, mentre que  $I_\phi$  presenta una estructura més flexible i dinàmica. Segons els autors, les diferències en la formació d'intermediaris primerencs en el camí de replegament de les espècies  $U_{S,II}$  i  $U_{vf}$  indiquen que l'estat desplegat dicta el camí de plegament que la proteïna ha de seguir per arribar a l'estat natiu. El plegament de  $U_{S,II}$  és més lent que el de  $U_{vf}$  a causa de la presència en la primera d'aquestes espècies d'enllaços X-Pro no natiu. Per tant, la formació de  $I_I$  té lloc a una velocitat inferior a la de la formació de  $I_\phi$ , la qual cosa fa que  $I_I$  tingui més temps per formar estructures secundàries estables i establir contactes terciaris. Això no és el que passa en el cas de  $I_\phi$ . Una velocitat de replegament més lenta permet una cooperativitat més elevada entre els diferents elements estructurals, permetent la formació d'intermediaris més estables (*native-like*) durant el procés de plegament.

Sendak i col. (1996) van crear una variant de la RNasa A, per substitució de la Tyr92 per Trp, amb una sonda òptica sensible per tal d'obtenir informació sobre el plegament de la proteïna mitjançant les tècniques d'*stopped-flow* (*single* i *double-jump*) seguides per fluorescència. L'intermediari hidrofòbicament col·lapsat  $I_\phi$  va ser observat durant el temps mort de la barreja de l'experiment, la qual cosa implica que la regió del voltant del residu Trp92 està involucrada en la formació de  $I_\phi$ .

Houry i Scheraga (1996a) van observar, a més de les fases de plegament molt ràpid, ràpid i lent, una nova fase de plegament mitjà. Aquesta nova fase s'origina a partir del replegament d'una espècie de desplegament diferent que anomenaren  $U_m$  (espècie de replegament mitjà). Per consegüent, hi ha com a mínim 5 espècies, observables experimentalment, en l'estat desplegat de la RNasa A:  $U_{vf}$ ,  $U_F$ ,  $U_m$ ,  $U_{S,I}$  i  $U_{S,II}$ . Totes cinc espècies desplegades corresponen a 8 espècies teòricament possibles que presenten diferents conformacions a cadascun dels enllaços peptídics X-Pro de Pro93, Pro114 i Pro117.  $U_{vf}$  presenta els 3 enllaços peptídics X-Pro en conformació nativa, mentre que  $U_m$  els presenta en conformació no nativa. Els resultats també van indicar que

cadascuna de les espècies desplegadas es replega cap a l'estat natiu a través de camins de plegament diferents a velocitats de replegament també diferents. El paper de la isomerització dels enllaços peptídics anteriors a una prolina en el replegament de la RNasa A ha estat provat per mutagènesi dirigida. La velocitat de replegament de la variant P42A de la RNasa A va resultar semblant a la de l'enzim natiu, indicant que la isomerització *cis/trans* de l'enllaç peptídic previ a la Pro42 no dificulta el replegament (Dodge i col., 1994). Tanmateix, un pont d'hidrogen entre la cadena lateral de la Tyr97, la qual és la cadena lateral menys mòbil dels sis residus de tirosina i els tres de fenilalanina, i l'enllaç peptídic de la Pro42 augmenta substancialment l'estabilitat (Eberhardt i col., 1996; Juminaga i col., 1997).

Dodge i Scheraga (1996) van portar a terme un estudi detallat de cinètiques de plegament/desplegament per *Stopped-flow* (*single-jump* i *double-jump*) de 4 variants de la RNasa A (P42A, P93A, P114A i P117A), en cadascuna de les quals un dels 4 residus de prolina de la RNasa A s'havia substituït per una alanina. A partir dels resultats obtinguts, i assumint que la isomerització *cis/trans* d'enllaços peptídics X-Pro és l'única causa de les diferents conformacions de les espècies desplegadas i que cada fase cinètica reflexa una espècie específica, així com també que els camins de replegament de les variants estudiades són similars als de la proteïna salvatge, aquests autors van proposar un model que descriu l'estat isomèric dels 4 enllaços peptídics X-Pro de les espècies desplegadas ( $U_{vf}$ ,  $U_F$ ,  $U_m$  i  $U_S$ ) de la RNasa A, per desnaturalització química i amb els enllaços disulfur intactes, i els canvis conformacionals que ocorren durant el replegament d'aquesta (FIGURA I.6). A més, els resultats dels experiments per a les variants estudiades van indicar que l'espècie  $U_F$  presenta dos isòmers: un amb la Pro117 en conformació no nativa *cis* i l'altre amb la Pro114 en conformació no nativa *trans*. L'espècie  $U_m$  presenta també dos isòmers: un amb Pro93 en conformació no nativa *trans* i l'altre amb Pro114 i Pro 117 en conformacions no natives, *trans* i *cis*, respectivament. L'espècie  $U_{S,II}$  presenta dos isòmers: un amb Pro93 i Pro117 en conformacions no natives, *trans* i *cis*, respectivament, i un altre amb Pro 93 i Pro114 en conformacions no natives *trans*. Finalment, l'espècie  $U_{S,I}$  mostra Pro 93, Pro114 i Pro117 en conformacions no natives. Amb els resultats de la variant P117A, els autors van concloure que a més dels enllaços peptídics en conformació *cis* que precedeixen la Pro93 i la Pro114, l'enllaç peptídic en conformació *trans* que precedeix la Pro114 és també responsable de les espècies de plegament lent ( $U_S$ ) de la RNasa A.

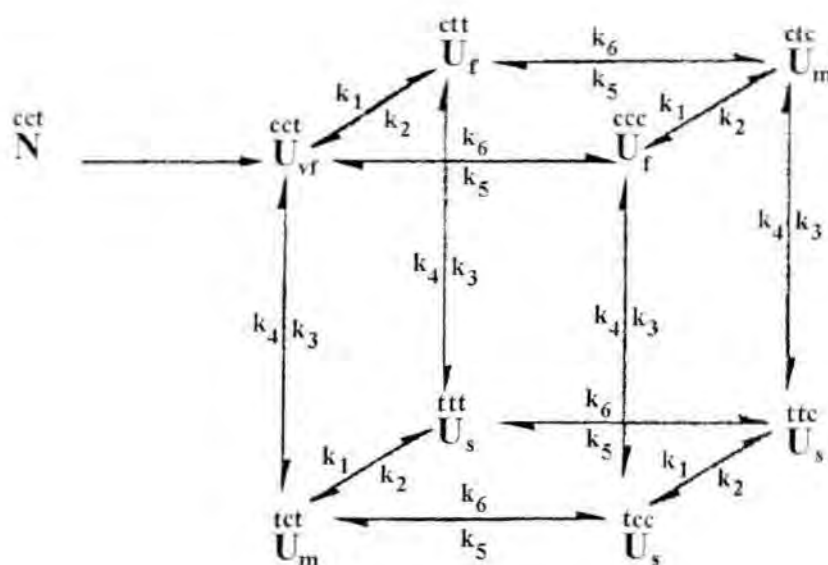


FIGURA I.6

Model pel desplegament de la RNasa A proposat per Dodge i Scheraga (1996). Primer, a partir de l'estat natiu (N) es forma l'espècie  $U_{vf}$ , amb tots els enllaços X-Pro en conformació nativa, en una etapa purament conformacional. Llavors, processos successius i independents d'isomerització *cis/trans* i *trans/cis* dels enllaços peptídics X-Pro93, X-Pro114 i X-Pro117 donen lloc a les restants espècies presents en l'heterogeni estat desplegat.  $U_{vf}$ ,  $U_f$ ,  $U_m$  i  $U_s$  corresponen a les espècies cinètiques que mostren replegament molt ràpid, ràpid, mitjà i lent. Les lletres indicades a la part superior de les diferents espècies es refereixen a la conformació *cis* o *trans* dels enllaços X-Pro93, X-Pro114 i X-Pro117, en aquest ordre. Les constants de velocitat  $k^1$ ,  $k^3$  i  $k^5$  fan referència a les isomeritzacions *cis/trans* dels enllaços X-Pro114, X-Pro93 i X-Pro117, respectivament, mentre que les constants de velocitat  $k^2$ ,  $k^4$  i  $k^6$  fan referència a les isomeritzacions *trans/cis* dels enllaços X-Pro114, X-Pro93 i X-Pro117, respectivament.

Juminaga i col. (1997) han investigat tres variants de la RNasa A (Y25F, Y92F i Y97F) pel que fa a activitats enzimàtiques, estabilitats moleculars i cinètiques de desplegament/replegament. Aquest estudi va suggerir que tant la Tyr 92 com la Tyr115 contribueixen a la fase de desplegament lent seguit per fluorescència, fet que contradiu la conclusió dels estudis previs de Schmid i col. (1986). Els resultats van indicar que les propietats fluorescents de la Tyr115 poden seguir la isomerització *cis/trans* de l'enllaç peptídic X-Pro. A partir de l'ajust exhaustiu de tots els models possibles de



desplegament de la RNasa A, els autors van descriure un model perfeccionat de la isomerització de prolines pel desplegament per a la RNasa A. Les dades cinètiques recolzen la identificació de la Pro93 com la prolina que la seva isomerització distingeix les espècies de replegament lent ( $U_{S,II}$  i  $U_{S,I}$ ) de les altres, les espècies de replegament ràpid ( $U_{Vf}$ ,  $U_F$  i  $U_m$ ), i implica que la Pro93 isomeritza en les reaccions de replegament lent:  $U_{S,I} \rightarrow N$  i  $I_N \rightarrow N$ . De manera similar, la Pro 114 sembla que distingeix entre  $U_{Vf}$  i  $U_F$ , i la Pro117 sembla distingir  $U_{S,II}$  de  $U_{S,I}$  i  $U_m$  de  $U_F$  i  $U_{Vf}$ . Un estudi posterior en el qual s'empra la variant Y115F de la RNasa A confirma que el model de desplegament pel desplegament de la RNasa A proposat en la FIGURA I.6 (Juminaga i col., 1998).

Torrent (1996) va obtenir la variant Y115W de la RNasa A, la qual proporciona la presència d'un únic residu de triptòfan en la cadena polipeptídica de la RNasa A, atès que aquesta proteïna no presenta cap residu de triptòfan en la seva seqüència d'aminoàcids. Es va observar que la introducció del residu Trp115 incrementa la fluorescència de la proteïna, tal com s'observa també per a la variant Y92W (Sendak i col., 1998), i que l'estabilitat de la variant mesurada a partir del desplegament induït per urea o altes pressions és pràcticament idèntica a la de la proteïna salvatge. Per tant, la variant Y115W podria servir com a sonda pel seguiment del desplegament local de la regió C-terminal de la proteïna. Recentment, Torrent i col. (1999) han corroborat aquests resultats i han afegit que l'estabilitat de la variant és també similar a la de la RNasa A si s'utilitza la temperatura com a agent desnaturalitzant.

#### **1.4.4. Estudis del plegament/desplegament de la RNasa A reduïda-nativa: formació dels enllaços disulfur**

El plegament oxidatiu de la RNasa A és un procés molt complex amb un gran nombre d'intermediaris. L'estudi del plegament de la RNasa A a través de la formació d'enllaços disulfur implica la caracterització termodinàmica, cinètica i estructural de tots els possibles intermediaris disulfur. Assumint que els processos de plegament *conformacional estan acoblats a la formació d'enllaços disulfur*, l'anàlisi dels intermediaris disulfur haurien d'ajudar a comprendre millor el camí de plegament.

La regeneració de la RNasa A mitjançant parells redox tiol de massa molecular petita ha estat estudiada en nombrosos laboratoris (Creighton, 1977,1979; Konishi i col., 1981,1982a-c; Wearne i Creighton, 1988). Ara bé, els resultats obtinguts són encara

matèria de controvèrsia i han conduït a proposar dos mecanismes diferents per a la regeneració de la RNasa A nativa a partir d'una espècie totalment desplegada i reduïda:

1. En el primer mecanisme se segueixen múltiples camins, presentant cadascun d'ells diferents etapes determinants de la velocitat. La quantitat relativa de proteïna nativa generada a través de cada camí depèn de les condicions de la solució (Konishi i col., 1982a-c; Scheraga i col., 1987).

2. En el segon mecanisme hi ha un únic camí de plegament amb l'etapa determinant de la velocitat que correspon a la formació de l'enllaç disulfur final (Creighton, 1977,1979; Wearne i Creighton, 1988).

Un dels punts que ha generat controvèrsia ha estat la interpretació de les dades experimentals obtingudes utilitzant dos parells redox diferents, el glutatió oxidat-glutatió reduït (GSSG/GSH) i el ditiotreitòl oxidat-ditiotreitòl reduït ( $\text{DTT}_{\text{ox}}/\text{DTT}_{\text{red}}$ ). Aquests dos compostos reaccionen de manera diferent amb grups tiol (Gilbert, 1994).

Rothwarf i Scheraga (1993a-d) han estudiat en una sèrie de treballs el camí de regeneració de la RNasa A utilitzant ambdós compostos i temperatures diferents. Aquests autors conclouen que els camins de regeneració depenen de la naturalesa de l'agent redox, així com també del potencial redox al qual aquests són utilitzats. L'ús de GSSG/GSH afavoreix els camins de regeneració múltiple, mentre que l'ús de  $\text{DTT}_{\text{ox}}/\text{DTT}_{\text{red}}$  afavoreix la regeneració a través de pocs camins. A més, els autors conclouen que en funció del tipus d'agent redox emprat els processos de regeneració procedeixen per camins diferents.

Els primers intents d'obtenir RNasa A completament regenerada utilitzant el parell  $\text{DTT}_{\text{ox}}/\text{DTT}_{\text{red}}$  van ser un fracàs (Wearne i Creighton, 1988; Creighton, 1988). La primera regeneració exitosa de la RNasa A totalment reduïda mitjançant el parell DTT, sota condicions anaeròbiques, va ser el descrit per Rothwarf i Scheraga (1991).

Quan es va seguir el camí de regeneració de la RNasa A utilitzant el parell  $\text{DTT}_{\text{ox}}/\text{DTT}_{\text{red}}$ , es va identificar un camí de regeneració principal (Rothwarf i Scheraga, 1993a,b). Aquest camí, procedeix a través d'una etapa determinant de la velocitat que implica una reorganització intramolecular d'una o més espècies amb tres enllaços

disulfur, i és un camí essencialment idèntic al model proposat per Creighton (1988). D'aquesta manera, les observacions experimentals i les conclusions de Creighton poden ser, en part, compatibles amb el model de múltiples camins de Scheraga. La diferència principal rau en la proposta de Creighton, segons la qual els camins de formació i reducció de la proteïna nativa són els mateixos.

Malgrat que la regeneració de la RNasa A nativa utilitzant com a parell redox el glutatió ha estat portada a terme de manera exitosa en molts laboratoris, l'aïllament d'intermediaris amb enllaços disulfur s'ha vist dificultat per la complexitat de la barreja en equilibri dels isòmers redox. L'única excepció va ser una espècie amb tres enllaços disulfur, aïllada de manera homogènia, a la qual li mancava l'enllaç disulfur 40-95. Es va veure que aquest intermediari mostrava una estructura compacte similar a la nativa i era enzimàticament actiu, però amb una conformació menys estable que es desestabilitzava amb només la meitat de la concentració d'urea requerida per desnaturalitzar la RNasa A nativa (Creighton, 1980; Galat i col., 1981).

En el camí de reducció de la RNasa A, especialment quan s'utilitza DTT com a agent reductor, ha estat difícil no només aïllar sinó també detectar espècies intermediàries amb enllaços disulfur trencats o disposats en un nou ordre (Creighton, 1977,1979,1988). Això no obstant, Rothwarf i Scheraga (1991), emprant DTT com a agent reductor i 2-aminoetilmetanotiosulfonat com a agent bloquejant, van aïllar una espècie, semblant a la conformació nativa, amb tres enllaços disulfur, en la qual mancava l'enllaç disulfur 65-72. Aquest intermediari, anomenat des-[65-72]-RNasa A, va mostrar una estabilitat tèrmica substancialment inferior a la de la RNasa A nativa i un 81% de l'activitat enzimàtica de la RNasa A nativa enfront del substrat cCMP, mentre que les conformacions trobades per a aquesta espècie mostraven una estructura molt ben definida i similar a la de l'enzim natiu, diferenciant-se només en la regió compresa pels residus 60-72 (Talluri i col., 1994). La gran similitud estructural entre des-[65-72]-RNasa A i l'enzim natiu va suggerir que no eren necessaris canvis conformacionals grans per a la seva interconversió. Per tant, els autors conclouen que en els camins de reducció que inclouen l'intermediari des-[65-72]-RNasa A, l'etapa limitant de la velocitat correspon a un desplegament parcial d'una regió de la proteïna i no a un procés de desplegament conformacional global, com s'havia suggerit en treballs anteriors (Creighton, 1988). Els resultats, a més a més, suggereixen que en els camins de regeneració que involucren la des-[65-72]-RNasa A, la regió compresa entre els residus 60 i 72 és la darrera a plegar-se.

Li i col. (1995), examinant el camí de reducció de la RNasa A a diferents condicions de pH, temperatura, i concentració de DTT, van descriure l'aïllament i caracterització de dos intermediaris, semblants a la conformació nativa, amb tres enllaços disulfur, anomenats I<sub>1</sub> i I<sub>2</sub>. I<sub>1</sub> va ser identificat com des-[65-72]-RNasa A, descrit prèviament per Talluri i col. (1994), mentre que I<sub>2</sub>, al qual li manca l'enllaç disulfur 40-95 (des-[40-95]-RNasa A), podria correspondre a l'intermediari descrit per Creighton (1980) en el camí de replegament de la RNasa A utilitzant glutatió oxidat. Aquest darrer intermediari només presenta un 5% de l'activitat de la RNasa A nativa enfront del substrat cCMP, suggerint que el residu Lys41 està més alterat en la des-[40-95]-RNasa A que en la des-[65-72]-RNasa A. A ambdós intermediaris, els manquen els mateixos enllaços disulfur que manquen a les dues variants termoestables de la RNasa A (C[65-72]S i C[40-95]S) (Laity i col., 1993).

Les cinètiques de reducció de la RNasa A nativa i els intermediaris purificats suggereixen que el desplegament per reducció de la RNasa A amb DTT ocorre a través de camins paral·lels, en els quals, cadascun dels intermediaris anteriorment esmentats hi estaria implicat, i que les etapes limitants de la velocitat estarien determinades per dos desplegaments locals diferents i no per un de global (Li i col., 1995). Aquests resultats són contraris a l'opinió generalment acceptada que el desplegament proteic segueix un mecanisme de tot o res i que l'etapa limitant de la velocitat està controlada per una reorganització de l'estructura nativa (Creighton, 1994).

El camí de regeneració oxidativa de la RNasa A en presència de DTT<sub>ox</sub>/DTT<sub>red</sub> procedeix a través de dos espècies independents, principal i secundària, amb tres enllaços disulfur i determinants de la velocitat, des-[40-95] i des-[65-72], respectivament (Rothwarf i Scheraga 1991,1993a-d; Rothwarf i col., 1995). De manera similar, el camí de reducció de la RNasa A en presència de DTT<sub>red</sub> procedeix també a través dels mateixos dos intermediaris determinants de la velocitat (Li i col., 1995). Els camins poblats amb major i menor proporció en la reducció de la RNasa A són, tanmateix, l'invers dels camins de regeneració, amb les espècies, amb tres enllaços disulfur determinants de la velocitat, principal i secundària, des-[65-72] i des-[40-95], respectivament (Li i col., 1995).

Ruoppolo i col. (1996) van estudiar el camí de replegament de la RNasa A reduïda i desnaturalitzada mitjançant l'escisió enzimàtica, separació i identificació de fragments



per espectrometria de masses, que permet la identificació de la formació i el reordenament dels enllaços disulfur durant el procés. Els resultats van indicar que tant es formen enllaços disulfur nadius com no nadius durant el replegament de la RNasa A reduïda i desnaturalitzada sota diferents condicions experimentals. Es van observar només 14 d'un total de 28 espècies amb un sol enllaç disulfur possibles quan la reoxidació tenia lloc en presència d'urea 8 M. De manera interessant, es van detectar tots els enllaços disulfur nadius excepte el 26-84. Malgrat que 14 espècies és una fracció significativa del total teòric, l'aparició de només un subconjunt d'enllaços disulfur indica clarament que la formació dels enllaços disulfur no ocorre a l'atzar ni quan la reoxidació té lloc sota condicions desnaturalitzants. Quan la reoxidació va ser duta a terme sota condicions no desnaturalitzants, es va observar la formació de varis enllaços disulfur no nadius ben definits, així com també de nadius, a les etapes inicials del procés de plegament. A les etapes finals de replegament, els enllaços disulfur no nadius eren sumament disminuïts o absents.

Xu i col. (1996) van determinar les identitats i poblacions relatives d'intermediaris amb un sol enllaç disulfur formats durant el camí de regeneració oxidativa de la RNasa A mitjançant l'ús de mapatges peptídics, detecció d'enllaços disulfurs específics i espectrometria de masses. Es van detectar un total de 24 sobre 28 intermediaris teòricament possibles amb un únic enllaç disulfur i es va veure que la població d'aquests intermediaris no segueix una distribució a l'atzar sinó que predominen les espècies que presenten un dels 4 enllaços disulfurs nadius. L'intermediari amb l'enllaç disulfur 65-72 és l'espècie més poblada, la qual ocupa un 40% del conjunt d'espècies amb un enllaç disulfur. És probable que aquest enllaç disulfur estigui altament poblat en les darreres etapes del plegament, i això afavoreixi els camins de regeneració en els quals aquest enllaç es forma primer. L'estabilitat de l'espècie amb l'enllaç disulfur 65-72 s'atribueix a la formació d'una estructura en gir  $\beta$  la qual pot també servir com a regió iniciadora del plegament proteic. A més, els resultats van suggerir que les interaccions que estableixen l'enllaç disulfur entre els residus de cisteïna 65 i 72 tenen un paper important en la determinació dels camins de regeneració de la RNasa A.

Posteriorment, estudis de RMN i d'estabilitat tèrmica de les variants de la RNasa A [C65S, C72S] (Shimotakahara i col., 1997) i [C40A, C95A] (Laity i col., 1997), que són anàlegs estructurals dels intermediaris des-[65-72] i des-[40-95] de la regeneració oxidativa de la RNasa A, respectivament, han suggerit que aquests dos intermediaris

tenen estructures tridimensionals plegades similars a la de l'estat natiu de la RNasa A, però globalment són menys estables, amb una fluctuació substancial en el *loop* del disulfur mutat i en el seu ambient circumdant. Per tant, en l'etapa determinant de la velocitat dels camins principals de regeneració, hi estan involucrats tant els reordenaments disulfur com el plegament conformacional. Específicament, la caracterització estructural de la variant [C40A, C95A] va indicar que el trencament de l'enllaç disulfur Cys40-Cys95 en el intermediari des-[40-95] no facilita el trencament de l'enllaç disulfur Cys65-Cys72 a través de perturbacions estructurals. De fet, la regió que envolta Cys65-Cys72 en la variant [C40A, C95A] és la regió de la proteïna més similar a la nativa. Aquest fet està en concordança amb els estudis de regeneració i reducció, els quals indiquen que els dos camins tant per a la regeneració com per a la reducció impliquen estats de transició diferents quan a conformació (Li i col., 1995). Posteriorment, Pearson i col. (1998) han resolt l'estructura cristal·logràfica de la variant [C40A, C95A] i han observat que l'enllaç disulfur 65-72 no es veu afectat per la mutació.

Darrerament, Rothwarf i col. (1998a,b) han confirmat que la regeneració de la RNasa A desde la forma reduïda a la nativa procedeix a través de dos camins paral·lels en els quals es formen els dos intermediaris des-[65-72] i des-[40-95]. Aquestes espècies es formen durant l'etapa que determina la velocitat d'ambdós camins, una etapa en la qual té lloc la major part del plegament conformacional, i són les mateixes que s'havien trobat durant la reducció de la RNasa A. A més, a partir d'anàlisis cinètiques es va veure que des-[65-72] i des-[40-95] són els únics intermediaris de l'estat post-transició que apareixen després de l'etapa determinant de la velocitat i es pleguen ràpidament cap a l'estat natiu.

Lester i col. (1997) van estudiar dues variants de la RNasa A en les quals s'havien substituït 4 dels 8 residues de Cys per Ser i Ala per formar [C40S, C65S, C72S, C95S] i [C40A, C65A, C72A, C95A], respectivament. L'oxidació amb DTT<sub>ox</sub> d'aquestes variants prèviament reduïdes i amb els grups tiols bloquejats va donar lloc a la formació de les 3 possibles espècies amb dos enllaços disulfur: l'espècie amb els 2 enllaços disulfur nadius (26-84, 58-110) i dues espècies amb els 2 enllaços disulfur no nadius (26-110, 58-84) i (26-58, 84-110). Es va veure que la formació dels enllaços disulfur no és completament a l'atzar sinó que la població de l'espècie amb els dos enllaços disulfur nadius era més gran que la predita a partir de consideracions de *loop entropy*, la qual

cosa va indicar que les interaccions entàlpiques han de contribuir també al procés de plegament. És a dir, les interaccions locals específiques presents en la proteïna reduïda dirigeixen la formació preferencial dels enllaços disulfur nadius en les dues variants de la RNasa A analitzades. La preferència per a la formació dels enllaços disulfur nadius observada pot resultar de la presència d'interaccions locals i de mig abast en la proximitat dels residus Cys26, Cys58, Cys84 i Cys110. Aquestes interaccions locals poden ser degudes a la formació de regions anomenades de nucleació o regions d'inici del plegament proteic originades principalment per interaccions hidrofòbiques que es donen en estadis primaris del plegament (veure el següent apartat).

#### **I.4.5. Regions proposades com a centres de nucleació o regions iniciadores del plegament proteic de la RNasa A**

En 1978, Matheson i Scheraga, considerant els aspectes inicials del plegament proteic en solució aquosa, anomenat procés de nucleació, van examinar la qüestió de l'existència de regions de nucleació i la base estructural i molecular per a la seva formació. Els autors van proposar que el procés de nucleació es porta a terme mitjançant una reacció en la qual una secció de la cadena polipeptídica es plega sobre si mateixa i crea una estructura específica en forma de butxaca (*hairpin-like conformation*) estabilitzada principalment per interaccions hidrofòbiques de curt abast. La creació d'aquesta butxaca permetria llavors la formació ràpida i directa de la conformació nativa completa de la proteïna. Basats en aquestes assumpcions, Matheson i Scheraga van utilitzar un mètode matemàtic per predir regions de nucleació en el plegament proteic a partir de l'estimació de l'energia lliure de formació d'aquestes butxaques. Coneixent la seqüència d'aminoàcids de la proteïna i amb l'ajut de l'ordinador van buscar butxaques de residus no polars que la seva energia d'interacció compensés l'augment de l'energia lliure necessària per acostar aquests residus de tal manera que puguin formar interaccions hidrofòbiques. La butxaca, formada per 11 residus com a mínim per tal d'evitar el contacte amb el solvent, més favorable al plegament va ser predita com a regió de nucleació de la proteïna. A partir del model anterior, els autors van descriure una regió de nucleació molt estable per a RNasa A que estaria formada per 13 residus, del residu Ile106 al residu Val118.

Posteriorment, s'han realitzat molts treballs experimentals i teòrics que han recolzat la idea que les estructures locals termodinàmicament estables tenen un paper important



en les etapes inicials del plegament proteic (Rose, 1979; Scheraga, 1980; Kim i Baldwin, 1982; Scheraga, 1984).

Némethy i Scheraga (1979), van identificar 6 regions de nucleació en la RNasa A a partir del mapa de contacte de l'estructura cristal·lina de la RNasa S: residus 4-11 (regió A), 25-34 (regió B), 51-57 (regió C), 53-79 (regió D), 71-111 (regió E) i 103-124 (regió F).

Montelione i col. (1984) van adoptar el terme regions iniciadores del plegament, de l'anglès, *chain folding initiation structure or sites* (CFIS), per referir-se a les conformacions locals més estables termodinàmicament que es formen a partir d'interaccions de curt abast durant les etapes inicials del plegament, descrites anteriorment per Matheson i Scheraga (1978) com a regions de nucleació. Probablement, aquestes estructures redueixen l'espai conformacional que el polipeptid necessita provar abans del plegament, dirigeixen (o influencien) esdeveniments de plegament subseqüents, i proporcionen estructures en forma de cor estables al voltant de les quals la resta de la cadena polipeptídica pot plegar-se.

Estudis posteriors amb fragments de la RNasa A i derivats d'aquesta amb els enllaços disulfur reduïts, han recolzat la idea que les interaccions de curt abast són suficients per definir estructures locals en varis segments independents de la cadena polipeptídica. D'aquests estudis destaquen els realitzats amb els pèptids següents: (1) l'hèlix  $\alpha$  N-terminal (CFIS A, residus 4-11) (Kim i col., 1982; Rico i col., 1986, 1987), (2) Cys58-Cys72 (CFIS D, residus 53-79) (Altman i Scheraga, 1990), (3) Ac-Tyr92-Pro93-Asn94-NHMe, (CFIS E, residus 71-111) (Stimson i col., 1982), (4) Ac-Asn113-Pro114-Tyr115-NHMe (CFIS F, residus 103-124) (Montelione i col., 1984), i (5) el pèptid 16è aïllat per cromatografia a partir d'un digerit triptic de la RNasa A oxidada (CFIS F, residus 103-124) (Haas i col., 1987).

Rico i col. (1989) van evidenciar, a partir d'experiments de bescanvi de protons amida H/D de la RNasa A a 55°C per RMN, un elevat grau de protecció per part dels residus: Val63, Ile107, Val108, Ala109, Val116 i Val118. Segons aquests resultats, els autors van indicar que aquesta regió de la molècula romandria compacta mentre que altres parts estarien parcialment desplegadas o mostrarien una elevada flexibilitat, la qual cosa estaria en concordança amb la proposta de Matheson i Scheraga (1978) sobre

la regió 106-118 com a centre de nucleació de la RNasa A.

De manera similar, Talluri i Scheraga (1990) van examinar el bescanvi H/D de la RNasa A a pH 2,5 i a diferents temperatures, abarçant la regió de la transició tèrmica. Els resultats van indicar que a la temperatura del punt mig de la transició tèrmica, 46°C en les condicions assajades, els únics protons amida que no s'han bescanviat són els dels residus: Val54, Val63, Ile107, Val108 i Val116. El protó amida de Val116 va mostrar una velocitat de bescanvi H/D lenta fins i tot a temperatures superiors a 46°C, la qual cosa podria indicar la retenció, en aquesta regió, d'estructura similar a la nativa en l'estat desnaturalitzat.

Beals i col. (1991) van analitzar les propietats conformacionals d'un pèptid marcat, format pels 20 residus de la regió C-terminal de la RNasa A (105-124) per determinar si les interaccions hidrofòbiques de curt abast entre els residus 106-118 són suficientment fortes per induir la formació d'una estructura plegada en el fragment peptídic esmentat. Aquest pèptid conté molts residus no polars, una cisteïna (Cis110), un sol grup amino (l'amino N-terminal), i tres grups carboxil (Glu111, Asp121 i el carboxil C-terminal). A més, aquesta regió de la RNasa A (105-124) es troba en una estructura de full plegat  $\beta$  antiparal·lela *hairpin-like* que conté un gir d'inversió  $\beta$  del tipus VI, degut a la presència d'una prolina en conformació cis, en Gly112-Asn113-Pro114-Tyr115.

Els resultats van indicar l'existència d'una estructura parcialment ordenada en el pèptid en solució, en absència d'agent desnaturalitzant i a temperatures  $\geq 20^\circ\text{C}$ , estabilitzada per interaccions hidrofòbiques de curt abast. Aquestes interaccions hidrofòbiques en el pèptid, probablement degudes a la predominància de residus no polars, semblaven ser el factor principal en la formació d'estructura compacta en el pèptid, tal com s'esperaria en un CFIS. Aquests resultats concorden amb el model del CFIS teòric proposat per Matheson i Scheraga (1978), que prediu els residus 106-118 com a regió de nucleació pel plegament de la RNasa A i que les interaccions hidrofòbiques de curt abast són les forces estabilitzadores dominants que compensen la pèrdua d'entropia en formació de l'estructura plegada.

La distribució d'estructures observades en el pèptid en solució semblava ser predominantment no nativa, és a dir, es tractaria d'un conjunt d'estructures en equilibri que comprenen des de conformacions compactes similars a la nativa fins a conformacions esteses. Aquest fet no significa que el pèptid no contingui un CFIS. En el model de Matheson i Scheraga (1978), un CFIS no requereix adquirir la conformació

nativa en les primeres etapes de plegament per ser capaç de dirigir el posterior plegament, sinó que pot adoptar inicialment una conformació no nativa, però compacta, i restringir la quantitat d'espai conformacional que la proteïna ha de provar. Aquest model és directament aplicable al pèptid estudiat, en el qual l'enllaç peptídic Asn113-Pro114 es troba molt probablement tant en conformació *cis* com *trans*. Aquest fet estava en concordança amb els estudis de Pincus i col. (1983) que mitjançant càlculs d'energia conformacional d'aquest mateix pèptid havien predit que les conformacions en full plegat  $\beta$  similars a la nativa són energèticament favorables tant per a la conformació de l'enllaç peptídic Asn113-Pro114 en *cis* com en *trans*. Probablement, en els estadis inicials del plegament de la RNasa A es podria formar una estructura compacta en el CFIS del pèptid, amb el grup Asn113-Pro114 tant en conformació *cis* com *trans*, que posteriorment es reorganitzaria per donar lloc a la conformació nativa mitjançant una isomerització *cis/trans* en els estadis finals de plegament.

Aquest estudi va demostrar que el plegament local pot tenir lloc en una regió identificada com a CFIS i que existeixen fets suficients, experimentals i teòrics, per identificar el pèptid estudiat (105-124) com un CFIS. Les interaccions hidrofòbiques de curt abast, en absència d'interaccions de mig i llarg abast amb la molècula de RNasa A restant, poden induir la formació d'un conjunt d'estructures parcialment ordenades i compactes en absència d'agent desnaturalitzant.

A partir del model de plegament/desplegament de la RNasa A proposat per Dodge i Sheraga (1996) (FIGURA I.6), el qual especifica l'estat isomèric *cis/trans* de les espècies desplegadas a cada enllaç peptídic X-Pro, i l'anàlisi de 4 variants d'aquesta proteïna (P42A, P93A, P114A i P117A), els autors van examinar les diferències en la distribució d'espècies desplegadas entre la proteïna salvatge i les 4 variants i van avaluar quines isomeritzacions d'enllaços peptídics X-Pro estan associades amb la velocitat de replegament de la proteïna. D'aquesta manera van poder saber quines de les regions proposades com a iniciadores del plegament de la cadena polipeptídica (CFIS's) de la RNasa A estan afectades per la isomerització de prolines. Els autors utilitzaren aquest raonament per confirmar l'existència de CFIS's postulats per a la RNasa A. El model va mostrar que l'estat isomèric de l'enllaç peptídic Lys41-Pro42 no determina la velocitat del replegament de la RNasa A desnaturalitzada químicament i amb els enllaços disulfur intactes. Per tant, la regió del voltant de la Pro42 de la RNasa A no seria un CFIS. En canvi, l'estat d'isomerització dels enllaços peptídics Tyr92-Pro93, Asn113-Pro114 i Val116-Pro117 afecten el plegament de la RNasa A cap a l'estat natiu. Aquest

resultat recolzaria el fet que la regió del voltant del gir  $\beta$  de tipus VI a la posició Tyr92-Pro93 i la regió compresa pels residus 106-118 serien CFIS's i que l'estructura tridimensional s'hauria de formar en aquestes regions abans que la proteïna es pugui plegar cap a l'estat natiu.

Xu i col. (1996) van suggerir que les interaccions locals, les quals formen regions CFIS's, dirigeixen la formació d'enllaços disulfur, cosa que dona lloc a una preferència pels enllaços disulfur nadius. Lester i col. (1997), van proposar que la preferència observada per a la formació dels enllaços disulfur nadius en les variants de la RNasa A [C40A,C65A,C72A,C95A] i [C40S,C65S,C72S,C95S], les quals contenen 2 enllaços disulfur, pot resultar de la presència d'interaccions locals i de mig abast en la proximitat dels residus Cys26, Cys58, Cys84 i Cys110. A més, a partir dels espectres de  $^1\text{H}$ -RMN van demostrar que les conformacions de les 3 espècies (una amb els enllaços disulfur nadius i dues no nadius) d'ambdues variants són similars i predominantment desordenades. Tanmateix, es percep estructura local al voltant d'un dels 4 residus d'His, el més probable dels quals sembla ser la His105. Aquesta estructura local pot resultar de la hidrofobicitat inherent d'un CFIS (possiblement el 105-124), de les interaccions produïdes per la formació d'un enllaç disulfur o de les interaccions entre el residu d'His i un residu de Cys proper.

Udgaonkar i Baldwin (1995) van analitzar les propietats de bescanvi de protons amida dels residus Val63, Thr100, Ile106 i Val116 de la regió de full plegat  $\beta$  de l'intermediari del camí de replegament de l'espècie desplegada majoritària ( $U_{S,II}$ ) de la RNasa A,  $I_N$ , i van observar que aquests residus hi estan altament protegits. Prèviament, Udgaonkar i Baldwin (1990) havien observat que aquests mateixos residus estaven també altament protegits en l'intermediari  $I_1$ . Aquests resultats van indicar l'existència d'una estructura secundària altament ordenada en la regió del CFIS 106-118 dels intermediaris  $I_1$  i  $I_N$ .

Arran que Houry i col. (1995) havien mostrat que l'intermediari hidrofòbicament col·lapsat  $I_\phi$  del camí replegament de l'espècie  $U_{vf}$  està format principalment per interaccions hidrofòbiques, Houry i Scheraga (1996b) van comprovar si la regió del CFIS 106-118, corresponent a la regió més hidrofòbica de la RNasa A, es trobava protegida en aquest intermediari. Mitjançant experiments de *double-jump stopped-flow* seguits per bescanvi H/D van observar uns nivells mitjans i baixos de protecció al

bescanvi dels protons amida analitzats de l'esquelet polipeptídic d'aquesta regió (de les posicions 106, 109, 116 i 118). Aquesta observació va indicar que l'estructura en aquesta regió d'I<sub>φ</sub> és probablement de naturalesa dinàmica i flexible, la qual cosa implica que els contactes terciaris són necessaris per a una estabilització addicional d'aquesta regió de la proteïna. En la RNasa A nativa, la regió 106-118 es troba empaquetada aprop de l'hèlix  $\alpha$  III i de la regió de full plegat  $\beta$  (71-81), però en l'intermediari I<sub>φ</sub> l'hèlix  $\alpha$  III no sembla estar formada i la regió 71-81 només ho sembla estar parcialment. Per consegüent, la regió hidrofòbicament col·lapsada 106-118 no presenta una estabilització addicional per interaccions terciàries en I<sub>φ</sub>.

Darrerament, Neira i col. (1999) a partir d'experiments de bescanvi d'hidrogens de la RNasa A combinats amb RMN 2D realitzats a diferents valors de pH i temperatura, han suggerit la presència d'un possible CFIS que comprèn les regions de full plegat  $\beta$  62-64, 72-75, 106-110 i 116-119, junt amb la cara de l'hèlix  $\alpha$  III que conté els residus 54 i 57. Aquest extens CFIS podria donar lloc a un intermediari de plegament, l'estabilitat i localització del qual en el camí de plegament de la RNasa A no s'ha pogut deduir a partir dels resultats.

Tots els treballs descrits en aquest apartat corroboren la importància de la regió 106-118 com a centre de nucleació de la RNasa A.



### I.5. Estudis en cors hidrofòbics de proteïnes globulars

Les proteïnes globulars tenen un patró general de plegament en el qual els residus hidrofòbics se situen a l'interior mentre que els residus polars es troben a la superfície, la qual cosa suggereix que l'enterrament dels residus hidrofòbics per protegir els àtoms no polars de l'aigua del solvent, fenomen conegut com a efecte hidrofòbic, impulsa (o dirigeix) el plegament proteic (Bernal, 1939; Kauzmann, 1959; Dill, 1990). Els residus que interaccionen per formar el cor hidrofòbic d'una proteïna tenen un clar paper en la determinació de l'estructura i l'estabilitat proteica (Richards, 1977). Per bé que moltes substitucions de residus de la superfície de la proteïna no tenen efectes adversos, les substitucions a posicions internes tendeixen a ser severament desestabilitzadores (Alber i col., 1987). De manera similar, és conegut que en una família de proteïnes homòlogues, els residus més conservats, apart dels aminoàcids funcionals, són aquells que estan enterrats (Perutz i col., 1965). Varis factors poden contribuir a la importància del cor hidrofòbic com ara l'efecte hidrofòbic (Kauzmann, 1959; Tanford, 1980) i l'elevada densitat d'empaquetament de les cadenes laterals del cor (Richards, 1977; Chothia, 1975).

La contribució de les cadenes laterals dels aminoàcids interiors a l'estabilitat proteica és sovint analitzada mitjançant el tractament de l'interior de la proteïna com un líquid apolar (Fauchère i Pliska, 1983; Nozaki i Tanford, 1971; Radzicka i Wolfenden, 1988). Tanmateix, els interiors de les proteïnes difereixen dels líquids apolars en molts aspectes, com ara que els residus interiors estan més ben empaquetats que les molècules dels líquids apolars i que existeixen variacions en la polaritat, l'organització i la densitat a l'interior de les proteïnes. Una mesura quantitativa de l'efecte hidrofòbic s'obté generalment a partir de les solubilitats de molècules no polars, particularment hidrocarburs, en aigua. Un consens obtingut a partir de moltes mesures és que la transferència d'un hidrocarbur alifàtic des d'un solvent no polar a l'aigua costa 20-30 cal/(mol·Å<sup>2</sup>), en la qual l'àrea es defineix com l'àrea accessible al solvent (Lee i Richards, 1971). Ara bé, estudis més recents en els quals s'utilitzen la mutagènesi dirigida i la desnaturalització proteica suggereixen que la força d'aquest efecte hidrofòbic podria ser molt més gran. En un exemple típic, un residu hidrofòbic del cor de la proteïna se substitueix per un residu hidrofòbic més petit i es determina el canvi d'estabilitat proteica resultant entre la forma de la proteïna plegada versus la desplegada, el qual es pren com a mesura de la diferència entre l'estabilització hidrofòbica



proporcionada per dos aminoàcids. Experiments d'aquests tipus portats a terme amb proteïnes diferents han donat resultats variables. La raó d'aquestes discrepàncies roman, encara, objecte de debat. Una de les principals dificultats en solventar aquest problema és la manca de dades estructurals rellevants que permetin respondre a tota una sèrie de preguntes com ara: 1) Com respon una estructura proteica quan un residu hidrofòbic voluminós és substituït per un altre de tamany més petit? 2) L'estructura proteica es manté essencialment inalterada, o bé hi ha un reordenament estructural per evitar la creació de la cavitat? 3) Si es creen cavitats, contenen solvent?

Entendre com l'ambient d'un residu hidrofòbic afecta la seva contribució a l'estabilitat de la proteïna és, per tant, important per a una acurada predicció de la contribució del residu a l'estabilitat global. Això és essencial ja que l'energia lliure del plegament proteic és generalment petita, 5-15 kcal/mol (Privalov, 1979), la qual pot ser molt similar als canvis d'energia lliure involucrats en la mutació.

A continuació es descriuen alguns treballs realitzats en cors hidrofòbics de diferents proteïnes globulars que poden ser representatius del que s'ha esmentat en els paràgrafs anteriors:

Per tal de dilucidar el paper dels residus individuals en l'estabilització de la conformació de les proteïnes, Yutani i col. (1987) van construir una sèrie de variants de la subunitat  $\alpha$  de la triptòfan sintasa d' *E. coli*, substituïdes pels 20 aminoàcids a la posició 49, la qual està enterrada a l'interior hidrofòbic de la proteïna. A partir de la determinació dels valors de l'energia lliure del desplegament de les variants induït per clorur de guanidini, van observar que l'estabilitat conformacional tendeix a augmentar de manera lineal amb l'augment de la hidrofobicitat del residu, sempre que el volum d'aquest sigui inferior a un cert limit, el dels residus aromàtics. De manera similar, Matsumara i col. (1988) van observar el mateix efecte a partir mutacions en Ile3 del lisozim del bacteriòfag T4.

Kellis i col. (1989) van estudiar l'energètica de l'empaquetament complementari de cadenes laterals no polars de l'interior del cor hidrofòbic de la ribonucleasa extracel·lular de *Bacillus amyloliquefaciens*, coneguda com a barnasa, a partir de l'anàlisi de 5 variants d'aquesta proteïna en les quals s'havia substituït un residu d'Ile per Val o Ala o un residu de Leu per Ala. A. Les mutacions van ser escollides de manera que la possibilitat d'introduir interaccions addicionals fos mínima [fenomen conegut

com a deleccions no disruptives (Fersht, 1987)] per poder d'aquesta manera comparar directament la proteïna salvatge amb les seves variants i relacionar els canvis d'estabilitat en crear cavitats amb els canvis estructurals. La desestabilització resultant de la creació de cavitats va ser determinada a partir de les mesures de l'energia lliure del desplegament induït per urea, clorur de guanidini o calor. Els diferents mètodes van donar resultats consistents i es va assignar la pèrdua d'estabilitat de les proteïnes mutades en 1,0-1,6 kcal/mol per grup metilè eliminat, que correspon a una contribució dels residus hidrofòbics a l'estabilitat de 45-60 cal/(mol·Å<sup>2</sup>), valor que excedeix l'obtingut a partir d'experiments de partició de cadenes laterals pertinents entre solvents aquosos i no polars 20-30 cal/(mol·Å<sup>2</sup>). Segons els autors, bona part d'aquesta discrepància surgeix pel fet que en plegar-se una proteïna s'enterren dues superfícies, tant la cadena lateral de l'aminoàcid en qüestió com les parts de la proteïna amb (o contra ?) les quals s'empaqueta. Aquests experiments demostren que la importància de les interaccions hidrofòbiques varia considerablement en funció de la posició en una proteïna i que l'empaquetament de les cadenes laterals no polars a l'interior d'una proteïna és crucial per estabilitzar la seva estructura tridimensional.

Lim i Sauer (1989) van alterar a l'atzar una sèrie de residus del cor hidrofòbic del domini N-terminal del repressor del fag  $\lambda$  (Leu18, Val36, Met40, Val47, Phe51, Leu57 i Leu65) de manera individual i combinada. Mitjançant la selecció de les variants per la funció repressora *in vivo*, van identificar diferents seqüències que especifiquen el plegament del repressor  $\lambda$  i van veure que, malgrat que el nombre de seqüències funcionals és limitat per restriccions de composició, volum i interaccions estèriques, el simple fet que les posicions romanguin hidrofòbiques és el principal determinant de la compatibilitat del cor amb el plegament de la proteïna salvatge. A més, van observar que una sèrie de mutacions senzilles en el cor són desfavorables a menys que simultàniament tinguin lloc mutacions complementàries a posicions adjacents del cor. Els autors van concloure que les substitucions permeses en una posició del cor depenen del context i van suggerir que el camí de l'evolució de les proteïnes és, probablement, altament dirigit i limitat a certes regions de la proteïna.

Per tal de quantificar la contribució dels residus hidrofòbics a l'estabilitat de l'estat natiu d'una proteïna, Shortle i col. (1990) van preparar 83 variants senzilles de la nucleasa d'*staphylococcus*, en les quals van substituir cada residu de leucina, valina, tirosina, isoleucina, metionina i fenilalanina per alanina i glicina, i, a més, els residus

d'isoleucina es van substituir per valina. D'aquesta manera, les cadenes laterals hidrofòbiques s'escurcen i no es modifica la forma, la qual cosa fa que els resultats puguin ser interpretats de manera senzilla en termes de pèrdua d'àtoms de la cadena lateral. Els resultats de les desnaturalitzacions d'aquestes variants amb clorur de guanidini van mostrar 3 tendències inesperades: 1) La pèrdua d'estabilitat mitjana per a les variants amb el mateix tipus de mutació és 2-3 vegades superior a l'estimada en base a l'energia lliure de transferència de la cadena lateral hidrofòbica des d'aigua a n-octanol. 2) La magnitud de la pèrdua d'estabilitat en una determinada substitució varia molt entre les diferents posicions, la qual cosa indica que l'ambient circumdant al residu específic determina la contribució a l'estabilitat que farà la seva cadena lateral. En base a anàlisis estadístiques, el paràmetre que proporciona una millor estimació d'aquest efecte ambiental és el nombre de carbonis  $C_{\alpha}$  en una esfera de radi  $10\text{\AA}$  del  $C_{\alpha}$  del residu substituït. 3) Es va trobar una correlació significativa entre la pèrdua d'estabilitat i el valor absolut del canvi d'energia lliure en funció dels canvis en la concentració de clorur de guanidini. Aquesta correlació recolza la conclusió que les substitucions d'aminàcids poden desestabilitzar una proteïna de manera indirecta a través dels seus efectes en l'estructura i l'energia lliure de l'estat desnaturalitzat. Les contribucions dels residus hidrofòbics individuals a l'energia lliure del plegament global, tanmateix, roman un tret controvertit.

Atès que les mesures de solubilitat i pressió de vapor d'hidrocarburs des d'un solvent no polar cap a l'aigua per unitat d'àrea accessible al solvent estima la força de l'efecte hidrofòbic en un rang de  $20\text{-}30\text{ cal}/(\text{mol}\cdot\text{\AA}^2)$ , Sharp i col. (1991) van reavaluar les dades de solubilitat en base a nous desenvolupaments termodinàmics i van trobar un valor de  $46\text{-}47\text{ cal}/(\text{mol}\cdot\text{\AA}^2)$ . Els autors van demostrar que les equacions dels gasos ideals, combinades amb els volums molars experimentals corregits per la diferència de tamany entre el solut i el solvent, poden respondre a aquests canvis. En base a això, van obtenir escales de solubilitat pels 20 aminoàcids basades en energies de transferència des de ciclohexà cap a aigua i des d'octanol cap a aigua. Es va trobar una bona concordança entre aquestes escales, particularment la d'octanol, i les mesures d'estabilitat proteica de variants de proteïnes substituïdes en una posició hidrofòbica interna concreta per residus hidrofòbics més petits, obtingudes en la barnasa (Kellis i col., 1989) i la nucleasa d'*Staphylococcus* (Shortle i col., 1990). Com a primera aproximació, l'efecte de substituir un residu no polar per un de no polar més petit en l'estabilització proteica es deu al canvi en la hidrofobicitat, mesurada mitjançant experiments de transferència des

de solvents orgànics a aigua. Les variacions que s'esperarien resulten de variacions en l'empaquetament i d'interaccions locals, però la contribució dels residus hidrofòbics individuals a l'energia lliure de plegament global segueix essent tema de debat.

Per examinar si les interaccions en el cor hidrofòbic d'una proteïna poden ser adequadament modelades en base a les propietats d'un líquid hidrocarbonat, Sandberg i Terwilliger (1991) van estudiar els efectes de les mutacions apolars en els residus Val35 i Ile47 del cor hidrofòbic de la proteïna del gen V del bacteriòfag  $\phi$ 1. Van preparar 29 variants de la proteïna, 17 de les quals eren dobles, i en van mesurar l'energia lliure del desplegament. Els resultats van indicar que els canvis d'estabilitat produïts en aquestes dues posicions enterrades de la proteïna són bastant diferents: a la posició 47, les substitucions alifàtiques tenen els efectes esperats dels canvis en la hidrofobicitat mesurats a partir de la variació de l'energia de transferència des de ciclohexà cap a aigua, mentre que a la posició 35, existeix una restricció del tamany dels residus alifàtics, els més grossos que la valina desestabilitzen la proteïna malgrat n'augmenten la hidrofobicitat, la qual cosa suggereix que la posició 35 és més rígida que la 47. A més, les variants que contenen residus poc polars en aquestes dues posicions suggereixen que l'interior de la proteïna és més polar que un líquid hidrocarbonat. Els autors van concloure que la consideració dels interiors de les proteïnes com un model de líquid apolar ha d'incloure també les interaccions polars i una energia d'empaquetament dependent de la posició associada als canvis en l'estructura interna de la proteïna.

Eriksson i col. (1992) van construir i analitzar 6 variants del cor hidrofòbic del lisozim del bacteriòfag T4, en 5 de les quals s'havia substituït un residu de leucina per alanina i en una d'elles un residu de fenilalanina per alanina, per tal d'estudiar la resposta de l'estructura proteica a mutacions creadores de cavitats i la seva relació amb l'efecte hidrofòbic. Les substitucions van donar lloc a una disminució de l'estabilitat de la proteïna que oscil·la 2,7-5,0 kcal/mol, segons les variants. La resolució de les estructures de les variants per raigs X va indicar que, en cada cas, l'eliminació de la cadena lateral salvatge permet a alguns dels àtoms circumdants moure's cap a l'espai vacant, però sempre hi queda una cavitat, el volum de la qual varia en funció de les variants 24 -150 Å<sup>3</sup>. No es van observar molècules de solvent en cap d'aquestes cavitats. Es va trobar una correlació entre la desestabilització de les variants en les quals s'havia substituït Leu per Ala en relació a la proteïna salvatge i el tamany de la cavitat creada. La pèrdua global d'estabilitat va poder ser separada en dos termes, un terme



associat al tamany de la cavitat creada, i un terme constant ( $\sim 2,0$  kcal/mol), corresponent a la reducció de l'estabilitat hidrofòbica, i que és aproximadament igual a la diferència entre l'energia lliure de transferència des d'aigua a octanol de Leu en relació a Ala (Fauchère i Pliska, 1983). Els autors proposen que per explicar els canvis observats en l'estabilitat proteica causada per mutacions creadores de cavitats no és necessari suggerir que l'efecte hidrofòbic compti dues vegades, una pel residu eliminat i l'altra per la cavitat creada (Kellis i col., 1989), ni cal tampoc discutir que la força de l'efecte hidrofòbic ha de ser revisada del valor acceptat d'aproximadament 20-30 cal/(mol·Å<sup>2</sup>) a un nou valor de 43-47 cal/(mol·Å<sup>2</sup>) (Sharp i col., 1991). En canvi, creuen que en substituir una cadena lateral interna voluminosa com ara Leu per Ala, es perden molts contactes de van de Waals en la proteïna plegada i aquesta seria la base física pel terme de desestabilització associat a la creació de la cavitat. Els reajustaments de la proteïna que redueixen el tamany de la cavitat tendeixen a restaurar l'estabilitat proteica ja que probablement augmenten la compacitat global de la proteïna en afegir noves energies d'interacció de van de Waals. Els resultats no recolzarien el model de la gota líquida d'oli per a l'interior de la proteïna, sinó que el cor inclouria parts relativament rígides i parts més flexibles, però no desordenades.

Serrano i col. (1992) van analitzar els canvis en l'estabilitat de 64 variants de la barnasa per obtenir informació sobre les magnituds dels canvis d'estabilitat proteica causats per mutacions en residus que són importants per mantenir l'estructura. Els autors van arribar a una sèrie de conclusions: 1) Es dona una pobra correlació entre els canvis d'energia lliure del desplegament i les diferències en l'àrea accessible al solvent de la cadena lateral enterrada entre la proteïna salvatge i la mutada. La millor correlació es troba amb el nombre de grups metil/metilè de cadenes laterals a un radi de 6 Å del grup hidrofòbic eliminat. Aquests resultats indiquen que un factor important en la determinació de l'efecte de mutacions hidrofòbiques a l'estabilitat de la proteïna és la densitat d'empaquetament de l'àrea i, per consegüent, la rigidesa de la proteïna en aquella àrea. 2) El truncament de cadenes laterals de residus hidrofòbics enterrats té, en general, el major efecte en l'estabilitat. Prenent, a més, els valors obtinguts per Shortle i col. (1990) i Sandberg i Terwilliger (1991) en mutar residus hidrofòbics de la nucleasa d'*Staphylococcus* i la proteïna del gen V, respectivament, Serrano i col. van assignar la pèrdua d'estabilitat de les proteïnes mutades en residus completament enterrats (àrea accessible al solvent  $< 5$  Å<sup>2</sup>) a  $1,5 \pm 0,6$  kcal/mol per grup metilè eliminat, que equival a 63 cal/(mol·Å<sup>2</sup>) per l'enterrament de superfície hidrofòbica i és, també, 2-3 vegades el

trobat en estudis model  $20\text{-}30 \text{ cal}/(\text{mol}\cdot\text{Å}^2)$ .

De manera similar, Jackson i col. (1993) van mutar residus hidrofòbics del cor hidrofòbic de l'inhibidor 2 de la quimotripsina per tal de mesurar la seva contribució a l'estabilitat de la proteïna. El canvi mitjà en l'energia lliure del desplegament per a una mutació Ile per Val és de  $1,2 \pm 0,1 \text{ kcal/mol}$ , per a una mutació Val per Ala  $3,4 \pm 1,5 \text{ kcal/mol}$  i per a mutacions Ile per Ala o Leu per Ala  $3,6 \pm 0,6 \text{ kcal/mol}$ . Això dona un canvi mitjà en l'energia lliure de desplegament de  $1,3 \pm 0,5 \text{ kcal/mol}$  per grup metilè eliminat, que equival a  $55 \text{ cal}/(\text{mol}\cdot\text{Å}^2)$ , el qual és molt similar al valor mitjà de  $63 \text{ cal}/(\text{mol}\cdot\text{Å}^2)$  descrit per Serrano i col. (1992). A partir dels valors dels canvis en l'energia lliure del desplegament entre la proteïna salvatge i les variants, van trobar dues bones correlacions amb l'ambient del residu mutat a la proteïna, concretament amb la diferència en l'àrea accessible al solvent de la cadena lateral enterrada entre la proteïna salvatge i la variant, i amb el nombre de grups metil/metilè a un radi de  $6 \text{ Å}$  del grup hidrofòbic eliminat. Aquesta segona correlació és molt similar a la trobada per a la barnasa (Serrano i col., 1992), la qual cosa suggereix que és una relació general i aplicable als cors hidrofòbics d'altres proteïnes globulars. La combinació de les dades de l'inhibidor 2 de la quimotripsina i de la barnasa mostren una millor correlació amb el nombre de grups metil/metilè a un radi de  $6 \text{ Å}$  del grup eliminat; això indica que la densitat d'empaquetament al voltant d'un residu particular és important per determinar la contribució que fa el residu a l'estabilitat proteica. Una de les variants en la qual una Ile s'havia substituït per Val, va resultar ser lleugerament més estable que la proteïna salvatge. Els autors van analitzar l'estructura cristal·lina d'aquesta variant i ho van atribuir a petits moviments de les cadenes laterals del cor.

Buckle i col. (1996) van descriure les estructures cristal·lines de 4 variants de la barnasa creadores de cavitats, 3 de les quals corresponien a substitucions Ile per Ala i l'altra a Leu per Ala, i les van comparar amb les respostes estructurals a la mutació Leu per Ala de les variants del T4 lisozim (Eriksson i col., 1992). En primer lloc, es van observar reordenaments de l'estructura de la barnasa que provoquen que les cavitats col·lapsin parcialment, i es va trobar una relació aproximadament lineal entre els canvis d'estabilitat i el volum de la cavitat, similar a la trobada per les variants del T4 lisozim. En segon lloc, van trobar una molècula d'aigua en la cavitat, creada en mutar, d'una de les variants de la barnasa, la qual establia un sol pont d'hidrogen amb la proteïna. A més, van realitzar un estudi computacional de cavitats hidrofòbiques produïdes per



mutacions similars en diferents proteïnes, el qual va mostrar que totes les cavitats contenen una porció d'àtoms polars, la disponibilitat dels quals té implicacions per comprendre els camins de plegament ja que un cor solvatat se suposa que és present en l'estat de transició pel plegament i despleament. Els autors creuen que és possible que cavitats de cors hidrofòbics, creades en mutar, d'altres proteïnes puguin contenir molècules d'aigua, malgrat que aquestes no puguin ser detectades per anàlisis cristal·logràfics.

Recentment, Xu i col. (1998) han substituït diferents tipus de residus no polars voluminosos (Leu, Ile, Val, Met o Phe) enterrats en el cor del T4 lisozim per Ala. En 25 dels casos va ser possible determinar les estructures cristal·lines de les variants, les mutacions de la majoria dels quals van crear cavitats internes, però en alguns altres es van formar clivelles o canals oberts a la superfície. Els canvis estructurals observats, corresponents als desplaçaments dels àtoms de les cadenes principals, van ser mínims en uns casos ( $\leq 0,3 \text{ \AA}$ ) mentre que en altres van arribar fins a  $2 \text{ \AA}$ . En una de les variants, l'estructura va col·lapsar tant que el volum de la suposada cavitat va ser zero. Els resultats van suggerir que l'ocupació de les cavitats pel solvent és baixa, per bé que en dues de les variants s'hi han trobat una i dues molècules d'aigua, respectivament, ben ordenades. En aquestes dues variants, la mutació ha permès establir ponts d'hidrogen amb àtoms polars que estan oclusos a la proteïna salvatge i mostrar que les cavitats són una mica polars. La pèrdua d'estabilitat de totes les variants amb cavitats, excepte per a la que conté una molècula d'aigua a la cavitat, es pot racionalitzar com una combinació de dos termes de la mateixa manera que Eriksson i col. (1992) van descriure. En la variant que el col·lapse va evitar la formació de la cavitat, la pèrdua d'energia deguda a la substitució va ser la menor de les variants amb la substitució Ile per Ala, amb un valor de proper al corresponent al terme hidrofòbic sol ( $\sim 2,1 \text{ kcal/mol}$ ).

## 1.6. Objectius

Tal com es descriu en aquesta introducció, la ribonucleasa de pàncrees boví, RNasa A, ha estat un model clàssic per als estudis del plegament/desplegament proteic. Malgrat això, fins que no es va aconseguir l'expressió heteròloga del gen que la codifica no va ser possible abordar estudis de plegament/desplegament alterant la composició d'aminoàcids de la mateixa. La major part d'aquests estudis, emprant com a eina la mutagènesi dirigida, han anat encaminats a alterar residus de prolina o de cisteïna. Fins al moment present, i fins on arriben els nostres coneixements de l'àmplia bibliografia existent sobre la RNasa, no s'havia plantejat alterar altres aminoàcids que puguin ser importants per a dirigir el plegament d'aquest enzim com poden ser aminoàcids que pertanyin a cors hidrofòbics, tal com ha estat fet abastament per a altres proteïnes globulars petites.

Per tot el que s'ha esmentat anteriorment, l'**objectiu general** d'aquest treball ha estat alterar els aminoàcids hidrofòbics que pertanyen a una regió postulada com a centre de nucleació (CFIS) de la RNasa A, concretament la compresa entre els aminoàcids Ile106 i Val118, per tal d'obtenir informació sobre la contribució d'aquests residus a l'estabilitat global de la molècula, així com també sobre la seva importància relativa dins d'aquesta regió.

Els **objectius concrets** que es van proposar per assolir l'objectiu general són:

1. Obtenció per mutagènesi dirigida per oligonucleòtid d'una sèrie de variants de la RNasa A en les quals els residus hidrofòbics Ile106, Ile107, Val108, Ala109, Val116 i Val118 han estat substituïts per altres residus d'hidrofobicitat i tamany inferiors. D'aquesta manera es va proposar la construcció de les 13 variants senzilles de la RNasa A següents: I106L, I106V, I106A, I107L, I107V, I107A, V108A, V108G, A109G, V116A, V116G, V118A i V118G.
2. Obtenció per mutagènesi dirigida per oligonucleòtid de variants de la RNasa A amb doble mutació, concretament les 3 variants: I106V+Y115W, I106A+Y115W i I107L+Y115W.
3. Optimitzar un protocol de purificació de la proteïna salvatge i les seves variants.

senzilles i dobles, que permeti obtenir quantitats suficients de cadascuna per ser caracteritzades.

4. Caracterització de cada una de les variants en relació a la proteïna salvatge per:

4.1. Mesures d'activitat enzimàtica mitjançant la determinació dels paràmetres cinètics per mètodes espectrofotomètrics utilitzant substrats de baixa i elevada massa molecular: cCMP i poli(C).

4.2. Determinació de l'estructura secundària i terciària (estructura global) mitjançant espectrofotometria a l'UV i dicroisme circular (DC).

4.3. Determinació de l'estabilitat mitjançant la seva desnaturalització tèrmica seguida per DC i per calorimetria d'escombrat diferencial (DSC). El DC permet la determinació de les alteracions en les estructures secundàries i terciàries durant el procés de desnaturalització tèrmica i el DSC permet el càlcul directe de totes les funcions termodinàmiques del procés de desplegament.

4.4. Espectroscòpia de fluorescència de l'estat excitat i per una modalitat d'aquesta espectroscòpia, la de fase amb multifreqüència, amb la finalitat d'esbrinar l'efectivitat del residu de triptòfan introduït en la posició 115 com a sonda per a detectar canvis conformacionals locals de la regió CFIS esmentada (limitat a les variants de la RNasa A que incorporen la doble mutació i a la variant senzilla Y115W).

# **MATERIAL I MÈTODES**

## II.1. Equipament i productes químics

### II.1.1. Equipament

Durant aquest treball s'ha utilitzat de manera rutinària l'equipament que es detalla a la TAULA II.1. A més a més, en determinades ocasions s'ha fet ús d'equipament més específic que serà detallat en el moment d'esmentar la tècnica per a la qual és necessari.

TAULA II.1 - Equipament utilitzat en aquest treball

Equip	Marca	Model	País
Agitadors magnètics	SELECTA	Agimatic-NM	Espanya
	SBS-Instruments	A-163	Espanya
Agitador vòrtex	TECHNOKARTELL	TK3S	Itàlia
Agitadors orbitals	SELECTA	Rotabit	Espanya
	HEIDOLPH	Unimax 2010	Alemanya
Aparell d'ultrafiltració d'aigua	MILLIPORE	Milli-Q RG	EUA
	SELECTA	437-G i 437-P	Espanya
Autoclaus	RAYPA	AE-75	Espanya
	A&D Co. SALTER	FY-300 i ER-120A	Japó
Balances	METTLER	AE160	Espanya
	SELECTA	Unitronic 320 OR	Espanya
Banyes termostàtiques	SELECTA	Tectron-100	Espanya
	TELSTAR	2G-9	Espanya
Bomba de buit	PHARMACIA Biotech	P-1	Suècia
Bomba persitàtica	TELSTAR	PV-100	Espanya
Càbina de flux laminar	POLAROID	MP4+	EUA
Càmera fotogràfica	SORVALL	RC-5B	EUA
Centrífuga	PHARMACIA Biotech	Frac-200 i Redi-Frac	Suècia
Col·lector de fraccions	CRISON	524	Espanya
Conductímetre	SANYO	MDF-192AT	Japó
Congelador -80°C	PHILIPS/WHIRPOOL	COMBI	Alemanya
Frigorífic congelador	MILLIPORE	Milli-RO 6	EUA
Destil·lador d'aigua	CECIL	CE6602	Anglaterra
Espectrofotòmetre	RAYPA	I-280	Espanya
Estufa de cultiu	HERAEUS	T6030	Alemanya
Estufa d'assecat	APELEX	ST304 i PS3002	França
Fonts d'alimentació	PHARMACIA Biotech	EPS 300	Suècia
electroforesis	SELECTA	HotCold-UM	Espanya
Incubador de precisió	HETO	CT60e	Dinamarca
Liofilitzador	SIGMA	2K15	Alemanya
Minicentrífuga	PHILIPS	M704	Alemanya
Microones	CRISON	micropH2000	Espanya
pH-metre	HETO	VR-1/120/240	Dinamarca
Rotovapor (Speed-Vac)	TFX	20M	França
Transil·luminador de llum UV	BIOMETRA	Personal Cycler	Alemanya
Termociclador	MILLIPORE	Acrylic Minitan II	EUA
Ultrafiltrador tangencial			

### **II.1.2. Productes químics**

Els productes químics que s'han utilitzat de manera general durant aquest treball han estat de grau analític, procedents de les cases comercials Boehringer Mannheim (Alemanya), Fluka (Suïssa), Merck (Alemanya), Panreac (Espanya), Serva (Alemanya) i Sigma Chemical Co. (EUA). Pel que fa als productes d'ús més específic, la seva procedència serà indicada a mesura que apareguin en el text.



