



Universitat de Girona

**ESTABILITAT CONFORMACIONAL DE VARIANTS
DE LA RIBONUCLEASA: PRESSIÓ I TEMPERATURA
COM A INDUCTORS DEL DESPLEGAMENT PROTEIC**

Joan TORRENT i MAS

**ISBN: 84-8458-102-0
Dipòsit legal: GI-1214-2001**



UNIVERSITAT DE GIRONA

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

Tesi Doctoral

**Estabilitat conformacional de variants de la ribonucleasa A:
pressió i temperatura
com a inductors del desplegament proteic**

Joan Torrent i Mas

2000



UNIVERSITAT DE GIRONA

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

**Estabilitat conformacional de variants de la ribonucleasa A:
pressió i temperatura
com a inductors del desplegament proteic**

Memòria presentada per adquirir el grau de
Doctor per la Universitat de Girona, per

Joan Torrent i Mas

Vist-i-plau
La Directora de Tesi

Vist-i-plau
El Director de Tesi

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

Dr. Marc Ribó i Panosa
Professor Titular
de Bioquímica i Biologia Molecular

Girona, juny de 2000

Índex

<i>Índex general</i>	<i>i</i>
<i>Índex de taules i figures</i>	<i>v</i>
<i>Llista d'abreviatures</i>	<i>vii</i>
<i>Resum / resumen / summary</i>	<i>ix</i>
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. La ribonucleasa A	1
1.1.1. La producció heteròloga	2
1.1.2. Estructura i funció	4
1.1.2.1. <i>Un punt de referència</i>	4
1.1.2.2. <i>L'estructura</i>	4
1.1.2.3. <i>La interacció enzim-substrat i l'activitat catalítica</i>	5
1.1.3. Estabilitat i plegament	9
1.1.3.1. <i>La formació dels ponts disulfur</i>	10
1.1.3.2. <i>La isomerització dels enllaços peptídics X-Pro</i>	12
1.1.3.3. <i>La iniciació del plegament proteic</i>	13
1.2. El nucli hidrofòbic	16
1.2.1. L'efecte hidrofòbic	16
1.2.2. Estudis del nucli hidrofòbic de les proteïnes per mutagènesi dirigida	17
1.3. La pressió	19
1.3.1. Breu història	19
1.3.2. Efectes en l'estructura proteica	20
1.3.2.1. <i>La desnaturalització proteica</i>	21
1.3.2.2. <i>Utilitat de la modificació de la seqüència polipeptídica per estudis de desnaturalització induïda per pressió</i>	23
1.3.3. Tècniques espectroscòpiques emprades pel seguiment de la desnaturalització proteica per pressió	23
1.3.4. La pressió en biotecnologia	23
1.4. Objectius	28

2. MATERIAL I MÈTODES	31
2.1. Equipament i productes químics	31
2.1.1. Equipament.....	31
2.1.2. Productes químics	32
2.2. Mètodes de treball amb proteïnes	33
2.2.1. Anàlisi de l'estructura nativa per dicroïsm circular	33
2.2.1.1. <i>Fonament</i>	33
2.2.1.2. <i>Mètode</i>	33
2.2.2. Tècniques espectroscòpiques utilitzades per a l'anàlisi de la desnaturalització induïda per pressió i desnaturalització induïda per temperatura.....	35
2.2.2.1. <i>Espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat i espectroscòpia de fluorescència...</i>	35
2.2.2.1.1. <i>Fonament</i>	35
2.2.2.1.2. <i>Equipament d'alta pressió</i>	38
2.2.2.1.3. <i>Absorció a l'ultraviolat de quarta derivada</i>	40
2.2.2.1.3.1. <i>Condicions de treball</i>	40
2.2.2.1.3.2. <i>Processament de les dades</i>	40
2.2.2.1.3.3. <i>Anàlisi termodinàmica dels canvis espectrals</i>	40
2.2.2.1.4. <i>Fluorescència</i>	42
2.2.2.1.4.1. <i>Condicions de treball</i>	42
2.2.2.1.4.2. <i>Anàlisi termodinàmica dels canvis espectrals</i>	43
2.2.2.2. <i>Espectroscòpia d'absorció a l'infraroig</i>	43
2.2.2.2.1. <i>Fonament</i>	43
2.2.2.2.2. <i>Equipament d'alta pressió</i>	48
2.2.2.2.3. <i>Condicions de treball</i>	50
2.2.2.2.4. <i>Millora de la resolució espectral</i>	50
2.2.2.2.5. <i>Anàlisi dels canvis espectrals</i>	50
2.2.2.2.5.1. <i>Anàlisi termodinàmica</i>	51
2.2.2.2.5.2. <i>Anàlisi estructural</i>	52
2.2.3. Tècniques utilitzades per al seguiment de la desnaturalització induïda per urea .	53
2.2.3.1. <i>Espectroscòpia de fluorescència</i>	53
2.2.3.1.1. <i>Fonament</i>	53
2.2.3.1.2. <i>Condicions de treball</i>	53
2.2.3.1.3. <i>Anàlisi de les corbes de desnaturalització</i>	55
2.2.3.2. <i>Electroforesi en gel de poliacrilamida amb gradient transversal d'urea</i>	56
2.2.3.2.1. <i>Fonament</i>	56
2.2.3.2.2. <i>Equipament</i>	56
2.2.3.2.3. <i>Condicions de treball</i>	58
2.2.3.2.4. <i>Anàlisi de les corbes de desnaturalització</i>	61

3. RESULTATS I DISCUSSIÓ	63
3.1. Elecció dels residus a substituir: criteris seguits	63
3.2. Descripció de la regió que ha estat subjecte de l'estudi	66
3.3. Obtenció del gen de l'RNasa A modificat amb les corresponents mutacions	67
3.4. Expressió i purificació de les ribonucleases recombinants Comprovació de la seva puresa i homogeneïtat	70
3.5. Caracterització de les ribonucleases recombinants i comparació amb la proteïna salvatge	74
3.5.1. Determinació de les propietats catalítiques	74
3.5.2. Anàlisi de l'estructura nativa per dicromisme circular	76
3.5.3. Les variants hidrofòbiques	79
3.5.3.1. Desnaturalització per pressió i desnaturalització per temperatura	79
3.5.3.1.1. Espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat de quarta derivada	80
3.5.3.1.1.1. Variació de l'espectre d'absorció en funció de la pressió i de la temperatura	80
3.5.3.1.1.2. Efecte de les substitucions en l'estabilitat	84
3.5.3.1.1.3. El desplegament per pressió enfront del desplegament per temperatura	88
3.5.3.1.1.4. Canvis de volum.....	92
3.5.3.1.1.5. Les interaccions hidrofòbiques	92
3.5.3.1.1.6. Efectes estèrics	97
3.5.3.1.2. Espectroscòpia d'absorció a l'infraroig	100
3.5.3.1.2.1. L'espectre d'infraroig en la regió de l'amida I' en condicions natives.....	100
3.5.3.1.2.2. Variació de la regió de l'amida I' de l'espectre d'infraroig en funció de la pressió i de la temperatura	103
3.5.3.1.2.3. Efecte de les substitucions en l'estabilitat de la proteïna	105
3.5.3.1.2.4. El desplegament per pressió enfront del desplegament per temperatura	111
3.5.3.1.2.5. Variació del contingut d'estructura secundària a partir dels canvis espectrals	113
3.5.4. La variant Y115W	115
3.5.4.1. Desnaturalització per pressió i desnaturalització per temperatura	115
3.5.4.1.1. Espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat i espectroscòpia de fluorescència	115
3.5.4.1.1.1. Espectre d'absorció en la regió de l'ultraviolat	116
3.5.4.1.1.2. Fluorescència del triptòfan	118

3.5.4.1.1.3. Anàlisi del desplegament local i efecte de la substitució en l'estabilitat	120
3.5.4.1.2. Espectroscòpia d'absorció a l'infraroig	122
3.5.4.2. Desnaturalització per urea	123
3.5.4.2.1. Espectroscòpia de fluorescència	123
3.5.4.2.2. Electroforesi en gel de poliacrilamida amb gradient transversal d'urea	127
3.6. Discussió general.....	133
4. CONCLUSIONS.....	143
5. BIBLIOGRAFIA.....	147
APÈNDIX. MATERIAL I MÈTODES D'ÚS GENERAL	163

ÍNDIX DE TAULES

TAULA 2.1.	Equipament utilitzat en aquest treball.....	32
TAULA 2.2.	Efecte del solvent sobre els espectres de 4a derivada dels aminoàcids aromàtics.....	36
TAULA 2.3.	Freqüències en la regió amida I' de les conformacions de l'enllaç peptídic.....	47
TAULA 2.4.	Preparació de les solucions necessàries per a una corba de desnaturalització per urea .	54
TAULA 3.1.	Oligonucleòtids utilitzats per a l'obtenció dels gens mutants de l'RNasa A	68
TAULA 3.2.	Paràmetres cinètics de l'RNasa A WT i variants per als substrats C>p i poli(C).....	75
TAULA 3.3.	Contingut en hèlix α de les diferents proteïnes estudiades (CD).....	78
TAULA 3.4.	Paràmetres de la desnaturalització per p de l'RNasa A WT i variants (UV).....	86
TAULA 3.5.	Paràmetres de la desnaturalització per T de l'RNasa A WT i variants (UV).....	87
TAULA 3.6.	Pèrdua d'estabilitat mitjana per a cada tipus de reemplaçament (UV).....	94
TAULA 3.7.	Altres paràmetres que caracteritzen les variants de la regió C-terminal de l'RNasa A .	95
TAULA 3.8.	Interaccions suprimides i introduïdes en les diferents variants.....	99
TAULA 3.9.	Posició i assignació de les bandes d'absorció en la regió amida I' de l'RNasa A	102
TAULA 3.10.	Valors de $P_{1/2}$ i $T_{1/2}$ de l'RNasa A salvatge i variants (FTIR).....	108
TAULA 3.11.	Paràmetres de la desnaturalització per p de la variant Y115W (UV i fl.).....	121
TAULA 3.12.	Paràmetres de la desnaturalització per T de la variant Y115W (UV i fl.)	122
TAULA 3.13.	Valors de $P_{1/2}$ i $T_{1/2}$ de la variant Y115W (FTIR).....	122
TAULA 3.14.	Paràmetres de la desnaturalització per urea de l'RNasa A WT i Y115W (fl.)	127
TAULA 3.15.	Paràmetres de la desnaturalització per urea de l'RNasa A WT i Y115W (electroforesi)	131

ÍNDEX DE FIGURES

FIGURA 1.1.	Seqüència i representació tridimensional de l'RNasa A.....	5
FIGURA 1.2.	Representació esquemàtica de la interacció RNasa A-RNA.....	6
FIGURA 1.3.	Etapas de la degradació de l'RNA.....	7
FIGURA 1.4.	Diagrama d'una transició de desnaturalització per p-T.....	24
FIGURA 2.1.	Efecte de l'etanol sobre els espectres de 4a derivada dels aminoàcids aromàtics.....	37
FIGURA 2.2.	Efecte de la ϵ_r sobre els espectres de 4a derivada dels aminoàcids aromàtics.....	38
FIGURA 2.3.	Representació d'una cel·la d'alta p.....	39
FIGURA 2.4.	Configuració òptica de l'espectrofotòmetre d'IR per transformada de Fourier.....	44
FIGURA 2.5.	Representació d'un interferograma.....	45
FIGURA 2.6.	Espectre d'IR d'una solució de proteïna en D ₂ O emplaçada en una cel·la DAC.....	46
FIGURA 2.7.	Representació d'una cel·la DAC.....	49
FIGURA 2.8.	Esquema del Model 475 Gradient Delivery System de BIO-RAD.....	57
FIGURA 2.9.	Representació del procés de formació d'un gel de poliacrilamida amb gradient d'urea.....	58
FIGURA 3.1.	Representació de la regió 106-118 en l'estructura tridimensional de l'RNasa A.....	65
FIGURA 3.2.	Esquema de la construcció del vector pBXR. <i>mutació</i>	69
FIGURA 3.3.	Prova d'expressió de l'RNasa A WT i variant V118G (SDS-PAGE i zimograma).....	70
FIGURA 3.4.	Seguiment del procés de purificació de la variant Y115W (SDS-PAGE i zimograma).....	71
FIGURA 3.5.	Cromatograma de la variant V118G (Mono-S) per HPLC.....	72
FIGURA 3.6.	Cromatograma de la variant V118G (Mono-S i Vydac C ₄) per HPLC.....	73
FIGURA 3.7.	Espectre de CD en l'UV llunyà i proper de l'RNasa A WT i variants.....	77
FIGURA 3.8.	Espectre de CD en l'UV proper de l'RNasa A WT i de la variant Y115W.....	78
FIGURA 3.9.	Espectres d'absorció d'ordre 0 i de 4a derivada de la variant V116A.....	81
FIGURA 3.10.	Representació tridimensional de l'RNasa A amb els residus de Tyr indicats.....	82
FIGURA 3.11.	Espectre d'absorció a l'UV de 4a derivada de la variant V116A en funció de p i T.....	83
FIGURA 3.12.	Espectre d'absorció a l'UV de 4a derivada de l'ATEE en funció de T.....	84
FIGURA 3.13.	Corbes de desnaturalització per p i T de la variant V116A (UV).....	85
FIGURA 3.14.	Correlació entre els valors ΔG_U p i ΔG_U T de les variants estudiades (UV).....	90
FIGURA 3.15.	Correlació entre els valors de $P_{1/2}$ i $T_{1/2}$ de les variants estudiades (UV).....	90
FIGURA 3.16.	Corbes de desnaturalització per p de la variant I106V a diferents temperatures (UV).....	91
FIGURA 3.17.	Correlació entre els valors de $\Delta\Delta G_{U,0\%}$ i els valors de $\Delta\Delta G_{T,p}$ i T (UV).....	93
FIGURA 3.18.	Correlació entre els valors de $\Delta\Delta G_{U,0\%}$ i els valors de $-\Delta V_{res,p}$ i T (UV).....	96
FIGURA 3.19.	Correlació entre els valors de $\Delta\Delta G_{U,0\%}$ i la densitat d'empaquetament, per p i T (UV).....	98
FIGURA 3.20.	Espectres d'IR en la regió amida I' de l'RNasa A WT i de la variant V108G (estat N).....	101
FIGURA 3.21.	Espectres d'IR en la regió amida I' de la variant V118G, en funció de p i T.....	104
FIGURA 3.22.	Corbes de desnaturalització per p i T de la variant V118G (FTIR).....	106
FIGURA 3.23.	Corbes de desnaturalització per T de l'RNasa A WT i V108G (FTIR).....	107
FIGURA 3.24.	Espectres d'IR en la regió amida I' de l'RNasa A WT i V108G (estat D per T i p).....	111
FIGURA 3.25.	Correlació entre $P_{1/2}$ i $T_{1/2}$ per l'RNasa A WT i variants (FTIR).....	112
FIGURA 3.26.	Efecte de p i T en l'estructura desordenada i de full β per la variant V118G.....	114
FIGURA 3.27.	Variació de l'espectre de fluorescència de l'RNasa A WT en funció de T.....	116
FIGURA 3.28.	Espectre d'absorció a l'UV de 4a derivada de la variant Y115W en funció de p i T.....	117
FIGURA 3.29.	Corba de desnaturalització per T i p de la variant Y115W (UV).....	117
FIGURA 3.30.	Variació de l'espectre de fluorescència de l'Y115W (λ_{excit} 265nm), en funció de p.....	118
FIGURA 3.31.	Variació de l'espectre de fluorescència de l'Y115W (λ_{excit} 295 nm), en funció de p.....	119
FIGURA 3.32.	Corbes de desnaturalització per T de la variant Y115W (UV i fl.).....	121
FIGURA 3.33.	Variació de la intensitat de fluorescència (y) de l'Y115W en funció de la [urea].....	123
FIGURA 3.34.	Variació de la intensitat de fluorescència ($y\%$) de l'Y115W en funció de la [urea].....	124
FIGURA 3.35.	Variació d' F_U de l'Y115W en funció de la [urea].....	125
FIGURA 3.36.	Corbes de desnaturalització per urea de l'RNasa A WT i la variant Y115W (fl.).....	126
FIGURA 3.37.	Escanneig del gel de poliacrilamida amb gradient d'urea de l'RNasa A WT.....	128
FIGURA 3.38.	Corba de desnaturalització de l'RNasa A WT (electroforesi en gradient d'urea).....	129
FIGURA 3.39.	Corba de desnaturalització de l'RNasa A WT normalitzada (electroforesi).....	130
FIGURA 3.40.	Corbes de desnaturalització de l'RNasa A WT i Y115W (electroforesi).....	130
FIGURA 4.1.	Comparació dels valors de $\Delta P_{1/2}$ i $\Delta T_{1/2}$ de les variants respecte l'RNasa A WT.....	138
FIGURA 4.2.	Representació d'una part del nucli hidrofòbic de l'RNasa A.....	140
FIGURA 4.3.	Detall de la regió de l'RNasa A que mostra els residus V108, F8 i V57.....	140

LLISTA D'ABREVIATURES

#	Número	GSH	Glutatió reduït
λ	Longitud d'ona	GSSG	Glutatió oxidat
$\Delta\Delta G_U$	Diferència d'estabilitat conformational entre dues proteïnes	h	Hora(es)
ΔE	Variació d'energia interna	HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
ΔG	Variació d'energia lliure	I₀, I₁, I_N	Intermediaris de plegament
$\Delta G_{(H_2O)}$	Variació d'energia lliure en absència d'urea	IPG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosid
ΔG_U	Estabilitat conformational d'una proteïna	IR	Infraroig
ΔS	Variació d'entropia	J, KJ	Joule, quilojoule
ΔV	Variació de volum	K	Constant d'equilibri
ΔV^*	Canvi de volum en l'estat de transició	k_{cat}	Constant catalítica
[θ]	El.lipticitat	K_m	Constant de Michaelis Menten
[Urea]	Concentració d'urea (M)	L, mL, μL	Litre, mil.lilitre, microlitre
2D-NMR	Ressonància magnètica nuclear bidimensional	LacZ	Gen de la β -galactosidasa
3'-AMP	Adenina 3'-monofosfat	LB	Medi Luria-Bertrani
A	Adenina	M, mM, μM	Molar, mil.limolar, micromolar
Å	Amstrong	M9	Medi mínim
Abs, A	Absorbància	mA	Mil.liamper
Amp, Ap	Ampicil.lina	MES	Àcid 2(N-morfolino) etanosulfònic
Amp^r	Soca resistent a l'ampicil.lina	min	Minuts
ATEE	Ester etílic de la N-acetiltirosina	MPa	Megapascal
atm	Atmosfera(es)	mRNA	Àcid ribonucleic missatger
ATP	Adenosina-5'-trifosfat	mS	Mil.lisiemens
B	Subseti per a la fixació de bases	N	Conformació nativa
BPR	Gen de la ribonucleasa	nm	Nanometres
BrEt	Bromur d'etidi	NMR	Ressonància magnètica nuclear
BSA	Albúmina de sèrum bovi	N-terminal	Amino-terminal
C	Citidina	°C	Graus centígrads
cCMP, C>p	Citidina 2',3'-fosfat cíclic	Oligo	Oligonucleòtid
CD	Dicroïsm circular	p	Pressió
cDNA	DNA complementari	P	Subseti per a la fixació de fosfats
CFIS	<i>Chain-folding initiation site</i>	p/p	Relació pes/pes
CM-Sepharose	Carboximetil-Sepharose	p/v	Relació pes/volum
ϵ	Coefficient d'extinció molar	PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida
Cp	Capacitat calorífica	pb	Parell de bases
C-terminal	Carboxi-terminal	PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
D	Conformació desnaturalitzada	PEG	Poliètilenglicol
D₂O	Aigua deuterada	PMSF	Fenilmetilsulfonil fluorur
Da, KDa	Dalton, quilodalton	poli(A)	Àcid poliadenílic
DNA	Àcid desoxiribonucleic	poli(C)	Àcid policitidílic
dNTP	Desoxiribonucleòtid-5'trifosfat	poli(U)	Àcid poliuridílic
DO	Densitat òptica	R	Constant dels gasos
DSC	Calorimetria de rastreig diferencial	R	Subseti per a la fixació de riboses
dsDNA	DNA de doble cadena	RFDNA	Forma replicativa del DNA de fags filamentosos
DTT	1,4-ditio-DL-treitol	RNA	Àcid ribonucleic
DTT^{red}	1,4-ditio-DL-treitol reduït	RNasa A	Ribonucleasa A de pàncrees bovi
EDTA	Àcid etilendiamina-tetraacètic	RNasa	Ribonucleasa
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>	rpm	Revolucions per minut
FSD	<i>Fourier self-deconvolution</i>	rRNA	Àcid ribonucleic ribosomal
FTIR	Espectroscòpia d'infraroig per transformada de Fourier	RUP	<i>Reverse universal primer</i>
FUP	<i>Forward universal primer</i>	s	Segons
G	Guanina	SDM	Mutagènesi dirigida per oligonucleòtid
g, mg, μg, ng, pg	Gram, mil.ligram, microgram, nanogram, picogram, quilogram	SDS	Dodecil sulfat sòdic
Kg	Gram, mil.ligram, microgram, nanogram, picogram, quilogram	ssDNA	DNA de cadena senzilla
Gnd-HCl	Clorur de guanidini	T	Temperatura
		T	Timina
		TAE	Amortidor Tris/àcid acètic/EDTA

TB	Medi <i>terrific broth</i>	v/v	Relació volum/volum
TE	Amortidor Tris/HCl/EDTA	$V_{\text{màx}}$	Velocitat màxima
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina	WT	Tipus salvatge
TFA	Àcid trifluoroacètic	XC	Xilen cianol
Tris	Tris-hidroximetil-aminometà	xg	Força centrífuga relativa
tRNA	Àcid ribonucleic de transferència	X-Gal	5-Bromo-4-Cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosid
U	Unitat(s)	X-Pro	Enllaç imida entre una prolina i el residu que la precedeix
U_{vf}, U_{f}, U_{m}	Espècies de repliegament	ϵ_r	Constant dielèctrica
U_{S}^{II}, U_{S}^{I}	Ultraviolat		

RESUM

A fi d'analitzar la contribució de la regió C-terminal proposada com a iniciadora del plegament (CFIS 106-118) a l'estabilitat de l'RNasa A, els residus alifàtics d'aquesta regió es van substituir, mitjançant mutagènesi dirigida, per altres residus en els quals la cadena lateral alifàtica era progressivament escurçada. La major part de les substitucions projectades suposaven deleccions no disruptives de grups metil(è). A més, es va reemplaçar la Tyr115 per un Trp, de manera que, potencialment, s'introduïa una única sonda fluorescent, no desestabilitzant, per tal de seguir els canvis conformationals que es poguessin generar en la regió durant el procés de plegament/desplegament de la proteïna.

Tant els paràmetres cinètics, com els espectres d'FTIR i CD, determinats per cadascuna de les ribonucleases variants, indiquen que els reemplaçaments aminoacídics efectuats presenten, en general, poc o cap efecte en l'estructura nativa i en l'activitat de l'enzim.

Es va emprar l'espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat de quarta derivada, la fluorescència (per la variant amb Trp) i l'espectroscòpia d'infraroig per transformada de Fourier, per tal de seguir i caracteritzar, en condicions d'equilibri, les transicions conformationals de cada variant en funció de la pressió i de la temperatura. Els resultats es van comparar amb els que es van obtenir per la proteïna salvatge. Per determinar més a fons les característiques del procés de desplegament de la variant Y115W, les transicions de desnaturalització induïdes per urea d'aquesta variant i de la proteïna salvatge, van ésser examinades per mitjà d'electroforesi en gradient d'urea i espectroscòpia de fluorescència.

Curiosament, els canvis conformationals que resulten de la desnaturalització per pressió són molt semblants als que s'obtenen per temperatura. Enfront d'un augment gradual tant de pressió com de temperatura, l'estructura terciària i els elements d'estructura secundària de les proteïnes estudiades es perden de manera conjunta i reversible. Aquestes variacions estructurals que es promouen descriuen un procés de desplegament molt cooperatiu i en dos estats. Atès que ambdues tècniques (UV i FTIR) utilitzen cadascuna un règim de concentració proteica molt diferent, els resultats indiquen que el procés de desplegament per pressió i per temperatura és intramolecular.

Els resultats obtinguts suggereixen que la hidrofobicitat i el volum de les cadenes laterals del CFIS, juntament amb les interaccions de van der Waals entre elements d'estructura secundària intervenen de manera molt notable en l'estabilització de la proteïna.

Entre els diferents aminoàcids alifàtics que pertanyen al CFIS C-terminal, la Val108 és el residu més important per tal de preservar la integritat estructural de l'estat natiu. Els reemplaçaments en aquesta posició causen petites alteracions conformationals i una gran desestabilització de la proteïna (per exemple, el punt mig de la transició de desnaturalització per pressió i per temperatura de la variant V108G disminueix uns 592 MPa i 25°C, respectivament, respecte a la proteïna salvatge).

D'acord amb els resultats obtinguts, la variant Y115W ofereix una sonda útil per tal de seguir la cinètica de plegament/desplegament de l'RNasa A.

RESUMEN

Para analizar la contribución de la región C-terminal propuesta como iniciadora del plegamiento (CFIS 106-118) en la estabilidad de la RNasa A, los residuos alifáticos de esta región fueron sustituidos, mediante mutagénesis dirigida, por otros residuos en los cuales la cadena lateral alifática era progresivamente recortada. La mayor parte de las sustituciones proyectadas suponían deleciones no disruptivas de grupos metilo(eno). Además, se reemplazó la Tyr115 por un Trp, de forma que, potencialmente, se introducía una única sonda fluorescente, no desestabilizadora, para seguir los cambios conformacionales que se pudieran generar en la región durante el proceso de plegamiento/desplegamiento de la proteína.

Tanto los parámetros cinéticos, como los espectros de FTIR y CD, determinados para cada una de las ribonucleasas variantes, indican que las sustituciones aminoacídicas efectuadas presentan, en general, poco o ningún efecto en la estructura nativa y en la actividad de la enzima.

Se utilizó la espectroscopia de absorción ultravioleta de cuarta derivada, la fluorescencia (para la variante con Trp) y la espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier, para seguir y caracterizar, en condiciones de equilibrio, las transiciones conformacionales de cada variante en función de la presión y de la temperatura. Los resultados se compararon con los que se obtuvieron por la proteína salvaje. Para determinar más a fondo las características del proceso de desplegamiento de la variante Y115W, las transiciones de desnaturalización inducidas por urea de esta variante y de la proteína salvaje, fueron examinadas mediante electroforesis en gradiente de urea y espectroscopia de fluorescencia.

Curiosamente, los cambios conformacionales que resultan de la desnaturalización por presión son muy parecidas a los que se obtuvieron por temperatura. Enfrente de un aumento gradual tanto de presión como de temperatura, la estructura terciaria y los elementos de estructura secundaria de las proteínas estudiadas se pierden de forma conjunta y reversible. Estas variaciones estructurales que se promueven describen un proceso de desplegamiento muy cooperativo y en dos estados. Dado que las dos técnicas (UV y FTIR) utilizan cada una un régimen de concentración proteica muy diferente, los resultados indican que el proceso de desplegamiento por presión y por temperatura es intramolecular.

Los resultados obtenidos sugieren que la hidrofobicidad y el volumen de las cadenas laterales del CFIS, junto con las interacciones de van der Waals entre elementos de estructura secundaria intervienen de forma muy notable en la estabilización de la proteína.

Entre los diferentes aminoácidos alifáticos que pertenecen al CFIS C-terminal, la Val108 es el residuo más importante para preservar la integridad estructural del estado nativo. Las sustituciones en esta posición causan pequeñas alteraciones conformacionales y una gran desestabilización de la proteína (por ejemplo, el punto medio de la transición de desnaturalización por presión y por temperatura de la variante V108G disminuye unos 592 MPa y 25°C, respectivamente, respecto a la proteína salvaje).

De acuerdo con los resultados obtenidos, la variante Y115W ofrece una sonda útil para seguir la cinética de plegamiento/desplegamiento de la RNasa A.

SUMMARY

To analyze the contribution of the postulated carboxy terminal chain-folding initiation site (CFIS 106-118) on ribonuclease A stability, the aliphatic side chains in this region were progressively truncated using site-directed mutagenesis. Most amino acid substitutions were designed to be non-disruptive deletions of methyl and methylene groups. In addition, replacement of Tyr 115 with Trp was designed for its potential as a unique and non-destabilizing fluorescent label of conformational changes local to the region.

Steady-state kinetic parameters for the enzyme reaction, FTIR and CD spectra of each RNase A variant indicate that amino acid replacements performed in this region have, in general, little or no effect on the native structure and function of the enzyme.

Fourth derivative UV absorbance, fluorescence (for the Trp variant) and Fourier transform infrared spectroscopy were used to detect and characterize the conformational transitions of each variant, as a function of both pressure and temperature. The results were compared with those presented for the wild-type protein. To further determine the unfolding properties of the Y115W variant, the unfolding transitions induced by urea of RNase A wild-type and Y115W variant, were examined by urea gradient gel electrophoresis and fluorescence spectroscopy.

Interestingly, conformational changes resulting from pressure denaturation do not differ considerably from those obtained during temperature treatment. Simple two-state, reversible unfolding transitions were observed, suggesting that the disruption of tertiary and secondary structure of each protein at high pressure or temperature is strongly cooperative. Spectral changes occur at about the same values using both low- and high-protein concentration regime techniques, indicating that the observed unfolding events are intramolecular, and that breakdown of the tertiary and secondary structures occurs concomitantly.

The results obtained reveal that hydrophobicity and volume of the CFIS side chains, together with van der Waals interactions between secondary structural elements play an important role in stabilizing the protein.

Among the aliphatic amino acids belonging to the C-terminal CFIS, V108 is the most critical residue. Replacements performed in this site cause small conformational differences in the native state, and a dramatic destabilization of the protein (i.e. the pressure and temperature midpoint denaturation values of the V108G variant decrease by 592 MPa and by 25°C, respectively, relative to the wild-type RNase A).

According to the results obtained in the current study, the Y115W labeled variant offers a useful probe for the folding/unfolding kinetics.

1. Introducció

1.1. La ribonucleasa A

La informació genètica, que finalment s'expressa en forma de proteïnes, està xifrada en la molècula de DNA en la majoria d'organismes. El flux d'informació a través de l'RNA és essencial per a la vida tal i com la coneixem. Aquest flux està controlat principalment per dos tipus d'enzims: les RNA polimerases que catalitzen la síntesi de noves molècules d'RNA i les RNA depolimerases, més conegudes amb el nom de ribonucleases (RNases), que en catalitzen la degradació.

Aquesta activitat ribonucleolítica s'ha trobat que és particularment elevada en el pàncrees dels rumugants, probablement per tal de digerir la gran quantitat d'RNA produït per la microbiota del rumen (Barnard, 1969). Aquests elevats nivells d'activitat i l'estabilitat de l'enzim responsable van conduir a la identificació (Jones, 1920) i, més tard, a la caracterització de la ribonucleasa pancreàtica bovina. La forma predominant en el pàncrees boví la constitueix la ribonucleasa A (RNasa A; EC 3.1.27.5) que és la forma no glicosilada. Aquesta es pot separar cromatogràficament

de les formes B, C i D, cadascuna d'elles formada per una barreja de glicofomes del mateix enzim (Plummer, 1968; Baynes i Wold, 1970; Liang i col., 1980; Rudd i col., 1992; Fu i col., 1994).

L'RNasa A ha estat el model de molts estudis sobre plegament, estabilitat, química de proteïnes, enzimologia i evolució molecular. Aquests estudis han estat recollits en gran quantitat de revisions entre les que es poden destacar: Barnard, 1969; Richards i Wyckoff, 1971; Karpeisky i Yakovlev, 1981; Blackburn i Moore, 1982; Wlodawer, 1985; Beintema, 1987; Eftink i Biltonen, 1987; Beintema i col., 1988; Parés i col., 1991; Cuchillo i col., 1997; Neira i Rico, 1997; Raines, 1998.

1.1.1. La producció heteròloga

Gràcies al desenvolupament de les tècniques de DNA recombinant, ha estat possible l'expressió heteròloga de l'RNasa A, previ clonatge del seu gen (o del cDNA). L'expressió heteròloga ha possibilitat una purificació de la proteïna sovint més ràpida i amb millors rendiments que quan es parteix del teixit original. Sobretot però, el fet de tenir el gen de l'RNasa A clonat en un vector adequat, i per tant manipulable, i que aquest gen pugui expressar-se de manera heteròloga, ha permès provar el paper de determinats grups funcionals de la proteïna per mitjà de substitucions dirigides dels seus residus i de l'anàlisi de les conseqüències d'aquests canvis (per una referència general sobre l'enginyeria de proteïnes vegeu Matouscheck i Fersht, 1991).

La producció heteròloga de l'RNasa A va plantejar, de bon començament, certa dificultat a causa de diferents motius. D'una banda, el cDNA de l'RNasa A és difícil de clonar, perquè l'RNA corresponent s'ha d'aïllar intacte del pàncrees, el qual és un òrgan ric en ribonucleases (Chirgwin i col., 1979). D'altra banda, una vegada clonat i expressat el gen que codifica per l'RNasa A sorgeixen dos altres entrebancs: en primer lloc, l'RNasa A nativa en grans quantitats és citotòxica i en segon lloc, l'RNasa A desplegada és susceptible a un procés de proteòlisi (en aquest sentit, s'ha de destacar que la major part dels processos de purificació de la proteïna recombinant impliquen etapes de desnaturalització i reducció de la proteïna nativa). Aquests fets van dificultar l'obtenció de variants de l'RNasa A, la qual cosa va obstaculitzar inicialment els estudis funcionals i estructurals utilitzant tècniques de mutagènesi dirigida d'un dels enzims dels que es disposava de més informació. Així doncs, la comprovació d'algunes de les hipòtesis sobre la participació de determinats residus aminoacídics en la catàlisi, en la interacció del substrat o en els processos de plegament, no ha estat possible fins que no s'han obtingut sistemes eficients de clonatge i expressió de l'RNasa A.

El primer sistema heteròleg dirigit cap a l'expressió de l'RNasa A es va basar en la síntesi d'un gen que codificava per la proteïna (anteriorment Nambiar i col. (1984) havien sintetitzat un gen que codificava per la proteïna S, fracció inactiva de l'RNasa A que correspon als residus 21 a 124) i en l'expressió d'aquest gen en *Escherichia*

coli per tal de produir una proteïna de fusió associada a la β -galactosidasa (Nambiar i col. 1987). Aquest mètode presentava rendiments molt baixos. Posteriorment, McGeehan i Benner (1989) clonaren el mateix gen sintètic de l'RNasa A (Nambiar i col., 1987) darrera del promotor λ , el qual estava controlat per un repressor sensible a la temperatura. Per bé que el rendiment d'aquest mètode era superior a l'anterior, l'RNasa A produïda presentava una formilmetionina en l'extrem N-terminal. Schein i col. (1992) van insertar la seqüència codificant per un pèptid senyal d'exportació al sistema abans esmentat que va permetre dirigir l'enzim madur i actiu al periplasma. Aquesta modalitat permetia recuperar aproximadament uns 5 mg d'RNasa A soluble per cada litre de cultiu.

El gen codificant per l'RNasa A fou clonat per Carsana i col. (1988). Aquests autors van identificar l'existència d'una regió codificant per un prepeptid de 26 residus que seria el responsable de la secreció de l'RNasa A en les cèl·lules pancreàtiques exocrines. La clonació del gen (Carsana i col., 1988) i del cDNA (Raines i Rutter, 1989) va permetre l'expressió, inicialment per mitjà de sistemes que obtenien un rendiment relativament baix, tant en *E. coli* (Schultz i Baldwin, 1992; Tarragona-Fiol i col., 1992; Laity i col., 1993), com en *Bacillus subtilis* (Vasantha i Fipula, 1989) o en *Saccharomyces cerevisiae* (Raines i Rutter, 1989; Raines, 1991; delCardayré i col., 1995).

El pas que ha comportat un avenç més significatiu en la producció heteròloga de l'RNasa A ha estat la utilització dels sistemes pET (Studier i col., 1990). Aquests utilitzen el promotor de l'RNA polimerasa de T7 per dirigir l'expressió dels gens clonats. Les proteïnes resultants sovint s'agreguen en forma de cossos d'inclusió a causa de la gran quantitat de proteïna que s'obté per mitjà d'aquest sistema. Gràcies al fet que l'RNasa A és fàcil de solubilitzar i de replegar, la formació de cossos d'inclusió no suposa cap inconvenient. Al contrari, la formació d'aquests cossos és avantatjosa, ja que aquests són fàcils d'aïllar i contenen la proteïna d'interès de forma quasi pura. A més, l'RNasa A desplegada en cossos d'inclusió no té activitat ribonucleolítica i per consegüent tampoc presenta citotoxicitat. Utilitzant el sistema pET, s'ha obtingut l'RNasa A que és idèntica a l'aïllada directament del pàncrees boví amb un rendiment aproximat d'uns 50 mg per litre de cultiu (delCardayré i col., 1995).

Okorokov i col. (1995) i Panov i col. (1996) van desenvolupar un sistema per a l'obtenció d'RNasa A madura en el periplasma d'*E. coli* que utilitza el pèptid senyal de la fosfatasa alcalina i el promotor de λ P_R . El rendiment final d'aquest mètode és de 40 mg de proteïna per litre de cultiu. Actualment doncs, els sistemes pET i λ P_R permeten obtenir quantitats suficients de variants de l'RNasa A per a la seva caracterització.

1.1.2. Estructura i funció

1.1.2.1. *Un punt de referència*

L'RNasa A va ésser cristal·litzada per primera vegada ara fa aproximadament 60 anys (Kunitz, 1939; Kunitz, 1940). Els cristalls que es van obtenir difractaven a una resolució de 2 Å (Fankuchen, 1941). L'RNasa A és el primer enzim i la tercera proteïna que es va seqüenciar completament (Hirs i col., 1960; Smyth i col., 1963) i el tercer enzim i la quarta proteïna de la qual es va determinar l'estructura tridimensional per mitjà d'estudis de cristal·lografia i difracció de raigs X (Kartha i col., 1967). L'RNasa A ha estat utilitzada com a proteïna model en estudis de ressonància magnètica nuclear a fi de dilucidar l'estructura proteica (Saunders, 1957) i els camins de plegament proteic (Udgaonkar i Baldwin, 1988). L'estructura tridimensional de la proteïna en solució ha estat resolta per ressonància magnètica nuclear (Rico i col., 1989; Robertson i col., 1989; Rico i col., 1991; Rico i col., 1993; Santoro i col., 1993). Actualment, han estat dipositades en el Brookhaven Protein Data Bank (www.pdb.bnl.gov) més de 70 col·leccions de coordenades tridimensionals relacionades amb l'RNasa A.