## II.2. Material biològic i medis de cultiu

### II.2.1. Material biològic

Durant aquest treball s'han emprat les següents soques de l'espècie *Escherichia coli* :

***E. coli* TG1** (Gibson, 1984), de genotip:

*thr*, *hsdD5*, *supE*,  $\Delta$  (*lac-proAB*) / F'*[traD36, proA<sup>+</sup>, proB<sup>+</sup>, lac<sup>q</sup> lac Z $\Delta$ M15]*

Aquesta soca, distribuïda per Amersham Ltd. (Anglaterra) ha estat utilitzada de manera general com a hospedant dels vectors pUC119, pET22b(+) i els seus respectius derivats durant les diverses manipulacions genètiques precedents a l'expressió del gen. Es tracta d'una soca idònia per a la propagació i manipulació de vectors pel fet de créixer molt bé en medis rics, i tenir una elevada taxa de transformabilitat.

***E. coli* BL21(DE3)** (Studier i col., 1990), de genotip:

F<sup>-</sup>, *omp T*, *r B<sup>-</sup>*, *m B<sup>-</sup>* (DE3)

Aquesta soca és la que ha estat utilitzada durant tot el treball com a soca d'expressió de la RNasa A recombinant i les seves variants. Presenta la particularitat que en el gen *int* del genoma bacterià s'hi ha inserit el bacteriòfag DE3, derivat del fag  $\lambda$ , que és portador d'un fragment de DNA que conté el gen *lacI*, el promotor *lacUV5*, un fragment inicial del gen *lacZ* i el gen que codifica la RNA polimerasa de T7. Arran d'aquesta inserció, el gen *int* està interromput i, per tant, inactivat. Aquesta inactivació fa que el bacteriòfag DE3 estigui en un estat de lisogènia i necessiti un *helper* tant per a la integració com per a l'excisió del genoma. En aquestes condicions de lisogènia l'únic promotor conegut per dirigir la transcripció del gen de la RNA polimerasa de T7 és el promotor *lac UV5*, el qual és induïble per IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranòsid). L'addició d'aquest inductor a un cultiu d'aquesta soca en fase de creixement, genera la transcripció de la RNA polimerasa de T7, la qual alhora transcriu el gen que ha estat clonat en el plasmidi pET22b(+), darrera del promotor que reconeix aquesta polimerasa.

### II.2.2. Vectors

S'han utilitzat dos tipus de vectors: el vector de clonatge pUC119 i el vector d'expressió pET22b(+).

**pUC119** (Vieira i Messing, 1987)

És un vector derivat del pUC19, que alhora ho és de l'M13mp19. A diferència del pUC19, porta les seqüències necessàries per a la iniciació, terminació i empaquetament del fag M13, raó per la qual també se l'anomena fagèmid. Mercès a aquestes seqüències es pot obtenir DNA de cadena senzilla o monocadena (ssDNA) que pot resultar molt útil com a motllo en processos de seqüenciació i/o mutagènesi dirigida. A més a més, els plasmidis de la família pUC són d'alt nombre de còpies (de 500 a 700 de mitjana per cèl·lula), cosa que els fa molt interessants de cara a l'obtenció de gran quantitat de DNA per a clonatges i altres manipulacions. És interessant que el lloc de clonatge múltiple (*polycloning site*) del pUC119 sigui idèntic al d'M13mp19, fet que agilita el pas d'un fragment de DNA d'un vector a l'altre.

Aquest vector (FIGURA II.1.A) s'ha utilitzat per a la mutagènesi dirigida del gen de la RNasa A, per al posterior clonatge d'aquest gen mutat i per a la seva seqüenciació.

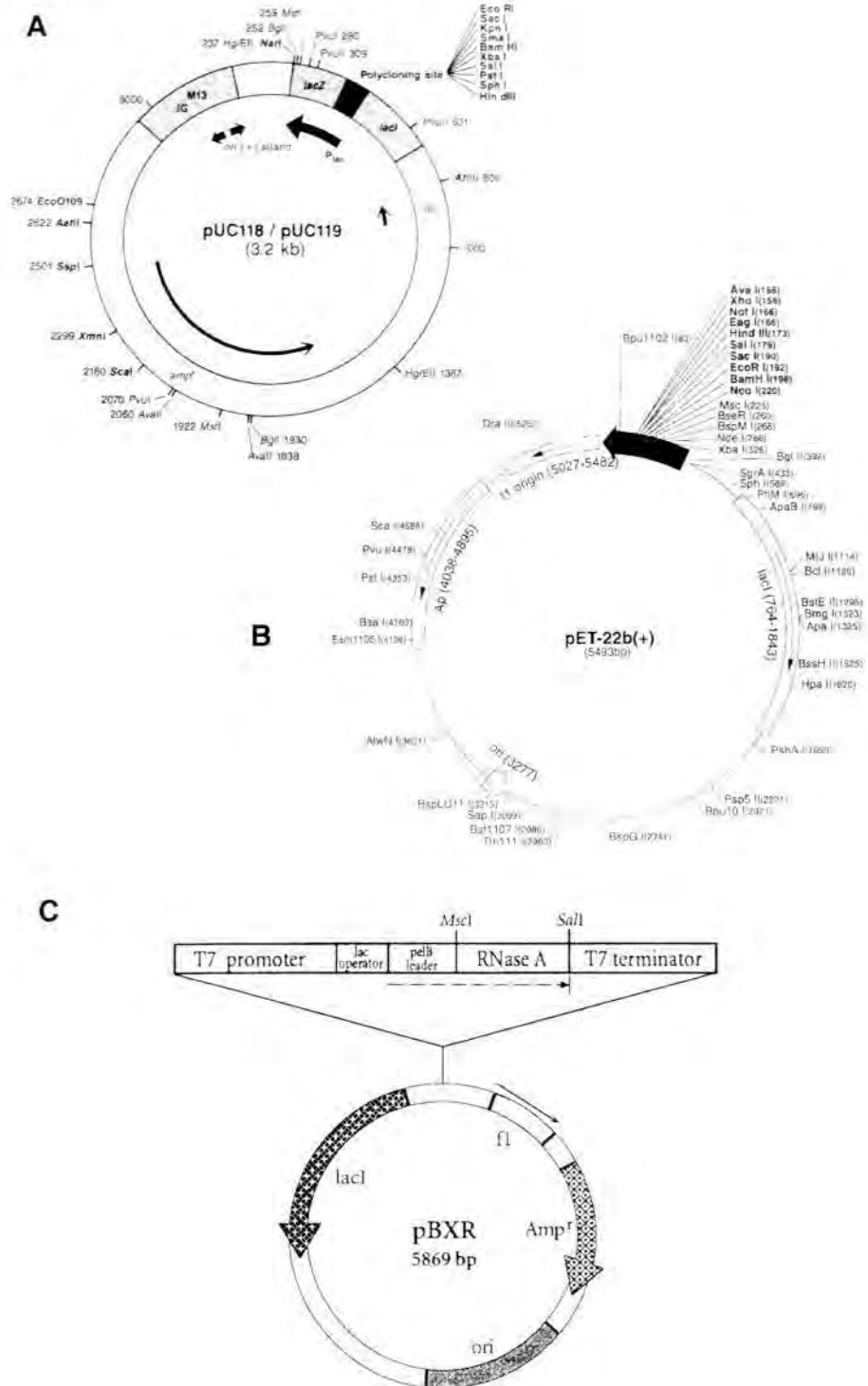
**pET22b(+)** (Studier i Moffat, 1986)

És un plasmidi que 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. Té un promotor del tipus *T7lac*, la qual cosa significa que existeix un operador *lac* just darrera del promotor de la RNA polimerasa de T7. A més, el pET22b(+) és portador del promotor natural i de la seqüència codificant del repressor *lac* (*lacI*), orientat en el sentit oposat al promotor *T7lac*. Quan aquest vector s'utilitza en lisògens del tipus DE3 per a l'expressió de gens foranis, el repressor *lac* actua tant sobre el promotor *lacUV5* per reprimir la transcripció de la RNA polimerasa de T7 (veure aparat anterior II.2.1), com sobre el promotor *T7 lac* per bloquejar la transcripció del gen forani per qualsevulla RNA polimerasa de T7 que es pugui trobar. El sistema descrit serveix per regular l'expressió de la seqüència senyal *peIB* de 63 pb que codifica un pèptid senyal d'exportació. Darrera d'aquesta seqüència es poden inserir els gens foranis a través de les dianes *Msc I* i *Sal I*, produint-se la proteïna per a la qual codifiquen fusionada al pèptid *peIB*. Aquest pèptid senyal està dissenyat per exportar les proteïnes heteròlogues al periplasma de la cèl·lula bacteriana (Better i col., 1998). El vector també comprèn un terminador propi de la RNA polimerasa de T7, necessari per impedir la transcripció de tot el vector.

Aquest vector (FIGURA II.1.B) s'ha utilitzat per a l'expressió de la RNasa A recombinant (rRNasa A) i variants d'aquesta en *E. coli* BL21(DE3).

**pBXR** (del Cardayré i col., 1995)

El gen de la RNasa A obtingut a partir d'una llibreria de cDNA de pàncrees de vaca es va lligar a un vector d'expressió pET22b(+) (FIGURA II.1.B), a través de les dianes *Msc* I i *Sal* I. La construcció resultant s'anomena pBXR (FIGURA II.1.C) on BXR fa referència a *Bacterial eXpression of RNase A*. Aquesta construcció es va utilitzar per transformar cèl·lules d'*E. coli* BL21(DE3), les quals ja transformades van ser cedides, en forma de glicerinars, pel Dr. Ronald T. Raines del Departament de Bioquímica i Química de la Universitat de Wisconsin-Madison (Wisconsin-EUA).



**FIGURA II.1.**

Vectors utilitzats en aquest treball. (A) Esquema del vector pUC119, (B) Esquema del vector pET22b(+), i (C) Esquema de la construcció pBXR.

### II.2.3. Medis de cultiu

Per al creixement i propagació de les diferents soques bacterianes, portadores o no de vectors, s'han utilitzat els medis de cultiu que es detallen a continuació.

#### Medi LB (Luria-Bertrani)

Es tracta d'un medi ric d'ús generalitzat en biologia molecular. S'ha utilitzat amb ambdues soques d'*E. coli*, tant per a l'obtenció i manipulació dels vectors com per a les proves d'expressió de les diferents construccions resultants d'aquesta manipulació.

Composició per 1 litre d'LB:

bactotripton	10 g
extret de llevat	5 g
NaCl	10 g
aigua destil·lada	1 L

Per a l'obtenció de medi sòlid en placa de Petri s'han d'afegir 15 g d'agar (1,5 % final). Cal ajustar el pH a 7,5 amb NaOH i posteriorment esterilitzar amb autoclau durant 20 minuts a 120°C.

#### Medi TB (Terrific Broth)

És un medi especialment ric que s'ha utilitzat per a l'expressió de la rRNasa A i les seves variants en cultius d'*E. coli* BL21(DE3) ja que permet obtenir un creixement cel·lular molt elevat.

Composició per 1 litre de TB:

bactotripton	12 g
extret de llevat	24 g
glicerol (80 %)	4 mL
fosfat potàssic monobàsic	2,31 g
fosfat potàssic dibàsic	12,5 g

La bactotripton i l'extret de llevat es dissolen en 900 mL d'aigua destil·lada, mentre que les sals en 100 mL. Ambdues solucions s'esterilitzen per separat, així com també el glicerol 80%, sotmetent-ho a 120°C durant 20 minuts a l'autoclau. Un cop estèrils es

reuneixen per assolir les concentracions esmentades, mantenint sempre les condicions d'esterilitat necessàries.

### **Medi mínim M9**

El medi M9 és un medi mínim que s'ha utilitzat per al creixement i manteniment en placa de la soca *E. coli* TG1.

Composició per 1 litre d'M9:

sals M9 x5	200 mL
MgSO <sub>4</sub> 1 M	2 mL
CaCl <sub>2</sub> 0,1 M	1 mL
tiamina 1 M	1 mL
glucosa 20 %	10 mL
aigua destil·lada	1 L

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

Composició de les sals M9 x5:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	32,3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 g
NH <sub>4</sub> Cl	5 g
NaCl	2,5 g
aigua destil·lada	1 L

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

### Addició d'antibiòtic al medi de cultiu

Quan es treballa amb soques transformades amb vectors, els medis de cultiu s'han de suplementar amb antibiòtics pels quals el vector confereix resistència. D'aquesta manera creixen només les cel·lules portadores del vector, i la soca no perd la informació genètica de la qual és portadora. Per suplementar els medis, s'ha partit d'una solució



mare (d'emmagatzematge) d'antibiòtic, preparada per separat i esterilitzada.

Durant aquest treball s'ha utilitzat únicament l'antibiòtic ampil·lina (Amp o Ap), que es prepara a una solució d'emmagatzematge de 25 mg/mL en aigua destil·lada que posteriorment s'esterilitza per filtració (0,22 µm de diàmetre de por) i es guarda al·liquotada a -20°C. La concentració de treball de l'ampil·lina ha estat de 50 µg/mL (pels cultius encaminats a l'expressió) o bé 400 µg/mL (pels pre-inòculs). Quan cal suplementar un medi sòlid (en placa), l'antibiòtic s'afegeix quan el medi ja s'ha refredat i just abans de dispensar-lo a les plaques, a una concentració final de 50 µg/mL. Aquestes plaques es poden mantenir en condicions òptimes durant uns dies a 4°C, però si l'emmagatzematge es perllonga més, és recomanable tornar a suplementar les plaques amb l'antibiòtic abans del seu ús.

#### II.2.4. Manteniment de les soques

Per al manteniment a curt termini de les soques d'*E. coli* esmentades anteriorment, portadores o no de plasmidis, 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 a -80°C. El procés per a l'obtenció d'un glicerinat és el següent:

1. Inocular el cultiu de la soca desitjada en 3 mL de medi de cultiu adequat.
2. Incubar a 37°C en agitació (250 r.p.m.) entre 12 i 18 hores.
3. Prendre una al·liquota de 0,75 mL del cultiu, transferir-la a un tub eppendorf estèril i afegir-hi 0,25 mL d'una solució de glicerol 80 % esterilitzada amb autoclau a 120°C durant 20 minuts (20% final).
4. Mesclar invertint el tub eppendorf i congelar immediatament a -80°C.

#### II.2.5. Creixement dels cultius

##### II.2.5.1. Condicions generals aplicades al creixement dels cultius

Per als cultius líquids:

- El volum del medi de cultiu ha estat sempre com a màxim 1/5 part de la capacitat del flascó.
- Els cultius de menys de 10 mL s'han preparat sempre a partir d'una colònia única aïllada en placa de Petri o bé d'un glicerinat, a una relació de 1:100 (glicerinat:medi).

Per als cultius de volum superior sempre s'ha fet créixer abans un pre-inòcul de volum adequat, referit normalment com a cultiu *overnight* (O/N), per després afegir-lo al medi de cultiu a una relació de 1:100 (inòcul:medi).

- La temperatura de creixement per a tots els cultius ha estat sempre de 37°C.
- El temps d'incubació dels cultius O/N ha estat sempre d'entre 12 i 15 hores. Es desaconsellen incubacions de més durada ja que poden tenir lloc processos proteolítics i també pot veure's reduïda la població de cèl·lules portadores del vector d'interès, en favor de la població de cèl·lules sense vector.
- Tots els cultius s'han incubat en agitació constant a 250 r.p.m.

Per als cultius en placa de Petri:

- Les incubacions han estat també sempre realitzades a 37°C.
- La durada de la incubació ha oscil·lat entre 10 i 16 hores. S'ha procurat obtenir colònies clares sense la presència de colònies satèl·lit al voltant. Les colònies satèl·lit apareixen després de períodes llargs d'incubació, i són propiciades per la degradació de l'antibiòtic al voltant de les colònies que són realment portadores de vector.

#### **II.2.5.2. Condicions de creixement dels cultius i inducció per a l'expressió de la RNasa A recombinant i variants en *E. coli*.**

S'ha partit de soques d'*E. coli* BL21(DE3) portadores del plasmidi pET22b(+) amb el gen de la RNasa A clonat, construcció anomenada pBXR (FIGURA II.1.C), per a l'expressió de rRNasa A, i dels plasmidis pET22b(+) amb els gens de la RNasa A mutats per a l'expressió de les variants d'aquesta proteïna. En tots els casos s'ha partit de soques conservades en forma de glicerinat a -80°C.

Abans d'iniciar el procés d'expressió d'aquestes soques encaminades a l'expressió dels gens recombinants, s'ha sembrat la soca desitjada en placa LB + Ap (50 µg/mL).

Per al creixement en medi líquid de la soca, s'ha realitzat en primer lloc un cultiu O/N d'una colònia única aïllada en placa, en 10 mL de medi líquid TB suplementat amb Ampicil·lina 400 µg/mL. És aconsellable realitzar dos cultius O/N més, fent una dilució 1/10<sup>2</sup> i 1/10<sup>4</sup> del primer. Una vegada transcorregut el temps d'incubació s'inocula el cultiu menys crescut dels tres, a una relació de 1/100, en 1 litre de medi líquid TB suplementat en aquest cas amb Ampicil·lina 50 µg/mL, i es deixa incubant a 37°C en agitació. A partir d'aquest moment, i cada dues hores, es van extraient alíquotes de 0,1 mL del cultiu que es mesclan amb 0,9 mL de medi fresc TB i se'n mesura l'absorbància

a 550 nm per tal de realitzar un seguiment del creixement del cultiu bacterià.

A les 3-5 hores d'haver-se iniciat el cultiu i després d'haver comprovat que el valor de l'A<sub>550</sub> es troba al voltant de 1 UDO s'afegeix IPTG a una concentració final de 1 mM, conservant en tot moment les condicions d'esterilitat adients. L'addició de l'IPTG es realitza per induir l'expressió del gen de la RNasa A atès que en el vector emprat, pET22b(+), el gen es troba fusionat a un pèptid senyal que en dirigeix l'exportació cap a l'espai periplàsmic i l'expressió del qual és controlada per un promotor de la RNA polimerasa de T7 que és induïble per IPTG.

A les 2-4 hores després de la inducció del cultiu se centrifuga tot el cultiu a 10000 xg durant 20 minuts. El sediment es pot guardar a -80°C fins al moment del seu processament. Si les cèl·lules bacterianes han de ser llisades passant-les per una *French Press* es guarda el sediment resuspès en 50 mL d'amortidor de llisat (Tris/HCl 20 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0) a -80°C.

## II.3. Mètodes de treball amb DNA

### II.3.1. Obtenció de DNA dels vectors

#### II.3.1.1. Minipreparacions de DNA plasmídic a partir de cultius d'*E. coli*

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

1. Inocular una colònia de la soca desitjada, que hagi estat prèviament transformada i sembrada en placa, en 3-10 mL de LB amb l'antibiòtic adequat. Incubar entre 12 i 15 h a 37°C amb agitació a 250 r.p.m.
2. Distribuir el cultiu en tubs eppendorf, en al·iquotes d'1,5 mL. Centrifugar a 12000 xg durant 5 min en una centrifuga 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 (fins a un màxim de 10 mL).
3. Eliminar el sobrenadant per aspiració, utilitzant la punta d'una pipeta pasteur, i deixar el sediment format per les cèl·lules bacterianes el més sec possible.
4. Resuspendre el sediment en 100 µL de solució I amb una micropipeta o bé agitant vigorosament amb el vòrtex. Mantenir 5 min en gel picat.
5. Afegir 200 µL de la solució II acabada de preparar. Barrejar les fases que es formen invertint el tub ràpidament diverses vegades, fins que la solució esdevé gairebé transparent. És molt important no agitar amb el vòrtex. Mantenir en gel 5 min.
6. Afegir 150 µL de la solució III refredada a 4°C. Agitar amb el vòrtex durant 20-30 seg. S'hauria d'observar un precipitat blanquinós. Mantenir el tub en gel durant 5 min.
7. Centrifugar a 12000 xg durant 15 min per aconseguir la formació d'un sediment sòlid. El sobrenadant, on es troba dissolta la major part del DNA plasmídic, es transfereix a un nou tub eppendorf, anant amb compte de no arrossegar part del sediment.
8. Afegir un volum igual de la solució de fenol:cloroform:alcohol isoamílic (25:24:1). Barrejar agitant amb el vòrtex fins a formar una emulsió i centrifugar a 12000 xg durant 2 min. Transferir la fase aquosa (superior) a un nou tub eppendorf.
9. Afegir-hi un volum igual de la solució de cloroform:alcohol isoamílic (24:1). Barrejar agitant

- amb el vòrtex per a formar una emulsió. Centrifugar a 12000 xg durant 30 seg. Transferir la fase aquosa (superior) a un nou tub eppendorf.
10. Precipitar el DNA plasmídic afegint-hi 2,5 volums d'etanol fred (-20°C). Mesclar invertint el tub diverses vegades. Mantenir 30 min a -80°C.
  11. Centrifugar a 12000 xg durant 10 min.
  12. Eliminar el sobrenadant per aspiració.
  13. Afegir-hi 1 mL d'etanol 70 % refredat prèviament a -20°C. Invertir 2-3 vegades el tub.
  14. Centrifugar a 12000 xg durant 5 min.
  15. Eliminar el sobrenadant. Tornar a centrifugar a 12000 xg durant 5-10 seg per concentrar les restes de líquid. Eliminar-les per aspiració.
  16. Deixar assecar el sediment amb el tub obert durant 5-10 min.
  17. La resuspensió del sediment es fa en volums variables (10-50 µL) de TE o aigua Milli-Q, en tots dos casos havent-los prèviament esterilitzats amb l'autoclau. Es pot escalfar a 70°C durant 10 min 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.
  18. Opcionalment es pot resuspendre el sediment amb una solució de RNasa a una concentració de 0,1 mg/mL, per tal d'eliminar les restes d'RNA que inevitablement s'ha purificat conjuntament amb el DNA plasmídic.

### **Solucions necessàries:**

Solució I: Glucosa 50 mM, Tris/HCl 25 mM (pH 8,0), EDTA 10 mM (pH 8,0)

S'esterilitza a l'autoclau a 120°C durant 20 min i s'emmagatzema a 4°C.

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

Aquesta solució es prepara immediatament abans d'utilitzar-la i es parteix d'una solució NaOH 2 N i d'una solució SDS 10 %. Aquestes dues solucions no han d'estar imprescindiblement autoclavades i es poden guardar a temperatura ambient.

Solució III: 60 mL Acetat potàssic 5 M; 11,5 mL d'Àcid acètic glacial; 28,5 mL d'aigua Milli-Q

S'esterilitza a l'autoclau a 120°C durant 20 min i s'emmagatzema a 4°C.

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

Es barregen 25 volums de fenol, amb 24 de cloroform i 1 volum d'alcohol isoamílic.

S'ha partit de fenol preparat comercialment tamponat a pH 8,0 i guardat a 4°C protegit de la llum.

La barrega resultant també es guarda a 4°C i protegida de la llum.

Solució cloroform:alcohol isoamílic (24:1)

Es barregen 24 volums de cloroform amb 1 volum d'alcohol isoamílic.

Solució TE: Tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0

Per preparar aquesta solució es mescla 1 mL d'una solució Tris 1 M (pH 8,0) amb 0,4 mL d'una solució EDTA 0,25 M i s'enrasa amb aigua Milli-Q fins a 100 mL.

La barreja resultant s'esterilitza a l'autoclau a 120°C durant 20 min.

#### Solució de RNasa:

Es prepara a una concentració de 1 mg/mL en aigua Milli-Q estèril. S'aliquota i se submergeix en un bany escalfat anteriorment a 100°C durant 15 min.

Es guarda a -20°C fins al moment del seu ús, que es diluirà a una proporció 1:10 amb aigua Milli-Q estèril.

## **II.3.2. Manipulació del DNA**

### **II.3.2.1. Electroforesi de DNA en gels d'agarosa**

Aquesta tècnica s'ha utilitzat en aquest treball per analitzar preparacions de DNA plasmídic, productes de digestió amb enzims de restricció i productes de PCR, a més de ser l'etapa preliminar per a la purificació del DNA (apartat II.3.2.2) i un mètode excel·lent d'estimació de la concentració de DNA (apartat II.3.2.4).

Per a la preparació dels gels s'ha utilitzat agarosa de baixa electroendòsmosi (Ecogen, Espanya) i els equips MT-1001 i MT-1002 (Ecogen) que permeten preparar gels de grandàries: 6,5 cm x 8 cm i 15 cm x 11 cm, respectivament. El percentatge d'agarosa per a la preparació dels gels ha oscil·lat sempre entre un 0,8 % i un 1,4 % en amortidor Tris-acetat-EDTA (TAE), depenent de les necessitats experimentals (percentatges elevats per a fragments petits de DNA).

El procediment per a la preparació del gel es detalla a continuació:

1. Pesar la quantitat necessària d'agarosa d'acord amb el percentatge final desitjat del gel i dipositar-ho en un contenidor de tipus erlenmeyer.
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 (TAE x50) 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 de la solució 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 a la formació de les butxaques, cal anar amb compte que no es



formin bombolles que podrien interferir en el posterior recorregut de les mostres.

Composició de l'amortidor TAE x50 (1 litre):

Tris-base	242 g
àcid acètic glacial	57,1 mL
EDTA	18,6 g
aigua destil·lada	fins a 1 L

No és necessari ajustar el pH. La solució de treball (x1) té la composició final següent:

Tris/acetat 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3

- Deixar gelificar l'agarosa, procés que pren més temps com menor sigui el percentatge d'agarosa del gel. Mentre està gelificant es prepara l'amortidor d'elució diluint l'amortidor concentrat (TAE x50) utilitzat en la preparació del gel en aigua Milli-Q.

El volum de gel i el d'amortidor d'elució per a cadascun dels models de l'equip d'electroforesi utilitzats foren els següents:

Model de l'equip	Volum de gel	Volum d'amortidor
MT-1001	50 mL	500 mL
MT-1002	100 mL	1000 mL

#### Procediment per a la càrrega del gel i condicions d'electroforesi:

- Afegir a les mostres que es volen carregar 1/10 (v/v) d'amortidor de càrrega x10. Opcionalment, les mostres es poden escalfar a 70°C durant 10 minuts refredant-les a continuació en gel picat.

Composició de l'amortidor de càrrega x6 (100 mL):

glicerol	30 mL
blau de bromofenol (BPB) (Merck)	250 mg
Xilen cianol (XC) (Eastman Kodak)	250 mg
aigua Milli-Q	fins a 100 mL

La composició de treball (x1) és la següent: glicerol 5 %, BPB 0,042 % i XC 0,042 %

- Carregar les mostres a les butxaques. Juntament amb les mostres es carreguen els marcadors de massa molecular adequada segons els requeriments de cada cas. Els marcadors emprats foren els subministrats per les cases comercials Boehringer Mannheim (Alemanya) i New England Biolabs (EUA). Aquests marcadors se subministren dissolts sense amortidor de càrrega per la qual cosa s'han de diluir en un volum igual d'amortidor de càrrega i 8 volums d'aigua Milli-Q o bé amortidor TE. De la dissolució resultant se n'apliquen 10 µL.
- Per a l'electroforesi s'ha utilitzat un voltatge de 80-100 mV. L'electroforesi es perllonga fins que el primer colorant (BPB) assoleix aproximadament 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 un cas s'ha afegit directament a l'agarosa, abans d'abocar-la al motllo, a una concentració final de 0,5 µg/mL. D'aquesta manera els àcids nucleics es tenyeixen durant el procés electroforètic, la qual cosa permet seguir la migració de les bandes durant la realització del mateix. En l'altre cas, procediment alternatiu, s'ha submergit el gel durant 15-30 min en 200 mL de bromur d'etidi a 0,5 µg/mL en el mateix amortidor d'electroforesi i, a continuació, si convé eliminar l'excés de bromur d'etidi se submergeix el gel durant 15-30 min en 200 mL d'una solució de MgSO<sub>4</sub> 1 mM o senzillament aigua destil·lada.
5. Els gels situats sobre un transil·luminador de llum UV es van fotografiar amb una Polaroid MP4+ equipada amb un filtre taronja Wratten 23A i una pel·lícula Polaroid 665. De forma rutinària s'usa una obertura de diafragma de 5,6 i un temps d'exposició de 8 seg.

### II.3.2.2. Purificació de fragments de DNA

L'aïllament d'un fragment de DNA de doble cadena lineal, provinent d'una digestió d'un vector amb enzims de restricció és una etapa imprescindible per a moltes manipulacions posteriors que s'han dut a terme en aquest estudi com ara digestions amb altres enzims, lligaments, seqüenciació i amplificacions per PCR. Depenent de la longitud dels fragments de DNA a purificar, s'ha utilitzat el sistema GeneClean<sup>®</sup> o bé el MERmaid<sup>®</sup>, ambdós subministrats per BIO101 Inc. (EUA).

El GeneClean<sup>®</sup> és un mètode molt vàlid per purificar DNA de cadena senzilla o doble de més de 200 pb, ja sigui a partir d'un gel d'agarosa, o bé directament de la solució en la qual es troba. És molt útil tant per deixar fragments de DNA a punt de ser sotmesos a un procés de lligament, com per aconseguir DNA plasmídic sencer d'un grau de puresa suficient per a qualsevol manipulació delicada, com la seqüenciació o l'amplificació per PCR d'una regió del plasmídi. Els passos següents per dur a terme una purificació amb GeneClean<sup>®</sup> es detallen a continuació:

1. Carregar les mostres en un gel d'agarosa utilitzant TAE com amortidor d'electroforesi. L'ús de TBE com a amortidor s'ha vist que repercuteix negativament en el rendiment de la recuperació.
2. Es tenyeix el gel amb bromur d'etidi com d'ha descrit en l'apartat II.3.2.1.
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 a 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 el tub eppendorf que conté la banda i afegir-hi solució saturada de NaI a una relació de 3 mL per cada gram de banda d'agarosa.
5. Submergir el tub eppendorf en un bany escalfat anteriorment a 55°C, fins que tota l'agarosa es fonguï (5-10 min).
6. Per recomanació de la casa comercial, és aconsellable afegir 10 µL d'una solució d'àcid acètic glacial al 10% (v/v) 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 boletes de vidre.
7. Afegir a continuació 5 µL de la suspensió de boletes de vidre. Agitar amb l'ajut d'un vòrtex uns segons i tot seguit mantenir en gel picat durant 5 min, agitant amb vòrtex cada 1-2 min.
8. Centrifugar 5 seg a 12000 xg per acumular les boletes de vidre a la part inferior del tub. Descartar el sobrenadant per aspiració amb una pipeta pasteur.
9. A continuació rentar 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 seguidament centrifugar durant 5 seg i descartar el sobrenadant. Aquests rentats eliminen les sals i altres compostos que podrien inhibir alguns enzims.
10. Després del tercer rentat afegir al sediment 10-20 µL d'amortidor TE o aigua Milli-Q autoclavada. Resuspendre amb cura amb una pipeta automàtica i incubar a 45-55°C durant 2-3 min per tal que el DNA s'elueixi de les boletes de vidre. No és aconsellable agitar amb vòrtex perquè el sediment es pot distribuir per la paret del tub, cosa que fa la seva recuperació molt difícil degut al petit volum que es manipula.
11. Centrifugar durant 3-4 min a 12000 xg. El sobrenadant, on es troba el DNA, es transvasa a un nou tub eppendorf estèril.
12. Opcionalment, i per aconseguir un major rendiment, es poden repetir els passos 10 i 11. Les dues elucions s'ajuntaran en un mateix tub.

Aquest mètode s'ha utilitzat també per a la purificació del DNA en solució quan es duïen a terme digestions dobles en les quals les condicions òptimes no eren compatibles per a tots dos enzims. Aleshores, la segona digestió anava sempre precedida d'aquesta purificació. En aquest cas, cal seguir el protocol anterior a partir del punt 7 havent prèviament afegit 3 volums de la solució saturada de NaI a la solució de DNA.

El MERmaid<sup>®</sup> suposa un sistema de purificació completa i ràpida de fragments de DNA de baix pes molecular (entre 10 i 200 pb), tant de cadena senzilla com de cadena doble. Es pot partir tant de DNA en solució com de DNA contingut en un fragment

d'agarosa, a l'igual que el GeneClean<sup>®</sup>. En aquest treball s'ha utilitzat per a la purificació, a partir de gels d'agarosa, de fragments de DNA resultants d'una amplificació per PCR que no assolien els 200 parells de bases. Els passos seguits per dur a terme una purificació amb MERmaid<sup>®</sup>, que són similars als seguits pel GeneClean<sup>®</sup>, es detallen a continuació:

1. Determinar la massa del fragment d'agarosa retallat on es troba el DNA. Afegir-hi la solució salina de perclorat sòdic (*High Salt solution*) a una relació de 3 mL per cada gram de banda d'agarosa. Agitar amb l'ajut del vòrtex fins que tota l'agarosa estigui dissolta.
2. Agitar amb el vòrtex el tub que conté la solució de boletes de vidre durant una estona per tal que aquestes es resuspenguin. Afegir-ne 8 µL per cada µg de DNA al tub on aquest es troba dissolt. Incubar a temperatura ambient durant 5-15 min. Durant aquest període d'unió del DNA a les boletes de vidre, és convenient que dugui a terme una agitació constant del tub, mitjançant un vòrtex ja que d'aquesta manera s'aconsegueix una major eficiència d'unió de fragments curts de DNA.
3. Centrifugar a 12000 xg durant uns segons i descartar completament el sobrenadant.
4. A continuació rentar 3 vegades el precipitat amb 0,3 mL de la solució alcohòlica. En cada rentat resuspendre el precipitat amb l'ajut del vòrtex per seguidament centrifugar durant 5 seg i descartar el sobrenadant.
5. Després del tercer rentat resuspendre el sedíment amb 5-20 µL d'aigua Milli-Q autoclavada i incubar a 45-55°C durant 5 min.
6. Centrifugar durant 3 min a 12000 xg. El sobrenadant, on es troba el DNA, es transvasa a un nou tub eppendorf estèril.
7. Opcionalment, i per aconseguir un major rendiment, es poden repetir els passos 5 i 6.

### II.3.2.3. Concentració del DNA

Sovint ha estat necessari concentrar el DNA resultant de qualsevol de les manipulacions descrites en aquest treball. Els procediments vàlids per dur-ho a terme són varis.

En primer lloc, es pot optar per un GeneClean<sup>®</sup>, tot resuspenent a l'etapa final amb un volum inferior a l'inicial. Aquest mètode presenta l'avantatge que dona DNA molt pur en un temps relativament curt, però té el desavantatge que, inevitablement, es perd una mica de mostra (tot i que en molts casos aquesta pèrdua no és massa significativa).

Un altre mètode pot ser la precipitació del DNA, prèvia extracció amb fenol o cloroform, afegint 0,1 volums d'acetat sòdic 3 M i 3 volums d'etanol, per al final

resuspendre amb un petit volum d'aigua Milli-Q o amortidor TE. En determinades ocasions, com ara després d'una amplificació per PCR, s'ha utilitzat la poliacrilamida com a *carrier* per a la precipitació dels fragments de DNA (apartat II.5.2).

Sovint, també s'ha concentrat el DNA sotmetent-lo a un rotovapor o Speed-Vac, connectat a una bomba de buit per tal de reduir el volum de la mostra que contenia el DNA.

#### II.3.2.4. Estimació de la concentració del DNA

Per a fer una 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. 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, de 40 µg/mL per a un DNA de cadena senzilla o de 20 µg/mL per a un oligonucleòtid. Partint d'aquestes equivalències i de la mesura d'absorbància de la solució, es pot estimar la concentració de DNA per a una dissolució determinada.

##### Estimació per electroforesi en gel 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 necessitat de determinar la massa molecular d'un fragment, juntament amb poca disponibilitat de mostra, fan més pràctica 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 realitzar una electroforesi analítica (apartat II.3.2.1) de la dissolució de DNA de la qual es vol fer l'estimació de concentració, tenint en compte el volum aplicat. La intensitat de la banda es compara amb la de les bandes dels marcadors més propers, atès que es pot calcular quina quantitat de DNA hi ha en cada una de les bandes dels marcadors.



### II.3.2.5. Amplificació de DNA mitjançant PCR

En la realització d'aquest treball, la reacció en cadena de la polimerasa (PCR, de l'anglès *Polymerase Chain Reaction*), ha estat utilitzada per a l'amplificació, sempre que ha calgut, de les diferents construccions gèniques clonades en pUC119, utilitzant com a encebadors els coneguts com *Forward Universal Primer* (FUP) i *Reverse Universal Primer* (RUP), que reconeixen zones situades als extrems de la zona de clonatge múltiple (*polycloning site*) d'aquest vector. La polimerasa de DNA utilitzada ha estat la *Deep Vent*<sup>®</sup> (New England Biolabs, EUA), amb activitat correctora 3'→5'. A banda de la mera amplificació, la tecnologia que envolta la PCR ha estat també utilitzada en aquest estudi, tal i com es veurà més endavant, per a la seqüenciació de DNA i la mutagènesi dirigida per oligonucleòtid. Cada cas requereix unes condicions diferents, però a continuació es descriu el procés general seguit per amplificar fragments de DNA inserits al plasmidi de clonatge pUC119:

#### Barreja de la reacció:

<i>Vent Buffer</i> x10	10 µL
dNTPs 10 mM (0,2 mM final)	2 µL
dsDNA motllo (50-100 ng pUC119+ insert)	10 µL
Encebador universal FUP (20 pmol)	5 µL
Encebador universal RUP (20 pmol)	5 µL
Aigua Milli-Q autoclavada	68 µL
<i>Deep Vent</i> <sup>®</sup> DNA polimerase (1 unitat)	0,5 µL
Oli mineral	40 µL

Els components indicats es dispensen en un tub per a termociclador, en condicions d'asèpsia i preferiblement en un bany de gel. El volum final de les barreges de reacció és sempre de 100 µL, cosa que s'aconsegueix, si cal, variant el volum de l'aigua Milli-Q. L'últim component en afegir-se ha de ser la polimerasa de DNA, ja que pel fet de tenir activitat exonucleasa podria degradar els encebadors abans d'iniciar-se el programa del termociclador. Tan bon punt s'ha afegit la polimerasa, es dispensa l'oli mineral i el tub es posa al termociclador, ja a 94°C.



### Programa del Termociclador:

1 min a 94°C

Repetició de 30 cicles:

1 min 15 seg a 94°C (desnaturalització)

1 min a 55°C (aparellament)

1 min a 72°C (extensió)

5 min a 72°C (extensió final)

Indefinidament a 4°C

Cal assenyalar que aquestes han estat les condicions de partida, però en casos puntuals, si ha calgut, s'han variat les proporcions d'encebadors i DNA motllo, així com també la temperatura de l'etapa d'aparellament. El producte de la reacció és tractat com s'indica més endavant (apartat II.5.2).

### **II.3.2.6. Tractament amb enzims de restricció**

Les condicions generals d'ús dels enzims de restricció han estat les següents:

- La quantitat de DNA a digerir ha oscil·lat entre 0,2 i 10 µg, depenent de si el propòsit de la digestió era analític o preparatiu. En qualsevol cas, la relació entre enzim i DNA ha estat sempre superior a 1 U/µg de DNA però mai més de 25 U/µg de DNA.
- El volum total de la digestió ha variat entre 10 i 25 µL, depenent de si la digestió havia de ser amb un o dos enzims de restricció i de si es tractava d'una digestió amb finalitat analítica o preparativa.
- El volum d'enzim de restricció addicionat no ha estat mai superior al 10% del volum final de la digestió. Això és degut al fet que els enzims de restricció són subministrats en solucions de glicerol al 50% i per a molts d'ells, una concentració de glicerol superior al 5% els fa perdre l'activitat de reconeixement. Aquesta pèrdua d'especificitat, coneguda com a activitat *star*, també es pot donar quan la concentració d'enzim respecte la de DNA és massa elevada (>25 U/µg de DNA).
- Els amortidors dels enzims de restricció, que se subministren acompanyant cada enzim, vénen en una presentació x10 (per raons de conservació i emmagatzement). Per tant, cal afegir-ne 0,1 volums respecte al volum total de la digestió. Per acabar d'arribar al volum desitjat es pot afegir aigua Milli-Q autoclavada (però mai cap amortidor que contingui EDTA, ja que pot inactivar alguns enzims).
- Les digestions amb dos enzims alhora s'han dut a terme només quan eren absolutament compatibles (mateix amortidor, temperatura, etc). Quan ha calgut dur a terme digestions dobles en què les condicions òptimes no eren compatibles per a tots dos enzims, aleshores, la segona digestió ha anat

- sempre precedida d'una purificació pel sistema GeneClean<sup>®</sup> (apartat II.3.2.2).
- La temperatura d'incubació ha estat sempre de 37°C.
  - El temps d'incubació ha estat normalment 2-6 h, tret dels casos en què era convenient una digestió completa, amb finalitat preparativa, o bé que s'utilitzaven dos enzims alhora. En aquests casos, la incubació s'ha perllongat fins a un màxim de 12 h.

Els enzims de restricció utilitzats es presenten en la TAULA II.2:

**TAULA II.2** - Enzims de restricció utilitzats en aquest treball

Enzim	Casa comercial <sup>a</sup>	Amortidor	Seqüència diana
<i>Hin</i> dIII	Boehringer Mannheim	B	A↓AGCTT
<i>Xba</i> I	Boehringer Mannheim	H	T↓CTAGA
<i>Bam</i> HI	Boehringer Mannheim	B	G↓GATCC
<i>Sal</i> I	Boehringer Mannheim	H	G↓TCGAC

<sup>a</sup> La concentració x1 dels amortidors de digestió utilitzats, que han estat els subministrats per la pròpia casa comercial en solucions concentrades x10, és la següent: Amortidor B: Tris/HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 100 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, pH 8,0. Amortidor H: Tris/HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 100 mM, ditioeritritol 1 mM, pH 7,5.

## II.4. Clonatge en plasmidis

Els mètodes de clonatge han estat utilitzats en aquest treball pel:

- Subconatge del gen de la RNasa A des de pBXR a pUC119, a través de les dianes de restricció *Hin* dIII i *Xba* I, per dur a terme el procés de mutagènesi dirigida per oligonucleòtid.

- Clonatge del gen de la RNasa A mutat, després del procés de mutagènesi, a pUC119, a través de les dianes *Hin* dIII i *Bam* HI, per tal de ser seqüenciat.

- Subclonatge del gen de la RNasa A mutat des de pUC119 a pET22b(+), a través de les dianes de restricció *Hin* dIII i *Xba* I, per poder ser expressat a la soca d'*E. BL21(DE3)*.

### II.4.1. Reacció de lligament

En aquest treball, la tècnica de lligament s'ha utilitzat per inserir fragments de DNA amb extrems cohesius, que contenen el gen de la RNasa A, en vectors plasmídics (pUC119 i pET22b(+)). Les condicions generals de lligament seguides han estat les següents:

1. Digerir el vector i el DNA forani amb els enzims de restricció adients i purificar-los a partir d'electroforesi en gels d'agarosa pel sistema Geneclean<sup>®</sup> (apartat II.3.2.2), resuspenent el DNA en aigua Milli-Q o en un amortidor que no contingui EDTA.
2. En l'amortidor de la lligasa, barrejar els fragments de DNA que es volen lligar. Idealment, s'aconsella que la concentració sigui 1 pmol/mL de DNA del vector per 4 pmols/mL de DNA de l'insert, quan els extrems són cohesius i 0,5 pmols/mL quan aquests són llisos. L'amortidor de la lligasa pot ser variable pel que fa a les concentracions dels seus components i fins i tot en la composició. S'ha utilitzat l'amortidor que subministra Boehringer Mannheim acompanyant la lligasa de DNA de T4. Aquest amortidor, que ve en una presentació x10 (Tris/HCl 660 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, ditioeritritol 10 mM, ATP 10 mM, pH 7,5) i és recomenable guardar en aliquotes de 5-10 µL a -20°C, s'afegeix a una relació de 0,1 volums respecte al volum total del lligament.
3. La mescla de lligament s'escalfa a 65°C durant 10 min i a continuació es refreda en gel. Aquest 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, l'ATP s'hi troba inclòs.
4. Afegir la lligasa de DNA de T4 a una proporció de 0,1-0,5 U/µg de DNA. El volum total de la

reacció de lligament ha estat sempre de 10  $\mu$ L i s'ha utilitzat aigua Milli-Q autoclavada per acabar d'arribar a aquest volum.

5. Incubar la reacció de lligament a 16°C durant 15-20 h. Sovint, sobretot per a extrems cohesius, es pot treballar amb concentracions més elevades de lligasa (fins a 5 U/ $\mu$ g de DNA) i, d'aquesta manera, escurçar el temps d'incubació fins a 2-4 h i realitzar-se a temperatura ambient. S'ha constatat durant el treball que aquestes condicions funcionen igualment bé alhora que redueixen el risc de degradació dels components de la mescla.
6. Aquesta barreja pot utilitzar-se directament per a transformar cèl·lules competents sense haver d'inactivar la lligasa per calor. S'aconsella no utilitzar mai tota la mescla del lligament en una única transformació. En el cas que no es pensi utilitzar immediatament, es pot guardar a -20°C. Paral·lelament es prepara un control negatiu del lligament (control de relligament) amb tots els components de la reacció de lligament però sense insert. Amb aquesta barreja es transformen simultàniament cèl·lules competents, comprovant que la recircularització del vector sigui nul·la o molt baixa.

#### II.4.2. Obtenció de cèl·lules competents

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 CaCl<sub>2</sub> fredes. Cal fer esment que les cèl·lules bacterianes només incorporen de forma estable per transformació molècules de DNA de doble cadena circulars. S'han preparat cèl·lules competents d'*E. coli* de les soques TG1 i BL21(DE3) de la manera que es detalla a continuació, mantenint en tot moment les màximes garanties d'esterilitat:

1. Incubar 3 mL de medi líquid LB, inoculats a partir d'una colònia de la soca desitjada crescuda en placa o d'una fracció de glicerinat, durant 12 h a 37°C i 250 r.p.m.
2. L'endemà, inocular 1 mL del cultiu O/N en 100 mL de medi líquid LB fresc. Aquest cultiu es deixa créixer fins assolir un valor d'Abs a 550 nm de 0,5 unitats de densitat òptica, per agitació constant a 250 r.p.m. a 37°C.
3. Deixar reposar el cultiu en gel durant 30 min.
4. Centrifugar a 5000 xg i 4°C durant 10 min.
5. Resuspendre el sediment cel·lular en 100 mM CaCl<sub>2</sub>, amb la meitat del volum original (en aquest cas 50 mL) i deixar reposar en gel picat durant 1 h.
6. Centrifugar a 5000 xg i 4°C durant 10 min i descartar el sobrenadant.
7. Resuspendre les cèl·lules en 1/4 del volum original amb dissolució de CaCl<sub>2</sub> 50 mM refredada en gel picat. Deixar 1 h en gel.

8. Tomar a centrifugar a 5000 xg i 4°C durant 10 min i descartar el sobrenadant.
9. Resuspendre les cèl·lules amb 1/15 del volum original (aproximadament 6,7 mL) amb dissolució de CaCl<sub>2</sub> 50 mM refredada en gel picat. Deixar 1 h en gel.
10. Afegir glicerol fins arribar a una concentració final del 15 % (1,5 mL de glicerol 80 %). Distribuir en alíquotes de 100 µL en tubs eppendorfs refredats prèviament i conservar les cèl·lules competents a -80°C.

Aquest protocol permet obtenir unes 80 alíquotes de 100 µL i es pot escalar a partir de volums de cultiu més grans. En qualsevol cas el volum de dissolució de CaCl<sub>2</sub> utilitzat en les diferents resuspensions ha de mantenir les proporcions exposades respecte al volum de cultiu original.

### II.4.3. Transformació de cèl·lules competents

El procés d'incorporació de DNA forani present en el medi per part de les cèl·lules bacterianes competents, és el que s'anomena transformació. Les cèl·lules competents, preparades com s'ha descrit anteriorment, poden ser transformades amb DNA provinent d'un lligament o d'una obtenció minipreparativa de DNA plasmídic. El procediment seguit ha estat el que es descriu a continuació:

1. Si es fan servir cèl·lules competents congelades a -80°C es descongelen les alíquotes necessàries segons el número de transformacions que s'hagin de fer, transferint els tubs eppendorfs a gel picat.
2. Afegir a cada fracció de cèl·lules competents (100 µL), un màxim de 50 ng de DNA en un volum que no sobrepassi 1/10 del volum de la fracció o alíquota. Agitar suaument per tal de mesclar bé la solució del DNA amb la de les cèl·lules.
3. Incubar els tubs en gel durant 10 min.
4. Transferir els tubs eppendorfs a un bany a 42°C durant 2 min.
5. Incubar els tubs en gel durant 10 min més.
6. A continuació, afegir 0,2-1 mL de medi LB fresc a cada tub eppendorf i incubar a 37°C en agitació suau com a mínim durant 45 min.
7. Sembrar alíquotes de 0,1-0,2 mL en plaques de LB-agar suplementades amb ampicil·lina 50 µg/mL per la qual els vectors que s'estan manipulant (pUC119 i pET22b(+)) proporciona resistència.
8. Incubar les plaques a una estufa a 37°C fins que s'observin colònies transformants (12-15 h). Cal evitar incubacions massa llargues per tal que no apareguin colònies satèl·lit que dificultarien la selecció dels transformants.

En totes les transformacions realitzades s'han inclòs dos controls:

- D'una banda, una alíquota de les cèl·lules competents utilitzades a la qual es va afegir 10  $\mu$ L d'aigua o TE se sembra en una placa com les descrites anteriorment. En aquesta placa no hi ha de créixer cap colònia. En cas contrari, indicaria contaminació de les cèl·lules competents.
- En segon lloc, se sembra el mateix que en el cas anterior, però en una placa de medi que no contingui l'antibiòtic. Hi ha d'aparèixer una capa confluent de cèl·lules bacterianes. Altrament, significaria que les cèl·lules competents estaven mortes.

A més d'aquests dos controls, en el cas de les transformacions amb mescles de lligament s'han inclòs dos controls addicionals:

- Una alíquota de les cèl·lules competents transformada amb vector sense tallar, circular, se sembra en una placa de medi amb ampicil·lina. En aquesta placa han d'aparèixer nombroses colònies transformants. En cas contrari indicaria que les cèl·lules que estem utilitzant tenen un nivell baix de competència.
- Una alíquota transformada amb la barreja de lligament sense el DNA forani (insert), anomenada control de relligament, se sembra en una placa de medi amb ampicil·lina. Hi hauria d'aparèixer un nombre significativament menor de colònies transformants que en la transformació amb barreja de lligament del vector i de l'insert. En cas contrari indicaria que el vector emprat no estava correctament digerit amb els dos enzims diferents que generen extrems cohesius.

#### **II.4.4. Selecció de colònies transformants**

Una vegada s'han obtingut colònies transformants, cal seleccionar aquelles que són portadores del vector amb l'insert, ja que hi ha la possibilitat que hi hagi alguna reacció de relligament del vector sense que s'hagi incorporat el fragment de DNA que es volia insertar. També hi ha la possibilitat que s'hagi incorporat més d'un insert al vector, de manera que cal fer una anàlisi del DNA per tal de detectar aquestes reaccions anòmales que impossibilitarien, a la llarga, l'expressió de la proteïna desitjada. Amb aquesta finalitat, es fa una extracció minipreparativa del DNA plasmídic d'algunes de les colònies aparegudes a la placa després de la transformació, per després sotmetre aquest DNA a una digestió amb un o varis enzims de restricció, per tal d'aclarir la presència de l'insert a la construcció incorporada per les cèl·lules. El producte d'aquesta digestió s'aplica a un gel d'agarosa juntament amb marcadors de massa molecular adequada, i una digestió de vector sense insert digerit amb els mateixos enzims de restricció com a control.



## II.5. Mutagènesi dirigida per oligonucleòtid

La mutagènesi dirigida per oligonucleòtid (SMD, de l'anglès *Site Directed Mutagenesis*) és una poderosa tècnica que permet introduir qualsevol mutació desitjada en una seqüència de DNA coneguda. Aquesta tècnica ens ha permès la consecució de les variants proteiques, a través de la substitució d'unes bases per unes altres amb l'objectiu de modificar residus concrets segons les nostres necessitats.

Existeixen diverses tècniques de mutagènesi dirigida, però la que millor resultats ha donat en el nostre grup, ha estat una de les variants de SMD descrita per Landt i col. (1990) que aprofita la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) utilitzant dsDNA com a motlle, amb una modificació introduïda per Juncosa-Ginestà i col. (1994) consistent en la utilització d'una polimerasa de DNA amb activitat correctora 3'→5', la *Deep Vent*® DNA polimerase (New England Biolabs, EUA).

### II.5.1. Disseny d'oligonucleòtids

Els oligonucleòtids han estat dissenyats en cada cas per optimitzar l'eficiència de mutagènesi. Aquest pas és molt important, atès que un error en el disseny de l'oligonucleòtid s'arrossegarà durant les etapes següents, i pot no ser visible fins que es dugui a terme la seqüenciació de la construcció resultant. Totes les mutacions s'han introduït en un fragment de DNA (gen de la RNasa A salvatge o del mutant Y115W, en el qual la posició 115 codifica un residu de Trp enlloc d'un de Tyr) clonat en el vector pUC119, de manera que s'ha treballat indistintament amb qualsevol de les dues cadenes que formen aquest plasmidi.

Es tracta de dissenyar oligonucleòtids que tinguin una seqüència complementària a una de les cadenes de la construcció que es vol mutar, excepte en el punt d'incorporació de la mutació desitjada. Les mutacions que s'han dissenyat en aquest treball han afectat a una, dues o tres bases, depenent dels casos, d'un mateix codó, de manera que el gen mutat codifiqui la proteïna substituïda en un únic residu.

Pel que fa a la longitud dels oligonucleòtids, si la mutació afecta a una sola base, n'hi ha prou amb què l'oligonucleòtid tingui una longitud de 21 bases, amb la mutació centrada. 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 banda i banda de la regió de mutació. En aquest treball, la longitud dels oligonucleòtids ha oscil·lat entre les 32 i 39 bases. S'ha evitat la presència d'adenina a l'extrem 3' de l'oligonucleòtid

dissenyat, atès que la seva presència pot incrementar els problemes de degradació d'aquest per part de la polimerasa de DNA *Deep Vent*<sup>®</sup>, la qual, pel fet de tenir activitat exonucleasa 3'→5' pot degradar els encebadors abans d'iniciar-se el programa del termociclador. Pel que fa a la longitud de cada braç s'ha ajustat de manera que la temperatura teòrica d'hibridació sigui aproximadament 42°C d'acord amb la fórmula següent:

$$T_H = 4 (n^o G+C) + 2 (n^o A+T) - 3$$

Els oligonucleòtids dissenyats d'aquesta manera han estat subministrats per Boehringer Mannheim (MWG-Biotech, Syntesis Lab., Alemanya) de manera liofilitzada. Aquests, es resuspenen amb 200 µL d'aigua Milli-Q autoclavada i es realitza una determinació espectrofotomètrica de la seva concentració per dilució 1/100 i prenent la relació entre unitats de densitat òptica i concentració de DNA que dona la casa comercial.

### II.5.2. Mètode SDM per PCR

Com ja s'ha dit anteriorment, totes les variants de la RNasa A produïdes en aquest treball s'han realitzat per mutagènesi dirigida per oligonucleòtid mitjançant la reacció de la polimerasa. Es tracta d'un sistema prou ràpid (3-4 dies) que permet treballar amb DNA de plasmidi (de doble cadena), cosa que facilita totes les etapes preliminars encaminades a l'obtenció de DNA motllo.

El procediment general per a l'obtenció dels mutants per PCR que s'ha seguit en aquest treball és el que s'indica tot seguit:

Es parteix del DNA motllo, que correspon al fragment que es vol mutar (gen de la RNasa A o del mutant Y115W), inserit en un vector adequat (pUC119) per al qual es tenen dos oligonucleòtids que s'hibriden a cadascun dels extrems del seu lloc de clonatge múltiple, a cadenes diferents (encebadors universals: RUP i FUP). En una 1a PCR s'amplifica una part del fragment inserit, la compresa entre les regions a les que s'hibriden l'encebador mutagènic i un dels encebadors universals. Una de les cadenes del producte obtingut d'aquesta 1a PCR, degudament purificat tal com s'explicarà més endavant, servirà com a encebador per a una 2a PCR, en la qual el DNA motllo segueix essent el vector que porta incorporat el fragment a mutar, i l'altre encebador és l'universal contrari al que s'ha utilitzat en la 1a PCR. El producte final de la 2a PCR és

purificat per ser posteriorment digerit amb dos enzims de restricció i inserit a un vector de clonatge (pUC119) amb el qual es transformen cèl·lules competents d'*E. coli*.

A continuació es detallen els programes del termociclador utilitzats per a la realització de la 1a i 2a PCR, així com també les concentracions dels diferents components de la barreja de reacció. Cal notar que les dues reaccions són molt semblants, i que la diferència principal és la utilització d'encebadors diferents.

### 1a PCR

#### Barreja de la reacció:

<i>Vent Buffer</i> x10	10 µL
dNTPs 10 mM (0,2 mM final)	2 µL
dsDNA motllo (50-100 ng pUC119+insert)	10 µL
Encebador universal (20 pmol de FUP o RUP)	5 µL
Encebador mutagènic (20 pmol)	5 µL
Aigua Milli-Q autoclavada	68 µL
<i>Deep Vent</i> <sup>®</sup> DNA polimerase (1 unitat)	0,5 µL
Oli mineral	40 µL

#### Programa del Termociclador:

1 min a 94°C

Repetició de 30 cicles:

1 min 15 seg a 94°C (desnaturalització)

1 min a 55°C (aparellament)

1 min a 72°C (extensió)

5 min a 72°C (extensió final)

Indefinidament a 4°C

### 2a PCR

#### Barreja de la reacció:

<i>Vent Buffer</i> x10	10 µL
dNTPs 10 mM (0,4 mM final)	4 µL
dsDNA motllo (50-100 ng pUC119+insert)	10 µL
Encebador universal (20 pmol de FUP o RUP)	10 µL
Producte purificat de la 1a PCR (la meitat)	5 µL
Aigua Milli-Q autoclavada	60 µL
<i>Deep Vent</i> <sup>®</sup> DNA polimerase (1 unitat)	0,5 µL
Oli mineral	40 µL

#### Programa del Termociclador:

1 min a 94°C

Repetició de 30 cicles:

1 min 15 seg a 94°C (desnaturalització)

1 min 30 seg a 45°C (aparellament)

1 min 15 seg a 72°C (extensió)

10 min a 72°C (extensió final)

Indefinidament a 4°C

Per a totes dues PCR cal dispensar en un tub per a termociclador els components indicats, en condicions d'asèpsia i preferiblement en un bany de gel. El volum final de les barreges de reacció és sempre 100 µL, cosa que s'aconsegueix, si cal, jugant amb el volum d'aigua Milli-Q.

Cal utilitzar sempre l'encebador universal de sentit contrari al mutagènic durant la 1a PCR, i l'altre encebador universal durant la 2a PCR.

L'últim component de la reacció en afegir-se ha de ser la polimerasa de DNA *Deep Vent*<sup>®</sup>, que pel fet de tenir activitat exonucleasa podria degradar els encebadors abans

d'iniciar-se el programa del termociclador. Tan bon punt s'ha afegit la polimerasa, es dispensa l'oli mineral i el tub es posa al termociclador, ja a 94°C.

Aquestes han estat les condicions de partida, però això no vol dir que en casos puntuals no s'hagi hagut de jugar amb les proporcions d'encebadors i DNA motllo, així com amb la temperatura de l'etapa d'aparellament.

#### Purificació del producte d'una PCR

Després de cada PCR cal purificar del producte resultant. Això s'ha fet sempre mitjançant una extracció amb cloroform amb posterior precipitació amb etanol i acetat sòdic utilitzant poliacrilamida com a agent coprecipitant o *carrier*. Aquest mètode, basat en el d'Strauss i Gaillard (1990) és útil tant per a precipitar petites quantitats de DNA (de 100 a 1 ng), com per DNA poc concentrat. El protocol seguit per a la precipitació del producte de la PCR ha estat el següent:

1. Recuperar 90 µL del producte de la PCR sense arrossegar oli mineral (eixugant l'exterior de la punta de la pipeta amb paper assecant si hi queden restes d'oli).
2. Afegir-hi 90 µL d'una barreja de fenol:cloroform:alcohol isoamílic (25:24:1).
3. Agitar en vòrtex fins a formar una emulsió.
4. Centrifugar a 12000 xg durant 5 min.
5. Recuperar 85-90 µL de la fase aquosa (superior) i transferir-la a un nou tub eppendorf.
6. Afegir-hi 9 µL d'acetat sòdic 3 M autoclavat i 8 µL de poliacrilamida 0,25 % preparada com s'indica més avall.
7. Agitar en vòrtex.
8. Afegir-hi 275 µL d'etanol absolut fred i invertir unes quantes vegades.
9. Deixar a -80°C durant 1 h o bé a -20°C durant la nit.
10. Centrifugar a 12000 xg durant 10 min.
11. Eliminar el sobrenadant per aspiració.
12. Rentar el sediment afegint al tub 1 mL d'etanol 70 % fred i invertir el tub dues vegades.
13. Centrifugar a 12000 xg durant 5 minuts.
14. Tornar a eliminar el sobrenadant per aspiració.
15. Deixar assecar el sediment.
16. Resuspendre amb el volum desitjat d'aigua Milli-Q autoclavada (generalment 15 µL) i carregar-ho a un gel d'agarosa (apartat II.3.2.1) a l'1,4 % o bé guardar-ho a -20°C. Posteriorment, es purifica a partir d'agarosa mitjançant el sistema GeneClean<sup>®</sup> o MERmaid<sup>®</sup> (apartat II.3.2.2), depenent de la longitud del fragment amplificat.

El protocol per a la preparació de la solució de poliacrilamida al 0,25 % com a agent coprecipitant per a la precipitació de proteïnes és el següent:

1. Per a un volum final de solució estoc, barrejar:

acrilamida	1,25 g
Tris-base 1 M	1 mL
acetat sòdic 3 M	167 $\mu$ L
EDTA 0,5 M, pH 7,8	100 $\mu$ L
aigua destil·lada	fins a 25 mL

La solució resultant és acrilamida 5 % en Tris 40 mM, acetat sòdic 20 mM, EDTA 2 mM, pH 7,8.

2. Polimeritzar la solució anterior afegint-hi 1/100 volum de persulfat amònic al 10 % i 1/1000 volum de TEMED. Deixar a temperatura ambient durant 30 min, fins a la completa polimerització.
3. Afegir acetat sòdic fins a una concentració final de 0,3 M i precipitar el polímer durant 5 min en gel per addició de 2,5 volums d'etanol absolut fred.
4. Centrifugar el precipitat a 10000  $\times$ g durant 5 min i eliminar el sobrenadant.
5. Rentar el sediment amb etanol 70 % fred, centrifugar i retirar el sobrenadant.
6. Deixar assecar el sediment i dissoldre'l amb aigua destil·lada fins a una concentració final de 0,25 %. És convenient guardar aquesta solució de treball en alíquotes i a -20°C.

Una vegada purificat el producte de la 2a PCR, que suposadament conté el gen de la RNasa A amb la mutació incorporada, i el vector pUC119 seleccionat per al seu clonatge se sotmeten a digestió amb els enzims de restricció *Hin* dIII i *Bam* HI. La barreja de cada digestió es carrega a un gel d'agarosa a l'1,4 % per posteriorment purificar, a partir d'agarosa mitjançant el sistema GeneClean<sup>®</sup>, la banda corresponent a cada producte digerit. Finalment, es procedeix al lligament corresponent i amb el qual es transformen cèl·lules competents d'*E. coli* de la soca TG1 que se sembren en plaques LB-agar + Ap. D'entre les colònies transformants obtingudes, se seleccionen les que han incorporat correctament la mutació, cosa que es comprova per seqüenciació del DNA.

## II.6. Seqüenciació de DNA

La seqüenciació del DNA corresponent al gen de la RNasa A mutat ha estat el mètode que ha permès validar els diferents clons obtinguts, després del procés de mutagènesi dirigida. El mètode seguit ha estat el mètode enzimàtic de Sanger (Sanger i col., 1977; Sanger i Coulson, 1978), també anomenat del dideoxi, i s'ha utilitzat dsDNA com a DNA motllo (pUC119+insert). Per a la detecció de les cadenes de DNA s'ha utilitzat la seqüenciació manual amb tinció de nitrat de plata, que havia estat prèviament posada a punt en el nostre laboratori per Canals (1997), o la seqüenciació automàtica, la qual s'ha realitzat en el Servei de Seqüenciació de la Facultat de Veterinària del Departament de Bioquímica de la Universitat Autònoma de Barcelona, amb un seqüenciador Applied Biosystems 373 A.

A continuació es descriu breument la preparació del DNA a seqüenciar i les etapes d'aquest procés de seqüenciació:

1. Extracció de DNA plasmídic (pUC119+insert) del clon seleccionat (apartat II.3.1.1).
2. Carregar-lo a un gel d'agarosa (apartat II.3.2.1) i purificar el dsDNAcc mitjançant el sistema GeneClean<sup>®</sup> (apartat II.3.2.2).
3. Amplificació de la zona corresponent al lloc de clonatge múltiple del vector pUC119+insert a seqüenciar mitjançant PCR (apartat II.3.2.5).
4. Purificació del producte amplificat de la PCR (apartat II.5.2).
5. Reacció de seqüenciació cíclica seguint el protocol descrit per Canals (1997) i utilitzant com a DNA motllo el producte de l'apartat anterior i l'encebador universal (RUP).
6. Electroforesi de DNA en gel de poliacrilamida-urea (Canals, 1997).
7. Tinció del gel de seqüenciació amb nitrat de plata (Canals, 1997).

Els passos 3,4,5,6 i 7 s'han seguit només per preparar el DNA que havia de ser seqüenciat manualment.



## II.7. Mètodes de treball amb proteïnes

### II.7.1. Obtenció de la Ribonucleasa A no recombinant

La RNasa A no recombinant utilitzada en la realització d'aquest treball s'ha obtingut per purificació de la RNasa pancreàtica bovina comercial de Sigma Chemical Company (EUA) mitjançant cromatografia de bescanvi iònic seguint el mètode descrit per Alonso i col. (1986). Aquest mètode suposa la realització d'una cromatografia de bescanvi catiònic emprant una reïna de tipus CM-Sepharose CL-6B (Pharmacia, Suècia). L'equip cromatogràfic a pressió atmosfèrica estava constituït per una bomba peristàltica LKB P-1 i un col·lector de fraccions RediFrac (Pharmacia Biotech, Suècia). El seguiment del perfil cromatogràfic s'ha fet per mesures d'absorció a l'ultraviolat emprant un espectrofotòmetre Milton Roy Spectronic 3000 Array (EUA) o un CECIL CE6602 (Anglaterra). Aquests equips són els que s'han utilitzat al llarg d'aquest treball, en tots els cromatogrames a pressió atmosfèrica que es descriuran més endavant. Així mateix, totes les cromatografies descrites s'han portat a terme a temperatura ambient.

Per a la purificació de la RNasa A, es dissol 1 g de RNasa comercial en 40 mL (1,83 mM) d'amortidor Tris/HCl 15 mM, pH 8,0, i s'aplica la mostra a una columna empaquetada amb la reïna abans esmentada. Les característiques i condicions d'aquesta cromatografia s'indiquen a continuació:

Dimensions columna:	2,5 x 60 cm
Volum:	250 mL
Flux:	80 mL/h
Fraccions recollides:	4,5 mL
Amortidor d'equilibrat:	Tris/HCl 15 mM, pH 8,0 (500 mL)
Volum de mostra:	40 mL
Amortidor de rentat:	Tris/HCl 15 mM, pH 8,0 (100 mL)
Gradient:	0-0,17 M de NaCl en Tris/HCl 15 mM, pH 8,0 (600mL+600mL)
Enregistrament:	280 nm

En la FIGURA II.2 es presenta el perfil d'elució enregistrat a partir de la lectura d'absorbància a 280 nm. La RNasa A s'elueix en un pic majoritari al final del gradient, aproximadament a un valor de conductivitat de 12 mS. El pic minoritari que apareix en el cromatograma correspon a la mateixa RNasa A amb diferents graus de glicosilació.

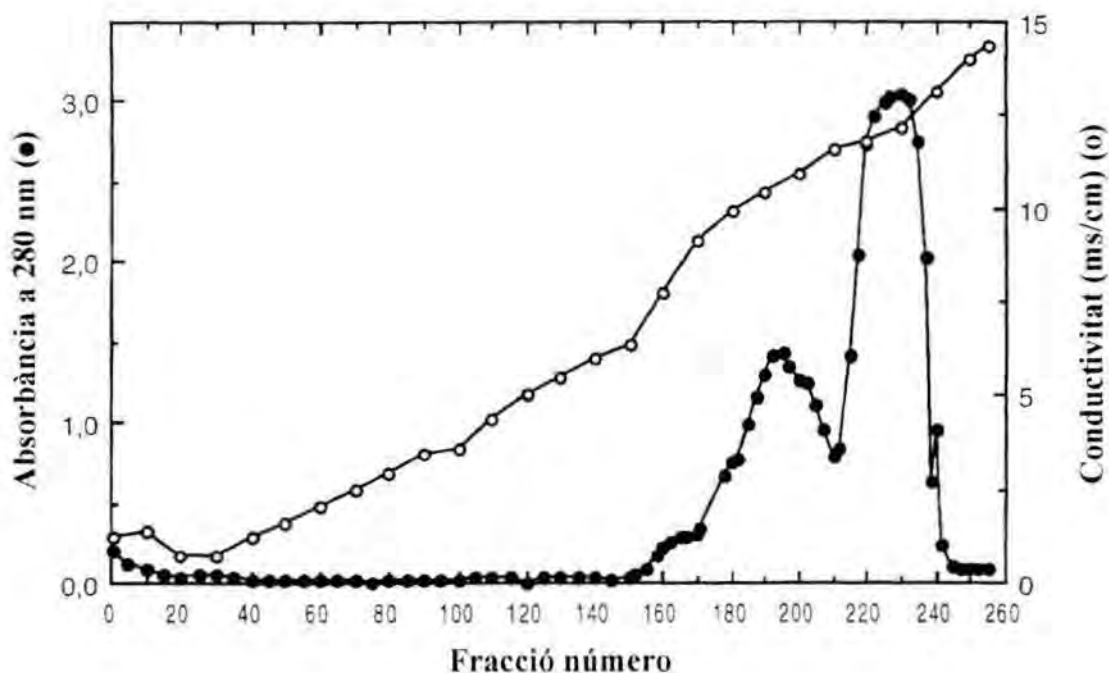


FIGURA II.2.

Perfil cromatogràfic corresponent a la cromatografia de bescanvi catiònic per a la purificació de la RNasa A comercial. El pic corresponent a la fracció no glicosilada (fraccions núm. 220-240) s'elueix a un valor de conductivitat de 12 mS. (●) Absorbància a 280 nm, (○) conductivitat en  $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

Les fraccions corresponents al pic de RNasa A no glicosilada s'ajunten i es dessalen per diàlisi enfront d'aigua Milli-Q (5 litres) durant 24 h realitzant un canvi a les 12 h. Es liofilitza i es guarda a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins al moment del seu ús.

Les diàlisis s'han realitzat amb sacs de mida d'exclusió 3500 Da (MWCO, *molecular weight cut off*) (Spectra/Por<sup>®</sup>, Spectrum, EUA) de 29 mm de diàmetre, els quals s'han rentat exhaustivament en aigua destil·lada abans de la seva utilització. Aquests tipus de sacs són els que s'han utilitzat al llarg d'aquest treball, en totes les diàlisis realitzades.

## II.7.2. Purificació de les RNases A recombinants expressades en *E. coli* BL21(DE3)

La ribonucleasa A recombinant (rRNasa A) i les seves variants s'han aïllat a partir de cultius de cèl·lules d'*E. coli* BL21(DE3) transformades amb els vectors corresponents (pBXR o pBXR+mutació) que havien estat creixent en 1 litre de medi TB + Ap 50 µg/mL durant 2-4 hores després de la inducció amb IPTG 1 mM tal i com s'ha descrit a l'apartat II.2.5.2.

Per a la purificació de les ribonucleases recombinants d'aquest treball s'han utilitzat indistintament dos protocols, els quals s'han anomenat A i B, respectivament.

### II.7.2.1. Purificació de les rRNases A seguint el protocol A

A continuació s'esquematitzen les etapes del protocol A seguit per a la purificació de les rRNases A, el qual està basat en el descrit per delCardayré i col. (1995) amb algunes modificacions:

1. Solubilització de les rRNases A.
2. Cromatografia de bescanvi catiónic a pressió atmosfèrica en presència d'urea i DTT.
3. Plegament i oxidació.
4. Cromatografia de bescanvi catiónic pel sistema d'HPLC.

#### 1. Solubilització de les rRNases A

Atès que l'estructura del gen codificador per a la rRNasa A es troba fusionat darrera el pèptid senyal pelB, aquesta proteïna està preparada per ser exportada a l'espai periplasmàtic de la cèl·lula bacteriana. Ara bé, s'ha vist que en centrifugar el cultiu cel·lular previ xoc osmòtic d'aquest, no es troba presència de la proteïna en el sobrenadant. A causa d'aquest fet, s'ha iniciat la purificació partint del sediment cel·lular obtingut en centrifugar tot el cultiu.

Els passos seguits en el processament del cultiu i la solubilització de les rRNases A han estat els següents:

1. Centrifugar a 10000 r.p.m. a 4°C durant 20 min per tal de recollir les cèl·lules.
2. El sediment que s'obté es dissol en 200 mL d'amortidor de solubilització, el qual permetrà solubilitzar la proteïna alhora que trenca les cèl·lules. La composició d'aquest

amortidor s'indica a continuació:

- Tris/HCl 20 mM, pH 7,8
- urea 6M
- EDTA 1 mM
- PMSF 0,2 mM (dissolt en 500  $\mu$ L d'isopropanol)
- DTT 20 mM

Les solucions d'urea a concentracions elevades i a  $\text{pH} \geq 7$  desplacen l'equilibri entre la urea i el cianat d'amoni de manera que la concentració de cianat d'amoni esdevé significativa. En aquestes condicions la RNasa A pot ser modificada químicament pel cianat d'amoni, el qual pot carbamilar residus de lisina de manera irreversible (Stark i col., 1960) reduint la càrrega de la proteïna. Per tal d'evitar la presència d'ions cianat, la solució d'urea 6 M utilitzada, tant per a la preparació de l'amortidor de solubilització de la proteïna com pels amortidors utilitzats en la cromatografia a pressió atmosfèrica, va ser desionitzada utilitzant la reïna de bescanvi iònic AG<sup>®</sup> 501-X8(D) (Bio-Rad, EUA). Aquesta reïna es va addicionar directament a la solució i es va mantenir en agitació fins al moment de la seva utilització, per preparar els amortidors necessaris. Aleshores, es va filtrar la solució per separar les boletes de reïna. Aquesta reïna de bescanvi iònic té la particularitat que conté un colorant blau unit irreversiblement a les seves boletes que canvia a color groc quan s'ha exhaurit la capacitat bescanviadora d'aquesta.

3. Una vegada està completament resuspès el sediment s'incuba a 37°C durant 1 h i amb agitació constant a 250 r.p.m.
4. Se centrifuga novament a 10000 r.p.m. a 4°C durant 20 min.
5. El sobrenadant, anomenat S<sub>1</sub>, es reserva i el sediment es resuspèn novament en 200 mL d'amortidor de solubilització.
6. Es repeteixen els passos 3 i 4.
7. El sobrenadant, anomenat S<sub>2</sub>, s'ajunta amb el sobrenadant S<sub>1</sub> i el sediment es torna a resuspendre en 100 mL d'amortidor de solubilització.
8. Es repeteixen de nou els passos 3 i 4.
9. Finalment, el sobrenadant, S<sub>3</sub>, s'ajunta amb la barreja de sobrenadants S<sub>1</sub> i S<sub>2</sub> per constituir la mostra que serà posteriorment sotmesa a cromatografia de bescanvi catiònic per dur a terme la purificació de la proteïna recombinant, (S<sub>1</sub>+S<sub>2</sub>+S<sub>3</sub>).

## 2. Cromatografia de bescanvi catiònic a pressió atmosfèrica en presència d'urea i DTT

S'ha utilitzat com a primer pas de purificació una cromatografia de bescanvi catiònic emprant una reïna del tipus CM-Sepharose CL-6B (Pharmacia) a pressió atmosfèrica i a temperatura ambient. Les característiques i condicions d'aquesta cromatografia s'indiquen a continuació:

Dimensions columna:	2,5 x 20 cm
Volum:	100 mL
Flux:	30 mL/h
Fraccions recollides:	3,5 mL
Amortidors d'equilibrat:	a. Tris/HCl 20 mM, pH 7,8 (200 mL) b. Tris/HCl 20 mM, pH 7,8, urea 6M (250 mL) c. Tris/HCl 20 mM, pH 7,8, urea 6 M, DTT 2 mM (100 mL)
Volum de la mostra:	500 mL (corresponents a la fracció S <sub>1</sub> +S <sub>2</sub> +S <sub>3</sub> )
Amortidor de rentat:	Tris/HCl 20 mM, pH 7,8, urea 6 M, DTT 2 mM (200 mL)
Gradient:	0-0,5 M de NaCl en el darrer tampó d'equilibrat (3).
Enregistrament:	280 nm

### Detecció de les fraccions amb activitat ribonucleasa:

Les fraccions amb activitat ribonucleàsica s'han detectat pel mètode de determinació de l'activitat RNasa que utilitza la tècnica de la placa d'agarosa en presència del substrat natural de la RNasa, l'RNA. Gràcies a aquesta tècnica es poden assajar les diferents fraccions de la cromatografia d'una manera ràpida, senzilla i sensible, permetent, al cap de 24 h, reunir les fraccions de la cromatografia corresponents a la proteïna amb activitat ribonucleasa. A l'apartat II.7.5.2 es detalla el protocol per a realitzar aquesta tècnica.

### 3. Plegament i oxidació

La mostra corresponent a les fraccions amb activitat ribonucleasa reunides es dilueix amb amortidor Tris/HCl 20 mM, pH 7,8 fins a una concentració final de 0,6 mg/mL, estimada a partir de la determinació de l'absorbància a 275 nm i considerant el valor  $A^{0,1\%}_{275\text{nm}} = 0,68$  DO per a la RNasa A reduïda i desnaturalitzada. Per a les variants de la RNasa A que contenen triptòfan s'ha determinat la concentració pel mètode de Bradford (apartat II.7.3.2). A continuació, es dialitza la mostra en dues etapes per tal de facilitar la renaturalització i la reoxidació de la rRNasa A, la qual es troba

desnaturalitzada i reduïda a causa de les etapes anteriors portades a terme en condicions desnaturalitzants i reductores.

1a diàlisi: S'ha realitzat enfront de l'amortidor Tris/HCl 20 mM, pH 7,8, NaCl 0,1 M, GSH (glutatió reduït) 1 mM, GSSG (glutatió oxidat) 0,2 mM. Aquesta diàlisi permet eliminar la urea i el DTT, alhora que permet el procés de reoxidació dels quatre ponts disulfur. El temps de diàlisi total ha estat de 24 h, realitzant un canvi a les 12 h. El volum d'amortidor utilitzat ha estat, en ambdós casos, de 2,5 L.

2a diàlisi: S'ha realitzat enfront de l'amortidor Tris/HCl 20 mM, pH 7,8 per tal d'acabar d'eliminar la urea i el DTT que no s'hagi descartat en la primera diàlisi i alhora eliminar la sal i el glutatió de la diàlisi anterior. El temps i el volum de diàlisi han estat els mateixos que en la primera diàlisi.

Finalment, com que el volum de mostra era molt gran s'ha dialitzat enfront d'aigua destil·lada Milli-Q per tal de poder-la concentrar posteriorment per liofilització. El temps i el volum de diàlisi han estat els mateixos que en les diàlisis anteriors. La mostra dialitzada s'ha centrifugat a 10000 r.p.m. a 4°C durant 10 min per tal d'eliminar la fracció de proteïna no soluble. El sobrenadant corresponent a aquesta centrifugació s'ha liofilitzat i guardat a -20°C fins a la seva utilització.

#### 4. Cromatografia de bescanvi catiónic pel sistema d'HPLC

En aquest treball, l'HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) ha estat d'utilitat tant en la seva vessant preparativa (quan suposava una etapa de purificació) com en la vessant purament analítica (quan servia per comprovar la puresa d'una mostra). Totes les cromatografies pel sistema d'HPLC s'han realitzat en un equip Waters (Millipore Corp., EUA) que consta dels següents components: 2 bombes del model Waters 510, un injector Rheodyne 7125 acoplat a un *loop* de 200 µL o d'1 mL (Rheodyne, EUA) i un detector del model Waters 995 Photodiode Array. El sistema es controla per ordinador amb el programa Software Milenium 2010, Chromatography Manager, Microsoft Corporation, EUA.

Tots els amortidors utilitzats per HPLC s'han preparat en aigua destil·lada Milli-Q, filtrat amb filtres de 0,22 µm de diàmetre de por i desgasificat durant 15-30 min.

Aquest tipus de cromatografia ha estat l'última etapa de purificació de les rRNases A. La mostra liofilitzada amb activitat ribonucleasa purificada per cromatografia de



bescanvi catiònic a pressió atmosfèrica i posteriorment replegada i reoxidada, s'ha resuspès en amortidor Tris/HCl 20 mM, pH 8,0 i s'ha sotmès a diàlisi enfront de 5 L del mateix amortidor durant 24 h, realitzant un canvi a les 12 h. Després s'ha centrifugat la mostra dialitzada a 10000 r.p.m. a 4°C durant 20 min. El sobrenadant s'ha injectat a l'equip d'HPLC. Les condicions d'aquesta cromatografia es descriuen a continuació:

Solvents:	Amortidor A) Tris/HCl 20 mM, pH 8,0 Amortidor B) Tris/HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 1 M
Columna:	Mono-S <sup>®</sup> HR 5/5-FPLC (Pharmacia, Suècia)
Flux:	1,0 mL/min
Rentat:	10-20 mín amb l'amortidor A
Gradient:	0-15 % de l'amortidor B en 45 min 15-100 % de l'amortidor B en 5 min 100 % de l'amortidor B durant 5 min
Enregistrament:	214-280 nm

Una vegada obtingut el perfil d'elució d'aquesta cromatografia, s'han reunit les fraccions corresponents al pic central i majoritari, i s'ha dialitzat enfront d'aigua Milli-Q (5 L) durant 24 h, realitzant un canvi a les 12 h. Finalment s'ha filtrat amb filtres de 0,22 µm de diàmetre de por i s'ha liofilitzat per a la seva conservació. La proteïna pura s'ha emmagatzemat a -20°C, d'aquesta manera es manté en òptimes condicions durant mesos.

### II.7.2.2. Purificació de les rRNases A seguint el protocol B

A continuació es detalla el protocol B que s'ha posat a punt, el qual està basat en el descrit per Kim i col. (1995) amb bastantes modificacions. Les etapes d'aquest protocol són les següents:

1. Trencament cel·lular i solubilització de les rRNases A
2. Plegament i oxidació
3. Cromatografia de bescanvi catiònic pel sistema d'HPLC

#### 1. Trencament cel·lular i solubilització de les rRNases A

1. Centrifugar el cultiu a 5000 r.p.m. a 4°C durant 15 min i resuspendre el sediment que s'obté en 50 mL de l'amortidor de lisi: Tris/HCl 20 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM. Guardar-ho a -80°C.

2. Descongelar la suspensió de cèl·lules en un bany d'aigua a 37°C i posteriorment mantenir-les en gel picat.

3. Lisar les cèl·lules resuspeses passant-les dues o tres vegades per la *French Press*<sup>®</sup> (SLM Aminco<sup>®</sup> Spectronic Instruments, EUA) utilitzant la cel·la 20K, que permet un volum màxim de 40 mL i una pressió màxima de 1260 psi, i un injector automàtic. Cada vegada que es passa la mostra per la *French Press*<sup>®</sup> s'ha d'apreciar una disminució de la viscositat d'aquesta. És convenient mantenir la mostra en gel picat quan no està dins la *French Press*<sup>®</sup>.

4. Centrifugar les cèl·lules lisades a 12000 r.p.m. a 4°C durant 1 h. Eliminar el sobrenadant.

5. Resuspendre el sediment, corresponent al material insoluble on es troba la proteïna recombinant, en 12 mL de l'amortidor de solubilització: Tris/HCl 20 mM, pH 8,0, clorur de guanidini 6 M, EDTA 10 mM. Aquest amortidor es prepara de la següent manera:

Tris-base	0,121 g
EDTA	0,186 g
aigua Milli-Q	fins a 25 mL

La solució resultant serà Tris/HCl 40 mM, pH~8,5, EDTA 20 mM

A continuació s'hi dissol el clorur de guanidini (Gdn·HCl) tenint en compte la relació entre els grams de Gdn·HCl per gram d'H<sub>2</sub>O en funció de la concentració de Gdn·HCl desitjada, essent de 1,0 g Gdn·HCl/g H<sub>2</sub>O per a una concentració de Gdn·HCl 6 M:

Gdn·HCl (Fluka)	15 g
Tris/HCl 40 mM, pH~8,5, EDTA 20 mM	15 mL

El pH resultant sol ser proper a 8,0, si no ho és cal ajustar-lo. D'aquesta manera s'obtenen aproximadament uns 30 mL de la solució Tris/HCl 20 mM, pH 8,0, clorur de guanidini 6 M, EDTA 10 mM.

6. Repartir el volum del sediment solubilitzat amb la solució desnaturalitzant anterior en dos tubs tapats i agitar a 150 r.p.m. a temperatura ambient durant 1 h. Si en el pas anterior no s'havia pogut resuspendre bé el sediment, intentar-ho de nou durant aquesta etapa.

7. Afegir 92,5 mg de DTT en pols a cada tub, per tal d'assolir una concentració final de 0,1 M.

8. Mantenir de nou en agitació durant 1 h més. Acabar de dissoldre el sediment si convé durant aquesta etapa, ja que la presència del DTT ho facilitarà.

9. Afegir 4 mL més d'amortidor de solubilització a cada tub i centrifugar a 10000 r.p.m. a 4°C durant 30 min per eliminar el material insoluble.

## 2. Plegament i oxidació

1. Dialitzar el sobrenadant anterior enfront de 4 L d'àcid acètic 20 mM (4,6 mL d'àcid acètic glacial (Merck) en 4 L d'aigua Milli-Q) durant 20 h, realitzant un canvi a les 4-5 h.

2. Centrifugar la solució dialitzada a 10000 r.p.m. a 4°C durant 30 min. Potser caldrà centrifugar-la una altra vegada per tal d'eliminar completament el material precipitat durant la diàlisi.

3. Estimar la concentració de les rRNases A a partir de la determinació del valor d'absorbància a 275 nm d'una dilució 1/10 del sobrenadant anterior (100 µL) en la solució enfront la qual s'havia estat dialitzant (900 µL) i considerant el valor  $A^{0,1\%}_{275\text{nm}} = 0,68 \text{ DO}$  per a la RNasa A reduïda i desnaturalitzada.

4. Diluir la mostra en Tris/HOAc 0,1 M, GSH 3,0 mM i GSSG 0,6 mM fins a una concentració final de 0,3 mg/mL de la següent manera:

- Calcular el volum final que haurà de tenir la mostra per assolir una concentració final de 0,3 mg/mL.
- Pendre 1/10 del volum final calculat de la solució amortidora Tris/HOAc 1 M, pH 8,0.

- Diluir en aigua Milli-Q:

$$\text{volum d'aigua Milli-Q} = \text{volum final} - 1/10 \text{ del volum final} - \text{volum de mostra}$$

- Afegir GSH i GSSG de manera que les concentracions finals siguin de 3,0 i 0,6 mM, respectivament.
- Comprovar el pH de la solució i ajustar si cal.
- En agitació de la solució, afegir-hi la mostra a poc a poc.

Mantenir-ho en agitació suau durant unes 24 h a temperatura ambient.

5. Afegir 1/100 del volum final d'àcid acètic glacial, a poc a poc, a la solució proteica per tal d'aturar el procés d'oxidació i deixar 5-10 min en agitació suau. Guardar, si convé, la solució a 4°C.

## Concentració de la solució proteica

Per tal d'evitar un procés de concentració per liofilització de la solució de proteïna resultant de l'etapa de plegament i oxidació, el qual seria llarg ja que el volum de mostra ha oscil·lat entre els 180 i 250 mL, s'ha aprofitat que en el nostre laboratori es disposava d'un equip d'ultrafiltració tangencial i s'ha optat per concentrar la solució d'aquesta manera. Aquest procés s'ha dut a terme amb l'equip Acrylic Minitan II (Millipore, EUA) amb quatre plaques de doble filtre de cel·lulosa de mida d'exclusió 5000 Da (*molecular weight cut off*), també de millipore, acoblat a una bomba peristàltica de la mateixa casa comercial. Aquest sistema ha permès una concentració ràpida i eficient de la mostra (d'uns 200 mL a uns 40 mL en 30 min). S'ha treballat sempre a una pressió mitja

transmembrana d'entre 12 i 13 psi.

La mostra resultant s'ha dialitzat enfront de Tris/HCl 20 mM, pH 8,0 (5 L) durant 24 h, realitzant un canvi a les 12 h.

A continuació, s'ha centrifugat la mostra dialitzada a 12000 r.p.m. a 4°C durant 20 min per eliminar la fracció de proteïna no soluble i s'ha procedit a realitzar una cromatografia de bescanvi catiònic pel sistema d'HPLC.

### 3. Cromatografia de bescanvi catiònic pel sistema d'HPLC

Les condicions d'aquesta cromatografia han estat les mateixes que s'han descrit en el procés de purificació anterior (protocol A) (apartat II.7.2.1).

### **II.7.2.3. Comprovació de la puresa i seguiment del procés de purificació de la rRNases A**

Una vegada acabat el procés de purificació de les rRNases A, ja sigui mitjançant el protocol A o el B, s'ha portat a terme:

- 1) La comprovació de la puresa de les rRNases A mitjançant:
  - Cromatografia de bescanvi catiònic pel sistema d'HPLC.
  - Cromatografia de fase inversa pel sistema d'HPLC.
- 2) El seguiment del procés de purificació de la rRNasa A.

#### 1) Comprovació de la puresa de les rRNases A

Una petita part del liofilitzat corresponent a la fracció principal eluïda en l'etapa de cromatografia de bescanvi catiònic per HPLC, s'ha reinjectat a l'equip d'HPLC per dur a terme dues cromatografies de caire analític:

#### - Cromatografia de bescanvi catiònic pel sistema d'HPLC

El liofilitzat s'ha resuspès en 100-200 µL de l'amortidor Tris/HCl 20 mM, pH 8,0 i s'ha recromatografiat, seguint les mateixes condicions de la cromatografia de bescanvi catiònic de l'apartat II.7.2.1, per tal de verificar la puresa d'aquesta fracció quan a presència d'isoformes diferents de la proteïna. En aquestes condicions de treball la RNasa A comercial s'elueix als 35-38 min.

#### - Cromatografia de fase inversa pel sistema d'HPLC

Aquesta cromatografia, que separa les proteïnes segons el seu grau d'hidrofobicitat, eluint-se la proteïna en aplicar un gradient on s'incrementa progressivament la fase orgànica, s'ha realitzat amb la finalitat de comprovar la puresa de les RNases A

recombinants.

La mostra liofilitzada s'ha resuspès en el dissolvent A i s'ha centrifugat a 10000 r.p.m. a 4°C durant 10 min. El sobrenadant corresponent a aquesta centrifugació s'ha recromatografiat en una columna de fase inversa.

Les condicions dutes a terme per a aquesta cromatografia s'indiquen a continuació:

Solvents:	A) TFA 0,1% en aigua Milli-Q B) acetonitril +TFA 0,1%
Columna:	Vydac 214-TP C <sub>4</sub> ( Vydac, EUA)
Flux:	0,5 mL/min
Volum de la mostra:	100 µL
Rentat:	20 min en 90% de solvent A i 10% de solvent B
Gradient:	10-22 % de solvent B en 20 min 22-33 % de solvent B en 80 min 33-100 % de solvent B en 20 min 100 % de solvent B durant 10 min
Enregistrament:	214-280 nm

En aquestes condicions de treball la RNasa A comercial s'elueix als 84-86 min.

## 2) Seguiment del procés de purificació de la rRNasa A

Al llarg del procés de purificació de la rRNasa A s'han anat prenent alíquotes en diferents etapes, les quals s'han anat guardant a -20°C. La finalitat de prendre alíquotes ha estat analitzar-les posteriorment mitjançant les tècniques que s'indiquen a continuació, les quals es descriuen en els apartats indicats entre parèntesis:

- Electroforesi discontinua en gels de poliacrilamida-SDS (II.7.4.1)
- Gels de poliacrilamida-SDS amb poli(C) revelats per activitat (II.7.5.3)
- Determinacions de proteïna total (Bradford) (II.7.3.2)

Alíquotes que s'han pres seguint el protocol de purificació A:

- a. Fracció del procés de solubilització de la rRNasa A corresponent a S<sub>1</sub>+S<sub>2</sub>+S<sub>3</sub>.
- b. Fracció majoritària amb activitat ribonucleasa corresponent a la cromatografia de bescanvi catiónic (CM-Sepharose) a pressió atmosfèrica en presència d'urea i DTT.
- c. Fracció de proteïna soluble corresponent al sobrenadant de la proteïna amb

activitat ribonucleasa que després del procés de replegament i reoxidació s'ha centrifugat per tal d'eliminar-ne la fracció de proteïna no soluble.

- d. Fracció majoritària amb activitat ribonucleasa de la cromatografia de bescanvi catiònic pel sistema d'HPLC (Mono-S<sup>®</sup> HR 5/5-FPLC).

Alíquotes que s'han pres seguint el protocol de purificació B:

- a. Fracció soluble corresponent al procés de solubilització de la rRNasa A amb Tris/HCl 20 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, Gdn·HCl 6M, DTT 0,1 M, posterior al procés de trancament cel·lular.
- b. Fracció de proteïna soluble de la diàlisi enfront d'àcid acètic 20 mM.
- c. Fracció amb activitat ribonucleasa corresponent al procés final de replegament i oxidació.
- d. Fracció majoritària de la cromatografia de bescanvi catiònic per HPLC (Mono-S<sup>®</sup> HR 5/5-FPLC).

### **II.7.3. Determinació de la concentració de proteïna**

#### **II.7.3.1. Mètode espectrofotomètric**

La concentració de rRNasa A purificada i de RNasa A bovina comercial s'han determinat per espectrofotometria, mitjançant la llei de Lambert-Beer, a partir del valor d'absorbància a 278 nm i utilitzant el coeficient d'extinció molar de la proteïna a aquesta longitud d'ona  $\epsilon_{277,5} = 9800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Sela i Anfinsen, 1957). Aquest mètode s'ha aplicat també per a les variants de la RNasa A que no contenen triptòfan, una vegada s'ha comprovat que els seus coeficients d'extinció molar eren molt similars al de la RNasa A.

A més, i per tal de realitzar una primera comparació de l'estructura global entre la rRNasa A i la comercial, així com també entre les diferents variants de la RNasa A recombinants, s'ha realitzat un espectre d'absorció a la regió UV, en el marge corresponent a 240-340 nm, de les proteïnes. Els espectres d'absorció s'han realitzat amb un espectrofotòmetre Hewlett Packard HP 8252 A i cubetes d'1 cm de pas de llum.



### II.7.3.2. Mètode de Bradford

L'estimació de la quantitat de proteïna total present en les diferents etapes del procés de purificació i la determinació de la concentració de les variants de la RNasa A que contenen triptòfan s'han realitzat pel mètode de Bradford (1976). Aquest mètode, basat en el canvi del màxim d'absorció, de 465 nm a 595 nm, del colorant blau brillant de Coomassie en solució àcida quan s'uneix a les proteïnes, presenta uns quants avantatges respecte dels tradicionals mètodes de Lowry i del Biuret com ara la rapidesa de la reacció i l'estabilitat de l'absorbància del complex proteïna-colorant durant 1h. El reactiu utilitzat ha estat subministrat per Bio-Rad (EUA).

El procediment de microassaig que s'ha seguit s'indica a continuació:

1. Es prepara una recta patró d'albumina de sèrum boví (BSA) amb els següents nivells de concentració: 1, 2, 5, 8, 10, 15, 20 i 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de proteïna en 800  $\mu\text{L}$  d'aigua destil·lada Milli-Q.  
Paral·lelament es prepara també una recta patró de RNasa A comercial amb nivells de concentració: 1, 2, 4, 6, 8 i 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de proteïna en 800  $\mu\text{L}$  d'aigua destil·lada Milli-Q. S'han escollit aquests nivells després d'haver observat que per a concentracions superiors a 10-15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de RNasa A es perd linealitat en aquest assaig.
2. Es preparen diferents dilucions de les mostres a analitzar de 800  $\mu\text{L}$  de volum fins que es trobin dintre el marge comprès per la recta patró.
3. S'afegeixen 200  $\mu\text{L}$  del reactiu de Bradford, subministrat per Bio-Rad, sense diluir i s'agita immediatament invertint el tub varies vegades o bé fent ús del vòrtex.
4. Després d'agitar cal esperar un mínim de 5 min i un màxim d'1 h i es mesura l' $\text{Abs}_{595}$  enfront d'un blanc preparat amb 800  $\mu\text{L}$  d'aigua destil·lada Milli-Q i 200  $\mu\text{L}$  de reactiu.
5. Finalment es construeixen els gràfics d' $\text{A}_{595}$  versus concentració de proteïna ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) per a les dues rectes patró i s'hi interpolen les diferents mostres, tenint en compte el factor de dilució utilitzat per a cadascuna.

### II.7.4. Mètodes electroforètics

#### II.7.4.1. Electroforesi discontinua en gels de poliacrilamida-SDS

Les electroforesis de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants permeten la separació de proteïnes en funció de la seva massa molecular i s'han emprat com a mètode analític en el seguiment del procés de purificació de les rRNases A.

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

El procediment que s'ha seguit s'indica a continuació:

1. Preparació gel separador al 15 % d'acrilamida (per a dos gels):

solució A (acrilamida 30%:bisacrilamida 0,8%)	8 mL
solució B (Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8, SDS 0,4%)	4 mL
aigua Milli-Q	4 mL
Desgasificar la solució i afegir:	
TEMED	8 µL
persulfat amònic 10 % (p/v) (preparat al moment)	64 µL

2. Preparar el Kit d'electroforesi i abocar la dissolució del gel separador en el suport evitant la formació de bombolles. Acte seguit s'afegeix amb una pipeta pasteur una capa fina d'aigua Milli-Q per tal de facilitar la polimerització i permetre que el front del gel no es deformi. El gel es deixa polimeritzar com a mínim 30 min i s'elimina la capa d'aigua amb paper assecat.

3. Preparació del gel concentrador (per a dos gels):

solució A (acrilamida 30%:bisacrilamida 0,8%)	0,6 mL
solució C (Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8, SDS 0,4%)	1,5 mL
aigua Milli-Q	3,9 mL
Desgasificar la solució i afegir:	
TEMED	6 µL
persulfat amònic 10 % (p/v) (preparat al moment)	60 µL

Abocar el gel concentrador, col·locar la pinta i deixar polimeritzar.

4. Preparar la cubeta d'electroforesi i preparar l'amortidor d'elució:

100 mL d'amortidor d'elució x10 (Tris/HCl 0,25 M, glicina 1,92 M, pH 8,3-8,5, SDS 1%)  
aigua Milli-Q fins a 1 L

Omplir la cubeta d'electroforesi evitant la formació de bombolles en l'extrem inferior dels gels per tal d'impedir un corrent electroforètic de les mostres incorrecte.

5. Les mostres es preparen per dilució amb amortidor d'aplicació de mostres x4 (Tris/HCl 120 mM, pH 6,8, glicerol 40 % (v/v), SDS 8 % (p/v), blau de bromofenol 0,05% (p/v)) a una relació mostra/tampó de 3:1.

Opcionalment, si es vol que l'amortidor d'aplicació de mostres tingui caràcter reductor s'afegeix  $\beta$ -mercaptoetanol a una concentració final del 15% (v/v).

S'han utilitzat els marcadors prenyits de Bio-Rad: fosforilasa b (106000 Da), albúmina de sèrum boví (80000 Da), ovoalbúmina (49500 Da), anhidrasa carbònica (32500 Da), inhibidor de tripsina de soja (27500 Da) i lisozim (18500 Da).

6. Les electroforesis es fan córrer a temperatura ambient i amb una intensitat de corrent de 20-30 mA i s'aturen 10 minuts després que el colorant blau de bromofenol hagi surtit del gel.
7. Revelat del gel: Tinció de proteïnes en gels de poliacrilamida amb blau de Coomassie
 

Aquest mètode de tinció permet detectar fins 0,3-1  $\mu$ g per banda de proteïna. Tots els passos que s'indiquen a continuació es realitzen a temperatura ambient i amb agitació suau:

  - a. Fixar els gel submergint-lo durant un període mínim de 30 min en una solució fixadora: metanol 50%, àcid acètic 7%.
  - b. Retirar la solució fixadora i submergir el gel durant com a mínim 15 min en una dissolució de blau de Coomassie: metanol 50% (v/v), àcid acètic 7% (v/v), blau brillant Coomassie R-250 (Sigma, EUA) 0,1% (p/v)

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

  - c. Eliminar la solució de tinció i realitzar varis rentats amb àcid acètic 7% per tal d'eliminar l'excés de colorant.
  - d. Els gels es poden conservar per períodes de temps prolongats en àcid acètic 7% i a 4°C.

#### II.7.4.2. Electroforesi discontinua en condicions no desnaturalitzants

Quan s'ha pretès d'analitzar la presència de dímers de ribonucleasa s'ha realitzat una electroforesi catòdica en gels de poliacrilamida en condicions no desnaturalitzants que és una adaptació del mètode de Reisfeld i col. (1962).

En tots els casos s'ha utilitzat l'aparell d'electroforesi Mini-Protean II (Bio-Rad) i s'han preparat gels de dimensions: 9 x 6 x 0,15 cm.

El procediment que s'ha seguit és el següent:

1. Preparació gel separador al 7,5 % d'acrilamida (per a dos gels):

solució A (acrilamida 30%;bisacrilamida 0,8%)	4,5 mL
solució C*	2,25 mL
solució E (riboflavina 0,004 %)	2,25 mL
aigua Milli-Q	9 mL
Desgasificar la solució i afegir:	
TEMED	30 $\mu$ L

persulfat amònic 10 % (p/v) 240 µL

\* La solució C es prepara d'aquesta manera:

- diluir 12,8 mL d'àcid acètic glacial en 30 mL d'aigua Milli-Q
- afegir-hi 1 mL de TEMED
- ajustar el pH a 4,0 amb 35 mL de KOH 1 M
- enrasar a 100 mL amb aigua Milli-Q
- comprovar el pH i acabar d'ajustar si cal

2. Preparar el Kit d'electroforesi i abocar la dissolució del gel separador en el suport evitant la formació de bombolles. Afegir amb una pipeta pasteur una capa fina d'aigua Milli-Q per tal de facilitar la polimerització i permetre que el front del gel no es deformi. El gel es deixa polimeritzar com a mínim 45 minuts i s'elimina la capa d'aigua amb paper assecant.

3. Preparació del gel concentrador (per a dos gels):

solució B (acrilamida 10 %-bisacrilamida 2,5 %)	3 mL
solució D*	1,5 mL
solució E (riboflavina 0,004 %)	1,5 mL
aigua Milli-Q	6 mL

Desgasificar la solució i afegir:

TEMED	22,5 µL
persulfat amònic 10 % (p/v) (preparat al moment)	120 µL

Abocar el gel concentrador, col·locar la pinta i deixar polimeritzar.

\* La solució D es prepara de la següent manera:

- diluir 4,3 mL d'àcid acètic glacial en 30 mL d'aigua Milli-Q
- afegir-hi 0,46 mL de TEMED
- ajustar el pH a 5,0 amb 50 mL de KOH 1 M
- enrasar a 100 mL amb aigua Milli-Q
- comprovar el pH i ajustar si cal

4. Preparar la cubeta d'electroforesi l'amortidor d'elució:

250 mL d'amortidor d'elució x4, que s'obtenen així:

- dissoldre 14,2 g de β-alanina amb 800 mL d'aigua Milli-Q
- ajustar a pH 4,0 amb àcid acètic glacial
- enrasar amb aigua Milli-Q fins a 1 L

aigua Milli-Q fins a 1 L

Omplir la cubeta d'electroforesi evitant la formació de bombolles en l'extrem inferior dels gels per tal d'impedir un corrent electroforètic de les mostres incorrecte.

5. Les mostres es preparen per dilució amb amortidor d'aplicació de mostres x5 (glicerol 50 %

(v/v), verd de metil 0,2% (p/v)) a una relació mostra/tampó de 4:1. Es carrega entre 1-2 µg de proteïna.

6. Les electroforesis s'han fet córrer a 4°C amb una intensitat de corrent de 20 mA i polaritat invertida durant 1 h.
7. Revelat del gel: Tinció de proteïnes en gels de poliacrilamida amb blau de Coomassie  
Se segueix el mateix protocol que per l'electroforesi en medi desnaturalitzant (apartat II.7.4.1).

## II.7.5. Mètodes de determinació de l'activitat ribonucleasa

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

### II.7.5.1 Determinacions espectrofotomètriques

#### A. Seguiment espectrofotomètric de la hidròlisi de citidina 2',3'-fosfat cíclic (cCMP)

Els paràmetres cinètics de la RNasa A comercial i de les rRNases A utilitzant com a substrat cCMP s'han determinat pel mètode espectrofotomètric de Crook i col. (1960) amb algunes modificacions (Herries i col., 1962). En aquest mètode la hidròlisi del substrat cCMP, corresponent a la 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.

Els assajos d'activitat amb cCMP s'han realitzat amb l'espectrofotòmetre Hewlett Packard HP 8452 A, d'un sol feix de llum, amb detector del tipus Diode Array i cambra de cubetes termostatitzada.

Les condicions d'assaig foren les següents:

Amortidor: 0,2 M acetat sòdic, pH 5,5

Temperatura: 25°C

Substrat: S'han assajat 10 dilucions de cCMP (Sigma, EUA) entre 0,1 i 3 mM en amortidor 0,2 M acetat sòdic, pH 5,5. Les concentracions de les diferents dissolucions s'han comprovat a partir del coeficient d'extinció molar del cCMP 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 a tots els casos assajats.

Volum de reacció: 1 mL de la solució de substrat + 25 µL d'enzim. Les cubetes

utilitzades foren de quars d'1 cm de pas de llum i 1 mL de capacitat, prèviament rentades amb àcid nítric 30% i, a continuació, exhaustivament amb aigua destil·lada.

Temps de reacció: La reacció és lineal durant 5-10 min a partir dels 20-30 seg. Es van prendre mesures de 300 seg.

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

## B. Seguiment espectrofotomètric de la hidròlisi de poli(C)

Els paràmetres cinètics de la RNasa A comercial i de les rRNases A s'han determinat també espectrofotomètricament, utilitzant poli(C) com a substrat, mitjançant el mètode espectrofotomètric de mesura del decrement d'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 el poli(C) permet estudiar el mecanisme catalític de la RNasa A enfront de substrats d'alt pes molecular. Els assajos d'activitat amb poli(C) s'han realitzat també amb l'espectrofotòmetre Hewlett Packard HP 8452 A.

Les condicions d'assaig s'indiquen a continuació:

Amortidor: 0,2 M acetat sòdic, pH 5,5

Temperatura: 25°C

Substrat: S'han assajat 8 dilucions de poli(C) (Sigma, EUA) entre 0,1 i 2 mg/mL en amortidor 0,2 M acetat sòdic, pH 5,5. Cal tenir molta cura a l'hora de pesar el poli(C), utilitzant guants i pinces prèviament submergides en àcid nítric al 30% i esbandides amb aigua destil·lada.

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

Volum de reacció: 0,5 mL de la solució de substrat + 12,5  $\mu\text{L}$  d'enzim. Les cubetes utilitzades foren de quars de 0,2 cm de pas de llum i 0,7 mL de capacitat, prèviament rentades amb àcid nítric 30% i, a continuació, exhaustivament amb aigua destil·lada.

Temps de reacció: La reacció és lineal durant 2-3 min a partir dels 10-20 seg. Es van prendre mesures de 160 seg.

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



Pel càlcul de les constants cinètiques  $K_m$  i  $V_{m\max}$ , tant en els assajos amb poli(C) com amb cCMP, 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 van calcular a partir de la tangent a l'origen de la progressió cinètica amb el programa HP 89531 A de l'espectrefotòmetre Hewlett Packard HP 8252 A.

### II.7.5.2. Determinació en placa d'agarosa

Les plaques d'activitat constitueixen una eina molt sensible i ràpida per determinar les zones d'una cromatografia que presenten activitat ribonucleasa, ja que permet assajar un elevat nombre de fraccions en un temps inferior al que requereixen els mètodes espectrofotomètrics o electroforètics. Aquesta tècnica es basa en determinar les regions de la placa on hi ha hagut digestió del substrat, RNA contingut en l'agarosa abans que aquesta gelifiqui, per tinció del substrat que no ha estat digerit. Per preparar 10-12 plaques s'ha seguit el següent protocol:

1. Es pesen els tres components que componen les plaques d'activitat de manera que la composició final en la placa sigui la indicada entre parèntesis:

Tris-base	3,03 g (0,1 M)
RNA(Torula Yeast, tipus VI, Sigma, EEUU)	125 mg (0,5 mg/mL)
Agarosa baixa EEO (Ecogen)	2,0 g (0,8 % p/v)

- a. Es dissolen els 2 g d'agarosa en 200 mL d'aigua destil·lada i es fon l'agarosa en el microones.
  - b. Es dissolen els 3,03 g de Tris-base en 50 mL d'aigua destil·lada i s'ajusta el pH a 8,0 amb HCl. A continuació, s'hi dissolen els 125 mg de l'RNA.
2. Una vegada la temperatura de la dissolució d'agarosa ha baixat de 50°C, es mesclen les dues solucions: a i b. S'agita bé i tot seguit s'aboquen de 15-20 mL sobre plaques de petri col·locades en una superfície plana.
  3. Les plaques es deixen solidificar i assecar a temperatura ambient. Una vegada seques es poden guardar dins una bossa de plàstic a 4°C per a períodes de temps llargs (2-3 mesos). En aquest cas, caldrà prèviament atemperar-les i deixar-les assecar abans de ser utilitzades.
  4. Per dur a terme la determinació d'activitat es dipositen, de forma ordenada, sobre la placa, 1-2 µL de les fraccions que volem assajar i seguidament es tanca la placa. Per tal de treure el màxim profit d'una placa, és útil col·locar-la sobre una quadricula numerada, amb el nombre de requadres que es vulgui, en el moment de dipositar-hi les mostres a assajar.
  5. Llavors la placa s'incuba a 37°C durant 24 h. De fet el temps és variable en funció de la

concentració de ribonucleasa que la mostra tingui. Es coneix que períodes d'incubació de 4 h permeten detectar concentracions de fins a 10 ng/ $\mu$ L de RNasa.

6. Seguidament es tenyeix l'RNA no digerit amb una solució de toluidina 0,1 % (p/v) en Tris/HCl 10 mM, pH 8,0 durant 5-10 min i mantenint en tot moment la placa immòbil.
7. Per eliminar l'excés de colorant es realitzen diversos rentats amb aigua corrent, fins a la detecció de les àrees d'activitat, les quals apareixen com a taques blanques sobre un fons blau.
8. Finalment, i situant la placa de nou sobre la quadrícula, es poden determinar les fraccions de la cromatografia que presenten activitat ribonucleasa.

### **II.7.5.3. Mètode electroforètic en gels de poliacrilamida-SDS amb poli(C) revelats per activitat (Zimogrames)**

Es tracta d'un altre sistema de detecció i seguiment de l'activitat ribonucleasa, el qual es basa també en una tinció negativa. A més de l'elevada sensibilitat i especificitat, aquest sistema presenta un avantatge respecte a altres mètodes de detecció d'activitat ribonucleasa, alhora que determina si una fracció és o no activa, permet visualitzar quina o quines espècies moleculars són les responsables d'aquesta activitat. Aquest sistema s'ha utilitzat sobretot per a la detecció de les proteïnes amb activitat ribonucleasa que constitueixen cadascuna de les etapes de la purificació de la RNasa A recombinant.

El mètode de tinció negativa de gels de poliacrilamida-SDS amb poli(C) seguit per la detecció d'activitat RNasa (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'alt pes molecular per a la RNasa, poli(C), que és afegit durant el procés d'entrecruament de les cadenes d'acrilamida. Es tracta de separar primer, mitjançant una electroforesi convencional, les proteïnes. Llavors s'elimina del gel l'SDS mitjançant uns rentats amb isopropanol aquós per tal de renaturalitzar completament les proteïnes. Les proteïnes que presentin activitat ribonucleasa podran degradar localment el substrat contingut en el gel i podran ser visualitzades per tinció negativa submergint els gels amb colorants que tenyeixen àcids nucleics.

El protocol seguit es detalla a continuació:

0. Tot el material, vidres, separadors i pintes s'ha de netejar amb etanol 70 % abans de l'electroforesi, per tal que estigui ben net. S'han utilitzat separadors de 0,75 mm per a la realització dels gels d'activitat.

1. Es prepara un gel separador segons s'ha descrit anteriorment en l'apartat II.7.4.1 amb lleugeres modificacions:
  - a. Es dispensa en un got de precipitats l'aigua i en un altre l'amortidor del gel de separació (solució B) i la solució d'acrilàmida. Ambdós gots cal que estiguin ben nets, per a la qual cosa convé netejar-los amb àcid nítric 30 % i llavors exhaustivament amb aigua destil·lada.
  - b. En el got de precipitats que conté l'aigua es dissol el poli(C) (Pharmacia Biotech, EUA) de manera que presenti una concentració final en el gel separador de 0,3 mg/mL. Cal tenir molta cura en pesar el poli(C), utilitzant guants i pinces prèviament submergides en àcid nítric 30 % i esbandides amb aigua destil·lada.
  - c. Aquesta dissolució s'incuba tapada amb paper d'alumini, en una estufa a 55°C durant 10 min per tal de facilitar la dissolució del poli(C).
  - d. Una vegada dissolt el poli(C), s'aboca sobre el got de precipitats que conté l'amortidor del gel i la solució d'acrilàmida.
  - e. S'afegeixen les quantitats de TEMED i persulfat amònic al 10 % que pertoquin i s'agita la solució tot fent girar el vas, suaument, sobre una superfície plana.
  - f. S'aboca la dissolució del gel separador en el suport i s'hi afegeix amb una pipeta pasteur una capa fina d'aigua Milli-Q per tal de facilitar la polimerització i permetre que el front del gel no es deformi. El gel es deixa polimeritzar com a mínim 30 min i s'elimina l'aigua amb paper assecant.
2. El gel concentrador es prepara com s'ha descrit en l'apartat II.7.4.1.
3. Les mostres es preparen amb amortidor d'aplicació de mostres 4x sense  $\beta$ -mercaptoetanol com s'ha indicat en l'apartat II.7.4.1.
4. Les condicions d'electroforesi han estat les mateixes que les d'una electroforesi discontinua de poliacrilàmida-SDS, corrent a 20-30 mA fins 10 min després que el colorant blau de bromofenol surti del gel.
5. Per al revelat del gel:
  - a. S'elimina el SDS del gel submergeint aquest en amortidor Tris/HCl 10 mM, pH 8,0, isopropanol 20 %, amb agitació suau. Aquest rentat dura 15 min i es realitza dues vegades, utilitzant 50-100 mL per a cada rentat.
  - b. L'isopropanol s'elimina incubant el gel en el mateix amortidor descrit anteriorment però sense la presència d'isopropanol, amb agitació suau. Aquest rentat també dura 15 min i es realitza dues vegades, utilitzant 50-100 mL per a cada rentat.
  - c. El gel s'incuba en amortidor Tris/HCl 0,1 M, pH 8,0 amb agitació molt suau per evitar el màxim la difusió. El temps d'incubació és variable depenent de la concentració de la mostra i ha oscil·lat durant el treball entre 10 i 30 min.
  - d. Incubar el gel en el mateix amortidor descrit a l'apartat 5.b durant 10 min amb agitació suau.

- e. Tenyir els gels submergint-los en una dissolució de blau de toluïdina 0,1 % (p/v), Tris/HCl 10 mM, pH 8,0, durant 10-15 min. Aquest pas tenyeix el poli(C) que no ha estat digerit.
- f. S'elimina l'excés de colorant rentant el gel amb aigua corrent, fent diversos canvis fins a l'aparició de les zones o bandes d'activitat, que s'observen com a zones clares en un entorn blau, situades en la zona on una proteïna d'activitat ribonucleasa hagi migrat.

Alternativament a aquest sistema de tinció descrit es poden observar les bandes d'activitat col·locant el gel sobre una placa de capa fina de cel·lulosa amb indicador fluorescent F254 (Merck, Alemanya) embolicada amb paper de plàstic transparent i il·luminada amb llum ultraviolada de 254 nm mitjançant una font UVatom 70 (Atom, Espanya). Aquest sistema presenta l'avantatge que permet seguir l'aparició de les bandes d'activitat a mesura que aquestes es van generant, alhora que es pot fotografiar el gel en les mateixes condicions en què es fotografia el DNA en un gel d'agarosa, o bé es pot passar a la tinció amb toluïdina quan creiem convenient, evitant problemes d'excés de digestió.

### II.7.6. Determinació del coeficient d'extinció molar

La determinació de la concentració acurada d'una dissolució proteica és molt sovint necessària. En aquest treball ha estat requerida principalment pels càlculs dels paràmetres cinètics, termodinàmics i de l'el·lipticitat molar de les variants de la RNasa A.

La determinació de la concentració d'una dissolució proteica es fa sovint per espectrofotometria, mesurant l'absorbància,  $A$ , al voltant de 280 nm i utilitzant la llei de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

on  $\varepsilon$  és el coeficient d'extinció molar ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $l$  és el pas de llum (cm), i  $C$  és la concentració proteica (M). Aquest és un mètode excel·lent per mesurar concentracions de proteïna si es disposa d'un valor acurat de  $\varepsilon$ .

Es pot determinar el coeficient d'extinció molar d'una proteïna mitjançant l'equació anterior, preparant una dissolució de la proteïna pura i determinant-ne l'absorbància a la longitud d'ona màxima, al voltant de 280 nm, i la concentració. La mesura d' $A$  és directe, però la mesura de  $C$  no ho és. Segons Pace i col. (1995), d'entre les tècniques utilitzades més sovint per mesurar  $\varepsilon$ , el mètode experimental d'Edelhoc, descrit per Gill i von Hippel (1989) basant-se en les dades d'Edelhoc (1967), és el més senzill i fiable.

Aquest mètode consisteix en preparar dues dissolucions de la proteïna, una en estat natiu i l'altra en estat desnaturalitzat amb clorur de guanidini (Gdn·HCl) 6 M, a la mateixa concentració i determinar-ne el valor d'absorbància a la longitud d'ona màxima, al voltant dels 280 nm. Si s'aplica l'equació de la llei de Lambert-Beer per a cadascuna de les dues dissolucions resulta que el terme concentració és el mateix, i per tant, es poden igualar les dues equacions:

$$(A_{\text{nad}}) / (\varepsilon_{\text{nad}}) = (A_{\text{Gdn-HCl}}) / (\varepsilon_{\text{Gdn-HCl}})$$

El mètode suposa que el coeficient d'extinció molar d'una proteïna desnaturalitzada en clorur de guanidini 6 M,  $\varepsilon_{\text{Gdn-HCl}}$ , es pot calcular de manera teòrica a partir del nombre de residus de tirosina, triptòfan i cistina que conté la molècula, utilitzant els coeficients d'extinció molar de compostos model apropiats d'aquests residus en aquesta solució. Edelhoch va mesurar els coeficients d'extinció molar d'aquests compostos model en funció de la longitud d'ona i va demostrar que aquests residus són els únics que contribueixen significativament al valor d'absorbància d'una proteïna desnaturalitzada a longituds d'ona entre 276 i 282 nm. Mitjançant la relació matemàtica anterior es pot obtenir el valor del coeficient d'extinció molar de la proteïna en estat natiu.

Tot i que el valor de  $\varepsilon$  de la RNasa A nativa és conegut (apartat II.7.3.1), ha fet falta comprovar el valor de les variants de la RNasa A, tot i que a priori no semblava que les mutacions introduïdes afectessin aquest valor excepte en el cas de les variants en les quals s'havia introduït un residu de triptòfan.

A continuació es detalla el protocol, basat en el mètode d'Edelhoch, que s'ha seguit per a la determinació de  $\varepsilon$  de les variants de la RNasa A:

1. Dissoldre aproximadament 1 mg de liofilitzat de proteïna pura en 0,5 mL d'aigua Milli-Q i filtrar-la amb filtres de 0,2  $\mu\text{m}$  de diàmetre de por.

2. Paral·lelament es prepara una solució de Gdn·HCl 7 M tenint en compte la relació entre els grams de Gdn·HCl per gram d' $\text{H}_2\text{O}$  en funció de la concentració de Gdn·HCl desitjada, essent de 1,383 g Gdn·HCl/g  $\text{H}_2\text{O}$  per a una concentració de Gdn·HCl 7 M.

Per obtenir-ne uns 20 mL s'ha preparat de la següent manera:

Gdn·HCl (Fluka)	13,83 g
aigua Milli-Q	10,0 mL

3. En dues cubetes de quars d'1 cm de pas de llum i d'1 mL de capacitat, es dilueix la dissolució de proteïna en aigua Milli-Q (medi natiu) i en una dissolució de Gdn·HCl 7 M (medi desnaturalitzant), respectivament, de la següent manera:



Medi natiu

900  $\mu\text{L}$  d'aigua Milli-Q

150  $\mu\text{L}$  de la solució de proteïna preparada

Medi desnaturalitzat

900  $\mu\text{L}$  de la solució de clorur de guanidini 7 M

150  $\mu\text{L}$  de la solució de proteïna preparada

4. Tot seguit es realitza l'espectre d'absorbància de cadascuna de les dilucions anteriors i se'n determina el valor d'absorbància a 278 nm, que ha estat la longitud d'ona màxima per a totes les variants analitzades. El blanc per a cadascuna de les dues dilucions és el següent:

Medi natiu

aigua Milli-Q

Medi desnaturalitzat

900  $\mu\text{L}$  de la solució de clorur de guanidini 7 M

150  $\mu\text{L}$  d'aigua Milli-Q

5. Finalment, es determina el valor de  $\epsilon$  a 278 nm de la forma nativa de la proteïna a partir de la següent relació:

$$\epsilon_{\text{nad}} = (A_{\text{nad}}) (\epsilon_{\text{Gdn-HCl}}) / (A_{\text{Gdn-HCl}})$$

$$\text{on } \epsilon_{\text{Gdn-HCl}} = a \cdot \epsilon_{\text{Tyr}} + b \cdot \epsilon_{\text{Trp}} + c \cdot \epsilon_{\text{Cys}}$$

a, b i c corresponen als nombres de residus de tirosina, triptòfan i cisteïna per molècula de proteïna, respectivament, i es fa l'assumpció que els residus de cisteïnes contribueixen com a mitges cistines.

$\epsilon_{\text{Tyr}}$ ,  $\epsilon_{\text{Trp}}$  i  $\epsilon_{\text{Cys}}$  corresponen als coeficients d'extinció molar de compostos model per a la tirosina, triptòfan i cisteïna, respectivament, en medi desnaturalitzant (Gdn-HCl 6 M). A 278 nm,  $\epsilon_{\text{Tyr}} = 1400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{\text{Trp}} = 5600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  i  $\epsilon_{\text{Cys}} = 127 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Per a la RNasa A i les variants que no contenen triptòfan,  $\epsilon_{\text{Gdn-HCl}} (278 \text{ nm}) = 9416 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Per a les variants que contenen triptòfan,  $\epsilon_{\text{Gdn-HCl}} (278 \text{ nm}) = 13616 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .



### II.7.7. Estudi estructural per dicroisme circular (DC)

El dicroisme és l'absorció diferencial de la radiació polaritzada en dues direccions en funció de la freqüència. El dicroisme circular, DC, es basa en la detecció de la diferència entre l'absorció de llum polaritzada circular cap a la dreta i cap a l'esquerra. Aquesta tècnica permet estudiar trets generals de l'estructura secundària i terciària de les macromolècules en dissolució.

L'absorció desigual de la llum polaritzada circular (activitat òptica) de les proteïnes depèn de la disposició asimètrica dels enllaços peptídics, i, en menor proporció, de les cadenes laterals dels aminoàcids. L'espectre en la regió de l'UV llunyà depèn principalment de l'estructura secundària. La contribució en l'espectre DC de les cadenes laterals dels aminoàcids ens dona informació de l'estructura terciària de les proteïnes. A partir de 240-250 nm es troben bandes característiques de cadenes laterals d'aminoàcids que no queden encobertes amb les bandes corresponents als enllaços peptídics. Els aminoàcids que contribueixen en l'espectre DC són bàsicament: triptòfan, tirosina, cisteïnes que formen ponts disulfur, i, minoritàriament, fenilalanina i histidina (Timasheff, 1970; Adler i col., 1973; Yang i col., 1986).

El dicroisme circular es pot utilitzar pel seguiment dels canvis conformationals d'una proteïna i per calcular el contingut en hèlix  $\alpha$  i full plegat  $\beta$  de proteïnes natives.

Aparell: S'ha utilitzat un espectropolarímetre Jasco J-715 (Japan Spectroscopic Co., Ltd., Japó) equipat amb cambra de cubetes termostatitzades (Hellma Cells, EUA) i un bany d'aigua circular programable (Neslab RTE-11, EUA). Els espectres s'han enregistrat en una atmosfera de nitrogen (flux de 10 mL/h). S'han fixat les següents condicions de lectura de l'aparell:

- Sensibilitat: 20 mdeg
- Resolució: 0,2 nm
- Amplada de banda: 1,0 nm
- Velocitat de lectura: 10 nm/min
- Acumulació d'espectres: 8
- Regió de lectura: entre 190 i 250 nm pels espectres UV llunyà  
entre 250 i 310 nm pels espectres UV proper
- Temperatura: a 10°C pels espectres a l'estat natiu  
entre 20 i 30°C per sobre la temperatura de transició tèrmica  
pels espectres a l'estat desnaturalitzat
- Velocitat d'escalfament de la mostra: 1 K/min.

**Preparació de les mostres:** S'han analitzat mostres de RNasa A i les seves variants a partir de liofilitzats de proteïna pura guardats a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Es dissolen aquests liofilitzats en amortidor acetat sòdic 50 mM, pH 5,0, es filtren amb filtres de  $0,22\ \mu\text{m}$  de diàmetre de por i se'n determina la concentració de proteïna per espectrofotometria (apartat II.7.3.1). Per a les variants que no contenen triptòfan s'utilitza el  $\epsilon_{277,5} = 9800\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$  (Sela i Anfinsen, 1957), però per a les variants en les quals s'ha introduït un triptòfan s'utilitza el  $\epsilon_{278} = 13450\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$  estimat tal com s'ha descrit en l'apartat III.3.1. Posteriorment, es dilueixen en el mateix amortidor fins assolir les concentracions de 0,25 i 1,0 mg/mL (18 i 73  $\mu\text{M}$ ) per l'enregistrament de l'espectre a la regió de l'UV llunyà i proper, respectivament.

**Cubetes:** S'han utilitzat cubetes de quars circulars de 0,02 cm de pas de llum per a la regió de l'UV llunyà i de 1,0 cm per a la de l'UV proper. Les cubetes es renten prèviament amb una solució d'àcid nítric al 50 % i s'esbandeixen exhaustivament amb aigua destil·lada.

**Unitats:** L'aparell dona les mesures inicials d'activitat òptica en el·lipticitat,  $\theta_{\text{obs}}$ , (en deg). Utilitzant la funció *Arithmetics* del programa Standart Analysis s'introdueixen les mesures del pas de llum de la cubeta (en cm) i la molaritat de la mostra (M), l'aparell calcula l'el·lipticitat molar,  $[\Theta]$ , en (deg  $\text{cm}^2\ \text{dmol}^{-1}$ ). L'el·lipticitat mitja residual es calcula a partir de la massa molecular residual mitjana (*mean residual weight*, MRW). El MRW d'una proteïna és igual a la seva massa molecular dividida pel nombre de residus, que en el cas de la RNasa A és 110,35. El càlcul de l'el·lipticitat mitja residual s'obté a partir de l'equació:

$$[\Theta]_{\lambda} = (\theta_{\text{obs}} \cdot 100\ \text{MRW}) / (l \cdot c)$$

$l$  = pas de llum en cm;  $c$  = concentració em mg/mL

**Calibració:** L'aparell s'ha calibrat amb un patró JASCO no higroscòpic, l'amoni (+)-10-camforsulfonat, assumint  $[\Theta]_{290,5} = 7910\ \text{deg}\ \text{cm}^2\ \text{dmol}^{-1}$  (Takakuwa i col., 1985).

Per a cada determinació s'ha restat el blanc corresponent, segons la cubeta i l'amortidor de mostra, acetat sòdic 50 mM, pH 5,0 en tots els casos. La línia base de cada espectre s'ha igualat a 0 agafant com a referència el valor a 310 nm (el·lipticitat = 0). Els blancs s'han d'analitzar paral·lelament amb les mostres corresponents, per evitar errors deguts a petites variacions de lectura. El soroll de fons ha estat reduït utilitzant el software Jasco J-715 que l'aparell té incorporat.

Apart de l'enregistrament dels espectres a la regió de l'UV llunyà i del proper, tant de l'estat natiu com el desnaturalitzat de les mostres, s'ha dut a terme també l'enregistrament del seguiment de l'el·lipticitat, a 222 nm (dins la regió de l'UV llunyà) i a 276.4 nm (dins la regió de l'UV proper), des de l'estat natiu al desnaturalitzat, amb velocitat d'escalfament constant d'1 K/min. La temperatura de la transició s'ha determinat a partir del pic de la primera derivada dels perfils obtinguts.

S'ha estimat el contingut en hèlix  $\alpha$  de les mostres a partir dels valors d'el·lipticitat a 222 nm, tal com descriu Chen i col. (1972) per a proteïnes globulars:

$$f_H = - ([\Theta]_{222} + 2340) / 30300$$

on  $f_H$  representa la fracció d'hèlix  $\alpha$ , la qual, si es multiplica per 100 s'obté en %

### II.7.8. Calorimetria d'escombrat diferencial (DSC)

Les tècniques de calorimetria no s'han aplicat àmpliament a l'estudi termodinàmic de sistemes biològics fins fa relativament poc temps. Això era degut a la carència d'instruments suficientment sensibles i precisos per mesurar les petites quantitats de calor que acompanyen les seves transicions. En els darrers vint anys i gràcies al desenvolupament de la microelectrònica i del disseny dels instruments han estat possibles estudis calorimètrics de macromolècules biològiques a concentracions raonables i en volums petits. Les tècniques calorimètriques han permès d'obtenir una caracterització termodinàmica de transicions tèrmiques ordre-desordre de molècules biològiques interessants, així com també de processos d'unió macromolècula-l·ligand i d'unions macromolècula-macromolècula. Els sistemes biològics estudiats han estat tant proteïnes i àcids nucleics com estructures supramoleculares tals com membranes, nucleosomes i cromatina.

Hi ha dos tipus principals de metodologies calorimètriques actualment en ús, la calorimetria d'escombrat diferencial i la calorimetria de tritació isotèrmica, de les quals, la primera és la que s'ha utilitzat en aquest treball i de la que a partir d'ara es parlarà.

La calorimetria d'escombrat diferencial (DSC, de l'anglès *Differential Scanning Calorimetry*) és un mètode que mesura de manera continuada els petits canvis en la capacitat calorífica d'una mostra al llarg d'un rang de temperatura, amb escalfament o refredament continu d'aquesta i a velocitat constant. D'aquesta manera es pot obtenir una informació més completa sobre la funció capacitat calorífica i l'automatització completa

del procés. Els calorímetres d'escombrat diferencial mesuren de manera directa capacitats calorífiques diferencials, és a dir, estan formats per dues cel·les calorimètriques idèntiques, una per a la mostra i l'altra per a la referència, i les mesures consisteixen en la comparació de les seves capacitats calorífiques.

Per entendre millor la tècnica de DSC suposem un sistema format per una dissolució proteica, que se situa dins d'una de les dues cel·les de l'aparell, mentre que a l'altra cel·la s'hi col·loca una quantitat idèntica de solvent sense proteïna com a referència. L'aparell escalfa les solucions de les dues cel·les i mesura únicament el flux de calor cap a la proteïna, ja que el flux de calor cap al solvent és igual per a la mostra que per a la referència. Aquest calor absorbit per la proteïna produirà, primer, un increment del moviment vibracional i rotacional de la molècula. Una mesura d'aquest calor és la capacitat calorífica,  $C_p$ , que es defineix com la quantitat de calor necessària per elevar la temperatura de la molècula 1°C. Aquests tipus de calorímetres determinen  $C_p$  en funció de la temperatura. Valors de  $C_p$  baixos són característics d'estructures natives mentre que valors elevats són característics d'estructures obertes, desnaturalitzades o *random coil*. A mesura que la temperatura va augmentant, el sistema sofreix una transició (absorbint o cedint calor) a causa d'un canvi conformacional que normalment és una desnaturalització. L'entalpia d'aquesta transició ( $\Delta H_{cal}$ ) es determina directament per mesura de l'àrea sota de la corba que apareix en representar  $C_p$  en funció de la temperatura com es mostra en la FIGURA II.3, atès que  $\Delta H^{\circ} = \int \Delta C_p dT$ . La temperatura a la qual la reacció es troba a la meitat del seu camí correspon al màxim de la transició, és a dir, al pic característic de la corba. Aquesta temperatura s'anomena temperatura de la transició ( $T_{tr}$ ) o de desnaturalització ( $T_d$ ). La variació d'entropia de la transició ve donat pel quocient  $\Delta H_{cal}/T_{tr}$ . A partir de la forma i el punt mig de la corba, es pot obtenir informació sobre els diferents estats pels que la reacció passa, i la variació de la capacitat calorífica de la proteïna en desnaturalitzar-se ( $\Delta_d C_p$ ).

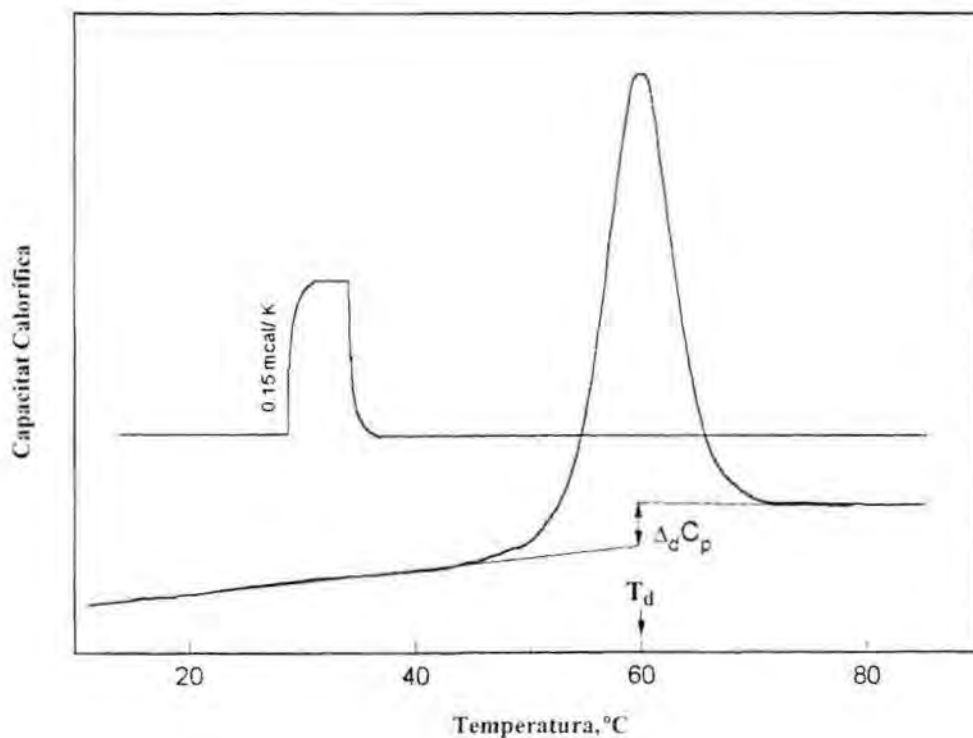
Aquest tipus de calorimetria resulta una tècnica fonamental per a l'estudi de l'estructura i propietats fisicoquímiques de les proteïnes mitjançant l'anàlisi de la seva desnaturalització tèrmica, ja que és l'única tècnica que permet la determinació directa de totes les funcions termodinàmiques associades al procés de desplegament, i a més, pot ser utilitzat per comprovar la validesa d'un model de dos estats pel procés (Donovan 1984; Privalov i Potekhin 1986, Sturtevant, 1987; Plum i Breslauer 1995).