1.1.2.2. *L'estructura*

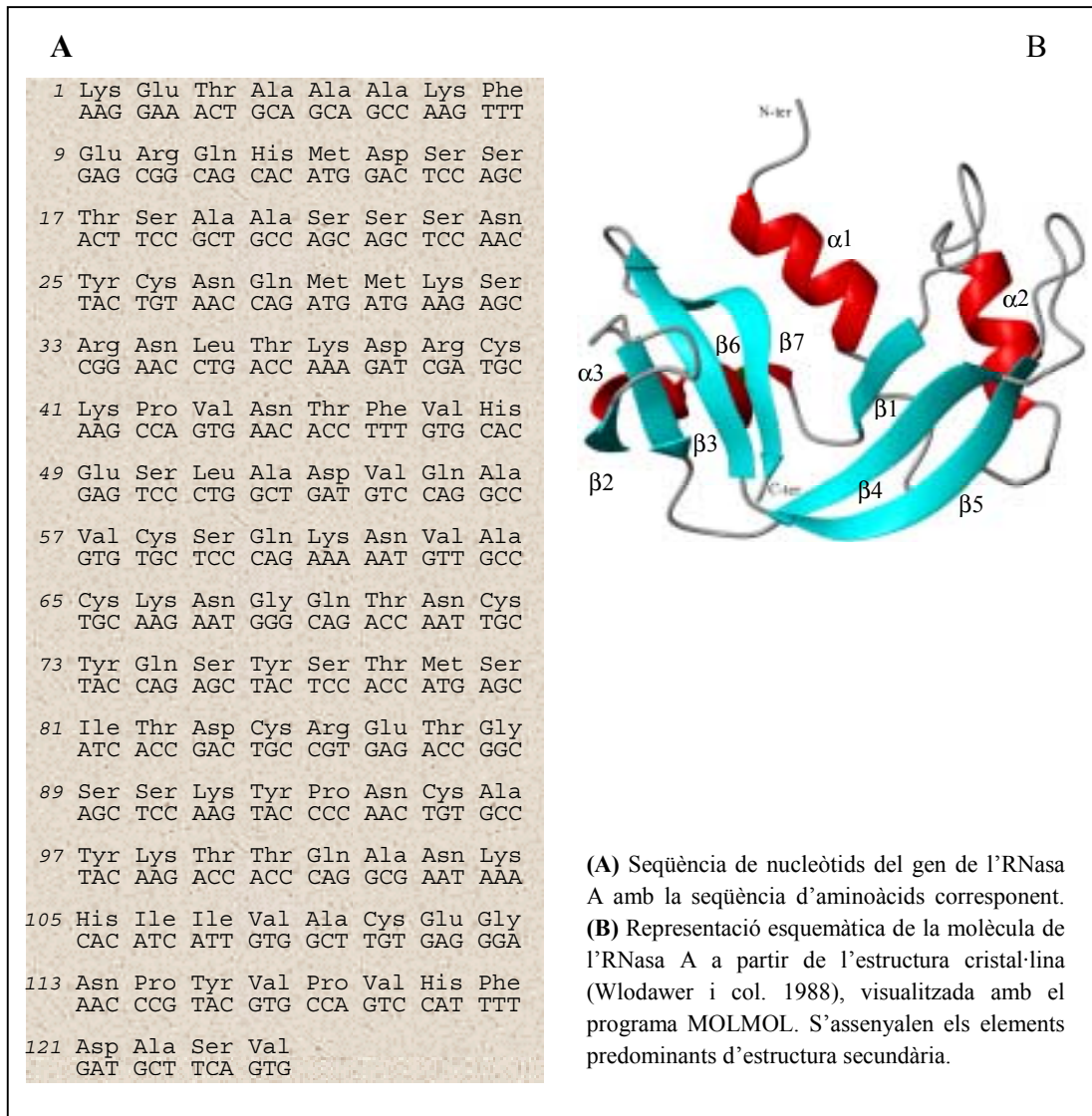
L'RNasa A, una vegada madura, està constituïda per una única cadena polipeptídica de 124 residus (la seva estructura primària es presenta a la FIGURA 1.1) amb una massa molecular de 13.686 Da i un pI de 9.6 (Anfinsen i col., 1952; Smyth i col., 1963). Conté 19 dels 20 aminoàcids estàndards, mancant-li només el triptòfan. La fórmula molecular de la proteïna nativa, no carregada, és $C_{575}H_{907}N_{171}O_{192}S_{12}$. Donat que és una proteïna petita, l'RNasa A va esdevenir la primera proteïna a ésser sintetitzada de manera íntegra (Gutte i Merrifield, 1969).

En l'estat natiu, l'RNasa A té una forma globular arronyonada, amb els residus del centre actiu disposats al llarg de la depressió. Els elements predominants d'estructura secundària són: una àmplia regió tipus full plegat β , formada per cadenes antiparal·leles (β_1 : 43-47; β_2 : 61-63; β_3 : 72-74, β_4 : 79-86; β_5 : 97-104; β_6 : 106-111; i β_7 : 116-123), i tres regions hèlix- α curtes (α_1 : 3-13; α_2 : 24-34; i α_3 : 50-60) (FIGURA 1.1). Conté vuit residus de cisteïna que formen 4 ponts disulfur intracatenaris entre les posicions 26-84, 40-95, 58-110, i 65-72. Té quatre residus de prolina: Pro42, Pro93, Pro114 i Pro117. Els enllaços peptídics que precedeixen els residus Pro93 i Pro114 estan en conformació *cis*. Aquests dos residus de prolina es troben en girs d'inversió de tipus VI (Chou i Fasman, 1977) en els costats oposats de la proteïna nativa.

La determinació de l'estructura cristal·lina de complexos covalents i no covalents entre l'enzim i àcids nucleics que actuen com a anàlegs de substrat (normalment desoxiribonucleòtids), ha facilitat l'estudi de la funció de l'RNasa A (McPherson i

col., 1986a,b; Aguilar i col., 1991; Aguilar i col., 1992; Birdsall i McPherson, 1992; Fontecilla-Camps i col., 1994; Zegers i col., 1994; Boqué i col., 1994, Boqué i col., 1998). Les estructures de l'RNasa A i els seus complexos resoltes per estudis de difracció de raigs X i ressonància magnètica nuclear han estat recollides en revisions recents (Gilliland, 1997; González i col., 1997).

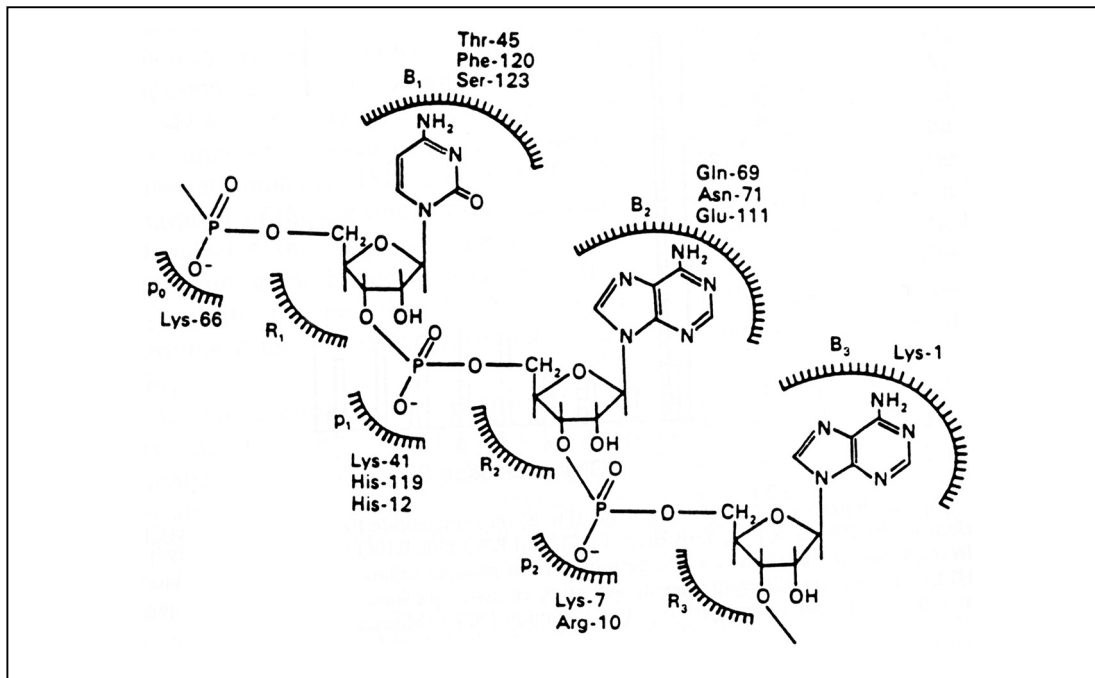
FIGURA 1.1



1.1.2.3. La interacció enzim-substrat i l'activitat catalítica

Estudis estructurals i funcionals han proposat i demostrat l'existència de diferents subetis enzimàtics que contribueixen a la unió del substrat polimèric (FIGURA 1.2).

FIGURA 1.2



Representació esquemàtica de la interacció d'un fragment d'RNA amb l'RNasa A. B, R i p fan referència als subsetis per a la fixació de bases, riboses i fosfats, respectivament. B₁ és específic per pirimidines i B₂ prefereix purines. Els mononucleòtids 3'-pirimidina interaccionen a B₁R₁p₁ i els mononucleòtids 5'-purina interaccionen a B₂R₂p₁. Els 3'-AMP interaccionen a B₂R₂p₂. El grup fosfat de l'enllaç fosfodiester hidrolitzat per l'enzim interacciona a p₁. S'indiquen els residus que podrien participar en cada subseti. Reproduït de Parés i col. (1991).

Segons la nomenclatura introduïda per Richards i Wyckoff (1971), B, R i p fan referència als subsetis per a la fixació de bases, riboses i fosfats, respectivament. Es defineix p₁ com el subseti catalític on es troba el grup fosfat de l'enllaç fosfodiester que s'escindeix i B₁R₁ com el subseti principal específic per pirimidines (posició 3' respecte a l'enllaç fosfodiester que s'escindeix). A més, donat que l'enzim mostra preferència per nucleòtids de purina en la posició 5', s'ha definit un subseti secundari anomenat B₂R₂. De la mateixa manera, s'han proposat altres subsetis d'unió de grups fosfats a més de p₁, tal i com s'indica més endavant.

Els treballs on s'ha estudiat la participació dels diferents subsetis de l'RNasa A han estat revisats recentment per Cuchillo i col. (1997), Gilliland (1997) i Nogués i col. (1998).

Tres dels subsetis (B₁, B₂ i B₃) interaccionen amb les bases del substrat que s'uneix amb l'enzim. Tal i com s'ha esmentat, el subseti B₁ és específic per pirimidines (McPherson i col., 1986; Aguilar i col., 1992) i presenta preferència per citosina. Al contrari, els subsetis B₂ i B₃ s'uneixen a totes les bases, per bé que B₂ té preferència per purines i en especial per adenina (Kato i col., 1986) i B₃ té

preferència per purines (Rushizky i col., 1961; Irie i col., 1984a; Parés i col., 1980; Boqué i col., 1994).

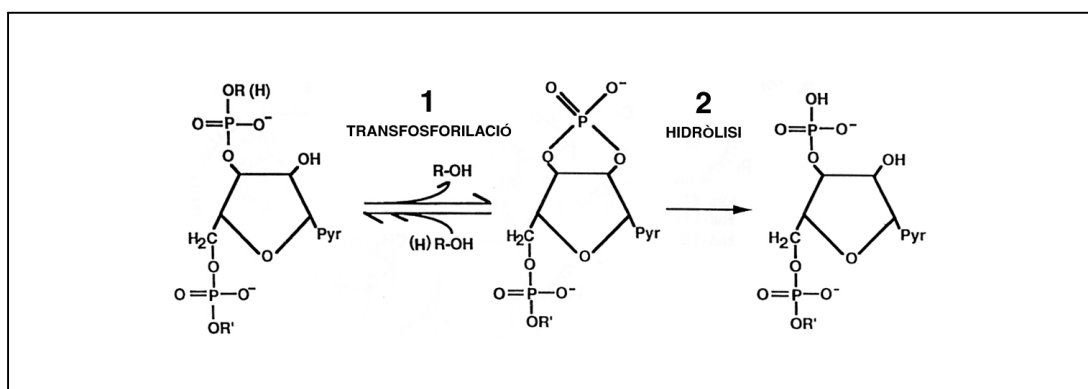
Els subsetis p_0 , p_1 i p_2 interaccionen amb els grups fosfat del substrat que s'uneix amb l'enzim. Els més ben caracteritzats són p_0 i p_2 , els quals es troben adjacents al subseti catalític en la direcció 5' i en la direcció 3', respectivament. Ambdós subsetis van ser postulats respectivament per Mitsui i col. (1978) i Parés i col. (1980).

L'eficiència catalítica de l'RNasa A s'incrementa amb la longitud de la cadena de l'oligonucleòtid (Irie i col., 1984a,b). El coneixement que es té de l'estructura i localització dels subsetis d'unió a fosfats, així com de les propietats cinètiques de l'enzim, demostren que la millor eficiència catalítica observada pels substrats d'elevat pes molecular s'origina per la unió múltiple i cooperativa del substrat amb l'enzim (Moussaoui i col., 1996; Cuchillo i col., 1997).

Els residus més importants dels diferents subsetis han estat identificats per mitjà d'estudis cinètics, estudis de modificació química, estudis de complexos de l'RNasa A amb diversos anàlegs de substrat i també per mutagènesi dirigida. Aquests residus s'indiquen a la FIGURA 1.2. Tots aquests treballs es troben detallats a la revisió de Nogués i col. (1998).

L'RNasa A catalitza l'escissió de l'enllaç P-O^{5'} de l'RNA per mitjà d'una reacció de transfosforilació des de la posició 5' d'un nucleòtid a la posició 2' del nucleòtid adjacent, formant-se un extrem 2',3'-fosfat cíclic i un extrem 5'-OH lliure; i una reacció d'hidròlisi del fosfodièster cíclic, concretament de l'enllaç P-O^{2'} del nucleòsid 2',3'-fosfat cíclic (N>p), formant-se un grup 3'-fosfat terminal (FIGURA 1.3). En el mecanisme de catàlisi hi intervenen principalment la cadena lateral de l'His12 i de l'His119 (Findlay i col., 1961).

FIGURA 1.3



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

En la reacció de transfosforilació, el grup imidazole de l'His12 actua com a base, mentre que el grup imidazole de l'His119 té un paper complementari, actuant com a àcid. Després de catalitzar la transfosforilació, cada residu d'histidina en el centre actiu de l'RNasa A està protonat de manera apropiada per catalitzar la hidròlisi de l'intermediari cíclic. No obstant, no és correcte considerar ambdues reaccions com un procés seqüencial, amb la formació d'un intermediari associat a l'enzim, sinó que els productes de la reacció de transfosforilació són alliberats al solvent. La hidròlisi de l'intermediari cíclic no té lloc mentre es trobin substrats d'aquesta primera reacció (Cuchillo i col., 1993). En la reacció d'hidròlisi, les funcions de les histidines es capgiren, de manera que la hidròlisi s'hauria de considerar com un procés equivalent a la reacció inversa de la transfosforilació (Cuchillo i col., 1993).

La catàlisi dels substrats CpX i C>p és dues vegades més ràpida que la dels corresponents substrats amb uracil (Richards i Wyckoff, 1971). El substrat poli(C) és fragmentat aproximadament unes 20 vegades més ràpid que el poli(U) (delCardayré i Raines, 1994; Sorrentino i Libonati, 1994). L'RNasa A també catalitza l'escissió de poli(A), per bé que amb una eficiència $10^3 - 10^4$ vegades inferior que en poli(U) (delCardayré i Raines, 1994; Sorrentino i Libonati, 1994). Les causes d'aquesta especificitat de substrat van ser estudiades per delCardayré i Raines (1994, 1995) mitjançant la tècnica de mutagènesi dirigida.

L'RNasa A està considerada un enzim distributiu donat que quan s'uneix a un substrat polimèric, catalitza una reacció química, i allibera un producte polimèric en el solvent. Cap dels polímers poli(C), poli(U) i poli(A) són fragmentats de manera processiva per l'RNasa A salvatge. El comportament distributiu de la RNasa A probablement és degut a les especificitats del subseti B₁ (que no s'uneix a adenina) (McPherson i col., 1986a; Aguilar i col., 1992) i dels subsetis B₂ i B₃ (amb poca preferència per citosina i uracil) (Rushizky i col., 1961; Irie i col., 1984a; Katoh i col., 1986).

Es coneixen moltes molècules de mida petita que actuen com a inhibidors de l'activitat catalítica de l'RNasa A. L'inhibidor més interessant des del punt de vista biològic, anomenat inhibidor de ribonucleasa (RI), és una proteïna de 50 KDa que es troba en el citosol de les cèl·lules de mamífer (Blackburn i Moore, 1982; Roth, 1967). L'RI probablement protegeix l'RNA citosòlic de l'acció ribonucleolítica de les ribonucleases secretores provinents del torrent circulatori. S'ha observat que una de les característiques comunes entre les proteïnes homòlogues a l'RNasa A amb propietats citotòxiques és, precisament, llur capacitat d'evadir l'acció inhibidora de l'RI. L'RI ha estat objecte de revisions diverses: Lee i Vallee (1993), Hofsteenge (1997).

1.1.3. Estabilitat i plegament

L'estabilitat de l'RNasa A ha estat abastament reconeguda. S'ha de destacar que el procediment clàssic de purificació de l'RNasa A a partir del pàncrees boví ja es fonamentava en el fet que la proteïna manté la seva integritat i solubilitat sota condicions extremes (Kunitz i McDonald, 1953). El fet de conèixer, emprant l'RNasa A com a exemple, que l'estructura tridimensional de les proteïnes està totalment codificada per la seva seqüència d'aminoàcids (Sela i col., 1957; White i Anfinsen, 1959; Anfinsen i col., 1961; Haber i Anfinsen, 1961; White, 1961), va suposar que l'RNasa A es convertís en un dels models preferits a fi d'assajar nous mètodes per a l'estudi del plegament proteic.

No obstant això, la presència de quatre ponts disulfur i l'existència, en l'estat natiu, de dos enllaços peptídics X-Pro en conformació *cis*, han complicat l'anàlisi del seu camí de plegament. A més, tal com s'ha comentat, fins fa poc no era possible l'expressió amb rendiments suficients de l'RNasa A salvatge o de variants d'aquesta, obtingudes a partir de mutagènesi dirigida, com per dur a terme aquests estudis.

En els estudis d'estabilitat i plegament de l'RNasa A, la desnaturalització de la proteïna s'ha produït principalment per acció de reactius químics, com ara la urea que trenca els ponts d'hidrogen; de diversos reductors que fan el mateix amb els ponts disulfur; d'àcids i bases que actuen sobre els enllaços de tipus iònic; de la calor, la qual també trenca els enllaços pont d'hidrogen.

El desplegament de l'RNasa A per alta pressió ha atret l'interès de molts investigadors, essent un camp captivador per les expectatives que ofereix (Brandts i col., 1970; Hawley, 1971; Takeda i col., 1995; Tamura i Gekko, 1995; Zhang i col., 1995).

En l'estudi del plegament de l'RNasa A s'han utilitzat com a punts de partida, o bé la proteïna reduïda o bé la proteïna nativa (amb els quatre ponts disulfur nadius intactes). Els estudis del plegament amb l'enzim reduït s'han centrat en la formació dels ponts disulfur, mentre que els estudis del plegament amb la proteïna nativa s'han basat principalment en la isomerització dels enllaços peptídics X-Pro, els quals donen lloc a etapes de plegament lent. Aquest i altres aspectes del plegament de l'RNasa A han estat revisats recentment per Cuchillo i col., (1997) i Neira i Rico (1997).

La major part de les dades experimentals s'han obtingut a partir d'estudis del plegament/desplegament de proteïnes *in vitro*. Tanmateix, *in vivo* encara no són clares algunes qüestions sobre la relació temporal entre la biosíntesi del polipèptid al ribosoma i el seu plegament. Se sap que hi ha proteïnes que catalitzen el procés de plegament en la cèl·lula. Si bé és cert que algunes proteïnes són capaces d'autoplegar-se, la visió actual és que la majoria necessiten l'ajuda d'altres proteïnes amb les quals interaccionen transitòriament durant l'adquisició de l'estructura tridimensional definitiva. Aquestes són les proteïndisulfur isomerasas, que participen

en la formació d'enllaços disulfur, les peptidil prolil isomerasas, que catalitzen la isomerització *cis-trans* dels enllaços peptídics de Pro, i d'altres proteïnes, anomenades en general *molecular chaperons*, que acceleren el procés de plegament i potser ajuden a reparar proteïnes danyades o plegades incorrectament. La funció bàsica de les *molecular chaperons* seria, doncs evitar les interaccions indesitjables d'un polipèptid sense plegar amb ell mateix i amb la resta de proteïnes cel·lulars.

1.1.3.1. *La formació dels ponts disulfur*

La caracterització dels intermediaris de plegament, malgrat llur naturalesa transitòria, resulta un mitjà adient per tal de conèixer els camins de plegament de les proteïnes (Kim i Baldwin, 1990; Matthews, 1993; Ptitsyn, 1995; Houry i col., 1995; Li i col 1995). Quan el plegament d'una proteïna està vinculat a la formació dels enllaços pont disulfur, aquest es pot estudiar per mitjà de l'aïllament i caracterització dels intermediaris que es formen en el camí o camins de regeneració (Hantgan i col., 1974; Creighton, 1979; Scheraga i col., 1984; Rothwarf i Scheraga 1993 a-d; Li i col., 1995).

Durant el plegament oxidatiu de l'RNasa A completament desplegada i reduïda es generen un gran nombre d'intermediaris (763 intermediaris possibles), els quals poden ésser dividits en 5 grans grups (R, 1S, 2S, 3S i 4S) segons el nombre de ponts disulfur que contenen. La regeneració de l'RNasa A té lloc a través de dos camins de plegament paral·lels que condueixen a la formació de dos intermediaris: des-[65-72] i des-[40-95]. Ambdós intermediaris tenen tres ponts disulfur. Els manca el pont disulfur 65-72 i 40-95, respectivament (Rothwarf i Scheraga, 1991a; Rothwarf i col., 1995 i 1998a,b).

Estudis estructurals per ressonància magnètica nuclear de les variants de l'RNasa A [C65S, C72S] i [C40A, C95A], les quals es van dissenyar per simular els intermediaris de plegament des-[65-72] i des-[40-95], respectivament, han demostrat que la conformació global d'aquestes proteïnes variants era semblant a la de la proteïna salvatge. No obstant això, aquestes variants eren menys estables que la proteïna salvatge i presentaven petites variacions de l'estructura al voltant de la regió on es van portar a terme les substitucions abans esmentades (Shimotakara i col., 1997; Laity i col., 1997). També es van obtenir les variants de l'RNasa A [C26S, C84S] i [C58A, C110A]. Considerant que aquestes variants eren més inestables enfront de la temperatura que la proteïna salvatge i enzimàticament inactives a temperatura ambient, es provava la importància dels ponts disulfur 26-84 i 58-110 en l'estabilitat de l'estat natiu dels intermediaris des-[65-72] i des-[40-95].

Recentment, Klink i col. (2000) han suggerit que els dos enllaços pont disulfur terminals en la seqüència d'aminoàcids (26-84 i 58-110), els quals enllacen una hèlix α amb una full plegat β en el nucli hidrofòbic, són més crítics per a l'estabilitat de la proteïna que els altres dos (40-95 i 65-72) que connecten dos girs d'inversió superficials. L'eliminació de qualsevol dels dos ponts disulfur terminals redueix uns 40°C la termostabilitat de la proteïna. Tanmateix convé ressaltar que, si bé els ponts

disulfur 40-95 i 65-72 són menys importants per preservar l'estabilitat de la proteïna, aquests presenten, segons els mateixos autors, una importància cabdal per sostenir l'activitat catalítica.

Xu i col. (1996) van identificar intermediaris de plegament que contenen un sol pont disulfur. Es va observar que les poblacions de cadascuna de les quatre espècies amb un pont disulfur natiu, 26-84, 40-95, 58-110 o 65-72, eren més nombroses que no pas les poblacions esperades si la formació dels ponts disulfur hagués tingut lloc a l'atzar. Per consegüent, es va suggerir que certes interaccions locals promouien la formació d'aquests ponts disulfur nadius. D'acord amb això, es va observar que el 40% de les espècies amb un únic pont disulfur contenen el pont disulfur natiu 65-72.

Malgrat el coneixement que es té de les espècies amb un o tres ponts disulfur, se sap molt poc sobre la distribució d'aquests enllaços covalents dins del grup d'espècies amb 2 ponts disulfur. Es desconeix si la preferència per formar el pont disulfur 65-72, fa que aquest persisteixi al llarg del procés de plegament. Tot i que s'ha proposat que els intermediaris que contenen el pont disulfur 65-72 poden jugar un paper important a l'hora d'obtenir l'intermediari des-[40-95] (Xu i col., 1996), els camins de plegament poden comprendre altres intermediaris mancats del pont disulfur 65-72 que condueixin a la formació de l'intermediari des-[65-72]. Atès que el plegament oxidatiu de l'RNasa A probablement d'inicia a través de múltiples camins que comprenen un gran nombre d'intermediaris, no s'ha pogut aïllar ni caracteritzar cap membre de les 210 espècies possibles amb 2 ponts disulfur. Considerant que els ponts disulfur 26-84 i 58-110 són importants per estabilitzar els intermediaris des-[65-72] i des-[40-95], semblaria lògic pensar que un intermediari amb dos ponts disulfur hauria de contenir aquests ponts disulfur abans esmentats. Es creu que durant el procés de desplegament per reducció de la proteïna salvatge (Li i col., 1995), es formaria l'intermediari que conté els ponts disulfur nadius 26-84 i 58-110. S'ha vist que la reducció de l'RNasa A salvatge amb DTT^{red} també té lloc al llarg de dos camins paral·lels que inclouen la reducció dels ponts disulfur 65-72 o 40-95, la qual cosa condueix a la formació dels intermediaris amb tres ponts disulfur des-[40-95] i des-[65-72], respectivament (Li i col., 1995). La formació d'aquests intermediaris constitueix l'etapa limitant del desplegament, i es va suggerir que en el procés de reducció de l'RNasa A, en comptes d'un desplegament global de tota la proteïna, tenia lloc un desplegament local.

Així doncs, s'ha de destacar que en els camins de regeneració principals de l'RNasa A, a pH 8.0 i 25°C, tots els intermediaris de l'estat pre-transició (R, 1S, 2S, 3S i 4S) estan estructuralment desordenats i aquests assoleixen un estat estable després d'un cert temps de regeneració (Rothwarf i Scheraga, 1993a-d). Les etapes limitants són les reorganitzacions que tenen lloc en la transició de 3S als intermediaris des-[65-72] i des-[40-95] (Rothwarf i col., 1998aib). Convé ressaltar que 1S, 2S, 3S i 4S són, cadascun, grups de diversos intermediaris amb el mateix nombre de ponts disulfur, i que des-[65-72] i des-[40-95] són dos intermediaris post-transició que es generen després de l'etapa limitant i que es pleguen ràpidament cap a l'estat natiu (N) (Rothwarf i col., 1998aib).

1.1.3.2. La isomerització dels enllaços peptídics X-Pro

Les prolines s'uneixen al residu que les precedeix (X-Pro) per mitjà d'un enllaç imida. Aquest enllaç fa que el grup peptídic X-Pro tingui isòmers *trans* i *cis* amb una energia gairebé equivalent (Zimmerman i Scheraga, 1976). La relació entre les poblacions d'aquests isòmers per la prolina, en pèptids petits i proteïnes desplegadas, és aproximadament de 3:1 (*trans:cis*) (Grathwohl i Wüthrich, 1981). En canvi, aquesta relació per la resta d'aminoàcids és superior a 100:1 (LaPlanche i Rogers, 1964; Zimmerman i Scheraga, 1976; Stewart i col., 1990). Quan una proteïna desplegada se sotmet a condicions de plegament, generalment les seves prolines adopten un únic estat isomèric final, per bé que algunes proteïnes mostren heterogeneïtat isomèrica fins i tot en l'estat natiu (Raleigh i col., 1992). La isomerització de les prolines anomenades essencials (Schmid i Baldwin, 1978) és un procés lent que, tot i que té lloc després del procés de plegament conformacional, alenteix l'assoliment de l'estat natiu de la proteïna (Kim i Baldwin, 1990).

Des de fa temps, l'RNasa A amb els ponts disulfur nadius intactes ha estat un sistema model per tal d'estudiar la relació entre la isomerització dels enllaços X-Pro i el plegament conformacional (Neira i Rico, 1997). En aquests estudis s'han observat diverses fases de replegament. L'heterogeneïtat en l'estat desplegat s'origina a causa de la isomerització *cis-trans* dels enllaços peptídics X-Pro (Brands i col., 1975; Cook i col., 1979; Schmid, 1982; Schmid i col., 1986). En l'estat natiu de l'RNasa A, dos dels enllaços peptídics X-Pro (Tyr92-Pro93 i Asn113-Pro114) estan en la conformació *cis*, mentre que els altres dos enllaços (Lys41-Pro42 i Val116-Pro117) estan en la conformació *trans* (Wlodawer i Sjölin, 1983; Wlodawer i col., 1988). Durant el desplegament, tots quatre enllaços peptídics X-Pro isomeritzen i assoleixen un equilibri entre aproximadament un 30% *cis* i un 70% *trans*. La isomerització entre les conformacions *trans* i *cis* és un procés lent i pot esdevenir una etapa limitant del plegament (Brandts i col., 1975).

Utilitzant tècniques *double-jump* i variants de l'RNasa A amb els residus de prolina substituïts per residus d'alanina, es va observar que tres prolines eren essencials per l'heterogeneïtat cinètica de l'RNasa A: Pro93, Pro114 i Pro117 (Dodge i col., 1994; Dodge i Scheraga, 1996). La isomerització *cis-trans* d'aquests enllaços peptídics X-Pro sota condicions desnaturalitzants dóna lloc a vuit espècies desplegadas, les quals han estat organitzades en un "*box model*" que associa aquests vuit estats isomèrics de les 3 prolines essencials sota condicions de desplegament amb les cinc fases de replegament observades (Houry i col., 1994; Dodge i Scheraga, 1996; Houry i Scheraga, 1996a,b; Juminaga i col., 1997). En aquest model, l'RNasa A nativa es desplega de manera ràpida per formar l'espècie de replegament molt ràpid (U_{vf}), la qual reté els enllaços peptídics X-Pro en la conformació nativa. Tot seguit, des de l'espècie U_{vf} , té lloc la isomerització *cis-trans* dels enllaços peptídics X-Pro. Consegüentment, es formen altres espècies desplegadas: U_f , U_m , U_S^{II} i U_S^I , les quals corresponen a les fases de replegament ràpid, mitjà, lent majoritari i lent minoritari, respectivament.

S'ha estudiat en detall el replegament d'algunes espècies desplegadas. El replegament de l'espècie U_{vf} és un procés molt ràpid regit per un col·lapse hidrofòbic, cosa que porta a la formació d'un intermediari *molten-globule* parcialment plegat (I_0) (Houry i col., 1995; Houry i Scheraga, 1996a,b). El replegament de l'espècie U_S^{II} inclou un intermediari amb enllaços d'hidrogen (I_1), el qual forma tot seguit un intermediari similar a l'estat natiu (I_N). El replegament de l'intermediari I_N , per tal d'obtenir l'estructura nativa (N), constitueix una etapa limitant a causa de la isomerització *cis-trans* de com a mínim un enllaç peptídic X-Pro (Cook i col., 1979; Schmid i Baldwin, 1979; Kim i Baldwin, 1980; Schmid i Blaschek, 1984; Udgaonkar i Baldwin, 1988, 1990, 1995). Estudis més recents (Juminaga i col., 1997, 1998) han permès identificar la isomerització de l'enllaç peptídic X-Pro93 com la responsable de la distinció de les espècies de replegament lent (U_S^{II} i U_S^I) de les altres espècies de replegament més ràpid (U_{vf} , U_f i U_m). Això implica que l'enllaç peptídic X-Pro93 isomeritza en les reaccions de replegament lent $U_S^I \rightarrow N$ i $I_N \rightarrow N$. De manera similar, la Pro114 sembla discriminar entre les espècies de replegament molt ràpid (U_{vf}) i les espècies de replegament ràpid (U_f). Finalment, la Pro117 podria diferenciar les espècies majoritàries de replegament lent (U_S^{II}) de les espècies minoritàries de replegament lent (U_S^I), així com també permetria distingir les espècies de replegament mitjà (U_m) de les espècies de replegament ràpid i molt ràpid (U_f , U_{vf}).

1.1.3.3. La iniciació del plegament proteic

Es creu que el plegament proteic s'inicia per mitjà d'interaccions de curt abast que resulten en la formació, dins d'una cadena polipeptídica, d'una o més regions iniciadores del plegament (*chain-folding initiation sites*, CFIS), abans anomenades regions de nucleació (Wetlaufer, 1973). S'ha suggerit que aquests CFIS redueixen l'espai conformacional que el polipèptid ha de temptejar per tal de plegar-se, dirigint el plegament cap al col·lapse hidrofòbic. També l'RNasa A ha estat utilitzada com un model per estudiar aquestes etapes inicials del plegament i de fet, diversos treballs han apuntat l'existència de possibles CFIS per aquest enzim (Matheson i Scheraga, 1978; Némethy i Scheraga, 1979; Chávez i Scheraga, 1980; Montelione i col., 1984; Oka i col., 1984; Montelione i Scheraga, 1989; Udgaonkar i Baldwin, 1990; Altmann i Scheraga, 1990; Beals i col., 1991; Buckler i col., 1995; Dodge i Scheraga, 1996; Xu i col., 1996; Neira i col., 1999). Matheson i Scheraga (1978) van identificar diverses regions iniciadores del plegament en un grup de proteïnes per mitjà d'un model que es fonamenta en les interaccions hidrofòbiques que indueixen a la formació de conformacions tipus forca (*hairpin*). Algunes d'aquestes regions van ser proposades pel plegament de l'RNasa A, essent la regió compresa entre els residus Ile106-Val118 la més probable per iniciar el plegament. Némethy i Scheraga (1979), utilitzant un model alternatiu respecte al treball abans esmentat, van identificar els residus Asn71-Glu111 (regió E) i els residus Asn103-Val124 (regió F), juntament amb 4 regions més (regions A-D), com els emplaçaments més probables per a l'inici del plegament de l'RNasa A.

A fi d'estudiar aquests CFIS, s'han utilitzat fragments peptídics curts de la proteïna que contenen la seqüència d'aminoàcids de les regions d'interès. Per l'RNasa A s'han estudiat principalment els següents pèptids lineals: (1) els pèptids N-terminal Lys1-Ala19 i Lys1-Met13 (CFIS A; residus 4-11), (2) el pèptid Cys58-Cys72 (CFIS D; residus 53-79), (3) el pèptid Ac-Tyr92-Pro93-Asn94-NHMe (CFIS E; residus 71-111), (4) el pèptid Ac-Asn113-Pro114-Tyr115-NHMe (CFIS F; residus 103-124), i (5) els pèptids His105-Val124 i Gly112-Val124 (CFIS F, residus 103-124). Tots aquests pèptids mostren, en solució aquosa, preferències conformacionals per la formació d'estructura secundària. Aquest fet suggereix que la formació d'estructura secundària té lloc en les primeres etapes del plegament proteic. A més, aquests estudis demostren que les interaccions hidrofòbiques en els pèptids tenen un paper important, tant en l'estabilització dels elements d'estructura secundària, com en la formació d'agrupacions hidrofòbiques en aquests pèptids i possiblement en proteïnes desnaturalitzades.

Els fragments N-terminal Lys1-Ala19 (o Lys1-Ala20: S-pèptid) i Lys1-Met13 (C-pèptid) han estat àmpliament estudiats per difracció circular i ressonància magnètica nuclear (Silverman i col., 1972; Bierzynski i col., 1982; Kim i col., 1982; Mitchinson i Baldwin, 1986; Rico i col., 1986, 1987). Aquests són els primers pèptids curts que es va demostrar que formaven poblacions significatives d'hèlix α quan estaven aïllats (Bierzynski i col., 1982; Rico i col., 1983). Es va observar que l'hèlix α es troba en equilibri dinàmic amb la conformació desplegada. Aquest equilibri és dependent de la temperatura i del pH. En conseqüència, les interaccions de curt abast que dirigeixen la formació d'hèlix α són presents en el pèptid. A més, es va demostrar que la formació d'aquesta estructura és un procés dirigit entàlpicament (Bierzynski i col., 1982). Avbelj i Moulton (1995), mitjançant simulacions teòriques, van identificar la regió Glu2-Met13 de l'RNasa A com a una unitat de plegament independent de la resta de la proteïna. També s'han estudiat, per ressonància magnètica nuclear, els fragments peptídics que constitueixen l'hèlix α II i l'hèlix α III en la proteïna nativa (Jiménez i col., 1987, 1988). Els resultats indiquen que les tres hèlixs α de l'RNasa A, com a fragments aïllats i en absència d'interaccions terciàries, són parcialment estables.

Estudis del pèptid Cys58-Cys72 (Milburn i Scheraga, 1988; Altmann i Scheraga, 1990) van demostrar que el gir d'inversió amb el pont disulfur natiu Cys65-Cys72, està termodinàmicament afavorit respecte el gir d'inversió no natiu Cys58-Cys65, el qual té una mida similar. Una anàlisi mitjançant ressonància magnètica nuclear del pèptid Lys61-Gln74 (Talluri i col., 1993) va demostrar que les interaccions de curt abast ajuden a estabilitzar el pont disulfur Cys65-Cys72 per mitjà de la formació d'un gir d'inversió β de tipus II. D'acord amb aquest resultat, Xu i col. (1996) van observar, mitjançant l'aïllament i caracterització d'intermediaris en les etapes inicials del plegament oxidatiu de l'RNasa A, que l'intermediari amb el pont disulfur 65-72 constitueix el 40% de tots els possibles 28 intermediaris 1S. Iwaoka i col. (1998) van observar que en absència del pont disulfur natiu Cys65-Cys72 (RNasa A [C65S,C72S]), el plegament de la proteïna és significativament més lent. Un estudi per ressonància magnètica nuclear d'aquesta variant de l'RNasa A (Shimotakahara i

col., 1997) va suggerir que el gir d'inversió amb el pont disulfur natiu Cys65-Cys72 i la regió C-terminal de la proteïna estan relacionats de manera conformacional.

Els pèptids Ac-Tyr92-Pro93-Asn94-NHMe i Ac-Asn113-Pro114-Tyr115-NHMe, els quals corresponen a fragments amb girs d'inversió- β tipus VI (amb *cis* X-Pro) del CFIS E i F, respectivament, van ésser estudiats per ressonància magnètica nuclear i per mètodes cristal·logràfics de difracció de raigs X (Stimson i col., 1982; Montelione i col., 1984). Es va observar que aquests pèptids curts tenen poca preferència per la conformació nativa *cis* de l'enllaç peptídic X-Pro. En conseqüència, i segons els autors, tot i que aquests tripèptids estan plegats, les interaccions locals no són suficients per assolir la conformació nativa *cis* de l'enllaç peptídic X-Pro.

Mitjançant mesures de temps de vida de l'estat excitat per fluorescència (*lifetime*) i estudis de ressonància magnètica nuclear, es va observar que el pèptid His105-Val124 podia adoptar dues o més conformacions que s'originarien per mitjà d'interaccions diferents a la isomerització *cis/trans* de l'enllaç peptídic X-Pro114 (Haas i col., 1987). Beals i col. (1991) van assajar si les interaccions hidrofòbiques entre els residus 106-118 de l'RNasa A eren prou fortes per induir la formació d'una estructura plegada en el fragment peptídic His105-Val124. Es va observar que les interaccions de curt abast presents en la regió 105-124, afavorides pel gir d'inversió β de tipus VI, conduïen a la formació d'estructures parcialment plegades. Per bé que les estructures que es generaven no eren les natives, els autors van concloure que aquesta preferència conformacional era capaç de restringir l'espai conformacional que la resta de la proteïna havia d'assajar per tal de plegar-se.

Jiménez i col. (1990) van examinar les propietats conformacionals del fragment C-terminal Gly112-Val124 de la RNasa A per mitjà de dicromisme circular i ressonància magnètica nuclear. No es va observar cap indicatiu del gir d'inversió β Gly112-Tyr115 present en l'estat natiu de l'RNasa A, la qual cosa suggeriria que es necessiten interaccions de llarg abast a fi d'estabilitzar aquesta regió tipus forca, tal i com va ser inferit posteriorment per Buckler i col. (1995) a partir d'un estudi dut a terme amb la cadena polipeptídica sencera.

Buckler i col. (1995) van observar que el segment C-terminal de l'RNasa A manté certa estructura fins i tot en l'estat desplegat i que aquesta està estabilitzada per mitjà d'interaccions locals i no locals. Altres estudis han suggerit que l'estat desnaturalitzat de l'RNasa A manté unes dimensions compactes i que aquest conté estructura secundària residual (Labhardt, 1982; Privalov i col., 1989; Sosnick i Trewhella, 1992; Seshadri i col., 1994; Tamura i Gekko, 1995; Neira i col., 1999). Aquesta estructura residual de la proteïna podria reflectir un arrest o bloqueig en el procés de plegament de la proteïna, i per tant, la caracterització estructural d'aquests estats desplegats pot donar lloc a nous coneixements sobre les interaccions que condueixen la proteïna desplegada vers l'estructura nativa.