Els experiments de DSC s'han realitzat en un microcalorímetre d'escombrat diferencial model DASM-4 (NPO Biopor, Puschino, Rússia). El disseny de les cel·les

d'aquest tipus de calorímetre presenta una sèrie d'avantatges que el fan altament sensible i precís, com són les següents:

- Tenen un volum fix i petit (0,48 mL) que permet resultats reproduïbles i precisió en la determinació de la quantitat de mostra present en l'anàlisi.

- Estan formades per tubs capilars prims disposats helicoidalment que, a més de facilitar el rentat i l'ompliment de les cel·les evitant la formació de bombolles, proporcionen uns gradients tèrmics molt petits en les solucions estudiades, els quals permeten l'ús de velocitats d'escalfament i temperatures de treball més elevades.



**FIGURA II.3**

Termograma típic de DSC per a la desnaturalització de la RNasa A a 1,05 mg/mL (77  $\mu$ M) en acetat sòdic 50 mM, pH 5,0. S'ha enregistrat la capacitat calorífica diferencial de la dissolució de RNasa A respecte al solvent. Es pot observar que la capacitat calorífica de la proteïna nativa és inferior i més depenent de la temperatura que la de la proteïna desnaturalitzada. Es mostra també la línia base que s'ha obtingut omplint les dues cel·les amb el solvent, acetat sòdic 50 mM, pH 5,0.

Les mostres analitzades han estat la RNasa A i les variants d'aquesta que no contenen triptòfan, les quals s'han preparat sempre a partir de liofilitzats de proteïna pura,



guardats a  $-20^{\circ}\text{C}$ , que s'han dissolt amb l'amortidor acetat sòdic 50 mM, pH 5,0. Aquest amortidor s'ha escollit perquè presenta una variació del pH amb la temperatura relativament baixa. Cal recordar que les proteïnes analitzades havien estat prèviament dialitzades enfront d'aigua Milli-Q abans de ser liofilitzades.

La concentració de proteïna ha oscil·lat entre 0,8 i 1,6 mg/mL (60-120  $\mu\text{M}$ ). En aquest rang de valors de concentració no s'ha vist dependència de la concentració en els paràmetres de desnaturalització de les proteïnes estudiades.

El protocol que s'ha seguit per dur a terme els experiments de DSC es detalla a continuació:

1. Preparació de la mostra:
  - a. Dissoldre aproximadament 1mg de proteïna pura amb 1 mL d'acetat sòdic 50 mM, pH 5,0, preparat amb aigua Milli-Q.
  - b. Determinar la concentració de proteïna exacta d'aquesta dissolució per espectrofotometria tal com s'ha descrit a l'apartat II.7.3.1.
2. Amb les dues cel·les de l'aparell de DSC omplertes d'aigua Milli-Q, refredar a una velocitat de refredament d'1 K/min fins a assolir  $5^{\circ}\text{C}$ .
3. Obtenció de la línia base de l'aparell:
  - a. Buidar completament el contingut de cel·les del calorímetre i omplir-les amb l'amortidor acetat sòdic 50 mM, pH 5,0, anant molt amb compte de no provocar la formació de bombolles. És aconsellable l'ús d'una xeringa per dur-ho a terme, així com també, repetir l'ompliment de les cel·les amb l'amortidor, llençant-ne el contingut la primera vegada.
  - b. Aplicar una pressió extra de 1,5 atmòsferes als extrems externs de les cel·les i mantenir-la durant el transcurs de l'experiment per tal d'evitar una possible evaporació de les solucions en ser escalfades i la formació de bombolles.
  - c. Esperar fins a assolir de nou  $5^{\circ}\text{C}$ , ja que durant l'ompliment de les cel·les la temperatura haurà pujat una mica. Deixar que s'estabilitzi aquesta temperatura.
  - d. Escalfar a una velocitat d'1K/min fins a assolir  $100^{\circ}\text{C}$  i anar enregistrant la capacitat calorífica diferencial en funció de la temperatura. Mentre s'enregistra la línia base es calibra l'instrument aplicant una potència elèctrica definida de  $25 \cdot 10^{-6}$  W en una de les dues cel·les, la qual imita un canvi en la capacitat calorífica d'aquesta cel·la que permetrà estimar  $C_p$  en unitats de capacitat calorífica.
4. Refredar a una velocitat d'1K/min fins a assolir  $5^{\circ}\text{C}$ .
5. Per obtenir el termograma típic de DSC pel desplegament tèrmic de les



ribonucleases assajades cal:

- Buidar completament el contingut d'una de les dues cel·les amb l'ajut de la xeringa i omplir-la de nou amb la dissolució proteica sense formar bombolles.
- Aplicar una pressió extra de 1,5 atmòsferes a l'aparell.
- Esperar fins a assolir de nou 5°C i deixar estabilitzar.
- Escalfar a una velocitat d'1K/min fins que el procés d'absorció de calor per part de la proteïna s'hagi acabat, que oscil·la entre uns 20 i 30°C per sobre de la temperatura al punt mig de la transició del desplegament, depenent de cada variant de ribonucleasa, i anar enregistrant la  $C_p$  diferencial en funció de la temperatura.

6. Per comprovar de manera rutinària la reversibilitat del desplegament tèrmic de les mostres:

- Refredar fins a 5°C a una velocitat de refredament igual a la d'escalfament (1K/min) i deixar que s'estabilitzi aquesta temperatura.
- Escalfar de nou a la mateixa velocitat fins a assolir la mateixa temperatura final i registrar de nou els valors de  $C_p$  en funció de la temperatura.

Les corbes de desplegament tèrmic obtingudes per a les diferents ribonucleases recombinants es corregeixen restant la línia base de l'aparell. A partir de les corbes corregides es poden calcular els paràmetres termodinàmics següents, a pressió constant, tal com descriu Privalov i Potekhin (1986):

-  $T_d$  (temperatura de desnaturalització)

Correspon a la temperatura al punt mig de la transició tèrmica del desplegament i es determina directament a partir de la corba, tal com es mostra en la FIGURA II.3.

-  $C_{p^{20}}^{\text{prot}}$  (capacitat calorífica molar parcial de la proteïna a 20°C)

Es determina a partir de l'equació:

$$C_{p^{20}}^{\text{prot}} = [C_{p^{20}}^{\text{solv}} (V_{\text{prot}}^{20} / V_{\text{solv}}^{20})] - (\Delta C_{p^{20}}^{\text{prot/solv}} / m_{\text{prot}})$$

$C_{p^{20}}^{\text{solv}} = 1 \text{ cal K}^{-1} \text{ g}^{-1}$ , correspon a la capacitat calorífica específica parcial del solvent a 20°C i s'ha pres el valor de l'aigua (Kell, 1971)

$V_{\text{prot}}^{20} = 0,70 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ , correspon al volum específic parcial de la RNasa A a 20°C calculat a partir dels volums específics parcials dels residus constituents de la RNasa A, d'acord amb Makhatadze i col. (1990)

$V_{\text{solv}}^{20} = 1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ , correspon al volum específic parcial de l'aigua a 20°C (Kell, 1971)

$\Delta C_{p^{20}}^{\text{prot/solv}}$  correspon a la capacitat calorífica diferencial entre la dissolució proteica i el solvent a 20°C i es calcula directament a partir de la corba

$m_{\text{prot}}$  correspon a la massa, en grams, de proteïna situada dins la cel·la calorimètrica

-  $\Delta H_{\text{cal}}(T_d)$  (entalpia calorimètrica de la desnaturalització)

Correspon a l'entalpia de la desnaturalització estimada per calorimetria i es determina directament per mesura de l'àrea sota del pic que apareix en representar  $C_p$  en funció de la temperatura tal com es mostra en la FIGURA II.3. Aquest paràmetre és independent de cap model i s'expressa en kcal mol<sup>-1</sup>

-  $\Delta H_{\text{vH}}(T_d)$  (entalpia efectiva o de van't Hoff de la desnaturalització)

Correspon a l'entalpia teòrica de la desnaturalització d'un model de 2 estats, que es comporta com un equilibri entre l'estat natiu i el desnaturalitzat. S'expressa en kcal mol<sup>-1</sup> i s'estima a partir de l'equació següent, basada en les relacions de van't Hoff i la forma de la corba calorimètrica:

$$\Delta H_{\text{vH}}(T_d) = 4 \cdot R \cdot T_d^2 (C_p^{\text{màx}} / \Delta H_{\text{cal}})$$

R correspon a la constant dels gasos (1,987 cal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>)

$C_p^{\text{màx}}$  i  $\Delta H_{\text{cal}}$  correspon al valor de capacitat i l'entalpia calorífica a la  $T_d$ , respectivament

-  $\Delta S_{\text{cal}}(T_d)$  (canvi d'entropia calorimètrica de la desnaturalització)

S'estima a partir de l'equació:

$$\Delta S_{\text{cal}} = \Delta H_{\text{cal}} / T_d$$

-  $\Delta_d C_p$  (variació de la capacitat calorífica específica que acompanya la desnaturalització)

Correspon a la diferència entre la capacitat calorífica de l'estat desnaturalitzat i el natiu i es calcula directament a partir de l'alçada entre la línia pre i post-transició de la corba tal com s'indica en la FIGURA II.3. S'expressa en les unitats: cal K<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>

### II.7.9. Cromatografia de gel filtració pel sistema d'HPLC

La columna de gel filtració Protein Pak 125 (Waters, Millipore Corp.) s'ha utilitzat per caracteritzar algunes de les variants de la RNasa A. Té un interval de fraccionament entre 2000 i 80000 Da per a proteïnes globulars i entre 1000 i 30000 Da per a proteïnes desnaturalitzades. S'ha utilitzat principalment per comprovar la presència de dímers en estat natiu d'algunes variants de la RNasa A.

Les condicions dutes a terme per a aquesta cromatografia s'indiquen a continuació:

Solvent:	amortidor acetat sòdic 50 mM, pH 5,0
Columna:	Protein Pak 125 amb reina de gel de sílica
Flux:	0,5 mL/min
Equilibrat:	30 min com a mínim amb el solvent
Volum de la mostra:	100 µL a una concentració 1-6 mg/mL
Elució:	isocràtica durant 30-40 min
Enregistrament:	214-280 nm

Abans de cromatografiar la mostra s'ha calibrat la columna amb una barreja de proteïnes patró: BSA, ovoalbúmina, anhidrasa carbònica, inhibidor de tripsina de soja i lisozim.

En aquestes condicions de treball, per a la RNasa A s'ha determinat un temps de retenció de 20-22 min.

### II.7.10. Espectroscòpia de fluorescència de l'estat excitat i espectroscòpia de fluorescència de fase amb multifreqüència

L'espectroscòpia de fluorescència ha estat àmpliament utilitzada en el camp de la química física de proteïnes arran dels avantatges substancials que presenta, com ara la poca quantitat de mostra que requereix i la capacitat d'estudiar la dependència en el temps dels canvis conformationals en les proteïnes. Concretament, la fluorescència originada pels residus de triptòfan s'utilitza com a una eina per detectar aquests canvis. A causa que la fenilalanina presenta un rendiment quàntic (fotons emesos/fotons absorbits) massa baix i la tirosina mostra problemes d'extinció quan està ionitzada o propera a un triptòfan, o a grups amino o carboxil, el triptòfan és el residu que més contribueix a la fluorescència de les proteïnes. El fet que les propietats fluorescents dels residues de triptòfan són sensibles a l'ambient circumdant, permet correlacionar

l'ambient del triptòfan i les propietats fluorescents d'una proteïna si es coneix l'estructura d'aquesta (Longworth, 1983) i a més presenta un únic residu de triptòfan. Això mateix és també cert per a proteïnes que tenen varis residus de triptòfan si es coneixen els temps de vida de l'estat excitat d'aquests residus individuals.

Una modalitat de l'espectroscòpia de fluorescència és la de fase amb multifreqüència. Aquest mètode consisteix en l'excitació amb llum, la intensitat de la qual està modulada sinusoidalment. Els temps de vida de l'estat excitat poden ser calculats a partir del retard en la fase i la demodulació de la llum emesa en relació a la llum utilitzada per a l'excitació (Spencer & Weber, 1969). Per a una descripció completa d'aquest mètode cal fer una remissió a Lakowicz, 1983.

En la realització d'aquest treball, s'ha utilitzat l'espectroscòpia de fluorescència convencional, de l'estat excitat, i la de fase amb multifreqüència per resoldre les propietats fluorescents (longitud d'ona de màxima emissió de fluorescència, rendiment quàntic i els temps de vida de l'estat excitat) del residu de triptòfan a la posició 115 en quatre variants de la RNasa A que contenen un únic residu de triptòfan i determinar les propietats dinàmiques d'aquestes proteïnes. Aquestes variants, obtingudes per mutagènesi dirigida per oligonucleòtid, són les següents: Y115W, I106V+Y115W, I106A+Y115W i I107L+Y115W.

#### Preparació de les mostres

Les mostres s'han preparat a partir de liofilitzats de proteïna pura guardats a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Aquests liofilitzats s'han dissolt amb l'amortidor acetat sòdic 50 mM, pH 5,0 fins a obtenir un valor d'absorbància a 295 nm d'aproximadament 0,08 UDO per a la determinació de la fluorescència de l'estat estacionari, i de 0,7-0,9 UDO per a la fluorescència de fase amb multifreqüència. Les solucions s'han filtrat amb filtres de 0,22  $\mu\text{m}$  de diàmetre de por per tal d'eliminar possibles partícules de proteïna no dissoltes.

#### Absorció a l'UV

L'absorció a l'UV ha estat mesurada en un espectrofotòmetre Unikon kontron 940.

#### Fluorescència de l'estat estacionari

La fluorescència de l'estat estacionari s'ha mesurat amb un espectrofluorímetre SPEX (Fluorolog 1691, SPEX Industries, EUA) amb clivelles d'excitació i d'emissió de 7,2 i 3,6 nm, respectivament. Els espectres s'han corregit per la dependència del monocromador d'emissió i del fotomultiplicador a la longitud d'ona, i també mitjançant

la substracció de les intensitats de fons de la solució amortidora utilitzada. El portacubetes s'ha termostatitzat a 22°C. La longitud d'ona d'excitació ha estat 295 nm per minimitzar la contribució dels residus de tirosina a la fluorescència total, assegurant que la fluorescència mesurada és deguda únicament a la del residu de triptòfan.

El rendiment quàntic de la proteïna,  $Q_{\text{prot}}$ , s'ha determinat en relació al triptòfan en solució (aigua destil·lada) segons el mètode de Parker i Rees (1960):

$$Q_{\text{prot}} = (\int I_{\text{prot}} \cdot A_{\text{Trp}} / \int I_{\text{Trp}} \cdot A_{\text{prot}}) Q_{\text{Trp}}$$

on  $\int I$  és la intensitat de fluorescència integrada de la regió de longitud d'ona d'emissió entre 300 i 450 nm

$A_{\text{Trp}}$  i  $A_{\text{prot}}$  corresponen a l'absorbància a 295 nm del triptòfan i la proteïna, respectivament

$Q_{\text{Trp}}$  és el rendiment quàntic del triptòfan en aigua, el qual segons Chen (1967) és 0,14

S'ha determinat també la longitud d'ona màxima d'emissió de fluorescència de cada variant de la RNasa A estudiada.

#### Determinació del temps de vida de l'estat excitat

Les dades del temps de vida de l'estat excitat han estat determinades utilitzant un fluorímetre automatitzat de fase amb multifreqüència. Aquest instrument és similar al descrit per Lakowicz i col. (1985) excepte per l'ús d'un fotomultiplicador (Hamamatsu H5023, EUA) d'elevat rendiment enlloc d'una placa amplificadora amb microcanals. La part de detecció ha estat descrita per Vos i col. (1997). La font d'excitació consisteix en un laser de safir dopat amb titani de freqüència constant (Spectra Physics Tsunami, Holanda) bombejat per un laser de ions  $\text{Ar}^+$  (Beamlok 2080, Spectra Physics 2080, Holanda). Després de triplicar la freqüència (Spectra Physics GWU) la longitud d'ona d'excitació és de 295 nm. Un component harmònic únic del tren de pulsacions de la llum excitada es converteix primer en una freqüència intermitja de 455 kHz a través d'una correlació creuada externa, i, a més, es filtra i s'amplifica per obtenir la llum excitada a 50 freqüències de modulació diferents, des de 1,6 MHz fins aproximadament 1 GHz. El desplaçament de fase es mesura en el domini de freqüència baixa (700 Hz) utilitzant una segona etapa de correlació creuada. D'aquesta manera, les mesures del temps de vida de l'estat excitat es calculen mitjançant la mesura del desplaçament de fase de l'emissió modulada.

Les mesures dels desplaçaments de fase s'han realitzat a 22°C. La longitud d'ona



d'emissió s'ha programat a 330, 340, 350, 360, 370 i 380 nm. S'ha utilitzat com a fluoròfor de referència el p-terfenil (dissolt en ciclohexà) amb un temps de vida de 1,04 nseg a 22°C.

Per a un fluoròfor amb relaxació exponencial de la fluorescència no única, sinó múltiple, els desplaçaments de fase mesurats,  $\phi$ , a una freqüència de modulació,  $\omega$ , de la llum excitada estan relacionats amb la relaxació de la fluorescència en el temps  $I(t)$ ,

$$I(t) = \sum_i a_i e^{-t/\tau_i}$$

on  $a_i$  és l'amplitud del senyal fluorescent del component amb un temps de vida  $\tau_i$  per mitjà de l'equació següent (Weber, 1981):

$$\tan \phi(\omega) = S(\omega)/G(\omega)$$

on  $S(\omega)$  i  $G(\omega)$  representen les transformades de Fourier sinus i cosinus de  $I(t)$ ,

$$S(\omega) = \sum_i f_i ((\omega \tau_i) / (1 + \omega^2 \tau_i^2))$$

$$G(\omega) = \sum_i f_i (1 / (1 + \omega^2 \tau_i^2))$$

on  $f_i$  representa la contribució a l'estat estacionari del component amb temps de vida  $\tau_i$  ( $f_i = a_i \tau_i / \sum_i a_i \tau_i$ ).

D'aquesta manera s'obtenen els temps de vida individuals d'una proteïna. El temps de vida promig es determina a partir dels temps de vida individuals:

$$\langle \tau \rangle = \sum_i f_i \tau_i$$

#### Determinació dels paràmetres de la relaxació de l'anisotropia

Les mesures de l'anisotropia resolta en el temps s'han obtingut a partir de la diferència de l'angle de fase, el qual depèn de la freqüència, entre els components paral·lels i perpendiculars de la fluorescència d'emissió modulada. La longitud d'ona d'emissió s'ha programat a 340 nm. Els valors s'han ajustat a una llei de relaxació de l'anisotropia multiexponencial:

$$r(t) = r_0 \sum_i g_i e^{-t/\phi_i}$$

on  $r_0$  és l'anisotropia inicial,  $\phi_i$  són els temps de correlació rotacionals i  $g_i$  les fraccions associades amb  $\sum_i g_i = 1$ . Les anàlisis s'han dut a terme assumint que cada espècie fluorescent amb temps de vida  $\tau_i$  té la mateixa funció d'anisotropia (Lakowicz i col., 1985),



### Anàlisi de les dades

Les anàlisis de les dades s'han realitzat utilitzant un algoritme de mínims quadrats no lineal (Bevington, 1969) i diverses tècniques estadístiques en el procediment d'ajust com ha estat descrit per Clays i col. (1989). Les mesures dutes a terme a diferents longituds d'ona d'emissió s'han analitzat simultàniament en una anàlisi global per tal d'augmentar la resolució dels temps de vida i de les corresponents amplituds (Beechem i col., 1983). Les dades de fase s'han ajustat utilitzant l'algoritme de Levenberg-Marquardt modificat (More i col., 1983) assumint els temps de vida de l'estat excitat que són independents de la longitud d'ona d'emissió i una relació d'amplitud variable.

## II.8. Models moleculars

Els models moleculars de les variants de la RNasa A han estat generats amb el programa TURBO-FRODO (Roussel i col., 1994). Aquest, és un programa de visualització de gràfics que parteix d'una base de dades que pot incloure tant dades experimentals de cristal·lografia de raigs X, com de RMN, com de models moleculars. En aquest treball s'han utilitzat les dades cristal·logràfiques de la RNasa A extretes del PDB, de l'anglès *Protein Data Bank*, (codi PDB: 7rsa) (Wlodawer i col., 1988) i s'hi han introduït les mutacions desitjades per tal de generar un nou fitxer de l'estructura de la variant. Posteriorment, s'ha utilitzat el programa GROMOS (Groningen Molecular Simulations, van Gunsteren i Berendsen, 1991) per portar a terme una minimització d'energia sense incloure les molècules d'aigua de l'estructura. Els models moleculars optimitzats s'han sobreposat i s'han calculat les àrees superficials accessibles al solvent utilitzant el programa XAM (Software determination and visual display of NMR structures of protein, Xia, 1992). Les estructures secundàries van ser assignades amb el programa DSSP (Dictionary of Protein Secondary Structure: Pattern Recognition of Hydrogen-Bonded and Geometrical features, Kabasch i Sander, 1983).

La generació dels models moleculars de les variants de la RNasa A estudiades en aquest treball s'ha dut a terme amb l'ajut del Servei de Biocomputació, I.B.F., de la Universitat Autònoma de Barcelona.

## **RESULTATS I DISCUSSIÓ**

### III.1. Obtenció de les variants de la ribonucleasa A

#### III.1.1. Criteris seguits per a l'elecció de les mutacions

L'objectiu general d'aquest treball, com s'ha exposat en la introducció, era obtenir informació sobre la contribució dels residus hidrofòbics de la regió 106-118 de la RNasa A a l'estabilitat global de la molècula i també sobre la importància relativa d'aquests residus dins l'esmentada regió. La regió 106-118 de la RNasa A, que està situada en el seu cor hidrofòbic, ha estat postulada per Matheson i Sheraga (1978) com a centre de nucleació o regió iniciadora del plegament proteic (CFIS).

Per assolir aquest objectiu s'ha procedit a la obtenció de variants de la RNasa A, per mutagènesi dirigida per oligonucleòtid, en les quals els residus hidrofòbics Ile106, Ile107, Val108, Ala109, Val116 i Val118 (FIGURA III.1) han estat substituïts per residus d'hidrofobicitat i tamany inferiors. Aquests residus es troben molt conservats entre la superfamília de les ribonucleases (Beintema i col., 1997), pel que fa a la seqüència i polaritat dels aminoàcids, essent la Val118 el més conservat.

Totes les mutacions excepte les substitucions Ile per Leu han estat dissenyades per truncar sistemàticament les cadenes laterals dels residus esmentats, eliminant 1, 2 o 3 grups metil/metilè de manera que la possibilitat d'introduir interaccions addicionals sigui mínima. D'aquesta manera es redueix el tamany i la hidrofobicitat del residu en qüestió. Aquest fenomen es coneix com a delecions no disruptives (Fersht, 1987) i permet comparar directament la proteïna salvatge amb les seves variants i relacionar els canvis d'estabilitat resultants en termes de pèrdua de grups metil/metilè, d'interaccions, i petits moviments de les cadenes laterals circumdants o la intervenció de molècules d'aigua per tal d'acomodar la cavitat creada.

Els elevats rendiments en la producció de la RNasa A recombinant mitjançant els protocols esmentats en l'apartat II.7.2, han possibilitat la caracterització de variants d'aquesta proteïna des del punt de vista cinètic, estructural i d'estabilitat.

D'una banda, s'han preparat les 13 variants senzilles de la RNasa A següents:

- I106L, I106V i I106A del residu Ile106
- I107L, I107V i I107A del residu Ile107
- V108A i V108G del residu Val108
- A109G del residu Ala109
- V116A i V116G del residu Val116
- V118A i V118G del residu Val118

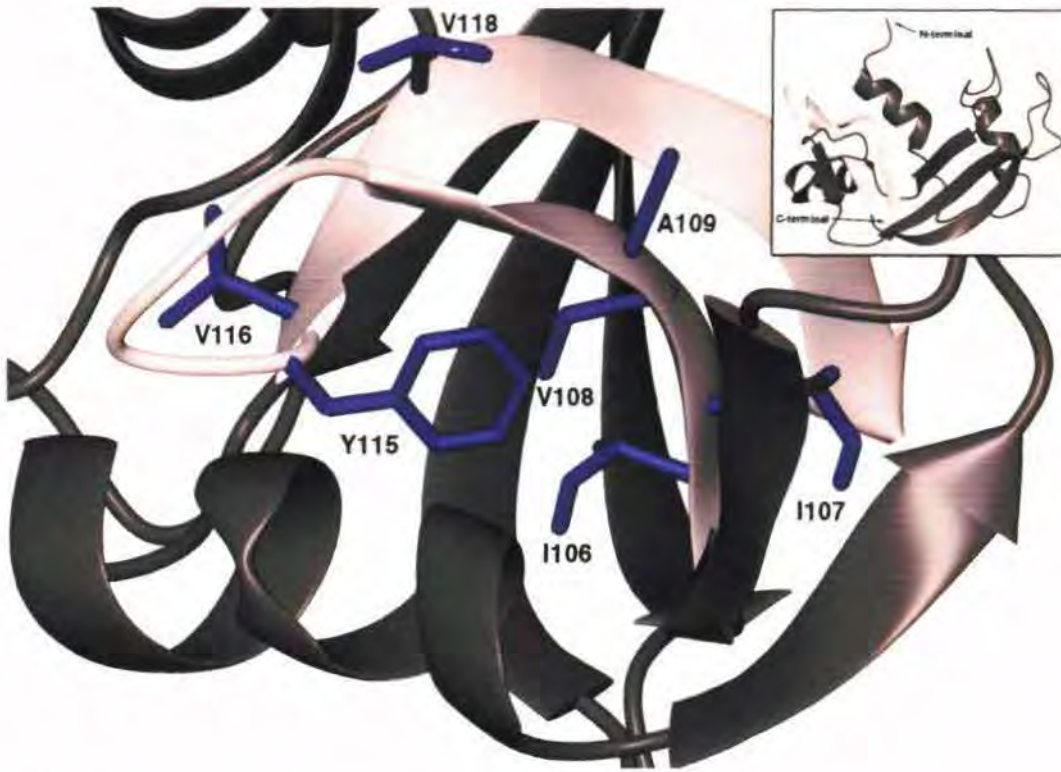
A més a més, s'han preparat 3 variants de la RNasa A en les quals, a part de l'alteració en un dels residus hidrofòbics esmentats, s'havia substituït el residu Tyr115 (FIGURA III.1) per un triptòfan. Aquesta substitució proporciona la presència d'un sol residu de triptòfan en la cadena polipeptídica de la RNasa A, la fluorescència del qual pot ser correlacionada amb el seu ambient circumdant, atès que Torrent (1996) havia observat que la substitució de la Tyr115 per un triptòfan en la RNasa A gairebé no pertorbava l'estabilitat de la proteïna. Mercès que en el nostre grup de treball es disposava de la construcció pUC119.Y115W (Torrent, 1996), en la qual el cDNA de la RNasa A s'havia mutat per substituir el residu de tirosina de la posició 115 per un triptòfan, es va utilitzar aquesta construcció com a DNA motllo per obtenir mutants dobles del gen de la RNasa A. Per assajar la fluorescència d'aquest triptòfan com a sonda per detectar canvis conformationals en la proteïna causats per l'efecte d'una altra substitució, en la regió 106-118 de la RNasa A, es van preparar les tres variants dobles següents:

- I106V+Y115W
- I106A+Y115W
- I107L+Y115W

L'elecció de les mutacions I106V, I106A i I107L per a l'obtenció d'aquestes variants dobles es va fer, principalment, en base als resultats obtinguts prèviament per a les variants senzilles de la proteïna mitjançant DSC. Es va escollir una sèrie de tres tipus distints de substitucions que donessin lloc a una desestabilització diferenciada de les proteïnes variants, en relació a la RNasa A, i que, a la vegada, no mostressin valors de la relació entre l'entalpia calorimètrica i l'entalpia de van't Hoff significativament diferents a 1. L'elecció del tipus de mutació Ile per Leu es va fer pel caràcter dirisruptiu d'aquesta.

Amb aquestes 3 variants dobles es va decidir comprovar si el residu Trp115 podia servir de sonda local de mutacions realitzades en residus de la regió 106-118. Això s'ha dut a terme mitjançant l'estudi de les propietats fluorescents del residu Trp115 per espectroscòpia de fluorescència de l'estat excitat i per una modalitat d'aquesta espectroscòpia, la de fase amb multifreqüència.





**FIGURA III.1**

Representació esquemàtica de l'estructura tridimensional de la RNasa A mostrant elements d'estructura secundària i els residus proposats per ser substituïts (color blau). La regió CFIS (residus 106-118) està formada per una estructura en full plegat  $\beta$  antiparal·lela *hairpin-like*. El  $\beta$ -*hairpin* clàssic (color gris clar) està format per la 6a (residus 106-111) i 7a (residus 116-123) cadena  $\beta$  i conté un gir  $\beta$  del tipus VI, causat per la presència d'una prolina en conformació *cis*, Pro114, en Gly112-Tyr115 com s'identifica a partir de l'estructura cristal·lina (Wlodawer i col., 1988).

### III.1.2. Construcció dels vectors pBXR+mutació

En aquest apartat es descriu, en primer lloc, la construcció del vector pUC119 amb el gen (cDNA) de la RNasa A, pUC119.BPR, a partir del qual es construiran els vectors amb el gen de la RNasa A mutat, pUC119.BPR+mutació. Finalment es descriu el subclonatge del gen de la RNasa A mutat en el vector d'expressió pET22b(+) que dona lloc a la construcció del vector pBXR+mutació.

### III.1.2.1. Construcció del vector pUC119.BPR

A partir del vector pBXR (apartat II.2.2) cedit pel Dr. R.T. Raines de la Universitat de Wisconsin-Madison (Wisconsin, EUA), que correspon a una construcció que conté el gen que codifica la RNasa A (del Cardayré i col., 1995) inserit en el vector pET22b(+), es va procedir al subclonatge del gen de la RNasa A en el vector pUC119. Aquest vector és el recomanat pel procés de mutagènesi dirigida per PCR que s'ha utilitzat en aquest treball ja que els programes del termociclador utilitzats estan dissenyats considerant com a vector el pUC119.

Per a l'obtenció del vector pUC119 que portés el gen que codifiqui la RNasa A (pUC119.BPR) es va seguir l'esquema que es presenta en la FIGURA III. 2.

El seguit d'etapes que es van portar a terme per a l'obtenció del vector pUC119.BPR es descriuen breument a continuació.

#### 1. Purificació del fragment BPR-*Hin* dIII-*Xba* I

A partir d'un cultiu de nit d'*E. coli* BL21(DE3)-[pBXR] es va realitzar una extracció de DNA plasmídic i es va sotmetre a digestió amb *Hin* dIII i *Xba* I. El vector així digerit va permetre purificar a partir d'electroforesi en gel d'agarosa el fragment d'aproximadament 0,5 kb corresponent al gen BPR i a la seqüència del pèptid senyal *peIB*.

#### 2. Obtenció de pUC119-*Hin* dIII-*Xba* I

A partir d'un cultiu de nit d'*E. coli* TG1-[pUC119] es va extreure el DNA plasmídic, el qual es va digerir amb els enzims de restricció *Hin* dIII i *Xba* I. El vector linealitzat es va purificar a partir d'electroforesi en gel d'agarosa.

#### 3. Lligament i transformació

Es va realitzar un lligament direccional entre el vector pUC119-*Hin* dIII-*Xba* I i el fragment *Hin* dIII-*Xba* I obtingut a partir de la construcció pBXR. La mescla de lligament es va utilitzar per transformar cèl·lules competents d'*E. coli* TG1 que es van sembrar en placa LB+Ap. Es va utilitzar la soca TG1 d'*E. coli* perquè es tracta d'una soca idònia per a la propagació i manipulació de vectors ja que creix molt bé en medis rics i té una elevada taxa de transformabilitat.

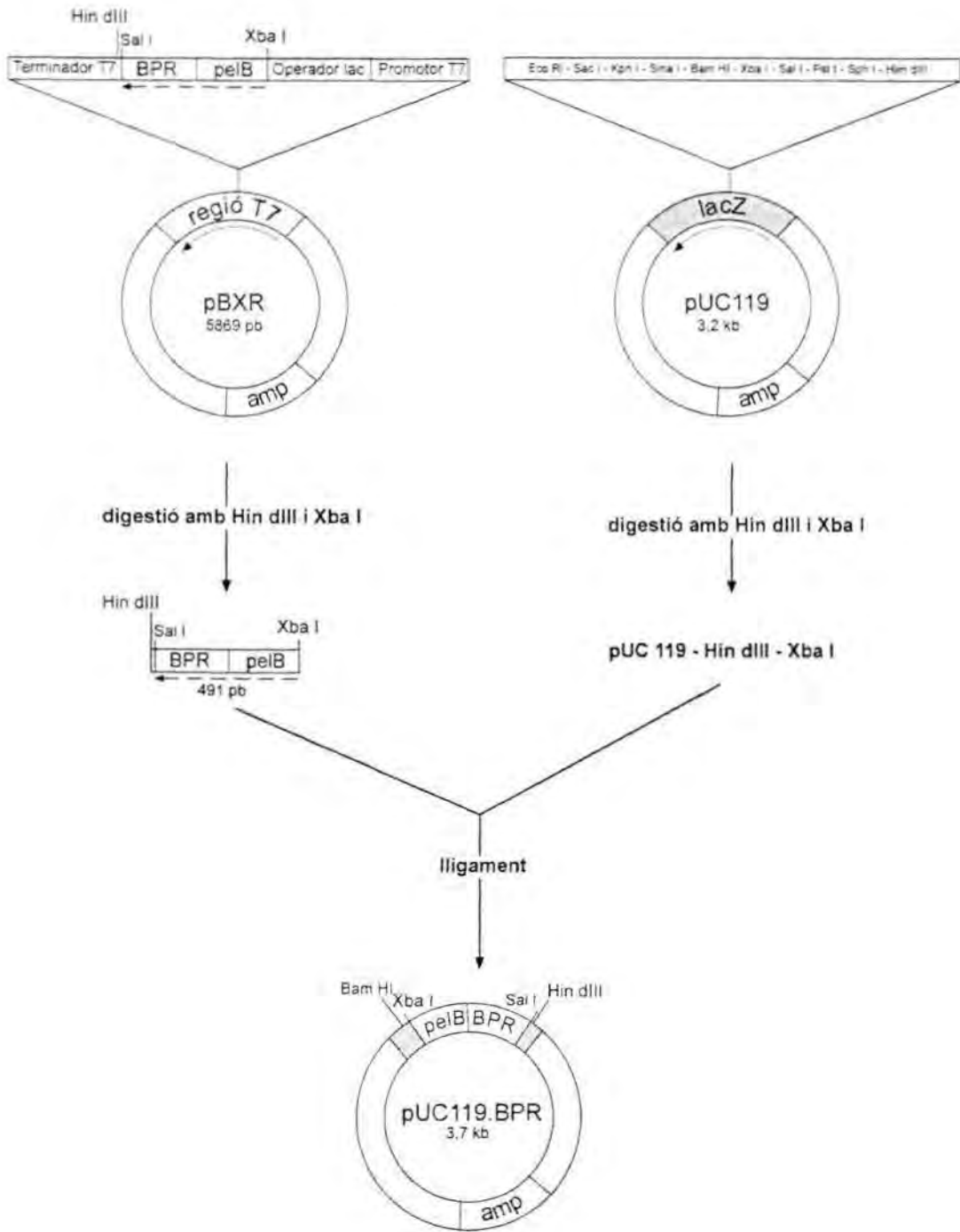


FIGURA III.2

Construcció del vector pUC119.BPR. El gen BPR del vector pBXR es va obtenir per digestió amb *Hin* dIII i *Xba* I. L'insert, una vegada purificat, es va clonar en el vector pUC119 que havia estat prèviament tallat amb *Hin* dIII i *Xba* I per donar lloc al vector pUC119.BPR. amp, gen de resistència a l'ampicil·lina; lac Z, darrera part del gen lac Z; BPR, gen de la RNasa A; *pelB*, seqüència del pèptid senyal d'exportació.

#### 4. Selecció de transformants

De les varies colònies resistents a l'ampicil·lina que es van obtenir, se'n van cultivar 5 per tal d'obtenir-ne el DNA plasmídic, el qual posteriorment es va sotmetre a una anàlisi de restricció per esbrinar si s'havia inserit el gen en els diferents clons. En el primer pas d'aquesta anàlisi es va digerir el DNA plasmídic amb els enzims de restricció *Sal* I i *Xba* I. Dels clons que apareixia una banda d'aproximadament 0,5 kb, corresponent al gen més la seqüència del pèptid senyal *pe/B*, es va repetir la digestió però només amb un dels dos enzims de restricció. De tots clons es va observar una única banda d'aproximadament 3,7 kb, cosa que va confirmar que s'havia inserit un únic fragment en el vector pUC119 digerit amb *Hin* dIII i *Xba* I i no tres còpies seguides del fragment com podia haver succeït.

#### 5. Seqüenciació del gen

Es va procedir a comprovar que la seqüència del gen. Per a la seqüenciació, es va agafar com a DNA motllo el producte purificat d'una amplificació per PCR del gen BPR clonat a pUC119 tal i com s'ha descrit en l'apartat II.6. El resultat va indicar que la seqüència del gen de la RNasa A clonat es corresponia exactament a la descrita per delCardayré i col. (1995) (FIGURA III.3).

```

LysGluThrAlaAlaAlaLysPheGluArgGlnHisMetAspSerSerThrSerAlaAla20
AAGGAAACTGCAGCAGCCAAGTTTGAGCGGCAGCACATGGACTCCAGCACTTCCGCTGCC

SerSerSerAsnTyrCysAsnGlnMetMetLysSerArgAsnLeuThrLysAspArgCys40
AGCAGCTCCAACACTACTGTAACCAGATGATGAAGAGCCGGAACCTGACCAAAGATCGATGC

LysProValAsnThrPheValHisGluSerLeuAlaAspValGlnAlaValCysSerGln60
AAGCCAGTGAACACCTTTGTGCACGAGTCCCTGGCTGATGTCCAGGCCGTGTGCTCCCAG

LysAsnValAlaCysLysAsnGlyGlnThrAsnCysTyrGlnSerTyrSerThrMetSer80
AAAAATGTTGCCTGCAAGAATGGGCAGACCAATTGCTACCAGAGCTACTCCACCATGAGC

IleThrAspCysArgGluThrGlySerSerLysTyrProAsnCysAlaTyrLysThrThr100
ATCACCGACTGCCGTGAGACCGGCAGCTCCAAGTACCCCAACTGTGCCTACAAGACCACC

GlnAlaAsnLysHisIleIleValAlaCysGluGlyAsnProTyrValProValHisPhe120
CAGGCGAATAAACACATCATTGTGGCTTGTGAGGGAAACCCGTACGTGCCAGTCCACTTT

AspAlaSerVal
GATGCTTCAGTG

```

**FIGURA III.3**

Seqüència de nucleòtids del cDNA que codifica la RNasa A amb la corresponent seqüència d'aminoàcids segons delCardayré i col. (1995).



### III.1.2.2. Construcció dels vectors pUC119.BPR+mutació

Per a la construcció dels 16 vectors pUC119 que portessin el gen que codifica la RNasa A amb la mutació desitjada (I106L, I106V, I106A, I107L, I107V, I107A, V108A, V108G, A109G, V116A, V116G, V118A, V118G, I106V+Y115W, I106A+Y115W o I107L+Y115W), es va seguir el procés que es descriu a continuació:

#### Disseny dels oligonucleòtids

Partint de la seqüència de nucleòtids del cDNA de la RNasa A (FIGURA III.3) es van dissenyar els oligonucleòtids mutagènics que permetessin introduir els canvis desitjats. Per al seu disseny es va tenir en compte, a més dels principis generals exposats a l'apartat II.5.1, l'ús de codó per part d'*E. coli* i l'ús de codó de la resta del gen, de manera que es va seleccionar aquell codó que és molt utilitzat per *E. coli* i que més s'assembla a l'original del gen. Els oligonucleòtids utilitzats per a l'obtenció dels mutants foren els que es presenten en la TAULA III.1.

TAULA III.1 - Oligonucleòtids utilitzats per a l'obtenció de les variants de la RNasa A

Mutació	Seqüència de l'oligonucleòtid o encebador mutagènic <sup>a</sup>
I106L	5' -TCC CTC ACA AGC CAC AAT <u>CAG</u> GTG TTT ATT CGC CTG GGT- 3'
I106V	5' -CAG GCG AAT AAA CAC <u>GTG</u> ATT GTG GCT TGT GAG- 3'
I106A	5' -CAG GCG AAT AAA CAC <u>GCT</u> ATT GTG GCT TGT GAG- 3'
I107L	5' -G GCG AAT AAA CAC ATC <u>CTG</u> GTG GCT TGT GAG GG- 3'
I107V	5' -TT TCC CTC ACA AGC CAC <u>CAC</u> GAT GTG TTT ATT CGC CTG- 3'
I107A	5' -TT TCC CTC ACA AGC CAC <u>AGC</u> GAT GTG TTT ATT CGC CTG- 3'
V108A	5' -CG AAT AAA CAC ATC ATT <u>GCG</u> GCT TGT GAG GGA AAC- 3'
V108G	5' -CG AAT AAA CAC ATC ATT <u>GGC</u> GCT TGT GAG GGA AAC- 3'
A109G	5' -AT AAA CAC ATC ATT GTG <u>GGC</u> TGT GAG GGA AAC CC- 3'
V116A	5' -AG GGA AAC CCG TAC <u>GCG</u> CCA GTC CAC TTT GAT- 3'
V116G	5' -AG GGA AAC CCG TAC <u>GGC</u> CCA GTC CAC TTT GAT- 3'
V118A	5' -AC CCG TAC GTG CCA <u>GCG</u> CAC TTT GAT GCT TCA G- 3'
V118G	5' -AC CCG TAC GTG CCA <u>GGC</u> CAC TTT GAT GCT TCA G- 3'

<sup>a</sup>Els nucleòtids subratllats són els corresponents al triplet alterat i els escrits en negreta són els modificats

Els oligonucleòtids dissenyats tenien una longitud que oscil·lava entre les 32 i 39 bases i eren complementaris a una de les dues cadenes del cDNA de la RNasa A excepte en el/els nucleòtid/s del codó que calia modificar. A priori, tots els oligonucleòtids es van dissenyar de manera que fossin complementaris a la mateixa cadena del gen, però a causa que la mutagènesi per a l'obtenció dels mutants I106L, I107V i I107A va fracassar, es van tornar a dissenyar per aquests tres casos els oligonucleòtids corresponents de manera que fossin complementaris a l'altra cadena del gen.

### Obtenció dels vectors pUC119.BPR+mutació

#### 1. Reaccions de mutagènesi:

Es va utilitzar la tècnica de mutagènesi dirigida per oligonucleòtid mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) que permet treballar amb dsDNA com a motllo. Atès que la metodologia de la PCR per a la mutagènesi dirigida per oligonucleòtid ha estat criticada pel problema de la manca de fiabilitat, en aquest treball s'ha utilitzat la polimerasa de DNA de *Pyrococcus sp.* GB-D (comercialment coneguda com a *Deep Vent*<sup>®</sup>) enlloc de la comunament utilitzada de *Thermus aquaticus* (*Taq*), la qual careix d'activitat exonucleasa correctora 3'→5'. La fidelitat d'una polimerasa de DNA que té activitat 3'→5', com ara la *Deep Vent*<sup>®</sup>, és de com a mínim 10 vegades més elevada que l'observada per la *Taq* (Tindall i col., 1988). Juncosa-Ginestà i col. (1994) van determinar que la mutagènesi dirigida per oligonucleòtid mitjançant PCR usant la *Deep Vent*<sup>®</sup> aconsegueix una eficiència elevada de mutagènesi (xifrada en un 98-100%).

Donat que el procediment encaminat a l'obtenció dels 13 mutants senzills i els 3 mutants dobles del gen de la RNasa A era pràcticament idèntic, amb la utilització dels oligonucleòtids mutagènics corresponents i el dsDNA motllo adient (el vector pUC119.BPR pels mutants senzills i el vector pUC119.Y115W pels dobles mutants) com a úniques diferències, les modificacions del gen BPR es van dur a terme seguint el protocol que es mostra a l'esquema general de tot el procés, a la FIGURA III.4.



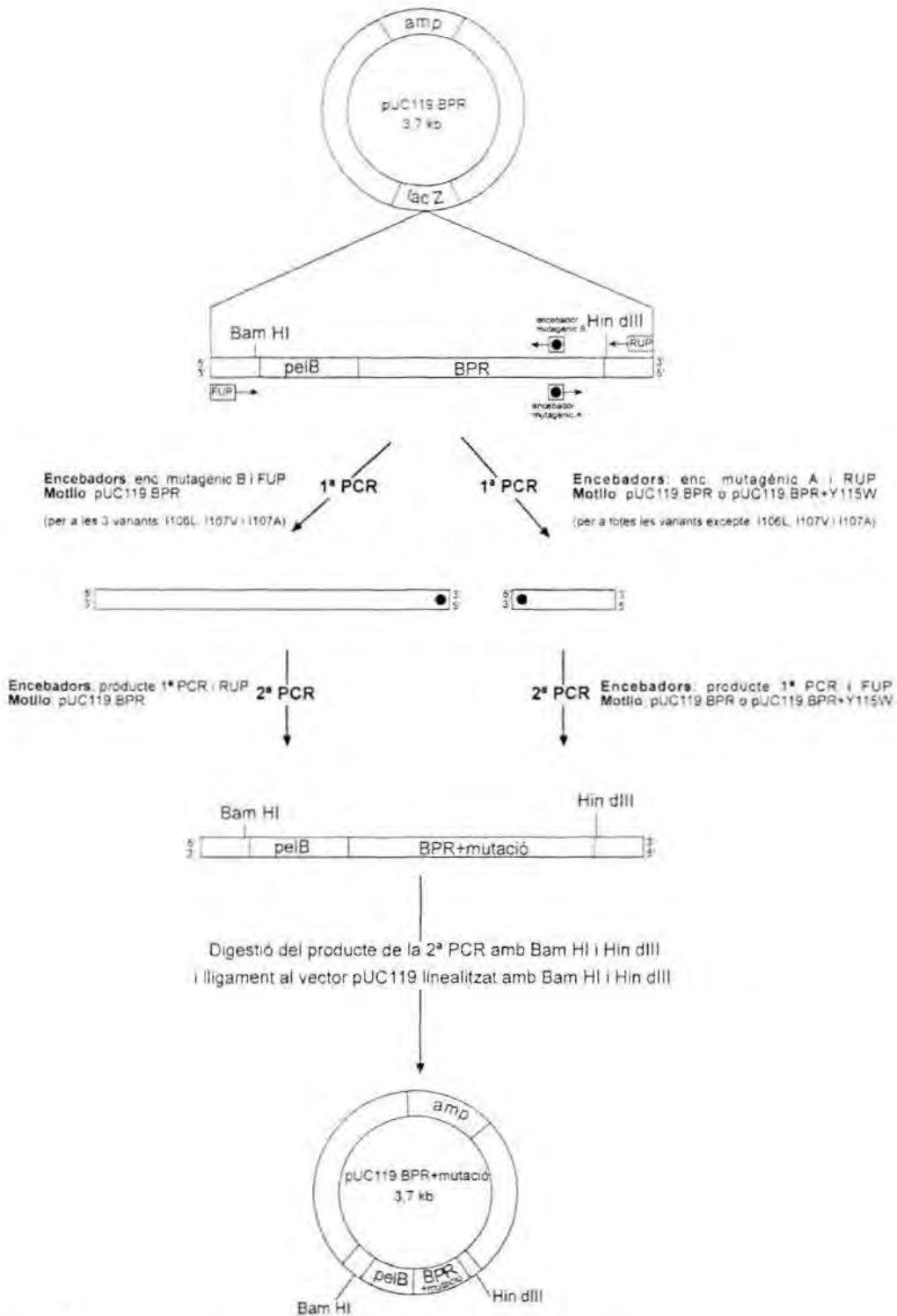


FIGURA III.4

Esquema general del procés de mutagènesi dirigida per oligonucleòtid (SDM) per PCR que s'ha dut a terme per obtenir els mutants senzills i dobles del gen de la RNasa A. FUP: *forward universal primer*, RUP: *reverse universal primer*.

Per a les reaccions de mutagènesi del procés esquematitzat en la FIGURA III.4 es van seguir els passos següents:

a. Obtenció de DNA motllo (pUC119.BPR o pUC119.BPR+mutació)

A partir d'un cultiu O/N d'*E. coli* TG1-[pUC119.BPR] o *E. coli* TG1-[pUC119.Y115W] es va realitzar una extracció de DNA plasmídic i se'n va purificar la forma de doble cadena covalentment tancada (dsDNA<sub>ccc</sub>) a partir de gel d'agarosa.

b. 1a PCR

En la 1a PCR es va amplificar una part del fragment inserit al vector pUC119, la compresa entre les regions a les que hibriden l'encebador mutagènic i un dels encebadors universals (RUP en tots els casos excepte per a les mutacions I106L, I107V o I107A que es va utilitzar el FUP).

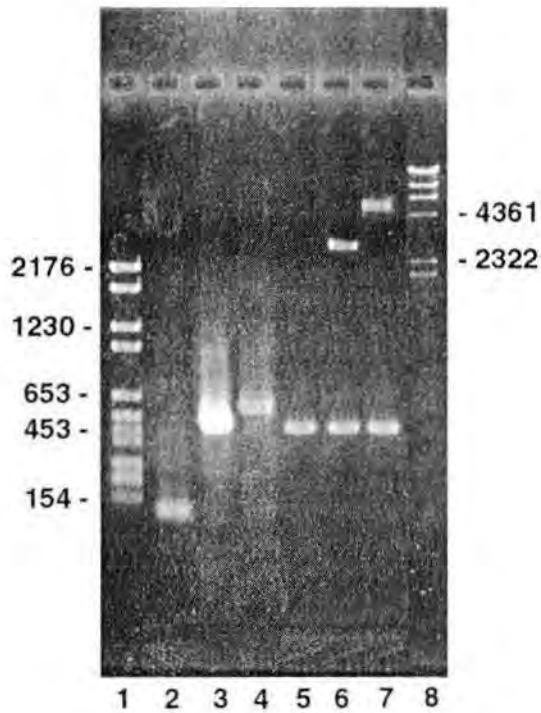
c. 2a PCR

El producte de la 1a PCR es va precipitar i purificar a partir de gel d'agarosa per ser utilitzat com a encebador per a la 2a PCR junt a l'encebador universal contrari al que s'havia utilitzat en la 1a PCR. D'aquesta manera, el producte de la 2a PCR correspon al fragment amplificat des de RUP fins a FUP.

El procés de mutagènesi per a cada una de les variants de la RNasa A va ser analitzat mitjançant electroforesi en gel d'agarosa. A la FIGURA III.5 es presenta un resum d'aquestes anàlisis.

Tal com es pot observar en la FIGURA III.5 els productes de la primera PCR tenen una longitud diferent en funció del disseny dels oligonucleòtids i l'encebador universal utilitzat. Per a l'obtenció de les totes les mutacions a excepció de I106L, I107V o I107A s'han utilitzat com a encebadors els oligonucleòtids dissenyats complementaris a una de les cadenes del gen BPR i el *Reverse Universal Primer* (RUP), mentre que per a les mutacions I106L, I107V o I107A s'han utilitzat els oligonucleòtids dissenyats complementaris a l'atra cadena del gen BPR i el *Forward Universal Primer* (FUP). D'aquesta manera es generen productes de tamany 101-137 pb en el primer cas (carrer 2) i de 506-509 pb en el segon cas (carrer 3). Pel que fa al producte que es genera en la segona PCR, s'obté en tots els casos un fragment de 609 pb (carrer 4) ja que s'utilitzen com a encebadors els productes de la primera PCR i l'encebador universal contrari al

que s'havia utilitzat en la primera PCR, la qual cosa genera fragments amplificats des de RUP fins a FUP.



**FIGURA III.5**

Electroforesi en gel d'agarosa-TAE a l'1,4% del proces de mutagènesi dirigida per oligonucleòtid mitjançant PCR. **1.** Marcadors de massa molecular de Boehringer Mannheim (pBR328-*Bgl* I-*Hinf* I): 2176, 1766, 1230, 1044, 653, 517, 453, 394, 298, 234, 220 i 154 pb. **2.** Producte de la primera PCR per a les mutacions I106V, I106A, I107L, V108A, V108G, A109G, V116A, V116G, V118A, V118G, I106V+Y115W, I106A+Y115W o I107L+Y115W. **3.** Producte de la primera PCR per a les mutacions I106L, I107V o I107A. **4.** Producte de la segona PCR per a les diverses mutacions. **5.** Producte de la segona PCR digerit amb *Hin* dIII i *Bam* HI. **6.** Vector pUC119.BBR+mutació digerit amb *Hin* dIII i *Bam* HI. **7.** Vector pBXR+mutació digerit amb *Sal* I i *Xba* I. **8.** Marcadors de massa molecular de New England Biolabs (Lambda DNA-*Hin* dIII): 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125 pb.

Una vegada s'havien dut a terme les reaccions de mutagènesi, es va procedir al clonatge del gen de la RNasa A presumptament mutat al vector seleccionat (pUC119),

a través de les dianes de restricció *Hin* dIII i *Bam* HI, tal com s'indica a continuació i s'esquematitza en la FIGURA III.4.

#### 2. Obtenció del fragment BPR+mutació-*Hin* dIII-*Bam* HI

El producte de la segona PCR, que suposadament conté el gen BPR amb la mutació incorporada, es va precipitar i purificar a partir d'un gel d'agarosa, i es va digerir amb els enzims de restricció *Hin* dIII i *Bam* HI. El fragment d'aproximadament 0,5 kb que conté el gen BPR presumptament mutat es va purificar de nou a partir de gel d'agarosa (carrer 5, FIGURA III.5).

#### 3. Obtenció del vector pUC119-*Hin* dIII-*Bam* HI

A partir d'un cultiu de 3 mL d'*E. coli* TG1-[pUC119] es va extreure el DNA plasmídic i es va sotmetre a digestió amb *Hin* dIII i *Bam* HI. El fragment corresponent al vector linealitzat es va purificar a partir de gel d'agarosa.

#### 4. Lligament i transformació

Es va realitzar un lligament direccional entre pUC119-*Hin* dIII-*Bam* HI i el fragment BPR+mutació-*Hin* dIII-*Bam* HI. La barreja de lligament es va utilitzar per transformar cèl·lules competents d'*E. coli* TG1 que es van sembrar en placa LB+Ap.

#### 5. Selecció de transformants

De les diverses colònies resistents a l'ampicil·lina que es van obtenir, se'n van cultivar 5. Per tal d'esbrinar si s'havia inserit el gen en els diferents clons, es va extreure el DNA plasmídic i es va sotmetre a una primera anàlisi de restricció utilitzant els enzims *Hin* dIII i *Bam* HI. Dels clons que apareixia una banda d'aproximadament 0,5 kb (carrer 6, FIGURA III.5) es va repetir la digestió, però només amb un dels dos enzims de restricció. De tots clons es va observar una única banda d'aproximadament 3,7 kb, cosa que va confirmar que s'havia inserit un únic fragment en el vector pUC119 digerit amb *Hin* dIII i *Bam* HI i no tres còpies seguides del fragment.

#### 6. Seqüenciació del gen

La comprovació de la validesa de les mutacions es va fer mitjançant la seqüenciació del DNA tal com es descriu en l'apartat II.6. Els resultats d'aquestes seqüenciacions van mostrar que en la seqüència del gen de la RNasa A només s'hi havia introduït la mutació desitjada.

### III.1.2.3. Subclonatge dels gens mutats al vector pET22b(+)

El procés de clonatge del gens de la RNasa A mutats del vector pUC119 al vector d'expressió pET22b(+) s'esquematitza en la FIGURA III.6. Es va escollir un vector de la sèrie pET per a la producció heteròloga de la RNasa A atès que aquests vectors utilitzen el fort promotor de la polimerasa de T7 per dirigir l'expressió dels gens clonats, la qual cosa fa que les proteïnes resultants siguin produïdes en quantitats elevades.

#### 1. Obtenció del fragment BPR+mutació-*Hin* dIII-*Xba* I

A partir d'un cultiu de 10 mL d'*E. coli* TG1-[pUC119.BPR+mutació], es va fer una extracció de DNA plasmídic, el qual es va digerir amb els enzims de restricció *Hin* dIII i *Xba* I. El fragment que conté el gen de la RNasa A mutat es va purificar a partir de gel d'agarosa.

#### 2. Obtenció del vector pET22b(+)-*Hin* dIII-*Xba* I

Es va fer una extracció de DNA plasmídic de 10 mL d'un cultiu d'*E. coli* TG1-[pET22b(+)] i es va digerir amb *Hin* dIII i *Xba* I. El vector linealitzat es va purificar a partir d'un gel d'agarosa.

#### 3. Lligament i transformació

Es va realitzar el lligament direccionat entre pET22b(+)-*Hin* dIII-*Xba* I i el fragment BPR+mutació-*Hin* dIII-*Xba* I. La barreja de lligament es va utilitzar per transformar cèl·lules competents d'*E. coli* BL21(DE3) que es van sembrar en placa LB+Ap.

#### 4. Selecció de transformants

De les diverses colònies resistents a l'ampicil·lina que es van obtenir, se'n van cultivar 5 en 4 mL de medi líquid LB+Ap. D'aquests cultius se'n va guardar 0,75 mL en forma de glicerinat i de la resta es va fer una extracció del DNA plasmídic. Per tal d'esbrinar si s'havia inserit el gen en els diferents clons, es va extreure el DNA plasmídic i es va sotmetre a una anàlisi de restricció amb *Sal* I i *Xba* I. Aquesta anàlisi de restricció va mostrar una banda d'aproximadament 0,5 kb en gairebé tots els clons (carrer 7, FIGURA III.5). Posteriorment, es va repetir la digestió però només amb un dels dos enzims de restricció i es va observar una única banda d'aproximadament 5,9 kb, fet que va confirmar que s'havia inserit un únic fragment en el vector pET22b(+) digerit amb *Hin* dIII i *Xba* I i no tres còpies seguides del fragment.

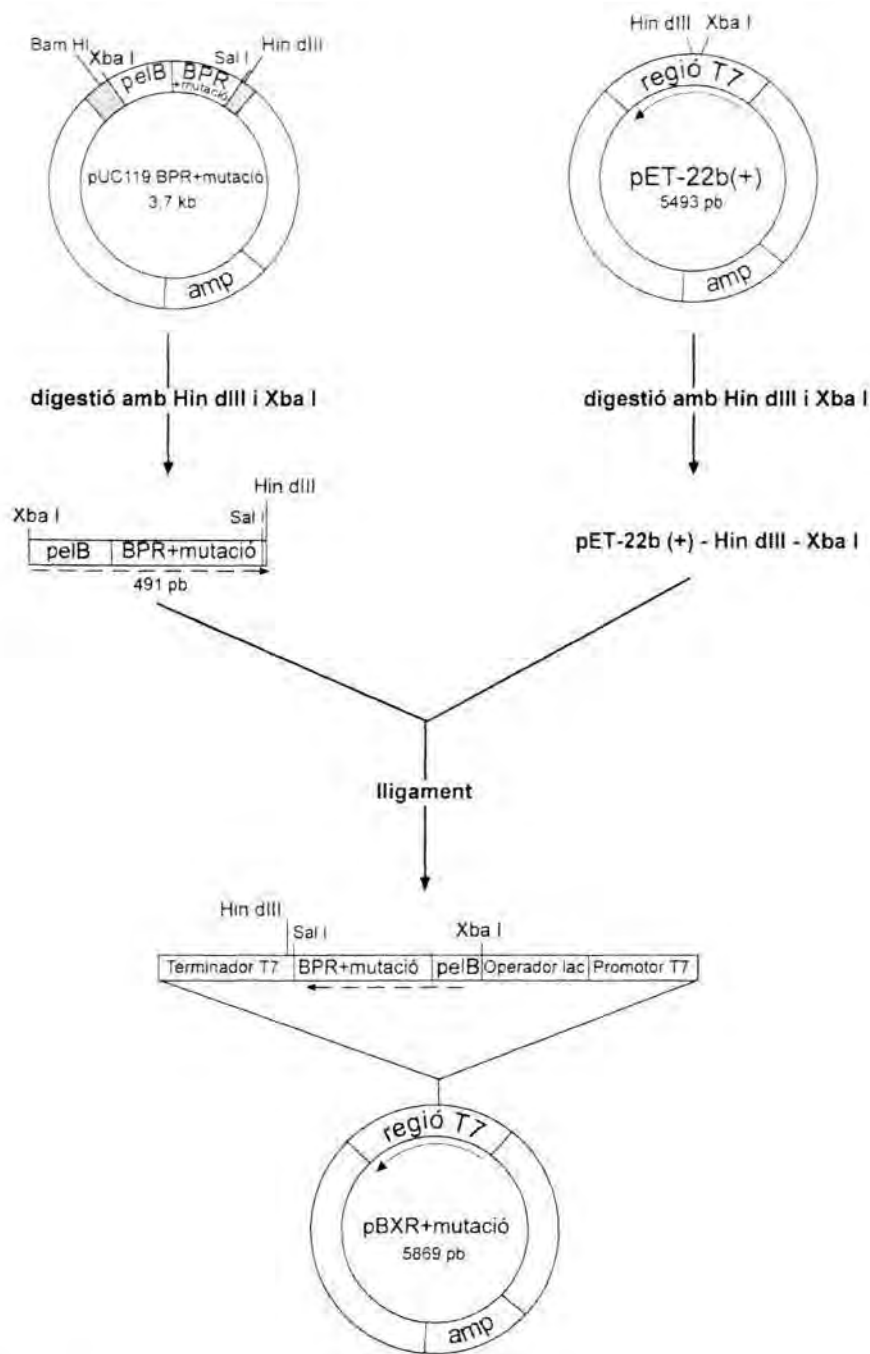


FIGURA III.6

Subclonatge del gen BPR+mutació al vector d'expressió pET22b(+), a través de les dianes *Hin* dIII i *Xba* I. La construcció final és anomenada pBXR+mutació.



### III.1.3. Expressió de la RNasa A i les seves variants en *E. coli* BL21(DE3)

Per a l'expressió de la RNasa A i les 16 variants d'aquesta s'ha partit de glicerinat de cèl·lules d'*E. coli* BL21 (DE3) transformades amb el vectors d'expressió que contenen el gen salvatge i el mutat de la RNasa A, descrits en l'apartat anterior com a pBXR i pBXR+mutació, respectivament. També s'hi ha inclòs l'expressió del mutant Y115W de la RNasa A, del qual es disposava, en el nostre grup de treball, de glicerinat d'*E. coli* BL21(DE3) transformats amb el vector d'expressió pBXR.Y115W.

#### III.1.3.1. Comparació de l'expressió de la RNasa A i les seves variants

Abans de començar a produir les diferents variants de la RNasa A recombinant de cara a la seva purificació, es va dur a terme una prova d'expressió, comparada a l'expressió de la proteïna salvatge. Amb aquesta prova es pretenia veure si els nivells d'expressió de les diferents variants era similar a la de la rRNasa A.

Es va partir de cultius de nit de 3 mL d'*E. coli* BL21(DE3)-[pBXR] i d'*E. coli* BL21(DE3)-[pBXR+mutació] en LB+Ap (400 µg/mL), cadascun dels quals es va inocular en 10 mL de LB+Ap (50 µg/mL) a una relació 1/100 d'aquest volum. Tots els cultius es van incubar a 37°C en agitació (250 r.p.m.) durant 2-3 hores (fins que el valor de l'A<sub>550</sub> es trobava entre 1 i 1,5 UDO). Posteriorment, es va retirar una alíquota d'1 mL de cadascun dels cultius, la qual es va centrifugar a 12000 xg i el sediment cel·lular resultant es va resuspendre en 100 µL d'amortidor d'aplicació d'electroforesi en gels de poliacrilamida-SDS. Paral·lelament, es van induir els cultius a expressar el cDNA que codifica la RNasa A (o variants d'aquesta) amb l'addició d'IPTG a una concentració final d'1 mM i es van deixar créixer de nou durant 2 hores i 30 minuts més. Una vegada transcorregut aquest temps es va retirar una altra alíquota d'1 mL de cadascun dels cultius, la qual es va centrifugar i resuspendre de la mateixa manera que s'havia fet abans.

L'anàlisi de la producció de les proteïnes recombinants es va dur a terme mitjançant el mètode electroforètic en gel de poliacrilamida-SDS amb poli(C) revelat per activitat (zimograma) (Bravo i col., 1994). Aquesta anàlisi permet detectar la presència d'activitat ribonucleasa, determinar la mobilitat electroforètica de la banda responsable de l'activitat, i també permet discriminar l'activitat provinent de ribonucleases pròpies d'*E. coli*, de massa molecular diferent. En la FIGURA III.7 s'exemplifica un zimograma, juntament amb un gel sense poli(C) tenyit amb Blau de Coomassie, amb mostres de cultius d'*E. coli* que expressen la RNasa A i les seves variants I106L, I106V i I106A.

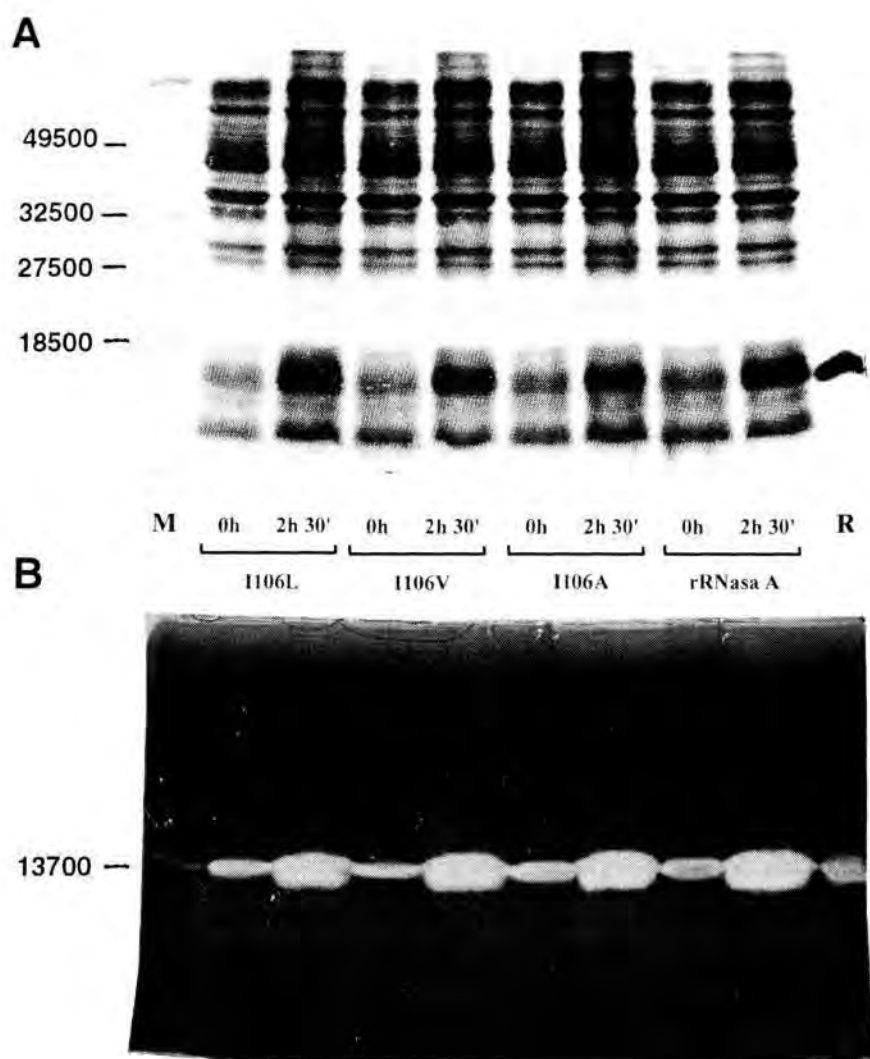


FIGURA III.7

(A) Electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS al 15 % tenyit amb Blau de Coomassie, de mostres de cultius d'*E. coli* BL21(DE3) que expressen les variants I106L, I106V i I106A i la proteïna salvatge, abans de la inducció amb IPTG 1 mM i 2h i 30 min després de la inducció. El volum de mostra aplicat és de 10  $\mu$ L. Al carrer M s'hi han aplicat els marcadors de massa molecular pretenyits següents: fosforilasa b (106000 Da), BSA (80000 Da), ovoalbúmina (49500 Da), anhidrasa carbònica (32500 Da), inhibidor de tripsina de soja (27500 Da) i lisozim (18500 Da) de Bio-Rad. Al carrer R s'hi ha aplicat la RNasa A comercial. (B) Electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS al 15 % amb poli(C) revelat per activitat de les mateixes mostres. El volum de mostra aplicat és de 3  $\mu$ L.