Recentment, utilitzant NMR bidimensional, Neira i col. (1999) han seguit el bescanvi per deuteri dels protons amida de l'esquelet de l'RNasa A, a diferents

valors de pH i de temperatura, la qual cosa ha permès determinar el factor de protecció de cadascun d'aquests protons i assignar-los a bescanvis originats per fenòmens de desplegament de baixa amplitud o locals, o bé a bescanvis associats a un desplegament global. La comparació d'aquests resultats amb els resultats obtinguts per Udgaonkar & Baldwin (1990), els quals per mitjà d'NMR bidimensional i experiments de *quench-flow* van identificar els protons protegits (o de bescanvi lent) durant el procés de replegament, i que per tant coincideixen amb els protons que es bescanviarien associats a un desplegament global, ha permès proposar a Neira i col. (1999) la presència d'un possible CFIS d'excel·lent estabilitat en el nucli hidrofòbic de l'RNasa A. Aquest CFIS estaria format per la regió de full plegat β : Lys62-Ala64, Cys72-Ser75, Ile106-Cys110 i Val116-His119, juntament amb la cara de l'hèlix α III que conté la Val54 i la Val57.

Tots els treballs que s'han exposat indicarien la rellevància del nucli hidrofòbic i apunten un paper fonamental de la regió 106-118 com a CFIS en el plegament de l'RNasa A.

1.2. El nucli hidrofòbic

Malgrat que la contribució de l'efecte hidrofòbic s'accepta com a transcendental en els processos de plegament de les proteïnes (Fersht, 1999) i, malgrat que l'RNasa A ha estat utilitzada com a model per a molts estudis estructurals i funcionals, no han coincidit ni s'han aprofitat ambdues conjectures per realitzar estudis de proteòmica encaminats a aclarir la importància del nucli hidrofòbic d'aquest enzim en l'estabilitat conformacional i/o sobre els processos de plegament/desplegament que afecten la seva conformació nativa.

1.2.1. L'efecte hidrofòbic

El plegament natiu d'una proteïna globular ha de ser el termodinàmicament més estable. Malgrat la disminució de la llibertat de moviment del polipèptid durant el plegament, aquest procés és espontani donat que d'una banda apareixen interaccions energèticament favorables entre els grups de la molècula plegada, que inclouen les unions electrostàtiques, els ponts d'hidrogen interns i les forces de van der Waals. D'altra banda hi ha l'anomenat efecte hidrofòbic, és a dir, és molt favorable que les cadenes laterals hidrofòbiques estiguin amagades a l'interior de la proteïna i no orientades cap a l'exterior, en contacte amb l'aigua, la qual cosa provocaria una ordenació rígida de les molècules d'aigua, situació que seria energèticament desfavorable.

Si bé les interaccions de van der Waals entre grups hidrofòbics d'una proteïna tenen un paper important en l'estabilitat de l'estat natiu, l'estabilització principal resulta de l'efecte entròpic, és a dir, de l'efecte hidrofòbic.

L'aigua en estat líquid està formada per una xarxa dinàmica d'enllaços pont d'hidrogen anomenades "agrupacions oscil·lants". La presència d'una molècula o grup hidrofòbic causa una reorganització local en aquesta malla d'enllaços pont d'hidrogen. A fi de preservar el nombre d'enllaços pont d'hidrogen que s'estableixen entre les molècules d'aigua, cadascun amb una energia aproximada d'uns 25 KJ/mol, les molècules d'aigua que embolcallen el grup hidrofòbic es reorganitzen formant una estructura quasi cristal·lina (*icebergs*). Conseqüentment, malgrat que el solut apolar no provoca grans canvis en l'entalpia del solvent polar, aquest solut disminueix l'entropia del sistema donat que augmenta l'ordre local. L'associació entre grups hidrofòbics d'una proteïna està afavorida per l'alliberació d'una part de les molècules d'aigua que es trobaven embolcallant cadascun dels grups hidrofòbics per separat. La base de l'efecte hidrofòbic radica en l'augment d'entropia que resulta de l'increment de llibertat de les molècules d'aigua alliberades. Per tant, un grup hidrofòbic serà conduït cap a l'interior de la proteïna, evitant la interacció amb l'aigua, per tal de recuperar l'entropia del sistema.

Així, l'efecte hidrofòbic és la força que determina la tendència dels components no polars, com ara els hidrocarburs, de transferir-se d'una solució aquosa a una fase orgànica (Kauzmann, 1959). L'efecte hidrofòbic es pot quantificar (Kauzmann, 1954, 1959) mitjançant l'estimació de l'energia estàndard de transferència d'un solut A, de l'aigua a un solvent i ($\Delta G_{A, H_2O \rightarrow \text{solvent } i}^{\circ}$). O sigui, per mitjà del canvi de l'energia lliure estàndard quan el solut A, dissolt en aigua en condicions estàndards, és transferit des de l'aigua a un solvent no aquós i en condicions estàndards. L'energia lliure estàndard de transferència dels soluts hidrofòbics de l'aigua a un solvent orgànic és negativa. Arran d'aquest canvi negatiu en l'energia lliure estàndard, s'origina l'efecte hidrofòbic.

S'ha observat experimentalment que l'efecte hidrofòbic és proporcional a la reducció de l'àrea accessible al solvent en la transferència de petites molècules hidrofòbiques de solvents orgànics a aigua. L'energia de transferència és de 80-100 KJ/mol per Å² d'àrea accessible al solvent de solut que esdevé enterrada, evitant la seva interacció amb l'aigua (20-25 cal/mol/Å²) (Hermann, 1972; Harris i col., 1973; Reynolds i col., 1974; Clothia, 1974).

1.2.2. Estudis del nucli hidrofòbic de les proteïnes per mutagènesi dirigida

La importància de l'efecte hidrofòbic en l'estabilitat de les proteïnes globulars va ser descrita per primera vegada per Kauzmann (1959). Des d'aleshores, s'ha considerat que l'efecte hidrofòbic és la força principal que condueix el plegament proteic (Dill, 1990).

L'enginyeria de proteïnes ha esdevingut el procediment estàndard per determinar la importància del nucli hidrofòbic en l'estabilitat de les proteïnes. En estudis realitzats emprant aquesta tecnologia, es porten a terme reemplaçaments d'aminoàcids del suposat nucli hidrofòbic i a continuació es comproven els canvis en

L'estabilitat de la proteïna (Fersht i Serrano, 1993). L'estabilitat conformacional d'una proteïna es defineix com el canvi d'energia lliure, ΔG_U , per la reacció proteïna plegada \Leftrightarrow proteïna desplegada (Pace, 1990). Per comparar una proteïna variant amb la salvatge, es mesura la diferència d'estabilitat conformacional, $\Delta\Delta G_U = \Delta G_U(\text{salvatge}) - \Delta G_U(\text{variant})$ (Pace, 1995). Les substitucions d'aminoàcids assajades comporten petites delecions de les cadenes laterals a fi d'eludir qualsevol tipus d'incompatibilitat estèrica. Algunes de les proteïnes estudiades emprant aquest sistema són: sintetasa de triptòfan, lisozim T4, barnasa, nucleasa estafilococal, proteïna del gen 5 del bacteriòfag f1 i l'inhibidor de quimotripsina 2 (Yutani i col., 1987; Kellis i col., 1988, 1989; Matsumura i col., 1988; Lim i Sauer, 1989; Shortle i col., 1990; Sandberg i Terwilliger, 1991a,b; Eriksson i col., 1992; Serrano i col., 1992; Buckle i col., 1993; Jackson i col., 1993; Takano i col., 1995; 1997, Buckle i col., 1996; Xu i col., 1998). La disminució d'estabilitat observada per grup metilè eliminat és aproximadament de 6 ± 2 KJ/mol (1.5 ± 0.5 Kcal/mol) (Fersht, 1999).

Serrano i col. (1992) van observar una correlació entre les $\Delta\Delta G_U$ estimades i les diferències d'àrea accessible al solvent entre la cadena lateral substituïda de les proteïnes variants i la cadena lateral de la proteïna salvatge. Pace (1992) va idear un mètode a fi d'expressar i comparar els valors de $\Delta\Delta G_U$ estimats per a les diferents variants en funció d'una mateixa accessibilitat al solvent de la cadena lateral substituïda, per exemple 0% d'accessibilitat. Tot i això, s'ha observat que les conseqüències termodinàmiques i estructurals de les substitucions de residus que presenten la mateixa accessibilitat al solvent vénen condicionades per la seva localització dins del mateix nucli hidrofòbic. Una mostra d'això és que després d'una substitució, o bé no es produeix pràcticament cap moviment estructural, la qual cosa està lligada a una màxima desestabilització de la proteïna, o bé té lloc un col·lapse, el qual pot esdevenir gairebé complet, dels àtoms que envolten la cavitat originada amb la consegüent compensació de la pèrdua d'estabilitat (Eriksson i col., 1992; Buckle i col., 1993; Jackson i col., 1993; Buckle i col., 1996).

Per la barnasa (Serrano i col., 1992) i per l'inhibidor de la quimotripsina 2 (Jackson i col., 1993), es va observar una correlació entre la pèrdua d'estabilitat i el nombre de grups $-\text{CH}_2-$ i $-\text{CH}_3-$ presents dins d'una esfera de 6 Å de radi des del grup metil/metilè que se suprimeix en la cadena lateral hidrofòbica. Els autors van concloure que com més gran és la densitat d'empaquetament, més fortes són les interaccions van der Waals que s'estableixen i, en conseqüència, és menys probable que els àtoms es desplacin vers la cavitat formada per la delecio dels grups metil/metilè. Per tant, la densitat d'empaquetament dels residus que envolten l'emplaçament on ha tingut lloc la substitució és un dels principals factors que determinen l'efecte d'un reemplaçament hidrofòbic.

En altres tipus de treballs, més encaminats a l'estudi de l'empaquetament i de la tensió del nucli hidrofòbic, s'ha demostrat que el nucli hidrofòbic és molt resistent a la substitució de les cadenes laterals hidrofòbiques per altres d'una mida més gran i amb diferent geometria. Per bé que s'han dut a terme canvis molt extrems, la

proteïna ha retingut sempre la seva activitat biològica (Lim i col., 1992; Gassner i col., 1996; Axe i col., 1996).

Malgrat que el valor de l'efecte hidrofòbic quan s'estima per mitjà dels experiments de mutagènesi dirigida en proteïnes és superior al valor obtingut quan es calcula mitjançant reaccions model de transferència d'un solut hidrofòbic d'aigua a un solvent orgànic. (Fersht, 1993), s'ha observat que els valors de ΔG_{tr} a octanol (Sharp i col., 1991) poden utilitzar-se per estimar l'estabilitat que es guanya quan una cadena lateral hidrofòbica es trasllada vers l'interior de la proteïna durant el procés de plegament (Pace, 1992). Això no obstant, convé ressaltar, tal i com s'ha esmentat en els punts anteriors, que les $\Delta\Delta G_U$ estimades no es poden analitzar únicament en termes de l'efecte hidrofòbic.

1.3. La pressió

La vida, a la superfície de la Terra, està adaptada a gairebé tots els medis possibles, ja sigui a l'aire, al terra o a l'aigua, fins i tot en les condicions més extremes. Les pressions elevades no reflecteixen una condició anormal a la biosfera donat que els oceans cobreixen més del 65% de la superfície del planeta. En aquest sentit, s'ha de destacar que la capa d'aigua oceànica té una espessor mitjana d'uns 4000 m (essent la fossa abissal més profunda d'uns 11000 m) i presenta una pressió mitjana en el fons de 38 MPa ($1 \text{ atm} = 1 \text{ Kg cm}^{-2} \approx 1 \text{ bar} \approx 0.1 \text{ MPa}$). En aquest medi s'hi troba vida fins i tot a les profunditats més grans, i per tant, aquesta s'ha hagut d'adaptar a condicions extremes de pressió hidrostàtica. Els bacteris adaptats a viure en aquestes condicions extremes, en les fosses abissals o en rifts oceànics, toleren temperatures de fins a 105°C i pressions superiors a 40 MPa (Prieur i col., 1992). Aquests límits en la viabilitat dels éssers vius vénen dictats entre altres factors per l'estabilitat que presenten les proteïnes enfront d'ambdós paràmetres físics.

1.3.1. Breu història

Ja a l'any 1887, Regnard va dur a terme un treball pioner basat en l'efecte de l'alta pressió en l'activitat motora dels animals. Més tard, Hite i col. (1899) van descriure l'efecte de la pressió en els bacteris de la llet, carn, suc de fruita i altres aliments. Al mateix temps es va proposar emprar la pressió com a una alternativa a la temperatura per tal d'alliberar de microorganismes els aliments. El 1914, Bridgman va postular que una pressió de 700 MPa era suficient per desnaturalitzar les proteïnes de la clara d'ou d'una manera similar, tot i que no idèntica, a la temperatura. Més endavant, Basset i col. (1932) van estudiar els efectes de l'alta pressió en els bacteris, sistemes antígen-anticòs, virus, proteïnes, etc. Des d'aleshores, s'han dut a terme diversos treballs per tal d'estudiar els efectes de la pressió sobre els microorganismes i en el tractament dels aliments (Cheftel, 1992). No obstant això, des del treball capdavanter de Bridgman (1914), els investigadors han deixat de banda l'aplicació

de la pressió com a eina bàsica de recerca. La raó per la qual l'activitat en aquest camp no va continuar, va ser la manca de coneixement dels efectes de la pressió en les reaccions bioquímiques i en les estructures dels biopolímers, així com la falta d'idees sobre el que aquesta podia aportar en l'estudi de les proteïnes.

Recentment, s'ha observat un augment notable en l'interès dels investigadors per aplicar la pressió com una variable que actua en els sistemes biològics, gràcies a la importància potencial d'aquest paràmetre en les àrees biotecnològiques (Balny i col., 1992; Mozhaev i col., 1994). Per altra banda, juntament amb les condicions de temperatura i de solvent, la pressió pot ésser utilitzada per tal de determinar les propietats termodinàmiques i cinètiques del sistema en estudi (Gross i Jaenicke, 1994). Així, en la desnaturalització proteica, les altes pressions hidrostàtiques proporcionen una informació singular del procés de desplegament de la proteïna (Silva i Weber, 1993; Jonas i Jonas, 1994; Mozhaev i col., 1996), tal i com es descriu més endavant.

A causa del progrés tècnic dels darrers anys, molts problemes instrumentals que obstaculitzaven la recerca emprant altes pressions han estat solucionats i actualment quasi totes les metodologies que s'utilitzen de forma rutinària a pressió atmosfèrica es poden adaptar a estudis d'alta pressió.

1.3.2. Efectes en l'estructura proteica

El comportament dels biosistemes sota condicions d'alta pressió ve governat pel principi de Le Chatelier, el qual prediu que l'aplicació de pressió desplaça un equilibri cap a l'estat que ocupa el menor volum i accelera els processos pels quals l'estat de transició presenta un volum més petit que l'estat inicial.

A fi de comprendre els efectes de la pressió en els processos bioquímics, com és ara la desnaturalització de les proteïnes, és molt útil examinar curosament els canvis de volum que es deriven dels processos moleculars que es promouen (Morild, 1981; Heremans, 1982; Mozhaev i col., 1994). En primer lloc, convé ressaltar que la solvatació dels grups carregats d'una proteïna va acompanyada per una reducció del volum. En contra, la formació de les interaccions electrostàtiques com a conseqüència de l'associació de dos grups iònics amb càrrega oposada comporta un canvi positiu de volum (ΔV) i per tant, no està afavorida per la pressió. En segon lloc, s'accepta de forma general que la formació de contactes hidrofòbics implica valors positius de ΔV . Així doncs, un increment de pressió és advers a la formació d'aquest tipus de contactes. D'altra banda, l'apilament dels anells aromàtics suposa petits valors de ΔV negatius, per això un increment de pressió els afavoreix. En darrer lloc, els ponts d'hidrogen es troben estabilitzats per l'alta pressió. Aquesta estabilització s'origina per la disminució de la distància entre els àtoms que participen en l'enllaç.

L'estructura primària de les proteïnes és insensible a la pressió, o al menys no s'altera per pressions de 1000-2000 MPa, a causa de la baixa compressibilitat dels enllaços covalents (Gross i Jaenicke, 1994). Així doncs, la pressió opera

principalment sobre les estructures espacials de les proteïnes (estructura secundària, terciària i quaternària).

Si bé una pressió de 100-200 MPa és suficient perquè tingui lloc la dissociació de proteïnes oligomèriques i de complexos multiproteics (Silva i Weber, 1993), per tal de desnaturalitzar les proteïnes monomèriques és necessari aplicar una pressió de 400 a 800 MPa, i en algun cas concret es requereix una pressió per sobre de 1000 MPa (Heremans, 1982).

Quan s'aplica alta pressió (o temperatura) a una proteïna es generen dos efectes diferents: l'efecte elàstic i l'efecte conformacional (Heremans i Smeller, 1998). L'efecte elàstic fa referència als canvis que es promouen en la llargada dels enllaços, en la hidratació i en la compressió de les cavitats. No obstant això, es preserva l'estructura secundària de la proteïna. Si la pressió és suficientment alta, tenen lloc canvis cooperatius en l'estructura secundària amb la consegüent reorganització local o global dels àtoms, la qual cosa és coneguda com efecte conformacional.

1.3.2.1. *La desnaturalització proteica*

La desnaturalització de les proteïnes s'estudia normalment a pressió atmosfèrica i s'indueix per mitjà de l'ús d'altres temperatures, clorur de guanidini o urea com a agents desnaturalitzants. Aquests mètodes presenten certes limitacions, a causa principalment dels dos punts que s'exposen a continuació: (1) la variació de temperatura canvia tant el volum com l'energia interna del sistema, de manera que es fa difícil separar els seus efectes; i (2) els paràmetres termodinàmics de la desnaturalització per clorur de guanidini o per urea es troben influenciats per l'unió d'aquestes molècules a les proteïnes (Makhatadze i Privalov, 1992). Ara bé, si la desnaturalització és induïda per pressió, a una temperatura constant i en absència d'agents desnaturalitzants químics, hom pot aïllar i descriure els efectes en funció dels canvis en el volum de la proteïna (Silva i Weber, 1993). La utilització de la pressió és també avantatjosa des d'un punt de vista metodològic, ja que la renaturalització té lloc simplement minvant la pressió i, en general, els efectes són reversibles. Només en algunes ocasions la desnaturalització comprèn efectes irreversibles com l'agregació o canvis en l'estructura covalent de la proteïna (Gross i Jaenicke, 1994).

La pressió és una eina molt útil per tal d'estudiar els canvis de volum en la desnaturalització de les proteïnes (ΔV). Per a un procés en equilibri $A \leftrightarrow B$, el canvi d'energia lliure del sistema (ΔG), el canvi d'energia interna (ΔE), el canvi de volum (ΔV) i el canvi d'entropia (ΔS) s'expressen en funció de la temperatura (T) i de la pressió (p) per mitjà de la següent equació:

$$\Delta G = \Delta E + p\Delta V - T\Delta S \quad (1.1)$$

Tal com s'ha esmentat, la pressió només afecta el volum del sistema en estudi. El canvi de volum és la diferència entre els volums dels estats final (V_B) i inicial (V_A) i, a una temperatura constant, es pot calcular de la següent forma:

$$\Delta V = V_B - V_A = \left(\frac{\partial \Delta G}{\partial p} \right)_T = -RT \left(\frac{\partial \ln K}{\partial p} \right)_T \quad (1.2)$$

on R és la constant dels gasos i K és la constant d'equilibri.

El volum d'una proteïna en solució comprèn la suma de tres termes (Kauzman, 1959): el volum dels propis àtoms, el volum de les cavitats internes, que s'originen a causa de l'empaquetament imperfecte dels residus de la proteïna, i el volum que aporta la solvatació dels enllaços peptídics i de les cadenes laterals dels aminoàcids (Mozhaev i col., 1996). Si bé la presència de cavitats contribueix de manera positiva al volum total de la proteïna, la solvatació tendeix a disminuir-ne el volum, de manera que ambdós efectes es cancel·len mútuament (Gross i Jaenicke, 1994).

Tal com s'ha comentat, la pressió indueix la desnaturalització de les proteïnes, la qual cosa implica que el volum que ocupa l'estat natiu és més gran que el volum de l'estat desplegat. D'acord amb això, el desplegament d'una proteïna es caracteritza per un volum de desnaturalització (ΔV) negatiu, de l'ordre de menys d'un 2% del volum total de la proteïna (Silva i Weber, 1993).

De forma general s'ha acceptat que aquesta disminució en el volum de la proteïna durant la desnaturalització té el seu origen en un canvi en les interaccions que s'estableixen entre la proteïna i el solvent. Es creu que en aquesta disminució hi intervenen l'electrostricció de residus carregats enterrats quan esdevenen exposats al solvent durant el desplegament de la proteïna, la hidratació de l'esquelet polipeptídic i de les cadenes laterals dels aminoàcids i finalment, l'eliminació dels defectes de l'empaquetament i la supressió de les cavitats en el desplegament de la proteïna. Recentment, Frye i Royer (1998) han suggerit que el canvi de volum vindria atribuït quasi exclusivament a la desaparició de les cavitats durant el desplegament.

S'ha observat que la conformació d'una proteïna desnaturalitzada per pressió és més compacte que una proteïna desnaturalitzada per temperatura o per agents químics (Silva i Weber, 1993; Gross i Jaenicke, 1994), fins el punt que l'estat desnaturalitzat que s'obté per pressió aparenta la conformació dels intermediaris *molten globule* de les proteïnes (Ptitsyn, 1992; Gross i Jaenicke, 1994). Aquest fet ha encoratjat als investigadors a utilitzar la pressió en els estudis de plegament/desplegament de les proteïnes. En aquest sentit, convé esmentar que a l'estat desnaturalitzat d'una proteïna sota condicions fisiològiques sovint se l'anomena intermediari de plegament i se'l relaciona amb l'anomenat estat *molten globule*. Aquests són estats compactes, parcialment plegats, els quals poden ésser aïllats sota condicions desnaturalitzants suaus o moderades, com ara la utilització de la pressió (Masson i Cléry, 1996) o quan se suprimeix un cofactor o un ió metàl·lic essencial per l'estabilitat (Ptitsyn, 1995). En alguns casos, sobretot mitjançant electroforesi sota pressió, s'han observat processos de desnaturalització complexos que involucren intermediaris estables (Masson i col., 1990; Erijman i col., 1993).

Aquests estats *molten globule* de les proteïnes es caracteritzen per presentar poques interaccions terciàries, certa estructura secundària i un nucli hidrofòbic variable, així com per estar separat de l'estat natiu per una energia d'activació elevada. Dalby i col. (1998) van suggerir que per la barnasa aquest estat és 12 KJ/mol més estable que la proteïna desnaturalitzada.

1.3.2.2. Utilitat de la modificació de la seqüència polipeptídica per estudis de desnaturalització induïda per pressió

L'aplicació de la pressió en l'estudi de l'estabilitat de proteïnes variants, obtingudes ja sigui per modificació química o bé pel reemplaçament de residus aminoacídics per mitjà de mutagènesi dirigida, sovint proporciona informació molt singular. Les diferències en l'estabilitat i en els valors de ΔV entre la proteïna salvatge i les modificades (particularment si es tenen dades dels canvis estructurals que han tingut lloc en resposta a la modificació) evidencien el paper dels residus substituïts en l'estabilitat proteica (Mombelli i col., 1998), en el plegament (Royer i col., 1993) o en l'acoblament de diferents proteïnes (Rodgers i Sligar, 1991). A més, les proteïnes amb una estructura primària modificada poden fins i tot ésser més estables a la desnaturalització per pressió (Silva i col., 1992; Hirsch i col., 1994), essent això molt interessant per l'aplicació pràctica de les proteïnes en bioprocessos que es portin a terme a pressions elevades.

1.3.3. Tècniques espectroscòpiques emprades pel seguiment de la desnaturalització proteica per pressió

La difracció de raigs X és la tècnica per excel·lència per tal de determinar els detalls de l'estructura tridimensional de les proteïnes globulars. No obstant això, aquesta tècnica presenta la limitació fonamental que només pot emprar-se quan les molècules es troben cristal·litzades. A més, aquesta no pot utilitzar-se en facilitat per tal d'estudiar els canvis de conformació que es produeixen en resposta a canvis de l'entorn de les proteïnes. Existeixen altres tècniques que ens permeten estudiar les proteïnes en dissolució. Recentment, moltes d'aquestes tècniques han estat adaptades per estudiar la desnaturalització de les proteïnes induïda per un augment de pressió, essent les més utilitzades: espectroscòpia d'ultraviolat (Lange i col., 1996a,b), de fluorescència (Silva i Weber, 1993), d'infraroig (Goossens i col., 1996), i la ressonància magnètica nuclear (Jonas i Jonas, 1994).

1.3.4. La pressió en biotecnologia

La pressió s'empra en àrees biotecnològiques diverses, a fi de modificar l'estructura macromolecular de biomolècules, alterar l'activitat catalítica d'enzims, modular el metabolisme i l'expressió de certs gens en microorganismes, lisar les cèl·lules d'un teixit o cèl·lules microbianes per tal de separar determinades

biomolècules, tractar els aliments, etc. A continuació es presenten alguns exemples d'aplicacions de la pressió en biotecnologia.

FIGURA 1.4

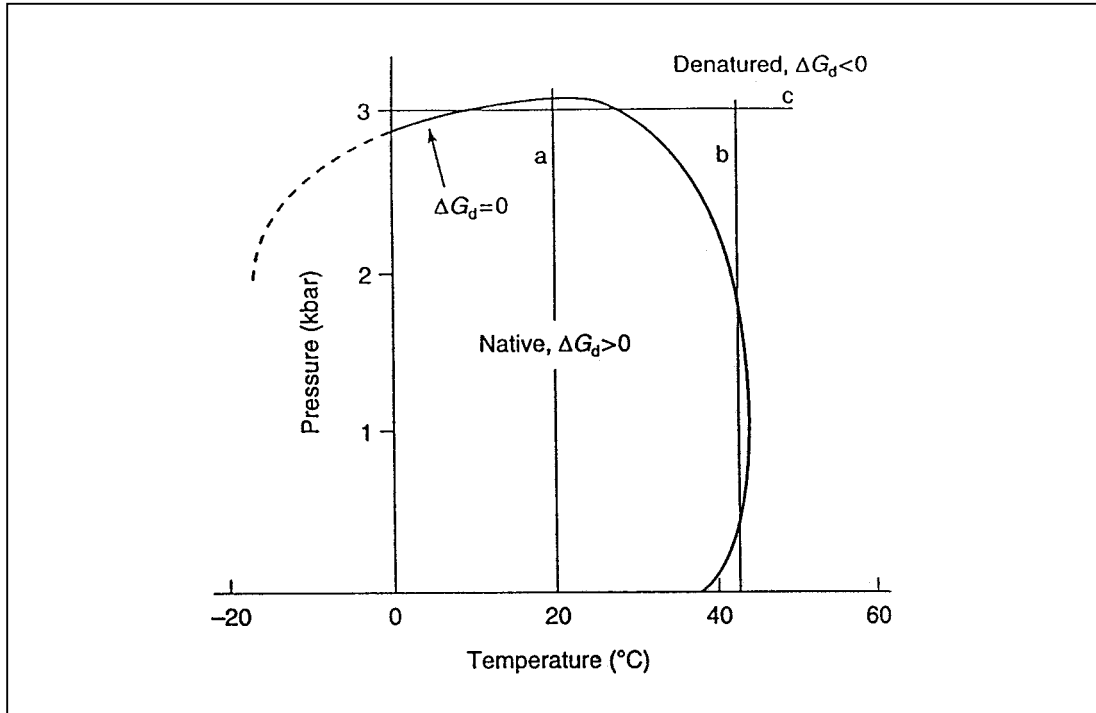


Diagrama de la transició de desnaturalització per pressió-temperatura del quimotripsinogen A. La línia contínua connecta els punts experimentals (no es mostren) on les concentracions, en equilibri, de l'estat natiu i de l'estat desnaturalitzat de la proteïna són iguals ($\Delta G_U=0$). Per sota d'aquesta línia es troba la regió on la conformació nativa de la proteïna és més estable que la desnaturalitzada ($\Delta G_U>0$) i per sobre de la línia es troba la regió d'instabilitat termodinàmica de la proteïna nativa, on la conformació desnaturalitzada és més estable ($\Delta G_U<0$). A 20°C, un increment de pressió >3 Kbar (línia a) promou la desnaturalització. S'observa un comportament més complex a 43°C (línia b): si bé a pressió atmosfèrica la major part de la proteïna es troba desnaturalitzada, un increment de pressió per sobre de 0.5 Kbar induïx la transició cap a la conformació nativa. Això explicaria, perquè les proteïnes es troben estabilitzades enfront de la desnaturalització tèrmica a pressions elevades, i perquè enzims inactivats per temperatura poden a vegades ésser reactivats mitjançant l'aplicació de pressió. Finalment, a pressions >2 Kbar, la proteïna es desnaturalitza de nou. Es poden obtenir unes transicions de reactivació-inactivació similars per mitjà d'incrementar la temperatura a una pressió fixa (línia c). Reproduït de Mozhaev i col. (1994).

1.3.4.1. Modulació de l'estabilitat proteica (lligam pressió-temperatura)

Tant un augment de pressió com un augment de temperatura promouen la desnaturalització proteica; conseqüentment, les proteïnes conserven llur conformació nativa dins d'una combinació molt limitada d'ambdós paràmetres. Així, els diagrames de pressió-temperatura per les transicions de desnaturalització proteica

(FIGURA 1.4) poden ésser utilitzats per tal de modular l'estructura i l'estabilitat de les proteïnes de manera idònia (Kunugi, 1993).

Convé ressaltar que a pressió atmosfèrica i a temperatures elevades (les condicions que s'empren habitualment en el tractament d'aliments), les proteïnes es desnaturalitzen sovint de manera irreversible. Tanmateix en certs casos és necessària la reversibilitat del procés. L'aplicació d'aquests diagrames en bioquímica dels aliments pot facilitar, doncs, l'establiment de les condicions òptimes per desnaturalitzar les proteïnes de manera reversible.

S'ha observat que l'estabilitat dels bacteriòfags i bacteris, dels complexos multiproteics, així com les transicions solució-gel dels polisacàrids mostren diagrames similars als obtinguts per les proteïnes (Gross i Ludwig, 1992; Heremans, 1992).

1.3.4.2. Transicions solució-gel en macromolècules

Freqüentment, a pressions elevades té lloc una disminució de la temperatura de la transició solució-gel de biopolimers en solució. Arran d'aquest fet, els tecnòlegs poden elaborar gels alimentaris a temperatura ambient, els quals presenten millors qualitats (fermesa, suavitat...) que els gels preparats a elevades temperatures.

1.3.4.3. Proteòlisi

El grau de desplegament de les proteïnes induït per pressió depèn de llur seqüència i estructura. Vist que la digestió per proteòlisi està afavorida en aquelles proteïnes més desplegades, la pressió permet dur a terme una inducció selectiva de la proteòlisi en una barreja de diferents proteïnes, la qual cosa presenta aplicacions pràctiques en el tractament d'aliments (Hayashi, 1992). N'és un exemple clar, la degradació selectiva de les lactoglobulines en el sèrum per tal de reduir el caràcter al·lèrgic de la llet (Kunugi, 1993).

1.3.4.4. Modificació de l'activitat catalítica d'enzims

Atès que la pressió accelera les reaccions enzimàtiques que impliquen una disminució del volum en la formació de l'estat de transició, i viceversa, la pressió pot ésser un paràmetre molt útil per tal de modular la selectivitat de molts enzims pels seus substrats. Per exemple, Mozhaev i col. (1994) van observar que la hidròlisi d'una anilida per l' α -quimotripsina presenta un valor negatiu de ΔV^\ddagger , per consegüent, un increment de pressió fins a 200 MPa augmenta aproximadament unes 7 vegades la velocitat de la reacció. En canvi, la hidròlisi d'un èster pel mateix enzim presenta un valor positiu de ΔV^\ddagger , de manera que un increment de pressió fins a 200 MPa suposa un alentiment de fins a 10 vegades la velocitat de la reacció. N'és un altre exemple clar la carboxipeptidasa de llevat. A més de la seva activitat carboxipeptidasa principal, aquest enzim catalitza reaccions de transferència de grups acil i, per tant, pot ésser utilitzat per a la síntesi peptídica. Per bé que la síntesi

peptídica a pressió atmosfèrica presenta un baix rendiment, aquest pot ésser millorat fins unes 6 vegades a una pressió de 200 MPa, com a resultat d'una disminució de l'activitat peptidasa, la qual és responsable de la hidròlisi del substrat (Kunigi, 1993).

1.3.4.5. Processos d'extracció de proteïnes de membrana

Els canvis induïts per la pressió en les membranes biològiques condueixen a un afèbliment de les interaccions no covalents que s'estableixen entre les molècules proteiques i lipídiques. En conseqüència, les proteïnes de membrana integrals i perifèriques poden ésser alliberades mitjançant un augment de pressió, sense perdre llur conformació nativa. Per exemple, Orr i col. (1990) van aïllar la proteïna quinasa C i altres proteïnes que interaccionen amb lípids per mitjà d'un procés d'extracció de proteïnes de membrana induït per pressió, la qual cosa és molt difícil d'assolir mitjançant procediments que utilitzin detergents.

1.3.4.6. Immunoadsorció

De manera general, les proteïnes monomèriques es desnaturalitzen a pressions per sobre de 400 MPa, mentre que els complexos proteïna-proteïna es poden dissociar a partir de 100 MPa. Conseqüentment, a pressions de 100-400 MPa, la dissociació dels complexos no covalents antígen-anticòs té lloc sense que es produeixi la desnaturalització (Howlett i col., 1992). Així, la immunoadsorció a pressions elevades ofereix un potencial notable per la seva aplicació en processos de bioseparació. Una mostra d'això, és per exemple la dissociació del complex albúmina i immunoglobulina quan s'apliquen pressions de menys de 200 MPa. En aquest cas es recupera la proteïna pura i activa i es conserven les propietats d'unió dels anticossos immobilitzats (Howlett, 1992).

1.3.4.7. Microbiologia

El potencial biotecnològic dels bacteris barofílics resulta principalment del fet que aquests bacteris, adaptats a viure a un ambient molt extrem, poden créixer a 105°C i a 20-40 MPa (Prieur, 1992). Aquesta singularitat pot ésser de gran utilitat en processos biotecnològics on es combini pressions i temperatures elevades. Per exemple, atès que els enzims propis d'aquests tipus de bacteris presenten la capacitat de treballar en condicions extremes, aquests serien molt apropiats per la recerca de nous mètodes de síntesi química que fossin benignes pel medi ambient (Yayanes, 1999).

1.3.4.8. Tractament d'aliments

L'ús de la pressió en comptes de la temperatura en el tractament d'aliments permet preservar millor el gust, olor i color dels aliments (Hayashi, 1992). Donat que el tractament per pressió consumeix menys energia que el tractament per temperatura, els aliments tractats per pressió (per bé que actualment són més cars) seran probablement més competitius comercialment. Un dels papers més importants de la pressió en la indústria alimentària és en el procés d'esterilització. Cal destacar

que l'eficàcia d'aquest procés augmenta si es combina la pressió amb la temperatura o amb la utilització d'ones ultrasòniques, camps electromagnètics o additius químics. A més, l'aplicació de la pressió possibilita operar a temperatures per sota de 0°C sense congelació, la qual cosa permetria un procés tant de congelació com de descongelació dels aliments molt ràpid, fonamental per la preservació de la seva qualitat.

Els diferents exemples exposats justifiquen l'ampli ventall de recerca bàsica que s'està portant a terme actualment per tal d'estudiar l'efecte de les pressions en les diferents molècules biològiques.

1.4. Objectius

El coneixement de com una proteïna pot assolir la seva conformació nativa a partir de la seqüència d'aminoàcids és una qüestió que segueix oberta i un repte per a la Bioquímica del proper segle. Tal i com es descriu en aquesta introducció, molts estudis encaminats a respondre aquesta pregunta s'han basat en el seguiment del procés de desnaturalització-renaturalització proteica, tant des d'un punt de vista termodinàmic com des d'un punt de vista cinètic, emprant proteïnes globulars petites d'estructura terciària ben coneguda com a models. Per bé que les tècniques utilitzades pel seguiment del procés de desnaturalització-renaturalització han estat molt diverses, els agents desnaturalitzants usats per provocar la transició de l'estat natiu al desnaturalitzat han estat principalment la temperatura i reactius químics. Darrerament s'està emprant la pressió com a agent pertorbador d'un sistema en equilibri, per una banda per tal d'estudiar el seu efecte sobre l'estructura proteica, i per l'altra, pel potencial extraordinari que aquesta presenta en la indústria alimentària.

Una de les proteïnes model per a l'estudi del plegament/desplegament proteic ha estat la ribonucleasa de pàncrees boví o RNasa A. Els treballs inicials de replegament o renaturalització d'aquest enzim realitzats per Anfinsen a finals dels anys 50, van ésser els que van establir que la informació per assolir l'estructura nativa està continguda en la seqüència aminoacídica. A fi d'estudiar el paper d'un grup funcional qualsevol d'aquesta seqüència d'aminoàcids, se sol modificar o substituir el grup funcional seleccionat i s'analitzen les conseqüències d'aquest canvi. Encara que aquestes alteracions de seqüència es poden introduir per modificació química de determinats residus o per mitjà de procediments sintètics o semisintètics, és indubtable que la mutagènesi dirigida i l'expressió heteròloga de les proteïnes han contribuït a precisar la introducció dels canvis desitjats en una seqüència proteica i a abaratir el seu cost.

En el cas de l'RNasa A, la major part dels estudis de plegament/desplegament i estabilitat, que treuen profit d'aquestes tecnologies, s'han centrat en la importància dels residus de cisteïna i de prolina. Tanmateix, no només aquests residus són importants durant el plegament proteic. Com s'ha esmentat en aquesta introducció, ha estat proposat que un dels principals llocs d'iniciació del plegament proteic (CFIS) d'aquest enzim es localitza en la regió que s'estén des del residu 106 al 118, la qual cosa suggereix que altres processos o interaccions a banda de l'oxidació de cisteïnes o la isomerització dels enllaços X-Pro poden ésser essencials perquè aquesta proteïna assoleixi la seva estructura nativa o conservi la seva estabilitat.

El grup de recerca en el qual s'integra aquest treball té com a interès general aprofundir en el coneixement de la relació existent entre estructura i funció de les proteïnes, les interaccions proteïna-proteïna, així com en el desenvolupament d'aplicacions que en poguessin derivar, utilitzant com a model les ribonucleases de pàncrees.

Per això, l'**objectiu general** d'aquest treball, en el qual l'RNasa A ha estat emprada com a model, fou estudiar la contribució de residus que formen part d'un nucli hidrofòbic sobre l'estabilitat global de l'enzim i aprofundir en el coneixement dels efectes de la pressió sobre l'estructura proteica, comparant el procés de desnaturalització induït per la pressió amb el procés de desnaturalització induït per la temperatura i agents químics.

Per aconseguir l'objectiu general esmentat, els **objectius concrets** que es proposaren en la realització d'aquest treball van ser:

- Estudiar la importància de la hidrofobicitat, la mida i la forma de les cadenes laterals de les posicions 106-109, 116 i 118 en l'estabilitat de la proteïna i en l'assoliment de l'estructura nativa.
- Comprovar el potencial de la introducció d'un residu de triptòfan en la posició 115 de la seqüència d'aminoàcids de l'RNasa A com a sonda local dels canvis conformacionals que es promouen en la regió en estudi durant els processos de desnaturalització.

Els procediments emprats han estat:

- Comparació de la conformació nativa de les variants de l'RNasa A respecte a la proteïna salvatge mitjançant dicromisme circular.
- Comparació dels processos de desnaturalització de les variants de l'RNasa A respecte a la proteïna salvatge mitjançant espectroscòpia d'absorció a l'UV de quarta derivada i espectroscòpia d'absorció a l'infraroig per transformada de Fourier, emprant com agents desnaturalitzants pressió i temperatura.
- Comparació dels processos de desnaturalització de la variant Y115W de l'RNasa A respecte a la proteïna salvatge mitjançant espectroscòpia de fluorescència, emprant pressió, temperatura i urea com a agents desnaturalitzants.
- Comparació dels processos de desnaturalització de la variant Y115W de l'RNasa A respecte a la proteïna salvatge mitjançant electroforesi amb gradient d'urea perpendicular a la direcció de migració de la mostra.

La consecució d'aquests objectius havia de constituir un punt de partida per analitzar la contribució, mitjançant estudis de cinètica de plegament/desplegament, dels residus substituïts en la regió 106-118 en el procés de plegament de l'RNasa A.