D'aquesta figura es dedueix que les variants I106L, I106V i I106A de la RNasa A analitzades tenen uns nivells d'expressió similars als de la proteïna salvatge al cap de 2h i 30 min després d'induir. Per a totes les altres variants estudiades en aquest treball també es van apreciar uns nivells d'expressió similars als de la proteïna salvatge. Per tant, la mutació introduïda en el cDNA de la RNasa A no afecta els nivells d'expressió d'aquesta.

### III.1.3.2. Expressió de la RNasa A i les seves variants

Una vegada comprovada la correcta expressió de la RNasa A i les seves variants, es van començar a produir totes elles. Es va partir de cultius O/N d'*E. coli* BL21(DE3)-[pBRX], *E. coli* BL21(DE3)-[pBXR.Y115W] i *E. coli* BL21(DE3)-[pBRX+mutació].

Es va observar que si aquests cultius es realitzaven a partir d'una colònia aïllada en placa LB suplementada amb ampicil·lina s'aconseguia un percentatge més elevat de cèl·lules portadores del vector d'expressió. Per això, es va portar a terme una sembra en estria en placa LB+Ap (50 µg/mL) del glicerinat de la soca i després es va inocular una de les colònies en 10 mL de medi TB en presència d'una forta selecció (Ap 400 µg/mL). Per tal de tenir un valor de l'A<sub>550</sub> final més baix en el moment de la inducció, es van realitzar dues dilucions del cultiu anterior, 1/10<sup>2</sup> i 1/10<sup>4</sup>, i es van incubar tots tres cultius O/N unes 12 h a 37°C amb agitació constant (250 r.p.m.). A partir del cultiu O/N menys crescut, corresponent sovint a la dilució 1/10<sup>4</sup>, es va inocular, a una relació 1/100, en 1 litre de medi líquid TB+Ap (50 µg/mL). El creixement del cultiu bacterià es va seguir mesurant l'A<sub>550</sub> tal com s'ha descrit en l'apartat II.2.5.2.

La inducció per expressar el cDNA que codifica la RNasa A o una variant d'aquesta es va realitzar quan l'A<sub>550</sub> era al voltant d'1 UDO, entre les 3 i 5 h d'haver-se iniciat el cultiu, amb l'addició d'IPTG a una concentració final d'1 mM. L'addició d'IPTG al cultiu afecta el creixement cel·lular fins al punt que aquest es veu interromput i estimula la síntesi de la RNA polimerasa de T7, la qual serà capaç de transcriure el gen de la RNasa A ja que el vector és portador del promotor que reconeix aquesta RNA polimerasa de T7. Per tant, es porta a terme una sobre-expressió de la RNasa A de manera que es veu afectat el creixement bacterià.

L'expressió de totes les variants de la RNasa A es va realitzar de la mateixa manera i no es van observar diferències significatives entre elles ni respecte a la proteïna salvatge.

### III.1.4. Purificació de les rRNases A expressades en *E. coli* BL21(DE3) seguint el protocol A

En aquest apartat es presenten els resultats obtinguts en la purificació de la RNasa A recombinant i les seves 17 variants, aïllades a partir de cultius de cèl·lules d'*E. coli* BL21(DE3)-[pBXR], *E. coli* BL21(DE3)-[pBXR.Y115W] i *E. coli* BL21(DE3)-[pBXR+mutació] que havien estat creixent en medi líquid TB suplementat amb 50 µg/ml d'Ap durant 2-4 h a partir del moment de la inducció amb 1 mM IPTG tal com s'ha descrit en l'apartat III.1.3.2. El protocol A que es va seguir (apartat II.7.2.1) està basat en el descrit per delCardayré i col. (1995) amb algunes modificacions i consisteix en la solubilització de la proteïna recombinant, una cromatografia de bescanvi catiónic a pressió atmosfèrica en presència d'urea i DTT, el replegament de la proteïna recombinant i la reoxidació dels ponts disulfur a través de l'eliminació de la urea i el DTT mitjançant una diàlisi que, a més afavoreix la formació dels ponts disulfur ja que conté la parella redox GSSG/GSH, i una cromatografia de bescanvi catiónic pel sistema d'HPLC. Una vegada acabat el procés de purificació s'ha comprovat la puresa de la proteïna resultant mitjançant cromatografia de bescanvi catiónic i de fase inversa pel sistema d'HPLC.

El protocol de purificació seguit és el mateix per a totes les rRNases A, i, per tant, s'exemplificarà amb la descripció de la proteïna salvatge.

La purificació s'inicia a partir del sediment cel·lular obtingut en centrifugar el litre de cultiu a les 2-4 h després de la inducció amb IPTG, malgrat que el sistema d'expressió utilitzat estigués dissenyat per exportar les proteïnes heteròlogues a l'espai periplasmàtic de la cèl·lula bacteriana.

Treballs previs de delCardayré i col. (1995) havien demostrat que la major part de la RNasa A produïda per *E. coli* BL21(DE3) portadora del vector pBXR no es trobava a l'espai periplasmàtic després d'un xoc osmòtic fred, ni en la fracció soluble de la suspensió de cèl·lules lisades. La RNasa A recombinant era produïda en una forma insoluble, però correctament processada, és a dir, no contenia el pèptid senyal d'exportació *peIB*. Aquest resultat era inesperat perquè el processament té lloc en atravesar la membrana cel·lular, però els cossos d'inclusió es formen generalment al citoplasma. Això podia ser explicat si la RNasa A recombinant parcialment plegada s'agregava en el periplasma (Mitraki i King, 1989), o si la translocació de la RNasa A

era aturada després de l'escisió del pèptid senyal. Una translocació ineficient s'ha observat pel lisozim, el qual, com la RNasa A, té varis residus bàsics aprop de l'extrem N-terminal (Yamane i Mizushima, 1988). La insolubilitat de la RNasa A produïda per *E. coli* va resultar útil per superar el problema de la seva toxicitat. L'enzim quedava retingut a la fracció cel·lular i calia aconseguir solubilitzar-ne la màxima quantitat sota condicions desnaturalitzants, utilitzant un amortidor que contingüés urea, com a agent desnaturalitzant, i DTT, com a agent reductor, per tal de reduir els ponts disulfur entre molècules que s'haguessin pogut formar i, d'aquesta manera, desfer els possibles agregats proteics.

#### **III.1.4.1. Procés de solubilització de les rRNAases A**

El sediment cel·lular es va resuspendre en l'amortidor de solubilització, es va incubar a 37°C durant 1 h en agitació constant i finalment es va centrifugar. En el sobrenadant s'hi trobava solubilitzada la proteïna recombinant. Aquest procés es va realitzar en tres etapes per tal de solubilitzar la màxima quantitat de proteïna, obtenint-se les fraccions corresponents als tres sobrenadants, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> i S<sub>3</sub>, respectivament, tal i com s'ha descrit en l'apartat II.7.2.1. Aquestes tres fraccions es van reunir formant la fracció S<sub>1</sub>+S<sub>2</sub>+S<sub>3</sub>, a partir de la qual s'ha iniciat el procés de purificació de la proteïna recombinant.

#### **III.1.4.2. Cromatografia de bescanvi catiònic a pressió atmosfèrica en presència d'agent desnaturalitzant i reductor**

En la primera etapa del procés de purificació de la rRNasa A es va realitzar una separació per cromatografia de bescanvi catiònic a pressió atmosfèrica en presència d'urea i DTT.

La mostra, constituïda per la reunió dels tres sobrenadants corresponents a les tres extraccions amb l'amortidor de solubilització, S<sub>1</sub>+S<sub>2</sub>+S<sub>3</sub>, es va sotmetre a una cromatografia de bescanvi catiònic CM-Sepharose CL-6B equilibrada amb amortidor Tris/HCl 20 mM, pH 7,8, urea 6M, DTT 2 mM, les característiques i condicions de la qual han estat descrites en l'apartat II.7.2.1. El perfil cromatogràfic corresponent s'indica en la FIGURA III.8. Les fraccions amb activitat ribonucleasa corresponen al pic central i majoritari i van ser detectades pel mètode de determinació de l'activitat ribonucleasa en placa d'agarosa-RNA (apartat II.7.5.2). Tot i la presència de la urea i el DTT, tant en l'amortidor de solubilització com en el de la cromatografia, va ser possible assajar



l'activitat de les diferents fraccions per aquest mètode gràcies a la seva elevada sensibilitat i al fet que el mètode permet el replegament, encara que parcial, de l'enzim.

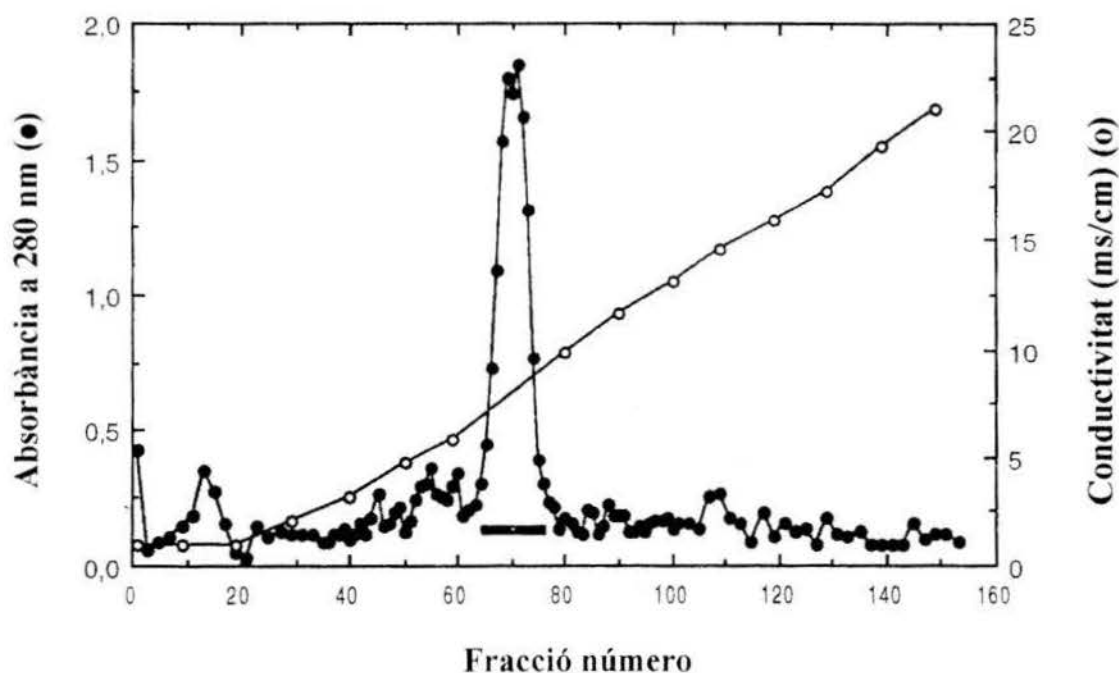


FIGURA III.8

Perfil d'elució de la rRNasa A enregistrat a 280 nm corresponent a la cromatografia de bescanvi catònic (CM-Sepharose CL-6B) a pressió atmosfèrica en presència d'agent desnaturalitzant i reductor del sobrenadant (500 mL) del procés de solubilització de la rRNasa A d'un cultiu d'*E. coli* BL21 (DE3)-[pBXR]. La reïna es va equilibrar amb l'amortidor Tris/HCl 20 mM, pH 7,8, urea 6M, DTT 2 mM i es va aplicar un gradient de 0 a 0,5 M NaCl en el mateix amortidor. Les fraccions recollides van ser de 3,5 ml. La fracció que presenta activitat ribonucleasa, eluïda a un valor de conductivitat al voltant de  $8 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ , s'ha indicat amb una barra negra sota el cromatograma. (●) Absorbància a 280 nm, (○) conductivitat en  $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

En les condicions en què es va portar a terme aquesta cromatografia de bescanvi catònic es va poder separar una fracció corresponent a proteïna amb activitat ribonucleasa d'altres proteïnes, la major part de les quals s'elüen durant el rentat de la columna. Es va comprovar que en aquest rentat no apareixia activitat ribonucleasa mitjançant la tècnica en plaques d'agarosa-RNA ni es detectava cap proteïna que



presentés una banda de la mateixa mobilitat electroforètica que la corresponent a la RNasa A en l'anàlisi electroforètica en SDS-PAGE 15%. El perfil de la cromatografia del procés de solubilització de les variants de RNasa A va ser similar a l'obtingut per a la rRNasa A (FIGURA III.8), en el qual la fracció amb activitat ribonucleasa era eluïda a un valor de conductivitat al voltant de  $8 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

### III.1.4.3. Plegament i oxidació

Per aconseguir el replegament i la reoxidació de la proteïna recombinant, la mostra, prèviament diluïda a una concentració de  $0,6 \text{ mg/mL}$  en l'amortidor Tris/HCl  $20 \text{ mM}$ , pH 7,8, es va sotmetre a diàlisi enfront de l'amortidor Tris/HCl  $20 \text{ mM}$ , pH 7,8, NaCl  $0,1 \text{ M}$ , GSH  $1 \text{ mM}$ , GSSG  $0,2 \text{ mM}$ , tal com s'ha descrit en l'apartat II.7.2.1. Durant aquesta diàlisi es va observar la formació d'agregats proteics insolubles, la qual cosa representa una pèrdua de proteïna en aquesta etapa. Cal destacar que no es va veure una diferència clara en la formació d'aquests agregats entre la rRNasa A i les seves variants.

Per tal d'acabar d'eliminar la urea que no s'hagués descartat durant la diàlisi anterior i alhora eliminar la sal i el glutatió, es va sotmetre la mostra a una segona diàlisi enfront de l'amortidor Tris/HCl  $20 \text{ mM}$ , pH 7,8.

Finalment, com que el volum de la mostra era molt gran es va sotmetre a una tercera diàlisi enfront d'aigua destil·lada Milli-Q, es va centrifugar la mostra per tal d'eliminar la fracció de proteïna no soluble, probablement no correctament replegada, i es va reduir el volum per liofilització.

Segons els resultats de l'anàlisi electroforètica en gels de poliacrilamida-SDS i de la tècnica en plaques d'agarosa-RNA, el pic de la cromatografia de bescanvi catiónic a pressió atmosfèrica anterior presentava una única banda, amb activitat ribonucleasa, de mobilitat anàloga a la presentada per la proteïna comercial igual que una vegada havia estat sotmesa al seu plegament i oxidació. Per tant, semblava, a priori, que el procés de purificació es podia aturar en aquesta cromatografia seguida del procés de plegament i oxidació de la proteïna recombinant. Malgrat això, es va comprovar la homogeneïtat i puresa de la mostra, mitjançant una cromatografia de bescanvi catiónic pel sistema d'HPLC.

### III.1.4.4. Cromatografia de bescanvi catiònic pel sistema d'HPLC

La proteïna aïllada en l'etapa de purificació anterior, constituïda per la reunió de les fraccions amb activitat ribonucleasa de la cromatografia de bescanvi catiònic a pressió atmosfèrica una vegada dialitzada i posteriorment liofilitzada, es va recromatografiar en una columna de bescanvi catiònic Mono-S<sup>®</sup> HR 5/5-FPLC (Pharmacia) pel sistema d'HPLC, equilibrada amb l'amortidor Tris/HCl 20 mM, pH 8,0, tal com ha estat descrit en l'apartat II.7.2.3. El perfil d'elució corresponent a aquesta cromatografia es mostra en la FIGURA III.9.

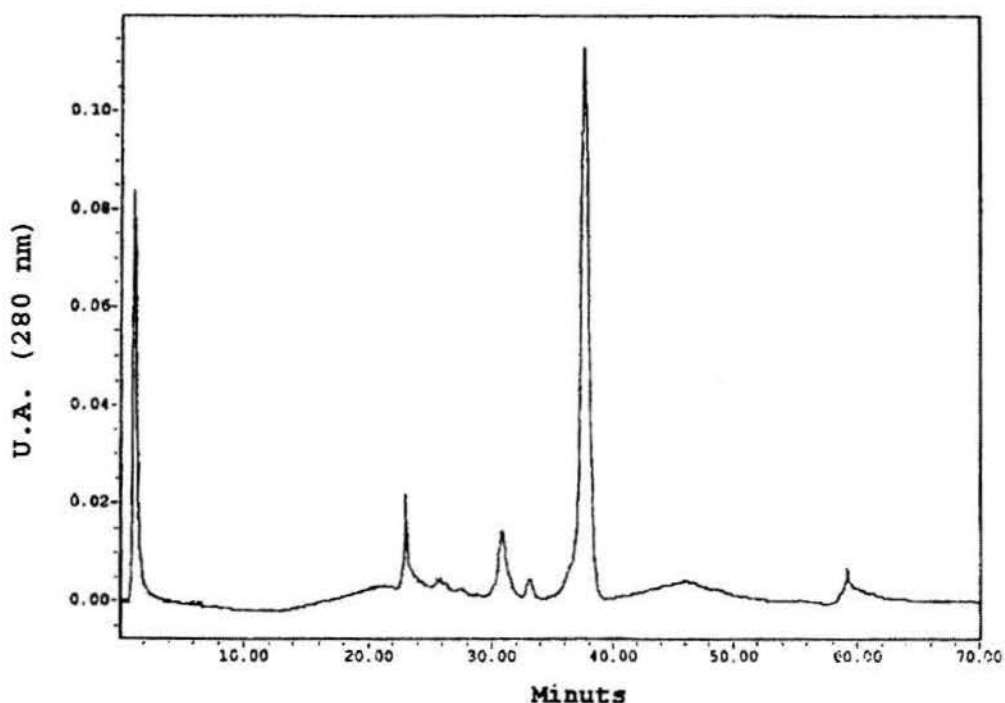


FIGURA III.9

Perfil d'elució de proteïna enregistrat a 280 nm de la cromatografia de bescanvi catiònic en columna Mono-S<sup>®</sup> HR 5/5-FPLC per HPLC corresponent a la purificació de la rRNasa A. La mostra estava constituïda per les fraccions amb activitat ribonucleasa eluïdes de la cromatografia de bescanvi catiònic a pressió atmosfèrica una vegada havien estat sotmeses al seu plegament i oxidació. La columna es va equilibrar amb l'amortidor Tris/HCl 20 mM, pH 8,0. La mostra s'ha eluït amb un gradient lineal de 0 a 0,15 M de NaCl en el mateix amortidor d'equilibrat durant 45 min tal com s'ha descrit en l'apartat II.7.2.1.

A partir de la FIGURA III.9 es pot observar la presència d'un pic central i majoritari, molt ben definit, que s'elueix aproximadament al voltant dels 35-38 min (NaCl 0,1 M), i la presència de pics minoritaris eluïts essencialment abans del pic principal. Es va identificar el pic principal com a RNasa A amb els 4 ponts disulfur correctament formats, ja que segons Dodge i Sheraga (1996) el plegament de la RNasa A a partir de l'espècie amb els ponts disulfur reduïts cap a la que conté els 4 ponts disulfur nadius, utilitzant glutatió com a agent redox, fa que els residus de cisteïna de la proteïna formin enllaços disulfur intermoleculars amb el glutatió. A causa que cada enllaç disulfur intermolecular amb el glutatió redueix la càrrega positiva de la RNasa A en una unitat (a pH 7), les espècies que tinguin menys de 4 ponts disulfur s'eluiran abans de la nativa. La presència dels pics minoritaris en el nostre perfil cromatogràfic, els quals presenten una mobilitat electroforètica similar a la de la RNasa A comercial, en l'anàlisi electroforètica en SDS-PAGE 15 %, podria atribuir-se a l'existència de poblacions de rRNasa A amb diferent nombre de ponts disulfur.

Davant d'aquests resultats es va considerar oportú afegir aquesta cromatografia de bescanvi catiònic pel sistema d'HPLC com a una etapa més del procés purificació i d'aquesta manera aconseguir separar la rRNasa A amb els 4 ponts disulfur nadius d'altres espècies amb un nombre de ponts disulfur inferior.

La proteïna salvatge i les seves variants van presentar uns perfils cromatogràfics semblants, malgrat no idèntics al de la FIGURA III.9. En la FIGURA III.10 es presenten els perfils d'elució de dues d'aquestes variants, com a exemple. En tots els casos es va observar un pic principal al voltant dels 35-38 min i una sèrie de pics minoritaris eluïts abans del pic principal.

La mostra corresponent a la reunió de les fraccions del pic central i majoritari es van reunir i dialitzar enfront d'aigua Milli-Q. Finalment, es va filtrar la mostra amb filtres de 0,22 µm de diàmetre de por per eliminar la fracció de proteïna no soluble, malgrat aquesta gairebé no es percebia, i es va liofilitzar. La mostra es va guardar a -20°C i és la que es va utilitzar pels estudis posteriors.

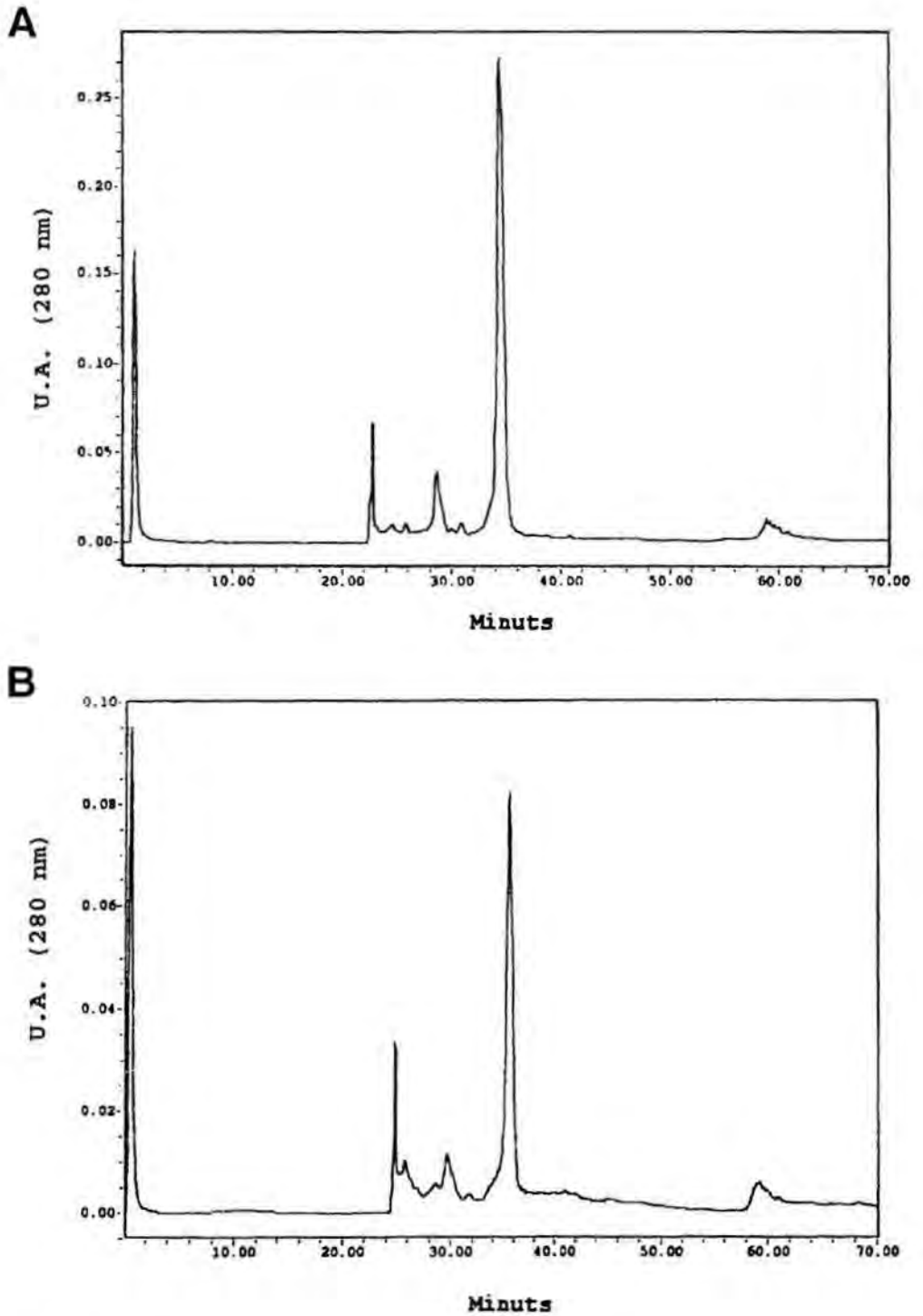


FIGURA III.10

Perfil d'elució de proteïna enregistrat a 280 nm de la cromatografia de bescanvi catònic en columna Mono-S® HR 5/5-FPLC pel sistema d'HPLC corresponent a la purificació de les variants de la RNasa A següents: (A) V108A (B) Y115W+I106V. Les condicions de la cromatografia han estat les mateixes que s'han descrit en la FIGURA III.9.

### III.1.4.5. Comprovació de la puresa de les rRNases A purificades

La mostra de proteïna amb els 4 ponts disulfur correctament formats, obtinguda tal i com s'ha descrit a l'apartat anterior, es va reinjectar de nou al sistema d'HPLC per dur a terme dues cromatografies de caire analític i d'aquesta manera comprovar la seva homogeneïtat i puresa.

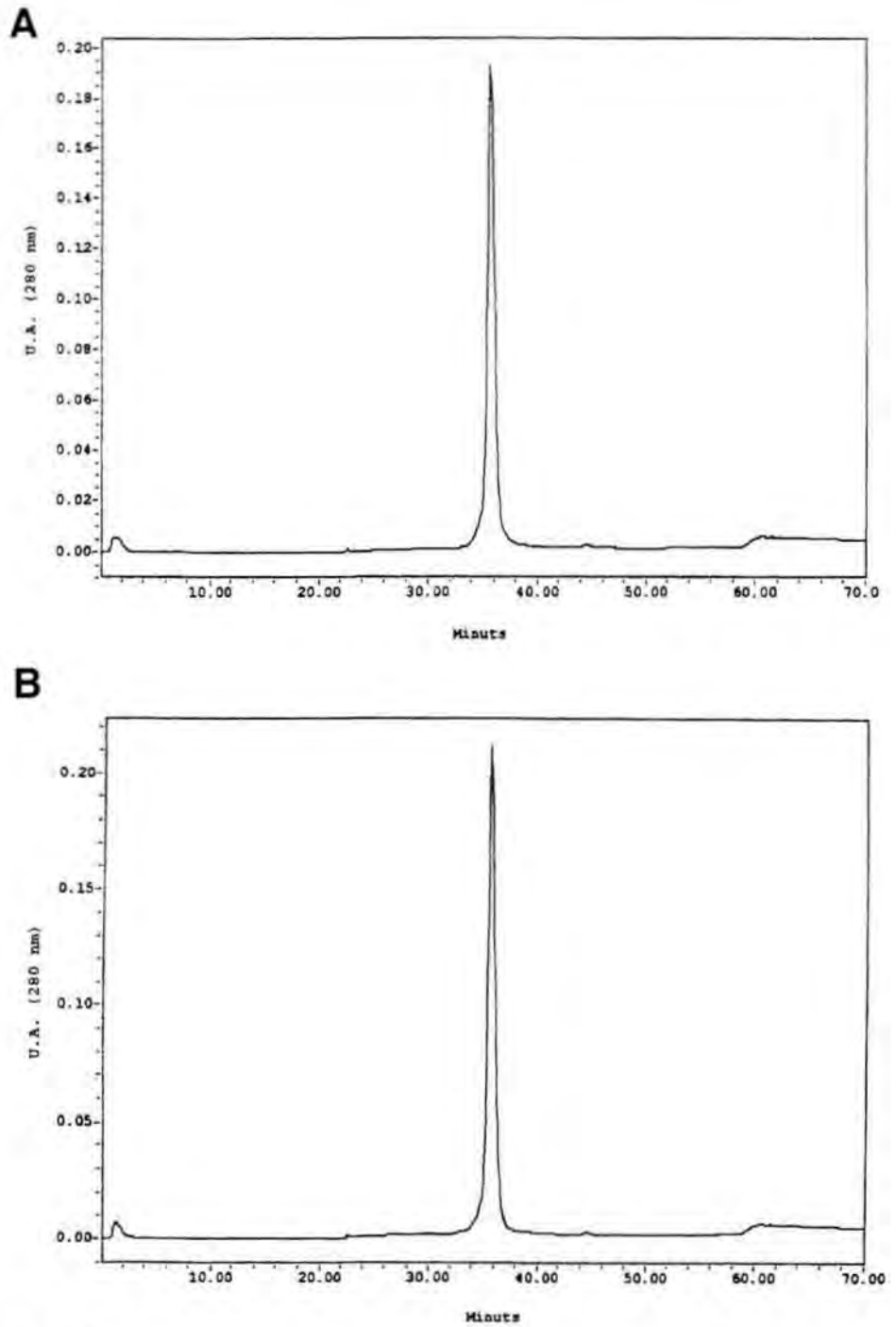
#### III.1.4.5.1. Cromatografia de bescanvi catiònic pel sistema d'HPLC

En primer lloc, la mostra es va recromatografiar de nou en les mateixes condicions descrites en l'apartat III.1.4.4 per tal de corroborar la homogeneïtat de la proteïna pel que fa a la presència dels ponts disulfur correctament formats.

En la FIGURA III.11 es mostra el perfil cromatogràfic obtingut per a la proteïna salvatge recombinant (A) i per a la proteïna comercial (B).

El perfil cromatogràfic obtingut per a la proteïna salvatge (A) mostra la presència d'un únic pic que s'elueix a un temps de retenció idèntic al del pic principal de la FIGURA III.9 i al de la RNasa A comercial cromatografiada en les mateixes condicions (B). El mateix perfil d'elució es va observar en recromatografiar les 17 variants de la RNasa A. Aquests fets ens indiquen que les rRNases A purificades mitjançant aquest protocol no presenten isoformes pel que fa a un diferent nombre de ponts disulfur i que es tracta d'espècies correctament plegades.

A més, el fet que totes les variants de la RNasa A s'elueixin al mateix temps de retenció de la RNasa A comercial, confirma, també, que els residus de lisina de les ribonucleases purificades no estan carbamilats, ja que la carbamilació d'aquests residus hauria reduït la càrrega de la proteïna i aquest fet es podria haver detectat en aquesta cromatografia. La carbamilació de residus de lisina de la RNasa A era possible que succeís atès que s'havia treballat a concentracions d'urea elevades (6 M) i  $\text{pH} \geq 7$  ( $\text{pH}$  7,8) durant l'etapa de solubilització de les ribonucleases recombinants i de cromatografia a pressió atmosfèrica. En aquestes condicions, les solucions d'urea poden desplaçar l'equilibri entre la urea i el cianat d'amoni de manera que la concentració de cianat d'amoni esdevingui significativa i pugui reaccionar amb la RNasa A per carbamilar residus de lisina de manera irreversible (Stark i col., 1960). Cal recordar que es va utilitzar la reïna de bescanvi iònic AG<sup>®</sup> 501-X8(D) per desionitzar la solució d'urea 6 M dels amortidors emprats en les etapes de solubilització de les ribonucleases recombinants i de cromatografia a pressió atmosfèrica, i, així, evitar la presència d'ions cianat.



**FIGURA III.11**

Perfils d'elució de proteïna enregistrat a 280 nm de la cromatografia de bescanvi catiònic en columna Mono-S<sup>®</sup> HR 5/5-FPLC per HPLC. (A) La mostra estava constituïda per les fraccions del pic principal de la cromatografia de bescanvi catiònic per HPLC, corresponent a la purificació de la rRNasa A. (B) RNasa A comercial. Les condicions de la cromatografia han estat les mateixes que s'han descrit en la FIGURA III.9.



### III.1.4.5.2. Cromatografia de fase inversa pel sistema d'HPLC

En segon lloc, es va recromatografiar la mostra en una columna de fase inversa Vydac 214-TP C<sub>4</sub> per tal de comprovar la puresa de la proteïna. Les condicions i característiques d'aquesta cromatografia s'han indicat de manera detallada en l'apartat II.7.2.3. En la FIGURA III.12 es mostra el perfil d'elució d'aquesta cromatografia corresponent a la proteïna salvatge.

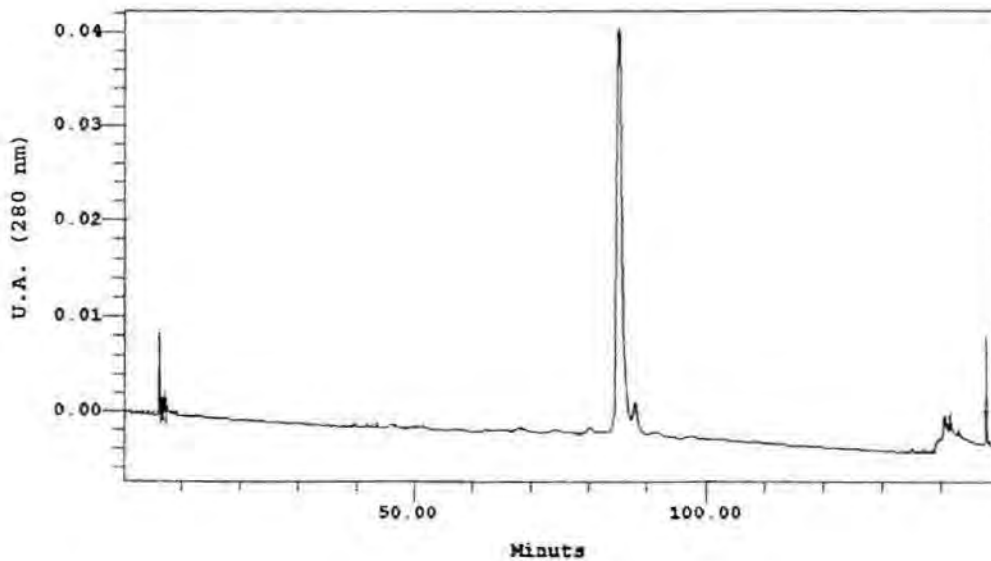


FIGURA III.12

Perfil d'elució de proteïna enregistrat a 280 nm de la cromatografia de fase inversa en columna Vydac 214-TP C<sub>4</sub> pel sistema d'HPLC. La mostra estava constituïda per les fraccions del pic principal de la cromatografia de bescanvi catiònic per HPLC, corresponent a la purificació de la rRNasa A. La columna es va equilibrar amb acetonitril 10 %:TFA 0,1 %. La mostra s'ha eluït amb un gradient, entre el 10 i el 100% d'acetonitril, en tres etapes.

Aquest perfil cromatogràfic corrobora que la proteïna recombinant purificada mitjançant aquest protocol és pura.

S'ha comprovat que el temps de retenció de la rRNasa A coincideix amb el de les 17 variants d'aquesta, al voltant del minut 85 (30% d'acetonitril), aplicades a la mateixa columna i emprant les mateixes condicions de gradient.

#### II.1.4.6. Seguiment del procés de purificació de les rRNases A

En la FIGURA III.13 es mostren els resultats corresponents a l'anàlisi electroforètica en gel de poliacrilamida-SDS al 15 %, tenyit amb blau de Coomassie, i de la determinació de l'activitat ribonucleasa per zimograma de les fraccions obtingudes durant el procés de purificació de la rRNasa A descrit anteriorment.

Amb els resultats obtinguts en la FIGURA III.13.A per a les diferents fraccions analitzades es pot veure que després de l'etapa corresponent a la cromatografia de bescanvi catiònic a pressió atmosfèrica en presència d'urea i DTT es detecta una sola banda. La mobilitat electroforètica que presenta aquesta fracció (carrer 3) és lleugerament inferior a la que presenten les fraccions corresponents a les etapes posteriors a aquesta (carrers 4, 5 i 6) i a la que presenta la RNasa A comercial (carrer 7). Aquesta mobilitat electroforètica lleugerament inferior, així com també la de la banda electroforètica corresponent a la RNasa A de la fracció del procés de solubilització de la proteïna recombinant (carrer 2), es deu al fet que la proteïna es troba reduïda en aquestes etapes, a més de desnaturalitzada, ja que l'anàlisi electroforètica en gel de poliacrilamida-SDS al 15 % en presència de  $\beta$ -mercaptoetanol (15 %) en l'amortidor d'aplicació de les mostres per a les fraccions obtingudes durant el procés de purificació de la rRNasa A, va mostrar una banda de mobilitat pràcticament idèntica en totes les mostres analitzades.

L'anàlisi de les mateixes fraccions per zimograma (FIGURA III.13.B) va permetre comprovar la presència d'activitat ribonucleasa en totes les fraccions assajades i alhora visualitzar la massa molecular de l'espècie responsable d'aquesta activitat. Es va observar també una mobilitat inferior per a les mateixes fraccions comentades anteriorment, les que contenen urea i DTT, corresponents als carrers 2 i 3 de la FIGURA III.13.A. Cal dir que les fraccions corresponents a aquests dos carrers s'han hagut d'aplicar a una concentració molt més elevada, en comparació a les altres fraccions, per tal de poder observar la banda d'activitat ja que aquestes es trobaven desnaturalitzades i reduïdes.

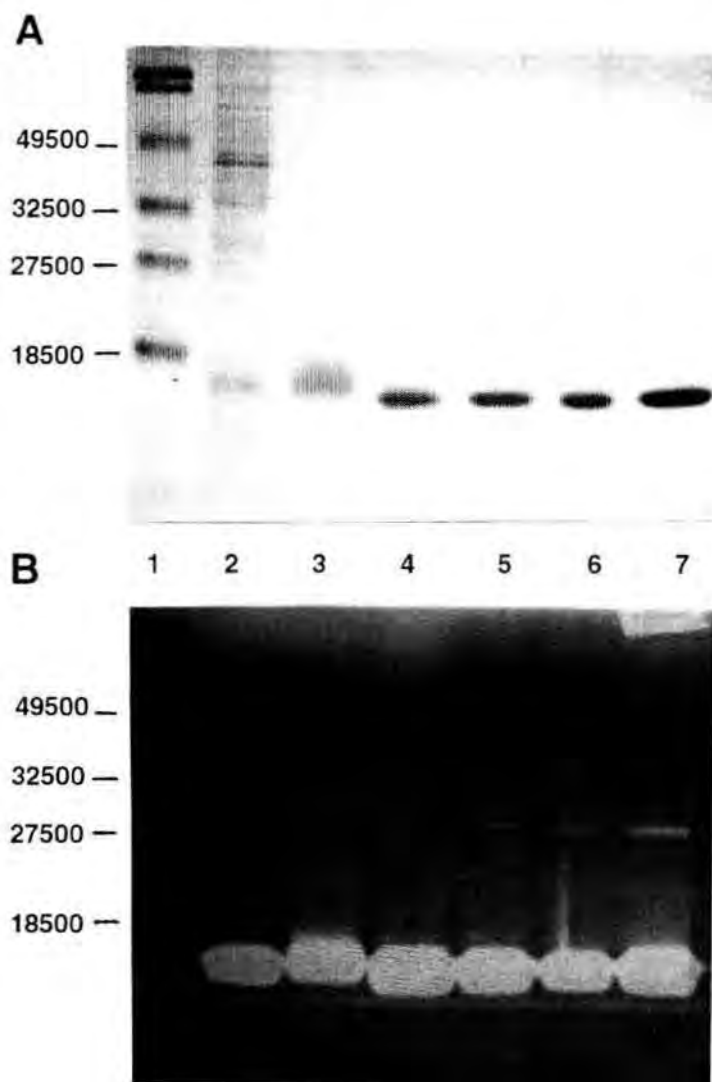
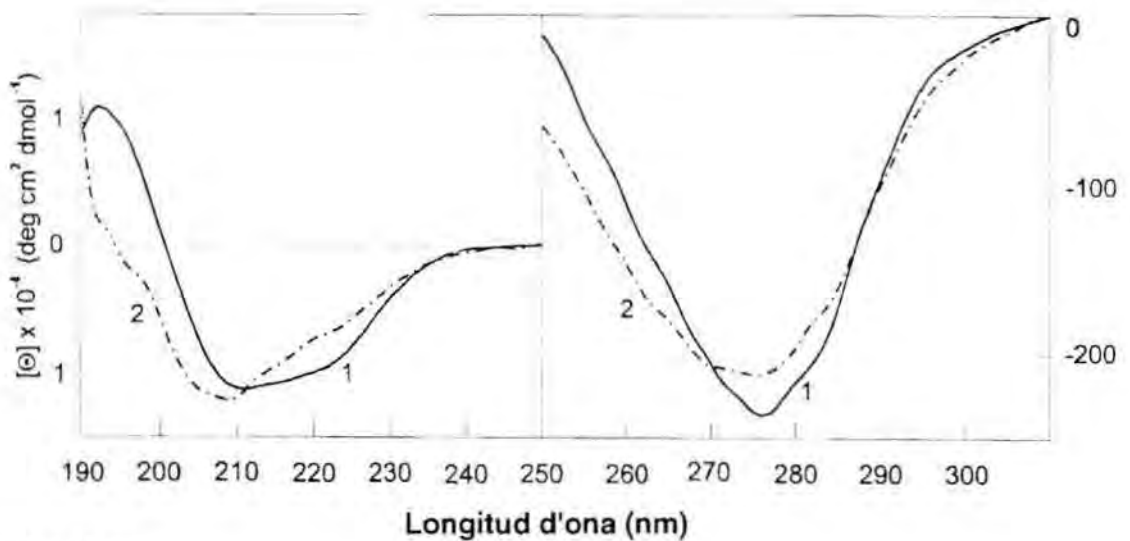


FIGURA III.13

(A) Anàlisi electroforètica en gel SDS-PAGE 15 %, tenyit amb blau de Coomassie, i (B) anàlisi electroforètica en gel SDS-PAGE 15% amb poli(C) revelats per activitat (Zimograma) de les fraccions obtingudes en la purificació de la rRNasa A pel protocol A. 1) Marcadors de massa molecular (fosforilasa b (106000 Da), BSA (80000 Da), ovoalbúmina (49500 Da), anhidrasa carbònica (32500 Da), inhibidor de tripsina de soja (27500 Da) i lisozim (18500 Da); 2) fracció corresponent al procés de solubilització de rRNasa A ( $S_1+S_2+S_3$ ); 3) fracció majoritària amb activitat ribonucleasa corresponent a la cromatografia de bescanvi catiónic a pressió atmosfèrica (CM-Sepharose) en presència d'urea i DTT; 4) fracció corresponent al sobrenadant de la proteïna amb activitat ribonucleasa que després del procés de replegament i reoxidació s'ha centrifugat per tal d'eliminar la fracció de proteïna no soluble; 5) fracció majoritària de la cromatografia de bescanvi catiónic per HPLC (Mono-S<sup>®</sup> HR 5/5-FPLC); 6) fracció majoritària de la cromatografia de fase inversa per HPLC (Vydac 214-TP C<sub>4</sub>) una vegada eliminat l'acetoneitril; 7) RNasa A comercial.

Una vegada purificades les diferents variants de la RNasa A, es van fer les anàlisis electroforètiques en gels SDS-PAGE 15 % i en zimogrames de la fracció majoritària de la cromatografia de bescanvi catiónic per HPLC (Mono-S<sup>®</sup> HR 5/5-FPLC ) de cada variant. Els resultats van mostrar una única banda amb activitat ribonucleasa de mobilitat idèntica a l'observada per a la RNasa A comercial (carrer 7, FIGURA III.13.A i B).

A més, es va fer un estudi estructural per diroisme circular (DC) de la fracció soluble de la proteïna amb activitat ribonucleasa del procés de replegament i reoxidació corresponent al procés de purificació de la rRNasa A, amb posterior diàlisi exhaustiva enfront d'aigua Milli-Q, i es va comparar amb el de la proteïna comercial. En la FIGURA III.14 es presenten els espectres d'activitat òptica de les dues proteïnes enregistrant l'el·lipticitat a la regió de l'UV llunyà (regió 190-250 nm) i de l'UV proper (regió 250-310 nm) a 10°C. Els valors de lectura d'activitat òptica,  $\theta_{obs}$  en deg, es van transformar en valors d'el·lipticitat molar,  $[\Theta]$ , en deg  $cm^2 dmol^{-1}$ .



**FIGURA III.14**

Espectres de diroisme circular de la RNasa A comercial (1) i de la fracció del procés de purificació de la rRNasa A corresponent a la proteïna soluble amb activitat ribonucleasa del procés de replegament i reoxidació (2). Els espectres s'han enregistrat a 10°C i s'ha utilitzat una concentració de proteïna de 0,25 mg/mL en amortidor acetat sòdic 50 mM, pH 5,0 i cubetes de quars de 0,02 cm de pas de llum per a la regió de l'UV llunyà (190-250 nm) i una concentració de proteïna d'1,0 mg/mL i cubetes de quars d'1 cm de pas de llum per a la regió de l'UV proper (250-310 nm).

Les diferències d'el·lipticitat observades en els espectres de dicroisme circular a l'UV llunyà indiquen que la fracció de la rRNasa A analitzada (2), corresponent al procés de replegament i reoxidació, presenta una estructura secundària diferent a la de la RNasa A comercial (1). En els espectres a l'UV proper s'observen també diferències entre ambdues proteïnes, la qual cosa indica que l'ambient circumdant al seus residus de tirosina és diferent entre les dues proteïnes. Per tant, la fracció analitzada mostra una estructura secundària i terciària significativament diferent a la de la RNasa A comercial que podria ser deguda a la presència d'isoformes pel que fa a un diferent nombre de ponts disulfur.

Davant d'aquests resultats es va reafirmar que calia afegir l'etapa de cromatografia de bescanvi catiònic pel sistema d'HPLC en el procés de purificació de les rRNases A seguint el protocol A, com prèviament s'havia decidit a partir dels resultats obtinguts per aquesta cromatografia (apartat III.1.4.4). Amb la incorporació d'aquesta etapa, com es veurà més endavant en la FIGURA III.17, s'aconsegueix obtenir una proteïna recombinant amb estructura tridimensional idèntica a la de la RNasa A comercial.

#### III.1.4.7. Rendiment del procés de purificació de les rRNAases A

El procés de purificació de la rRNasa A descrit anteriorment es va quantificar, a partir d'1 litre de cultiu, mitjançant el mètode de Bradford (apartat II.7.3.2) que permet estimar la quantitat de proteïna total. A continuació, s'indiquen els resultats obtinguts, en intervals de valors, de l'estimació de la quantitat de proteïna total en diferents etapes del procés de purificació de la rRNasa A:

1. Fracció corresponent al procés de solubilització de rRNasa A ( $S_1+S_2+S_3$ ):  
334-440 mg
2. Fracció majoritària amb activitat ribonucleasa corresponent a la cromatografia de bescanvi catiònic a pressió atmosfèrica (CM-Sepharose) en presència d'urea i DTT: 66-96 mg
3. Fracció corresponent al sobrenadant de la proteïna amb activitat ribonucleasa que després del procés de replegament i reoxidació s'ha centrifugat per tal d'eliminar-ne la fracció de proteïna no soluble: 51-75 mg
4. Fracció majoritària amb activitat ribonucleasa de la cromatografia de bescanvi catiònic per HPLC (Mono-S<sup>®</sup> HR 5/5-FPLC): 20-30 mg

Els rendiments finals del procés de purificació de les 17 variants de la RNasa A van ser similars als obtinguts per la proteïna salvatge. Es van aconseguir entre 20 i 30 mg de proteïna pura i amb els quatre ponts disulfur correctament formats. No sembla, doncs, que les mutacions introduïdes a la RNasa A afectin ni a l'expressió ni a la recuperació de les proteïnes recombinants en qüestió.

### **III.1.5. Purificació de les rRNases A expressades en *E. coli* BL21(DE3) seguint el protocol B**

Amb la finalitat de millorar el rendiment i escurçar el temps de la purificació de les rRNases A, es va posar a punt un protocol alternatiu (apartat II.7.2.2), el qual està basat en el descrit per Kim i col. (1995) amb bastantes modificacions.

Aquest protocol es diferencia de l'anterior en quatre punts essencials: (1) en la substitució de l'ús de la urea com agent desnaturalitzant pel clorur de guanidini; (2) en la solubilització de les rRNases A no només per un procés purament químic sinó que la solubilització amb clorur de guanidini va precedida d'un trencament cel·lular per mitjans físics, passant la resuspensió de les cèl·lules dues o tres vegades per la *French Press*<sup>®</sup>; (3) en l'estalvi de l'etapa cromatogràfica a pressió atmosfèrica; (4) en la substitució d'un procés de concentració per liofilització per un d'ultrafiltració tangencial.

#### **III.1.5.1. Trencament cel·lular i solubilització de les rRNases A**

El sediment cel·lular, obtingut de la centrifugació d'1 litre de cultiu de cèl·lules d'*E. coli* BL21(DE3) transformades amb el vector d'expressió corresponent i induïdes amb IPTG 1 mM tal com s'ha descrit en l'apartat III.1.3.2, es va resuspendre en l'amortidor Tris/HCl 20 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM i es va passar dues o tres vegades per la *French Press*<sup>®</sup> per trencar les cèl·lules. Es va eliminar el sobrenadant d'aquesta solució per centrifugació i es va solubilitzar el sediment, corresponent al material insoluble, que és on es localitza la major part de la proteïna recombinant, mitjançant resuspensió en l'amortidor de solubilització Tris/HCl 20 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, Gdn-HCl 6 M, DTT 0,1 M. Finalment, es va centrifugar per tal d'eliminar el material no solubilitzat.



### III.1.5.2. Plegament i oxidació

La fracció solubilitzada del sediment cel·lular es va dialitzar enfront d'àcid acètic 20 mM. Durant aquesta diàlisi, en la qual es van eliminar el Gdn·HCl i el DTT, es va observar la formació de nombrosos agregats proteics insolubles, els quals es van eliminar per centrifugació.

El fracció soluble resultant, que és on es trobava solubilitzada la proteïna recombinant, es va diluir fins assolir una concentració final de 0,3 mg/mL en Tris/HOAc 0,1 M, pH 8,0, GSH 3,0 mM i GSSG 0,6 mM i es va deixar dins d'un contenidor obert, en agitació suau, i a temperatura ambient durant 24 h.

La parella redox utilitzada per a la reoxidació dels ponts disulfur de la proteïna que havien estat prèviament reduïts per acció del DTT, va ser la mateixa que en el protocol de purificació anterior (A), [GSSG]/[GSH], però a una concentració de 0,6 mM i 3 mM, respectivament.

Finalment es va afegir 1/100 del volum final d'àcid acètic glacial, que provoca un descens del pH fins a 4,5, per aturar una posterior oxidació.

### III.1.5.3. Cromatografia de bescanvi catiònic pel sistema d'HPLC

Atès que el volum de mostra després del procés de plegament i oxidació era molt gran (180-250 mL), calia concentrar-la abans de ser cromatografiada. En aquest protocol de purificació es va optar per concentrar la mostra mitjançant ultrafiltració tangencial (apartat II.7.2.2), la qual cosa va fer reduir de manera considerable el temps necessari per a la concentració, en comparació al procés de liofilització. La mostra així concentrada es va dialitzar enfront de Tris/HCl 20 mM, pH 8,0 i es va centrifugar per eliminar la fracció de proteïna no soluble. El sobrenadant corresponent es va cromatografiar en una columna de bescanvi catiònic Mono-S<sup>®</sup> HR 5/5-FPLC (Pharmacia) de la mateixa manera que s'ha descrit en l'altre protocol de purificació (A) (apartat III.1.4.4). El perfil d'elució corresponent a aquesta cromatografia va ser molt similar al perfil obtingut per a la mateixa proteïna mitjançant el protocol A (FIGURA III.9).

Pel que fa a les variants de la RNasa A que es van purificar seguint aquest protocol alternatiu, van mostrar també uns perfils cromatogràfics similars als de la proteïna salvatge.

En tots els casos es van reunir les fraccions corresponents al pic principal. La mostra resultant es va dialitzar enfront d'aigua destil·lada Milli-Q, es va filtrar amb filtres de 0.22 µm de diàmetres de por i es va liofilitzar.

#### **III.1.5.4. Comprovació de la puresa de les rRNases A purificades**

Es va comprovar la homogeneïtat i puresa de la rRNasa A amb els 4 ponts disulfur correctament formats, obtinguda tal com s'ha descrit a l'apartat anterior, d'una manera igual a la de la proteïna purificada pel protocol A (apartat III.1.4.5).

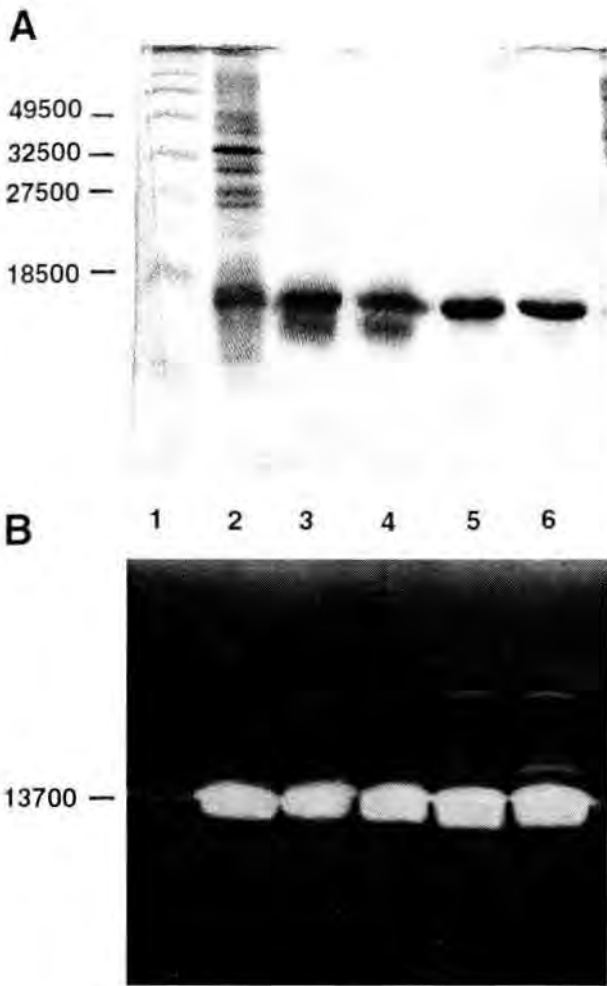
Tant la cromatografia analítica de bescanvi catiònic com la de fase inversa, ambdues pel sistema d'HPLC, van mostrar uns perfils idèntics als obtinguts en les FIGURES III.11 i III.12, respectivament.

El mateixos perfils cromatogràfics es van observar en recromatografiar les variants de la RNasa A. Aquests fets indiquen que les proteïnes purificades mitjançant aquest protocol alternatiu (B) tampoc presenten isoformes pel que fa a un diferent nombre de ponts disulfur i que es tracta també d'espècies pures i correctament plegades.

#### **III.1.5.5. Seguiment del procés de purificació de les rRNases A**

En la FIGURA III.15 es mostren els resultats corresponents a l'anàlisi electroforètica en gel SDS-PAGE 15 % i en zimograma de les fraccions obtingudes durant el procés de purificació de la rRNasa A.

Amb els resultats obtinguts en la FIGURA III.15.A es pot veure que entre el carrer 2 i 3 hi ha una extraordinària davallada del nombre de bandes. Aquest fet indica que la diàlisi enfront d'àcid acètic 20 mM de la solució de proteïna solubilitzada, amb Tris/HCl 20 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, Gdn-HCl 6 M, DTT 0,1 M, aconsegueix separar la proteïna recombinant de la majoria de proteïnes ja que aquestes precipiten mentre que la RNasa A es manté soluble en aquestes condicions. Sovint es va detectar la presència d'una segona banda de mobilitat lleugerament superior a la RNasa A en els carrers 3 i 4, tal com es pot apreciar en la figura, que s'ha atribuït a isoformes de la proteïna, pel que fa a un nombre diferent de ponts disulfur, presents en l'etapa de replegament i reoxidació, les quals se separaven en l'etapa cromatogràfica per HPLC posterior.



**FIGURA III.15**

(A) Anàlisi electroforètica en gel SDS-PAGE 15 %, tenyit amb blau de Coomassie, i (B) anàlisi electroforètica en gel SDS-PAGE 15 % amb poli(C) revelats per activitat (Zimograma) de les fraccions obtingudes en la purificació de la rRNasa A pel protocol B. 1) Marcadors de massa molecular (fosforilasa b (106000 Da), BSA (80000 Da), ovoalbúmina (49500 Da), anhidrasa carbònica (32500 Da), inhibidor de tripsina de soja (27500 Da) i lisozim (18500 Da); 2) fracció soluble corresponent al procés de solubilització de rRNasa A amb Tris/HCl 20 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, Gdn·HCl 6 M, EDTA 10 mM, DTT 0,1 M posterior al procés de truncament cel·lular; 3) fracció de proteïna soluble de la diàlisi enfront d'àcid acètic 20 mM; 4) fracció corresponent al final del procés de replegament i reoxidació; 5) fracció majoritària de la cromatografia de bescanvi catiònic per HPLC (Mono-S<sup>®</sup> HR 5/5-FPLC); 6) RNasa A comercial

Els resultats de la FIGURA III.15.B van permetre comprovar la presència d'activitat ribonucleasa en totes les fraccions assajades.

Una vegada purificades les variants de la RNasa A es van fer les anàlisis electroforètiques en gels SDS-PAGE 15 % i en zimogrames de la fracció majoritària de la cromatografia de bescanvi catiònic per HPLC (Mono-S<sup>®</sup> HR 5/5-FPLC ) de cada variant. Els resultats van mostrar una única banda amb activitat ribonucleasa de mobilitat idèntica a l'observada per a la RNasa A comercial (carrer 6, FIGURA III.15.A i B).

El perfil d'elució de la cromatografia de bescanvi catiònic pel sistema d'HPLC en columna Mono-S<sup>®</sup> HR 5/5-FPLC i la freqüent presència de la segona banda en les

fraccions corresponents al replegament i reoxidació prèvies a aquesta cromatografia, analitzades mitjançant gels de poliacrilamida-SDS, van demostrar que calia també afegir aquesta etapa cromatogràfica per HPLC en aquest procés de purificació alternatiu de les rRNases A, ja que d'aquesta manera s'assegura que en les proteïnes purificades no s'hi troben isoformes pel que fa a un diferent nombre de ponts disulfur.

A més a més, l'estudi estructural per diroisme circular de la fracció corresponent al procés de replegament i reoxidació, amb posterior concentració per ultrafiltració tangencial i diàlisi exhaustiva enfront d'aigua Milli-Q, va reafirmar la necessitat d'incloure l'etapa cromatogràfica, ja que va permetre comprovar que la seva estructura tridimensional era significativament diferent a la de la RNasa A comercial. Els espectres de DC a l'UV llunyà i a l'UV proper de la fracció analitzada van ser molt similars als enregistrats per a la fracció analitzada del procés de purificació seguint el protocol A (FIGURA III.14.A i B, espectre 2). Incorporant aquesta etapa, com es veurà més endavant en la FIGURA III.17, s'aconsegueix obtenir una proteïna recombinant amb una estructura tridimensional idèntica a la de la RNasa A comercial.

### III.1.5.6. Rendiment del procés de purificació de les rRNAases A

El procés de purificació de la rRNasa A pel protocol B es va quantificar de la mateixa manera que per a la proteïna purificada pel protocol A (apartat III.1.4.7). Els resultats obtinguts de l'estimació de la quantitat de proteïna total en les diferents etapes del procés de purificació de la rRNasa A s'indiquen tot seguit:

1. Fracció soluble corresponent al procés de solubilització de rRNasa A amb Tris/HCl 20 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, Gdn-HCl 6 M, DTT 0,1 M posterior al procés de trencament cel·lular: 350-490 mg
2. Fracció corresponent al final del procés de replegament i reoxidació: 60-70 mg
3. Fracció de proteïna replegada i reduïda després de ser concentrada, dialitzada enfront de Tris/HCl 20 mM, pH 8,0 i centrifugada per eliminar la part insoluble: 40-50 mg
4. Fracció majoritària amb activitat ribonucleasa de la cromatografia de bescanvi catiònic per HPLC (Mono-S<sup>®</sup> HR 5/5-FPLC): 15-20 mg

Els rendiments finals del procés de purificació de les variants de la RNasa A van ser

també similars a l'obtingut per a la proteïna salvatge.

Amb aquest protocol de purificació alternatiu de les rRNases A, malgrat s'obtenen rendiments lleugerament inferiors als del protocol anterior (A) (apartat III.1.4.7), s'aconsegueix reduir el temps de realització, gràcies, sobretot, a l'estalvi d'una etapa de cromatografia a pressió atmosfèrica. A més a més, s'impedeix la possibilitat de modificació química que pot sofrir la proteïna recombinant per carbamilació de residus de lisina mercès a la substitució de la urea, com a agent desnaturalitzant, pel clorur de guanidini.

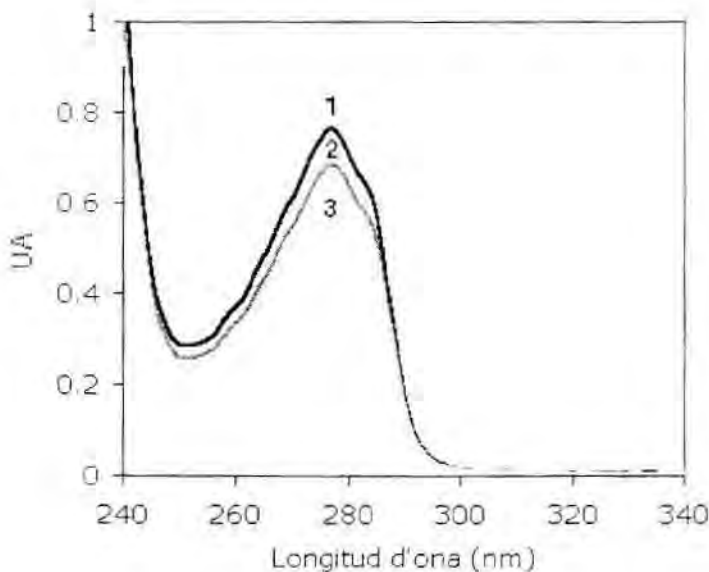
### III.2. Caracterització de la rRNasa A i comparació amb la RNasa A comercial

S'han caracteritzat diferents propietats de les dues rRNases A salvatges (WT) expressades per la soca *E. coli* BL21(DE3)-[pBXR] i obtingudes mitjançant dos protocols de purificació diferents, A i B, amb la finalitat de comprovar que el processos d'expressió i purificació utilitzats produeixen una proteïna recombinant amb propietats estructurals i catalítiques equivalents a les de la RNasa A comercial, obtinguda a partir de pàncrees boví.

S'han obtingut els espectres d'absorbància a la regió UV i de dicroisme circular de les rRNases A WT i de la RNasa A comercial per tal de comprovar l'estructura general de les proteïnes. També s'han determinat els paràmetres cinètics enfront de dos substrats, cCMP i poli(C), per tal de comparar les propietats catalítiques entre les proteïnes recombinants WT i la RNasa A comercial.

#### III.2.1. Anàlisi espectrofotomètrica

Els espectres d'absorbància en la regió ultraviolada en el marge entre 250 i 300 nm, de les dues rRNases A WT purificades i de la RNasa A comercial es mostren en la FIGURA III.16.



**FIGURA III.16**

Espectres en la regió UV de la RNasa A comercial (1) i recombinants salvatges obtingudes seguint els protocol de purificació A (2) i B (3). S'ha utilitzat una concentració de proteïna d'1 mg/mL, aproximadament, en amortidor acetat sòdic 50 mM, pH 5,0. Les cubetes utilitzades van ser d'1 cm de pas òptic.



Tal com es pot veure en aquesta figura no s'han observat canvis en l'espectre d'absorció a l'UV en relació a la RNasa A comercial. Per tant, en una primera comparació, sembla que l'estructura global de les tres proteïnes és idèntica.

### III.2.2. Estudi de l'espectre de DC

L'estudi de l'espectre de dicroisme circular de les rRNases A WT purificades pels dos mètodes, A i B, permet comprovar que l'estructura tridimensional d'aquestes proteïnes és idèntica a la de la RNasa A comercial.

En la FIGURA III.17 es mostren els espectres de DC a l'UV llunyà (190-250 nm) i a l'UV proper (250-310 nm) per a la rRNasa A purificada seguint el protocol A, la purificada seguint el protocol B i la RNasa A comercial enregistrats a 10°C.

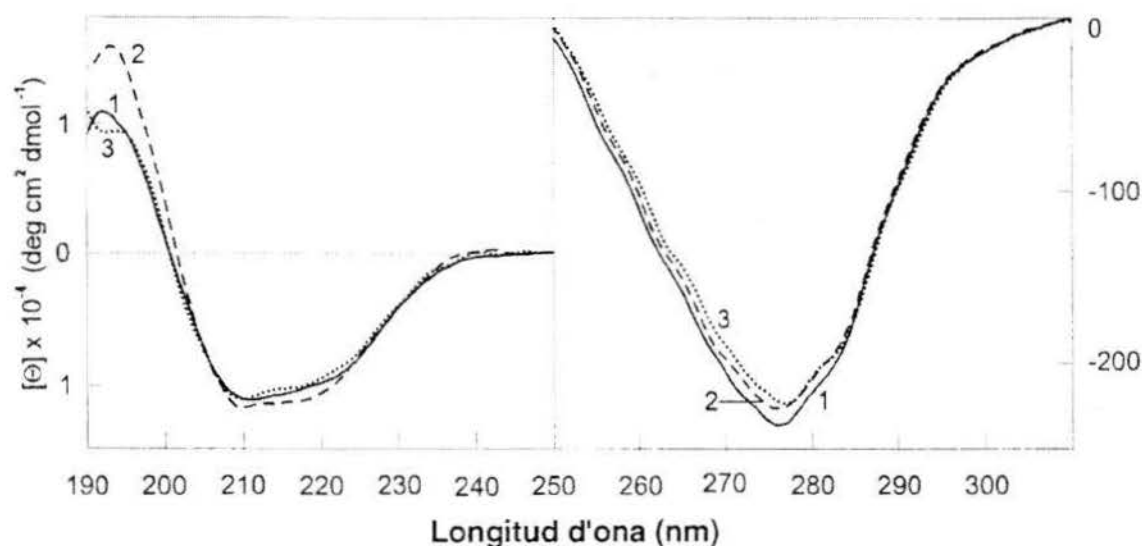


FIGURA III.17

Espectres de dicroisme circular de la RNasa A comercial (1) i la rRNasa A purificada seguint el protocol A (2) i la purificada seguint el protocol B (3) enregistrats a 10°C. S'ha utilitzat una concentració de proteïna de 0,25 mg/mL en amortidor acetat sòdic 50 mM, pH 5,0 i cubetes de quars de 0,02 cm de pas de llum per a la regió de l'UV llunyà (190-250 nm) i una concentració de proteïna d'1,0 mg/mL i cubetes de quars d'1 cm de pas de llum per a la regió de l'UV proper (250-310 nm).

La visió general dels espectres de DC de la FIGURA III.17 és similar i comparable a la de la RNasa A publicada per diferents autors (Pflumm i Beychok, 1969; Hennessey i col., 1981).

Els tres espectres a la regió de l'ultraviolat llunyà, la qual correspon principalment a l'absorció de l'enllaç peptídic i s'associa a una superposició de la conformació hèlix  $\alpha$  i la conformació full plegat  $\beta$ , mostren una banda negativa similar en la regió amb un mínim a 210 nm i un replà a 217 nm característic de la RNasa A (Pflumm i Beychok, 1969; Shultz i col., 1975).

A partir del valor de l'el·lipticitat de la cadena polipeptídica a 222 nm, s'ha estimat el contingut d'hèlix  $\alpha$  de cada mostra pel sistema descrit per Chen i col. (1972), el qual correspon a  $(25 \pm 5) \%$  per a la RNasa A comercial i  $(22 \pm 5) \%$  i  $(24 \pm 5) \%$  per a la rRNasa A purificada seguint el protocol A i B, respectivament. A causa que la precisió d'una estimació absoluta del contingut d'hèlix  $\alpha$  a partir de DC és  $\pm 5 \%$  (Bayley i Martin, 1992).

Pel que fa a la regió propera de l'UV, els tres espectres mostren una banda negativa amb un mínim al voltant de 275 nm (Pflumm i Beychok, 1969; Horwitz i Strickland, 1971) semblant, concretament a 276,4 nm, la qual s'ha interpretat com a resultat de l'activitat òptica dels residus de tirosina i en menor proporció, de residus de cisteïna (Strickland, 1972).

### III.2.3. Propietats catalítiques

Els paràmetres cinètics de les dues rRNases A WT i la RNasa A comercial s'han determinat pel mètode de seguiment espectrofotomètric de l'activitat de 2',3'-fosfat cíclic (cCMP) i de poli(C), tal i com s'han descrit en l'apartat II.7.5.1.

Per a l'assaig amb el substrat cCMP s'ha utilitzat el mètode espectrofotomètric de Crook i col. (1960) modificat per Herries i col. (1962). La hidròlisi del substrat cCMP i formació de 3'-CMP es mesura a partir de l'increment d'absorbància a 296 nm.

Per a la determinació dels paràmetres cinètics del trencament del substrat poli(C) s'ha utilitzat el mètode espectrofotomètric que mesura el decrement d'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'absorbància entre 230 i 320 nm, en el qual s'ha observat que hi ha una regió de decrement lineal màxim entre 292 i 296 nm i s'ha seleccionat 294 nm com a longitud òptima de lectura (Boix, 1993).

Ambdós assaigs s'han realitzat en amortidor acetat sòdic 0,2 M, pH 5,5 i a 25°C. Les concentracions d'enzim i substrat es presenten en la TAULA III.2.

**TAULA III.2** - Comparació dels paràmetres cinètics de les dues rRNases A WT purificades pel protocol A i B, respectivament, amb la RNasa A comercial per als substrats cCMP i poli(C). Tots tres assaigs s'han realitzat en amortidor acetat sòdic 0,2 M, pH 5,5 i a 25°C. Per al substrat cCMP s'ha utilitzat una concentració final d'enzim de 0,1 µM i de substrat entre 0,1 i 3 mM, mentre que per al substrat poli(C) s'ha utilitzat una concentració d'enzim de 5 nM i de substrat entre 0,1 i 2 mg/mL.

<b>cCMP</b>			
Enzim	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )x10 <sup>3</sup>
rRNasa A (A)	0,69	150	3,62
rRNasa A (B)	0,70	157	3,74
RNasa A comercial	0,67	160	3,98

<b>Poli(C)</b>			
Enzim	$K_m$ (mg/mL)	Rel. $V_{m\grave{a}x}/[E_0]^1$ (%)	Rel. $V_{m\grave{a}x}/[E_0]/K_m$
rRNasa A (A)	0,37	90	243
rRNasa A (B)	0,27	109	404
RNasa A comercial	0,32	100	313

<sup>1</sup>  $[E_0]$  és la concentració final d'enzim. Els valors de la  $V_{m\grave{a}x}$  per a la RNasa A comercial es refereixen com a 100 %.

Els valors de  $K_m$  i  $k_{cat}$  per a les dues rRNases A WT són comparables als obtinguts en les mateixes condicions d'assaig per a la RNasa A comercial. Tanmateix, els paràmetres cinètics calculats amb el substrat poli(C) per a les proteïnes recombinats es

desvien més dels de la RNasa A comercial, especialment pel que fa a la seva  $K_m$ . No obstant això, aquestes desviacions estan dins el marge d'error experimental d'aquest mètode de determinació de l'activitat ribonucleasa amb un substrat d'elevada massa molecular.

El sistema d'expressió en *E. coli* i els dos sistemes de purificació utilitzats posteriorment (A i B) en aquest treball permeten l'obtenció de 15-30 mg de proteïna recombinant pura i amb propietats estructurals i catalítiques equivalents a la de la RNasa A comercial, aïllada de pàncrees boví. Per tant, serà indiferent el mètode de purificació utilitzat per a l'obtenció de les diferents variants de la RNasa A.

### III.3. Caracterització de les variants senzilles de la RNasa A

S'han obtingut els espectres d'absorbància a la regió UV i de dicroisme circular de les 14 variants senzilles de la RNasa A per tal de comprovar l'estructura general de la proteïna i comparar-la amb la de la RNasa A, i, a més, s'han calculat els seus coeficients d'extinció molar. També, s'han determinat els paràmetres cinètics enfront dels dos substrats, cCMP i poli(C), per tal de comparar les propietats catalítiques de les variants respecte a l'enzim salvatge.

#### III.3.1. Determinació del coeficient d'extinció molar

La determinació del coeficient d'extinció molar de la RNasa A i les seves variants es va realitzar mitjançant el mètode d'Edelhoch, descrit per Gill i von Hippel (1989) (apartat II.7.6).

A excepció de la variant Y115W, les variants senzilles van presentar un valor no significativament diferent al determinat per a la proteïna salvatge, el qual va ser de  $10195 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , si es considera que la precisió del mètode és de  $\pm 4\text{-}5\%$ . Aquest resultat no és gens inesperat atès que no s'ha substituït cap dels residus que participen en l'absorbància d'una proteïna en solució per sobre dels 275 nm, que són triptòfan, tirosina i cistina (Wetlaufer, 1962; Pace i col., 1995). D'aquesta manera, es confirma que les mutacions individuals introduïdes en la RNasa A no afecten el coeficient d'extinció molar de la proteïna, tot i que els residus Ile107 i Val108 es troben a uns 5 Å d'un residu de Tyr, la Tyr73, i el residu Val116 a uns 4 Å de la Tyr115, en l'estructura cristal·lina de la RNasa A. Per tant, els canvis introduïts en mutar no sembla que afectin l'estructura local circumdant dels residus de Tyr de la proteïna de manera que causin un canvi en l'absorbància d'aquests residus, els quals serien els que més podrien contribuir al valor del coeficient d'extinció molar, atès que la RNasa A no conté triptòfan en la seva seqüència.

Pel que fa a la variant Y115W, va mostrar un valor del seu coeficient d'extinció molar de  $14050 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , que és significativament diferent al de la RNasa A. Aquesta diferència es deu a la substitució d'un dels 6 residus de Tyr de la RNasa A per un Trp en la variant, ja que les cadenes laterals dels residus de triptòfan són les que més contribueixen a l'absorbància d'una proteïna en solució per sobre dels 275 nm

(Wetlaufer, 1962; Pace i col., 1995). D'aquesta manera, la introducció d'un residu de triptòfan en la posició Tyr115 de la RNasa A altera de manera considerable el seu coeficient d'extinció molar.

Segons Pace i col. (1995), el coeficient d'extinció molar a 280 nm d'una proteïna plegada pot ser predit a partir de l'equació següent:

$$\epsilon (280 \text{ nm}) ( \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} ) = (\# \text{Trp}) (5500) + (\# \text{Tyr}) (1490) + (\# \text{cistina}) (125)$$

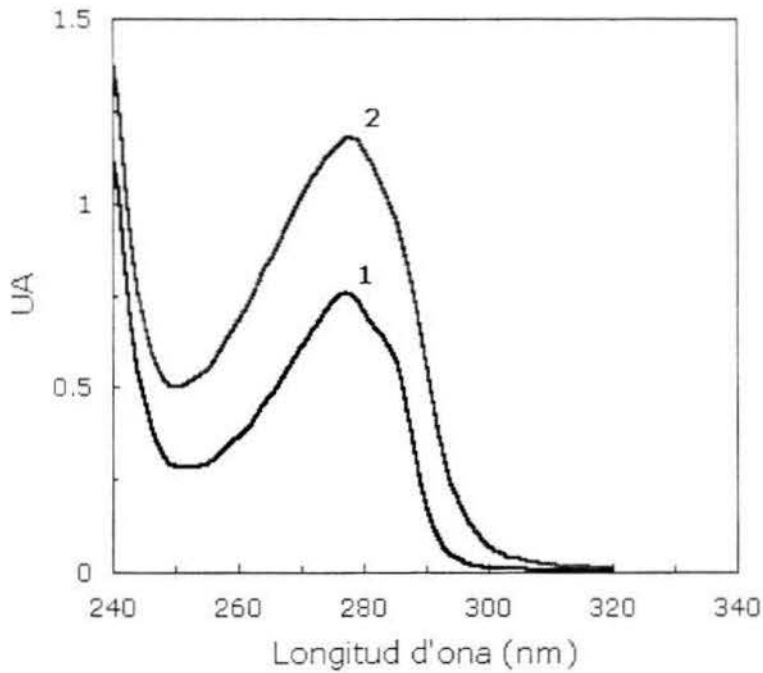
on # correspon al nombre de residus de Trp, Tyr i cistines, respectivament.

Segons aquesta equació, es prediu un valor del coeficient d'extinció molar de la variant Y115W de la RNasa A de 13450 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Aquest valor és similar al trobat experimentalment, mitjançant mètode d'Edelhoch, que correspon a 14050 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, si es té en compte que la precisió del mètode és de ± 4-5 %.

### III.3.2. Anàlisi espectrofotomètrica

En els espectres d'absorbància en la regió ultraviolada en el marge corresponent a 240-320 nm de totes les variants senzilles de la RNasa A no s'han observat canvis en relació a la proteïna salvatge (FIGURA III.16) excepte per a la variant que conté triptòfan, Y115W. En la FIGURA III.18 es compara l'espectre d'aquesta variant amb el de la proteïna salvatge. Com es pot observar en aquesta figura, l'absorció de la llum per part de la variant és superior a la de la proteïna salvatge i s'aprecia una petita diferència com és la desaparició del *shoulder* característic de la RNasa A al voltant de la longitud d'ona de 285 nm, probablement, a causa de la pròpia absorció del triptòfan. Per tant, de les 14 mutacions senzilles introduïdes en la RNasa A, només la substitució de la tirosina 115 per triptòfan provoca una lleugera alteració de l'espectre d'absorbància en la regió ultraviolada de la proteïna salvatge.





**FIGURA III.18**

Espectres en la regió UV de la RNasa A (1) i la seva variant Y115W (2). S'ha utilitzat una concentració de proteïna de 1,0 mg/mL en amortidor acetat sòdic 50 mM, pH 5,0. Les cubetes utilitzades van ser d'1 cm de pas òptic.

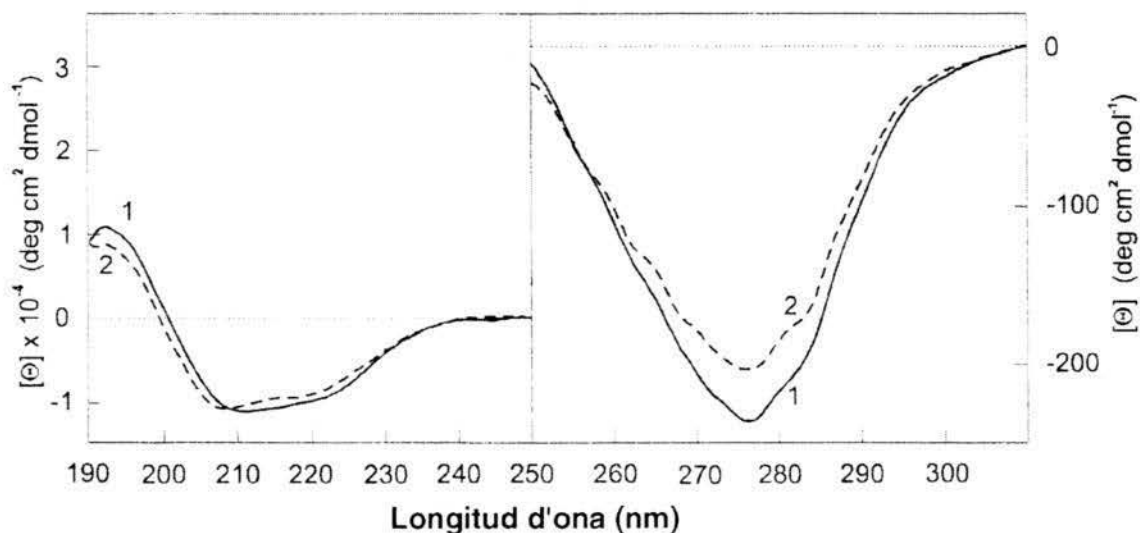
### III.3.3. Estudi de l'espectre de DC

Per tal de comprovar si existeixen diferències estructurals entre les variants senzilles de la RNasa A i la proteïna salvatge, en l'estat natiu, s'han estudiat els espectres de dicroisme circular de totes elles a 10°C i s'han comparat amb els espectres obtinguts per a la proteïna salvatge.

A excepció de la variant Y115W, la visió general dels espectres de DC de les altres 13 variants senzilles enregistrats a 10°C és similar, tant en la regió llunyana de l'UV com en la regió propera, a l'obtingut per a la proteïna salvatge, i només la variant V108G en difereix lleugerament. Per a totes aquestes variants s'ha observat una banda negativa amb un mínim a 210 nm i un replà a 217 nm en l'espectre UV llunyà, i una banda negativa amb un mínim a 276,4 nm en l'espectre UV proper, corresponents totes elles a bandes característiques de la RNasa A.

A partir del valor de l'el·lipticitat de la cadena polipeptídica a 222 nm, s'ha estimat el contingut d'hèlix  $\alpha$  de totes les variants pel sistema descrit per Chen i col. (1972). Per a cap de les variants s'han trobat diferències significatives respecte al valor estimat per a la RNasa A, per bé que s'han vist petites diferències. La variant V108G, amb un contingut d'hèlix  $\alpha$  ( $21 \pm 5$ ) %, és la que més difereix de la proteïna salvatge. Considerant que la precisió en l'estimació absoluta del contingut d'hèlix  $\alpha$  per aquest sistema és de  $\pm 5$  %, s'observa que les mutacions introduïdes de manera individual en la RNasa A produeixen un efecte negligible en el contingut d'hèlix  $\alpha$ . És necessari remarcar que un valor absolut de DC a 222 nm es deu tant al contingut total d'hèlix  $\alpha$  com a distorsions en l'hèlix  $\alpha$  de la proteïna (Manning i col., 1988).

En la FIGURA III.19 es mostren els espectres de DC, a 10°C, de la regió 190-250 nm i 250-310 nm de la proteïna salvatge i els de la variant que més difereix dels d'aquesta, la V108G.



**FIGURA III.19**

Espectres de dicroisme circular de la rRNasa A WT (1) i de la variant V108G (2) enregistrats a 10°C. S'ha utilitzat una concentració de proteïna de 0,25 mg/mL en amortidor acetat sòdic 50 mM, pH 5,0 i cubetes de quars de 0,02 cm de pas de llum per a la regió de l'UV llunyà (190-250 nm) i una concentració de proteïna d'1,0 mg/mL i cubetes de quars d'1 cm de pas de llum per a la regió de l'UV proper (250-310 nm).

Els espectres de DC de la variant V108G, tant en l'UV llunyà com en el proper, són bastant equiparables als de la proteïna salvatge, amb petites diferències en el perfil de les bandes però no en la posició d'aquestes, excepte en la banda de 210 nm que mostra un lleuger desplaçament cap a 208 nm i en la banda de 276,4 nm que mostra menys intensitat del senyal. Aquesta variació en la intensitat del senyal a 276,4 nm de la variant V108G respecte a la RNasa A, indicaria que l'ambient circumdant a algun residu de Tyr de la RNasa A ha canviat lleugerament en substituir el residu Val108 per Gly. Possiblement, es tracti del residu Tyr73 ja que és el residu de tirosina que es troba més propera a Val108 en l'estructura cristal·lina de la RNasa A, concretament a uns 5Å.

Per tant, a partir dels espectres de les 13 variants senzilles de la RNasa A en l'estat natiu no sembla que les modificacions introduïdes en mutar alterin l'estructura secundària i terciària de la proteïna de manera significativa.

Pel que fa a la comparació d'aquests espectres de DC entre la variant Y115W i la proteïna salvatge (FIGUA III.20), s'observen també diferències poc significatives en la regió de l'UV llunyà, fet que demostra que la substitució realitzada no altera l'estructura secundària d'aquesta variant. Ara bé, en la regió de l'UV proper les diferències són significatives. En la variant Y115W s'observa l'aparició de noves bandes a 284 nm, 290 nm i 296 nm corresponents a components vibracionals de la cadena lateral del residu de triptòfan, la qual cosa corrobora la presència d'aquest residu en la proteïna.

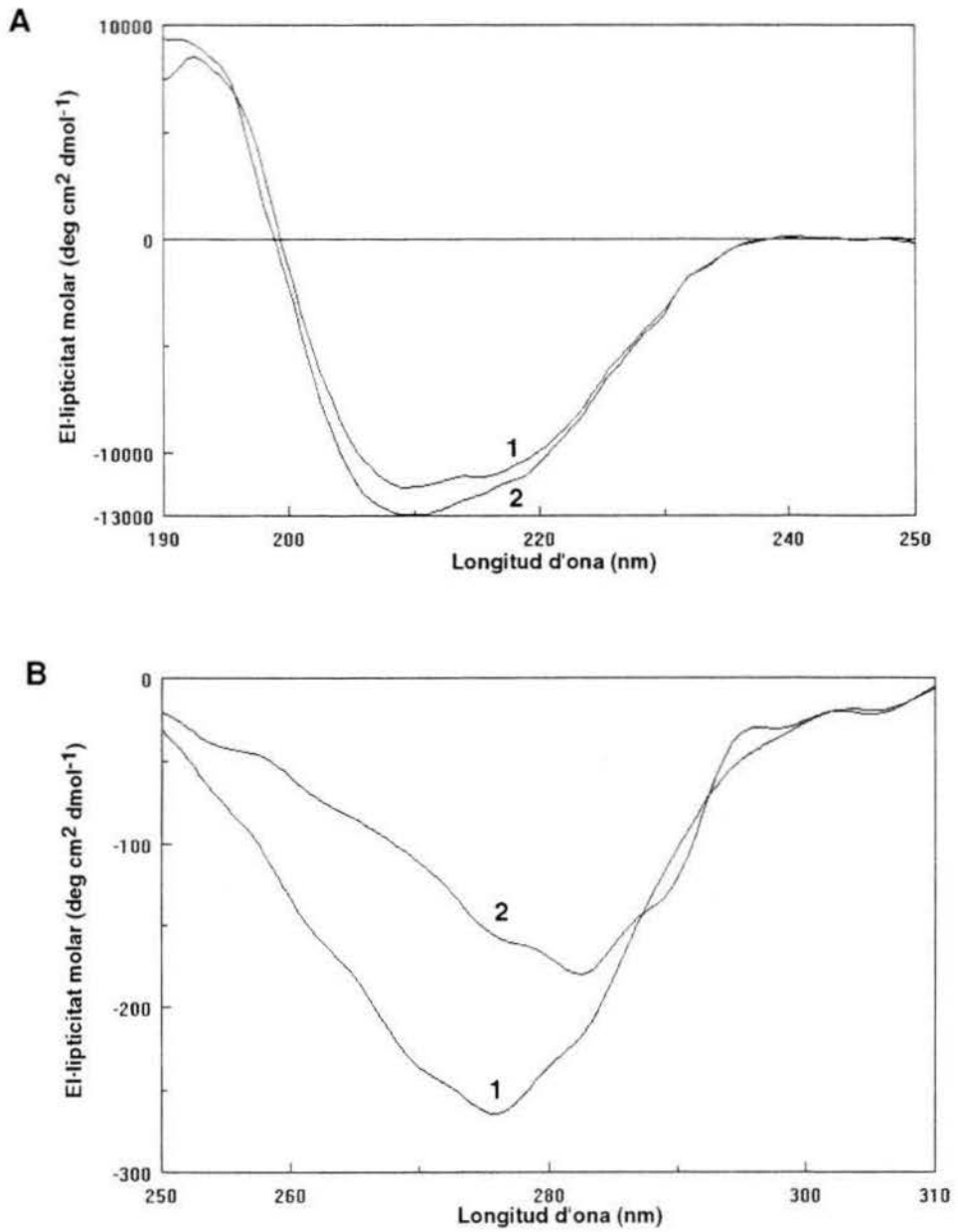


FIGURA III.20

Espectres de diroisme circular de la rRNasa A WT (1) i de la variant Y115W (2) enregistrats a  $10^\circ\text{C}$ . S'ha utilitzat una concentració de proteïna d'1 mg/mL en amortidor acetat sòdic 50 mM, pH 5,0 i cubetes de quars de 0,01 cm de pas de llum per a la regió de l'UV llunyà (190-250 nm) (A) i una concentració de proteïna de 0,5 mg/mL i cubetes de quars de 0,2 cm de pas de llum per a la regió de l'UV proper (250-310 nm) (B).

### III.3.4. Propietats catalítiques

Els paràmetres cinètics de les 14 variants de la RNasa A determinats amb els substrats cCMP i poli(C), s'indiquen en la TAULA III.3.

A partir de la TAULA III.3, es pot observar que la majoria de les variants senzilles de la RNasa A presenten uns valors dels paràmetres cinètics per a la hidròlisi del cCMP i per al trencament del poli(C) similars o amb diferències poc significatives als trobats per a l'enzim salvatge. Aquests resultats concorden amb el fet que canvis puntuals de residus que són importants pel plegament proteic no afecten l'activitat catalítica, tal com s'ha descrit per altres enzims i s'ha suggerit que pot ser una característica general dels enzims (Shoichet i col., 1995).

Si es té en compte una precisió dels valors  $K_m$  i  $k_{cat}$  pel cCMP de l'ordre de  $\pm 25\%$  i dels valors de  $K_m$  i  $Rel.V_{m\acute{a}x}/[E_0]$  pel poli(C) de  $\pm 30-40\%$ , es pot considerar que les substitucions individuals realitzades en els residus Ile106, Ile107, Val108, Ala109, Y115, Val116 i Val118 no afecten de manera significativa el mecanisme catalític de la RNasa A pel substrat cCMP ni pel poli (C).

**TAULA III.3** - Comparació dels paràmetres cinètics de les variants senzilles de la RNasa A respecte a la proteïna salvatge per als substrats cCMP i poli(C). Els assaigs s'han realitzat d'una manera igual a la indicada en la TAULA III.2.

<b>cCMP</b>			
Enzim	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (M <sup>1</sup> s <sup>-1</sup> ) x10 <sup>3</sup>
WT	0,70	155	3,69
I106L	0,89	144	2,70
I106V	0,69	136	3,29
I106A	0,68	116	2,84
I107L	0,76	149	3,27
I107V	0,74	149	3,36
I107A	0,77	133	2,88
V108A	0,79	139	2,93
V108G	0,87	128	2,45
A109G	0,64	180	4,69
Y115W	0,54	116	3,58
V116A	0,69	120	2,90
V116G	0,82	133	2,70
V118A	0,65	115	2,95
V118G	0,66	122	3,08

<b>Poli(C)</b>			
Enzim	$K_m$ (%)	Rel. $V_{m\grave{a}x}/[E_0]^1$ (%)	Rel. $V_{m\grave{a}x}/[E_0]/K_m$
WT	0,32	100	313
I106L	0,37	79	214
I106V	0,33	93	282
I106A	0,30	76	253
I107L	0,34	75	221
I107V	0,31	83	268
I107A	0,40	89	223
V108A	0,44	108	245
V108G	0,38	81	213
A109G	0,32	69	216
Y115W	0,23	70	304
V116A	0,32	77	241
V116G	0,43	107	249
V118A	0,39	81	208
V118G	0,40	92	230

<sup>1</sup>  $[E_0]$  és la concentració final d'enzim. Els valors de la  $V_{m\grave{a}x}$  per a la RNasa A WT es refereixen com a 100%.



### III.4. Caracterització de l'estat desnaturalitzat de les variants senzilles de la RNasa A per DC

La visió general dels espectres de DC de les 13 variants senzilles, sense considerar la Y115W, enregistrats a una temperatura entre 20 i 30°C per sobre la temperatura de desnaturalització de cada variant, assolida a una velocitat d'escalfament de la mostra d'1 K/min, és pràcticament idèntica, tant en la regió de l'UV llunyà com en la de l'UV proper, als obtinguts per a la proteïna salvatge. En la FIGURA III.21 s'exemplifica amb els espectres de DC de la RNasa A i els de la variant V108G.

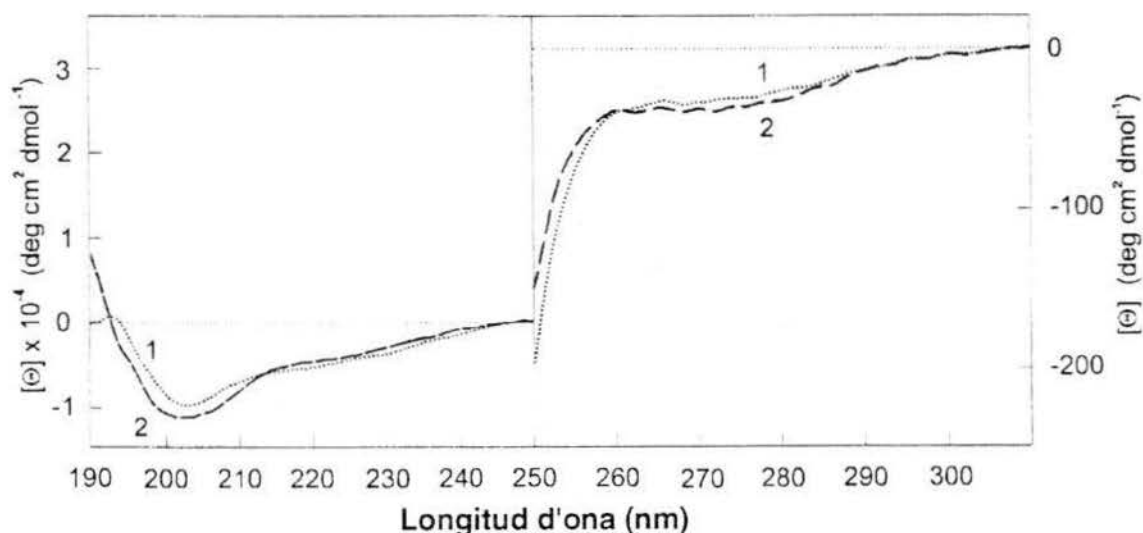


FIGURA III.21

Espectres de dicroisme circular de la rRNasa A WT (1) i de la variant V108G (2) enregistrats a 80 i 60°C, respectivament. S'ha utilitzat una concentració de proteïna de 0,25 mg/mL en amortidor acetat sòdic 50 mM, pH 5,0 i cubetes de quars de 0,02 cm de pas de llum per a la regió de l'UV llunyà (190-250 nm) i una concentració de proteïna d'1,0 mg/mL i cubetes de quars d'1 cm de pas de llum per a la regió de l'UV proper (250-310 nm). La velocitat d'escalfament de les mostres ha estat d'1 K/min.

En la regió de l'UV proper s'ha observat la desaparició de la banda a 276 nm, característica dels 6 residus de tirosina de la RNasa A, en totes les rRNases A estudiades a causa que les estructures locals d'aquestes tirosines són pràcticament destruïdes en l'estat desnaturalitzat.

En canvi, en la regió de l'UV llunyà s'ha observat un espectre significatiu per a totes les proteïnes. A partir del valor de l'el·lipticitat a 222 nm s'ha estimat el contingut d'hèlix  $\alpha$  de la proteïna salvatge en  $(9 \pm 5) \%$ , el qual ha resultat ser pràcticament idèntic al de les variants de la proteïna. Aquest valor està en concordança amb el trobat per Robertson i Baldwin (1991) per a la RNasa A desnaturalitzada per calor a partir de la senyal de DC a 222 nm, i curiosament, també, amb el trobat per a la S-proteïna (residus 21-124) (Loftus i col., 1986) i per a altres proteïnes (Privalov i col., 1989) desnaturalitzades per calor. Aquest senyal ha estat interpretat com la presència d'estructura secundària residual que no és a l'atzar, la qual s'ha vist que pot ser reduïda a un nivell inferior addicionant clorur de guanidini (Labhardt, 1982). No es coneix massa bé la naturalesa d'aquesta l'estructura residual responsable de l'espectre de DC, per bé que Robertson i Baldwin (1991) diuen que no es tracta d'una estructura estable amb ponts d'hidrogen perquè no observen protecció significativa per a cap dels hidrogens amida analitzats en experiments de bescanvi H/D. Aquest estudi de bescanvi H/D ha estat discutit posteriorment per altres autors (Santoro i col., 1993; Wang i col., 1995), els quals utilitzant també tècniques de bescanvi H/D van observar un grau significatiu d'estructura en l'estat desplegat de la RNasa A. Per a les diferents variants de la RNasa A s'ha estimat un contingut d'hèlix  $\alpha$  en l'estat desnaturalitzat similar al trobat per a la proteïna salvatge.

Per tant, la desnaturalització de les 13 variants de la RNasa A dóna lloc a una estructura residual pràcticament idèntica a la que s'obté per a la proteïna salvatge. Les substitucions realitzades en els residus hidrofòbics de la regió 106-118 de la RNasa A no afecten, en general, o afecten molt poc l'estructura nativa i la desnaturalitzada de la proteïna, dins els límits mesurables per la tècnica utilitzada.

### III.5. Desnaturalització tèrmica de la rRNasa A i les seves variants senzilles seguida per DC

El dicromisme circular ha estat també utilitzat per seguir la desnaturalització per calor de la RNasa A i les seves 13 variants senzilles, a excepció de la Y115W. S'ha enregistrat l'el·lipticitat a dues longituds d'ona diferents, a 222 nm i a 276,4 nm, des dels 10-20°C fins a una temperatura entre 20 i 30°C per sobre la temperatura de desnaturalització de cada variant. Les velocitats d'escalfament i de refredament de les mostres han estat les mateixes que s'han utilitzat en els experiments de DSC que es presenten en el seguüent apartat, d'1 K/min. El seguiment de la desnaturalització a 222 nm és indicatiu del contingut d'hèlix  $\alpha$  de la proteïna mentre que el seguiment a 276,4 nm ho és de la destrucció de les estructures locals dels 6 residus de tirosina de la RNasa A.

Cadascuna de les RNases recombinants analitzades ha mostrat una coincidència total entre la forma de la corba de desnaturalització enregistrada a 276,4 nm i l'enregistrada a 222 nm, tal com es pot veure exemplificat a la FIGURA III.22 per a la RNasa A i per a la seva variant més desestabilitzada (V108G). Aquesta coincidència testimonia que les alteracions en les estructures secundàries i terciàries de cada proteïna durant el procés de desnaturalització tèrmica són concurrents. Per a la variant V108G s'observa que es parteix d'uns valors del contingut d'hèlix  $\alpha$  i de l'el·lipticitat a 276,4 nm lleugerament inferiors als de la RNasa A, cosa que no s'ha observat per a les altres variants, les quals han presentat valors similars als de la proteïna salvatge. Aquesta variació en el valor de l'el·lipticitat a 276,4 nm de la variant V108G en l'estat natiu pot ser causada per petites diferències en les estructures locals del residu Tyr73 en relació a la proteïna salvatge nativa, tal com ja s'ha indicat a partir dels espectres de DC d'aquestes dues proteïnes en l'estat natiu (apartat III.3.3, FIGURA III.19). Malgrat això, el camí de desnaturalització, seguit a 222 nm i 276,4 nm, de la variant V108G és similar al de la RNasa A i al de les altres variants i s'arriba a un estat desnaturalitzat que presenta un contingut d'hèlix  $\alpha$  i una destrucció de les estructures locals dels 6 residus de tirosina similar també al de la proteïna salvatge i al de les altres variants.

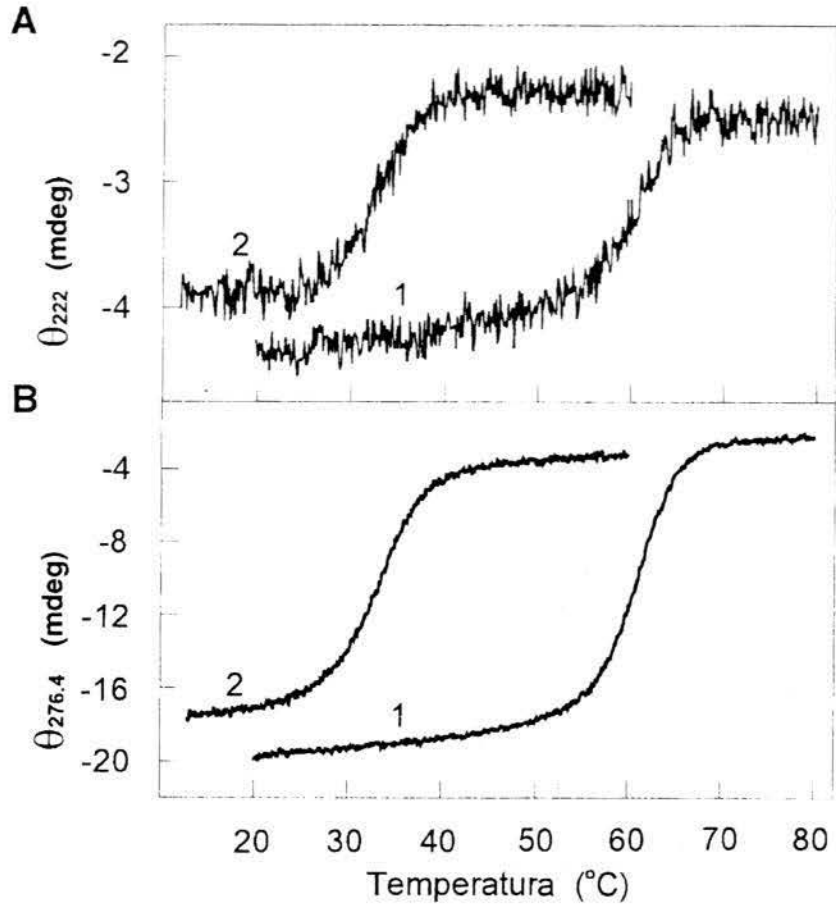


FIGURA III.22

Desnaturalització de la rRNasa A (1) i la variant V108G (2) seguida per mesura de l'el·lipticitat a 222 nm i 276,4 nm. S'ha utilitzat una concentració de proteïna de 0,25 mg/mL en amortidor acetat sòdic 50 mM, pH 5,0 i cubetes de quars de 0,02 cm de pas de llum pel seguiment a 222 nm (A) i una concentració de proteïna d'1,0 mg/mL i cubetes de quars d'1 cm de pas de llum pel seguiment a 276,4 nm (B). La velocitat d'escalfament de les mostres ha estat d'1 K/min.

A partir dels pics corresponents a la primera derivada dels perfils enregistrats a 276,4 i a 222 nm s'obté el valor de la temperatura de desnaturalització,  $T_d$ , que correspon a la temperatura en el punt mig de la transició tèrmica del desplegament, amb una precisió de  $\pm 0,3$  °C. Per a la RNasa A, s'han obtingut uns valors de 60,8 °C i 61,0 °C, respectivament. Considerent la precisió del mètode, aquests valors són idèntics al que s'obté per DSC (veure apartat III.6 i TAULA III.4), que és de 60,8 °C i amb una precisió lleugerament millor de  $\pm 0,2$  °C. Per a les diferents variants de la RNasa A, els valors de la  $T_d$  obtinguts per DC han coincidit també amb els obtinguts per DSC.

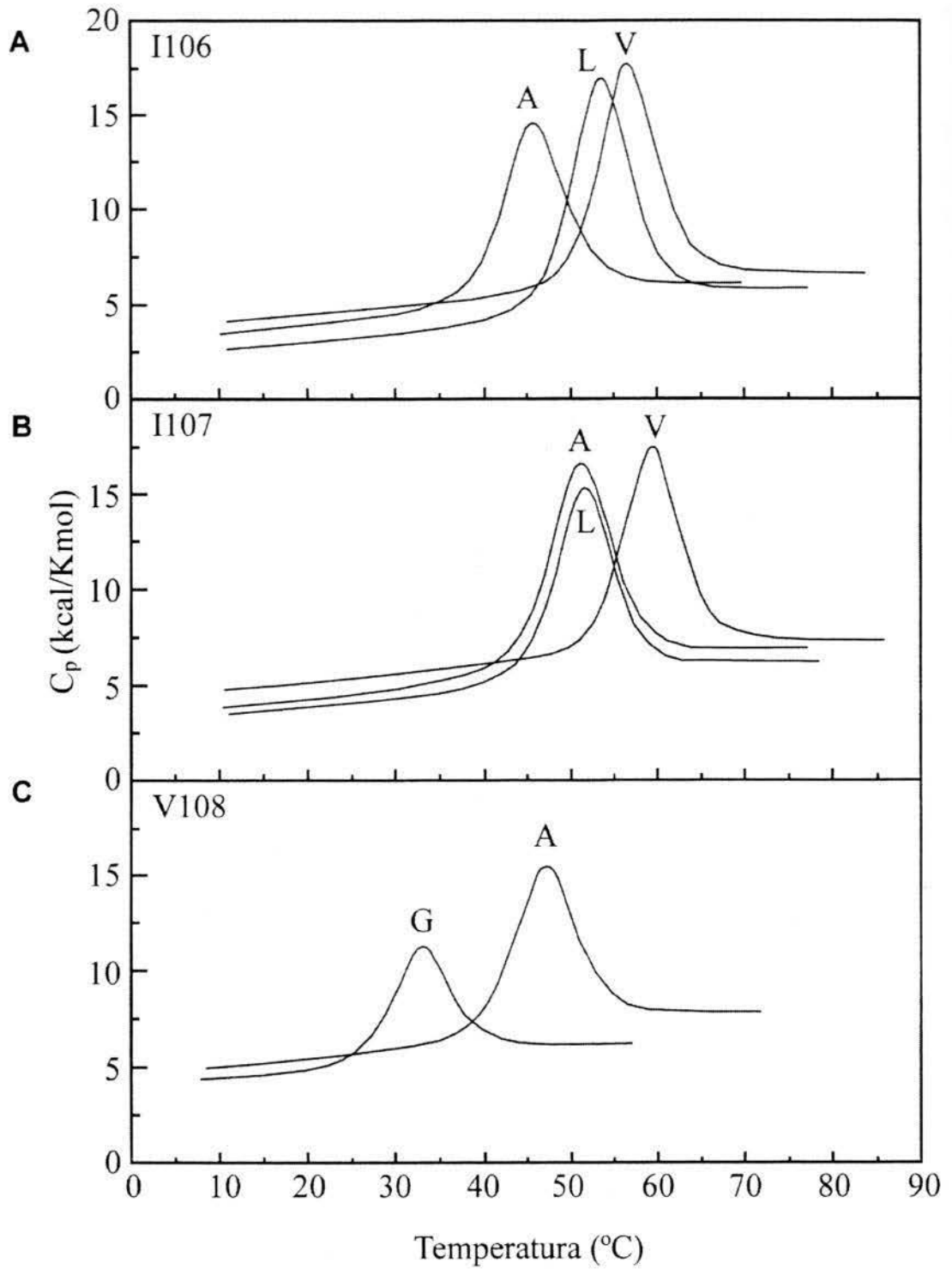
### III.6. Desnaturalització tèrmica de la rRNasa A i les seves variants senzilles seguida per DSC

La calorimetria d'escombrat diferencial (DSC) mesura de manera continuada els petits canvis en la capacitat calorífica,  $C_p$ , d'una mostra (en el nostre cas d'una dissolució proteica) en relació a la referència (amortidor) al llarg d'un rang de temperatura, amb velocitats d'escalfament o refredament constants.

Aquest tipus de calorimetria té la capacitat per resoldre les transicions estructurals que sofreix un determinat compost químic quan és sotmès a una variació sistemàtica de temperatura i resulta una tècnica fonamental per a l'estudi de l'estructura i propietats fisicoquímiques de les proteïnes mitjançant l'anàlisi de la seva desnaturalització tèrmica, ja que és l'única tècnica que permet la determinació directa de totes les funcions associades al procés de desplegament, i a més, pot ser utilitzada per determinar si el procés és una transició entre dos estats reversible ( $N \leftrightarrow D$ ) i, per tant, per comprovar la validesa d'un model de dos estats (Privalov i Potekhin, 1986).

En la FIGURA III.23 es mostren les corbes de DSC o termogrames per a les 13 variants senzilles de la RNasa A, les quals es van portar a terme en l'amortidor acetat sòdic 50 mM, pH 5,0 i a una velocitat d'escalfament d'1 K/min, seguint el protocol descrit en l'apartat II.7.8.

Cal remarcar des de bon començament que la comprovació de la reversibilitat del desplegament tèrmic de les mostres analitzades, determinada seguint el criteri de superposició de dos successius escombrats de la mateixa mostra, amb refredament previ de la mostra a la mateixa velocitat, va indicar que el procés de desnaturalització tèrmica per calor de totes les variants de la RNasa A és quasi totalment reversible, amb valors superiors al 90 %. És per això que és totalment correcte considerar que es tracta d'un procés en equilibri, i, per tant, que es poden deduir amb fiabilitat les dades termodinàmiques corresponents a la desnaturalització tèrmica de les proteïnes estudiades.





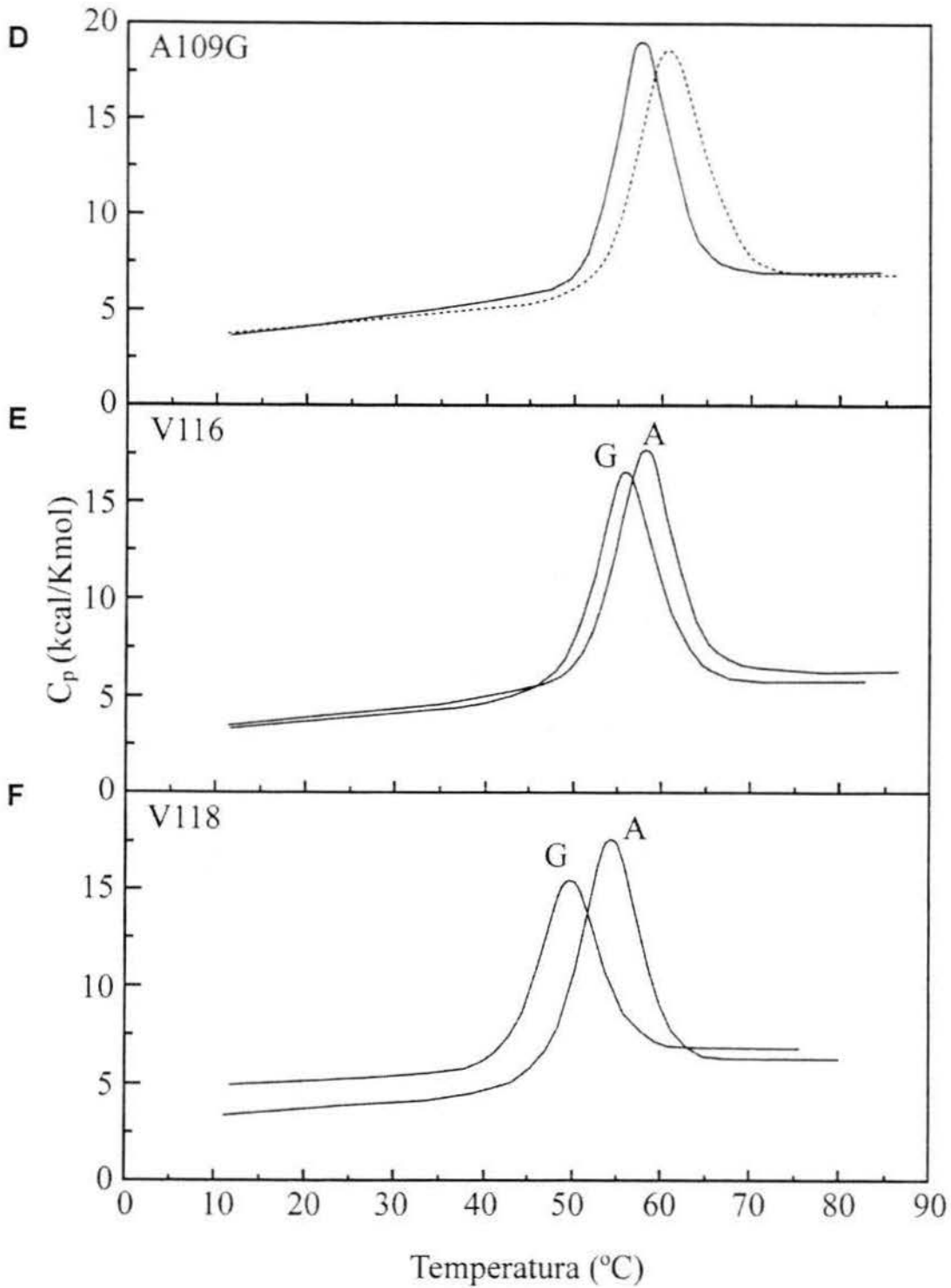


FIGURA III.23

Termogrames de DSC de la rRNasa A i les seves variants: I106L, I106V i I106A (**A**); I107L, I107V i I107A (**B**); V108A i V108G (**C**); A109G (**D**); V116A i V116G (**E**) i V118A i V118G (**F**), en acetat sòdic 50 mM, pH 5,0. El termograma de la rRNasa A (---) es mostra en (**D**). La velocitat d'escombrat ha estat d'1 K/min. La concentració de proteïna ha oscil·lat entre 0,8 i 1,6 mg/mL (60-120  $\mu$ M).

A partir dels termogrames anteriors s'han determinat els paràmetres termodinàmics del procés de desnaturalització per temperatura tal com s'ha descrit en l'apartat II.7.8. Aquests paràmetres es troben resumits en la TAULA III.4, en la qual també s'indica el grau de reversibilitat del procés per a cada una de les variants i per a la proteïna salvatge, i seran comentats amb detall en els següents apartats.

TAULA III.4 - Paràmetres termodinàmics de la desnaturalització induïda per temperatura de la rRNasa A i les seves variants obtinguts per calorimetria d'escombrat diferencial\*

Proteïna	$T_d$ (°C)	$C_p^{20}$ (kcal K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_{cal}(T_d)$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_{vH}(T_d)$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$R^{**}$	$\Delta\Delta G_d$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	reversi- bilitat
WT	60,8	4,4	115,2	116,3	0,99		97
I106L	54,0	3,8	96,6	100,0	0,97	2,35	91
I106V	56,5	4,7	95,7	119,6	0,80	1,48	90
I106A	46,6	4,1	79,4	91,3	0,87	4,90	90
I107L	51,8	3,8	83,9	98,3	0,85	3,11	96
I107V	60,4	4,9	87,3	105,1	0,83	0,14	95
I107A	50,6	4,1	79,0	97,0	0,81	3,52	90
V108A	46,8	5,0	71,4	95,3	0,75	4,83	97
V108G	33,8	4,9	42,4	85,5	0,50	9,32	99
A109G	58,1	4,4	99,2	106,2	0,93	0,93	90
V116A	57,5	3,8	92,5	105,3	0,88	1,14	91
V116G	55,5	3,7	94,7	96,8	0,98	1,83	90
V118A	54,3	3,8	96,5	101,5	0,95	2,24	94
V118G	50,0	4,8	78,1	95,4	0,82	3,73	93

\* Els valors de  $T_d$  tenen una precisió de  $\pm 0,2$  °C, els de  $C_p^{20}$  de  $\pm 0,5$  kcal K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> i els de  $\Delta H_{cal}(T_d)$  i  $\Delta H_{vH}(T_d)$  tenen una precisió de  $\pm 6$  %.

\*\*  $R = \Delta H_{cal}(T_d) / \Delta H_{vH}(T_d)$ .

### III.6.1. Comparació de l'estabilitat de les variants senzilles de la RNasa A en relació a la proteïna salvatge

A partir dels termogrames de les diferents variants de la RNasa A de la figura anterior s'observa que totes les mutacions estudiades provoquen un desplaçament de la corba cap a temperatures més baixes respecte a la proteïna salvatge, és a dir, causen una desestabilització de la proteïna, la qual ha resultat variable en funció del tipus de substitució feta i de la posició alterada. Les variants I107V i A109G són les úniques que es veuen només lleugerament afectades. Entre les sèries de variants de cada posició alterada, l'extensió d'aquesta desestabilització, la qual es pot observar millor a partir dels valors de la disminució de la temperatura de desnaturalització,  $T_d$ , indicats en la TAULA III.4, segueix el següent ordre: Ile<Val<Leu<Ala<Gly. Ara bé, la disminució de la  $T_d$  entre cada sèrie és diferent. S'observa que el canvi Ile106 per Val o Ala és més significatiu que els mateixos canvis realitzats en el residu Ile107, mentre que la disminució de la  $T_d$  com a resultat de la substitució d'Ile per Leu en la posició 107 és més gran que la realitzada en la posició 106. La presència de Val en les posicions 106 i 107 es troba molt conservada entre la superfamília de les RNases, essent més significativa aquesta conservació en la posició 107 que en la 106 (Beintema i col., 1997). Pel que fa a les sèries de variants de residus de valina, es veu que la substitució de Val per Ala o Gly afecta més en la posició 108 que en les posicions 118 i 116, essent més significativa en la 118 que en la 116. D'aquesta manera, d'entre els diferents residus hidrofòbics alterats de la regió iniciadora del plegament de la RNasa A (106-118), la posició Val108 és la que es veu més alterada pel que fa a la disminució de la  $T_d$  quan és substituïda per Val o Gly. Comparant els valors de la  $T_d$  d'aquestes dues variants respecte a la proteïna salvatge, s'observa una disminució de 14 °C i 27 °C, respectivament.

El valor de la capacitat calorífica parcial a 20°C,  $C_p^{20}$ , determinat per a la RNasa A és  $(4,4 \pm 0,5)$  kcal K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>. Aquest valor és típic de proteïnes globulars compactes (Privalov i col., 1989) i és pràcticament idèntic al valor trobat per a les diferents variants de la RNasa A (TAULA III.4 i FIGURA III.23). A partir de les corbes de DSC mostrades en la FIGURA III.23, es pot observar que la capacitat calorífica molar parcial de les diferents RNases A en l'estat desnaturalitzat, és a dir, després de la transició tèrmica, és també molt similar i amb valors més grans que els trobats per a l'estat natiu, cosa que és característica d'estructures obertes, és a dir, desnaturalitzades. El fet que els

valors de la capacitat calorífica parcial de les variants de la RNasa A, tant a 20°C com després de la transició tèrmica, siguin molt similars als trobats per a la proteïna salvatge indica que no sembla que existeixin diferències significatives quan a flexibilitat entre la RNasa A i les seves variants, ni en l'estat natiu ni en l'estat desnaturalitzat. Aquests resultats estan en concordança amb els trobats per diroisme circular i recolzen el fet que les mutacions introduïdes de manera individual en la RNasa A no afecten de manera significativa ni la l'estructura nativa de la proteïna ni la desnaturalitzada per calor (apartat III.5). El fet que mutacions senzilles en proteïnes causin generalment perturbacions estructurals molt petites ha estat àmpliament descrit a la bibliografia (Lattman i Rose, 1993; Carra i col., 1994). Que la conformació nativa de totes variants de la RNasa A sigui pràcticament idèntica a la de la proteïna salvatge és un factor important per a una correcta anàlisi comparativa de l'efecte d'una substitució en l'estabilitat tèrmica de la proteïna.

Una altra manera d'estimar l'estabilitat de cada variant respecte a la proteïna salvatge és el càlcul del valor de  $\Delta\Delta G_d$ , és a dir, la diferència entre el valor de l'energia lliure del desplegament de la proteïna salvatge i el valor d'aquest mateix paràmetre calculat per a cada variant.

Amb els valors dels paràmetres  $T_d$ ,  $\Delta H(T_d)$ , i de la variació en la capacitat calorífica específica que acompanya el procés de desnaturalització,  $\Delta_d C_p$ , de la RNasa A i les seves variants es pot estimar la variació de l'energia lliure del desplegament de cada proteïna a qualsevol temperatura,  $\Delta G_d(T)$ , mitjançant l'equació de Gibbs-Helmholtz:

$$\Delta G_d(T) = \Delta H(T_d) \cdot [1 - (T/T_d)] - \Delta_d C_p \cdot [(T_d - T) + T \cdot \ln (T/T_d)]$$

La precisió dels valors de  $\Delta G_d$  a temperatures llunyanes de la  $T_d$  no és massa bona a causa de la incertesa dels valors de  $\Delta_d C_p$  obtinguts a partir de les corbes de desnaturalització (FIGURA III.23) tal com s'ha indicat en l'apartat II.7.8. A partir de les corbes de desnaturalització obtingudes per a les diferents RNases A, s'ha calculat la variació en la capacitat calorífica específica que acompanya el procés de desnaturalització,  $\Delta_d C_p$ , per a cadascuna d'elles tal com s'ha indicat en l'apartat II.7.8. Per a la RNasa A s'ha determinat un valor de  $(0,080 \pm 0,020)$  cal K<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>. Com és usual per a la determinació d'aquest paràmetre a partir de les corbes de valoració, la precisió no és massa bona a causa que sovint és difícil obtenir una diferència clara i precisa de l'alçada entre la línia pre i post-transició. Tanmateix, el valor trobat està en concordança

amb el descrit per Privalov (1979) i Pace i col. (1999) per a aquesta proteïna. Pel que fa a les variants analitzades, s'han trobat uns valors similars al de la RNasa A en algunes variants mentre que en altres variants els valors han estat significativament diferents. Aquestes diferències es podrien deure a errors en la determinació d'aquest paràmetre com s'ha comentat anteriorment. Una manera d'avaluar si existeixen diferències significatives en  $\Delta_d C_p$  entre les diferents RNases A és comprovant si s'estableix una relació lineal entre  $\Delta H(T_d)$  i  $T_d$ , atès que està descrit en la bibliografia que el valor de  $\Delta_d C_p$  està en funció de les condicions sota les quals es mesura la variació de  $\Delta H(T_d)$  amb la  $T_d$ . A causa que per a algunes variants la relació entre  $\Delta H_{cal}(T_d)/\Delta H_{vH}(T_d)$  s'ha vist que és inferior a 1 (TAULA III.4), s'ha representat  $\Delta H_{vH}(T_d)$  versus  $T_d$  per a la RNasa A i les seves 13 variants (FIGURA III.24).

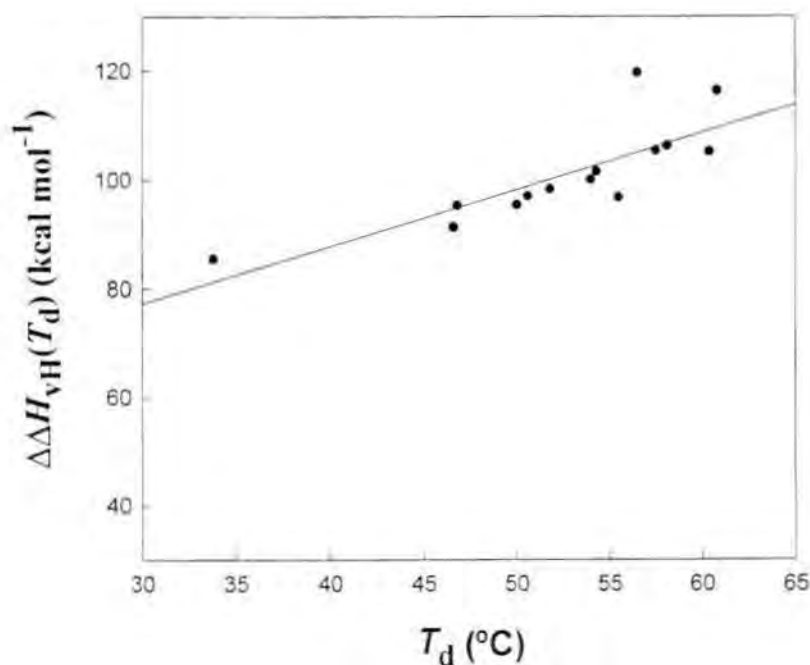


FIGURA III.24

Entalpia de van't Hoff de la rRNasa A i les seves 13 variants versus la temperatura de desnaturalització d'aquestes.

Els 14 punts del gràfic representat en la FIGURA III.24 mostren certa dispersió. Tot i així, es poden relacionar linealment amb un valor del coeficient de correlació de 0,81. La regressió lineal d'aquesta representació dona la següent equació:

$$\Delta H_{\text{vH}}(T_d) = 45,98 (\pm 11,72) + [1,04 (\pm 0,22) \cdot T_d]$$

Per tant, tenint en compte l'error que es pot haver comès en la determinació dels valors de  $\Delta H_{\text{vH}}(T_d)$ , semblaria que no existeixen diferències significatives entre les diferents RNases A pel que fa al paràmetre  $\Delta_d C_p$ . Es pot estimar el valor de  $\Delta_d C_p$  per a la RNasa A a partir del valor del pendent de la recta de regressió anterior, que és  $(1,04 \pm 0,22) \text{ kcal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ . Fent el canvi d'unitats oportú, el valor de  $\Delta_d C_p$  estimat és  $(0,076 \pm 0,016) \text{ cal K}^{-1} \text{ g}^{-1}$ , el qual és molt similar al valor de  $(0,080 \pm 0,020) \text{ cal K}^{-1} \text{ g}^{-1}$  determinat directament a partir de la corba de DSC per a la proteïna salvatge.

Tot i que no sembla que existeixin diferències massa significatives pel que fa als valors de  $\Delta_d C_p$  entre la RNasa A i les seves variants analitzades, no hi ha una seguretat absoluta que es pugui utilitzar el valor obtingut per a la proteïna salvatge en la determinació de  $\Delta G_d$  de totes les variants.

A més, donat que  $\Delta H_{\text{cal}}(T_d)$  no és tan sensible als canvis en la línia base com ho és  $\Delta H_{\text{vH}}(T_d)$ , és més precís utilitzar  $\Delta H_{\text{cal}}(T_d)$  per calcular  $\Delta G_d$ . Ara bé, atès que algunes variants de la RNasa A mostren un valor de la relació ( $R$ ) entre l'entalpia calorimètrica i la de van't Hoff (TAULA III.4 i apartat III.6.2) significativament inferior a 1 cal utilitzar  $\Delta H_{\text{vH}}(T_d)$ .

Error en els valors de  $\Delta H_{\text{vH}}(T_d)$  i  $\Delta_d C_p$  podrien portar a errors importants en la determinació de  $\Delta G_d$ . Tanmateix, si els càlculs de  $\Delta G_d$  es fan a una temperatura propera a la  $T_d$  de la proteïna salvatge, llavors són més precisos. Segons Becktel i Shellman (1987), sota aquestes condicions, es pot fer la següent aproximació per estimar la variació de l'energia lliure del desplegament entre la proteïna salvatge i una seva variant,  $\Delta \Delta G_d(T_d)$ :

$$\Delta \Delta G_d(T_d) \approx \Delta T_d \cdot \Delta S_d(T_d)$$

on  $\Delta T_d$  correspon a la diferència entre la temperatura de desnaturalització de la proteïna salvatge (WT) i la variant d'aquesta (V):  $T_d(\text{WT}) - T_d(\text{V})$ ,

i  $\Delta S_d(T_d)$  correspon a l'entropia molar del desplegament de la proteïna salvatge a la seva



temperatura de desnaturalització:  $\Delta H_{cal}(T_d) / T_d$ .

La utilització de l'equació anterior és l'aproximació més senzilla per a la determinació de  $\Delta\Delta G_d$ , i, a més, sembla fidedigne segons estudis de comparacions dels valors de  $\Delta\Delta G_d$  obtinguts mitjançant diferents procediments per a variants de proteïnes, com ara la barnasa (Matouschek i col., 1994). D'aquí que sovint sigui una aproximació utilitzada per molts investigadors per determinar la variació de l'energia lliure del desplegament entre una proteïna salvatge i una seva variant.

En la TAULA III.4 s'indiquen els valors de  $\Delta\Delta G_d(T_d)$  per a les diferents variants de la RNasa A calculats a partir de l'aproximació de Becketl i Shellman (1987).

Per a aquestes mateixes variants de la RNasa A han estat calculats en el nostre grup els valors de la variació de l'energia lliure del desplegament ( $\Delta G_d$ ) induïda per pressió i seguida per espectroscòpia d'absorció de 4a derivada calculats a 40°C i pH 5,0 (Torrent i col., 1999). Per tal de comprovar la validesa de l'aproximació utilitzada per estimar els valors de  $\Delta\Delta G_d(T_d)$  obtinguts a partir de les dades de calorimetria, s'han comparat aquests valors amb els de  $\Delta\Delta G_d$  del desplegament induït per pressió de Torrent i col., tal com es mostra en la FIGURA III.25. Atès que a 40°C no ha estat possible determinar el valor de  $\Delta G_d$  del desplegament induït per pressió per a la variant V108G de la RNasa A, no s'ha inclòs aquesta variant en la comparació.

La regressió lineal d'aquesta representació dona la següent equació amb un coeficient de correlació de 0,98:

$$\Delta\Delta G_d(\text{cal}) = 0,25 (\pm 0,17) + [0,90 (\pm 0,06) \cdot \Delta\Delta G_d(\text{press})]$$

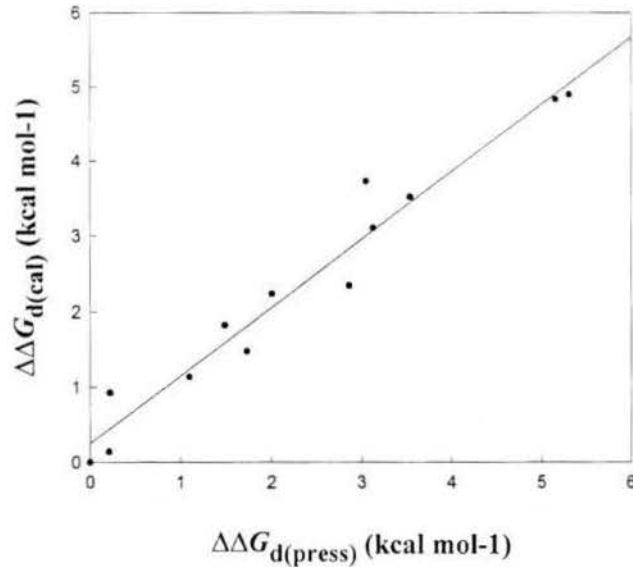


FIGURA III.25

Comparació entre la variació de l'energia lliure del desplegament en mutar determinada per calorimetria, calculats a partir de l'equació  $\Delta\Delta G_D(T_D) \approx \Delta T_D \cdot \Delta S_D(T_D)$ , i els valors determinats per desnaturalització per pressió (Torrent i col., 1999) de les variants senzilles de la RNasa A excepte la V108G. La línia sòlida correspon a la regressió lineal.

Segons els resultats d'aquesta regressió lineal, els dos mètodes emprats per a la determinació de la variació de l'energia lliure del desplegament entre la RNasa A i les variants d'aquesta estan en bona concordança, per bé que el valor del pendent de la regressió lineal és lleugerament diferent a 1 i aquesta no passa exactament per l'origen. Ara bé, s'han calculat els intervals de confiança al 95 % pel valor del pendent i s'ha trobat un límit inferior de 0,77 i un límit superior de 1,03, cosa que indica que el valor del pendent (0,90) no és significativament diferent a 1. D'igual manera s'ha vist que el valor de l'ordenada a l'origen (0,25) tampoc és significativament diferent a 0, ja que els límits superior i inferior calculats són -0,11 i 0,62, respectivament.

Aquestes petites diferències observades en la comparació dels dos mètodes no resulten gens estranyes si es té en compte que el procés de desnaturalització de les proteïnes estudiades ha estat induït de manera diferent en els dos mètodes, per calor en

un cas i per pressió en l'altre cas, la qual cosa pot donar lloc a diferències en el mecanisme de desplegament. Segons Zhang i col. (1995) a partir de la comparació entre el desplegament de la RNasa A induït per pressió i l'induït per calor seguits per RMN, s'observa que els desplegaments segueixen camins diferents i donen lloc a un estat desplegat de la proteïna també diferent depenent de com han estat induïts els desplegaments. A més, els valors de  $\Delta\Delta G_d$  han estat estimats a diferents temperatures, a 60,8°C els obtinguts per calorimetria i a 40°C els obtinguts per pressió.

Una vegada comprovada la validesa de l'aproximació de Becketl i Schellman (1987) per a l'estimació de  $\Delta\Delta G_d$  de les variants de la RNasa A estudiades, es pot veure l'efecte de cada substitució en l'estabilitat relativa de la proteïna. S'observa una desestabilització en totes les variants de la RNasa A respecte a la proteïna salvatge que oscil·la entre una desestabilització mínima de només 0,14 kcal mol<sup>-1</sup> per a la variant I107V fins a una desestabilització màxima de 9,32 kcal mol<sup>-1</sup> per a la variant V108G. La desestabilització varia en funció del tipus de substitució realitzada, augmenta sempre en disminuir la hidrofobicitat del residu reemplaçat, i en funció de la posició del residu hidrofòbic substituït, essent la posició Val108 la que resulta més desestabilitzada, tal com ja s'ha comentat anteriorment a partir dels valors de la  $T_d$ .

Per tant, malgrat que les propietats cinètiques de les diferents variants de la RNasa A siguin similars a les de la proteïna salvatge, llevat d'alguns casos, i els espectres de DC i el valors de la capacitat calorífica molar parcial a 20°C i en l'estat desnaturalitzat indiquin que no existeixen diferències estructurals, ni en l'estat natiu ni en el desnaturalitzat, entre la RNasa A i les seves variants, observem que les diferències d'estabilitat són clarament significatives. Això permet poder comparar les diferents variants de manera directa i interpretar els canvis d'estabilitat observats en termes d'hidrofobicitat i petites pertorbacions estructurals respecte a l'estructura de la proteïna salvatge. És de destacar l'espectacular efecte que la substitució d'un únic residu, V108G, té sobre l'estabilitat de la RNasa A.

### III.6.2. Estimació del nombre d'unitats cooperatives per a cada una de les RNases A estudiades

A partir dels valors de l'entalpia calorimètrica de la desnaturalització,  $\Delta H_{\text{cal}}(T_d)$ , determinada directament a partir de l'àrea sota la corba del pic del termograma, i els valors de l'entalpia efectiva o dita també de van't Hoff,  $\Delta H_{\text{vH}}(T_d)$ , la qual correspon a l'entalpia teòrica de la desnaturalització suposant que el procés es comporta com un equilibri entre dos estats, es pot calcular la relació ( $R$ ) entre l'entalpia calorimètrica i la de van't Hoff.

Segons Privalov i Potekhin (1986), aquesta relació  $\Delta H_{\text{cal}}(T_d)/\Delta H_{\text{vH}}(T_d)$  pot ser considerada com una mesura de la validesa de l'assumpció que el procés de desnaturalització estudiat es comporta com una transició entre dos estats, és a dir, com un equilibri entre la forma nativa i la forma desnaturalitzada de la proteïna. A la vegada, aquest paràmetre permet estimar el nombre d'unitats cooperatives que hi ha en la molècula, això és, del nombre de regions de la molècula que es "fonen" de manera més o menys independent. Per a la desnaturalització de proteïnes globulars petites i compactes, com ara la RNasa A, aquest valor és proper a 1, la qual cosa vol dir que les poblacions de tots els estats intermedis entre l'estat natiu i el desnaturalitzat són bastant baixes i la desnaturalització pot ser considerada, en una primera aproximació, com una transició entre dos estats.

Tanmateix, per a la desnaturalització de proteïnes grosses, i en alguns casos, fins i tot de no tan grosses,  $R$  excedeix de manera significativa el valor d'1. En aquests casos es pot considerar que el procés de disrupció de la seva estructura nativa no correspon a una transició entre dos estats, sinó que es formen varis estats intermedis en el procés i el valor d' $R$  permet obtenir informació sobre el nombre d'unitats cooperatives de la proteïna analitzada, que poden correspondre al número de dominis definits per a la proteïna.

Aquesta relació ( $R$ ) pot ser també inferior a 1, però això pot tenir lloc només en dos casos:

1. Quan el procés estudiat és irreversible.
2. Quan el tamany de la unitat cooperativa, és a dir, el nombre de molècules que s'associen per formar la unitat cooperativa, està determinat incorrectament. Aquest segon cas ocorre sovint en molècules que existeixen en solució com a dímers i no com a monòmers i que es desnaturalitzen en la forma dimèrica. En aquests casos, si es considera com a tamany de la unitat cooperativa el del dímer, és a dir, la massa

molecular del dímer, pel càlcul del valor de  $\Delta H_{\text{cal}}(T_d)$ , la relació  $R$  passa a ser 1.