2. Material i mètodes

Amb la finalitat d'aconseguir una presentació més entenedora, s'ha considerat convenient fonamentar aquest apartat de material i mètodes en tot aquell seguit de tècniques i metodologies que identifiquen de manera més característica aquest estudi i els resultats que s'han aconseguit. No s'han volgut obviar però, totes aquelles altres tècniques o mètodes que s'han utilitzat durant fases preparatòries dels resultats més destacables. Aquestes altres metodologies, pel fet de ser d'ús més extès o perquè de manera més habitual o rutinària s'empren en el nostre grup de recerca, s'han agrupat en l'Apèndix metodològic que es presenta al final del treball.

2.1. Equipament i productes químics

2.1.1. Equipament

Durant la realització d'aquest treball s'ha emprat l'equipament que es presenta a la TAULA 2.1. A més, en determinades ocasions s'ha fet ús d'un equipament més específic que serà detallat a l'apartat corresponent.

2. Material i mètodes

TAULA 2.1

Equipament utilitzat en aquest treball

Equip	Marca	Model	País
Agitadors magnètics	Selecta	Agimatic-NM	Espanya
	SBS-Instruments	A-07	Espanya
Agitador orbital	Heidolph	Unimax 2010	Alemanya
	Selecta	Rotabit	Espanya
Agitador vòrtex	Technokartell	TK3S	Itàlia
Ultrafiltrador d'aigua	Millipore	Milli-Q RG	EUA
Autoclau	Raypa	AE-75	Espanya
Balances	A&D Co. Salter	FY-300 i ER-120A	Japó
	Mettler	AE160	Espanya
Banys termostàtics	Selecta	Unitronic 320 OR	Espanya
	Selecta	Tectron-100	Espanya
Bloc termostàtic	Selecta	Tembloc	Espanya
Bomba de buit	Telstar	2G.9	Espanya
Bombes HPLC	Waters	510	EUA
	Pharmacia Biotech	P-900	Suècia
Bomba peristàltica	Pharmacia Biotech	P-1	Suècia
Cabina de flux laminar	Telstar	PV-100	Espanya
Càmera fotogràfica	Polaroid	MP4+	EUA
Centrífuga	Sorvall	RC-5B	EUA
Centrífuga de sobretaula refrigerada	Sigma	2K15	Alemanya
Col·lector de fraccions	Pharmacia Biotech	RediFrac	Suècia
Conductímetre	Crison	524	Espanya
Congelador -80°C	Sanyo	MDF-192AT	Japó
Destil·lador d'aigua	Millipore	Milli-RO 6	EUA
Detectors HPLC	Waters	996	EUA
	Pharmacia Biotech	UV-900	Suècia
Espectrofotòmetre	Cecil	CE6602	Regne Unit
Estufa d'assecat	Heraeus	T6030	Alemanya
Estufa de cultiu	Raypa	I-280	Espanya
Fonts d'alimentació electroforesi	SBS Instruments	G-200	Espanya
Frigorífic-congelador	Philips/Whirlpool	Combi	Alemanya
Incubador	Selecta	HotCold-UM	Espanya
Liofilitzador	Heto	CT60e	Dinamarca
Microones	Philips	M704	Alemanya
Micropipetes	Labsystems	Finnpipette	Finlàndia
pH-metre	Crison	MicropH2000	Espanya
Rotovapor (Speed-Vac)	Heto	VR-1/120/240	Dinamarca
Termociclador	Biometra	Personal Cyclor	Alemanya
Transil·luminador UV	TFX	20M	França
Ultrafiltrador tangencial	Millipore	Acrylic Minitan II	EUA

2.1.2. Productes químics

Els productes químics d'utilització general han estat reactius de grau analític procedents de les cases Boehringer Mannheim (Alemanya), Fluka (Suïssa), Merck

(Alemanya), Panreac (Espanya), Serva (Alemanya) i Sigma Chemical Co. (EUA). La procedència dels productes d'ús més específic s'indicarà a mesura que apareguin en el text.

2.2. Mètodes de treball amb proteïnes

2.2.1. Anàlisi de l'estructura nativa per dicroïsmes circulars

2.2.1.1. Fonament

Si bé la llum no polaritzada consta d'ones que vibren en tots els plans perpendiculars a la direcció del desplaçament, la llum polaritzada plana està composta per ones que vibren en un únic pla i el seu camp elèctric té una orientació fixa. En la llum polaritzada circular, el camp elèctric pot rotar tant en el sentit de les agulles del rellotge (llum polaritzada circular cap a la dreta) com en el sentit contrari (llum polaritzada circular cap a l'esquerra). La majoria de les molècules biològiques són asimètriques i presenten una diferència d'absorció de la llum polaritzada circularment cap a la dreta, respecte de la llum polaritzada circularment cap a l'esquerra, anomenada dicroïsmes circulars (CD). El dicroïsmes circulars es defineix com:

$$\Delta A = \frac{A_L - A_R}{A} \quad (2.1)$$

on A_L és l'absorbància (per part de la mostra analitzada) de la llum polaritzada circularment cap a l'esquerra, A_R és l'absorbància corresponent a la llum polaritzada circularment cap a la dreta i A és l'absorbància de la llum no polaritzada. Així doncs, ΔA pot ser positiva o negativa.

L'absorció desigual de la llum polaritzada circular (activitat òptica) de les proteïnes en la regió de l'ultraviolat llunyà o regió amida (170-250 nm) depèn principalment dels enllaços peptídics, mentre que les bandes CD en la regió de l'ultraviolat proper (250-300 nm) s'originen a partir de les cadenes laterals aromàtiques. A més, els ponts disulfur donen lloc a petites bandes CD al voltant de 250 nm. Les dues regions espectrals proporcionen diferents tipus d'informació sobre l'estructura proteica. Les bandes CD en la regió amida contenen informació sobre els enllaços peptídics i sobre l'estructura secundària de la proteïna. L'espectre CD en la regió de l'ultraviolat proper pot ésser utilitzada com a empremta de la conformació nativa.

2.2.1.2. Mètode

Es va emprar un espectropolarímetre Jasco J715 amb cambra de cubetes termostatitzada a 10°C. L'espectre de dicroïsmes circulars es va enregistrar entre 178 i

260 nm (UV llunyà) i entre 250 i 310 nm (UV proper). El compartiment de la mostra es purgava ininterrompudament amb nitrogen, a un flux de 25 mL/h en el llunyà i de 5 mL/h en el proper.

Les condicions que es van utilitzar per enregistrar els espectres van ser:

- Sensibilitat: 20 mdeg
- Resolució: 0.5 nm
- Amplada de banda: 2 nm
- Velocitat de lectura: 20 nm/min
- Acumulació d'espectres: 4

Les proteïnes es van dissoldre en tampó cacodilat sòdic 10 mM, pH 5.0 i posteriorment es van filtrar amb unitats de filtració Millex-GV (Millipore) de 0.2 µm de diàmetre de porus.

Per enregistrar l'espectre de CD en l'UV llunyà es va treballar amb una concentració de proteïna de 1 mg/mL i es va utilitzar una cubeta de 0.01 cm de pas òptic. Per l'enregistrament de l'espectre de CD en l'UV proper, la concentració de proteïna va ser de 0.5 mg/mL i es va utilitzar una cubeta de 0.2 cm de pas òptic. Les cubetes es van rentar prèviament amb una solució d'àcid nítric al 50% i es van esbandir amb aigua destil·lada.

Per cada espectre enregistrat es va restar el blanc corresponent, segons la cubeta emprada i el tampó de dilució de la mostra. La línia de base de cada espectre es va igualar a zero prenent com a referència el valor a 320 nm.

L'aparell donava les mesures inicials d'activitat òptica en el·lipticitat, θ_{obs} (deg). Per mitjà del programa STANDARD ANALYSIS (Japan Spectroscopic Co., Ltd.) i després d'introduir les mesures del pas de llum de la cubeta (en cm) i la molaritat de la mostra (M), es mesura l'el·lipticitat molar $[\theta]$ (deg cm² dmol⁻¹). L'activitat òptica de les proteïnes en la regió amida s'expressa sempre com a el·lipticitat mitjana per residu $[\theta]_{MRW}$ (deg cm² dmol⁻¹) i es pot calcular a partir de la massa molecular mitjana per residu (MRW). El MRW d'una proteïna és igual a la seva massa molecular dividida pel nombre d'aminoàcids. Així doncs, el càlcul de l'el·lipticitat mitjana per residu s'obté a partir de l'equació:

$$[\theta]_{MRW} = \frac{[\theta]_{obs} \times MRW}{10 \times l \times c} \quad (2.2)$$

on $[\theta]_{obs}$ és l'el·lipticitat mesurada en deg, MRW és la massa molecular mitjana per residu, c és la concentració de proteïna en g/mol, i l és el pas òptic de la cubeta en cm.

2.2.2. Tècniques espectroscòpiques utilitzades per a l'anàlisi de la desnaturalització induïda per pressió i desnaturalització induïda per temperatura

2.2.2.1. Espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat i espectroscòpia de fluorescència

2.2.2.1.1. Fonament

Les proteïnes són molècules que absorbeixen radiació al llarg d'un marge ampli de l'espectre. Les transicions d'energia elevada entre estats electrònics de la molècula condueixen a l'absorció en la regió del visible o de l'ultraviolat, mentre que les transicions d'energia baixa entre diferents nivells d'energia de vibració corresponen a l'absorció d'energia infraroja (apartat 2.2.2.2).

Les proteïnes no només absorbeixen llum sinó que també n'emeten en forma de llum fluorescent. Per això, l'energia s'absorbeix a la regió ultraviolada de l'espectre i les molècules passen de l'estat basal a un nivell d'alta energia. Després les molècules excitades passen a l'estat basal amb l'emissió de llum visible. La longitud d'ona de la llum emesa és sempre més gran que la de la radiació absorbida.

L'absorció a l'ultraviolat i la fluorescència es troben afectades per l'estat conformacional de la proteïna, donat que es modifica l'entorn local de les cadenes laterals aromàtiques. La interpretació dels espectres d'absorció a l'ultraviolat i de fluorescència pot esdevenir molt complexa quan hi ha més d'una cadena lateral aromàtica en la proteïna. A més, a causa de la multiplicitat de nivells electrònics assolits i a la proximitat en l'espectre de les bandes d'absorció dels residus que absorbeixen a l'ultraviolat (Phe, Tyr, Trp), les bandes dels diferents cromòfors són molt amples i sobreposades.

Per tal de millorar la resolució dels espectres d'absorció a l'ultraviolat, els investigadors han emprat, entre altres, el mètode de càlcul de quarta derivada descrit per Butler (1979). A fi de millorar la resolució dels espectres de quarta derivada de manera selectiva per a cadascun dels aminoàcids aromàtics, Lange i col. (1996a) van determinar els valors òptims, propis de cada aminoàcid aromàtic, d'un paràmetre necessari per al càlcul de la quarta derivada denominat finestra de derivació ($\Delta\lambda$) (Butler, 1979). Els valors de $\Delta\lambda$ que es van fixar són els següents: 1.3 nm (Phe), 2.6 nm (Tyr) i 1.6 nm (Trp).

L'espectroscòpia de quarta derivada presenta tot un seguit d'avantatges (Butler, 1979). En primer lloc, la quarta derivada pot revelar la presència de bandes constituents que no són evidents en l'espectre original; en segon lloc, els màxims d'absorció de l'espectre de quarta derivada presenten la mateixa posició que els màxims de l'espectre original, la qual cosa fa més clara la correlació entre les bandes de la derivada i les de l'espectre normal; i en darrer lloc, les bandes estretes són altament seleccionades en la quarta derivada i s'elimina la interferència de bandes

d'absorció amples, donat que la intensitat d'una corba de quarta derivada depèn de manera inversament proporcional a la quarta potència de l'amplada a mitja alçada de la banda original.

La disminució de la polaritat del solvent promou un canvi significatiu en les propietats dels espectres d'absorció de quarta derivada dels aminoàcids aromàtics (TAULA 2.2).

TAULA 2.2

Efecte del solvent sobre els espectres de quarta derivada dels aminoàcids aromàtics

Solvent	Constant Dielèctrica ϵ_r	Fenilalanina		Tirosina		Triptòfan	
		$\lambda_{\text{màx}}$	ΔA_{rel}	$\lambda_{\text{màx}}$	ΔA_{rel}	$\lambda_{\text{màx}}$	ΔA_{rel}
Aigua	80.4	262.45	1.00	282.0	1.00	288.4	1.00
Etilenglicol 50%	64.5	263.00	1.36	283.4	0.97	290.2	1.26
Etanol 50%	52.4	262.90	1.03	283.8	1.22	289.6	1.65
Etanol	24.3	263.10	1.84	286.2	1.27	290.3	2.84
Èter dietílic	4.34	263.25	1.87	286.3	3.03	291.0	3.26
Ciclohexà	2.02	263.25	1.72	287.7	1.06	290.4	4.09

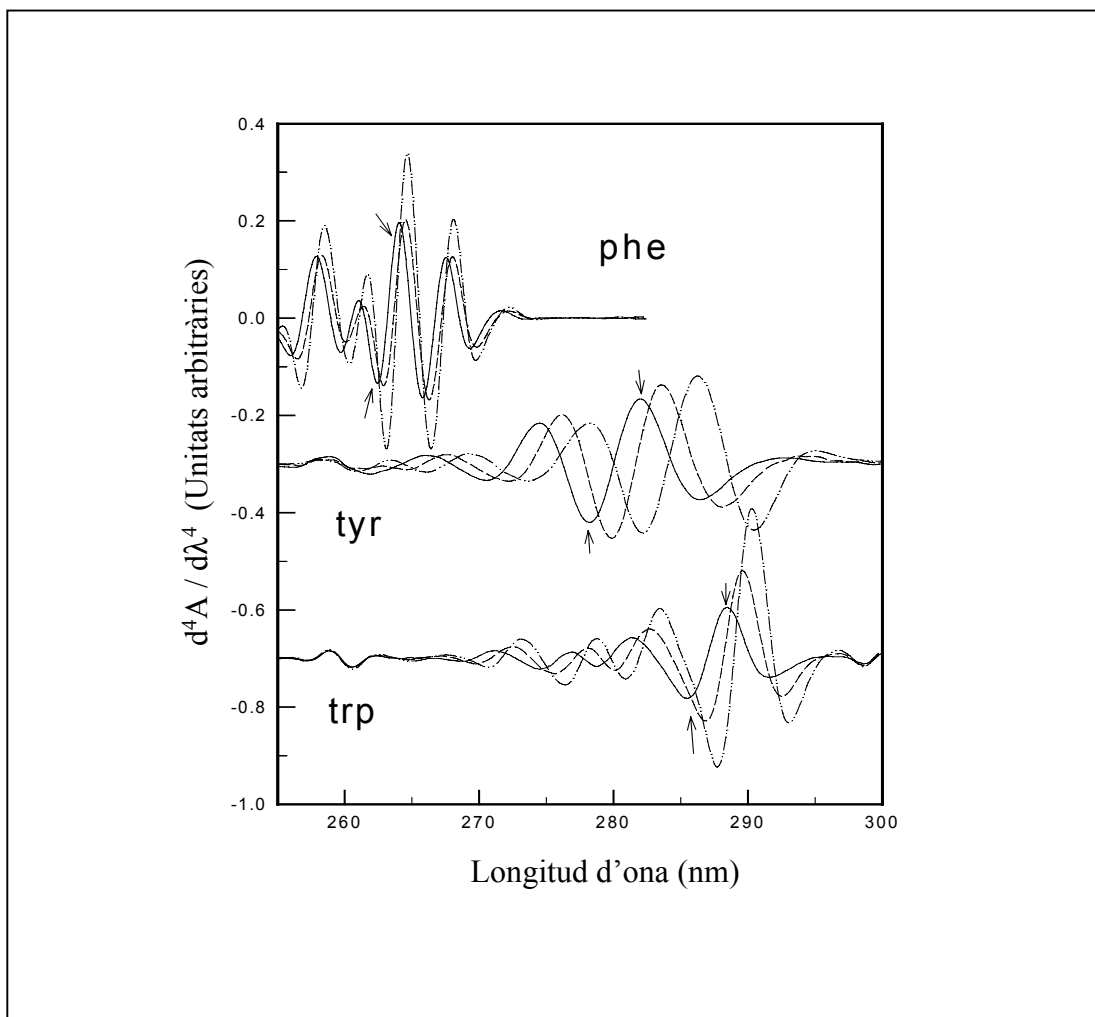
Una disminució de la polaritat del solvent provoca un augment de l'amplitud dels espectres i un desplaçament de les bandes cap a longituds d'ona més grans (desplaçament cap al vermell). La FIGURA 2.1 presenta l'efecte de l'etanol sobre els tres aminoàcids aromàtics. La substitució de l'aigua per etanol induïx un augment de les amplituds de la fenilalanina i del triptòfan, així com una lleugera modificació de la seva posició. En contra, les bandes de quarta derivada de la tirosina exhibeixen un desplaçament considerable cap al vermell, si bé les seves amplituds no són gaire alterades.

La TAULA 2.2 mostra l'efecte de sis solvents amb diferent polaritat sobre els espectres de quarta derivada dels aminoàcids aromàtics. El petit desplaçament cap al vermell induït pels solvents apolars sobre el benzè de la fenilalanina es pot explicar per l'interacció que s'estableix entre les molècules de solvent i el cromòfor. Aquestes forces d'interacció redueixen l'energia de l'estat excitat (Reichardt, 1990). Convé destacar que aquest efecte depèn de l'índex de refracció del medi. Aquest fenomen es complica per la tirosina i el triptòfan donat que ambdós aminoàcids presenten un grup funcional polar. La presència d'aquest grup induïx la formació d'interaccions dipol-dipol amb les molècules de solvent. Atès que una disminució de la polaritat de l'ambient promou un desplaçament cap al vermell, es creu que l'energia de l'estat electrònic basal augmenta en presència d'un solvent apolar. Aquest efecte es troba

2. Material i mètodes

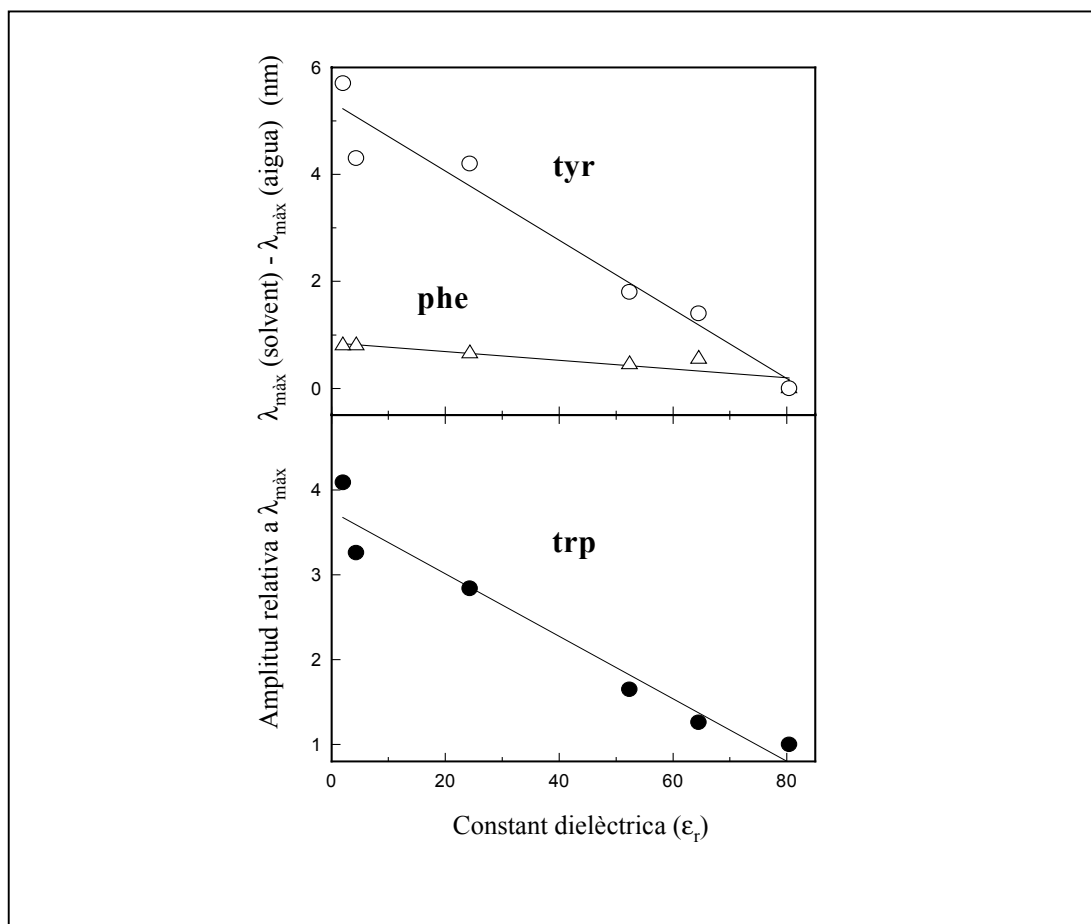
també influenciat per les propietats òptiques del medi. Per bé que s'han dut a terme molts assajos per comprendre aquest fenomen a nivell molecular, la teoria no és encara del tot evident. De tota manera, s'ha demostrat que la relació empírica entre la polaritat de l'ambient dels aminoàcids aromàtics i les seves propietats espectrals és lineal (FIGURA 2.2).

FIGURA 2.1



Efecte de l'etanol sobre els espectres de quarta derivada dels aminoàcids aromàtics. — Aigua, ----- etanol 50%, - - - - etanol 100%.

FIGURA 2.2



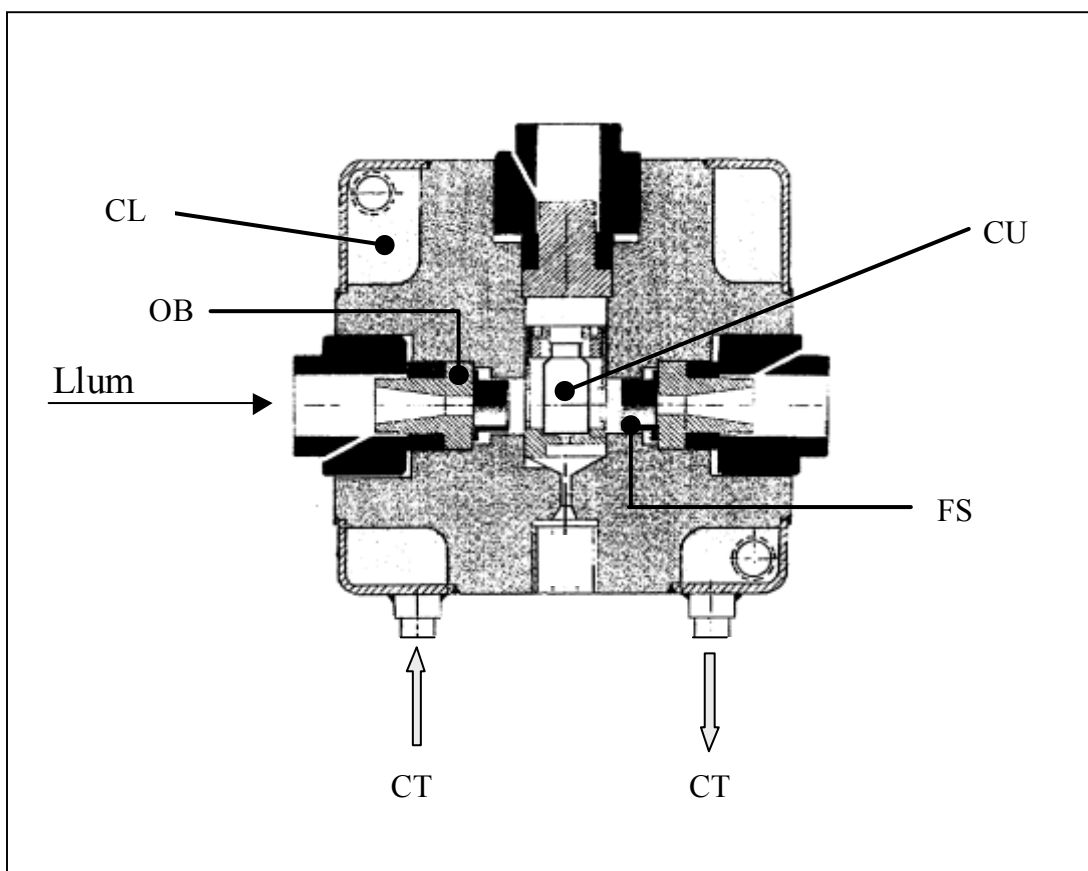
Efecte de la constant dielèctrica sobre els espectres de quarta derivada dels aminoàcids aromàtics. Els solvents són els mateixos que els de la Taula 2.2.

Gràcies a aquesta linealitat, hom pot emprar els espectres de quarta derivada com a una sonda de la polaritat mitjana dels aminoàcids aromàtics. Per tant, aquest mètode ofereix un sistema senzill per tal d'estudiar els canvis estructurals en les proteïnes induïts per la pressió, així com per la temperatura (Lange i col., 1996a,b).

2.2.2.1.2. Equipament d'alta pressió

Pels experiments de pressió, es va instal·lar una cel·la d'alta pressió (0.1 – 700 MPa) (Figura 2.3) dins de la cambra de cubetes d'un espectrofotòmetre CARY 3E (Varian) o d'un fluorímetre SLM-AMINCO model Aminco Bowman Series 2.

FIGURA 2.3



Representació d'una cel·la d'alta pressió. CT= Connexions al bany termostàtic; FS= Finestres de safir; OB= Obturadors; CL= Coberta per on circula el líquid del bany termostàtic; CU= Cubeta.

Aquesta cel·la ha estat dissenyada a l'INSERM U128 (França) i fabricada per l'S.O.F.O.P. (França) mitjançant un acer especial Marval X12 i unes finestres òptiques de safir sintètic. La carcassa central es troba embolcada per una coberta del mateix acer per on circula un líquid (aigua o alcohol), que prové d'un bany termostàtic NESLAB model RTE101D (França), per tal d'equilibrar la mostra a la temperatura desitjada. La mostra es disposa dins d'una cubeta de quars cilíndrica. La cubeta se segella amb una pel·lícula de polietilè Dura-Seal que es manté posicionada, obturant l'obertura de la cubeta, per mitjà d'una anella de cautxú. Aquesta pel·lícula permet la transmissió de la pressió a l'interior de la cubeta. La pressió es genera mitjançant una bomba manual i es controla per mitjà d'unes aixetes o comportes fabricades per NOVA model NW1.6 (Suïssa). L'aigua, com a transmissor de la pressió, és conduïda a través de tubs capil·lars d'acer inoxidable amb un diàmetre interior de 0.2 mm. La pressió de treball es mesura per mitjà d'un indicador digital de NEWPORT ELECTRONIQUE model Infcp (França).

Pel que fa a la cel·la per dur a terme els experiments de desnaturalització induïda per temperatura, es va emprar la cel·la termostatitzada que disposa el propi aparell.

2.2.2.1.3. Absorció a l'ultraviolat de quarta derivada

2.2.2.1.3.1. Condicions de treball

Els espectres d'absorció a l'ultraviolat, corregits per la seva línia de base, es van enregistrar mitjançant un espectrofotòmetre CARY 3E (Varian) entre 250 i 310 nm, en passos de 0.1 nm i amb un temps d'adquisició de dades de 1.0 s per pas. L'amplada de banda va ésser de 1.0 nm. La concentració de proteïna utilitzada va ser de 1 mg/mL.

Pels experiments de pressió, les proteïnes es van dissoldre en amortidor MES 50 mM, pH 5.0 i pels experiments de temperatura en amortidor acetat sòdic 50 mM, pH 5.0. Ambdós amortidors van ésser escollits donat que els seus valors de pK_a no canvien significativament en funció de la pressió o de la temperatura, respectivament. Els espectres d'absorció dels experiments de pressió es van enregistrar a 40°C. Malgrat la limitació de pressió (500 MPa de pressió màxima), aquesta temperatura de treball ens va permetre examinar la corba de desnaturalització de la majoria de les proteïnes de manera gairebé completa. Després de cada increment de pressió o temperatura (en passos de 20-50 MPa o de 2-5°C, respectivament), el sistema es va deixar equilibrar durant uns 5 minuts abans d'enregistrar l'espectre.

2.2.2.1.3.2. Processament de les dades

Per mitjà del programa Sigma Plot (Jandel), i abans de calcular la quarta derivada tal i com van descriure Lange i col. (1996a), es va corregir cadascun dels espectres enregistrats pels efectes de la pressió i de la temperatura en el volum de l'aigua (Kell, 1973 i Gibson i Loeffler, 1941; respectivament). El mètode que es va utilitzar per calcular la quarta derivada estava optimitzat (un acord entre senyal i soroll de fons, resolució i no distorsió espectral) a fi d'estudiar de manera resolutiva i selectiva l'espectre de les tirosines al voltant de 283 nm. Pel que fa a la variant Y115W de l'RNasa A, també es va assajar el mètode de càlcul de la quarta derivada que estava optimitzat per la banda del triptòfan situada al voltant de 287 nm.

2.2.2.1.3.3. Anàlisi termodinàmica dels canvis espectrals

Els paràmetres termodinàmics ΔG , ΔH , ΔS i ΔV de les transicions espectrals induïdes per pressió i temperatura es van determinar per mitjà de l'anàlisi dels espectres de quarta derivada en aquelles longituds d'ona on la magnitud, A, de la transició era màxima. A més a més, es va idear un mètode a fi d'aprofitar tota la regió espectral i així poder determinar una transició espectral mitjana amb la

consegüent millora de la relació entre senyal i soroll de fons. Per això, en primer lloc, es va sostreure un espectre de referència (normalment l'espectre de quarta derivada en condicions natives) de cadascun dels espectres de quarta derivada enregistrats al llarg de la desnaturalització, generant una sèrie d'espectres de diferència de forma sinusoidal. A continuació, per cadascun dels espectres de diferència, es van determinar les posicions dels punts de l'espectre que presentaven un valor d'absorbància igual a 0 ($y=0$), dins del marge de longitud d'ona de 275-290 nm (característic de les tirosines) o dins del marge 290-295 nm (propi del triptòfan, per la variant Y115W). Tot seguit es van calcular les àrees, sumant les amplituds espectrals, de cadascuna de les corbes disposades entre els successius parells de punts $y=0$. Finalment, els valors absoluts d'aquestes sumes es van addicionar per donar lloc al que es va anomenar diferència d'amplitud acumulativa (CDA). A causa del soroll de fons, els espectres de diferència d'aquells espectres que eren similars a l'espectre de referència presentaven molts punts $y=0$. Per evitar sumar les àrees de les corbes situades entre aquests punts $y=0$ aparents, es van emprar els punts $y=0$ obtinguts en el primer espectre de diferència on es van poder determinar de manera consistent. Tot i que l'obtenció de l'espectre de diferència resultava en una disminució de la relació entre senyal i soroll de fons, la millora en aquesta relació associada al fet d'analitzar tot l'espectre, i no una longitud d'ona puntual, avalava el nou mètode desenvolupat.

Es va utilitzar un model senzill de dos estats, on K és la constant d'equilibri entre l'estat desnaturalitzat (d) i l'estat natiu (n) de la proteïna, els quals estan caracteritzats per les amplituds espectrals A_d i A_n , respectivament. La constant d'equilibri es pot expressar com:

$$K = \frac{[d]}{[n]} = \frac{A_n - A}{A - A_d} \quad (2.3)$$

essent A , l'amplitud mesurada a qualsevol valor de pressió.

Transformant matemàticament l'equació anterior s'arriba a una equació per l'amplitud mesurada igual a:

$$K \cdot A - K \cdot A_d = A_n - A \quad (2.4)$$

$$K \cdot A - K \cdot A_d = A_n - A_d + A_d - A \quad (2.5)$$

$$A + K \cdot A = A_n - A_d + A_d + K \cdot A_d \quad (2.6)$$

$$A(1+K) = (A_n - A_d) + A_d (1 + K) \quad (2.7)$$

$$A = \frac{A_n - A_d}{1+K} + A_d \quad (2.8)$$

Donat que:

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (2.9)$$

$$K = e^{-\left(\frac{\Delta G}{RT}\right)} \quad (2.10)$$

Si treballem a temperatura constant:

$$\Delta G = \Delta G_{p=0} + p\Delta V \quad (2.11)$$

$$K = e^{-\left(\frac{\Delta G_{p=0} + p\Delta V}{RT}\right)} \quad (2.12)$$

on $\Delta G_{p=0}$ és el canvi d'energia lliure a pressió zero. Aleshores, la relació de l'amplitud de la quarta derivada en funció de la pressió es pot expressar, modificant les equacions anteriors, com:

$$A = \frac{A_n - A_d}{1 + e^{-\left(\frac{\Delta G_{p=0} + p\Delta V}{RT}\right)}} + A_d \quad (2.13)$$

i

$$A = \frac{A_n - A_d}{1 + e^{-\left(\frac{\Delta H - T\Delta S}{RT}\right)}} + A_d \quad (2.14)$$

per la transició de desnaturalització induïda per pressió i per temperatura, respectivament. L'ajust dels valors obtinguts en els experiments de desnaturalització a les equacions 2.13 i 2.14 va permetre la determinació dels paràmetres termodinàmics.

2.2.2.1.4. Fluorescència

2.2.2.1.4.1. Condicions de treball

Les mesures de fluorescència de la proteïna salvatge i de la variant Y115W, tant en els experiments de pressió com en els de temperatura, es van dur a terme mitjançant un fluorímetre SLM-AMINCO model Aminco Bowman Series 2. La concentració de proteïna utilitzada va ser de 0.5 mg/mL. La proteïna es va dissoldre en els mateixos amortidors que van ésser emprats en l'espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat (apartat 2.2.2.1.3.1). Les longituds d'ona d'excitació que es van utilitzar per la proteïna salvatge i la variant Y115W van ser respectivament de 265 i de 295 nm (obertura de 8 nm). L'emissió de la fluorescència de les tirosines es va mesurar entre 280 i 400 nm i la del triptòfan entre 315 i 400 nm (obertura de 4 nm, en passos de 1 nm).

2.2.2.1.4.2. Anàlisi termodinàmica dels canvis espectrals

Els espectres de fluorescència, corregits per la seva línia de base, van ésser analitzats mitjançant el càlcul del centre de masses espectral (CSM o $\langle \nu \rangle$) i també per mitjà de la intensitat de fluorescència total enregistrada entre 315 i 400 nm. El CSM es defineix com (Silva i col., 1986; Ruan i Weber, 1989):

$$\langle \nu \rangle = \frac{\sum \nu_i F_i}{\sum F_i} \quad (2.15)$$

on ν_i és el nombre d'ona i F_i és la intensitat de fluorescència a ν_i . Els desplaçaments de l'espectre d'emissió poden ésser emprats a fi de detectar canvis en l'ambient dels grups actius per fluorescència. S'observa un desplaçament cap el vermell quan els cromòfors són transferits cap a un ambient més polar.

Per a la determinació dels paràmetres termodinàmics, la transició de desnaturalització induïda per pressió i per temperatura es va ajustar al mateix model de dos estats utilitzat en l'espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat (apartat 2.2.2.1.3.3).

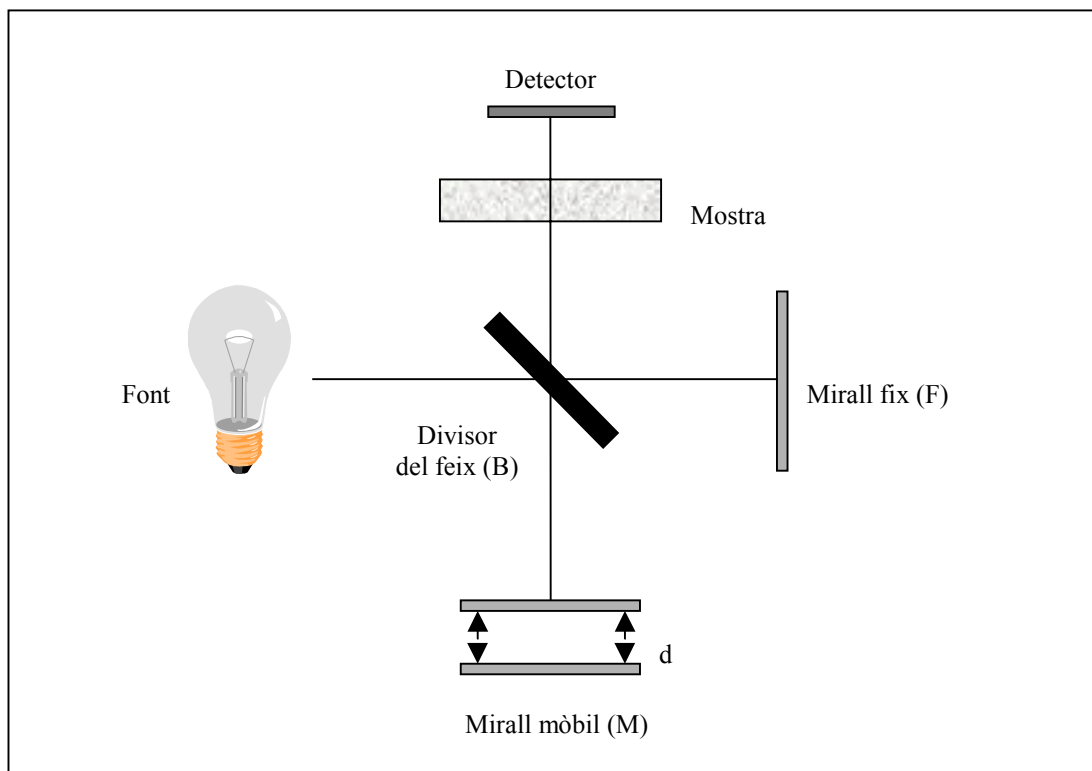
2.2.2.2. Espectroscòpia d'absorció a l'infraroig

2.2.2.2.1. Fonament

L'absorció en la regió visible o ultraviolada de l'espectre genera transicions d'energia elevada entre diferents estats electrònics, mentre que l'absorció en la regió infraroja origina transicions de baixa energia entre diferents nivells vibracionals. Així doncs, l'espectroscòpia d'infraroig permet l'estudi de les vibracions moleculars quan es produeix una interacció de radiació electromagnètica amb la matèria. L'espectre d'infraroig es pot dividir en tres zones diferents: infraroig proper que compren l'interval entre 0.00075 a 0.0025 μm (13330-4000 cm^{-1}), l'infraroig mig de 0.0025 a 0.025 μm (4000-400 cm^{-1}) i l'infraroig llunyà de 0.025 a 1 μm (400-10 cm^{-1}). La informació que dóna un espectre d'infraroig és característica de cada substància, per tant permet caracteritzar molècules amb un cert grau d'especificitat.

Els aparells d'infraroig es divideixen en dues categories: la dispersiva i la no dispersiva. Els instruments dispersius utilitzen un monocromador que dispersa la llum de la font en les seves diverses freqüències. Aquests són similars als espectrofotòmetres dispersius d'ultraviolat i visible, per bé que en la regió de l'infraroig s'empren diferents fonts de radiació i detectors. Els espectrofotòmetres no dispersius, basats en un interferòmetre –com és el cas de l'espectrofotòmetre d'infraroig per transformada de Fourier (Fourier transform infrared, FTIR)– ofereixen una major precisió a l'hora de mesurar la longitud d'ona. El més utilitzat és l'interferòmetre de Michelson, el qual es representa en la FIGURA 2.4.