En la TAULA III.4 es poden veure els valors de  $\Delta H_{\text{cal}}(T_d)$ ,  $\Delta H_{\text{vH}}(T_d)$  i  $R$  per a la RNasa A i les seves variants. Encara que la precisió dels valors de  $\Delta H_{\text{cal}}(T_d)$  i  $\Delta H_{\text{vH}}(T_d)$  és de  $\pm 6\%$ , cal dir que en la determinació d' $R$  s'han pogut cometre errors relativament més grans arran que les línies base en la regió de la transició són fortament dependents de la temperatura, i això fa difícil definir-les correctament en aquesta regió. Les línies base no donen generalment ni una línia recta ni horitzontal en instruments de DSC, tot i que aquests siguin supersensitius com ho és el que s'ha utilitzat en aquest treball (DASM-4, NPO Biopor), a causa de la impossibilitat de construir dues cel·les idèntiques. Possibles errors en la línia base poden conduir a errors significatius en la determinació de  $\Delta H_{\text{vH}}(T_d)$ , de manera que  $\Delta H_{\text{vH}}(T_d)$  seria sobreestimada i donaria lloc a un valor de la relació  $\Delta H_{\text{cal}}(T_d)/\Delta H_{\text{vH}}(T_d)$  inferior al real. Tot i tenir en compte aquest fet, podem considerar que la RNasa A i la majoria de les seves variants tenen un valor d' $R$  proper a 1 (TAULA III.4). Per tant, aquestes proteïnes representen un sistema cooperatiu únic que segueix un mecanisme de desnaturalització tèrmica entre dos estats. Ara bé, hi ha varies variants que mostren un valor d' $R$  significativament inferior a 1. Arran que el procés de desnaturalització per a totes aquestes variants amb valors d' $R$  inferiors a 1 és gairebé completament reversible, essent fins i tot totalment reversible per a les variants V108A i V108G, segons Privalov i Potekhin (1986) es pot considerar com un argument indiscutible a favor de l'existència d'un complex específic de varies molècules en solució. En el cas de la variant V108G amb el valor d' $R$  de 0,5, el qual és el més baix, correspondria a una autoassociació de molècules per formar dímers, ja que si es considera com a tamany de la unitat cooperativa la d'un dímer de la proteïna, amb una massa molecular de 27400 Da, llavors el valor de  $\Delta H_{\text{cal}}(T_d)$  seria de 84,8 kcal mol<sup>-1</sup> i la relació entre  $\Delta H_{\text{cal}}(T_d)$  i  $\Delta H_{\text{vH}}(T_d)$  seria de 0,99. En el cas de les variants I106V, I107V, I107A, V108A i V118G amb valors d' $R$  intermitjos, entre 1 i 0,5, podria correspondre a la presència d'una barreja de dímers i monòmers de proteïna en la solució. Per tant, malgrat la possible presència d'aquestes associacions moleculars, es pot considerar que totes les RNases A estudiades, fins i tot les que presenten valors de  $R$  significativament inferiors a 1, es comporten com un sistema cooperatiu únic que segueix un mecanisme de desnaturalització tèrmica entre dos estats.

### III.6.3. Correlació entre els canvis d'estabilitat de les variants de la RNasa A i la hidrofobicitat de les posicions alterades

La contribució de les interaccions hidrofòbiques sobre l'estabilitat d'una proteïna es pot estimar de diferents maneres. Una d'elles és correlacionar els valors de l'energia lliure de la desestabilització per a les diferents variants de la RNasa A, descrits en l'apartat III.6.1 i resumits en la TAULA III.4, amb els valors de les diferències en l'àrea accessible al solvent enterrada entre la proteïna salvatge i cada variant de la RNasa A ( $\Delta A$ ).

En la FIGURA III.26 es representa  $\Delta\Delta G_d(T_d)$  enfront de  $\Delta A$ . Els valors de  $\Delta A$  per a les variants de la RNasa A es calculen de manera similar a la descrita per Serrano i col. (1992) per a variants de la barnasa tal com s'indica a continuació:

A. Per a la posició X de la proteïna salvatge es calcula mitjançant el programa XAM (Xia, 1992):

- l'àrea accessible al solvent del residu X en la proteïna plegada (estat natiu) (valor 1)
- l'àrea accessible al solvent del residu X com si aquest residu estigués totalment exposat (valor 2)
- l'àrea accessible al solvent de la cadena lateral de la posició X enterrada en la proteïna salvatge s'estima a partir de la diferència entre aquests dos valors:

$$(\text{valor 2}) - (\text{valor 1}) = A$$

B. A partir de la creació d'una hipotètica mutació a la posició X de la proteïna salvatge es calcula mitjançant el programa XAM:

- l'àrea accessible al solvent del residu X en la variant (valor 1')
- l'àrea accessible al solvent del residu X com si aquest residu estigués totalment exposat (valor 2')
- l'àrea accessible al solvent de la cadena lateral de la posició X enterrada en la variant s'estima a partir de la diferència entre aquests dos valors:

$$(\text{valor 2}') - (\text{valor 1}') = B$$

C. Finalment, la diferència entre els valors A i B dóna lloc a la pèrdua d'àrea accessible al solvent enterrada en la proteïna plegada per la mutació estudiada:

$$\Delta A = A - B$$



En la TAULA III.5 es presenten aquests valors per a les variants de la RNasa A.

**TAULA III.5** - Valors de l'àrea accessible al solvent de diferents residus de la RNasa A i de variants d'aquesta en la proteïna plegada (valors 1 i 1') i valors de l'àrea accessible al solvent dels mateixos residus com si estiguessin totalment exposats (valors 2 i 2') i valors de  $\Delta A$ .

RNasa A			VARIANT			$\Delta A$ (Å <sup>2</sup> )
Posició	Àrea access. al solvent (valors 1) (Å <sup>2</sup> )	Àrea access. al solvent totalm. exposat (valors 2) (Å <sup>2</sup> )	Àrea access. al solvent (valors 1') (Å <sup>2</sup> )	Àrea access. al solvent totalm. exposat (valors 2') (Å <sup>2</sup> )	Posició	
Ile106	2,1	244,3	7,5	235,6	I106L	22,7
			4,6	224,1	I106V	14,1
			3,3	184,2	I106A	61,3
Ile107	19,7	246,1	21,7	244,1	I107L	12,3
			9,5	223,6	I107V	4,0
			8,6	184,4	I107A	50,6
Val108	2,4	224,1	5,5	184,0	V108A	43,2
			9,1	163,1	V108G	67,7
Ala109	2,6	184,4	0,9	164,8	A109G	17,9
Val116	39,7	224,5	27,9	183,7	V116A	29,0
			20,7	163,3	V116G	42,2
Val118	39,2	227,1	22,2	187,2	V118A	22,9
			27,0	166,4	V118G	48,5

En la FIGURA III.26 s'observa una bona correlació entre els valors de  $\Delta\Delta G_d(T_d)$  i de  $\Delta A$  per a cada una de les 5 posicions de la RNasa A alterades, excloent les mutacions Ile per Leu. A partir de la regressió lineal dels valors de cada posició s'ha determinat el valor del pendent. Aquest pendent ( $\text{pendent} = \Delta\Delta G_d(T_d) / \Delta A$ ) relaciona el canvi d'estabilitat de la proteïna en efectuar la mutació amb la variació d'àrea accessible al solvent enterrada en la proteïna plegada per la mutació estudiada. El valor del pendent s'interpreta com una mesura de la força de les interaccions hidrofòbiques a cada posició alterada.

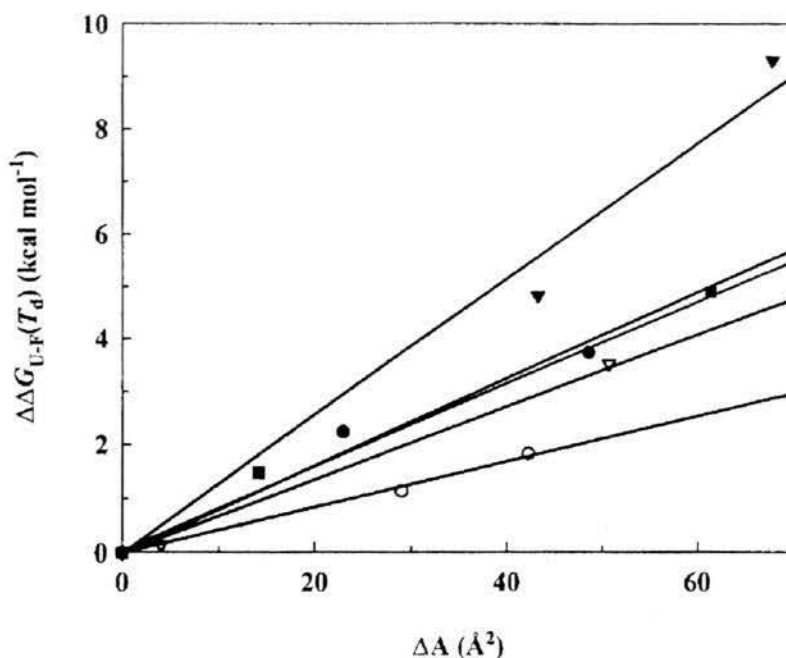


FIGURA III.26

Correlació entre els canvis d'estabilitat creats en mutar ( $\Delta\Delta G_d(T_d)$ ) i les diferències en l'àrea accessible al solvent de la cadena lateral enterrada entre la proteïna salvatge i cada variant de la RNasa A ( $\Delta A$ ). Les línies sòlides corresponen als millors ajustament de les dades per a cada posició alterada (coeficients de correlació  $\geq 0,98$  per a cada un dels 5 ajustaments). Les variants de la RNasa A estan designades de la següent manera: Ile106 (■), Ile107 (▽), Val108 (▼), Val116 (○) i Val118 (●). S'han exclòs les variants I106L i I107L.

Per al residu Val116 aquest valor és  $(43 \pm 3)$  cal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup>, per als residus Ile106, Ile107 i Val118 és de  $(75 \pm 7)$  cal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup> (sense considerar les mutacions Ile per Leu i prenent la mitjana dels pendents per aquests tres residus ja que tenen valors molt similars) i per al residu Val108 és de  $(135 \pm 18)$  cal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup>. Aquests valors són entre 2 i 5 vegades superiors als obtinguts a partir d'experiments de transferència amb compostos model des de solvents orgànics cap a l'aigua ( $20\text{-}30$  cal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup>) (Chothia, 1975; Ooi i col., 1987). Això es deu al fet que hi ha una diferència fonamental entre l'efecte hidrofòbic mesurat en un model de partició senzill i el que es troba en sistemes proteics (Harpaz i col., 1994). Els valors dels pendents per a les posicions Val116, Ile106, Ile107 i Val118 són similars als trobats per a mutacions hidrofòbiques creades en la barnasa i descrits per Serrano i col. (1992), mentre que el valor per al residu

Val108 és aproximadament el doble dels trobats per aquests autors. Aquesta diferència en el residu Val108 podria explicar-se pel fet que en la mesura de la força hidrofòbica hi participen altres factors a més de l'accessibilitat al solvent de cada posició estudiada i pel fet que les conseqüències d'un mateix tipus de mutació realitzada en el cor hidrofòbic d'una proteïna depenen molt de la posició d'aquesta mutació dins del cor.

Les substitucions en els residus hidrofòbics del cor de la RNasa A que s'han dut a terme per obtenir les 13 variants senzilles de la RNasa A són del tipus: Ile per Leu, Ile per Val, Ile per Ala, Val per Ala, Val per Gly i Ala per Gly. D'aquesta manera, excepte per a les substitucions d'Ile per Leu, les cadenes laterals alifàtiques dels residus esdevenen escurçades i de manera no disruptiva, és a dir, que la possibilitat d'introduir interaccions addicionals és mínima (Fersht, 1987). L'escurçament és d'un grup metil en les substitucions d'Ile per Val i d'Ala per Gly, de dos grups metil en la substitució de Val per Ala i de tres grups metil/metilè en els casos d'Ile per Ala i Val per Gly.

Es pot determinar la contribució que fa l'enterrament d'un grup metil/metilè a l'estabilitat conformacional d'una proteïna, dividint els valors de  $\Delta\Delta G_d(T_d)$  obtinguts per a les diferents variants de la proteïna pel corresponent nombre de grups metil/metilè eliminats en cada cas, en introduir la mutació.

Arran que les cadenes laterals dels residus substituïts en la RNasa A presenten diferents valors d'àrea accessible al solvent, tal com s'ha indicat en la TAULA III.5 (valors 1), cal fer una correcció dels valors de  $\Delta\Delta G_d(T_d)$  per tal de poder ser comparables a una mateixa accessibilitat del residu al solvent, la qual es considera del 100% d'enterrament.

La determinació dels valors de  $\Delta\Delta G_d(T_d)$  de les diferents substitucions corregits a un 100% d'enterrament es fa a partir de la següent expressió:

$$\Delta\Delta G_d(T_d)_{\text{corr.}} = (\Delta\Delta G_d(T_d) / \% \text{ d'enterrament}) \cdot 100$$

on el % d'enterrament en la RNasa A del residu substituït es determina de la següent manera:

1. A partir dels valors de l'àrea accessible al solvent del residu X en la proteïna salvatge (valors 1) i els de l'àrea accessible al solvent com si aquest residu estigués totalment exposat en la proteïna salvatge (valors 2), indicats en la

TAULA III.5, es calcula el percentatge d'àrea accessible al solvent que presenta cada residu en la proteïna respecte a la seva hipotètica posició d'exposició total al solvent (ex., per a Ile106  $2,1 \text{ \AA}^2$  equival a  $0,86 \%$  de  $244,3 \text{ \AA}^2$ ).

2. A partir del valor anterior es calcula el percentatge d'enterrament del residu en la proteïna de la següent manera:

$$\% \text{ d'enterrament} = 100 - \% \text{ d'àrea accessible al solvent del residu en la proteïna}$$

En la TAULA III.6 es presenten els valors de  $\Delta\Delta G_d(T_d)_{\text{corr.}}$  de les diferents substitucions realitzades en la RNasa A i els valors de la contribució de cada grup metil/metilè eliminat a l'estabilitat de l'enzim ( $\Delta\Delta G_d(T_d)_{\text{corr.}}/-\text{CH}_2-$ ), els quals s'han obtingut dividint els valors de  $\Delta\Delta G_d(T_d)_{\text{corr.}}$  pel corresponent nombre de grups metil/metilè eliminats en fer la substitució. No s'han considerat els valors per a les substitucions Ile per Leu, atès que no comporten l'eliminació de cap grup.

**TAULA III.6** - Valors de  $\Delta\Delta G_d(T_d)_{\text{corr.}}$ ,  $\Delta\Delta G_d(T_d)_{\text{corr.}}/-\text{CH}_2-$  de les substitucions realitzades en la RNasa A i el nombre de grups  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  o  $\text{CH}$  eliminats en mutar.

Substitució	$\Delta\Delta G_d(T_d)_{\text{corr.}}$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	No. metil/metilè eliminats	$\Delta\Delta G_d(T_d)_{\text{corr.}}/-\text{CH}_2-$ (kcal mol <sup>-1</sup> )
I106V	1,49	1	1,49
I106A	4,95	3	1,65
I107V	0,15	1	0,15
I107A	3,83	3	1,28
V108A	4,88	2	2,44
V108G	9,41	3	3,14
A109G	0,94	1	0,94
V116A	1,39	2	0,70
V116G	2,23	3	0,74
V118A	2,70	2	1,35
V118G	4,49	3	1,50

A partir de la TAULA III.6 es pot veure que per a un mateix tipus de substitució els valors de  $\Delta\Delta G_d(T_d)_{\text{corr.}}$  per grup metil/metilè eliminat varien segons la posició alterada en la proteïna. Per a les substitucions Ile per Val, els valors oscil·len entre  $0,15 \text{ kcal}$

mol<sup>-1</sup> per a la substitució H07V i 1,49 kcal mol<sup>-1</sup> per a la substitució H06V mentre que per a les substitucions lle per Ala l'oscil·lació és menor, de 1,28 kcal mol<sup>-1</sup> per a H07A i de 1,65 kcal mol<sup>-1</sup> per a H06A. Pel que fa a les substitucions de Val per Ala varien entre 0,70 kcal mol<sup>-1</sup> per a V116A i 2,44 kcal mol<sup>-1</sup> per a V108A i per a les substitucions de Val per Gly entre 0,74 kcal mol<sup>-1</sup> per a V116G i 3,14 kcal mol<sup>-1</sup> per a V108G.

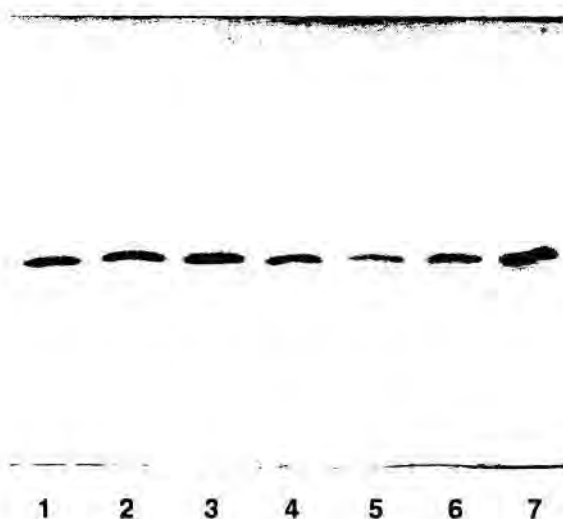
La contribució que fa l'enterrament d'un grup metil/metilè d'una proteïna a la seva estabilitat conformacional es pot estimar fent la mitjana dels valors de  $\Delta\Delta G_d(T_d)_{\text{corr.}}/-\text{CH}_2-$  de les substitucions realitzades en la RNasa A (TAULA III.6). D'aquesta manera s'obté un valor de 1,40 ( $\pm 0,83$ ) kcal mol<sup>-1</sup>, el qual és proper al valor 1,27 ( $\pm 0,51$ ) kcal mol<sup>-1</sup> calculat per Pace (1992) a partir de 72 substitucions de cadenes laterals alifàtiques del cor hidrofòbic de 4 proteïnes (barnase, T4 lisozim, nucleasa d'*Staphylococcus* i la proteïna del gen V del bacteriòfag f1).

En les variants substituïdes per Gly hi haurà una flexibilitat més gran al voltant dels enllaços  $\phi$  i  $\psi$  veïns del residu de Gly que en la proteïna salvatge (Nemethy i col., 1966). Per tant, l'entropia conformacional tindrà una contribució major en les valors de  $\Delta\Delta G_d$  mesurats. A partir de la TAULA III.6 es pot veure com aquest efecte és considerable per a la substitució V108G. És millor no considerar les substitucions per Gly per al càlcul de la contribució de l'enterrament d'un grup metil/metilè a l'estabilitat conformacional d'una proteïna. Repetint la mitjana dels valors de  $\Delta\Delta G_d(T_d)_{\text{corr.}}/-\text{CH}_2-$  de les diferents substitucions sense considerar els valors de V108G, A109G, V116G i V118G, s'obté un valor de 1,29 ( $\pm 0,72$ ) kcal mol<sup>-1</sup>, el qual és també proper al descrit per Pace (1992) 1,23 ( $\pm 0,47$ ) kcal mol<sup>-1</sup> quan no es consideren les substitucions per Gly.

L'enterrament dels residus hidrofòbics per tal de protegir els àtoms no polars del contacte amb l'aigua, fenomen conegut com a efecte hidrofòbic, és la força principal que dirigeix el plegament de les proteïnes globulars (Kauzmann, 1958; Dill, 1990). A partir dels resultats obtinguts amb les variants de la RNasa A estudiades, es recollça la proposta de Pace en la qual les proteïnes globulars guanyen 1,2-1,3 kcal mol<sup>-1</sup> per cada grup metil/metilè enterrat en plegar-se la proteïna. Ara bé, per a les substitucions V108A i V108G es troben valors més grans de desestabilització de la proteïna variant respecte a la RNasa A que els esperats segons la predicció de Pace mentre que per a la substitució H07V es troba una menor desestabilització.

### III.7. Comprovació de la presència de dímers en variants de la RNasa A

Per tal de comprovar la presència de dímers en solució a l'estat natiu de les variants amb valors d' $R$  significativament inferiors a 1 descrites en l'apartat III.6.2, es va realitzar en primer lloc una electroforesi catòdica en gels de poliacrilamida en condicions no desnaturalitzants adaptada del mètode de Reisfeld i col. (1963) seguint el protocol indicat en l'apartat II.7.4.2. En la FIGURA III.27 es mostren els resultats corresponents a aquestes anàlisis electroforètiques.



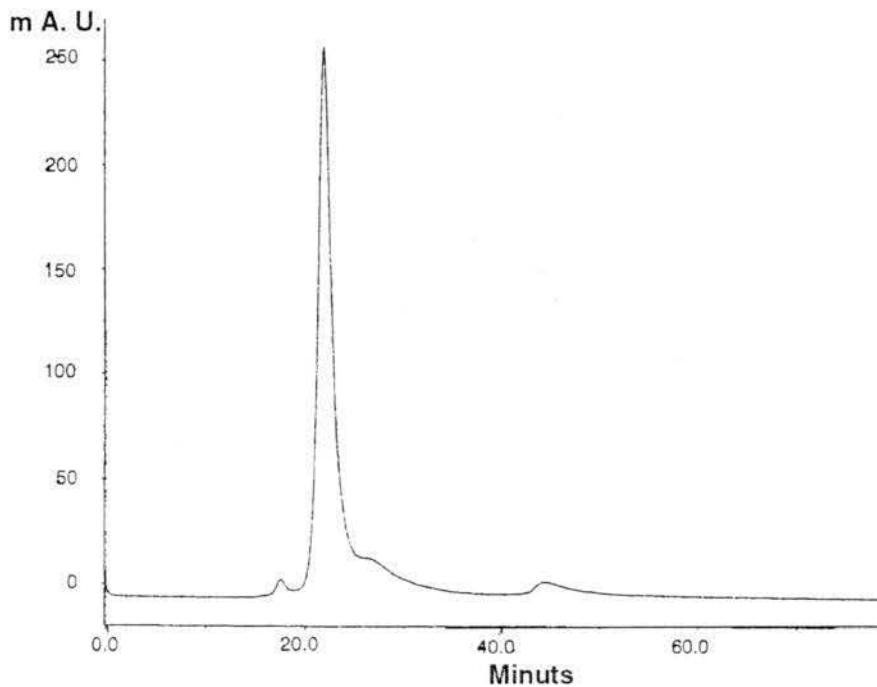
**FIGURA III.27**

Anàlisis electroforètiques en gels de poliacrilamida en condicions no desnaturalitzants a pH 4,0 i a 4°C, tenyits amb blau de Coomassie, de les variants de la rRNasa A amb valors de la relació ( $R$ ) entre l'entalpia calorimètrica i l'entalpia de van't Hoff significativament diferents a 1: 1) I106V; 2) I107V; 3) I107A; 4) V108A; 5) V108G i 6) V118G. El carrer 7 correspon a la rRNasa A.

En la FIGURA III.27 es pot veure la presència d'una sola banda en totes les variants de la RNasa A analitzades, la mobilitat de la qual és idèntica a la de la proteïna salvatge (carrer 7), la qual té un valor d' $R$  igual a 1. Per tant, no s'aprecia la presència de dímers en cap de les variants de la RNasa A analitzades en les condicions dutes a terme en aquesta l'electroforesi, a pH 4,0 i 4 °C.



Posteriorment, per tal de corroborar la no-presència de dímers en l'estat natiu de les variants esmentades anteriorment, i a la vegada poder utilitzar condicions més similars a les dutes a terme en els experiments de DSC, quan al pH i tipus d'amortidor i a la concentració de proteïna, es van analitzar les variants en una cromatografia de gel filtració pel sistema d'HPLC equilibrada amb acetat sòdic 50 mM, pH 5,0, tal com s'ha descrit en l'apartat II.7.9. En la FIGURA III.28 es presenta el perfil cromatogràfic corresponent a la RNasa A.



**FIGURA III.28**

Perfil d'elució de proteïna enregistrat a 280 nm de la cromatografia de gel filtració per HPLC en columna Protein-Pack 125 de la rRNasa A. L'elució és isocràtica en acetat sòdic 50 mM, pH 5,0.

En cromatografiar cada una de les 6 variants de la RNasa A, I106V, I107V, I107A, V108A, V108G i V118G, es va observar un perfil cromatogràfic idèntic a l'obtingut per a la RNasa A (FIGURA III.28), amb un temps de retenció de la fracció al voltant de 21-23 min. Per tal de descartar el possible efecte de la concentració de proteïna en la formació de dímers, es van repetir les cromatografies injectant les mostres a diferents

concentracions, des d'1 a 6 mg/mL atès que la concentració de proteïna d'aquestes mateixes variants analitzades per DSC va ser entre 0,8 i 1,6 mg/mL. En cap cas es va observar un perfil cromatogràfic diferent al de la FIGURA III.28. Per tant, es corrobora que, a temperatures no superiors als 20°C, les variants I106V, I107V, I107A, V108A, V108G i V118G es troben en solució únicament en forma monomèrica.

Per tant, semblaria que l'autoassociació de molècules per formar dímers en aquestes variants, deduïda a partir dels valors  $R$  (apartat III.6.2), tindria lloc durant el seu procés de desnaturalització tèrmica i, atès que aquest procés es reversible, les molècules associades en dímers es dissociarien en ser refredades.

### III.8. Caracterització de les variants dobles de la RNasa A i comparació amb la variant senzilla Y115W

S'han obtingut els espectres d'absorbància a la regió UV i de diroisme circular de les 3 variants dobles de la RNasa A, que contenen triptòfan (I106V+Y115W, I106A+Y115W i I107L+Y115W), per tal de comprovar l'estructura general de la proteïna i comparar-la amb la de la variant senzilla Y115W. També, s'han determinat els paràmetres cinètics enfront dels dos substrats, cCMP i poli(C), per tal de comparar les propietats catalítiques de les variants dobles respecte a la senzilla Y115W. A més, s'han calculat els seus coeficients d'extinció molar.

#### III.8.1. Determinació del coeficient d'extinció molar

La determinació del coeficient d'extinció molar de les variants dobles es va realitzar de manera igual a la de les variants senzilles (apartat III.3.1).

Les 3 variants dobles van presentar un valor no significativament diferent al determinat per a la variant senzilla Y115W, el qual era de  $14050 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , si es considera que la precisió del mètode és de  $\pm 4\text{-}5\%$ . D'aquesta manera, es confirma que les mutacions I106V, I106A i I107L introduïdes de manera individual en la variant Y115W de la RNasa A no afecten el coeficient d'extinció molar d'aquesta variant. En l'apartat III.3.1 ja s'havia observat que aquestes mateixes modificacions en els residus Ile106 i Ile107 tampoc afecten el coeficient d'extinció molar de la RNasa A.

#### III.8.2. Anàlisi espectrofotomètrica

En els espectres d'absorbància en la regió ultraviolada en el marge corresponent a 240-320 nm de les 3 variants dobles de la RNasa A tampoc s'han observat canvis en relació a l'espectre obtingut per a la variant senzilla Y115W (apartat III.3.2, FIGURA III.18).

#### III.8.3. Estudi de l'espectre de DC

Per comprovar si existeixen diferències estructurals entre les variants I106V+Y115W, I106A+Y115W, I107L+Y115W i la variant senzilla Y115W de la RNasa A en l'estat natiu s'han estudiat els espectres de diroisme circular de totes elles a

10°C i s'han comparat amb els espectres obtinguts per a la variant Y115W.

La visió general dels espectres de DC de les variants dobles enregistrats a 10°C és similar, tant en la regió de l'UV llunyà com en la de l'UV proper, a l'obtingut per a la variant senzilla Y115W (apartat III.3.3, FIGURA III.20). Per tant, no sembla que les modificacions I106V, I106A o I107L introduïdes en la variant Y115W alterin l'estructura secundària i terciària de la proteïna de manera significativa. Això corrobora el resultat que aquestes mateixes modificacions en les posicions Ile106 i Ile107 introduïdes en la RNasa A no alteren tampoc la seva estructura secundària i terciària (apartat III.3.3).

#### **III.8.4. Propietats catalítiques**

Els paràmetres cinètics de les 3 variants dobles de la RNasa A determinats amb els substrats cCMP i poli(C), juntament amb els de la variant senzilla Y115W, s'indiquen en la TAULA III.7.

A partir de la TAULA III.7, es pot observar que les variants dobles de la RNasa A presenten uns valors dels paràmetres cinètics per a la hidròlisi del cCMP i per al trencament del poli(C) similars o amb diferències poc significatives als trobats per a la variant senzilla Y115W, de la mateixa manera que la introducció de les modificacions I106V, I106A o I107L en la RNasa A s'ha vist que no provoquen canvis significatius en els paràmetres de la proteïna salvatge (apartat III.3.4).

**TAULA III.7** - Comparació dels paràmetres cinètics de les variants dobles de la RNasa A respecte a la variant sezilla Y115W per als substrats cCMP i poli(C). Els assaigs s'han realitzat d'una manera igual a la indicada en la TAULA III.2.

<b>cCMP</b>			
Enzim	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) x10 <sup>3</sup>
Y115W	0,54	116	3,58
I106V+Y115W	0,56	103	3,07
I106A+Y115W	0,51	96	3,14
I107L+Y115W	0,50	112	3,73

<b>Poli(C)</b>			
Enzim	$K_m$ (%)	Rel. $V_{m\acute{a}x}/[E_0]^1$ (%)	Rel. $V_{m\acute{a}x}/[E_0]/K_m$
Y115W	0,23	100	435
I106V+Y115W	0,25	90	360
I106A+Y115W	0,22	70	318
I107L+Y115W	0,25	76	304

<sup>1</sup>  $[E_0]$  és la concentració final d'enzim. Els valors de la  $V_{m\acute{a}x}$  per a la variant Y115W es refereixen com a 100 %.

### III.9. Estudi de la fluorescència de l'estat estacionari i fluorescència de fase amb multifreqüència de les variants dobles de la RNasa A. Propietats dinàmiques d'aquestes proteïnes.

Tal com s'ha esmentat en la introducció, en el nostre grup de treball s'havia obtingut la variant Y115W de la RNasa A, introduint d'aquesta manera un residu de triptòfan en la seqüència d'aminoàcids d'aquest enzim (Torrent, 1996). El residu Tyr115 de la RNasa A substituït es troba dins la regió iniciadora del plegament (106-118) de la RNasa A proposada per Matheson i Scheraga (1978) formant part d'un gir d'inversió de tipus VI i no manté cap mena d'interacció per ponts d'hidrogen amb altres aminoàcids de la molècula (Santoro i col., 1993; Wlodawer i col., 1988).

La caracterització d'aquesta variant de la RNasa A (apartat III.3) ha mostrat unes propietats catalítiques per als substrats cCMP i poli(C) no significativament diferents a les de la proteïna salvatge i una estructura secundària idèntica segons els espectres de DC a la regió de l'UV llunyà. En canvi, l'anàlisi espectrofotomètrica i l'estudi de l'espectre de DC a l'UV proper han mostrat diferències respecte a la proteïna salvatge causades per la presència del residu de triptòfan a la molècula en substitució d'un de tirosina. A més, Torrent i col. (1999) han descrit per a aquesta variant una estabilitat, mesurada a partir del seguiment del desplegament induït per calor o altes pressions i seguit per espectroscòpia de 4a derivada o fluorescència, només lleugerament inferior a la RNasa A.

Segons tots aquests resultats, semblava que s'havia de poder utilitzar el triptòfan 115 introduït en la RNasa A com a sonda fluorescent per detectar canvis conformationals en la proteïna causats per l'efecte d'altres substitucions en residus de la regió proposada com a iniciadora del plegament (106-118). Això és possible perquè les propietats fluorescents dels residus de triptòfan d'una proteïna són sensibles al seu ambient circumdant, i, per tant, es poden correlacionar aquestes propietats fluorescents amb l'ambient circumdant del Trp si es coneix l'estructura de la proteïna en estudi (Longworth, 1983).

Amb aquest objectiu s'han estudiat les 3 variants dobles de la RNasa A que contenen un residu de triptòfan a la posició 115 (I106V+Y115W, I106A+Y115W i I107L+Y115W) i la variant senzilla Y115W per espectroscòpia de fluorescència de l'estat estacionari i per una modalitat d'aquesta espectroscòpia, la de fase amb



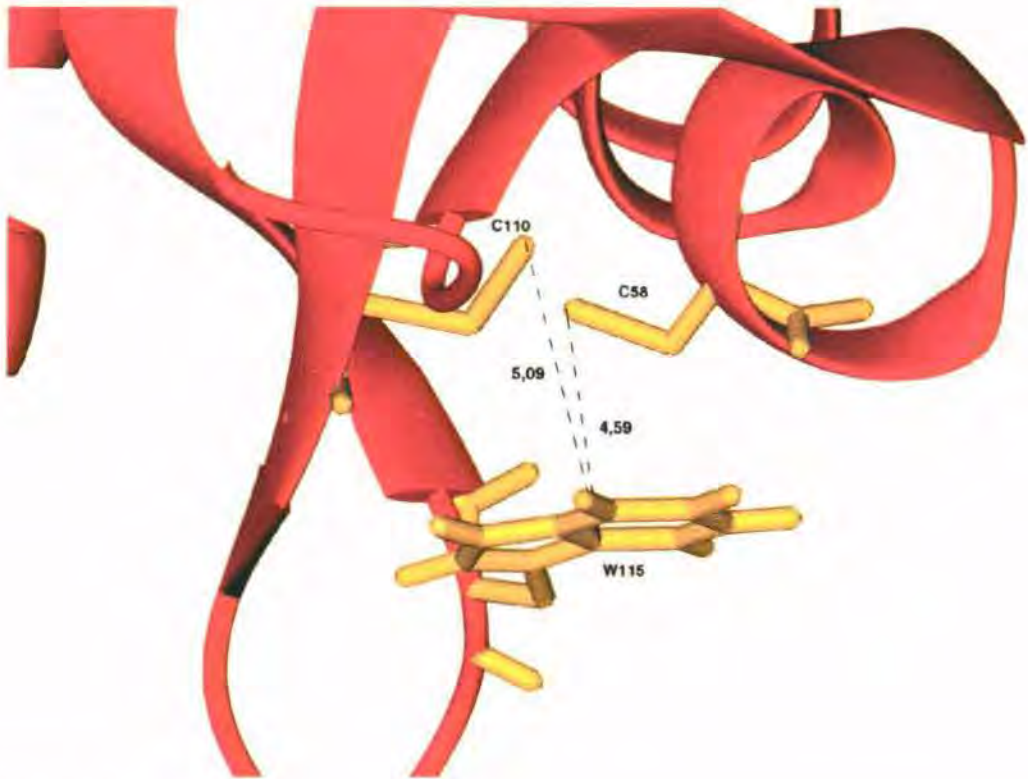
multifreqüència, per tal de resoldre les propietats fluorescents del residu Trp115 de cadascuna de les variants i determinar també les propietats dinàmiques d'aquestes proteïnes.

#### Fluorescència de l'estat estacionari

Els espectres d'absorció de fluorescència de les tres variants dobles van ser similars al de la variant senzilla Y115W, tal com ja s'ha descrit en l'apartat III.8.2.

Els espectres d'emissió de fluorescència van ser també molt similars en les 4 variants, amb una longitud d'ona de màxima emissió de 351-352 nm. Els espectres d'emissió de fluorescència de les proteïnes són generalment indicadors de la polaritat de l'ambient del residu de triptòfan. Per a proteïnes que contenen un sol triptòfan la longitud d'ona de màxima emissió oscil·la entre 320 i 350 nm. Quan la proteïna presenta una emissió fortament desplaçada cap al vermell ( $\lambda_{\text{màx}} \text{ excitació} = 350 \text{ nm}$ ) indica que el residu de triptòfan es troba en un ambient molt polar. El fet que els espectres d'emissió de fluorescència de les 4 variants estudiades presentin una longitud d'ona de màxima emissió de 351-352 nm indica que les substitucions realitzades en els residus Ile106 o Ile107 de la RNasa A no afecten la polaritat del residu Trp115, el qual es trobaria en un ambient polar en les 4 variants (amb un valor de l'àrea accessible al solvent propera al 40 %, la qual correspon a la calculada amb el programa XAM a partir del model molecular de la variant Y115W de la RNasa A).

La determinació del rendiment quàntic ( $Q$ ), que correspon a la relació entre els fotons emesos i els fotons absorbits, de cada variant s'indica en la TAULA III.8. Per a les 4 variants s'ha trobat un valor baix en comparació al valor que se sol obtenir per a proteïnes amb un sol triptòfan. Aquest fet indica que la fluorescència del triptòfan es troba extingida en les variants de la RNasa A estudiades. Els processos d'extinció actuen dissipant l'energia absorbida a través de mecanismes no radiatius i es coneix que els ponts disulfur poden actuar com a agents extintors. A partir de l'estructura del model molecular de la variant Y115W, s'observa que el pont disulfur 58-110 està situat molt proper al residu Trp115, concretament a uns 4-5 Å de l'àtom de sofre del residu Cys58 i a uns 5-6 Å de l'àtom de sofre del residu Cys110 (FIGURA III.29), mentre que els altres 3 ponts disulfur de la proteïna es troben més lluny, essent el pont disulfur 65-72 el segon més proper, a uns 10 Å. Per tant, el pont disulfur 58-110 pot ser el causant d'aquest procés d'extinció. La variant I107L+Y115W és la que presenta un procés d'extinció més accentuat, ja que el seu valor de  $Q$  és el més baix.



**FIGURA III.29**

Representació esquemàtica de l'estructura tridimensional de la regió de la variant Y115W de la RNasa A que mostra els residus de Cys del pont disulfur 58-10 i el residu Trp115. S'assenyalen les distàncies (en Å) més properes entre cada àtom de sofre del pont disulfur i el Trp115, les quals són amb l'àtom C $\delta^2$  de l'anell indol del Trp.

#### Temps de vida de l'estat excitat

Per a cadascuna de les variants de la RNasa A, el millor ajust de la relaxació de la fluorescència en el temps que s'ha obtingut és a partir d'una anàlisi global de les dades d'emissió de fluorescència realitzades a diferents longituds d'ona d'emissió (entre 330 i 380 nm a intervals de 10 nm) i assumint una relaxació exponencial amb 4 temps de vida de l'estat excitat ( $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $\tau_3$  i  $\tau_4$ ). D'aquesta manera, s'obté una millor definició dels següents paràmetres: temps de vida individuals, temps de vida promig i constants de velocitat dels processos radiatius i no radiatius (TAULA III.8). Les intensitats de fluorescència de les espècies emissores han estat recuperades amb suficient precisió per obtenir els espectres d'emissió associats a la relaxació de la fluorescència de les 4

variants estudiades. Aquests espectres, que es mostren en la FIGURA III.30, s'obtenen multiplicant la contribució fraccional de cada temps de vida individual per la intensitat de la fluorescència de l'estat estacionari per a cada longitud d'ona d'emissió.

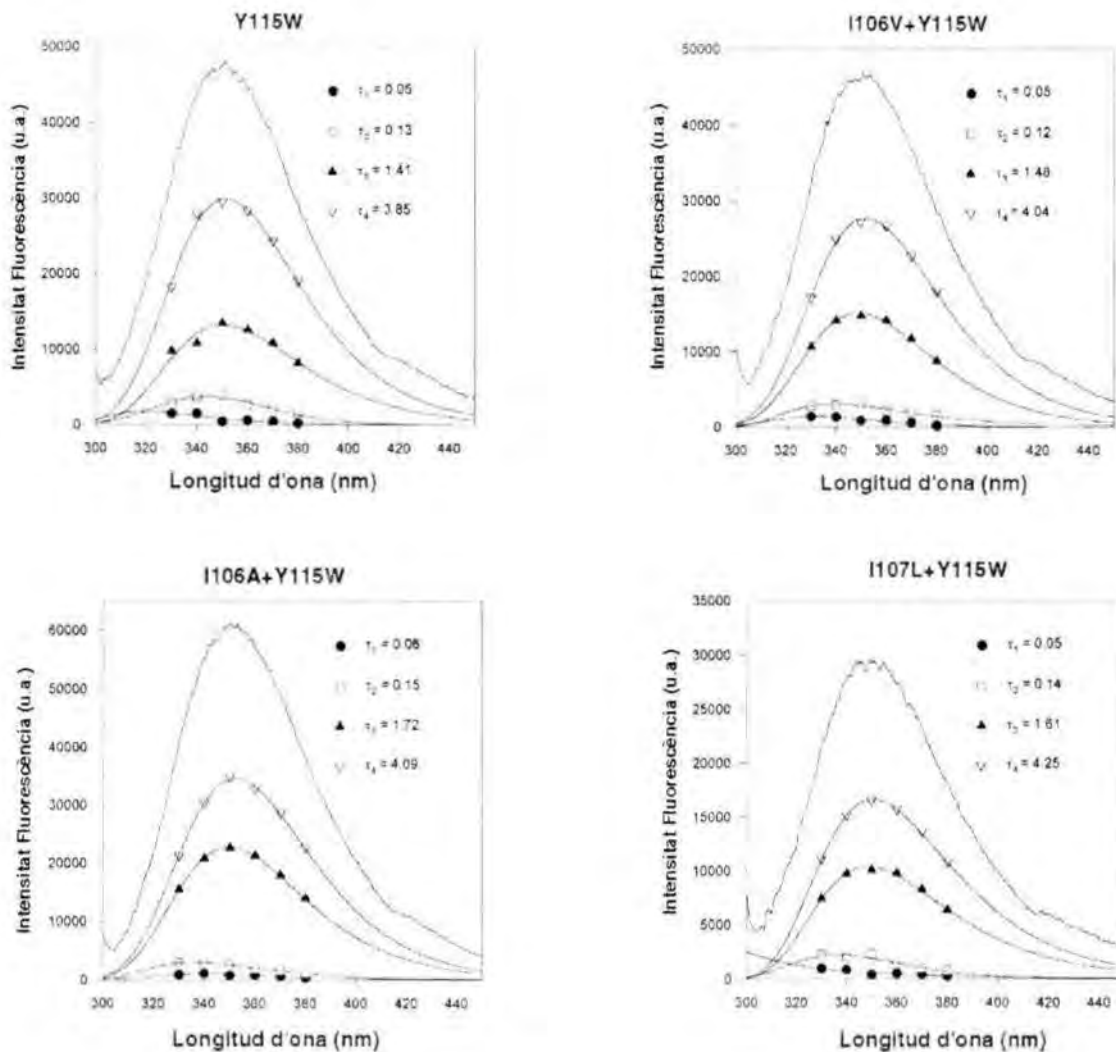


FIGURA III.30

Espectres d'emissió associats a la relaxació de les variants de la RNasa A: Y115W, I106V+Y115W, I106A+Y115W i I107L+Y115W. La corba superior de cada gràfic correspon a l'espectre de fluorescència global de la proteïna i les altres 4 corbes, en ordre creixent, són la contribució fraccional a la fluorescència total corresponent als temps de vida  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $\tau_3$  i  $\tau_4$ .

**TAULA III.8** - Rendiments quàntics,  $Q^a$ , Temps de vida individuals,  $\tau_i$ , Temps de vida promig,  $\langle\tau\rangle$ , Constant de velocitat de processos radiatius,  $K_R^b$ , i Constant de velocitat de processos no radiatius,  $K_{NR}^c$ , de variants de la RNasa A que contenen un sol residu de triptòfan (Trp115).

Proteïna	$Q$	$\tau_1$ (nseg)	$\tau_2$ (nseg)	$\tau_3$ (nseg)	$\tau_4$ (nseg)	$\langle\tau\rangle$ (nseg)	$K_R$ (nseg <sup>-1</sup> )	$K_{NR}$ (nseg <sup>-1</sup> )
Y115W	0,009	0,05	0,13	1,41	3,85	0,66	0,014	1,50
I106A+Y115W	0,015	0,06	0,15	1,72	4,09	1,04	0,014	0,95
I106V+Y115W	0,012	0,05	0,12	1,48	4,04	0,70	0,017	1,41
I107L+Y115W	0,007	0,05	0,14	1,61	4,25	0,61	0,012	1,63

<sup>a</sup>Els rendiments quàntics s'han calculat en relació a Trp en aigua ( $Q = 0,14$ ). <sup>b</sup> $K_R = Q/\langle\tau\rangle$ .

<sup>c</sup> $K_{NR} = (1-Q)/\langle\tau\rangle$ . La precisió dels valors de  $Q$  és de  $\pm 0,002$  i la dels valors de  $\tau_i$  és de  $\pm 0,005$  per a  $\tau_1$  i  $\tau_2$ ,  $\pm 0,002$  per a  $\tau_3$  i  $\pm 0,2$  per a  $\tau_4$ .

En general, els valors dels temps de vida de l'estat excitat de cada variant estudiada són baixos. Valors baixos d'aquest paràmetre poden ser resultat de processos d'extinció del solvent o de la mateixa proteïna. En el nostre cas, com ja s'ha comentat anteriorment, la proximitat del pont disulfur 58-110 al residu de Trp115 pot ser la causa d'aquest fenomen d'extinció. Les variants I106V+Y115W i I107L+Y115W presenten valors de temps de vida individuals i promig similars als de la variant Y115W, mentre que la variant I106A+Y115W presenta valors lleugerament més elevats que podrien ser resultat d'un procés d'extinció menys accentuat originat per un marcat descens dels processos no radiatius que dissipen l'energia absorbida. A més, aquesta variant és la que presenta el valor de  $Q$  més alt.

La relaxació multiexponencial de la fluorescència d'una proteïna es deu a microconformacions múltiples d'aquesta. Per tant, la relaxació de la fluorescència del triptòfan de les variants estudiades en 4 temps de vida correspon a 4 estats conformacionals diferenciables; és a dir, és com si el residu de Trp115 pogués ocupar 4 posicions diferents en la proteïna. La variant I106A+Y115W tindria unes poblacions més elevades de molècules amb les conformacions responsables de  $\tau_3$  i  $\tau_4$ .

#### Relaxació de l'anisotropia

Les millors mesures de l'anisotropia resolta en el temps per a les 4 variants de la RNasa A s'han obtingut considerant una llei de relaxació exponencial doble. D'aquesta



manera s'han obtingut 2 temps de correlació rotacional ( $\phi_1$  i  $\phi_2$ ) i les 2 corresponents fraccions associades ( $g_1$  i  $g_2$ ), a més de l'anisotropia inicial, per a cada variant (TAULA III.9).

**TAULA III.9** - Anàlisi de la relaxació de la fluorescència de variants de la RNasa A que contenen un sol residu de triptòfan (Trp115).

Proteïna	$r_0$	$\phi_1$ (nseg)	$\phi_2$ (nseg)	$g_1$	$g_2$
Y115W	0,19	3,83	0,26	0,49	0,51
I106V+Y115W	0,19	2,99	0,24	0,45	0,55
I106A+Y115W	0,18	3,28	0,31	0,51	0,50
I107L+Y115W	0,19	3,92	0,26	0,46	0,54

La precisió per als valors de  $r_0$  és de  $\pm 0,006$ ; per als de  $\phi_1$  és de  $\pm 0,6$ ; per als de  $\phi_2$  és de  $\pm 0,09$ ; per als de  $g_1$  i  $g_2$  és de  $\pm 0,007$ .

A partir de la TAULA III.9 s'observa que el temps de correlació rotacional  $\phi_1$ , el qual està relacionat amb la grandària de la proteïna, de les variants I106V+Y115W i I106A+Y115W presenta uns valors lleugerament inferiors al de la variant senzilla Y115W, cosa que indicaria que el tamany d'aquestes variants és una mica més petit que el de la variant senzilla. Pel que fa al temps de correlació rotacional del propi residu de triptòfan,  $\phi_2$ , el qual està relacionat amb la rigidesa d'aquest residu, és similar en totes les variants estudiades, per bé que la variant I106A+Y115W mostra un valor lleugerament superior, tot i que poc significatiu, que indicaria una discreta major rigidesa del Trp115 en aquesta variant.

Pel que fa a l'anisotropia inicial,  $r_0$ , s'observa un valor pràcticament idèntic en totes les variants, la qual cosa és lògica ja que es tracta d'un paràmetre constant per a un fluoròfor i les 4 variants estudiades presenten el mateix residu de triptòfan.

A partir de les TAULES III.8 i III.9 s'observa que no existeixen diferències significatives entre les 3 variants dobles de la RNasa A i la variant senzilla Y115W. Per tant, la substitució del residu Ile106 o Ile107 no sembla causar diferències conformacionals significatives en la RNasa A, la qual cosa corrobora els resultats obtinguts per DC en relació al fet que aquestes mutacions no alteren l'estructura global de la variant Y115W.

## **DISCUSSIÓ GENERAL**



La ribonucleasa A de pàncrees boví (RNasa A) ha estat extensament estudiada des de punts de vista estructurals, mecanístics i funcionals (Cuchillo i col., 1997; Raines, 1998). Dins el marc del plegament proteic, la RNasa A ha estat un bon model, malgrat que força complicat, per als estudis de plegament/desplegament proteic (Neira i Rico, 1997). La presència en l'estat natiu de quatre enllaços disulfur i l'existència de dos enllaços peptídics X-prolina en conformació *cis* han encaminat l'estudi del seu plegament a l'anàlisi del camí de plegament oxidatiu de la proteïna reduïda, és a dir, a la formació dels enllaços disulfur, així com també a la caracterització de les espècies presents en l'heterogeni estat desplegat no reduït, això és, amb els enllaços disulfur intactes (Cuchillo i col., 1997). A més, Matheson i Scheraga (1978), tot estudiant els esdeveniments que tenen lloc a l'inici del plegament de la RNasa A en solució aquosa, van postular l'existència de regions de nucleació (CFIS) en aquest enzim, la més estable de les quals estava formada per 13 residus de la regió C-terminal, del residu Ile106 al residu Val118, que se situen al cor hidrofòbic de la proteïna. Es creu que aquestes regions de nucleació permeten restringir l'espai conformacional de manera suficient per dirigir el plegament durant el transcurs del col·lapse hidrofòbic de l'estat desplegat (Houry i Scheraga, 1996b; Udgaonkar i Baldwin, 1995). Des d'aleshores, diferents treballs han corroborat la importància d'aquesta regió com a centre de nucleació de la RNasa A (Rico i col., 1989; Beals i col., 1991; Udgaonkar i Baldwin, 1995; Dodge i Scheraga, 1996), però en cap d'ells s'ha plantejat un estudi sistemàtic d'alteració del grau d'hidrofobicitat dels diferents aminoàcids que en formen part. La major part dels estudis de plegament/desplegament que s'han realitzat en la RNasa A, utilitzant la mutagènesi dirigida com a eina, s'han centrat en l'alteració dels seus residus de cisteïna (Lester i col., 1997) o prolina (Dodge i Scheraga, 1996) per tal d'estudiar la formació dels enllaços disulfur i les reaccions de plegament lent, respectivament.

L'objectiu general d'aquest treball ha estat obtenir informació sobre la contribució dels residus hidrofòbics de la regió CFIS 106-118 de la RNasa A a l'estabilitat global de la molècula, així com també sobre la importància relativa d'aquests residus dins la regió esmentada. És per això que es va plantejar l'obtenció per mutagènesi dirigida per oligonucleòtid d'una sèrie de variants de la RNasa A en les quals els residus Ile106, Ile107, Val108, Ala109, Val116 i Val118 fossin substituïts per altres residus d'hidrofobicitat i tamany inferiors. Amb aquesta idea es va decidir construir les 13 variants senzilles següents: I106L, I106V, I106A, I107L, I107V, I107A, V108A, V108G, A109G, V116A, V116G, V118A i V118G. A excepció de les substitucions

d'Ile per Leu, totes les altres substitucions són no disruptives (Fersht, 1987), és a dir, trunquen sistemàticament les cadenes laterals dels residus esmentats, eliminant 1, 2 o 3 grups metil/metilè de manera que la possibilitat d'introduir interaccions addicionals és mínima. El fet que siguin substitucions no disruptives ha permès comparar directament la proteïna salvatge amb les seves variants i relacionar els canvis d'estabilitat resultants en termes de pèrdua de grups metil/metilè, d'interaccions o petites perturbacions estructurals respecte a l'estructura de la proteïna salvatge.

A més, en el nostre grup de treball s'havia obtingut la variant Y115W de la RNasa A (Torrent, 1996) que suposa la introducció d'un únic residu de triptòfan en la seqüència de l'enzim, concretament en la posició 115 de la regió CFIS esmentada. La substitució del residu Tyr115 de la RNasa A per un triptòfan provocava un increment notable de la fluorescència de la proteïna i pràcticament no alterava la seva estabilitat, mesurada a partir del desplegament induït per urea, altes pressions o calor (Torrent, 1996; Torrent i col., 1999). En base a tots aquests resultats, es va plantejar utilitzar el Trp115 d'aquesta variant com a sonda fluorescent local per detectar canvis conformacionals en la proteïna causats per l'efecte d'altres substitucions en residus hidrofòbics del CFIS. Amb aquest objectiu i en funció dels resultats obtinguts per a les 13 variants senzilles de la RNasa A es van dissenyar les 3 variants dobles següents: I106V+Y115W, I106A+Y115W i I107L+Y115W.

Tot i que la producció heteròloga de la RNasa A ha estat problemàtica i difícil, en el moment d'iniciar aquest treball ja s'havien descrit bastants sistemes d'expressió i purificació d'aquesta proteïna (Vasanthi i Filpula, 1989; Schultz i Baldwin, 1992; Tarragona-Fiol i col., 1992; Laity i col., 1993; Boix i col., 1994). D'entre tots ells el més eficient havia demostrat ser el utilitzat pel grup de Raines i col·laboradors i descrit per delCardayré i col. (1995). Aquest sistema consisteix en l'expressió en *E. coli* del cDNA de la RNasa A clonat en el plasmidi d'expressió pET22b(+) (fusionat darrera la seqüència senyal *pelB*) utilitzant el sistema d'expressió de la T7 RNA polimerasa. La RNasa A produïda mitjançant aquest sistema es troba en la fracció insoluble després del procés de lisi cel·lular, malgrat la presència del pèptid senyal. La solubilització de la proteïna recombinant en medi desnaturalitzant i reductor seguida del replegament i reoxidació d'aquesta i dues etapes cromatogràfiques, permetia als autors obtenir 30-50 mg d'enzim pur i actiu per litre de cultiu.

Per a l'obtenció de la RNasa A recombinant i les seves variants es va utilitzar el sistema d'expressió abans esmentat. Tot i que els autors descriuen un rendiment entre 30 i 50 mg ha fet falta optimitzar el protocol de purificació, atès que es va comprovar que el protocol permetia obtenir proteïna pura i activa, però no homogènia (amb presència d'isoformes probablement a causa d'una formació no correcta dels enllaços disulfur). Mitjançant una modificació d'aquest protocol de purificació, que s'ha descrit en aquest treball, s'han aconseguit entre 20 i 30 mg de proteïna pura i homogènia quan a ponts disulfur correctament formats.

Una de les diferències principals entre el protocol de delCardayré i col. (1995) i l'emprat en aquest treball és la introducció d'una etapa de cromatografia de bescanvi catiónic (CM-Sepharose) a pressió atmosfèrica en presència d'agent desnaturalitzant i reductor posterior al procés de solubilització de la proteïna recombinant i prèvia al procés de replegament i reoxidació d'aquesta. Amb aquesta etapa s'aconsegueix separar la fracció de proteïna amb activitat ribonucleasa de la resta de proteïnes, la majoria de les quals s'elueixen en el rentat de la columna. Altres diferències són l'eliminació de les dues cromatografies de bescanvi iònic (DE52 i S-Sepharose) i la introducció d'una etapa de separació pel sistema d'HPLC (en columna Mono-S®) de la proteïna amb els 4 ponts disulfur nadius d'altres espècies amb un nombre de ponts disulfur inferior. Aquestes espècies són les que es creu que provoquen l'heterogeneïtat en les mostres obtingudes seguint el protocol descrit per delCardayré i col. (1995).

Amb la finalitat de millorar el rendiment i escurçar el temps del procés de purificació, es va assajar un protocol alternatiu. Aquest, està basat en el descrit per Kim i col. (1995) amb algunes modificacions, de les quals destaca la substitució de la cromatografia de gel filtració per una cromatografia de bescanvi catiónic pel sistema d'HPLC (en columna Mono-S®). Mitjançant aquest segon protocol de purificació s'han aconseguit entre 15 i 20 mg de proteïna pura i homogènia quan a ponts disulfur correctament formats.

Aquest segon protocol de purificació es diferencia del descrit primer en 4 punts essencials: (1) en la substitució de l'ús de la urea com a agent desnaturalitzant pel clorur de guanidini; (2) en la solubilització de la proteïna recombinant mitjançant no només un procés purament químic sinó que la solubilització amb clorur de guanidini va precedida d'un trencament cel·lular per mitjans físics, utilitzant la *French Press*®; (3) en l'estalvi de l'etapa cromatogràfica a pressió atmosfèrica; (4) en la substitució d'una concentració per liofilització per una d'ultrafiltració tangencial.

A partir de les anàlisis electroforètiques en SDS-PAGE i zimograma semblava que no era necessària l'etapa cromatogràfica de bescanvi catiònic pel sistema d'HPLC, principalment en el primer protocol descrit. Ara bé, tant el perfil d'aquesta cromatografia com l'estudi de l'espectre de DC, a la regió de l'UV llunyà i de l'UV proper, de la fracció de proteïna amb activitat ribonucleasa replegada i reoxidada però no sotmesa a aquesta cromatografia, han indicat que la cromatografia per HPLC és necessària per aconseguir separar la proteïna recombinant amb els 4 ponts disulfur nadius d'altres espècies amb un nombre de ponts disulfur inferior. Aquest tipus de cromatografia ho aconsegueix perquè en el plegament de la RNasa A a partir de l'espècie amb els 4 ponts disulfur reduïts cap a l'espècie amb els 4 ponts disulfur nadius, utilitzant glutatió com a agent redox, els residus de cisteïna de la proteïna formen enllaços disulfur intermoleculars amb el glutatió, la qual cosa redueix la càrrega positiva de la RNasa A (a pH 7) i, per tant, les espècies que tinguin menys de 4 ponts disulfur s'eluiran abans de la proteïna nativa (Dodge i Scheraga, 1996).

La caracterització de les dues RNases A recombinants salvatges, obtingudes seguint ambdós protocols de purificació, a partir de les anàlisis del seu espectre d'absorció a l'UV, l'estudi de l'espectre de DC, a l'UV llunyà i a l'UV proper, i la determinació dels seus paràmetres cinètics enfront de cCMP i poli(C) ha demostrat que s'obté una proteïna recombinant amb una estructura tridimensional i propietats catalítiques equivalents a la de la RNasa A comercial, aïllada de pàncrees boví.

L'expressió i els rendiments finals del procés de purificació de totes les variants de la RNasa A, seguint qualsevol dels dos protocols, van ser similars als obtinguts per a la proteïna salvatge. D'aquesta manera es va confirmar que les mutacions introduïdes no afecten ni l'expressió ni la recuperació de les proteïnes recombinants estudiades.

La caracterització de l'estat natiu de totes les variants de la RNasa A mitjançant l'anàlisi del seu espectre d'absorció a l'UV, l'estudi de l'espectre de DC, a l'UV llunyà i a l'UV proper, i la determinació dels seus paràmetres cinètics enfront de cCMP i poli(C) ha demostrat que les modificacions introduïdes en la RNasa A no sembla que afectin l'estructura nativa de la proteïna. Així mateix, els valors de les capacitats calorífiques molars parcials a 20°C, obtinguts per DSC, de les variants que no contenen triptòfan han estat idèntics al de la RNasa A ( $4,4 \pm 0,5$ ) kcal K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>, la qual cosa indica que no existeixen diferències significatives quan a flexibilitat entre els estats nadius de les



variants i el de la RNasa A.

La caracterització de les variants dobles en comparació a la variant senzilla Y115W per espectroscòpia de fluorescència de l'estat excitat i per espectroscòpia de fluorescència de fase amb multifreqüència, corrobora que les substitucions en els residus Ile106 o Ile107 de la RNasa A no afecten l'estructura de la proteïna a l'estat natiu, atès que no s'han detectat canvis conformacionals locals en l'ambient circumdant del triptòfan ni canvis en les propietats dinàmiques causats per l'efecte d'aquestes substitucions, a diferència del que s'ha descrit per a altres proteïnes (Willaert i col., 1994; Vos i col., 1995).

S'ha caracteritzat també l'estat desnaturalitzat per calor de la RNasa A i les seves variants que no contenen triptòfan, a partir de l'estudi de l'espectre de DC a la regió llunyana i propera de l'UV. En tots els casos s'ha obtingut un espectre significatiu i similar en la regió de l'UV llunyà, del qual s'ha estimat un contingut d'hèlix  $\alpha$  de  $(9 \pm 5)$  % a partir del valor de l'el·lipticitat a 222 nm. Aquest valor ha resultat ser idèntic al descrit per Robertson i Baldwin (1991) per a la RNasa A utilitzant la mateixa tècnica. La presència d'estructura secundària en la RNasa A desnaturalitzada per calor ha estat prèviament comprovada també per espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier (Seshadri i col., 1992), dispersió de raigs X de petit angle (Zhou i col., 1998) i bescanvi de protons amida per deuteri (Santoro i col., 1993; Wang i col., 1995; Neira i col., 1999). Pel que fa a l'espectre de DC a l'UV proper s'ha observat també una uniformitat en l'espectre de totes les proteïnes, en el qual les estructures locals dels residus de tirosina són pràcticament destruïdes. A més, els valors de les seves capacitats calorífiques molars parcials en l'estat desnaturalitzat obtinguts per DSC, és a dir, després de la transició tèrmica, són igualment molt similars. D'aquesta manera es constata que tampoc existeixen diferències significatives quan a estructura i flexibilitat entre els estats desnaturalitzats de les variants i el de la RNasa A i que tots ells presenten un cert grau d'estructuració, és a dir que no es tracta d'un *random coil*.

El fet que les substitucions en els residus hidrofòbics de la regió 106-118 introduïdes de manera individual en la RNasa A no afecten en general, o afecten molt poc, la seva estructura nativa i la desnaturalitzada per calor, està en concordança amb el que ha estat sovint descrit a la bibliografia, que substitucions úniques en proteïnes causen generalment pertorbacions estructurals molt petites (Lattman i Rose, 1993; Carra i col., 1994). A més, que la conformació nativa de totes les variants sigui pràcticament

idèntica a la de la proteïna salvatge és un factor important perquè permet una anàlisi comparativa directa de l'efecte d'una substitució en l'estabilitat tèrmica de la proteïna i poder interpretar els canvis d'estabilitat en termes d'hidrofobicitat i petites perturbacions estructurals. Cal remarcar també que el fet que les propietats catalítiques de totes les variants estudiades no siguin significativament diferents a les de la proteïna salvatge, concorda amb el que s'ha descrit per altres enzims i s'ha suggerit que pot ser una característica general dels enzims. Aquesta característica general suposa que els residus que són importants pel plegament proteic no ho són per l'activitat catalítica i viceversa (Shoichet i col., 1995).

La desnaturalització per calor de la RNasa A i les seves variants senzilles seguida per DSC i DC ha permès comprovar que el procés és quasi totalment reversible, amb valors superiors al 90%, i, per consegüent, determinar directament les funcions termodinàmiques associades al procés de desplegament. A més, ha permès comprovar la validesa d'un model de dos estats ( $N \leftrightarrow D$ ) per a cada proteïna. A partir dels valors de  $T_d$  o els de  $\Delta\Delta G_d(T_d)$ , calculats aquests darrers a partir de l'aproximació de Becktel i Schellman (1987), s'ha observat una desestabilització clarament significativa en totes les variants analitzades respecte a la proteïna salvatge que oscil·la entre una desestabilització mínima de només 0,14 kcal mol<sup>-1</sup> per a la variant I107V i una desestabilització màxima de 9,32 kcal mol<sup>-1</sup> per a la variant V108G. La desestabilització varia en funció del tipus de substitució feta, augmenta sempre en disminuir la hidrofobicitat del residu reemplaçat, i en funció de la posició del residu hidrofòbic substituït dins la regió estudiada. La substitució dels residus d'Ile per Val o Ala afecta més la posició 106 que la 107, mentre que per a la substitució d'Ile per Leu l'efecte és oposat, i la substitució de Val per Ala o Gly afecta més la posició 108 que la posició 116 i 118, essent més significativa la 118 que la 116. La desestabilització significativa observada en la majoria dels casos demostra la importància dels residus hidrofòbics de la postulada regió iniciadora del plegament de la RNasa A (106-118) estudiada en aquest treball. D'entre ells, el residu Val108 és el que es veu més afectat. És de destacar el fet que una sola substitució, Val108 per Ala o Gly, provoqui una disminució de l'estabilitat de la molècula, mesurada a partir dels valors de la  $T_d$ , de 14°C i 27°C, respectivament, en relació a la proteïna salvatge.

L'enterrament dels residus hidrofòbics per tal de protegir els àtoms no polars del contacte amb l'aigua, fenomen conegut com a efecte hidrofòbic, és la força principal



que dirigeix el plegament de les proteïnes globulars (Kauzmann, 1959; Dill, 1990). La contribució de les interaccions hidrofòbiques sobre l'estabilitat d'una proteïna globular es pot estimar de diferents maneres, una de les quals és correlacionar els valors de  $\Delta\Delta G_d(T_d)$  de les variants substituïdes en residus hidrofòbics del cor de la proteïna amb els valors de les diferències en l'àrea accessible al solvent enterrada entre la proteïna salvatge i cada variant ( $\Delta A$ ). S'ha trobat una bona correlació entre aquests valors per a cada una de les 5 posicions de la RNasa A alterades, excloent les variants amb substitucions disruptives (Ile per Leu). A partir de la regressió lineal de cada posició alterada, s'ha determinat el valor del pendent, el qual és indicatiu de la força de les interaccions hidrofòbiques a cada posició. Per a les posicions Ile106, Ile107, Val116 i Val118, els valors dels pendents són similars al trobat per a mutacions hidrofòbiques creades en la barnasa i descrits per Serrano i col. (1992), mentre que per a la posició Val108 el valor és aproximadament el doble del trobat per aquests autors. Aquesta diferència en el residu Val108 està en concordança amb la idea que la resposta de les estructures proteïques a mutacions creadores de cavitats no es pot predir. Estudis fets en cors hidrofòbics de diferents proteïnes indiquen que un residu hidrofòbic contribueix a l'estabilitat de la proteïna de dues maneres:

1. D'una manera constant causada per la naturalesa hidrofòbica de la cadena lateral reemplaçada que serà idèntica per a les substitucions del mateix tipus (Xu i col., 1998).