FIGURA 2.4

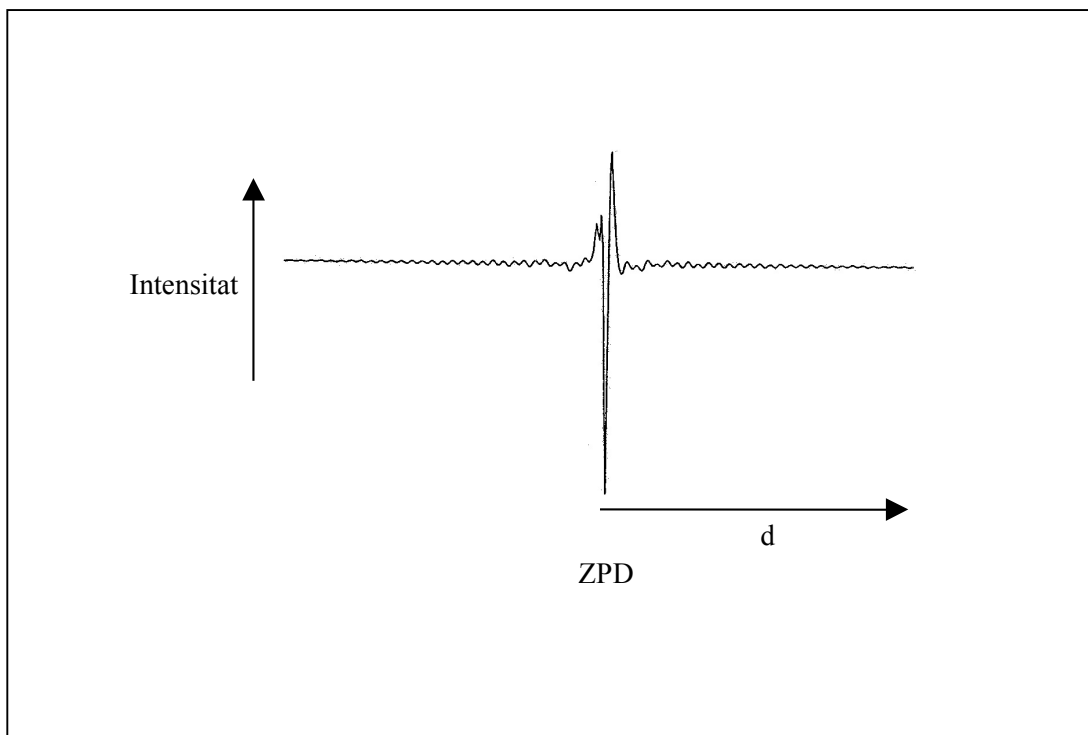


Configuració òptica de l'espectrofotòmetre d'infraroig per transformada de Fourier (interferòmetre).

Aquest aparell consta d'una font i un detector. El que distingeix l'interferòmetre és que entre dos miralls, un de fix (F) i un de mòbil (M), disposats entre si amb un angle de 90° , hi ha una làmina semireflectora divisòria del feix de llum (B). Aquesta làmina, emplaçada amb un angle de 45° , reflecteix el 50% del feix de llum incident, el qual és dirigit cap al mirall mòbil, i transmet el 50% restant vers el mirall fix. Després de la reflexió d'ambdós feixos de llum en els respectius miralls, aquests feixos interfereixen (constructivament o destructiva) en la làmina divisòria, on una altra vegada, la meitat del feix és reflectit i l'altra meitat transmès. El feix de llum reflectit passa a través de la mostra i arriba al detector, generant un interferograma. Un interferograma (FIGURA 2.5) és una representació de la intensitat que resulta de la suma de totes les ones incidents (cada ona es caracteritza per tenir una freqüència determinada englobant així tot l'espectre d'IR) en funció de la diferència de pas òptic, essent aquesta la posició del mirall mòbil.

Les freqüències d'ambdós feixos de llum es troben en fase (interferència constructiva) només quan la distància entre la làmina divisòria i els miralls F i M és iguala. En aquest cas, el senyal en el detector és màxim (punt ZPD de la FIGURA 2.5). En totes les altres posicions del mirall mòbil, les ones estan fora de fase i, per tant, tenen lloc diversos graus d'interferència destructiva. Així doncs, per cada escombrat o desplaçament complet del mirall s'obté un interferograma.

FIGURA 2.5



Representació d'un interferograma. El punt ZPD correspon a aquella posició del mirall on la diferència de pas òptic és igual a zero.

La mostra absorbeix ones amb unes freqüències concretes, consegüentment les amplituds d'aquestes ones disminueixen i per tant l'interferograma canvia. L'anàlisi d'aquestes variacions no és factible a partir d'aquest tipus de representació, per això, les dades interferomètriques es transformen mitjançant un procediment matemàtic anomenat transformació de Fourier. Aquest mètode dona lloc a un espectre d'absorció en funció de la freqüència de les diferents ones incidents.

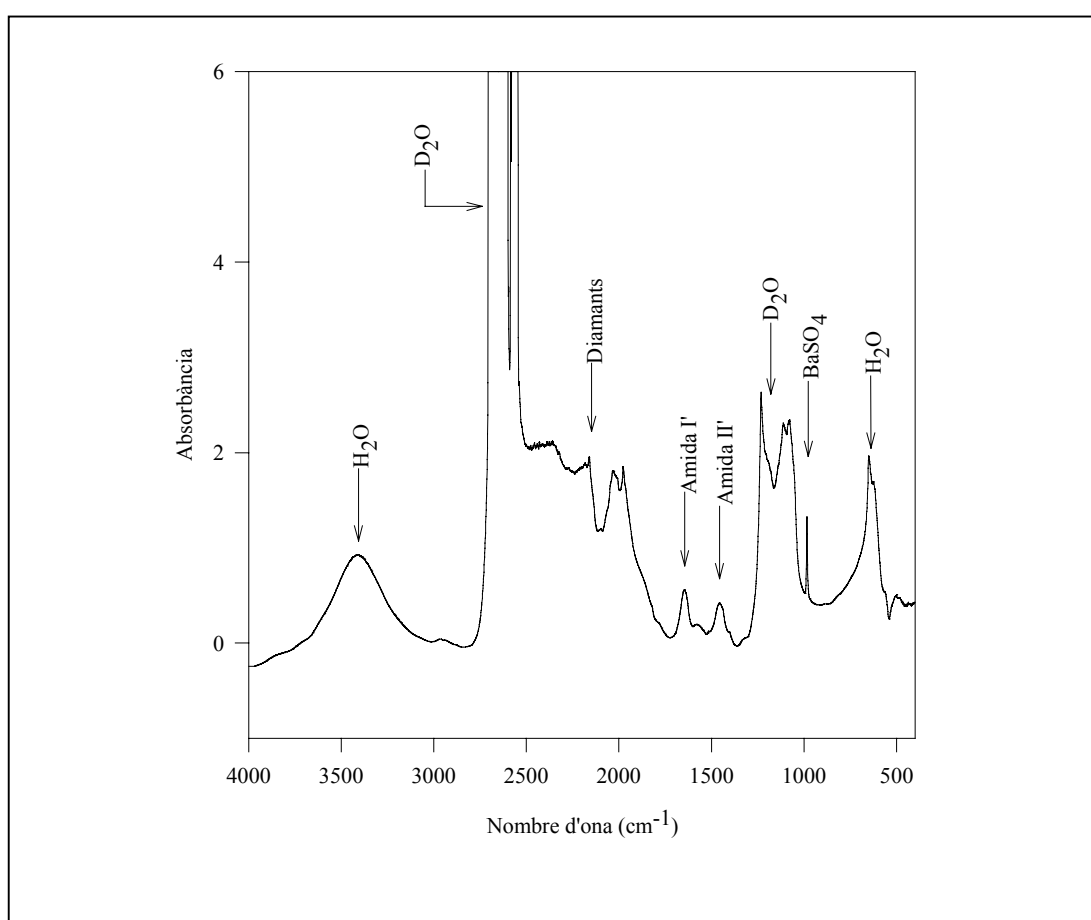
Considerant que certs grups d'àtoms generen bandes vibracionals a una mateixa freqüència, independentment de la molècula on es troben, se solen qualificar aquestes freqüències com a pròpies o característiques del grup químic. La freqüència de vibració de qualsevol d'aquests grups pot ésser alterada per factors inter o intramoleculars, essent l'enllaç pont d'hidrogen intermolecular el factor principal.

Les proteïnes mostren 9 bandes d'absorció característiques en la regió d'infraroig (totes originades per l'enllaç peptídic). Aquestes són les bandes de l'amida A, B, I-VII.

La major part dels treballs s'han dut a terme en la regió de l'amida I, emplaçada entre 1600 i 1700 cm^{-1} . En aquesta regió, l'absorció de la llum infraroja s'origina

principalment per la vibració del moviment d'extensió del grup CO, i amb menor grau pel moviment d'extensió del grup CN i el moviment de doblec o de deformació del grup NH. A causa de la superposició de la banda de l'amida I i la banda de l'aigua (localitzada a 1640 cm^{-1}), aquests tipus d'experiments se solen dur a terme utilitzant com a solvent el D_2O . A fi de discriminar aquestes mesures, quan s'utilitza aquest solvent s'inclou el símbol "prima" quan es mencionen les diferents bandes d'absorció (per exemple: amida I'). La FIGURA 2.6 mostra tot l'espectre d'IR d'una solució de proteïna en D_2O emplaçada en una cel·la DAC.

FIGURA 2.6



Espectre d'IR d'una solució de proteïna en D_2O emplaçada en una cel·la DAC amb l'assignació de les bandes d'absorció característiques.

La banda de l'amida I' està formada per diferents components que se sobreposen, atès que la seva amplada inherent és superior a la resolució de l'instrument. La

utilització de tècniques de millora de la resolució, com ara el tractament mitjançant FSD (*Fourier self-deconvolution*), ha permès separar cadascun d'aquests components. La freqüència exacta d'aquestes vibracions depèn principalment dels ponts d'hidrogen presents en els grups CO i NH i per tant del tipus d'estructura secundària que conté la proteïna. Byler i Susi (1986) van assignar un tipus d'estructura secundària a cadascun d'aquests components situats entre 1600 i 1700 cm^{-1} . Conseqüentment, l'espectroscòpia d'infraroig pot proporcionar informació directa sobre l'estructura macromolecular i, per tant, estimar el contingut dels diferents elements d'estructura secundària. Aquest tipus d'anàlisi sovint coincideix amb la composició d'estructura secundària indicada pels estudis de raigs X.

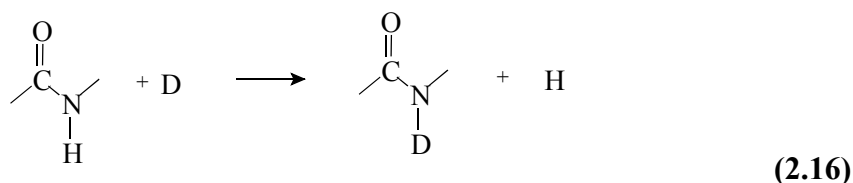
Els components de la banda amida I' que s'emporten dins del marge de l'espectre que s'estén entre 1620 i 1640 cm^{-1} s'atribueixen a l'estructura tipus full plegat β (components de baixa freqüència) (Arrondo i col., 1988). En la regió 1660-1680 cm^{-1} s'observa un sol component d'alta freqüència (Krimm i Bandekar, 1986; Chirgadze i col., 1976 a i b). Les conformacions de tipus hèlix α originen bandes d'absorció en la regió 1648-1660 cm^{-1} (Nevskaya i Chirgadze, 1976). Els pèptids amb una disposició a l'atzar exhibeixen bandes d'absorció al voltant de 1644 cm^{-1} . La major part de les proteïnes també mostren una banda emplaçada a 1633 cm^{-1} , la qual s'assigna a girs d'inversió. En aquells casos en què s'indueix la formació d'agregats quan s'augmenta la temperatura, s'observa l'aparició de dues bandes típiques addicionals: una banda principal a 1618 cm^{-1} i una banda secundària a 1685 cm^{-1} . Aquestes bandes s'assignen a segments peptídics amb cadenes β antiparal·leles formades per enllaços pont d'hidrogen intermoleculars (Ismail i col., 1992). La TAULA 2.3 mostra les freqüències característiques de cada tipus d'estructura secundària. Tanmateix, s'ha de ser prudent a l'hora d'utilitzar aquests valors, atès que sovint s'observen excepcions.

TAULA 2.3

Freqüències característiques en la regió de l'amida I' de diverses conformacions de l'enllaç peptídic (Arrondo i col., 1993)

Conformació	Freqüència amida I' (cm^{-1})
Hèlix α	1648-1660
Full β	1620-1640 (component baixa freqüència)
	1670-1680 (component alta freqüència)
Girs	1660-1700
Estructura desordenada	1640-1648
Full antiparal·lel	1610-1625 i 1675-1695
Hèlix 3_{10}	1660-1670
	1640-1648

Juntament amb l'anàlisi de l'estructura secundària, el règim i el grau de bescanvi d'hidrogen per deuteri és una sonda apropiada per seguir els canvis en l'estructura proteica (equació 2.16). Aquest intercanvi ens proporciona informació de l'accessibilitat al solvent i de l'estabilitat dels enllaços pont d'hidrogen dels protons amida (Wong i Heremans, 1988). En l'espectroscòpia d'infraroig, el bescanvi hidrogen-deuteri pot ésser seguit directament per mitjà de monitoritzar els canvis en la banda de l'amida II (1550 cm^{-1}). La banda amida II s'origina per la vibració del moviment de doblec del grup NH i la substitució de l'enllaç peptídic N-H a N-D resulta en un desplaçament notable de la banda d'absorció ($\sim 100\text{ cm}^{-1}$). A mesura que una proteïna exposa els seus grups enterrats al solvent (D_2O), aquesta banda es desplaça cap a 1450 cm^{-1} . La banda amida I' es troba menys afectada ($\sim 10\text{ cm}^{-1}$) per aquest bescanvi.



Tot i que l'espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat i l'espectroscòpia de fluorescència s'empren per tal de seguir els canvis en l'estructura proteica, aquestes mesures són difícils d'interpretar directament en termes de canvis de l'estructura secundària. Per assolir aquest objectiu ha adquirit molta importància la tècnica d'espectroscòpia d'infraroig. Per bé que el dicroïsmo circular és una tècnica vàlida per seguir la variació d'estructura secundària al llarg del procés de desplegament, aquesta no ha estat utilitzada a causa dels problemes tècnics amb què hom ha topat a l'hora d'adaptar-la a altes pressions.

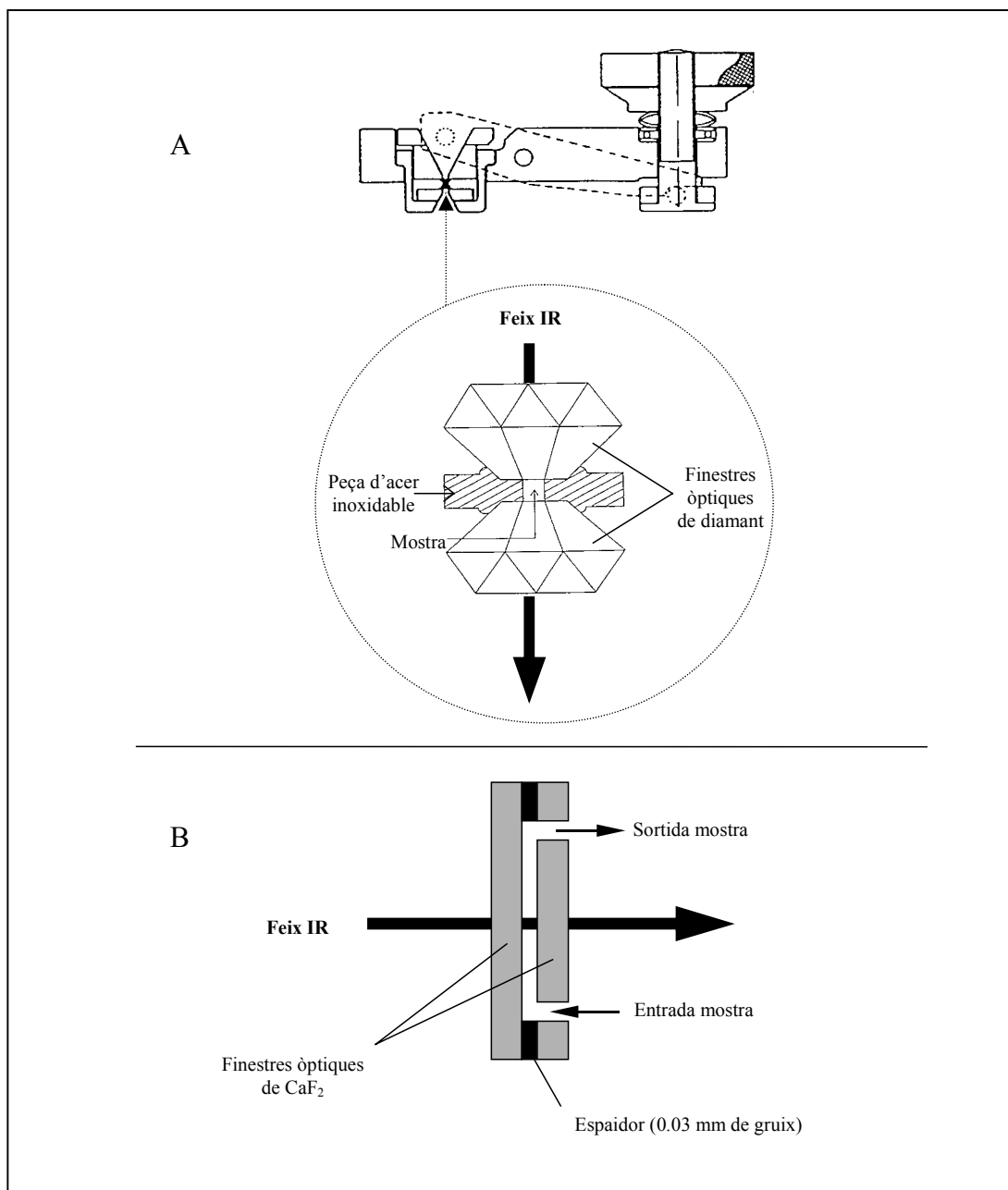
2.2.2.2.2. Equipament d'alta pressió

Pels experiments de pressió, s'ha utilitzat una cel·la d'alta pressió DAC (Sherman i Stadtmuller, 1987), de l'anglès *diamond anvil cell*, fabricada per DIACELL PRODUCTS (Anglaterra), la qual ha estat dissenyada essencialment per aplicacions de caire analític. La dissolució de proteïna es diposita en una obertura de 0.65 mm de diàmetre situada al centre d'una peça d'acer inoxidable. El gruix inicial d'aquesta peça metàl·lica és de 0.05 mm. La pressió es genera per mitjà de l'opressió de dos diamants sobre la mostra. Ambdós diamants, que es localitzen un a cada banda de la peça metàl·lica, actuen també com a finestres òptiques (transparent al llarg d'un marge molt ampli de l'espectre). Aquests es troben ben alineats entre ells, centrats respecte al forat que conté la mostra i col·locats de manera que els seus plans siguin perpendiculars a l'eix òptic. En la FIGURA 2.7.A es mostra un esquema de la cel·la DAC.

La pressió es mesura seguint el desplaçament de la banda de BaSO_4 situada a 983 cm^{-1} (Wong i Moffat, 1989). Convé ressaltar que anteriorment s'havia afegit BaSO_4

a la dissolució de proteïna. L'absorció d'aquest compost, insoluble en aigua, dona lloc a una banda molt accentuada i estreta (FIGURA 2.6), de manera que la seva posició pot ésser determinada de manera molt precisa.

FIGURA 2.7



(A) Representació esquemàtica dels principals components d'una cel·la DAC. Mecanisme de cargol per tal d'oprimir els dos diamants i generar l'alta pressió. Entremig d'ambdós diamants, que actuen com a finestres òptiques, es disposa la peça d'acer inoxidable amb la mostra. (B) Representació esquemàtica d'un tall transversal d'una cel·la de transmissió IR per líquids.

2.2.2.2.3. *Condicions de treball*

Les proteïnes liofilitzades es van dissoldre a una concentració de 75 mg/mL. Pels experiments de pressió es va emprar el tampó MES 50 mM, pD 5.0. Pel que fa als experiments de temperatura, es va utilitzar el tampó acetat sòdic 50 mM, pD 5.0. El pD es va mesurar addicionant 0.4 unitats al valor de pH (Glasoe i Long, 1960). Ambdós tampons van ésser seleccionats tenint en compte que el seus valors de pD són poc dependents de la pressió i de la temperatura, respectivament (Kitamura i Itoh, 1987). Les mostres, una vegada dissoltes, es van incubar tota la nit a temperatura ambient, a fi de garantir que el bescanvi d'hidrogen per deuteri hagués assolit l'equilibri. Els espectres d'infraroig es van enregistrar en funció de la temperatura a pressió atmosfèrica, o en funció de la pressió a 20°C. Els espectres van ésser enregistrat mitjançant un espectrofotòmetre IRTF Bruker IFS66 (Alemanya) equipat amb un detector MCT refrigerat amb nitrogen líquid. El compartiment de la mostra es purgava ininterrompudament amb aire sec. Els espectres d'absorció, enregistrats a una resolució de 2 cm⁻¹, van resultar de la suma de 250 interferogrames. La pressió es va incrementar a raó de 100 MPa per hora. Pel que fa als experiments de temperatura, la dissolució de proteïna es va disposar entre un parell de finestres òptiques de CaF₂, les quals estaven separades per una junta de 0.03 mm de gruix (FIGURA 2.7.B). La temperatura es va incrementar a raó de 0.2°C per minut mitjançant un dispositiu Graseby/Specac (Anglaterra).

2.2.2.2.4. *Millora de la resolució espectral*

Tal i com s'ha esmentat abans, cada tipus d'estructura secundària en una proteïna origina una banda d'absorció característica (component) en la regió de l'amida I'. Un dels problemes principals a l'hora d'aplicar l'espectroscòpia d'infraroig per estudiar la conformació proteica és l'amplada intrínseca d'aquests components que formen la banda amida I', els quals se superposen i no poden ésser separats per bé que s'augmenti la resolució de l'aparell. Aquest fet va limitar les aplicacions de l'espectroscòpia d'infraroig en l'estudi de sistemes biològics complexos fins que es van desenvolupar els mètodes matemàtics FSD (*Fourier self-deconvolution*) i la derivació. Aquests procediments van fer possible, de manera artificial, estrènyer l'amplada dels diferents components presents en la banda d'absorció d'infraroig. En aquest treball, s'ha emprat el mètode FD (Kauppinen i col., 1981).

2.2.2.2.5. *Anàlisi dels canvis espectrals*

Els canvis en l'estructura proteica vénen reflectits pels canvis en els seus espectres. Aquestes variacions espectrals poden ésser utilitzats per estudiar l'estabilitat proteica. Una anàlisi més detallada ens permet seguir els canvis en l'estructura secundària. Dit d'una altra manera, la informació que s'obté per espectroscòpia d'infraroig es pot analitzar des de dues perspectives diferents. D'una banda, des d'un punt de vista termodinàmic i d'altra banda, des d'un punt de vista estructural. A fi de dur a terme una anàlisi termodinàmica, es representen els canvis

que es promouen, durant el procés de desnaturalització per pressió o per temperatura, en les intensitats relatives de les bandes espectrals, en la seva amplada o en la seva posició. L'ajust dels espectres d'absorció en la regió amida I' per mitjà de corbes gaussianes dóna lloc a una anàlisi que proporciona informació més estructural.

2.2.2.2.5.1. Anàlisi termodinàmica

Un espectre d'infraroig d'una proteïna és representatiu de la seva estructura secundària. L'anàlisi de les característiques generals d'una banda d'absorció ens permet obtenir informació general sobre l'estructura global de la proteïna.

Si es representen les intensitats relatives de les bandes espectrals, la seva amplada o el desplaçament del màxim d'una banda en funció de la pressió o de la temperatura, s'obtenen corbes sigmoïdals pròpies d'un procés de desnaturalització en dos estats, les quals es van ajustar respectivament a les equacions 2.22 i 2.23.

La constant d'equilibri observada K_{obs} es pot definir com:

$$K_{obs} = \frac{f_D}{(1-f_D)} = \frac{y_N - y}{y - y_D} \quad (2.17)$$

on f_D representa la fracció de molècules en l'estat desnaturalitzat, y és el valor de l'observable que es determina en la transició i y_N i y_D són els valors per l'estat inicial (natiu) i final (desnaturaletzat).

La dependència de la K_{obs} respecte a la temperatura i la pressió ve donada per l'equació de van't Hoff (2.18) i l'equació de Planck (2.19):

$$d \ln K_{obs} / d T = \Delta H / R T^2 \quad (2.18)$$

$$d \ln K_{obs} / d p = -\Delta V / R T \quad (2.19)$$

Substituint l'equació 2.17 en les dues equacions anteriors s'obté:

$$y_N - y = y - y_D \left(e^{\left(\frac{-\Delta H}{RT} + ct \right)} \right) \quad (2.20)$$

$$y_N - y = y - y_D \left(e^{\left(\frac{-p\Delta V}{RT} + ct \right)} \right) \quad (2.21)$$

La fracció y es pot escriure per ambdues equacions com:

$$y = \frac{y_N + y_D \left(e^{\left(\frac{-\Delta H}{RT} + ct \right)} \right)}{1 + e^{\left(\frac{-\Delta H}{RT} + ct \right)}} \quad (2.22)$$

$$y = \frac{y_N + y_D \left(e^{\left(\frac{-p\Delta V}{RT} + ct \right)} \right)}{1 + e^{\left(\frac{-p\Delta V}{RT} + ct \right)}} \quad (2.23)$$

2.2.2.2.5.2. Anàlisi estructural

La predicció d'estructura secundària es va dur a terme per mitjà de combinar dos mètodes: l'FSD (*Fourier self-deconvolution*) i un ajust de la banda amida I' per mitjà de corbes gaussianes (Byler i Susi, 1986; Harris i Chapman, 1995). L'FSD és un mètode matemàtic que s'utilitza a fi d'evitar la superposició dels components de la banda amida I'. O sigui, els components es fan més estrets i per tant, millora la resolució. Aquest tractament matemàtic es va portar a terme amb un programa integrat en el mateix aparell. Es van emprar els següents paràmetres (Smeller i col., 1995): 21 cm⁻¹ d'amplada de banda a mitja alçada i 1.7 de factor de millora en la resolució.

L'espectre FSD, pot ésser utilitzat per analitzar quantitativament cadascun dels components que formen la banda amida I'. Per això, s'utilitzen corbes gaussianes que representen aquests components. L'ajust iteratiu de la banda amida I' per mitjà de modificar l'alçada, l'amplada i la posició de corbes gaussianes es va dur a terme amb el programa PROTEIR (Smeller i col., 1995). Es va assumir que les àrees relatives de les corbes gaussianes assignades als diferents tipus d'estructura secundària eren una estimació dels percentatges d'aquestes estructures en la proteïna (Byler i Susi, 1986).

Aquest procediment presenta diversos inconvenients i s'ha de destacar que convé ser caut a causa del que s'exposa a continuació: en primer lloc, la falta d'unicitat en l'assignació i en l'ajust de les bandes promou certs dubtes sobre els resultats obtinguts per aquest mètode; en segon lloc, aquest mètode assumeix, sense verificar, que l'absorció molar dels diferents components que s'assignen a les diferents conformacions d'estructura secundària és la mateixa (aquesta assumpció és necessària a fi de dur a terme una anàlisi quantitativa basada en les àrees de les corbes gaussianes); i en darrer lloc, donat l'elevat nombre de paràmetres que es poden arranjar, aquest ajust presenta un elevat grau de subjectivitat.

No obstant això, si s'utilitza apropiadament, aquest mètode proporciona una eina per diagnosticar i seguir, en termes relatius, la naturalesa dels canvis en la conformació de l'esquelet polipeptídic (Surewicz i col., 1993).

En definitiva, l'objectiu d'aquest ajust és simular l'espectre observat a partir de la suma de diferents corbes gaussianes. L'àrea d'aquestes corbes gaussianes s'empra per determinar la quantitat d'estructura secundària que representa.

Amb la finalitat de comparar si hi havia diferències qualitatives, per una banda, entre els estats nadius de les variants, i de l'altra, entre els estats desnaturalitzats, es va normalitzar cadascun dels espectres mitjançant la corresponent absorbància

mínima i l'absorbància màxima resultant. Per això, en primer lloc, es va sotstreure el valor de mínima absorbància de l'espectre, a tot l'espectre en qüestió. En segon lloc, l'espectre resultant es va dividir per la seva absorbància màxima, donant lloc a un espectre normalitzat entre 0 i 1.

2.2.3. Tècniques utilitzades per al seguiment de la desnaturalització induïda per urea

2.2.3.1. Espectroscòpia de fluorescència

2.2.3.1.1. Fonament

Tal i com s'ha esmentat en l'apartat 2.2.2.1.1, la fluorescència és sensible als canvis d'estructura terciària, és a dir, depèn del canvi d'entorn de les cadenes laterals d'aminoàcids aromàtics, sobretot del triptòfan i tirosina. El rendiment quàntic pot augmentar o disminuir durant la desnaturalització, de manera que una proteïna plegada pot tenir més o menys fluorescència que la mateixa proteïna a l'estat desnaturalitzat (Royer, 1995). Concretament, l'RNasa A desnaturalitzada té una fluorescència intrínseca més elevada que la proteïna nativa (Pace, 1990). La magnitud de la fluorescència no és informativa per ella mateixa, però pot servir com a sonda sensible a qualsevol pertorbació de l'estat natiu.

2.2.3.1.2. Condicions de treball

Per començar, es preparen tres solucions:

- Solució estoc d'agent desnaturalitzant: Urea 9 M en acetat sòdic 50 mM (pH 5.0)
- Solució tampó: Acetat sòdic 50 mM (pH 5.0)
- Solució de proteïna 2 mg/mL en acetat sòdic 50 mM (pH 5.0)

Les dues primeres solucions es van filtrar amb unitats de filtració (Millipore, EUA) de 0,22 µm de diàmetre de porus i seguidament es van degasificar.

Després, es preparen volumètricament una sèrie de solucions amb una quantitat creixent d'urea, barrejant un volum fix de la solució estoc de proteïna amb el volum apropiat de les solucions estoc d'urea i tampó per arribar a la concentració d'agent desnaturalitzant desitjada. Les proporcions assajades en aquest treball es mostren a la TAULA 2.4.

TAULA 2.4

Exemple de preparació de les solucions experimentals per una corba de desnaturalització típica mesurada per fluorescència.

Urea (μ l) ^a	Tampó (μ l) ^b	Proteïna (μ l) ^c	Urea (M) ^d
950	0	50	8.55
925	25	50	8.325
900	50	50	8.1
875	75	50	7.875
850	100	50	7.65
825	125	50	7.425
800	150	50	7.2
750	200	50	6.75
700	250	50	6.3
675	275	50	6.075
650	300	50	5.85
600	350	50	5.4
575	375	50	5.175
550	400	50	4.95
500	450	50	4.5
450	500	50	4.05
400	550	50	3.6
350	600	50	3.15
300	650	50	2.7
250	700	50	2.25
200	750	50	1.8
150	800	50	1.35
100	850	50	0.9
50	900	50	0.45
0	950	50	0

^a solució d'urea 9 M en acetat sòdic 50 mM (pH 5.0)

^b solució tampó acetat sòdic 50 mM (pH 5.0)

^c solució de proteïna 2 mg/mL en acetat sòdic 50 mM (pH 5.0)

^d Molaritat d'urea final a l'assaig

Convé destacar que les solucions d'urea es descomponen lentament per formar cianat i ions amoni. Atès que els ions cianat són capaços de modificar químicament els grups amí d'una proteïna, les solucions d'urea van ser preparades al moment.

A continuació, les diferents solucions experimentals es van incubar tota la nit a 37°C. Per tal d'enregistrar la intensitat de fluorescència, es va emprar un espectrofluorímetre Perkin Elmer LS50 (USA) amb cambra de cubetes termostatitzada a 37°C i una cubeta de quars de 1 mL de capacitat i 1 cm de pas de llum. Es va utilitzar una pipeta Pasteur per dipositar i extreure cadascuna de les solucions de la cubeta, anant amb cura de no ratllar les parets d'aquesta. Després de realitzar la mesura de fluorescència, les cubetes es van rentar amb aigua destil·lada i amb metanol de grau HPLC a fi d'accelerar l'evaporació i, així, minimitzar el volum de solució que hi pogués restar.

2.2.3.1.3. Anàlisi de les corbes de desnaturalització

Les dades de desnaturalització enregistrades en l'equilibri s'han analitzat utilitzant el model de Clarke i Fersht (1993). Està comprovat experimentalment que l'energia lliure de desplegament d'una proteïna en presència d'agent desnaturalitzant (ΔG) és linealment dependent de la concentració d'agent desnaturalitzant (Pace, 1986). Per tant,

$$\Delta G = \Delta G_{(H_2O)} - m \cdot [D] \quad (2.24)$$

on $\Delta G_{(H_2O)}$ és el valor de l'energia lliure aparent de desnaturalització en absència d'agent desnaturalitzant, $[D]$ és la concentració d'agent desnaturalitzant, i m ($= \delta \Delta G / \delta [D]$) és la pendent de la transició. La constant d'equilibri de desplegament (K_u) a una determinada concentració d'agent desnaturalitzant es calcula com

$$K_u = (y_f - y_{obs}) / (y_{obs} - y_u) \quad (2.25)$$

on y_f i y_u són la fluorescència de la forma plegada i desplegada respectivament, i y_{obs} la fluorescència mesurada. y_f i y_u es consideren que són linealment dependents amb la concentració d'agent desnaturalitzant (Horovitz i col, 1992). Per tant,

$$y_f = \alpha_f + \beta_f \cdot [D] \quad (2.26)$$

$$y_u = \alpha_u + \beta_u \cdot [D] \quad (2.27)$$

on α_f i α_u són els talls amb l'eix de les y , i β_f i β_u els pendents de les línies base a baixa concentració i a alta concentració d'agent desnaturalitzant respectivament.

Combinant aquestes equacions, i assumint que y_f i y_u varien linealment amb la concentració d'urea, la dependència de la fluorescència mesurada amb la concentració d'agent desnaturalitzant ve donada per:

$$y_{obs} = [(\alpha_f + \beta_f [D]) + (\alpha_u + \beta_u [D]) e^{-\{(\Delta G_{(H_2O)} - m \cdot [D]) / RT\}}] / [1 + e^{-\{(\Delta G_{(H_2O)} - m \cdot [D]) / RT\}}] \quad (2.28)$$

$$y_{obs} = [(\alpha_f + \beta_f [D]) + (\alpha_u + \beta_u [D]) e^{\{(m \cdot [D] - \Delta G_{(H_2O)}) / RT\}}] / [1 + e^{\{(m \cdot [D] - \Delta G_{(H_2O)}) / RT\}}] \quad (2.29)$$

A una concentració d'agent desnaturalitzant en la qual el 50% de la proteïna està desplegada, $[D] = [D]_{1/2}$, és evident a partir de l'equació 2.24 que:

$$(K_u = 1 \Rightarrow \Delta G = 0)$$

$$\Delta G_{(H_2O)} = m \cdot [D]_{1/2} \quad (2.30)$$

i per tant,

$$y_{obs} = [(\alpha_f + \beta_f [D]) + (\alpha_u + \beta_u [D]) \cdot e^{\{m([D] - [D]_{1/2}) / RT\}}] / [1 + e^{\{m([D] - [D]_{1/2}) / RT\}}] \quad (2.31)$$

L'equació utilitzada per ajustar les dades representades de manera normalitzada, es pot obtenir a partir del següent desenvolupament matemàtic:

$$F_U = (y_f - y_{\text{obs}}) / (y_f - y_u) \quad (2.32)$$

$$F_U = ((\alpha_f + \beta_f \cdot [D] - y_{\text{obs}}) / ((\alpha_f + \beta_f \cdot [D]) - (\alpha_u + \beta_u \cdot [D]))) \quad (2.33)$$

$$F_U = (\alpha_f + \beta_f \cdot [D]) - [(\alpha_f + \beta_f \cdot [D]) + (\alpha_u + \beta_u \cdot [D]) \cdot e^{\{m([D] - [D]_{1/2}) / RT\}}] / [1 + e^{\{m([D] - [D]_{1/2}) / RT\}}] / ((\alpha_f + \beta_f [D]) - (\alpha_u + \beta_u \cdot [D])) \quad (2.34)$$

Considerant que els coeficients α_f , β_f i β_u són zero i α_u és igual a 1, és a dir, que en absència d'agent desnaturalitzant $F_U = 0$ i en presència d'agent desnaturalitzant a la màxima concentració emprada $F_U = 1$, aleshores,

$$F_U = [e^{\{m([D] - [D]_{1/2}) / RT\}}] / [1 + e^{\{m([D] - [D]_{1/2}) / RT\}}] \quad (2.35)$$

$$F_U = 1 / (1 + e^{\{-m \cdot ([D] - [D]_{1/2}) / RT\}}) \quad (2.36)$$

Ajustant les dades a l'equació 2.31 o 2.36 mitjançant una anàlisi no lineal de mínims quadrats, es poden trobar els valors de m i $[D]_{1/2}$. A partir d'aquests dos valors es pot calcular l'energia lliure aparent de desnaturalització en absència d'agent desnaturalitzant, segons l'equació 2.30.

2.2.3.2. Electroforesi en gel de poliacrilamida amb gradient transversal d'urea

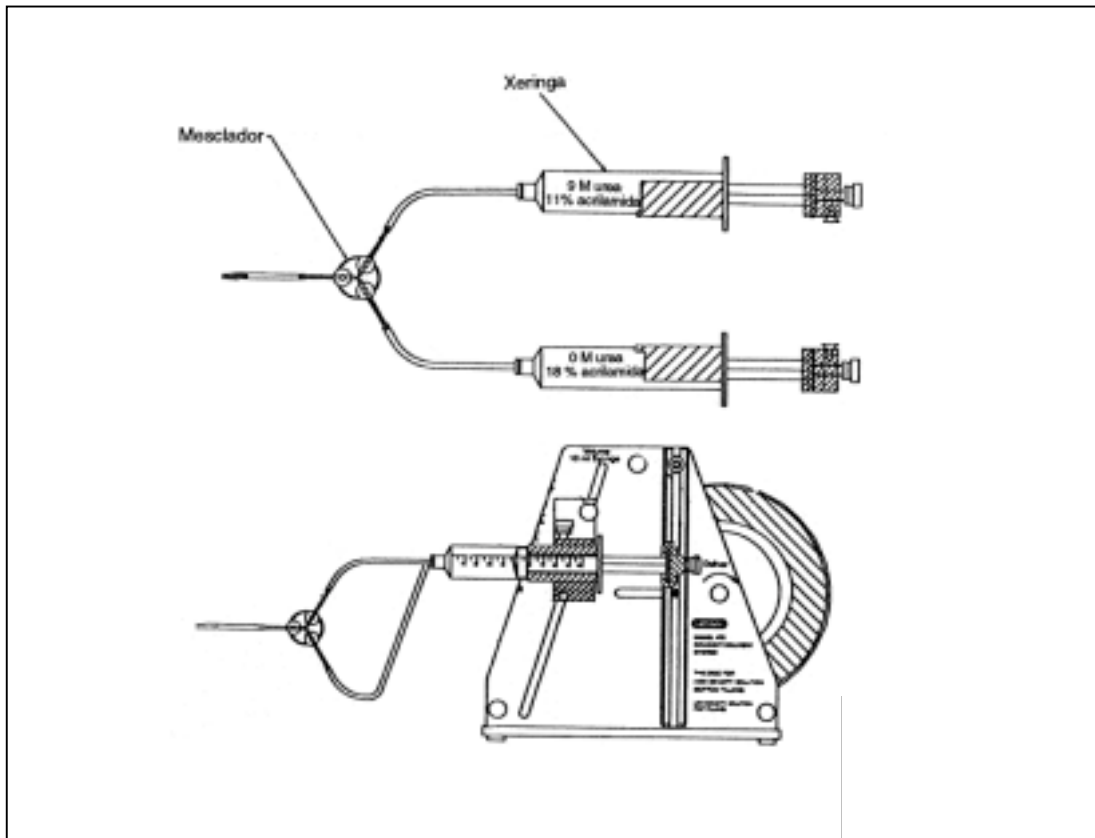
2.2.3.2.1. Fonament

Un dels paràmetres de diagnosi de l'estat desnaturalitzat de les proteïnes és la seva dimensió, la qual s'expressa generalment per mitjà del volum hidrodinàmic. Una estimació del volum hidrodinàmic d'una proteïna es pot obtenir per la seva mobilitat a través d'un gel de poliacrilamida (Goldenberg i Creighton, 1984; Creighton, 1993). La tècnica de l'electroforesi en gel de poliacrilamida amb gradient transversal d'urea (Creighton 1979a,b, 1980, 1986, 1994) és idònia per estudiar la conformació d'una proteïna al llarg del procés de desnaturalització. Atès que la mostra de proteïna que s'aplica al llarg de la superfície superior del gel migra sota les diferents condicions del gradient d'urea (perpendicular a la direcció de l'electroforesi), aquesta tècnica ens proporciona una mesura contínua de la mobilitat electroforètica (conformació proteica) en funció de la concentració d'agent desnaturalitzant.

2.2.3.2.2. Equipament

L'utilitatge que es va emprar va ser el D GENE™ Denaturing Gel Electrophoresis System de BIO-RAD (EUA). Per tal de formar un gel de poliacrilamida amb un gradient d'urea perpendicular a la direcció de migració de la mostra es va utilitzar el Model 475 Gradient Delivery System de BIO-RAD (EUA) (FIGURA 2.8).

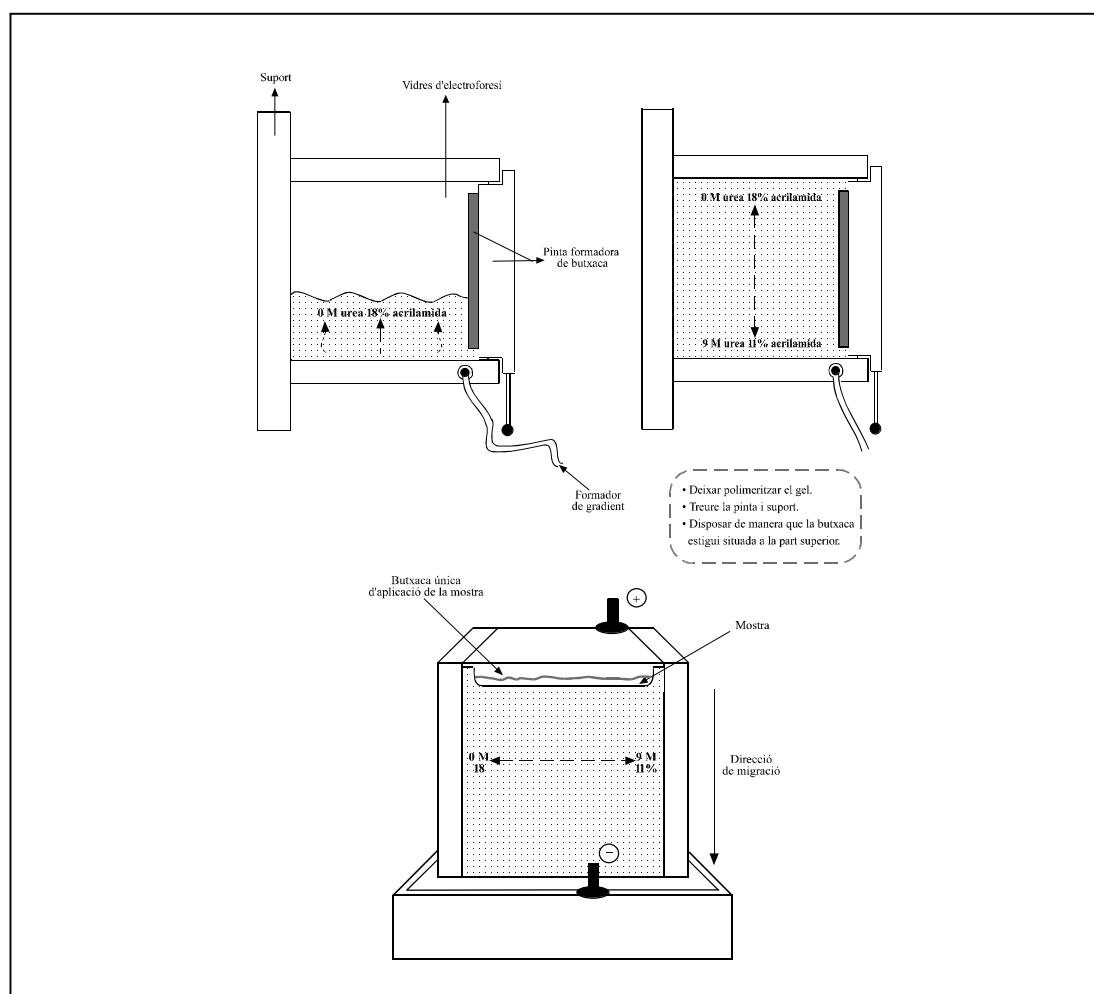
FIGURA 2.8



Esquema del Model 475 Gradient Delivery System de BIO-RAD (EUA). És un sistema capaç de formar un gel de poliacrilamida amb gradients lineals reproduïbles, per mitjà d'impel·lir i barrejar la solució d'alta i baixa densitat sense necessitat d'utilitzar una bomba peristàtica ni un agitador magnètic.

A la FIGURA 2.9 s'esquematitza el procediment per formar un gel de poliacrilamida amb gradient transversal d'urea.

FIGURA 2.9



Representació esquemàtica de la formació d'un gel amb gradient d'urea. (A-B) El formador de gradient impulsa i barreja les solucions d'alta i baixa densitat. Es genera un gradient lineal per mitjà d'un sistema de càrrega inferior. Es deixa polimeritzar el gel, es retira la pinta formadora de la butxaca i el suport i es porten a terme els arranjaments necessaris a fi de disposar el gel dins la cambra d'electroforesi, amb la butxaca situada a la part superior per tal d'aplicar la mostra (C).

2.2.3.2.3. Condicions de treball

Donat que la urea és un compost inestable (forma cianats que poden reaccionar amb els grups amí de les proteïnes), es va emprar urea d'alt grau de puresa i les solucions van ser preparades immediatament abans de ser utilitzades.

S'ha observat que la presència de concentracions creixents d'urea produeix una disminució continua de la mobilitat electroforètica de la proteïna, amb la consegüent absència d'una transició real de desnaturalització, a causa d'un augment en la viscositat de la solució i del canvi en les propietats de separació del gel. Tanmateix,

2. Material i mètodes

per compensar aquest efecte se sobreposa al gradient d'urea un gradient invers de concentració d'acrilamida. En aquest treball es va assajar un gradient lineal d'acrilamida del 18% (p/v) a 0 M d'urea i de l'11% (p/v) a 9 M d'urea. Aquest gradient proporcionava una mobilitat constant al lisozim al llarg de totes les concentracions d'urea. Aquesta proteïna es va utilitzar per verificar la correcta formació del gradient, ja que a les condicions de temperatura i pH emprades, es mantenia plegada fins i tot a 9 M urea. Així, si el gradient s'havia format correctament, la banda del lisozim havia d'ésser continua i de mobilitat constant al llarg del gradient. Aquesta proteïna es va aplicar al mateix gel on es va aplicar la proteïna en estudi. Si bé, per evitar que es produís una superposició, el lisozim es va aplicar 1 hora abans d'acabar l'electroforesi.

Dissolucions mare

DISSOLUCIÓ A: Acrilamida 30%-bisacrilamida 0.19%

Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0.19 g
Aigua Milli-Q	fins a 100 mL

DISSOLUCIÓ B: Amortidor Tris-acetat 0.05 M (pH 4.0) (10x)

Àcid acètic	1.43 mL
Aigua Milli-Q	fins a 50 mL

Ajustar el pH de la solució a 4.0 amb Tris 4 M.

Es van preparar gels amb unes dimensions de 16 cm x 16 cm x 1 mm i amb un volum total de 30 mL, a partir de les següents dissolucions:

DISSOLUCIÓ DE BAIXA DENSITAT (0 M urea, 18% acrilamida):

Dissolució A (acrilamida 30%-bisacrilamida 0.19%)	10.2 mL
Dissolució B (amortidor 10x)	1.7 mL
Aigua Milli-Q	5.1 mL

• Per polimeritzar el gel, afegir:

TEMED	14 µL
Persulfat amònic (Na ₂ S ₂ O ₈) 10% (p/v)	70 µL

DISSOLUCIÓ D'ALTA DENSITAT (9 M urea, 11% acrilamida):

Urea	13.52 g
Dissolució A (acrilamida 30%-bisacrilamida 0.19%)	9.17 mL
Dissolució B (amortidor 10x)	2.5 mL

- Després de dissoldre la urea escalfant i amb agitació, afegir:
Aigua Milli-Q fins a 25 mL
- Per polimeritzar el gel, agafar 17 mL d'aquesta barreja i afegir:
TEMED 14 µL
Persulfat amònic (Na₂S₂O₈) 10% (p/v) 70 µL

Com a amortidor d'elució d'electroforesi es va utilitzar el Tris-acetat 50 mM (pH 4.0) (àcid acètic 50 mM ajustat a pH 4.0 amb Tris). La cubeta d'electroforesi tenia una capacitat aproximada de 6.5 L.

A fi de preparar l'amortidor d'aplicació de mostres, es va barrejar:

Tris-acetat 50 mM (pH 4.0)	47 mL
Glicerol	3 mL
Verd de metil	0.1 g

Preparació de la mostra, aplicació i electroforesi:

Abans d'aplicar la mostra, es va fer una pre-electroforesi per tal d'eliminar qualsevol espècie carregada que pogués haver-se originat per la descomposició de la urea o pel procés de polimerització, així com per permetre que l'amortidor d'elució assolís els 37°C de temperatura, la qual havia estat prèviament seleccionada mitjançant el termòstat de l'aparell. Durant la pre-electroforesi una petita part de la urea difon a la part superior del gel de manera que pot dificultar l'aplicació i la migració de la mostra. Aquesta urea i les restes d'acrilamida que solen romandre quan es retira la pinta formadora de la butxaca es van retirar fàcilment amb una xeringa.

Mitjançant una xeringa Hamilton, es van aplicar uns 90 µg de proteïna en un volum de 150 µL de tampó d'aplicació en una única butxaca de 15 cm d'amplada (10 µL/cm).

Les electroforesis es van fer córrer a 37°C de temperatura i amb un voltatge de 280 V durant un temps òptim que es va determinar empíricament (entre 4 i 5 hores). D'una banda, si el temps d'electroforesi és molt curt, la diferència de mobilitat entre la forma nativa i la forma desnaturalitzada no és prou gran per tal de definir clarament una transició de desnaturalització. Per altra banda, les electroforesis molt llargues no proporcionen millors resultats ja que la difusió de la banda de proteïna contraresta qualsevol guany en la separació.

Tinció

1. Cobrir el gel amb una dissolució de Blau de Coomasie (vegeu Apèndix) durant un mínim de 15 minuts.
2. Eliminar la solució de tinció i dur a terme diversos rentats amb àcid acètic al 7%. Els gels poden conservar-se per temps prolongats en aquesta solució. Aquesta solució també permet la descoloració total del gel.

Ambdues etapes es van dur a terme a temperatura ambient i amb agitació suau.

2.2.3.2.4. Anàlisi de les corbes de desnaturalització

Bàsicament, es tracta d'aplicar el model de Clarke i Fersht que es va emprar per analitzar les corbes de desnaturalització per urea monitoritzades mitjançant fluorescència i que s'exposen en l'apartat 2.2.3.1.3, però substituint el paràmetre intensitat de fluorescència per la mobilitat electroforètica. El procediment que es va seguir s'exposa de manera detallada a l'apartat corresponent de resultats i discussió (apartat 3.5.4.2.2).

3. *Resultats i discussió*

3.1. **Elecció dels residus a substituir: criteris seguits**

Darrerament, l'RNasa A ha estat una proteïna molt estudiada mitjançant tècniques d'enginyeria de proteïnes, no només per intentar resoldre les relacions entre estructura i funció (Cuchillo i col., 1987; Raines, 1988), sinó també per les seves possibles aplicacions com a agent terapèutic (Leland i col., 1998). Tanmateix, fins al moment i pel que coneixem, no s'han generat variants de l'RNasa A amb la finalitat de realitzar estudis que permetin establir un lligam entre l'estructura i el plegament (a banda de variants dels residus de cisteïna i prolina).

Atès que conèixer el nexa entre estructura i plegament de les proteïnes és un dels requisits per poder encarar altres estudis, com ara la modificació de les propietats de proteïnes naturals o la síntesi *de novo* de proteïnes no presents en la natura, aquest és un camp d'estudi molt captivador. En aquest sentit, si aprofitem el grau de coneixement que hom té de l'RNasa A, aquesta proteïna pot ésser un bon model per dur a terme aquest tipus d'estudis.

Per l'RNasa A s'ha suggerit l'existència de diferents CFIS al llarg de la cadena polipeptídica que indueixen a la formació de regions amb cert grau d'estructura en les primeres etapes del procés de plegament (Matheson i Scheraga, 1978; Nemethy i Scheraga, 1979). S'ha proposat que un dels CFIS més estables s'estén des del residu 106 al 118 (Beals i col., 1991; Dodge i Scheraga, 1996), una regió molt hidrofòbica de la proteïna que constitueix en l'estat natiu, tal i com s'il·lustra en la FIGURA 3.1.A, una estructura tipus forca, la qual s'integra dins d'una estructura en full β formada per 4 cadenes β antiparal·leles (Wlodawer i col., 1988).

Els protons amida d'aquesta regió presenten una protecció notable enfront d'un bescanvi H-D durant el procés de desplegament de la proteïna (Zhang i col., 1995; Talluri i Sheraga, 1990; Robertson i Baldwin, 1991; Nash i col., 1996; Neira i col., 1999) i així mateix, una protecció primerenca en els primers estadis de plegament (Udgaonkar i Baldwin, 1995). En relació amb la seqüència d'aminoàcids i la polaritat, aquesta regió es troba molt conservada al llarg de la superfamília de les ribonucleases (Beintema i col., 1997). Aquests fets corroboren la importància d'aquesta regió en el manteniment de l'estructura i possiblement en el plegament de l'RNasa A.

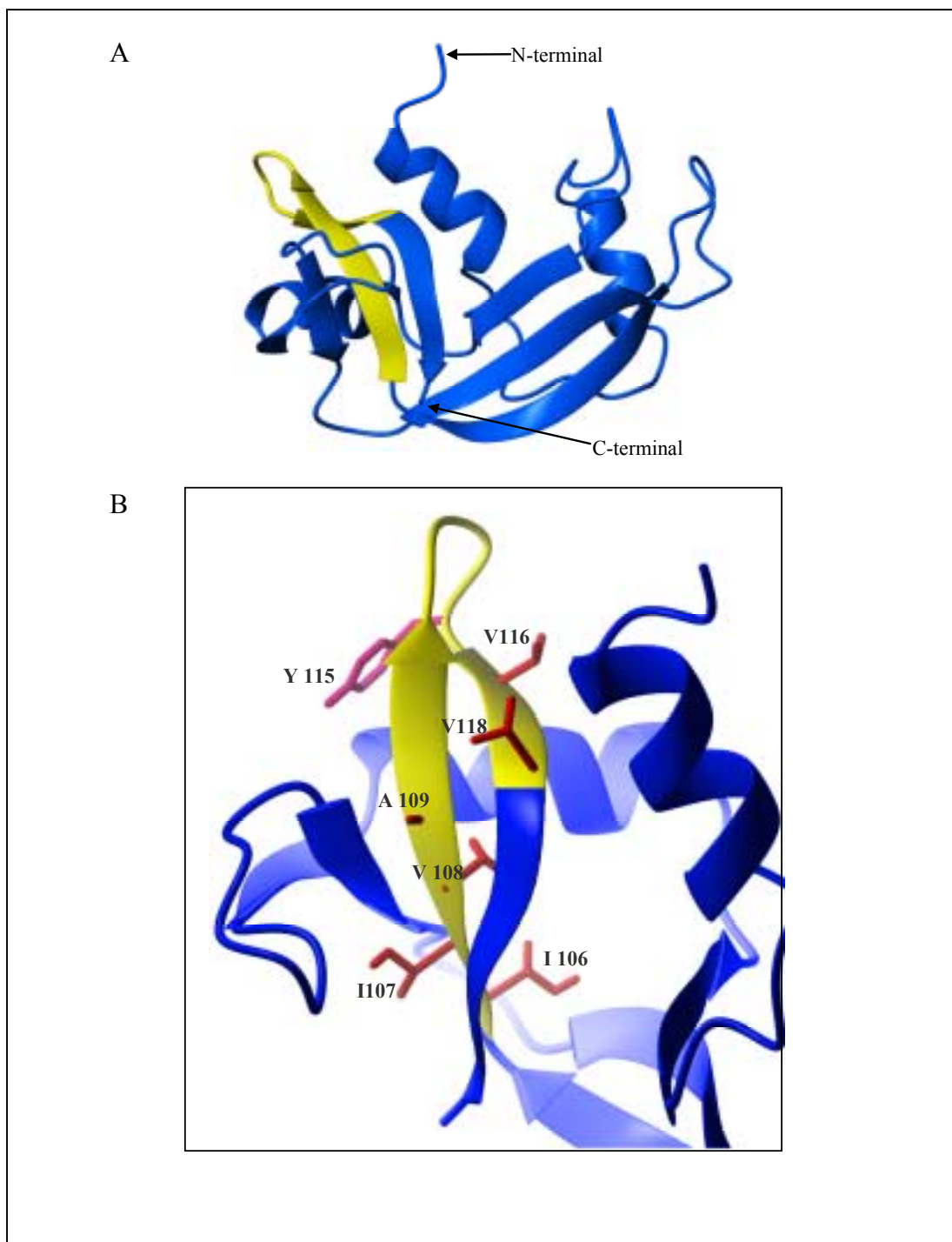
L'estructura inicial que es forma en els CFIS es troba en ràpid equilibri amb l'estat desplegat i promou l'etapa inicial, no limitant, del plegament. Tot i la diversitat de fases de replegament que s'originen de la isomerització *cis-trans* dels enllaços peptídics X-Pro, s'ha observat que els intermediaris que es formen en les etapes inicials del procés de replegament presenten al voltant de la regió 106-118 protons amida protegits de l'intercanvi H-D i certa estructura secundària (Zhang i col., 1995).

Com s'ha plantejat en els objectius d'aquest treball, per tal de provar la contribució de la regió 106-118 en l'estabilitat de la proteïna, i la importància de la hidrofobicitat, la mida i la forma de les diferents cadenes laterals alifàtiques tant en l'estabilitat com en el procés de plegament/desplegament, es van proposar variants de l'RNasa A que afectaven puntualment les posicions 106-109, 116 i 118 (FIGURA 3.1.B).

La major part de les substitucions puntuals proposades són conservatives, és a dir, delecions no disruptives de grups metil/metilè en aquestes cadenes laterals, amb la qual cosa es buscava minimitzar els reordenaments estructurals i la possible contribució d'efectes estèrics.

Així doncs, les cadenes hidrocarbonades dels residus alifàtics es va escurçar sistemàticament. Els reemplaçaments d'isoleucina per leucina que es van proposar suposen una excepció. Donat que aquestes cadenes laterals presenten quasi bé la mateixa mida, però tenen una distribució espacial dels grups metil/metilè diferent, les substitucions d'isoleucina per leucina podrien provocar canvis en l'ambient on es troba la cadena lateral i proporcionar informació complementària de la flexibilitat conformacional a nivell local.

FIGURA 3.1



(A) Representació esquemàtica de l'estructura tridimensional de l'RNasa A on es mostra l'emplaçament de la regió 106-118 (color groc). (B) Detall de la regió C-terminal on es presenten, en vermell, les cadenes laterals hidrofòbiques que han estat substituïdes en aquest treball. La cadena lateral de la tirosina115 es mostra de color rosa.

Ja que la majoria de les substitucions proposades introdueixen una cavitat en la regió estudiada, aquestes eren, *a priori*, un bon model per comparar els efectes de les altes pressions sobre l'estructura proteica amb relació als efectes produïts per la temperatura.

Així doncs, es van obtenir les següents proteïnes variants: I106A/L/V, I107A/L/V, V108A/G, A109G, V116A/G, V118A/G.

D'altra banda i per tal d'aconseguir més informació de la regió 106-118 de l'RNasa A, es va reemplaçar la Tyr115 per un triptòfan (FIGURA 3.1.B). Aquest residu es troba en un gir d'inversió β de tipus VI, que s'estén de la Gly112 a la Tyr115 (Wlodawer i col., 1988). D'entrada, atès que l'RNasa A no conté cap residu de triptòfan, aquest reemplaçament havia de proporcionar una única sonda fluorescent per tal de seguir el plegament/desplegament d'aquesta regió de la proteïna per mitjà d'espectroscòpia de fluorescència. Segons Juminaga i col. (1997), la isomerització de l'enllaç peptídic X-Pro114, que en l'estat natiu es troba en conformació *cis*, permet discriminar entre les espècies de replegament molt ràpid (U_{vf}) i les espècies de replegament ràpid (U_f) de l'RNasa A. Així, la fluorescència del Trp115 podria ser emprada també per monitoritzar la isomerització *cis-trans* de l'enllaç peptídic X-Pro114 durant el procés de plegament/desplegament de l'RNasa A. A més, convé ressaltar que Montelione i col. (1984) van suggerir que les interaccions locals presents en el pèptid aïllat Asn113-Pro114-Tyr115 (amb l'enllaç peptídic Asn-Pro tant en conformació *cis* com en conformació *trans*) determinen l'estructura en gir d'inversió que presenta aquesta regió en l'estat natiu de la proteïna. Donat que aquestes interaccions són essencials per la formació del gir d'inversió i per tant de l'estructura tipus full β adjacent que ha estat proposada com un possible CFIS, aquesta variant Y115W podria permetre, mitjançant fluorescència i tècniques de cinètica ràpida, obtenir informació d'una de les etapes inicials del plegament de la proteïna. Considerant que la Tyr115 està situada pròxima a la superfície, lluny del nucli hidrofòbic de la proteïna, aquest emplaçament no havia de dificultar l'acomodació d'un triptòfan, malgrat que aquest sigui un residu més voluminós.

3.2. Descripció de la regió que ha estat subjecte de l'estudi

L'estructura tipus forca que comprèn el CFIS en estudi està formada per la sisena i setena cadenes β de l'RNasa A (per una millor localització dels diferents elements d'estructura secundària vegeu la FIGURA 1.1). D'una banda, els residus Ile106, Ile107, Val108 i Ala109 corresponen als quatre primers residus de la sisena cadena β (residus 106 a 111). D'altra banda, els residus Val116 i Val118 estan emplaçats, respectivament, en la primera i tercera posició de la setena cadena β (residus 116 a 123). Ambdues cadenes β es troben enllaçades pel gir d'inversió (residus 112 a 115) on es troba situada la Tyr115.

L'Ile106 es troba gairebé totalment enterrada dins la proteïna ja que presenta una àrea accessible al solvent de tant sols 2.1 Å². La seva cadena lateral s'empaqueta enfront dels residus contigus de la seqüència primària i davant per davant de les cadenes β₄ (Met79, Ile81), β₅ (Lys104) i β₇ (Phe120, Ala122), així com de l'hèlix α₃ (Val54) i el residu Ser75.

L'Ile107 exhibeix una àrea accessible al solvent de 19.7 Å² i s'empaqueta de cares als residus veïns de la seqüència d'aminoàcids i a les cadenes β₃ (Cys72, Tyr73, Gln74) i β₇ (Asp121, Ala122), així com el residu C-terminal (Val124).

La Val108 es troba molt enterrada dins el nucli hidrofòbic de la proteïna. La seva cadena lateral mostra una àrea accessible al solvent de 2.4 Å². Aquesta s'empaqueta enfront dels residus adjacents de la seqüència primària i les cadenes β₃ (Tyr73), β₇ (Pro117, His119, Phe120, Asp121), així com l'hèlix α₁ (Phe8) i l'hèlix 3₁₀ (Val57).

L'Ala109 té una exposició al solvent de 2.6 Å². La seva cadena lateral s'empaqueta de cares als residus adjacents en la seqüència primària i a les cadenes β₃ (Cys72, Tyr73), β₇ (His119) i la cadena lateral d'Asn71.

La Val116 presenta una àrea accessible al solvent de 39.7 Å² i s'empaqueta enfront dels residus contigus de la seqüència primària i davant per davant de l'hèlix α₁ (Ala5), l'hèlix α₃ (Gln55) i la cadena β₆ (Glu111).

La Val118 mostra una exposició al solvent de 39.2 Å². L'empaquetament de la seva cadena lateral té lloc de cares als residus veïns de la seqüència d'aminoàcids, a la cadena β₆ (Ala109, Glu111) i a l'hèlix α₁ (Ala4, Phe8).

Finalment, la Tyr115 es troba emplaçada més cap a la superfície. Aquesta cadena lateral presenta una àrea accessible al solvent de 107.6 Å² i s'empaqueta de cares als residus adjacents de la seqüència primària i a les cadenes β₆ (Cys110, Glu111, Gly112), β₃ (Tyr73) i l'hèlix 3₁₀ (Cys58).

Els càlculs d'àrea accessible al solvent han estat efectuats utilitzant el programa XAM (veure Apèndix).

3.3. Obtenció del gen de l'RNasa A modificat amb les corresponents mutacions

L'obtenció de les diverses construccions que codifiquen i han permès l'expressió de les catorze variants d'RNasa A, proposades per als estudis descrits en els objectius d'aquest treball (apartat 1.4), es va dur a terme de manera simultània.

El gen es va aconseguir gràcies a la cessió del vector pBXR per part del Dr. R. T. Raines de la Universitat de Madison-Wisconsin (EUA). Aquest és un vector d'expressió que resulta de la clonació del cDNA codificant per l'RNasa A en el vector pET22b(+) (delCardayré i col., 1995).

3. Resultats i discussió

El gen es va clonar en M13mp19 i pUC119 generant-se les construccions M13mp19.BPR i pUC119.BPR, respectivament. Aquests plasmidis es van utilitzar com a motlle en les reaccions de mutagènesi dirigida per oligonucleòtid, les quals tenien com a finalitat introduir les mutacions desitjades en el gen de l'RNasa A.

Els oligonucleòtids utilitzats per introduir aquestes modificacions en el gen salvatge són els que es presenten en la TAULA 3.1. Aquests oligonucleòtids mutagènics són emprats juntament amb un oligonucleòtid extern al gen, com a encebadors de la primera PCR del procés de mutagènesi dirigida (veure Apèndix).

La validació del procés de mutagènesi es va realitzar mitjançant la seqüenciació de les construccions pUC119.BPR amb la corresponent mutació. D'aquesta manera es va confirmar que en cada una de les construccions s'havia introduït només la modificació desitjada i que cada un dels gens recombinants codificava per les 14 variants proteiques proposades.

Per tal de poder dur a terme l'expressió heteròloga de les diferents variants, el gen modificat es va clonar en el vector d'expressió pET22b(+), generant així les construccions pBXR.Y115W, pBXR.I106A, pBXR.I106V, pBXR.I106L, pBXR.I107A, pBXR.I107V, pBXR.I107L, pBXR.V108A, pBXR.V108G, pBXR.A109G, pBXR.V116A, pBXR.V116G, pBXR.V118A i pBXR.V118G.

Un esquema del procés que ha permès generar les construccions plasmídiques que han possibilitat la producció de les proteïnes que s'han utilitzat en aquest estudi es presenta a la FIGURA 3.2.

TAULA 3.1

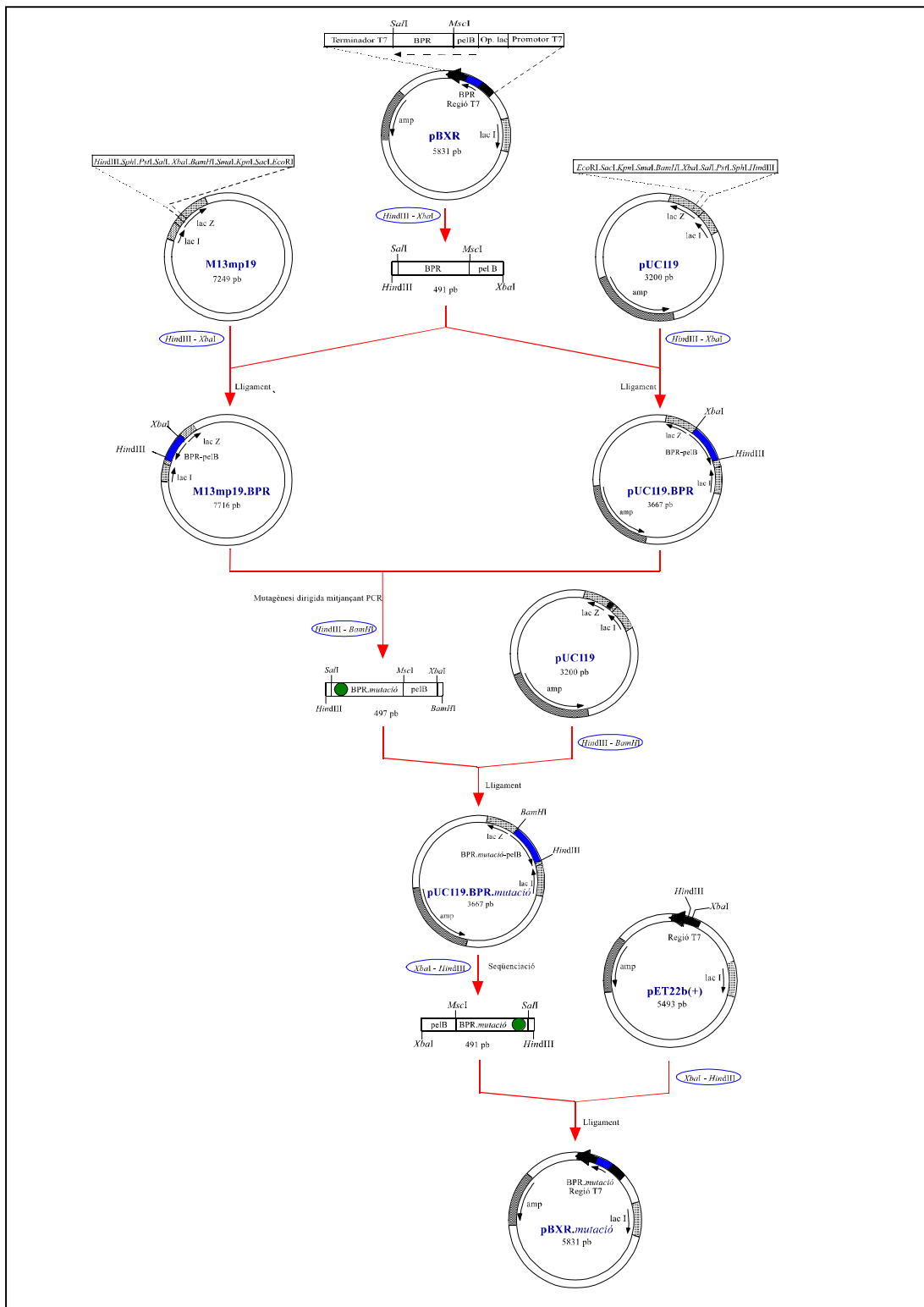
Oligonucleòtids utilitzats per a l'obtenció dels gens mutants de l'RNasa A.

Nom	Mutació	Seqüència ^a
Oligo #1	Y115W	5'- T GAG GGA AAC CCG TGG GTG CCA GTC CAC TT -3'
Oligo #2	I106A	5'- CAG GCG AAT AAA CAC GCT ATT GTG GCT TGT GAG -3'
Oligo #3	I106V	5'- CAG GCG AAT AAA CAC GTG ATT GTG GCT TGT GAG -3'
Oligo #4	I106L	5'- CAG GCG AAT AAA CAC CTG ATT GTG GCT TGT GAG -3'
Oligo #5	I107A	5'- G GCG AAT AAA CAC ATC GCT GTG GCT TGT GAG GG -3'
Oligo #6	I107V	5'- G GCG AAT AAA CAC ATC GTG GTG GCT TGT GAG GG -3'
Oligo #7	I107L	5'- G GCG AAT AAA CAC ATC CTG GTG GCT TGT GAG GG -3'
Oligo #8	V108A	5'- CG AAT AAA CAC ATC ATT GCG GCT TGT GAG GGA AAC -3'
Oligo #9	V108G	5'- CG AAT AAA CAC ATC ATT GGC GCT TGT GAG GGA AAC -3'
Oligo #10	A109G	5'- AT AAA CAC ATC ATT GTG GGC TGT GAG GGA AAC CC -3'
Oligo #11	V116A	5'- AG GGA AAC CCG TAC GCG CCA GTC CAC TTT GAT -3'
Oligo #12	V116G	5'- AG GGA AAC CCG TAC GGC CCA GTC CAC TTT GAT -3'
Oligo #13	V118A	5'- AC CCG TAC GTG CCA GCG CAC TTT GAT GCT TCA G -3'
Oligo #14	V118G	5'- AC CCG TAC GTG CCA GGC CAC TTT GAT GCT TCA -3'

^a Les bases escrites en negretes són les modificades

3. Resultats i discussió

FIGURA 3.2



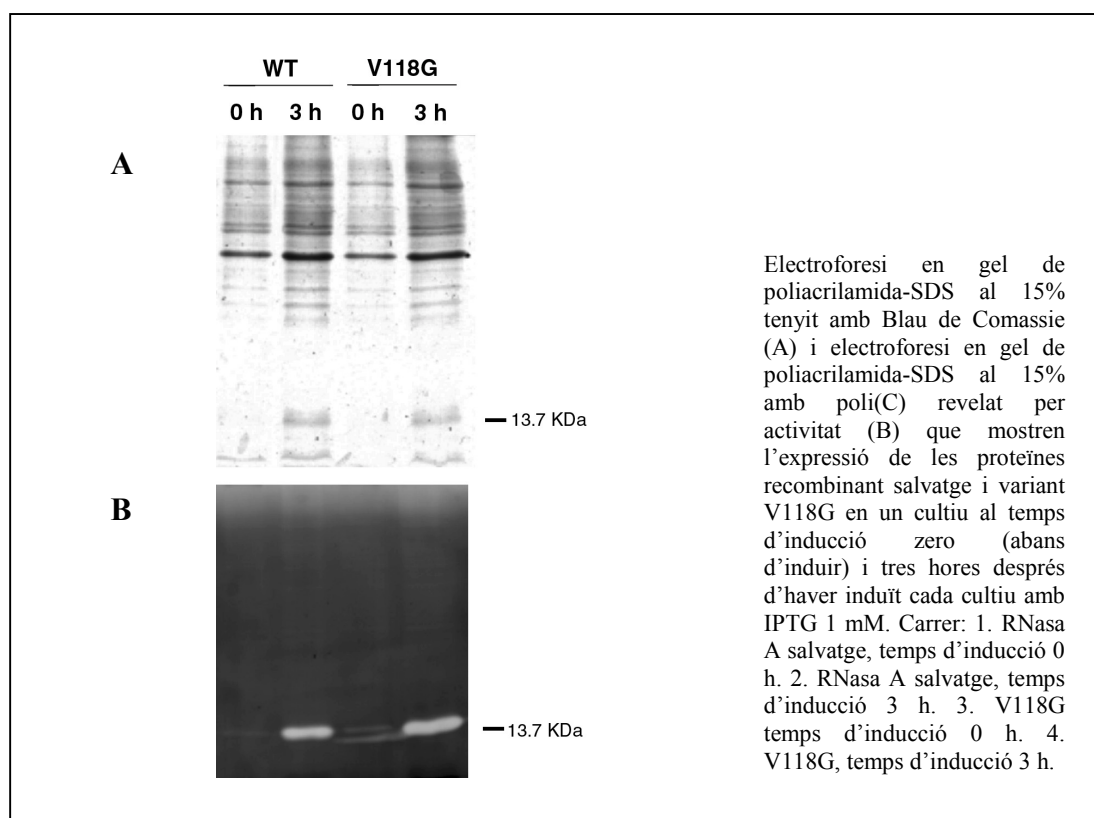
Esquema de la construcció del vector pBXR.mutació. Tenint en compte la identitat del procediment, aquest s'ha exposat englobant cadascun dels canvis introduïts en el gen dins del terme "mutació". amp, gen de resistència a l'ampicil·lina; lac I, seqüència codificant pel repressor lac; lac Z, gen que codifica per l'extrem N-terminal de la β -galactosidasa; BPR, gen de l'RNasa A.

3.4. Expressió i purificació de les ribonucleases recombinants. Comprovació de la seva puresa i homogeneïtat

Com a pas previ a la producció de les proteïnes recombinants en quantitats necessàries per realitzar els estudis estructurals recollits en els objectius, es va dur a terme la comparació dels nivells d'expressió de cadascuna de les 14 variants respecte a la proteïna salvatge.

Per fer aquesta comparació es van analitzar electroforèticament els sediments cel·lulars de cultius induïts amb IPTG de les cèl·lules BL21(DE3), les quals havien estat transformades amb cadascuna de les construccions que haurien de permetre l'expressió de les diferents variants i de l'RNasa A salvatge.

FIGURA 3.3



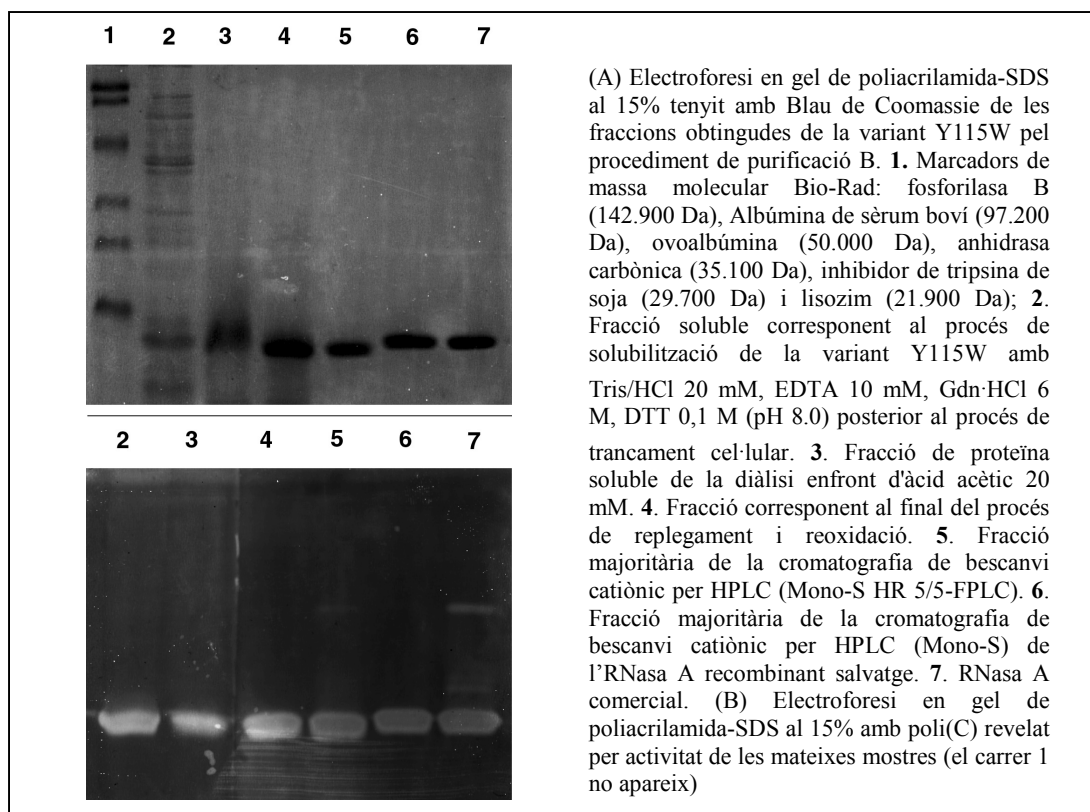
L'anàlisi electroforètica realitzada en gel de poliacrilamida-SDS tenyit amb Blau de Coomassie i en gel de poliacrilamida-SDS amb poli(C) revelat per activitat

(zimograma), va permetre observar, com es mostra a la FIGURA 3.3 per la variant V118G, que la introducció de les diverses mutacions en el gen de l'RNasa A no té cap efecte significatiu, segons el mètode d'anàlisi utilitzat, en els nivells d'expressió de cadascuna de les variants.

Per bé que s'han assajat altres procediments de purificació que permeten obtenir una quantitat acceptable de proteïna (procediment A de l'Apèndix), el procediment de purificació finalment adoptat (procediment B de l'Apèndix) ha permès escurçar el temps d'obtenció de les proteïnes i eludir la utilització de l'urea com a agent desnaturalitzant. Aquest darrer procediment s'iniciava amb el trencament de les cèl·lules amb la premsa de French. Tot seguit se separaven per centrifugació els cossos d'inclusió. El procediment continuava amb la desnaturalització d'aquests agregats amb Gdn-HCl 6 M i la reducció amb DTT a una concentració final de 0.1 M. La mostra, desnaturalitzada i reduïda, es dialitzava en front d'àcid acètic 20 mM durant 12-15 hores i es diluïa en un amortidor de replegament (Tris-acetat 100 mM, GSH 3.0 mM, GSSG 0.6 mM, pH 8.0) a una concentració de proteïna de 0.3 mg/ml. La mostra s'incubava en aquestes condicions a temperatura ambient durant 15 h i a continuació es baixava el pH amb àcid acètic per aturar el procés d'oxidació.