2. D'una manera variable que depèn considerablement de la posició del residu substituït en el cor de la proteïna i que altres factors apart de l'àrea accessible al solvent poden respondre a aquesta variació (Serrano i col., 1992). D'entre aquests factors es troba la pèrdua d'interaccions de van der Waals en escurçar la cadena alifàtica del residu, la qual dona lloc a una pèrdua d'estabilitat addicional (Xu i col., 1998). Ara bé, el cor hidrofòbic d'una proteïna és flexible i els àtoms de les cadenes laterals circumdants poden reorganitzar-se com a resposta a mutacions formadores de cavitats i reduir el volum de la cavitat creada o millorar l'empaquetament de la proteïna. Ambdós casos poden restaurar l'estabilitat de la proteïna ja que probablement augmenten la compacitat global en afegir noves interaccions de van der Waals (Eriksson i col., 1992; Buckle i col., 1996). A més a més, s'ha vist que la presència d'una molècula d'aigua en la cavitat creada en una variant de la barnasa (I76A) pot tenir un efecte estabilitzador (Buckle i col., 1996). Malgrat que la presència de molècules d'aigua en les cavitats creades en els cors hidrofòbics de variants de proteïnes globulars no és gens habitual, es creu que la seva presència pot ser possible, ja que es troba sovint una proporció d'àtoms polars en les cavitats. Ara bé, aquestes molècules serien massa mòbils per poder ser

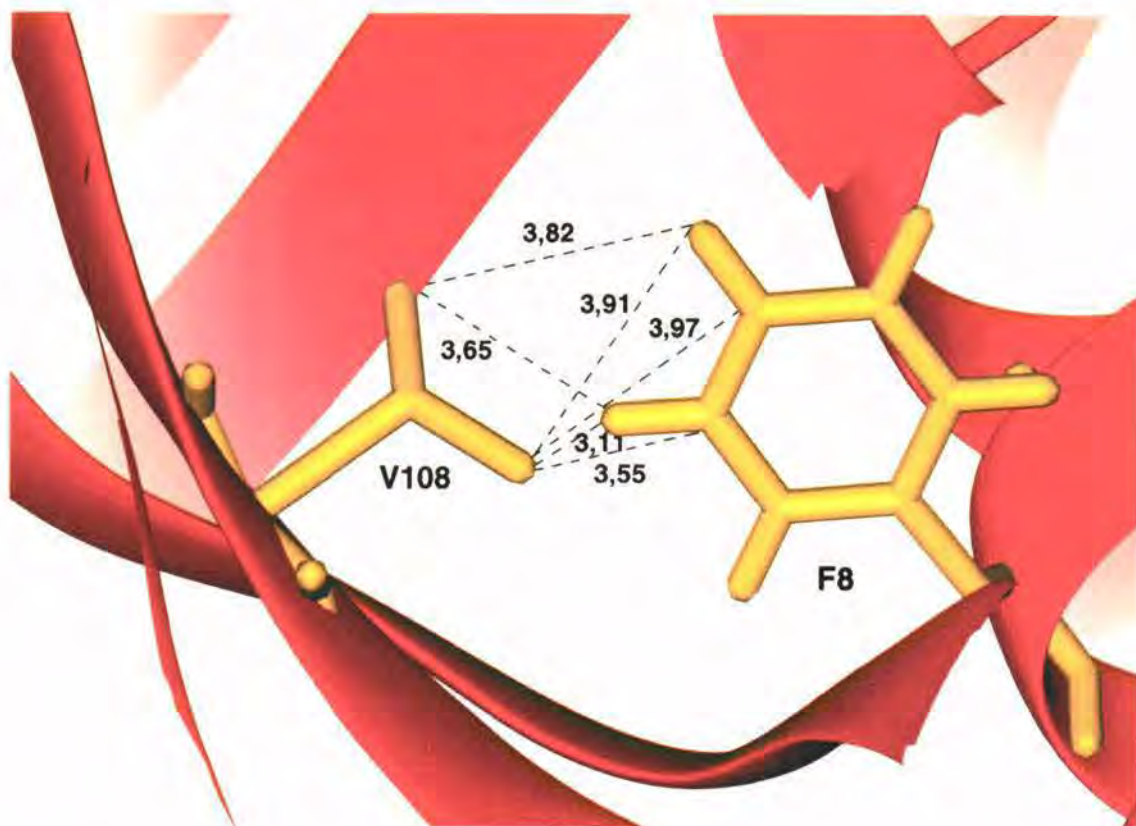
detectades mitjançant mètodes cristal·logràfics o bé el tamany de la cavitat seria massa gran per poder ser localitzades.

Es pot determinar la contribució que fa l'enterrament d'un grup metil/metilè a l'estabilitat conformacional d'una proteïna, dividint els valors de  $\Delta\Delta G_d(T_d)_{\text{corr}}$ , obtinguts per a les diferents variants de la proteïna, excloent les substitucions d'Ile per Leu, pel corresponent nombre de grups metil/metilè eliminats en cada cas en introduir la mutació. A partir dels resultats obtinguts amb les variants de la RNasa A estudiades, es recolza la proposta de Pace (1992) en la qual les proteïnes globulars guanyen 1,2-1,3 kcal mol<sup>-1</sup> per cada grup metil/metilè enterrat en plegar-se la proteïna. Ara bé, per a les variants V108A i V108G es troben valors significativament més grans (2,44 kcal mol<sup>-1</sup> i 3,14 kcal mol<sup>-1</sup>, respectivament) que els esperats segons la predicció de Pace. Això es deu a una desestabilització més elevada que l'esperada si es té en compte només la pèrdua de grups metil/metilè i l'accessibilitat al solvent del residu Val108. La desestabilització observada en aquestes variants podria explicar-se per la participació d'altres factors, per exemple, la creació d'una cavitat amb una relaxació estructural parcial dels grups del voltant que donés lloc a un volum de la cavitat creada superior a l'esperat per l'eliminació de 2 i 3 grups metil/metilè, respectivament, o bé a una disminució de la compacitat global de la proteïna. En canvi, per a la variant I107V es troba un valor significativament inferior (0,15 kcal mol<sup>-1</sup>) a 1,2-1,3 kcal mol<sup>-1</sup>. En aquest cas, no es dona la desestabilització esperada, sinó que la variant gairebé ni es veu desestabilitzada, la qual cosa podria explicar-se per fenòmens contraris al cas anterior, com ara una elevada relaxació estructural dels grups del voltant de la cavitat creada que donés lloc a un volum d'aquesta inferior a l'esperat per l'eliminació d'un sol grup metil, o a un augment de la compacitat global de la proteïna.

Per a la posició 108, a més de ser la més crítica per a l'estabilitat de la RNasa A, s'ha determinat un valor de la relació entre l'entalpia calorimètrica i l'entalpia de van't Hoff ( $R$ ) de les seves variants V108A i V108G significativament inferior a 1, essent de 0,5 per a la variant V108G. Aquests resultats s'han atribuït a l'autoassociació de molècules en solució per formar dímers, ja que el procés de desnaturalització és totalment reversible i no comporta agregació proteica. Ara bé, no s'ha observat la presència d'aquests suposats dímers a l'estat natiu de les variants V108A i V108G, emprant tant electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions no desnaturalitzants com cromatografia de gel filtració per HPLC. Per tant, semblaria que l'autoassociació de

molècules per formar dímers en aquestes variants tindria lloc durant el seu procés de desnaturalització tèrmica, i, atès que aquest procés es reversible, les molècules associades en dímers es dissociarien en ser refredades.

A partir dels models moleculars de les 13 variants de la RNasa A obtinguts en el nostre grup de treball s'ha vist que per a les variants més desestabilitzades i amb valors d' $R$  més baixos, V108A i V108G, es perden 4 i 6 interaccions (calculades com el nombre de grups metil/metilè presents en una esfera de 4 Å de diàmetre, essent el centre de la mateixa el  $C^\alpha$  del residu estudiat), respectivament, entre el residu Val108 i els residus de l'hèlix  $\alpha$  N-terminal (residus 1-15) de la variant, respecte a la proteïna salvatge. Concretament, totes aquestes interaccions perdudes són amb un únic residu, la Phe8. Cal remarcar que en la proteïna salvatge el nombre d'interaccions entre els residus Val108 i Phe8 és de 6 (FIGURA III.31). La Phe8 junt amb la His12 i la Met13 són els residus que més contribueixen a la unió entre l'S-pèptid (residus 1-20) i la S-proteïna (residus 21-124) (Richards i col., 1972) i a la vegada contribueixen fortament a l'estabilitat de la RNasa S (Richards i Wykoff, 1971; Blackburn i Moore, 1982). Recentment, Goldberg i Baldwin (1999) han observat a partir de l'estudi de l'estat de transició del plegament de l'S-pèptid en unir-se a l'S-proteïna plegada, suposant un model de dos estats, que tant l'estructura d'hèlix  $\alpha$  com la interacció entre la Phe8 i S-proteïna estan presents en l'estat de transició, i que en canvi ni la His12 ni la Met13 estabilitzen aquest estat de transició.



**FIGURA III.31**

Representació esquemàtica de l'estructura tridimensional de la regió de la RNasa A que mostra els residus Val108 i Phe8. S'assenyalen les 6 interaccions inferiors a 4 Å entre els dos residus: 2 interaccions entre l'àtom  $C\gamma^1$  de la Val108 i la Phe8 (amb els àtoms  $H^{\epsilon 1}$  i  $H^{\zeta}$ , a 3,65 Å i 3,82 Å, respectivament) i 4 interaccions entre l'àtom  $C\gamma^2$  de la Val108 i la Phe8 (amb els àtoms  $H^{\epsilon 1}$ ,  $C^{\epsilon 1}$ ,  $H^{\zeta}$ , i  $C^{\zeta}$ , a 3,11 Å, 3,55 Å, 3,91 Å i 3,97 Å, respectivament).

El dímer de la RNasa A, descobert per Crestfield i col. (1962) ha estat darrerament cristal·litzat i la seva estructura determinada a una resolució de 2,1 Å per Liu i col. (1998). La formació del dímer té lloc per un mecanisme conegut com a intercanvi de dominis, el qual ha estat també descrit per a dímers de més de 10 proteïnes diferents (Schlunegger i col., 1997), d'entre els quals hi ha el d'una RNasa, la bovina seminal (BS-RNasa). En aquesta última, la dimerització es veu afavorida per la formació de dos enllaços disulfur intercatenaris, entre el residu Cys31 d'una subunitat i el residu Cys32 de l'altra subunitat i viceversa. En el dímer de la RNasa A, les dues subunitats



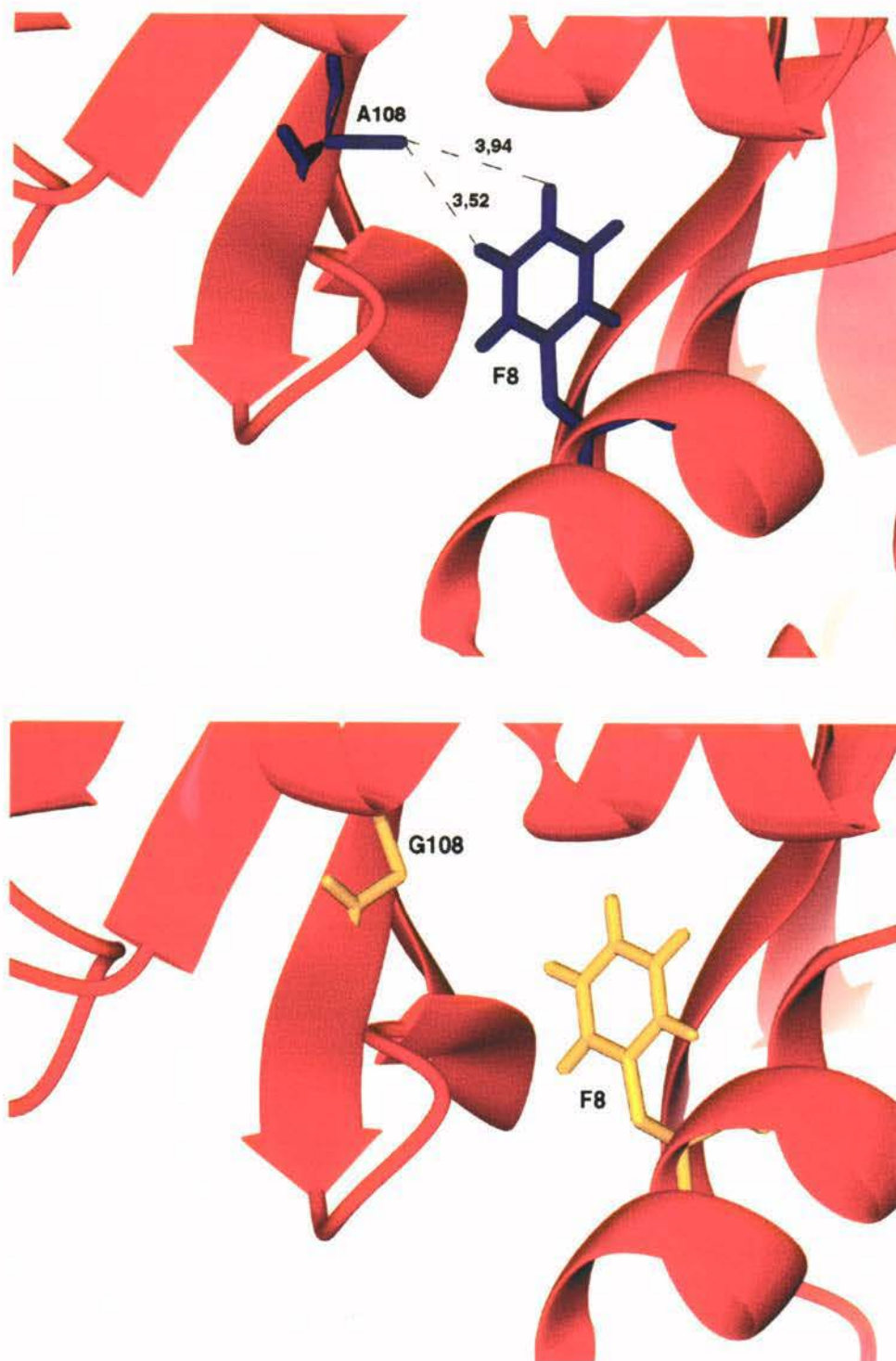
intercanvien també les seves hèlixs  $\alpha$  N-terminal (residus 1-15), com en el cas de l'estructura dimèrica majoritària de la BS-RNasa (Mazzarella i col., 1993). A partir d'estudis computacionals i en solució de la RNasa A i la BS-RNasa ha estat suggerit que la regió xarnera (residus 16-22), que connecta el domini intercanviat (residus 1-15) i el domini principal (residus 23-124), permet l'intercanvi de dominis (Mazzarella i col., 1995; Bergdoll i col., 1997). Liu i col. (1998) descriuen que cada subunitat del dímer de la RNasa A té una conformació gairebé idèntica a la del monòmer de la RNasa A, excepte en les seves regions xarnera, les quals han vist que són més flexibles que en la BS-RNasa, atès a la presència d'un residu de prolina en la posició 19 d'aquesta última. Els autors descriuen també que el dímer de la RNasa A difereix del de la BS-RNasa en l'orientació de les subunitats, cosa que atribueixen a les diferències de flexibilitat de la regió xarnera i a l'absència dels enllaços disulfur entre les subunitats del dímer de la RNasa A. Aquesta diferent orientació dona lloc a una diferent interfase entre les dues subunitats en cada dímer, la qual en el cas del dímer de la RNasa A està formada pels dos fulls plegats  $\beta$  (residus 97-103), un de cada subunitat, que estableixen 6 ponts d'hidrogen entre ells. S'ha suggerit que l'intercanvi de dominis és suficient per formar oligòmers, però que l'orientació precisa de les subunitats està influenciada per les interaccions d'aquesta interfase. S'ha postulat que mutacions en aquesta zona de la proteïna poden influenciar la naturalesa d'aquesta interfase i d'aquesta manera l'estructura global del dímer.

Atès a tot el que s'ha exposat en el paràgraf anterior, sembla clar que la formació de dímers en el cas de les ribonucleases pot estar influenciat com a mínim per dos factors:

1. L'intercanvi de dominis, relacionat de manera directa amb la regió xarnera que connecta l'S-pèptid i l'S-proteïna.
2. Les interaccions que s'estableixen en la regió de l'interfase entre les dues subunitats del dímer.

En el cas de les variants estudiades en aquest treball i concretament en el cas de les variants de la posició 108 es troba que:

1. Es produeix una pèrdua de 4 i 6 interaccions, d'un total de 6 existents en la proteïna salvatge, entre el residu Val108 i els residus de l'hèlix  $\alpha$  N-terminal en les variants V108A i V108G, respectivament (FIGURA III.32), que podria fer augmentar la flexibilitat de la regió xarnera de la proteïna, i, d'aquesta manera, donar lloc a una estructura globular menys compacta.



**FIGURA III.32**

Representació esquemàtica de l'estructura tridimensional de la regió de la variant V108A (figura superior) i V108G (figura inferior) de la RNasa A que mostra els residus de la posició 108 i la Phe8. S'assenyalen les interaccions inferiors a 4 Å que s'estableixen entre els dos residus: 2 interaccions entre l'àtom C $\beta$  de l'Ala108 i la Phe8 (amb els àtoms H $\epsilon^1$  i H $\zeta$ , a 3,52 Å i 3,94 Å, respectivament).



Aquest fet podria facilitar l'autoassociació de molècules per formar dímers, sobretot en la variant V108G que perd dues interaccions més que la variant V108A, en augmentar la temperatura, atès que s'ha proposat que per a l'intercanvi de les hèlixs  $\alpha$  N-terminals en la formació de dímers de la RNasa A cal un cert desplegament local de la proteïna (Kim i col., 1995; Liu i col., 1988).

2. A més, donat que les variants senzilles de la RNasa A estudiades en aquest treball presenten substitucions en residus propers a la regió del full plegat  $\beta$  (97-103), corresponent a la interfase entre les dues subunitats del dímer, la dimerització de la proteïna podria veure's influenciada per aquestes substitucions, en especial sota condicions extremes com pot ser un augment de temperatura que afavoreixi la separació de l'S-pètid i l'S-proteïna.

L'intercanvi de dominis dota el dímer de la BS-RNasa de propietats biològiques addicionals, com ara l'al·losterisme (Piccoli i col., 1988), activitat immunosupressora, antiespermatogènica i antitumoral (Vescia i Tramontano, 1980; Cafaro i col., 1995; Kim i col., 1995), les quals no posseeix el monòmer ni tampoc el dímer minoritari de la BS-RNasa que no està format per intercanvi de dominis. Es creu que totes les propietats biològiques especials de la BS-RNasa provenen de la seva citotoxicitat, la base molecular de la qual es creu que es deu a la seva capacitat per mantenir-se *in vivo* en la forma dimèrica formada per intercanvi de dominis, atès que només el dímer és resistent a la proteïna citosòlica inhibidora de la RNasa A (Kim i col., 1995).

Per tant, pot ser interessant conèixer quins residus de la RNasa A poden afavorir la seva dimerització i dotar-la de les propietats biològiques addicionals abans esmentades, ja que s'ha vist que dímers artificials de la RNasa A mostren activitat antitumoral per bé que menys potent que l'observada per a la BS-RNasa (Vescia i col., 1980).

Considerant el paper crucial de la posició 108 en l'estabilitat de la RNasa A, i la possibilitat que mutacions introduïdes en aquesta posició o posicions properes podrien afavorir la dimerització de la RNasa A, seria interessant caracteritzar l'estructura de la variant V108G en solució. Recentment, Neira i col. (1999), a partir d'experiments de bescanvi d'hidrogens per deuteri seguits per RMN-2D en la RNasa A nativa, han suggerit la presència d'un possible CFIS més extens que el proposat per Matheson i Scheraga (1978) i que ha estat estudiat en aquest treball. Aquest CFIS comprendria les regions de full plegat  $\beta$  62-64, 72-75, 106-110 i 116-119, junt a la cara de l'hèlix  $\alpha$  III

que conté els residus 54 i 57. Els autors han suggerit que podria donar lloc a un intermediari de plegament. La determinació de l'estructura de la variant V108G, principalment en solució, podria aportar més informació sobre aquest possible CFIS més extens proposat per Neira i col. (1999).

## **CONCLUSIONS**

- 1- S'han optimitzat dos sistemes de purificació de la RNasa A en *Escherichia coli* que permeten la producció de 15-30 mg de proteïna pura, activa i homogènia.
- 2- Tant estudis espectroscòpics com la determinació de paràmetres cinètics suggereixen que la RNasa A recombinant presenta la mateixa estructura tridimensional i propietats catalítiques que la RNasa A, aïllada de pàncrees bovi.
- 3- S'han obtingut per mutagènesi dirigida per oligonucleòtid 16 variants de la RNasa A de la regió 106-118 postulada com a centre de nucleació de l'enzim. Les variants obtingudes són: I106L, I106V, I106A, I107L, I107V, I107A, V108A, V108G, A109G, V116A, V116G, V118A, V118G, I106V+Y115W, I106A+Y115W i I107L+Y115W. Cada mutació ha disminuït la hidrofobicitat i el tamany del residu alterat a excepció de la substitució introduïda en la posició 115 (Y115W).
- 4- Aquestes variants, juntament amb la variant senzilla Y115W, s'han produït emprant els mateixos sistemes d'expressió utilitzats per a la proteïna salvatge. S'ha comprovat que les mutacions introduïdes no afecten ni l'expressió ni la recuperació de les proteïnes variants.
- 5- La caracterització de l'estat natiu de les variants en relació a la proteïna salvatge, mitjançant l'estudi de l'espectre de DC, la determinació dels paràmetres cinètics i de la capacitat calorífica molar parcial a 20°C, indica que les substitucions realitzades en la RNasa A no afecten l'estructura nativa de la proteïna. Els resultats obtinguts mitjançant espectroscòpia de fluorescència de l'estat excitat i l'espectroscòpia de fluorescència de fase amb multifreqüència de les variants dobles comparats amb els obtinguts per a la variant senzilla Y115W indiquen que les propietats dinàmiques de les proteïnes analitzades no varien, fet que corrobora un manteniment de l'estructura terciària malgrat la introducció de les substitucions.
- 6- La caracterització de l'estat desnaturalitzat per calor de la RNasa A i les seves variants que no contenen triptòfan mitjançant l'estudi de l'espectre de DC ha indicat en tots els casos la presència d'estructura secundària, amb un contingut d'hèlix  $\alpha$  de  $(9 \pm 5)$  %. Així mateix, els valors de la capacitat calorífica molar parcial després de la transició tèrmica determinats per a cada proteïna són molt similars. Per tant, es pot concloure que no existeixen diferències significatives quan a estructura i flexibilitat de l'estat desnaturalitzat entre les variants i la proteïna salvatge.
- 7- La desnaturalització per calor de la RNasa A i les seves variants seguida per DSC i DC ha permès comprovar que el procés de desnaturalització és quasi totalment reversible i que segueix un model de dos estats. A partir dels valors de  $T_d$  o els de

$\Delta\Delta G_d(T_d)$ , s'ha trobat una desestabilització clarament significativa en totes les variants, la qual augmenta en disminuir la hidrofobicitat del residu reemplaçat, però de manera variable en funció de la posició d'aquest.

8- La posició 108 és la més crítica per a l'estabilitat de la RNasa A. Comparant els valors de  $T_d$  s'observa que la substitució del residu Val108 per Ala o Gly provoca una desestabilització de la proteïna de 14°C i 27°C, respectivament.

9- S'ha estimat la contribució de les interaccions hidrofòbiques sobre l'estabilitat de la RNasa A a partir del quocient entre el paràmetre  $\Delta\Delta G_d(T_d)$  i els valors de les diferències en l'àrea accessible al solvent enterrada entre la proteïna salvatge i cada variant ( $\Delta A$ ). Els valors obtinguts per a totes les posicions alterades són similars als descrits en la bibliografia per a substitucions hidrofòbiques equivalents en proteïnes globulars, a excepció del valor trobat per a les substitucions a la posició Val108.

10- S'ha determinat la contribució que fa l'enterrament d'un grup metil/metilè a l'estabilitat conformacional de la RNasa A i els resultats obtinguts recolzen el descrit en la bibliografia per a les proteïnes globulars, les quals guanyen 1,2-1,3 kcal mol<sup>-1</sup> per cada grup metil/metilè enterrat en plegar-se la proteïna.

11- Per a les variants de la posició Val108 (V108A i V108G) s'ha trobat un valor de la relació entre l'entalpia calorimètrica i l'entalpia de van't Hoff significativament inferior a 1, que s'ha atribuït a l'autoassociació de molècules en solució per formar dímers. Atès que no s'ha observat la presència de dímers en l'estat natiu de les variants, s'ha postulat que l'autoassociació per formar dímers tindria lloc durant el seu procés de desnaturalització tèrmica i les molècules associades es dissociarien en ser refredades.

12- Els models moleculars de les variants de la RNasa A més desestabilitzades i amb valors d' $R$  més baixos, V108A i V108G, prediuen que es perden 4 i 6 interaccions, respectivament, entre el residu Val108 i el residu Phe8 de l'hèlix  $\alpha$  N-terminal, d'un total de 6 existents en la proteïna salvatge. S'ha proposat que aquesta pèrdua pot afectar la posició de l'S-pèptid afavorint l'intercanvi dels extrems N-terminals que té lloc en la formació de dímers. Així mateix, donat que les substitucions realitzades són properes a una regió descrita com a important per a la formació de dímers en la RNasa A, podria facilitar l'autoassociació de molècules, sobretot en condicions extremes com pot ser un augment de temperatura.

## **BIBLIOGRAFIA**



1. Adler, A. J., Greenfield, N. J., i Fasman, G. D. (1973). *Methods Enzymol.* **27D**, 675-797.
2. Adler, M., i Scheraga, H.A.(1990). *Biochemistry* **29**, 8211-8216.
3. Aguilar, C. F., Thomas, P. J., Moss, D. S., Mills, A., i Palmer, R. A. (1991). *Biochem. Biophys. Acta* **1118**, 6-0.2
4. Alber, T., Dao-Pin, S., Wilson, K., Wozniak, J. A., Cook, S. P., i Matthews, B. (1987). *Nature (London)* **330**, 41-46.
5. Allewer, N. M., Mitsui, Y., i Wyckoff, H. W. (1973). *J. Biol. Chem.* **248**, 5291-5298.
6. Alonso, J., Nogués, M. V., i Cuchillo, C. M. (1986). *Arch. Biochem. Biophys.* **246**, 681-689.
7. Altmann, K.-H., i Scheraga, H. A. (1990). *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 4926-4931.
8. Anfinsen, C. B., Flavin, M. i Fansworth, J. (1952). *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 468.
9. Anfinsen, C. B., i White, J. H. F. (1961) En "The Enzymes" (Boyer, P. D. et al., Eds), Vol. 1, 2 ed., pp. 95-122. Academic Press. New York.
10. Anfinsen, C. B. (1973). *Science* **181**, 223-230.
11. Ardelt, W., Mikulski, S., i Shogen, K. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**, 245-251.
12. Arús, C. (1981). Tesi Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.
13. Barnard, E. A. (1969a). *Ann. Rev. Biochem.* **38**, 677-732.
14. Barnard, E. A. (1969b). *Nature* **221**, 340-343.
15. Bayley, P. M., i Martin, S. R. (1992). *Biochem. Biophys. Acta* **1160**, 16-21.
16. Beals, J. M., Haas, E., Krausz, S., i Scheraga, H. A. (1991). *Biochemistry* **30**, 7680-7692.
17. Becktel, W. J., i Schellman, J. A. (1987). *Biopolymers* **26**, 1859-1877.
18. Beechem, J. M., Knutson, J. R., Ross, J. B. A., Turner, B. W., i Brand, L. (1983). *Biochemistry* **22**, 6054-6058.
19. Beers, R. F. (1960). *J. Biol. Chem.* **235**, 2393-2398.
20. Beintema, J. J. (1987). *Life Chem. Rep.* **4**, 333-389.
21. Beintema, J. J., Schüller, C., Irie, M. i Carsana, A. (1988a). *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **51**, 165-192.
22. Beintema, J. J., Blank, A., Schieven, G. L., Dekker, C. A., Sorrentino, S. i Libonati, M. (1988b). *Biochem. J.* **255**, 501-505.
23. 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. (1988c). *Biochemistry* **27**, 4530-4536.
24. Beintema, J. J., Schüller C., Irie, M., i Carsana, A.(1988d). *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **51**, 165-192.

25. Beintema, J. J., Breukelman, H. J., Carsana, A., i Furia, A. (1997). En "Ribonucleases: Structures and Functions" (D'Alessio, G., and Riordan, J. F., Eds.), pp. 245-269. Academic Press, New York.
26. Bello, J., i Nowoswiat, E. F. (1965). *Biochem. Biophys. Acta* **105**, 325-332.
27. Benner, S. A. (1988). *FEBS Lett.* **233**, 225-228.
28. Benner, S. A. i Allemann, R. K. (1989). *TIBS* **14**, 396-397.
29. Bergdoll, M., Remy, M.-H., Chagnon, C., Masson, J.-M., i Dumas, P. (1997) *Structure* **5**, 391-401.
30. Bernal, J. D. (1939). *Nature (London)* **143**, 663-667.
31. Bevington, P. R. (1969). En "Data Reduction and Error Analyses for the Physical Sciences", pp. 235-240. McGraw-Hill, New York.
32. Birdsall, D. L., i McPherson, A. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**, 22230.
33. Biringer, R. G., i Puntambekar, B. (1991). *Biophys. J.* **59**, 488a (Abstract).
34. Birnboim, H. C. i Doly, J. (1979). *Nucleic Acids. Res.* **7**, 1513-1523.
35. Blackburn, P. i Moore, S. (1982). En "The Enzymes" (Ed. Boyer, P. D.) Vol. **15**, 317-433. Academic Press, New York.
36. Blank, A., Sugiyama, R. H., i Dekker, C. A. (1982). *Anal. Biochem.* **120**, 267.
37. Boix, E. (1993). Tesi Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.
38. Boix, E., Nogués, M. V., Schein, C. H., Benner, S. A., i Cuchillo, C. M. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 2529-2271.
39. Boqué, L., Gracia Coll, M., Vilanova, M., Cuchillo, C. M., i Fita, I. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 19707-19712.
40. Borkakoti, N., Moss, D. S., i Palmer, R. A. (1982). *Acta Crystallogr.* **38**, 2210-2217.
41. Borkakoti, N., Palmer, R. A., Haneef, I., i Moss, D. S. (1983). *J. Mol. Biol.* **169**, 743-755.
42. Bradford, M. M. (1976). *Anal. Biochem.* **72**, 248-252.
43. Bravo, J., Fernández, E., Ribó, M., De Llorens, R. i Cuchillo, C. M. (1994). *Anal. Biochem.* **219**, 82-86.
44. Buckle, A. M., Cramer, P., i Fersht, A. R. (1996). *Biochemistry* **35**, 4298-4305.
45. Buckler, D. R., Haas, E., i Scheraga, H. A. (1995). *Biochemistry* **34**, 15965-15978.
46. Cafaro, V., De Lorenzo, C., Piccoli, R., Bracale, A., Mastronicola, M. R., Di Donato, A., i D'Alessio, G. (1995). *FEBS Lett.* **359**, 31-34.
47. Canals, A. (1998). *Universitat de Girona*, Girona.

48. Carlisle, C. H., Palmer, R. A., Mazumdar, S. K., Gorinsky, B. A., i Yates, D. G. R. (1974). *J. Mol. Biol.* **85**, 1-18.
49. Carra, J. H., Anderson, E. A., i Privalov, P. L. (1994). *Biochemistry* **33**, 10842-10850.
50. Carsana, A., Confalone, E., Palmieri, M., Sorrentino, S., Libonati, M., i Furia, A. (1988). *J. Nucleic Acids Res.* **16**, 5491-5502.
51. Chen, R. F. (1967). *Anal. Lett.* **1**, 35-42.
52. Chen, Y.-H., Yang J. T., i Martinez, H. M. (1972). *Biochemistry* **11**, 4120-4131.
53. Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., i Rutter, W. (1979). *J. Biochemistry* **18**, 5294-5299.
54. Chivers, P. T., Laboissière, M. C. A., i Raines, R. T. (1998). En "Prolyl Hydroxylase Protein Disulfide Isomerase and Other Structurally Related Proteins", (Guzman N. A., ed.), pp. 487-505. Marcel Dekker, New York.
55. Chothia, C. (1975). *Nature (London)* **254**, 304-308.
56. Clays, K., Jannes, J., Engelborghs, Y., i Persoons, A. (1989). *J. Phys. E Sci. Instrum.* **22**, 297-305.
57. Confalone, E., Carsana, A., Sasso, M. P., Palmieri, M., Sorrentino, S., Libonati, M., i Furia, A. (1989). En "Estructure and Chemistry of Ribonucleases" (Pavlovsky A., i Polyakov, K., eds.), pp110-117. Moscou.
58. Cook, K. H., Schimid, F. X., i Baldwin, R. L. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 6157-6161.
59. Craik, C. S., Sprang, S., Fletterick, R., i Rutter, W. J. (1982). *Nature* **299**, 180-182.
60. Creighton, T. E. (1977). *J. Mol. Biol.* **113**, 329-341.
61. Creighton, T. E. (1979). *J. Mol. Biol.* **129**, 411-431.
62. Creighton, T. E. (1980). *FEBS Lett.* **118**, 283-288.
63. Creighton, T. E. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5082-5086.
64. Creighton, T. E. (1994). En "Mechanism of Protein Folding" (R. H. Pain, ed.), pp. 1-25. IRL Press, New York.
65. Crestfield, A. M., Stein, W. H., i Moore, S. (1962). *Arch. Biochem. Biophys.*, Suppl. **1**, 217-222.
66. Crook, E. M., Mathias, A. P., i Rabin, B. R. (1960). *Biochem. J.* **74**, 234-238.
67. Cuchillo, C. M., Vilanova, M., i Nogués, M. V. (1997). En "Ribonucleases: Structures and Functions" (D'Alessio, G., and Riordan, J. F., Ed.), pp. 271-304, Academic Press, New York.
68. Cuchillo, C.M., Parés, X., Guasch, A., Barman, T., Travers, F., i Nogués, M. V. (1993). *FEBS Lett.* **333**, 207-210.

69. delCardayré, S. B., Thompson, J. E., i Raines, R. T. (1994). En "Techniques in Protein Chemistry V", (Crabb, J. W., ed.), pp. 313-320, Academic Press, San Diego, CA.
70. delCardayré, S. B., i Raines, R. T. (1995). *J. Mol. Biol.* **252**, 328-336.
71. delCardayré, S. B., Ribó, M., Yokel, E. M., Quirk, D. J., Rutter, W. J., i Raines, R. T. (1995). *Protein Eng.* **8**, 261-273.
72. Dill, K. A. (1990). *Biochemistry* **29**, 7133-7155.
73. Dodge, R. W., Laity, J. H., Rothwarf, D. M., Shimotakahara, S., i Scheraga, H. A. (1994). *J. Protein Chem.* **13**, 409-421.
74. Dodge, R. W., i Scheraga, H. A. (1996). *Biochemistry* **35**, 1548-1559.
75. Donovan, J. W. (1984). *TIBS* **54**, 340-344.
76. Eberhardt, E. S., Wittmayer, P. K., Templar, B. M., i Raines, R. T. (1996). *Protein Sci.* **5**, 1697-1703.
77. Edelhoch, H. (1967). *Biochemistry* **6**, 1948-1954.
78. Eftink, M. R., i Biltonen, R. L. (1983). *Biochemistry* **22**, 5123-5134.
79. Eftink, M. R., i Biltonen, R. L. (1987). En "Hydrolytic enzymes" (A. Neuberger i K. Brocklehurst, eds), pp. 333-376. Elsevier Science Publishers (Amsterdam, New York and Oxford).
80. Eriksson, A. E., Baase, W. A., Zhang, X.-J., Heinz, D. W., Blaber, M., Baldwin, E. P., i Matthews, B. W. (1992). *Science* **255**, 178-183.
81. Fauchere, J. L., i Pliska, V. E. (1983). *Eur. J. Med. Chem.* **18**, 369-375.
82. Fersht, A. R. (1987). *Biochemistry* **26**, 8031-8037.
83. Findlay, D., Heries, D. G., Mathias, A. P., Rabin, B. R., i Ross, C. A. (1961). *Nature (London)* **190**, 781-785.
84. Findlay, D., Heries, D. G., Mathias, A. P., Rabin, B. R., i Ross, C. A. (1962). *Biochem. J.* **85**, 152-153.
85. Fisher, B. M., Ha, J.-H., i Raines, R. T. (1998). *Biochemistry* **37**, 12121-12132.
86. Follmann, H., Wieker, H. J., i Witzel, H. (1967). *Eur. J. Biochem.* **1**, 234-250.
87. Fontecilla-Camps, J. C., de Llorens, R., Le Du, M. H., i Cuchillo, C. M. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 21526-21531.
88. Galat, A., Creighton, T. E., Lord, R. C., i Bout, E. R. (1981). *Biochemistry* **20**, 594-601.
89. Gibson, T. J. (1984). Ph.D. Thesis, Cambridge University, England.
90. Gilbert, H. F. (1994). En "Mechanism of Protein Folding" (R. H. Pain Ed.), pp. 104-136. IRL Press, New York.

91. Gill, S. C., i von Hippel, P. H. (1989). *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
92. Gilliland, G. L. (1997). En "Ribonucleases: Structures and Functions" (D'Alessio, G., i Riordan, J. F., eds.), pp. 305-341, Academic Press, New York.
93. 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.
94. Goldgerg, J. M., i Baldwin, R. L. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2019-2024.
95. González, C., Santoro, J., i Rico, M. (1987). En "Ribonucleases: Structures and Functions" (D'Alessio, G., i Riordan, J. F., Ed.), pp. 343-381. Academic Press, New York.
96. Grafl, R., Lang, K., Wrba, A., Schmid, F. X. (1986). *J. Mol. Biol.* **191**, 281-293.
97. Haas, E., Montelione, G. T., McWherter, C. A., i Scheraga, H. A. (1997). *Biochemistry* **26**, 1672-1683.
98. Hammes, G. G. (1968). *Advan. Protein Chem.* **23**, 1-57.
99. Hahn, U., i Rüterjans, H. (1985). *Biochemistry* **12**, 481-491.
100. Harpaz, Y., Gerstein, M., i Chothia, C. (1994). *Structure* **2**, 641-649.
101. Hennessey, J. P. Jr., i Johnson, W. C. Jr. (1981). *Biochemistry* **20**, 1085-1094.
102. Herries, D. G., Mathias, A. P., i Rabin, B. R. (1962). *Biochem. J.* **85**, 127-134.
103. Herschlag, D. (1994). *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11631-11635.
104. Hirs, C. H. W., Moore, S., i Stein, W. H. (1960). *J. Biol. Chem.* **235**, 633-647.
105. Horowitz, A., Matthews, J. M., i Fersht, A. R. (1992). *J. Mol. Biol.* **227**, 560-568.
106. Houry, W. A., Rothwarf, D. M. i Scheraga, H. A. (1994). *Biochemistry* **33**, 2516-2530.
107. Houry, W. A., Rothwarf, D. M. i Scheraga, H. A. (1995). *Nat. Struct. Biol.* **2**, 495-503.
108. Houry, W. A., Rothwarf, D. M. i Scheraga, H. A. (1996). *Biochemistry* **35**, 10125-10133.
109. Houry, W. A., i Scheraga, H. A. (1996a). *Biochemistry* **35**, 11719-11733.
110. Houry, W. A., i Scheraga, H. A. (1996b). *Biochemistry* **35**, 11734-11746.
111. Horwitz, J., i Strickland, E. H. (1971). *J. Biol. Chem.* **246**, 3749-3752.
112. Imura, N., Irie, M., i Ukita, T. (1965). *J. Biochem. (Tokyo)* **58**, 264-272.
113. Irie, M., Mikami, F., Ohgi, K., Tobe, M., Matsumura, G., Arata, Y., Hirose, T., i Inamaya, S. (1984a). *J. Biochem. (Tokyo)* **95**, 751-759.
114. Irie, M., Mikami, F., Monma, K., Ohgi, K., Watanabe, H., Yamaguchi, R. i Nagase, H. (1984b). *J. Biochem. (Tokyo)* **96**, 89-96.
115. Ish-Horowicz, D., i Burke, J. F. (1981). *Nucleic Acid Res.* **9**, 2989.



116. Jackson, S. E., Moracci, M., el Masry, N., Johnson, C. M., i Fersht, A. R. (1993). *Biochemistry* **32**, 11259-11269.
117. Jonas, J., i Jonas, A. (1994). *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 287-318.
118. Juminaga, D., Wedemeyer, W. J., Garduño-Júarez, R., McDonald, M. A., i Scheraga, H. A. (1997). *Biochemistry* **36**, 10131-10145.
119. Juminaga, D., Wedemeyer, W. J., i Scheraga, H. A. (1998). *Biochemistry* **37**, 11614-11620.
120. Juncosa-Ginestà, M., Pons, J., Planas, A., i Querol, E. (1994). *Biotechniques* **16**, 820-824.
121. Kabsch, W., i Sanders, C. (1983). *Biopolymers* **22**, 2577.
122. Kartha, G., Bello, J., i Harker, D. (1967). *Nature* **213**, 862-865.
123. Kauzmann, W. (1959). *Adv. Protein Chem.* **14**, 1-663.
124. Kell, G. S. (1971). *En "Handbook of Chemistry and Physics"* (Weast, R. C., ed). P F-5. Chemical rubber Co., Cranwood Parkway, Cleveland, OH.
125. Kellis, J. T., Nyberg, K., i Fersht, A. R. (1989). *Biochemistry* **28**, 4914-4922.
126. Kiefhaber, T., Labhardt, A. M., i Baldwin, R. L. (1995). *Nature (London)* **375**, 513-515.
127. Kim E. E., Varadajan, R., Wyckoff, H. W., i Richards, F. M. (1992). *Biochemistry* **31**, 12304-12314.
128. Kim, J. S., Soucek, J., Matousek, J., i Raines, R. T. (1995). *J. Biol. Chem.* **270**, 10525-10530.
129. Kim, P.S., i Baldwin, R. L. (1982). *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 459
130. Kim, P.S., i Baldwin, R. L. (1982). *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 631-660.
131. Kim, P.S., i Baldwin, R. L. (1990). *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 459-489.
132. Kim, P.S., Bierzynsky, A., i Baldwin, R. L. (1982). *J. Mol. Biol.* **162**, 187-199.
133. Klenova, E. M., Botezato, Y., Laudet, V., Goodwin, G. H., Wallace, J. C., i Lobanenkova, V. V. (1992). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**, 231-239.
134. Konishi, Y., Ooi, T., i Scheraga, H. A. (1981). *Biochemistry* **20**, 3945-3955.
135. Konishi, Y., Ooi, T., i Scheraga, H. A. (1982 a). *Biochemistry* **21**, 4734-4740.
136. Konishi, Y., Ooi, T., i Scheraga, H. A. (1982 b). *Biochemistry* **21**, 4741-4748.
137. Konishi, Y., Ooi, T., i Scheraga, H. A. (1982 c). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5734-5738.
138. Krebs, H., Schmid, F. X., i Jaenick, R. (1983). *J. Mol. Biol.* **169**, 619-635.
139. Labhardt, A. M. (1982). *J. Mol. Biol.* **157**, 331-355.
140. Laemmli, U.K. (1970). *Nature* **227**, 680-685.



141. Laity, J. H., Shimotakahara, S., i Scheraga, H. A. (1993). *Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 615-635.
142. Laity, J. H., Lester, C. C., Shimotakahara, S., Zimmerman, D. E., Montelione, G. T., i Scheraga, H. A. (1997). *Biochemistry* **36**, 12683-12699.
143. Lakowicz, J. R. (1983). *En "Principles of Fluorescence Spectroscopy"*, pp.266. Plenum Press, New York.
144. Lakowicz, J. R., Laczko, G., i Gryczynski, I. (1985). *Rev. Sci. Instrum.* **57**, 2499-2506.
145. Landt, O., Grunert, H. P., i Hahn, U. (1990). *Gene*. **96**, 125-128.
146. Lang, K., i Schmid, F. X. (1990). *J. Mol. Biol.* **212**, 185-196.
147. Lang, K., Wrba, A., Krebs, H., Schmid, F. X., i Beintema, J. J. (1986). *FEBS Lett.* **204**, 135-139.
148. Lattman, E., i Rose, G. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 439-441.
149. Leatherbarrow, R. J. (1987). ENZFITTER: A non-linear regression data analysis program for the IBM-PC. *Elsevier Biosoft*, Cambridge.
150. Lee, B. K., i Richards, F. M. (1971). *J. Mol. Biol.* **55**, 379-400.
151. Lester, C. C., Xu, X., Laity, J. H., Shimotakahara, S., i Scheraga, H. A. (1997). *Biochemistry* **37**, 13068-13076.
152. Levinthal, C. (1968). *J. Chim. Phys.* **85**, 44.
153. Li, Y.-J., Rothwarf, D. M., i Scheraga, H. A. (1995). *Nat. Struc. Biol.* **2**, 489-494.
154. Liang, C. J., Yamashita, K., i Kobata, A. (1980). *J. Biochem. (Tokyo)* **88**, 51-58.
155. Lim W. A., i Sauer, R. T. (1989). *Nature (London)* **339**, 31-36.
156. Lin, L. N., i Brandts, J. F. (1983a). *Biochemistry* **22**, 559-563.
157. Lin, L. N., i Brandts, J. F. (1983b). *Biochemistry* **22**, 564-573.
158. Lin, L. N., i Brandts, J. F. (1984). *Biochemistry* **23**, 5713-5723.
159. Lin, L. N., i Brandts, J. F. (1987). *Biochemistry* **26**, 3537-3543.
160. Lin, L. N., i Brandts, J. F. (1988). *Biochemistry* **27**, 9037-9042.
161. Liu, Y., Hart, P. J., Schlunegger, M. P., i Eisenberg, D. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3437-3442.
162. Loftus, D. J., Gbenle, G. O., Kim, P.S., i Baldwin, R. L. (1986). *Biochemistry* **25**, 1428-1436.
163. Longworth, J. W. (1983). *En "Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy in Biochemistry and Biology (Cundall, R. B., i Dale, R. E., eds) pp 651-725. Nato ASI Series Life Sciences 69, Plenum Press.*

164. Makhatadze, G. I., Medvedkin, V. N., i Privalov, P. L., (1990). *Biopolymers* **30**, 1001-1010.
165. Manning, M. C., Illangasekare, M., i Woody, P. W. (1988). *Biophys. Chem.* **31**, 77-86.
166. Marchiori, F., Borin, G., i Moroder, L. (1974). *Int. J. Peptide Res.* **6**, 419-434.
167. Mathenson, R. R., Jr., i Scheraga, H. A. (1982). *Macromolecules* **11**, 819-829.
168. Matsumara, M., Bechtel, W. J., i Matthews, B. W. (1988). *Nature (London)* **334**, 406-410.
169. Matthews, C. R. (1993). *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 653-683.
170. Matousek, J. (1973). *Experientia* **29**, 858-859.
171. Matousek, J., Matthews, J. M., Johnson, M., i Fersht, A. R. (1994). *Protein Eng.* **9**, 1089-1095.
172. Matousek, J., Soucek, J., Riha, J., Zankel, T. R., Benner, S. A. (1995) *Comp. Biochem. Physiol.* **112**, 235-241.
173. Mazzarella, L., Capasso, S., Demasi, D., Di Lorenzo, G., Mattia, C. A., i Zagari, A. (1993). *Acta Crystallogr.* **D 49**, 389-402.
174. Mazzarella, L., Vitagliano, L., i Zagari, A. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3799-3803.
175. McGeehan, G., i Benner, S. A. (1989). *FEBS Lett.* **247**, 55-56.
176. Mc Pherson, A., Brayer, G. D., i Morrison, R. D. (1986a). *J. Mol. Biol.* **189**, 395-327.
177. Mc Pherson, A., Brayer, G. D., i Morrison, R. D. (1986b). *Biophys. J.* **49**, 209-219.
178. Messmore, J. M., Fuchs D. N., i Raines R. T. (1995). *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 8057-8060.
179. Mitraki, A., i King, J. (1989). *Biotechnology* **7**, 690-697.
180. Mitsui, Y., Urata, Y., Torii, K., i Irie, M. (1978). *Biochem. Biophys. Acta* **535**, 229-308.
181. Montelione, G. T., Arnold, E., Meinwald, Y. C., Stimson, E. R., Denton, J. B., Huang, S.-G., Clardy, J., i Scheraga, H. A. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8197-8201.
182. More, J. J., i Sorensen D. C. (1983). *SIAM J. Sci. Stat. Comput.* **4**, 553-572.
183. Mosimann, S. C., Ardelt, W., i James, M. N. G. (1994). *J. Mol. Biol.* **236**, 1141-1153.
184. Moulton, J., i Unger, R. (1991). *Biochemistry* **30**, 381666-3824.
185. Moussaoui, M., Nogués, M. V., Guash, A., Barman, T., Travers, F., i Cuchillo, C. M. (1998a). *J. Biol. Chem.* **273**, 25565-25572.
186. Moussaoui, M., Guash, A., Boix, E., Cuchillo, C. M., i Nogués, M. V. (1998b). *J. Biol. Chem.* **271**, 4687-4692.
187. Mui, P. W., Konishi, Y., i Scheraga, H. A. (1985). *Biochemistry* **24**, 4481-4489.

188. Nall, B. T. (1994). *En* "Mechanisms of Protein Folding" (R. H. Pain Ed.), pp. 80-183, IRL Press, New York.
189. Nambiar, K. P., Stackhouse, J., Stauffer, D. M., Kennedy, W. P., Eldredge, J. K., i Benner, S. A. (1984). *Science* **223**, 1299-1301.
190. Nambiar, K. P., Stackhouse, J., Presnell, S. R., i Benner, S. A. (1987). *Eur. J. Biochem.* **163**, 67-71.
191. Nash, D., Lee, B.-S., i Jonas J. (1996). *Biochim. Biophys. Acta* **1297**, 40-48.
192. Neira, J. L., i Rico, M. (1997). *Fold. Des.* **2**, R1-R11.
193. Neira, J. L., Sevilla, P., Menéndez, M., Bruix, M., i Rico, M. (1998) *J. Mol. Biol.* **285**, 627-643.
194. Némenthy, G., Leach, S. J., i Scheraga, H. A. (1966). *J. Phys. Chem.* **70**, 998-1004.
195. Némenthy, G., i Scheraga, H. A. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 6050-6054.
196. Nitta, K., Oyama, F., Oyama, R., Sekiguchi, K., Kawauchi, H., Takayanagi, Y., Hakomori, S. -I., i Titani, K. (1993). *Glycobiology* **3**, 37-45.
197. Nogués, M. V., Vilanova, M., i Cuchillo, C. M. (1995). *Biochem. Biophys. Acta* **1253**, 16-24.
198. Nogués, M. V., Moussaoui, M., Boix, E., Vilanova, M., Ribó, M., i Cuchillo, C. M. (1998). *CMLS Cell. Mol. Life Sci.* **54**, 766-744.
199. Nozaki, Y., i Tanford, C. (1971). *J. Biol. Chem.* **246**, 2211-2217.
200. Ooi, T., Oobatake, M., Nemethy, G., i Scheraga, H. A. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3086-3090.
201. Pace, C. N., Laurents, D. V., i Thompson, J. A. (1990). *Biochemistry* **29**, 2564-2572.
202. Pace, C. N. (1992). *J. Mol. Biol.* **226**, 29-35.
203. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., i Gray, T. (1995). *Protein Sci.* **4**, 2411-2423.
204. Pace, C. N., Shirley, B. A., McNutt, M., i Gajiwala, K. (1996). *FASEB J.* **10**, 75-83.
205. Pace, C. N., Grimsley, G. R., Thomas, S. T., i Makhatadze, G. I. (1999). *Protein Sci.* **7**, 1500-1504.
206. Palmieri, M., Carsana, A., Furia, A., i Libonati, M. (1985). *Eur. J. Biochem.* **152**, 275-277.
207. Parés, X., de Llorens, R., Arús, C., i Cuchillo, C. M. (1980). *Eur. J. Biochem.* **105**, 571-579.
208. Parés, X., Nogués, M. V., de Llorens, R., i Cuchillo, C. M. (1991). *Essays Biochem.* **24**, 89-103.
209. Parker, C. A., i Rees, W. T. (1960). *Analyst* **85**, 587-600.

210. Pearson, M. A., Karplus, P. A., Dodge, R. W., Laity, J. H., Scheraga, H. A. (1998). *Protein Sci.* **7**, 1255-12258.
211. Perutz, M. F., Kendrew, J. C., i Watson, H. C. (1965). *J. Mol. Biol.* **13**, 669-678.
212. Pflumm, M. N., i Beychok, S. (1969a). *J. Biol. Chem.* **244**, 3973-3981.
213. Pflumm, M. N., i Beychok, S. (1969b). *J. Biol. Chem.* **244**, 3982-3989.
214. Piccoli, R., DiDonato, A., i D'Alessio, G. (1988). *Biochem. J.* **253**, 329-336.
215. Pincus, M. R., Gerewitz, F., Wako, H., i Scheraga, H. A. (1983). *J. Protein Chem.* **2**, 131-146.
216. Plum, C. E., i Breslauer, K. J. (1995). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 682-690.
217. Poklar, N., Petovcic, N., Oblak, M., i Vernaver, G. (1999). *Protein Sci.* **8**, 832-840.
218. Presnell, S. R. (1988) Tesi doctoral, E.T.H., Zürich.
219. Preuss, K. D., Wagner, S., Freudenstein, J., i Scheit, K. H. (1990). *Nucl. Acids Res.* **18**, 1057.
220. Privalov, P. L. (1979). *Advan. Protein Chem.* **33**, 167-236.
221. Privalov, P. L., i Potekhin, S. A. (1986). *Methods Enzymol* **131**, 4-51.
222. Privalov, P. L., Tiktopoulo, E. I., Venyaminov, S. Yu., Griko, Y. V. Makhatadze, G. I., i Khechinashvili, N. N. (1989) *J. Mol. Biol.* **205**, 737-750.
223. Quirk, D. J., Park, C., Thompson, J. E., i Raines, R. T. (1998). *Biochemistry* **37**, 17958-179664.
224. Rabin, B. R., Cuchillo, C. M., Deavin, A., Kemp, C. M., i Mathias, A.P. (1970). *En "Structure and Function of Enzymes"* ( Sols, A., i Grisolia, S., eds.), pp 203-218. Academic Press, London.
225. Radzicka, A., i Wolfenden, R. (1988). *Biochemistry* **27**, 1644-1670.
226. Raines, R. T. (1997). *Nature Struct. Biol.* **4**, 424-427.
227. Raines, R. T. (1998). *Chem. Rev.* **98**, 1045-1065.
228. Reisfeld, R. A., Lewis, U. J., Williams, D. E. (1962). *Nature* **195**, 281-283.
229. Richards, F. M., i Wyckoff, H. W. (1971). *En "The Enzymes"* (P. D. Boyer, ed.), pp 647-806. Academic Press, New York.
230. Richards, F. M., i Wyckoff, H. W., Carlson, W. D., Allewell, N. M., Lee, B., i Mitsui, Y. (1972). *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **36**, 35-43.
231. Richards, F. M. (1977). *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **6**, 151-176.
232. Richardson, R. M., Parés, X., i Cuchillo, C. M. (1990). *Biochem.* **267**, 593-599.



233. Rico, M., Santoro, J., Bermejo, F. J., Nieto, J.L., Gallego, E., i Jiménez, M. A. (1986). *Biopolymers* **25**, 1031-1053.
234. Rico, M., Bermejo, F. J., Santoro, J., Nieto, J.L., Gallego, E., Herranz, J., Voskuyl-Holtkamp, L., i Schattenkerk, C. (1987). *Int. J. Pept. Propein Res.* **29**, 193-206.
235. Rico, M., Bruix, M., Santoro, J., González, C., Neira, J. L., Nieto, J.L., i Herranz, J. (1989). *Eur. J. Biochem.* **183**, 623-638.
236. Rico, M., Santoro, J., González, C., Bruix, M., Neira, J. L., Nieto, J.L., i Herranz, J. (1991). *J. Biomol. NMR* **1**, 283-298.
237. 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.
238. Robertson, A. D., i Baldwin, R. L. (1991). *Biochemistry* **30**, 9907-9914.
239. Robertson, A. D., Purisima, E. O., Eastman, M. A., i Scheraga, H. A. (1999). *Biochemistry* **28**, 5930-5938.
240. Rose, G. D. (1979). *J. Mol. Biol.* **134**, 447.
241. Rothwarf, D. M., i Scheraga, H. A. (1991). *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 6293-6294.
242. Rothwarf, D. M., i Scheraga, H. A. (1993a). *Biochemistry* **32**, 2671-2679.
243. Rothwarf, D. M., i Scheraga, H. A. (1993b). *Biochemistry* **32**, 2680-2689.
244. Rothwarf, D. M., i Scheraga, H. A. (1993c). *Biochemistry* **32**, 2690-2697.
245. Rothwarf, D. M., i Scheraga, H. A. (1993d). *Biochemistry* **32**, 2698-2703.
246. Rothwarf, D. M., Li, Y.-J., i Scheraga, H. A. (1995). *Protein Sci.* **4**, 237-245.
247. Rothwarf, D. M., Li, Y.-J., i Scheraga, H. A. (1998a). *Biochemistry* **37**, 3760-3766.
248. Rothwarf, D. M., Li, Y.-J., i Scheraga, H. A. (1998b). *Biochemistry* **37**, 3767-3776.
249. Roussell, A., i Cambilleau, C. (1989). TURBO-FRODO. pp. 77-79, Silicon Graphics, Mountain View, CA.
250. Rudd, P. M., Scragg, I. G., Coghill, E. C., Dwek, R. A. (1992). *Glycoconjugate J.* **9**, 86-91.
251. Ruoppolo, M., Torella, C., Kanda, F., Panico, M., Pucci, P., Marino, G., i Morris, H. R. (1996). *Fold. Des.* **1**, 381-390.
252. Ruoppolo, M., Lundström-Ljung, J., Talamo, F., Pucci, P., i Marino, G. (1997). *Biochemistry* **36**, 12259-12267.
253. Rushizky, G. W., Knight, C. A., i sober, H. A. (1961). *J. Biol. Chem.* **356**, 687-708.
254. Sandeberg, W. S., i Terwilliger, T. C. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1706-1710.
255. Sanger, F. i Coulson, A. R. (1978). *FEBS Lett.* **87**, 107-110.

256. Sanger, F., Nicklen, S. i Coulson, A. R. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
257. Santoro, J., González, C., Bruix, M., Neira, J. L., Nieto, J. L., Herranz, J., i Rico, M. (1993). *J. Mol. Biol.* **229**, 722-734.
258. Sasso, M. P., Carsana, A., Confalone, E., Cosi, C., Sorrentino, S., Viola, M., Palmieri, M., Russo, E., i Furia, A. (1991). *Nucl. Acids Res.* **19**, 6469-6474.
259. Saunders, M., Wishnia, A., i Kirkwood, J. G. (1957). *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3289-3290.
260. Schein, C. H., Boix, E., Haugg, M., Holliger, K. P., Hemmi, S., Frank, G., i Schwalbe, H. (1992). *Biochem. J.* **283**, 137-144.
261. Scheraga, H. A. i Rupley, J. A. (1962). En "Advances in Enzymology" (Nrod, F. F., Ed.) Vol. **24**, pp. 161-261. John Wiley and Sons, New York.
262. Scheraga, H. A. (1980). En "Protein Folding" (Jaenicke ed.), p. 261. Elsevier, Amsterdam.
263. Scheraga, H. A. (1984). *Carlsberg Res. Commun.* **49**, 1.
264. Scheraga, H. A., Konishi, Y., Rothward, D. M., i Mui, P. W. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5740-5744.
265. Schmid, F. X. (1982). *Eur. J. Biochem.* **128**, 77-80.
266. Schmid, F. X. (1983). *Biochemistry.* **22**, 4690-4696.
267. Schmid, F. X., i Blaschek, H. (1981). *Eur. J. Biochem.* **114**, 111-117.
268. Schmid, F. X., Grafl, R., Wrba, A., i Beintema, J.J. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 872-876.
269. Schulunegger, M., Bennett, M., i Eisenberg, D. (1997). En "Advances in Protein Chemistry" (Richards, F. M., Eisenberg, D. S., Kim, P. S., eds) Vol 50, pp. 61-122. Academic, New York.
270. Schultz, D. A., i Baldwin, R. L. (1992). *Protein Sci.* **1**, 910-915.
271. Schultz, D. A., Schmid, F. X., i Baldwin, R. L. (1992). *Protein Sci.* **1**, 917-924.
272. Schultz, L. W., Quirk, D. J., i Raines, R. T. (1998). *Biochemistry* **37**, 8886-8898.
273. Schultz, L. W., Hargraves, S. R., Klink, T. A., i Raines, R. T. (1998). *Protein Sci.* **7**, 1620-1625.
274. Sela, M. i Anfinsen, C. B. (1957). *Biochem. Biophys. Acta* **24**, 229.
275. Sendak, R. A., Rothwarf, D. M., Wedemeyer, W. J., Houry, W. A., i Scheraga, H. A. (1996). *Biochemistry* **35**, 12978-12992.
276. Serrano, L., Kellis, J. T., Cann, P., Matouschek, A., i Fersht, A. R. (1992). *J. Mol. Biol.* **224**, 783-804.
277. Shapiro, R., Riordan, J. F., i Vallee, B. L. (1986). *Biochemistry* **25**, 3527-3532.



278. Sharp, K. A., Nicholls, A., Friedman, R., i Honig, B. (1991). *Biochemistry* **30**, 9686-9697.
279. Shimotakahara, S., Ríos, C. B., Laity, J. H., Zimmerman, D. E., Scheraga, H. A. i Montelione, G. T. (1997). *Biochemistry* **36**, 6915-6929.
280. Shoichet, B. K., Baase, W. A., Kuroki, R., i Matthews, B. W. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 452-456.
281. Shortle, D., Stites, W. E., i Meeker, A. K. (1990). *Biochemistry* **29**, 8033-8041.
282. Sierakowska, H., i Shugar, D. (1977). *Prog. Nucleic Acids Res. Molec. Biol.* **20**, 59-130.
283. Simonson, T., i Brünger, A. T. (1992). *Biochemistry* **31**, 8661-8674.
284. Smyth, D. G., Stein, W. H. i Moore, S. (1963). *J. Biol. Chem.* **238**, 227-234.
285. Sorrentino, S., i Glitz, D. G. (1991). *FEBS Lett.* **288**, 23-26.
286. Sorrentino, S., i Libonati, M. (1994). *Arch. Biochem. Biophys.* **312**, 340-348.
287. Sosnick, T., R., i Trehwella, J. (1992). *Biochemistry* **31**, 8329-8335.
288. Soucek, J., Raines, R. T., Haugg, M., Raillard-Yoon, S. A., i Benner, S. A. (1999). *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **123**, 103-111.
289. Spencer, R. D., i Weber, G. (1969). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **158**, 361-376.
290. Stark, G. R., Stein, W. H., i Moore, S. (1960). *J. Biol. Chem.* **235**, 3177-3181.
291. Stimson, E.R., Montelione, G. T., Meinwald, Y. C., Rudolph, R. K. E., i Scheraga, H. A. (1982). *Biochemistry* **21**, 5252-5262.
292. Strauss, F., i Gaillard, C. (1990). *Nucleic Acids Res.*, Vol. 18, n° 2.
293. Strickland, E. H. (1972). *Biochemistry* **11**, 3465-3474.
294. Strydom, D. J., R., Fett, J. W., Lobb, R. R., Alderman, E. M., Bethune, J. L., Riordan, J. F., i Vallee, B.L. (1985). *Biochemistry* **24**, 5486-5494.
295. Studier, F. W., i Moffatt, B. A. (1986). *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.
296. Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., i Dudendorff, J. W. (1990). *Methods Enzymology* **185**, 60-89.
297. Sturtevant, J. M. (1987). *Annu. Rev. Phys. Chem.* **38**, 463-488.
298. Svensson, L. A., Sjölin, L., Gilliland, G. L., Finzel, B. C., i Wlodawer, A. (1986). *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **1**, 370-375.
299. Takakuwa, T., Konno, T., i Meguro, H. (1985). *Anal. Sci.* **1**, 215-225.
300. Talluri, S., i Scheraga, H. A. (1990). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**, 800-803.
301. Talluri, S., Rothwarf, D. M., i Scheraga, H. A. (1994). *Biochemistry* **33**, 10437-10449.

302. Tanford, C. (1980). *The Hydrophobic Effect*. Wiley & Sons, New York.
303. Tarragona-Fiol, A., Taylorson, C. J., Ward, J. M., i Rabin, B. R. (1992). *Gene* **118**, 239-245.
304. Thompson, J. E., i Raines, R. T. (1994). *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 5467-5468.
305. Thompson, J. E., Venegas, F. D., i Raines, R. T. (1994). *Biochemistry* **33**, 7408-7414.
306. Timasheff, S. N. (1970). En "The Enzymes" (Ed. Boyer P. D.) **2**, 371-401. Academic Press, New York.
307. Tindall, K. R., i Kunkel, T. A. (1988). *Biochemistry* **27**, 6008-6013.
308. Torrent, J. (1996). *Universitat de Girona*, Girona.
309. Torrent J., Connelly, J. P., Coll, M. G., Ribó, M., Lange, R., i Vilanova, M. *Biochemistry*, en premsa.
310. Tramontano, V. S., Agusti-Tocco, G., i D'Alessio, A. (1980) *Cancer Res.* **40**, 3740-3744.
311. Trautwein, K., i Benner, S. A. (1991a). En "Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering", (Elsevier Science Publishers, El-Gewely, W.R. eds.), pp. 53-54.
312. Udgaonkar, J. B., i Baldwin, R. L. (1988). *Nature (London)* **335**, 694-699.
313. Udgaonkar, J. B., i Baldwin, R. L. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8197-8201.
314. Udgaonkar, J. B., i Baldwin, R. L. (1995). *Biochemistry* **34**, 4088-4096.
315. Usher, D. A., Erenrich, E. S., i Eckshtein, F. (1972). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 405-415.
316. van Gunsteren, W. F., i Berendsen, H. J. C. (1991). *Biomos; Nijenborgh 4*, AG The Netherlands.
317. Varadarajan, R., i Richards, F. M. (1992). *Biochemistry* **31**, 12315-12327.
318. Vasantha, N., i Fipula, D. (1989). *Gene* **76**, 53-60.
319. Vescia, S., i Tramontano, D. (1980). *Mol. Cell. Biol.* **36**, 125-128.
320. Viera, J., i Messing, J. (1987). *Meth. Enzymol.* **153**, 3.
321. Vos, Izard, J., Baty, D., i Engelgorhs, Y. (1995). *Biochemistry* **34**, 1734-1743.
322. Vos, R., Strobbe, R., i Engelgorhs, Y. (1997). *J. Fluorescence* **7**(1), 33S-35S.
323. Wang, A., Robertson, A. D., i Bolen, D.W. (1995). *Biochemistry* **34**, 15096-15104.
324. Wearne, S. J., i Creighton, T. E. (1988). *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **4**, 251-161.
325. Weber, G. (1981). *J. Phys. Chem.* **85**, 949-953.
326. Wetlinger, D. B. (1962). *Advan. Protein Chem.* **17**, 303-391.

327. Wigler, P. W. (1968). *Biochem. Prep.* **12**, 107.
328. Willaert, K., Loewenthal, R., Sancho, J., Froeyen, M., Ferscht, A., i Engelborghs, Y. (1992). *Biochemistry* **31**, 711-716.
329. Witzel H., i Barnard, E. A. (1962a). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **7**, 289-294.
330. Witzel H., i Barnard, E. A. (1962b). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **7**, 295-299.
331. Wlodawer, A., Bott, R., i Sjölin, L. (1982). *J. Biol. Chem.* **257**, 1325-1332.
332. Wlodawer, A., i Sjölin, L. (1983). *Biochemistry* **22**, 2720-2728.
333. Wlodawer, A., Svensson, L. A., Sjölin, L., i Gililand, G. (1988). *Biochemistry* **27**, 2705-2717.
334. Wright, P. E., Dyson, H. J., i Lerner, R. A. (1988). *Biochemistry* **27**, 7167-7175.
335. Xia, T. H. (1992). Ph.D. Thesis. ETH Zurich Nr. 9831.
336. Xu, X., Rothwarf, D. M., i Scheraga, H. A. (1996). *Biochemistry* **35**, 6406-6417.
337. Yamane, K., i Mizushima, S. (1988). *J. Biol. Chem.* **263**, 19690-19696.
338. Yang J. T., Wu C.-S. C., i Martinez H. M. (1986). *Methods Enzymol.* **130**, 208-269.
339. Yazdanparast, R., Andrews, P. S., Smith, D. L., i Dixon, J. E. (1987). *J. Biol. Chem.* **262**, 2507-2513.
340. Youle, R. J., Wu, Y. N., Mikulski, S. M., Shogen, K., Hamilton, R. S., Newton, D., D'Alessio, G., i Gravell, M. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 6012-6016.
341. Yutani, K., Ogasahara, K., Tsujita, T., i Sugini, Y. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4441-4444.
342. Zegers, I., Maes, D., Dao-Thi, M.-H., Poortmans, F., Palmer, R., i Wyns, L. (1994). *Protein Sci.* **3**, 2322-2339.
343. Zhang, J., Peng, X., Jonas, A., i Jonas, J. (1995). *Biochemistry* **34**, 8631-8641.
344. Zhou, H. M. i Strydom D. J. (1993). *Eur. J. Biochem.* **217**, 401-410.
345. Zhou, J. M., Fan, Y.X., Kihara, H., Kimura, K., i Ameniya, Y. (1998). *FEBS Lett.* **430**, 275-277.