En aquesta etapa i segons mostra el gel de poliacrilamida-SDS tenyit amb Blau de Coomassie de la FIGURA 3.4.A (carrer 4) i el zimograma de la FIGURA 3.4.B (carrer 4), la proteïna es podia considerar electroforèticament pura.

FIGURA 3.4



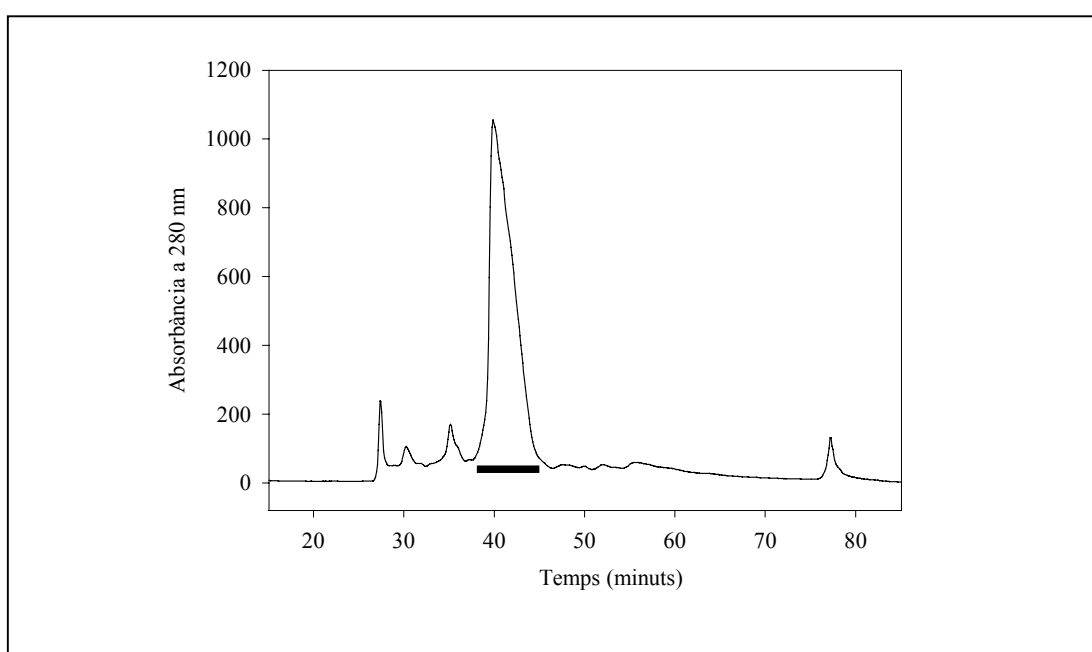
3. Resultats i discussió

Tanmateix, calia confirmar la seva homogeneïtat (absència de formes mal plegades de la mateixa proteïna). Així doncs, la proteïna es va sotmetre a una etapa cromatogràfica per HPLC.

Atès que la mostra estava molt diluïda, aquesta es va concentrar per ultrafiltració tangencial fins a un volum final d'aproximadament 40 mL, el qual es va aplicar a una columna de bescanvi catiònic Mono-S d'HPLC.

El cromatograma obtingut (FIGURA 3.5) presentava un pic principal acompanyat de tot un seguit de pics minoritaris.

FIGURA 3.5

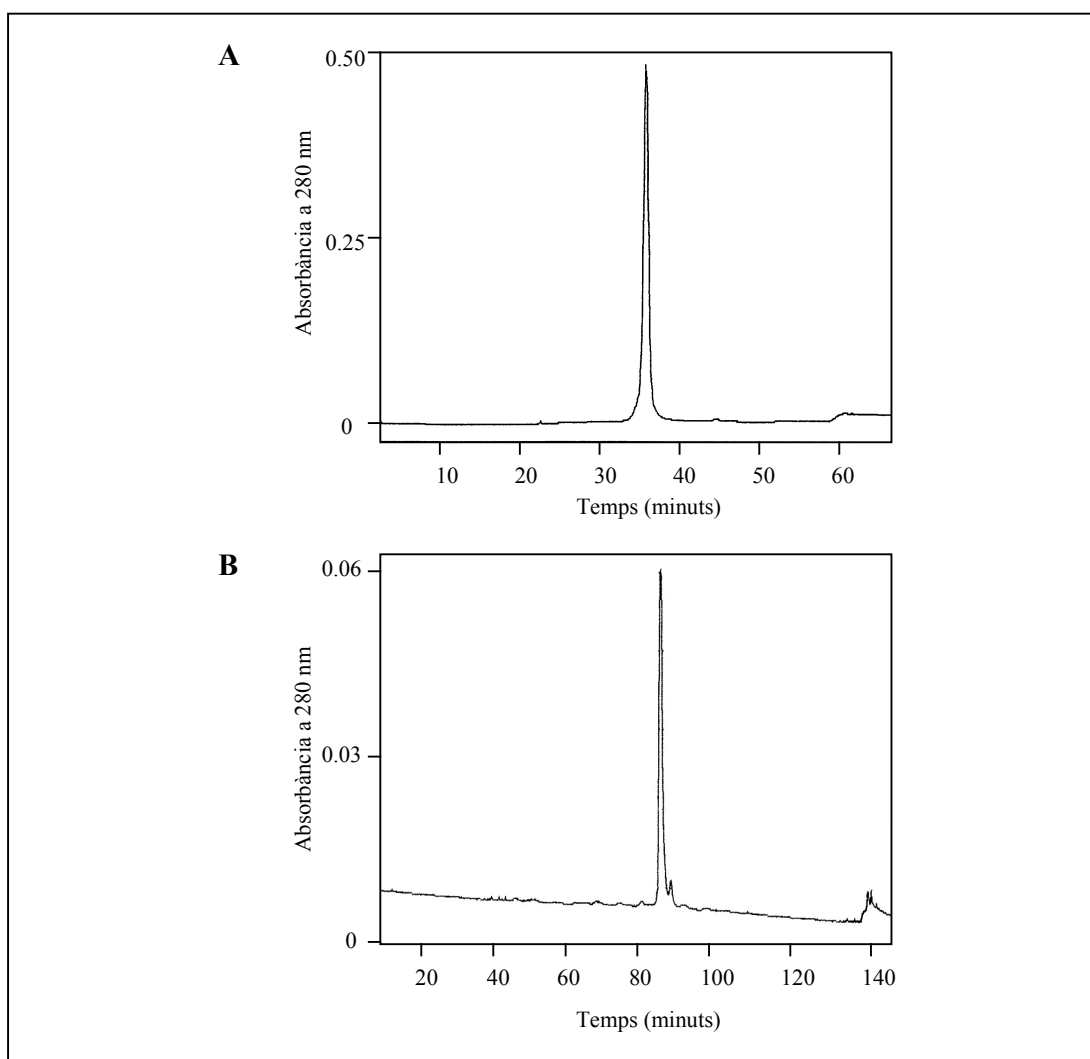


Cromatografia de bescanvi catiònic en columna Mono-S HR 5/5-FPLC per HPLC de la variant V118G. La mostra estava constituïda per la fracció corresponent al final del procés de replegament i reoxidació, una vegada concentrada per ultrafiltració i dialitzada. La columna es va equilibrar amb l'amortidor TrisHCl 20 mM (pH 8.0). La mostra es va eluir dins d'un gradient lineal de NaCl de 0 a 0.25 M en el mateix amortidor d'equilibrat durant 60 minuts. La franja negra indica el pic pertanyent a la fracció de proteïna correctament plegada.

El seguit de pics que apareixen a concentracions de sal menor que el pic principal i que s'observen com a minoritaris en el perfil d'elució que es representa en la FIGURA 3.5, es van analitzar per electroforesi en gel de poliacrilamida SDS tenyit amb Blau de Coomassie. Per cada un dels pics s'observava una única banda amb la mateixa mobilitat electroforètica (no es mostra). L'anàlisi per zimograma de les mateixes mostres va demostrar que totes presentaven activitat ribonucleasa. Dodge i Sheraga (1996) havien observat que durant el procés de replegament de la RNasa A es poden formar diversos intermediaris de plegament estables que mantenen enllaços

disulfur intermoleculars amb el glutatió. Com que cada pont disulfur amb el glutatió augmenta la càrrega negativa de la proteïna a pH 8.0, qualsevol molècula que presenti menys de quatre ponts disulfur intramoleculars hauria d'eluir, en una cromatografia de bescanvi catiònic, a una concentració de NaCl menor que la proteïna nativa. És per aquest motiu que es va concloure que el perfil d'elució obtingut mostra la presència de diverses isoformes amb ponts disulfur mixtes amb glutatió que es generarien durant el procés de replegament.

FIGURA 3.6



(A) Perfil d'elució de proteïna enregistrat a 280 nm de la cromatografia de bescanvi catiònic en columna Mono-S HR 5/5-FPLC per HPLC. Les condicions de la cromatografia han estat les mateixes que les que s'han descrit a la FIGURA 3.5. (B) Perfil d'elució de proteïna enregistrat a 280 nm de la cromatografia de fase reversa en columna Vydac 214-TP C4 per HPLC. La columna es va equilibrar amb acetonitril 10%:TFA 0.1%. La mostra es va eluir amb un gradient no lineal de 10-100% d'acetonitril. La mostra estava constituïda en ambdós casos per les fraccions del pic principal de la cromatografia de bescanvi catiònic per HPLC, corresponent a la purificació de la variant V118G.

Es va obtenir, en ambdós procediments de purificació assajats un perfil d'elució molt similar, essent el rendiment mig d'aproximadament uns 15 mg de proteïna pura i correctament plegada per litre de cultiu.

Cal destacar que, excepcionalment, en l'etapa cromatogràfica per HPLC, el perfil d'elució de la variant V108G no presentava un pic principal, sinó que s'observaven diferents pics al llarg del gradient. En conseqüència, el procediment estàndard de purificació assajat semblava provocar algun efecte en el plegament d'aquesta variant de l'RNasa A.

Atès que les substitucions que s'havien dissenyat anaven encaminades a estudiar el paper de determinats residus en el plegament i l'estabilitat de la proteïna es va creure oportú dur a terme les etapes de replegament i diàlisi de la variant V108G a 4°C. Amb aquesta modificació en el procediment de purificació es va aconseguir per aquesta variant un perfil d'elució que no diferia del perfil de les altres variants o de la proteïna salvatge obtinguda amb el mateix sistema d'expressió. Malgrat això, el rendiment final, 9 mg per litre de cultiu, era lleugerament inferior comparat amb el de qualsevol altra variant.

Aquests resultats convidaven a pensar d'entrada que les interaccions establertes per la V108 en la proteïna salvatge podien jugar un paper, si no determinant, significatiu en el procés de plegament de la proteïna a través d'alterar-ne l'estabilitat.

Finalment, i de caire analític, es va recollir el pic principal i es va aplicar de nou a una columna Mono-S i a una columna de fase reversa per HPLC Vydac-C4. En ambdós casos es va obtenir un sol pic cromatogràfic, que refermava l'homogeneïtat de la proteïna. A la FIGURA 3.6 es mostren els perfils d'elució ambdues cromatografies corresponents a la variant V118G.

3.5. Caracterització de les ribonucleases recombinants i comparació amb la proteïna salvatge

3.5.1. Determinació de les propietats catalítiques

Si bé un dels objectius d'aquest treball és estudiar la contribució dels residus hidrofòbics de la regió 106-118 de l'RNasa A en l'estabilitat de la proteïna, també es va analitzar l'efecte de les substitucions dutes a terme en les propietats catalítiques de l'enzim.

Per a les diferents RNases A modificades i mitjançant el mètode espectrofotomètric, es van determinar els paràmetres cinètics per a substrats de baix (C>p) i alt (poli(C)) pes molecular i es van comparar amb els que s'obtenen per la proteïna salvatge.

3. Resultats i discussió

La determinació de l'activitat pel substrat C>p per mitjà del mètode espectrofotomètric ens permet estudiar la reacció d'hidròlisi del procés de catàlisi de l'RNasa A. Pel que fa als assajos amb poli(C), aquests ens permeten estudiar la primera etapa del procés de catàlisi, la reacció de transfosforilació. En el marge de concentracions de substrat utilitzades, l'RNasa A mostra un comportament cinètic que es pot ajustar emprant el model de Michaelis-Menten.

Amb anterioritat s'havia observat que no hi havia diferències significatives entre els paràmetres cinètics de l'RNasa A recombinant salvatge i els de la purificada de pàncrees boví (Coll, 1994) o els de la variant Y115W (Torrent, 1996).

Tal i com es pot observar en la TAULA 3.2, els valors dels paràmetres cinètics de les diferents variants no mostren diferències prou grans respecte a la proteïna salvatge, com per poder discernir variacions en l'activitat catalítica entre les diferents proteïnes pels substrats emprats.

TAULA 3.2

Paràmetres cinètics de l'RNasa A salvatge i les diferents variants per al substrat C>p i poli(C)

Enzim	C>p		
	K_m (mM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) $\times 10^3$
Rec. salvatge ^a	0,70	155	3,69
I106A	0,68	116	2,84
I106L	0,89	144	2,70
I106V	0,69	136	3,29
I107A	0,77	133	2,88
I107L	0,76	149	3,27
I107V	0,74	149	3,36
V108A	0,79	139	2,93
V108G	0,87	128	2,45
A109G	0,64	180	4,69
V116A	0,69	120	2,90
V116G	0,82	133	2,70
V118A	0,65	115	2,95
V118G	0,66	122	3,08

Enzim	Poli(C)		
	K_m (mg/ml)	Rel. $V_{\text{m}\text{ax}}/[E_0]$ (%) ^b	Rel. $V_{\text{m}\text{ax}}/[E_0] / K_m$
Rec. salvatge ^a	0,32	100	313
I106A	0,30	76	253
I106L	0,37	79	214
I106V	0,33	93	282
I107A	0,40	89	223
I107L	0,34	75	221
I107V	0,31	83	268
V108A	0,44	108	245
V108G	0,38	81	213
A109G	0,32	69	216
V116A	0,32	77	241
V116G	0,43	107	249
V118A	0,39	81	208
V118G	0,40	92	230

^a Rec. salvatge: recombinant salvatge. ^b $[E_0]$ és la concentració final d'enzim. Els valors de $V_{\text{m}\text{ax}}$ per a l'RNasa A salvatge es refereixen com a 100%.

Donat que els residus que es van modificar no es troben en l'escletxa del centre actiu, els resultats obtinguts suggereixen que els reemplaçaments d'aquests residus no han alterat l'estructura nativa de la proteïna de forma suficient com per produir un canvi en la posició de les cadenes laterals dels residus que participen directament en la catàlisi o que formen part dels subetis d'interacció amb el substrat. Així, aquesta similitud en el comportament cinètic indica que probablement l'estructura del centre actiu de les ribonucleases recombinants estudiades és, si bé no idèntica, semblant a la conformació nativa de la proteïna salvatge.

3.5.2. Anàlisi de l'estructura nativa per dicromisme circular

A fi de distingir si hi havia diferències estructurals entre els estats nadius de les diferents proteïnes, es va emprar l'espectroscòpia de dicromisme circular.

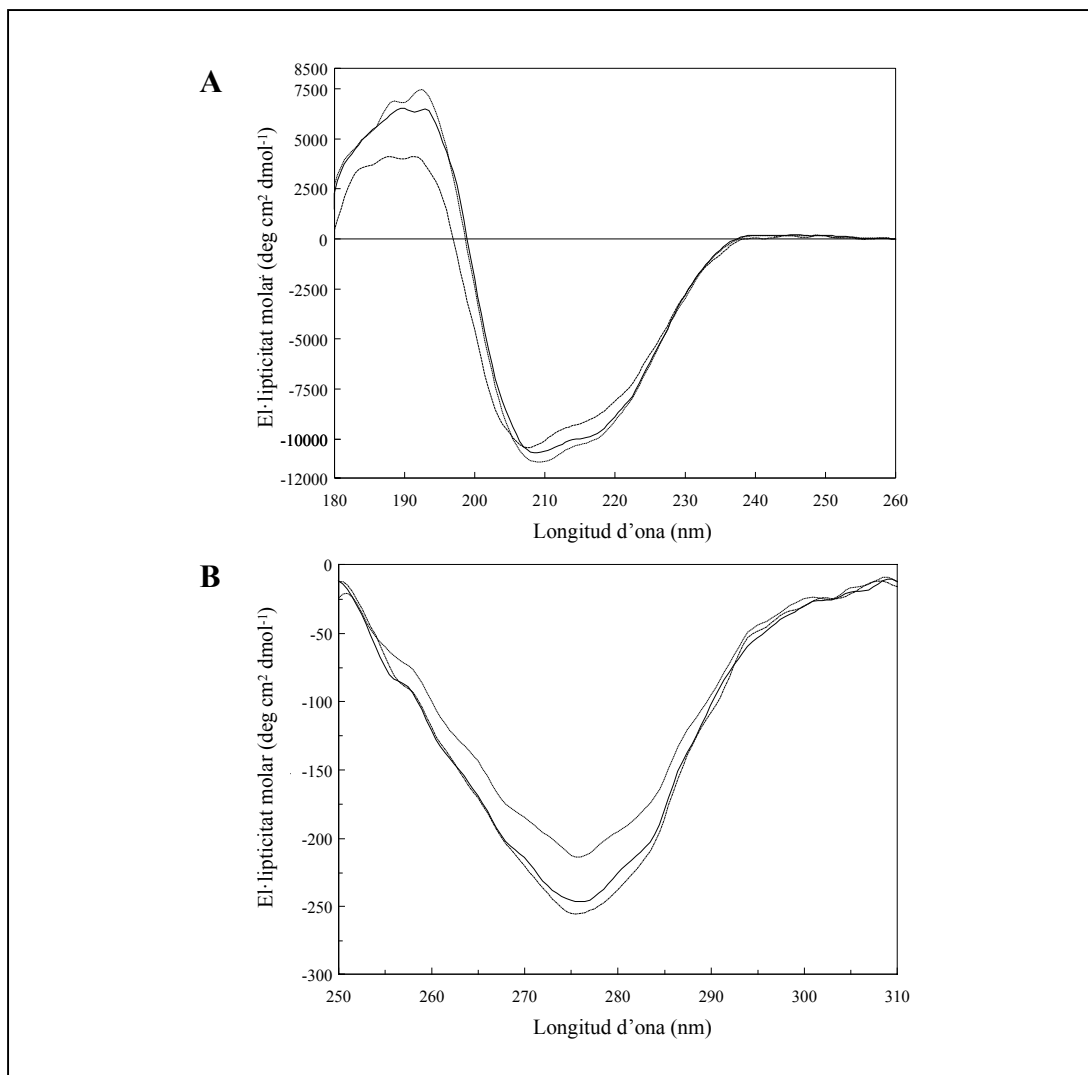
Es va obtenir per a totes les variants estudiades, tant per la regió de l'ultraviolat llunyà (180-260 nm) com per la regió de l'ultraviolat proper (260-300 nm), un perfil d'activitat òptica molt similar a l'obtingut per la ribonucleasa aïllada de pàncrees boví i la recombinant. D'entre les variants proposades per estudiar l'efecte de la substitució sobre l'estabilitat i el plegament, únicament la variant V108G presenta uns espectres lleugerament diferents. Per il·lustrar aquests resultats, en la FIGURA 3.7 es mostren els espectres de dicromisme circular que es van enregistrar per l'RNasa A recombinant salvatge i la variant V108G. A més, també es representen els espectres enregistrats per la variant I106V, els quals, donada la seva semblança amb els espectres obtinguts per la resta de variants, serveixen com a model per a aquestes.

Com es pot observar en la FIGURA 3.7, tot i que l'RNasa A conté només aproximadament un 23% d'hèlix α (Wlodawer i col., 1988), els espectres a l'ultraviolat llunyà estan dominats per la contribució d'aquest tipus d'estructura secundària, amb una banda negativa a 208 nm i un replà a 222 nm. Els espectres a l'ultraviolat proper presenten una banda negativa amb un mínim a 275 nm, la qual resulta de les 6 tirosines i els 4 ponts disulfur presents en la proteïna.

Pel que fa referència a la V108G, aquesta banda, a 275 nm, perd intensitat. Aquesta variació podria atribuir-se a un canvi en l'entorn d'alguna de les tirosines de l'RNasa A. La més ben situada com a candidata a ser responsable seria la Tyr73 que és la més propera (5Å) de la Val108 en l'estructura cristal·lina de l'RNasa A.

A fi d'estimar el contingut d'hèlix α , per a cadascuna de les proteïnes assajades, es va utilitzar el programa DICHROPROT (Deléage i Geourjon, 1993). Les diferències entre els perfils de les bandes d'el·lipticitat de les diferents proteïnes són massa petites com per poder concloure'n canvis en l'estructura secundària. Els percentatges d'hèlix α que es presenten en la Taula 3.3, per a les diferents proteïnes estudiades, són consistents amb el valor estimat per a l'RNasa A salvatge mitjançant cristal·lografia de raigs X (Wlodawer i col., 1988) i en cap cas s'observen diferències superiors al 5% que és el límit superior de precisió en l'estimació absoluta del contingut en hèlix α utilitzant aquesta metodologia.

FIGURA 3.7

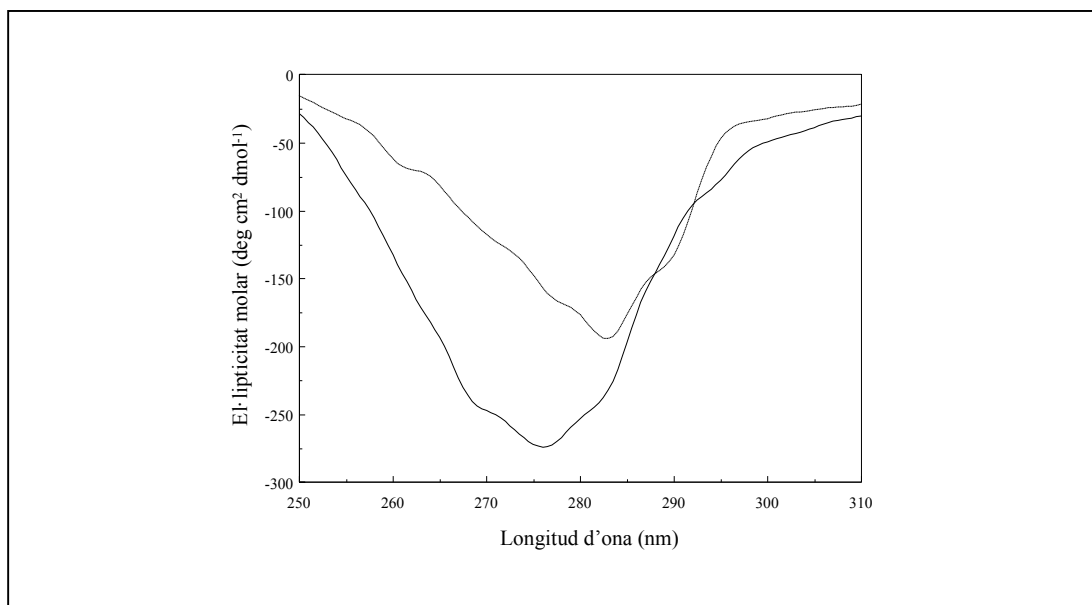


Espectres de diroïsm circular en la regi3 amida (A) i en la regi3 aromàtica (B) de l'RNasa A salvatge (—), la variant V108G (-----) i la variant I106V (— —). Condicions experimentals: cacodilat s3dic 10 mM (pH 5.0), T = 10°C i una concentraci3 de proteïna de 1 mg/mL (ultraviolat llunyà) i de 0.5 mg/mL (ultraviolat proper).

D'altra banda, convé ressaltar que si bé en la regi3 de l'ultraviolat llunyà, l'espectre de diroïsm circular per la variant Y115W presenta diferències poc significatives respecte a la resta d'espectres (no es mostra), en la regi3 de l'ultraviolat aquest és, de forma evident, discordant respecte els demés (FIGURA 3.8).

Mentre la similitud espectral en la regi3 de l'UV llunyà estaria indicant que la substituci3 realitzada no altera l'estructura secundària, la presència d'una banda negativa menys marcada i centrada aproximadament a 280, 290 i 295 nm en l'espectre de la variant Y115W vindria a confirmar la presència del tript3fan en la seqüència d'aminoàcids.

FIGURA 3.8



Espectres de diroïsm circular en la regió aromàtica de l'RNasa A salvatge (—) i la variant Y115W (-----). Condicions experimentals: cacodilat sòdic 10 mM (pH 5.0), T = 10°C i una concentració de proteïna de 0.5 mg/mL.

TAULA 3.3

Contingut en hèlix α de les diferents proteïnes estudiades

Proteïna ^a	Contingut en hèlix α (%)
Salvatge	21.8
Rec. salvatge	20.4
Y115W	22.1
I106A	21.9
I106V	20.4
I106L	21.3
I107A	20.7
I107V	19.5
I107L	21.8
V108A	20.2
V108G	18.8
A109G	21.3
V116A	18.3
V116G	20.0
V118A	20.5
V118G	19.5

^a Salvatge: RNasa A comercial (no recombinant); Rec. salvatge: recombinant salvatge

3.5.3. Les variants hidrofòbiques

3.5.3.1. *Desnaturalització per pressió i desnaturalització per temperatura*

L'estudi del procés de desplegament de les proteïnes ha adquirit molt d'interès en els darrers anys. Aquesta atenció ve donada no només perquè el desplegament d'una proteïna és indispensable per predir la seva estabilitat i per obtenir informació del seu procés de plegament, sinó també per tal d'explotar el potencial biotecnològic dels enzims que toleren condicions extremes i per estudiar la importància de proteïnes parcialment desnaturalitzades en el desenvolupament de certes malalties.

Per bé que s'han dut a terme nombrosos estudis, no s'ha reconegut cap model que s'adeqüi al mecanisme de desplegament de totes les proteïnes. Així, el plegament/desplegament proteic ha estat descrit tant com un procés amb dos estats, com un procés multiestat que comprèn intermediaris diversos (Ptitsyn, 1994; Walkenhorst, 1997). Altres investigadors han desestimat la hipòtesi de l'existència d'intermediaris i camins ben definits en la cinètica del plegament/desplegament proteic i expliquen els resultats, tant experimentals com teòrics, a partir d'un nou punt de vista en què s'utilitzen representacions de superfícies d'energia conformacional, les anomenades *energy landscapes* (Chan i Dill, 1998).

Aquestes apreciacions en principi contradictòries, s'originen principalment per tres motius: en primer lloc, donada la complexitat de la naturalesa macromolecular i la diversitat de proteïnes, la interpretació experimental ha d'ésser dependent del model; en segon lloc, convé ressaltar que en funció de la tècnica de detecció que s'utilitza, com ara l'NMR, CD, fluorescència, etc., els esdeveniments de desplegament que se segueixen difereixen l'un de l'altre, per tant, la interpretació experimental ha d'ésser dependent de la tècnica de seguiment que s'empra; i en darrer lloc, s'ha de destacar també el caràcter distintiu del desplegament, segons si s'indueix per agents desnaturalitzants químics, per calor o fred, i per pressió.

La utilització d'agents desnaturalitzants químics presenta l'inconvenient que per estimar els paràmetres termodinàmics, la transició de desnaturalització s'ha d'extrapolar a una concentració zero d'agent desnaturalitzant, i a més, sovint és molt difícil especificar la interacció de l'agent químic amb la proteïna, i encara més quan aquest pot interaccionar de manera diferent amb diferents estats de plegament o desplegament.

La utilització de la temperatura com a agent desnaturalitzant ve limitada pel fet que moltes proteïnes precipiten a elevades temperatures o mostren canvis estructurals irreversibles.

La pressió, al contrari, donat que pertorba (dins d'un interval limitat) l'equilibri químic de manera reversible ens proporciona una alternativa adient per tal de desnaturalitzar una proteïna. Atès que la major part dels estudis de desplegament de

proteïnes s'han dut a terme mitjançant la utilització de reactius químics o temperatura, pràcticament és desconegut el lligam entre l'efecte de la desnaturalització per pressió i els altres sistemes que s'usen habitualment o amb més tradició.

Les proteïnes model per aquest tipus d'estudis han de presentar dos requisits: d'una banda, la reacció de desplegament ha de ser reversible tant per pressió com per temperatura i d'altra banda, per simplificar l'anàlisi, les diferents proteïnes han d'ésser gairebé idèntiques però han de presentar un sol tret distintiu que afecti la seva estabilitat, per tal de poder atribuir el canvi observat en un determinat paràmetre a una pertorbació concreta.

Els nombrosos estudis realitzats amb l'RNasa A, no només sobre aspectes estructurals, fan pensar en aquesta proteïna com a un model per a qualsevol tipus d'estudi o comparació. El conjunt de variants de la regió 106-118 de l'RNasa A, proposades per l'interès en caracteritzar la influència de les substitucions en l'estabilitat i/o el plegament, és d'entrada també, un bon model per a la realització d'un estudi comparatiu sobre l'efecte d'agents desnaturalitzants diferents.

3.5.3.1.1. Espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat de quarta derivada

3.5.3.1.1.1. Variació de l'espectre d'absorció en funció de la pressió i de la temperatura

Les cadenes laterals aromàtiques dels aminoàcids fenilalanina, tirosina i triptòfan absorbeixen llum ultraviolada, i consegüentment presenten bandes d'absorció prominents, en la regió de l'espectre situada entre les longituds d'ona de 260 i 300 nm.

Aquestes bandes d'absorció a l'ultraviolat tenen una amplària considerable, a causa de les vibracions de l'estructura, i se sobreposen. A més la difusibilitat d'aquestes bandes s'accentua quan diversos cromòfors d'un mateix tipus (com per exemple, diferents residus de tirosina) es troben emplaçats en diferents microambients de la proteïna.

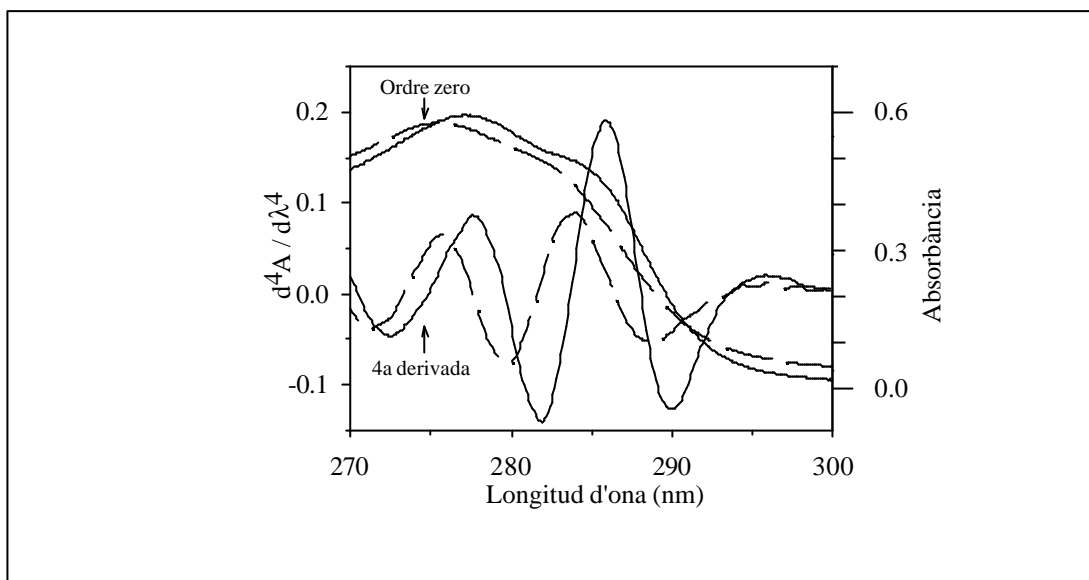
La resolució de l'espectre d'absorció es pot optimitzar mitjançant el càlcul de la segona o de la quarta derivada de l'espectre (Talsky, 1994) (FIGURA 3.9).

Si bé l'espectroscòpia d'absorció de segona derivada permet detectar canvis en l'ambient dels residus de tirosina (Fisher i Sligar, 1985; Kornblatt i col., 1995), el càlcul de la quarta derivada presenta l'avantatge que el màxim de l'espectre original correspon a un màxim de l'espectre d'absorció de quarta derivada. A més la quarta derivada possibilita un estudi més selectiu i resolutiu dels canvis que tenen lloc en l'ambient dels tres tipus de residus aromàtics (Mozo-Villarias i col., 1991; Padros i col., 1984a,b; Lange i col., 1996a).

Lange i col. (1996b) van aplicar l'espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat de quarta derivada per estudiar els canvis estructurals en proteïnes induïts per la pressió i per la temperatura. El càlcul de la quarta derivada es va optimitzar per seguir els

canvis en els aminoàcids aromàtics predominants en la proteïna que s'assajava (veure apartat 2.2.2.1.1).

FIGURA 3.9

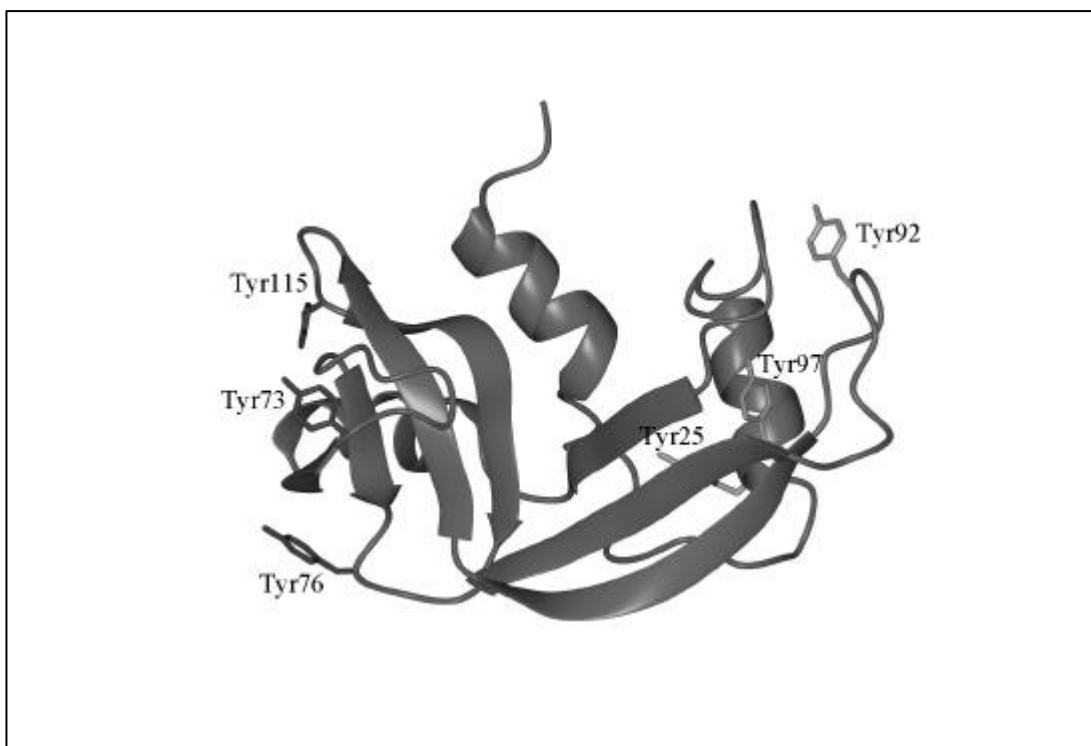


Comparació dels espectres d'absorció d'ordre zero i de quarta derivada de l'estat natiu (19°C —) i de l'estat desnaturalitzat (73°C —) de la variant V116A de l'RNasa A. Condicions experimentals: acetat sòdic 50 mM (pH 5.0), P = 0.1 MPa i una concentració de proteïna de 1 mg/ml.

Considerant els avantatges que ofereix el mètode de quarta derivada, en aquest treball es va emprar l'absorció a l'ultraviolat per seguir el procés de desnaturalització induït per pressió i per temperatura de l'RNasa A salvatge i de les seves variants.

Com es pot observar en la FIGURA 3.10, l'RNasa A conté 6 tirosines. D'aquestes, la Tyr115 es localitza dins de la regió 106-118 i les Tyr73 i 76, tenint en compte l'espai tridimensional de la proteïna, estan emplaçades a prop d'aquesta regió. Si bé les Tyr76 i 115 es troben en girs d'inversió i presenten respectivament un 46.5% i un 33% de la seva àrea exposada al solvent, la Tyr73 es troba en un full plegat β i força enterrada (9.4%). Les altres tres tirosines (Tyr25, Tyr92 i Tyr97) es troben bastant allunyades respecte a la regió en estudi. La Tyr25 (en una hèlix α) i la Tyr97 (en un full plegat β) presenten cadascuna un 4.1% d'àrea accessible al solvent i la Tyr92 (en un gir d'inversió) un 39.3%. Segons Juminaga i col. (1997), els quals van dur a terme reemplaçaments diversos de les tirosines per fenilalanines, la diferència d'absorció entre l'estat plegat i el desplegat de l'RNasa A s'origina principalment a causa de variacions en l'ambient d'aquestes tirosines més allunyades respecte la regió 106-118 (un 38% en la Tyr25, 13% en la Tyr92, 39% en la Tyr97, i resta un 10% per a una quarta tirosina). En conseqüència, l'espectre d'absorció a l'ultraviolat de quarta derivada no ens proporciona informació local de la regió modificada, sinó que resulta d'una mitjana dels canvis que tenen lloc en l'ambient d'aquestes tirosines.

FIGURA 3.10

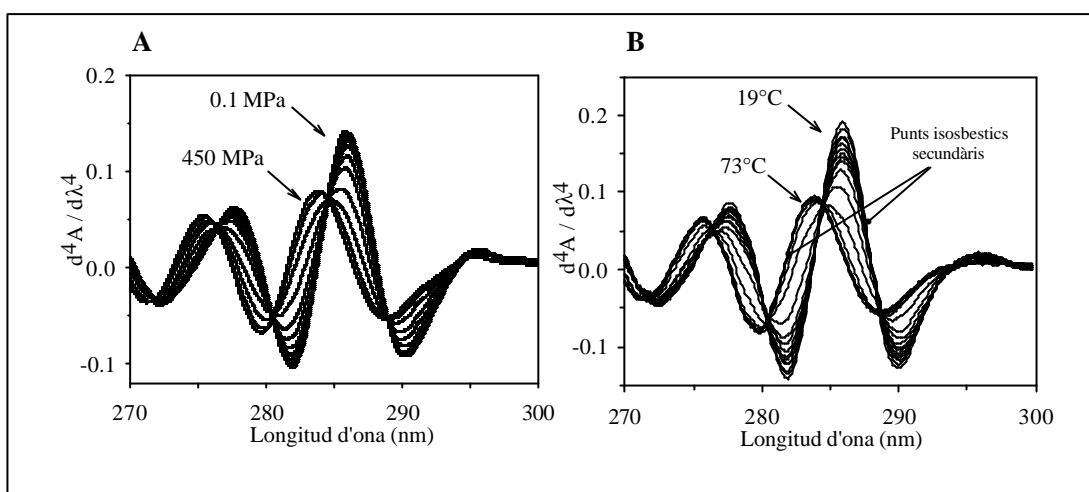


Representació de l'estructura tridimensional de l'RNasa A amb els residus de tirosina indicats. En carbassa, aquells residus de tirosina que segons Juminaga i col. (1997) promouen els canvis d'absorció que s'observen durant el desplegament (Tyr92, Tyr97 i Tyr25).

A fi de distingir els canvis en l'espectre d'absorció durant el procés de desplegament de l'RNasa A originats per les tirosines, dels canvis generats per la presència d'altres espècies que també absorbeixen, com ara la fenilalanina i les cisteïnes, els espectres de quarta derivada es van calcular emprant les condicions òptimes descrites per Lange i col. (1996a) ($\Delta\lambda = 2.6$) (veure apartat 2.2.2.1.1).

En la FIGURA 3.11 es presenten els espectres de quarta derivada enregistrats per la variant V116A en funció de la pressió i de la temperatura. Com es pot observar en aquesta figura, tant la pressió com la temperatura indueixen un canvi en l'absorció i un desplaçament dels espectres de quarta derivada cap al blau. Aquests canvis reflecteixen un augment en la polaritat a l'entorn de les tirosines de la proteïna, a causa de la progressiva solvatació d'aquests residus durant el desplegament (Lange i col., 1996b).

FIGURA 3.11



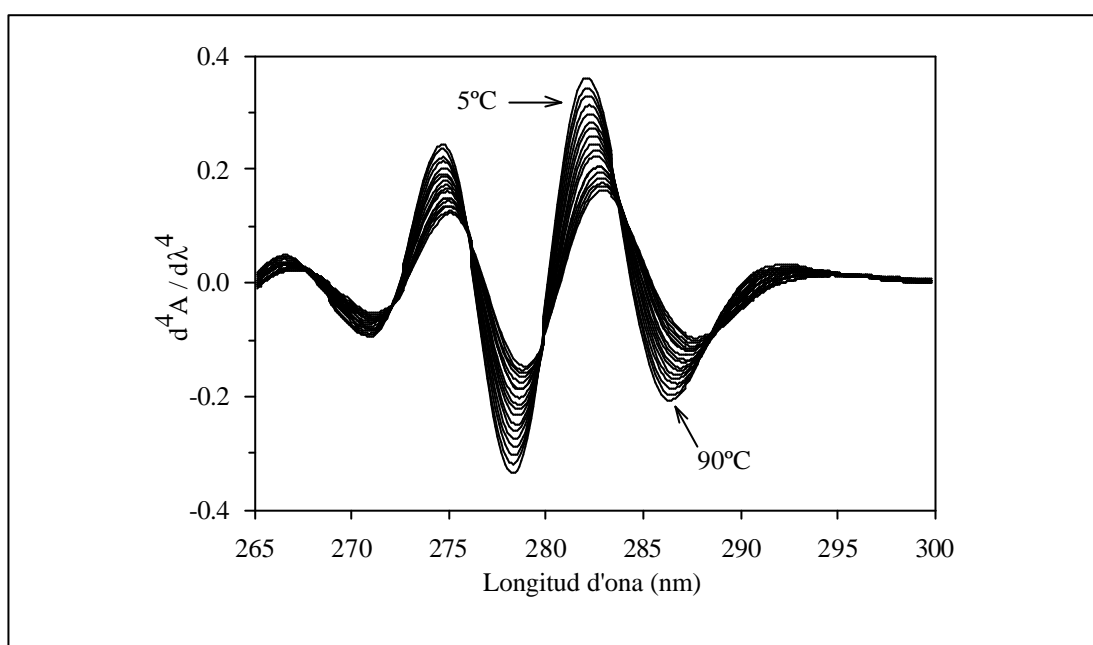
(A) Espectre d'absorció a l'ultraviolat de quarta derivada de la variant V116A en funció de la pressió, entre 0.1 i 450 MPa. Condicions experimentals: MES 50 mM (pH 5.0), $T = 40^{\circ}\text{C}$ i una concentració de proteïna de 1 mg/ml. (B) Espectre d'absorció a l'ultraviolat de quarta derivada de la variant V116A en funció de la temperatura, entre 19 i 73°C . Condicions experimentals: acetat sòdic 50 mM (pH 5.0), $P = 0.1$ MPa i una concentració de proteïna de 1 mg/ml.

Els espectres de quarta derivada en funció de la pressió i de la temperatura, per a qualsevol variant estudiada, mostren un punt isobèstic principal al voltant de 284 nm. Pel que fa a la desnaturalització per temperatura, s'evidencien fins a dos punts isobèstics secundaris: un dels quals engloba els primers espectres (pròxims a l'estat natiu) i l'altre, els darrers espectres (estat desplegat). Aquest fet (que no es percep en la FIGURA 3.11.B) és indicatiu de canvis intrínsecs a l'espectre de les tirosines, promoguts per la temperatura, i que es manifesten tant en els espectres de l'estat natiu de la proteïna com de l'estat desplegat. Per refermar això, es va enregistrar l'espectre de quarta derivada, en aigua i en etanol, de l'ATEE (un compost model dels residus de tirosina de les proteïnes) en funció de la temperatura. A diferència del que succeeix amb la pressió (Lange i col., 1996a), en aquest treball hem observat que un augment de la temperatura comportava l'aparició de punts isobèstics (com és ara el que s'emplaça 284 nm), acompanyats per una disminució en l'absorció i un desplaçament de l'espectre, tal i com es veu en la FIGURA 3.12.

Aquest desplaçament de l'espectre intrínsec de les tirosines fa que el punt isobèstic principal, que caracteritza la transició de desnaturalització proteica, es dispersi i consegüentment apareguin els dos punts isobèstics secundaris que s'han esmentat abans. Respecte a la pressió, el desplaçament de l'espectre de l'ATEE era pràcticament negligible, si més no fins a 450 MPa i amb la resolució experimental emprada. Així doncs, convé ressaltar que els punts isobèstics secundaris induïts per la temperatura no s'originarien per un procés de desplegament de la proteïna, sinó

que són propis de canvis intrínsecs a l'espectre de les tirosines. Es pot concloure per tant, que el punt isobèstic principal que s'observa en ambdós processos de desnaturalització és indicatiu d'un desplegament de la proteïna en dos estats, el natiu i el desnaturalitzat. Com és palès en la FIGURA 3.11 i per a totes les proteïnes estudiades, l'efecte de la pressió en l'espectre de quarta derivada és molt similar a l'efecte obtingut per alta temperatura. Aquest fet ens indicaria que la polaritat de l'ambient en què es troben les tirosines durant el procés de desplegament per pressió varia de manera molt similar al de temperatura. Així mateix, per ambdós estats desnaturalitzats, l'entorn de les tirosines presenta una polaritat semblant.

FIGURA 3.12

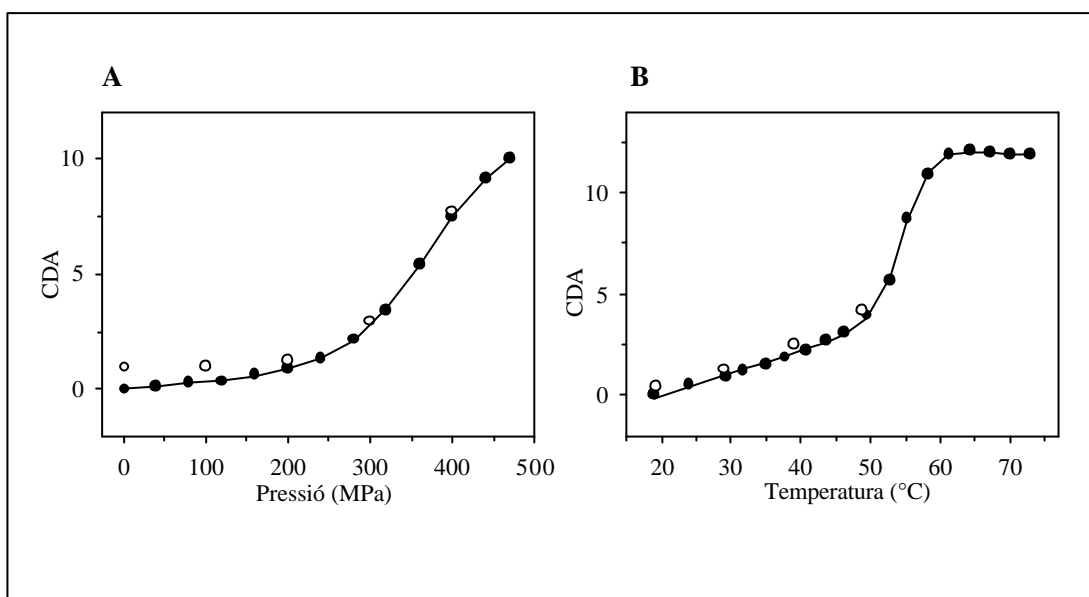


Espectre d'absorció a l'ultraviolat de quarta derivada de l'ATEE en funció de la temperatura, entre 5 i 90°C. Condicions experimentals: acetat sòdic 50 mM (pH 5.0), P = 0.1 MPa i una concentració d'ATEE de 0.3 mM. Es pot observar l'aparició d'un punt isobèstic aproximadament a 284 nm.

3.5.3.1.1.2. Efecte de les substitucions en l'estabilitat

Per tal de poder calcular l'estabilitat de les diferents variants i comparar-la amb la de la proteïna salvatge, es va representar el canvi d'absorció, per exemple la diferència d'amplitud cumulativa (CDA) (veure apartat 2.2.2.1.3.3), en funció de la pressió o de la temperatura. En tots els casos s'observa una transició sigmoïdal i unes regions pre- i post-transició gairebé lineals (FIGURA 3.13). Aquesta transició correspon al procés de desnaturalització proteica. Convé ressaltar que totes les transicions espectrals que es van obtenir eren reversibles.

FIGURA 3.13



Corbes de desnaturalització per pressió (A) i per temperatura (B) de la variant V116A. Augment (●) i disminució (○) de pressió o temperatura. La línia contínua correspon a un ajust no lineal de mínims quadrats de les dades basat en un model de dos estats.

Les corbes de desnaturalització es van ajustar a un model termodinàmic de dos estats, el qual es va combinar amb funcions lineals per tal d'ajustar la pendent de la pre- i post-transició (Lange i col., 1996). A les TAULES 3.4 i 3.5 es presenten respectivament els paràmetres termodinàmics que es van calcular a partir de les transicions de desplegament induïdes per pressió i per temperatura, de cadascuna de les proteïnes estudiades, per mitjà de la metodologia descrita a l'apartat 2.2.2.1.3.3.

Per a la pressió, l'energia lliure de desplegament es va mesurar a 40°C i a 0.1 MPa. Per tal de comparar ambdós processos de desnaturalització sota les mateixes condicions, la ΔG_U per temperatura es va calcular utilitzant l'equació 3.1 (Elwell i Schellman, 1977) i els valors de $\Delta H_{T_{1/2}}$ i $T_{1/2}$ que es detallen en la TAULA 3.5. El valor de ΔC_p es va fixar a $5.3 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ (Makhatadze i Privalov, 1995)

$$\Delta G_{U_T} = \Delta H_{T_{1/2}} (1 - T / T_{1/2}) - \Delta C_p [(T_{1/2} - T) + T \ln (T / T_{1/2})] \quad (3.1)$$

Allen i Pielak (1998) van descriure que la precisió amb la qual s'ajusta una corba de desnaturalització es troba definida per l'exactitud amb què es poden determinar les regions pre- i post-transició. Dins dels nostres errors experimentals i per a cadascuna de les proteïnes estudiades, els valors de ΔG_U (a 40°C i 0.1 MPa) entre ambdós processos de desnaturalització són equivalents. Una bona part de la variació observada l'atribuïm a les regions pre- i post-transició. N'és un exemple clar la corba

3. Resultats i discussió

TAULA 3.4

Paràmetres que caracteritzen la desnaturalització per pressió de l'RNasa A salvatge i les seves variants a 40°C i 0.1 MPa^a.

Proteïna ^b	ΔG_U (KJ mol ⁻¹)	ΔV (cm ³ mol ⁻¹)	$P_{1/2}$ (MPa)	λ_N (nm) ^c	λ_D (nm) ^d
Salvatge	23.24 (0.44)	-46.5 (3.3)	500	285.8	285.6
Rec. salvatge	24.61 (0.70)	-46.5 (fixat)	529	285.4	285.0
I106A	2.50 (0.50)	-63.4 (3.8)	39	284.4	283.7
I106L	12.72 (0.58)	-47.7 (1.7)	267	285.4	283.6
I106V	17.42 (0.91)	-52.8 (2.7)	330	285.5	283.7
I107A	9.89 (0.35)	-47.4 (2.3)	209	285.5	283.7
I107L	11.60 (0.36)	-47.5 (1.0)	244	285.5	283.6
I107V	23.75 (2.3)	-52.2 (6.9)	455	285.9	285.1
V108A	3.13 (0.30)	-55.9 (2.7)	56	285.2	283.5
V108G ^e	-	-	-	283.8	283.8
A109G	23.72 (1.23)	-53.2 (3.4)	446	285.6	284.7
V116A	20.04 (0.52)	-53.6 (1.5)	374	285.8	284.0
V116G	18.41 (1.30)	-57.9 (3.8)	318	285.4	283.3
V118A	16.25 (1.31)	-51.2 (3.9)	317	285.3	283.6
V118G	11.90 (1.48)	-55.1 (4.8)	216	284.9	283.5

^a Els números entre parèntesi són els errors estàndard. ^b Salvatge: RNasa A comercial (no recombinant); Rec. salvatge: recombinant salvatge; abs.: absorció; fluor.: fluorescència. ^c Longitud d'ona de la màxima amplitud de quarta derivada a 0.1 MPa més pròxima al punt isobèstic de 283.5 nm. ^d Longitud d'ona de la màxima amplitud de quarta derivada a 440 MPa més pròxima al punt isobèstic de 283.5 nm. ^e Completament desnaturalitzada a 40°C i 0.1 MPa.

3. Resultats i discussió

TAULA 3.5

Paràmetres que caracteritzen la desnaturalització per temperatura de l'RNasa A salvatge i les seves variants al punt mig de la transició i a 0.1 MPa ^a.

Proteïna ^b	$\Delta H_{T_{1/2}}$ (KJ mol ⁻¹)	$T_{1/2}$ (°C)	$\Delta G_{U_{40^\circ C}}$ (KJ mol ⁻¹) ^c	λ_N (nm) ^d	λ_D (nm) ^e
Salvatge	487 (9)	58.9 (0.0)	24.76 (0.52)	286.1	284.3
Rec. salvatge	437 (12)	58.0 (0.1)	21.16 (0.67)	285.5	283.9
I106A	301 (14)	43.1 (0.2)	2.87 (0.21)	285.7	283.7
I106L	410 (15)	51.7 (0.1)	13.68 (0.54)	285.7	283.7
I106V	431 (21)	55.0 (0.1)	17.81 (0.94)	285.7	283.8
I107A	405 (13)	47.7 (0.1)	9.26 (0.32)	285.3	283.8
I107L	435 (19)	49.4 (0.1)	11.98 (0.58)	285.3	283.6
I107V	422 (17)	58.6 (0.1)	20.83 (0.96)	285.7	283.7
V108A	350 (10)	43.3 (0.1)	3.59 (0.14)	285.6	283.7
V108G	237 (9)	29.4 (0.2)	-9.31 (0.37)	285.4	283.6
A109G	455 (21)	55.4 (0.1)	19.36 (0.98)	285.6	283.8
V116A	447 (27)	54.8 (0.2)	18.38 (1.22)	285.9	283.4
V116G	468 (52)	53.6 (0.1)	16.21 (0.57)	285.6	283.8
V118A	454 (89)	52.5 (0.1)	13.12 (0.60)	285.7	283.8
V118G	451 (58)	47.9 (0.1)	9.56 (0.36)	285.7	284.0

^a Els números entre parèntesi són els errors estàndard. ^b Veure Taula 1. ^c Energia lliure de desplegament calculada a 40°C. ^d Longitud d'ona de la màxima amplitud de quarta derivada a 25°C més propera al punt isobèstic de 283.5 nm. ^e Longitud d'ona de la màxima amplitud de quarta derivada a 75°C més propera al punt isobèstic de 283.5 nm.

de desnaturalització per pressió de la variant V116A que es presenta a la FIGURA 3.13.A, on la regió post-transició no es va poder determinar de manera completa.

Els valors de ΔG_U de les variants estudiades, juntament amb els valors de $P_{1/2}$ o $T_{1/2}$, ens aporten una idea de les estabilitats relatives de les diferents proteïnes. D'entrada, tant la proteïna comercial com l'RNasa A recombinant, mostren el mateix comportament. Per consegüent, el procés de replegament i purificació de les proteïnes recombinants a partir dels cossos d'inclusió no afecta de manera significativa l'estabilitat. D'altra banda, les variants I107V i A109G estan molt poc desestabilitzades. Pel que fa a la sèrie d'RNases modificades en la posició I106, aquestes són menys estables que la sèrie de variants que presenten les mateixes substitucions, però en I107, a excepció de la variant I106L que és més estable que la variant I107L. D'entre les variants que resulten del reemplaçament d'una Val, la sèrie de la V108 és la més desestabilitzada. En relació a les sèries de la V116 i V118, aquestes estan bastant menys afectades, essent la de la V116 més estable que la de la V118. Dins del grup de les variants que resulten de diferents substitucions en una mateixa posició de la proteïna, l'estabilitat segueix l'ordre Ile>Val>Leu>Ala>Gly, tot i que les estabilitats relatives dins de cada sèrie varien una mica.

Amb la finalitat de comprovar si existien diferències per una banda, entre els estats desnaturalitzats de les variants, i de l'altra, entre les estructures dels estats nadius, es van comparar les longituds d'ona de la màxima amplitud de quarta derivada més propera al punt isobèstic de 284 nm (vegeu les TAULES 3.4 i 3.5). Pels experiments de pressió (a 40°C), les condicions de l'estat natiu i de l'estat desplegat es van definir respectivament com a 0.1 i 440 MPa, i pels experiments de temperatura (a pressió atmosfèrica) com a 25 i 75°C. Els valors de longitud d'ona en aquestes condicions reflecteixen la polaritat mitjana de l'ambient al voltant dels residus de tirosina. És destacable el fet, ja comentat abans, que durant el desplegament s'observa un desplaçament d'aquestes longituds d'ona cap al blau. D'altra banda, donada l'equivalència de les longituds d'ona, els resultats suggereixen que no hi ha diferències significatives en l'estructura, ni entre els estats nadius ni entre els estats desnaturalitzats, de les diferents RNases (almenys mitjançant la utilització d'aquesta tècnica). Excepcionalment, cal assenyalar que a 40°C i 0.1 MPa, la polaritat al voltant dels residus de tirosina de la variant V108G és lleugerament diferent a la resta de variants de l'RNasa A analitzades. Aquests resultats recolzen els obtinguts per a l'estat natiu mitjançant dicromisme circular i espectroscòpia d'infraroig per transformada de Fourier (veure respectivament apartats 3.5.2 i 3.5.3.1.2.1).

3.5.3.1.1.3. El desplegament per pressió enfront del desplegament per temperatura.

Zhang i col. (1995) van dur a terme un estudi comparatiu del procés de desplegament en equilibri de l'RNasa A, induït per pressió i per temperatura, mitjançant ressonància magnètica nuclear. Els autors van observar que diferents regions de la proteïna es desplegaven de manera no cooperativa. A més, van suggerir que la pressió i la temperatura portaven a diferents estats desplegats de la proteïna

salvatge. En aquest sentit, molts investigadors sostenen que el desplegament de la proteïna induït per pressió podria conduir a un estat parcialment desplegat o intermediari *molten globule* (Takeda i col., 1995; Zhang i col., 1995), en el qual, si bé el solvent pot penetrar cap a l'interior de la molècula, aquesta reté una estructura secundària similar a la de l'estat natiu. En canvi, s'ha suggerit que l'estat desnaturalitzat que s'obté per temperatura estaria més desplegat que l'obtingut per pressió, en part a causa d'un intercanvi més ràpid dels protons dels residus interns de la proteïna desplegada per temperatura respecte al de pressió (Zhang i col., 1995). No obstant això, altres investigadors (Sosnick i Trewhella, 1992; Lustig i Fink, 1992; Seshadri i col., 1994; Tamura i Gekko, 1995) consideren que l'estat desnaturalitzat que s'assoleix per temperatura mostra també característiques *molten globule*.

Per a totes les proteïnes estudiades i tal com s'ha esmentat, el procés de desnaturalització (tant per pressió com per temperatura) seguit per espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat és reversible i correspon o es pot ajustar a un model de dos estats. A causa de l'elevada cooperativitat del procés de desplegament de l'RNasa A i donat que la tècnica de seguiment utilitzada ens aporta informació global de la proteïna, no va ser possible discernir els processos de desplegament seqüencial observats per Zhang i col. (1995). Pel fet que la polaritat de l'ambient on es troben les tirosines en l'estat desplegat és la mateixa, tampoc no es van observar diferències entre els estats desnaturalitzats per pressió i temperatura. Tanmateix, convé ressaltar que per mitjà d'espectroscòpia d'infraroig per transformada de Fourier (veure apartat 3.5.3.1.2.4), s'observen certes diferències estructurals entre ambdós estats desplegats.

En conseqüència, tal i com es mostra a la FIGURA 3.14, si tenim en compte els errors experimentals, els valors de ΔG_U (a 40°C i 0.1 MPa) estimats a partir les corbes de desnaturalització per pressió són equivalents a les estimacions del mateix paràmetre termodinàmic a partir de les corbes de desnaturalització obtingudes quan s'utilitza la temperatura com a agent desnaturalitzant.

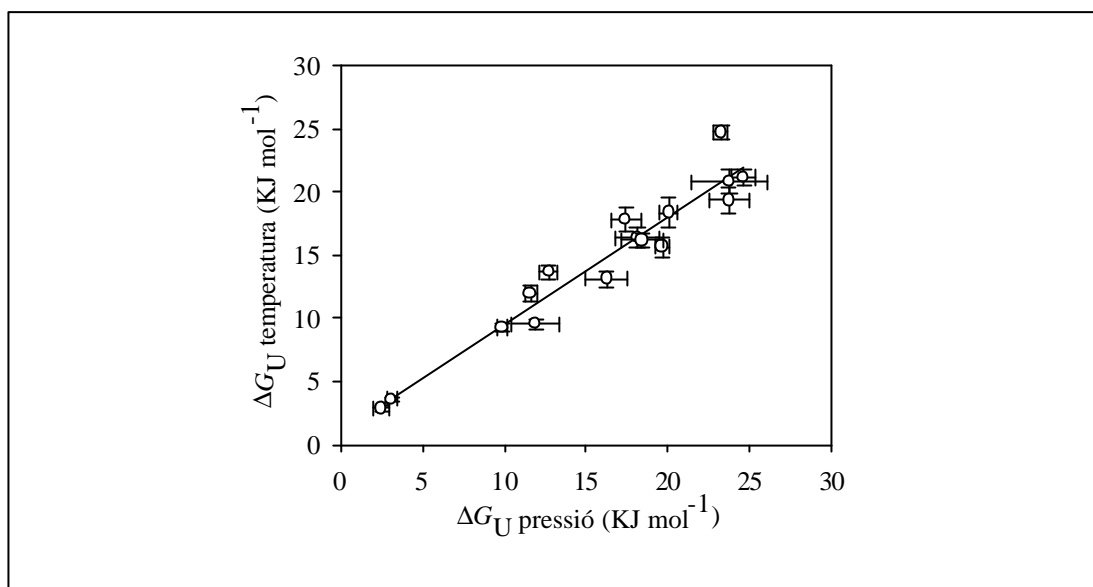
Altres indicadors d'estabilitat, com ara els valors de $P_{1/2}$ i $T_{1/2}$ de les transicions de desnaturalització induïdes respectivament per pressió i per temperatura, es correlacionen mútuament (FIGURA 3.15) i en conseqüència, també es correlacionen amb els valors de ΔG_U .

Aquestes correlacions ens indiquen d'una banda que el mecanisme de desplegament per ambdós processos de desnaturalització és molt semblant i d'altra banda, que els paràmetres que caracteritzen ambdues transicions de desnaturalització varien d'una manera molt similar per a cadascuna de les proteïnes estudiades. La qual cosa suggereix que les substitucions que s'han dut a terme tenen un efecte equivalent tant en el desplegament per pressió com en el de temperatura.

En contra d'aquests resultats, Prehoda i col., (1998) van suggerir que ometre la compressibilitat del sistema resulta en uns valors de ΔG_U i ΔV més elevats. Aquest fet incrementaria sistemàticament els valors dels paràmetres termodinàmics obtinguts per la desnaturalització per pressió, i en conseqüència resta la possibilitat que la

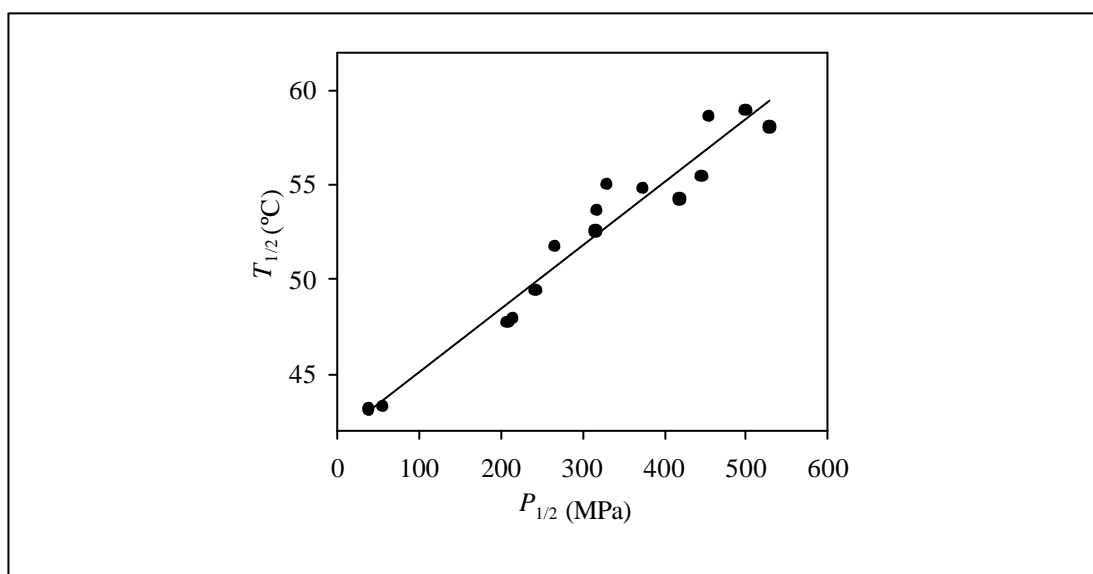
semblança amb els valors obtinguts per temperatura sigui merament una coincidència.

FIGURA 3.14



Correlació entre els valors d'energia lliure de desplegament per pressió i per temperatura (a 40°C i 0.1 MPa) de cadascuna de les proteïnes estudiades. La línia contínua mostra el millor ajust de les dades a una equació lineal ($r = 0.965$). Les barres d'error són errors estàndard de les dades.

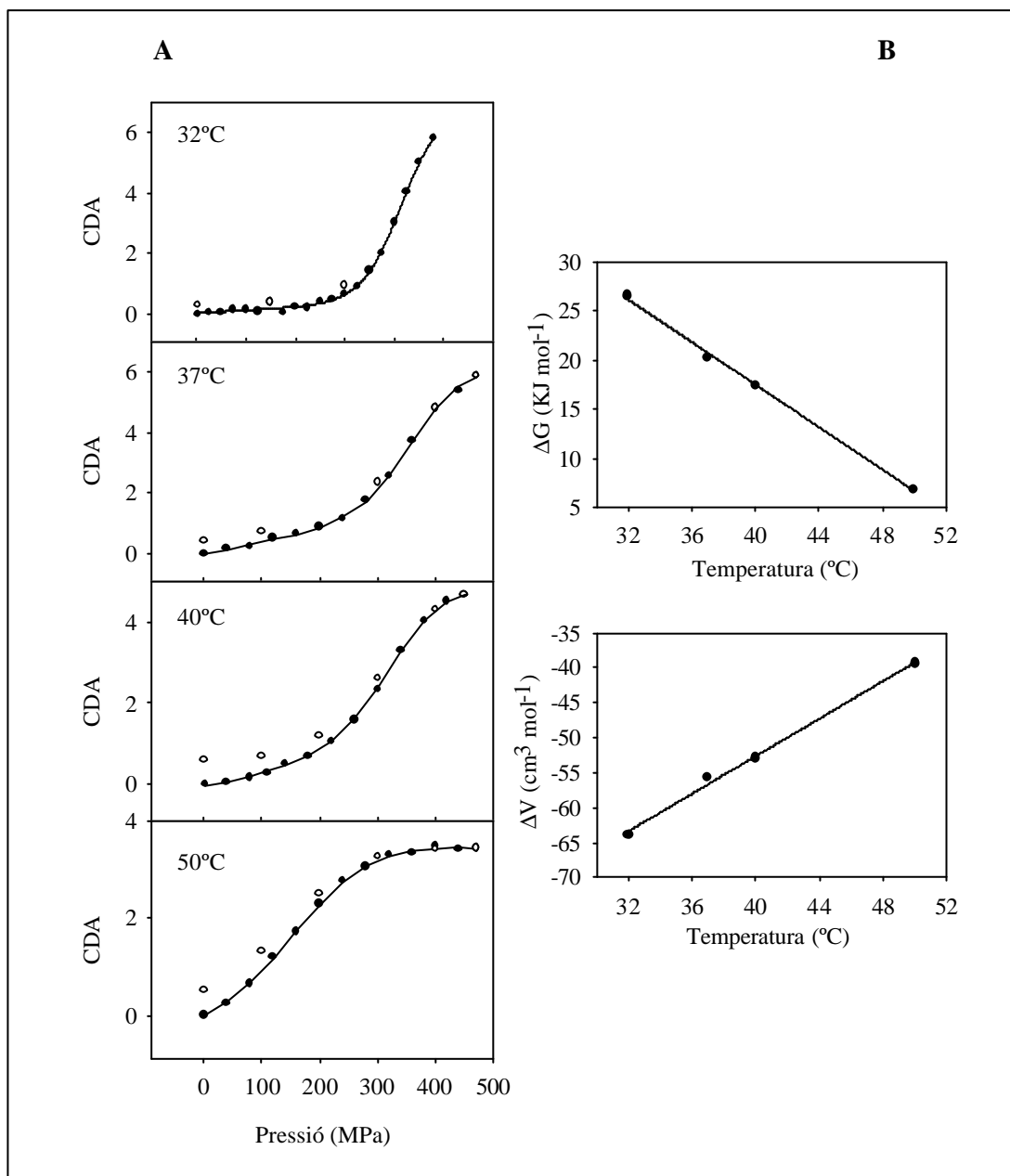
FIGURA 3.15



Correlació entre els valors de $P_{1/2}$ i $T_{1/2}$ de cadascuna de les proteïnes estudiades. La línia contínua mostra el millor ajust de les dades a una equació lineal ($r = 0.973$).

No obstant això, fruit de la correspondència entre pressió i temperatura que s'ha observat, els paràmetres termodinàmics ΔG i ΔV que es van estimar a partir dels experiments de pressió enregistrats a diferents temperatures mantenen una relació lineal amb aquest paràmetre físic (FIGURA 3.16).

FIGURA 3.16



(A) Corbes de desnaturalització per pressió de la variant I106V enregistrades a diferents temperatures. Augment (●) i disminució (○) de pressió. La línia contínua correspon a un ajust no lineal de mínims quadrats de les dades basat en un model de dos estats. (B) Correlació entre els valors de ΔG , ΔV i la temperatura en què s'ha enregistrat l'experiment. La línia contínua mostra el millor ajust de les dades a una equació lineal ($r = 0.999$ i $r = 0.997$, respectivament).

Respecte a aquest punt, les relacions lineals que s'observen ratifiquen la correcta estimació dels paràmetres termodinàmics estimats i per tant que l'ajust de les dades que s'utilitza és molt adequat per a aquesta finalitat.

3.5.3.1.1.4. Canvis de volum

Els valors de la ΔV (TAULA 3.4) del desplegament per pressió per a totes les variants són, en general, més negatius que la proteïna salvatge. Aquests valors mostren una tendència similar a la diferència de volum que hi ha entre els dos aminoàcids implicats en els reemplaçaments ($-\Delta V_{\text{res}}$) (TAULA 3.6). Per determinar els valors de $-\Delta V_{\text{res}}$, es calcula la diferència entre el volum del residu en qüestió en la proteïna variant, i el volum del residu que ocupava aquella posició en la proteïna salvatge. Els valors de V_{res} corresponen a residus totalment enterrats i s'han obtingut del treball d'Harpaz i col. (1994).

Aquest resultat estaria d'acord amb el treball de Frye i Royer (1998), els quals van suggerir per la nucleasa estafilococal que el canvi de volum vindria atribuït quasi exclusivament a la desaparició de les cavitats internes de la proteïna durant el desplegament.

3.5.3.1.1.5. Les interaccions hidrofòbiques

A fi d'analitzar la contribució de l'efecte hidrofòbic a l'estabilitat de l'RNasa A, es van comparar els canvis en l'estabilitat de les variants assajades respecte a la proteïna salvatge ($\Delta\Delta G_{\text{U}}$) amb els canvis d'energia lliure de transferència d'aigua a n-octanol dels aminoàcids implicats en les substitucions ($\Delta\Delta G_{\text{tr}}$). Els valors de $\Delta\Delta G_{\text{tr}}$ s'han obtingut per mitjà de sostreure l'estimació de l'energia estàndard de transferència del residu salvatge, de l'estimació de l'energia estàndard de transferència del residu variant, els quals es van obtenir del treball de Sharp i col (1991).

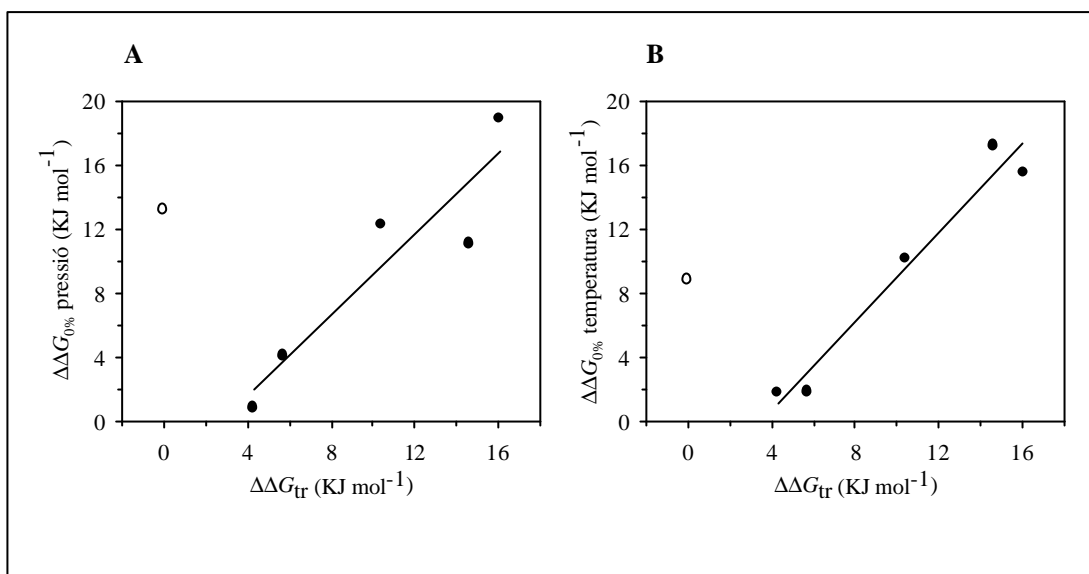
Donat que les cadenes laterals que es van modificar presenten diferent accessibilitat al solvent, els valors de $\Delta\Delta G_{\text{U}}$ es van estimar al 0% d'accessibilitat ($\Delta\Delta G_{\text{U } 0\%}$). El càlcul dels valors de $\Delta\Delta G_{\text{U } 0\%}$ de cadascuna de les variants es va dur a terme a partir de l'expressió:

$$\Delta\Delta G_{\text{U } 0\%} = (\Delta\Delta G_{\text{U}} \cdot 100) / \text{percentatge d'enterrament} \quad (3.2)$$

essent el percentatge d'enterrament igual a: 100 menys el tant per cent d'àrea accessible al solvent del residu en la proteïna variant, el qual s'estima per mitjà del programa XAM.

Tal i com es pot observar en la FIGURA 3.17, els valors mitjans de $\Delta\Delta G_{\text{U } 0\%}$ (TAULA 3.6) que resulten de cada tipus de substitució es correlacionen bé amb els corresponents valors de $\Delta\Delta G_{\text{tr}}$ (TAULA 3.6), tant pels experiments de pressió [$r = 0.929$] com pels de temperatura [$r = 0.978$].

FIGURA 3.17



Correlació entre els valors mitjans de $\Delta\Delta G_{U 0\%}$ que resulten de cada tipus de substitució i els valors de $\Delta\Delta G_{tr}$ corresponents. La línia contínua mostra el millor ajust de les dades a una equació lineal. (A) Pressió i (B) temperatura.

Aquests resultats són molt similars als obtinguts per Pace i col. (1996) en un estudi de variants diverses de la barnasa, la nucleasa estafilococal, el lisozim T4 i la proteïna del gen V del bacteriòfag f1 [$r = 0.96$]. Les correlacions obtingudes suggereixen que els canvis en l'estabilitat de la proteïna, que són induïts pels reemplaçaments d'aminoàcids en la regió 106-118, són canvis essencialment originats per la pèrdua d'interaccions hidrofòbiques. No obstant, convé ressaltar que la correlació entre la pèrdua d'estabilitat i els valors de $\Delta\Delta G_{tr}$ no és tan bona per les variants que resulten de substitucions disruptives o isoestèriques com ara Ile→Leu.

Un altre aspecte que es va analitzar fou la correlació existent entre els valors mitjans de $\Delta\Delta G_{U 0\%}$ que resulten de cada tipus de substitució i la diferència de volum dels residus implicats, és a dir els valors de $-\Delta V_{res}$ que es presenten a la TAULA 3.6 i que han estat calculats tal i com s'ha descrit abans, tant pels experiments de pressió [$r = 0.869$] com pels de temperatura [$r = 0.992$] (FIGURA 3.18).

Per tal d'expressar la pèrdua d'estabilitat que resulta d'eliminar un (Ile→Val), dos (Val→Ala) o tres (Ile→Ala) grups metil(è) de la regió 106-118 de la RNasa A, es van dividir els valors mitjans de $\Delta\Delta G_{U 0\%}$ que resulten d'un mateix tipus de substitució pel nombre de grups metil(è) eliminats ($\Delta\Delta G_{U 0\%} / -CH_2-$ o $-CH_3$) (TAULA 3.6). Els resultats són molt similars als obtinguts en altres proteïnes per variants que resulten de substitucions equivalents (Serrano i col., 1992; Jackson i col., 1993; Pace i col., 1996). Els valors mitjans de $\Delta\Delta G_{U 0\%}$ per grup metil(è) delecionat, calculats per pressió i per temperatura, són de 5.54 i 4.05 KJ mol⁻¹,

TAULA 3.6

Pèrdua d'estabilitat mitjana que resulta de cada tipus de reemplaçament i la seva relació amb mesures de transferència a solvents i amb la diferència de volum dels residus implicats en aquestes substitucions.

Tipus de substitució	Número de variants	Desnaturalització per pressió		Desnaturalització per temperatura		$\Delta\Delta G_{tr}$ (KJ mol ⁻¹) ^d	$-\Delta V_{res}$ (Å ³) ^e
		$\Delta\Delta G_{U_{0\%}}$ (KJ mol ⁻¹) ^b	$\Delta\Delta G_{U_{0\%}}/-CH_2-$ (KJ mol ⁻¹) ^c	$\Delta\Delta G_{U_{0\%}}$ (KJ mol ⁻¹) ^b	$\Delta\Delta G_{U_{0\%}}/-CH_2-$ (KJ mol ⁻¹) ^c		
Ile-Ala	2	18.98	6.33	15.56	5.19	16.07	74.8
Ile-Val	2	4.12	4.12	1.88	1.88	5.69	25.8
Ile-Leu	2	13.28	-	8.90	-	-0.08	0.3
Val-Ala	3	12.34	6.17	10.17	5.09	10.38	49.0
Val-Gly	2 ^a / 3	11.14	3.71	17.26	5.75	14.60	75.3
Ala-Gly	1	0.89	0.89	1.81	1.81	4.27	26.3

^a Variants assajades per desnaturalització per pressió. ^b Valor de $\Delta\Delta G_U$ mitjà esperat que resulta de cada tipus de reemplaçament si considerem que la cadena lateral substituïda es troba 100% enterrada. Aquest valor es va calcular tal i com van descriure Pace i col. (1996). ^c Els valors mitjans de $\Delta\Delta G_{U_{0\%}}$ es van dividir pel nombre de grups CH-, -CH₂-, i -CH₃ eliminats. ^d Els valors de $\Delta\Delta G_{tr}$ que corresponen a cada tipus de substitució es basen en mesures de transferència d'aigua → n-octanol (Fauchère i Pliska, 1983), corregits per Sharp i col. (1991). ^e Els valors de $-\Delta V_{res}$ es basen en els volums que ocupen els residus enterrats (Harpaz i col., 1994).

TAULA 3.7

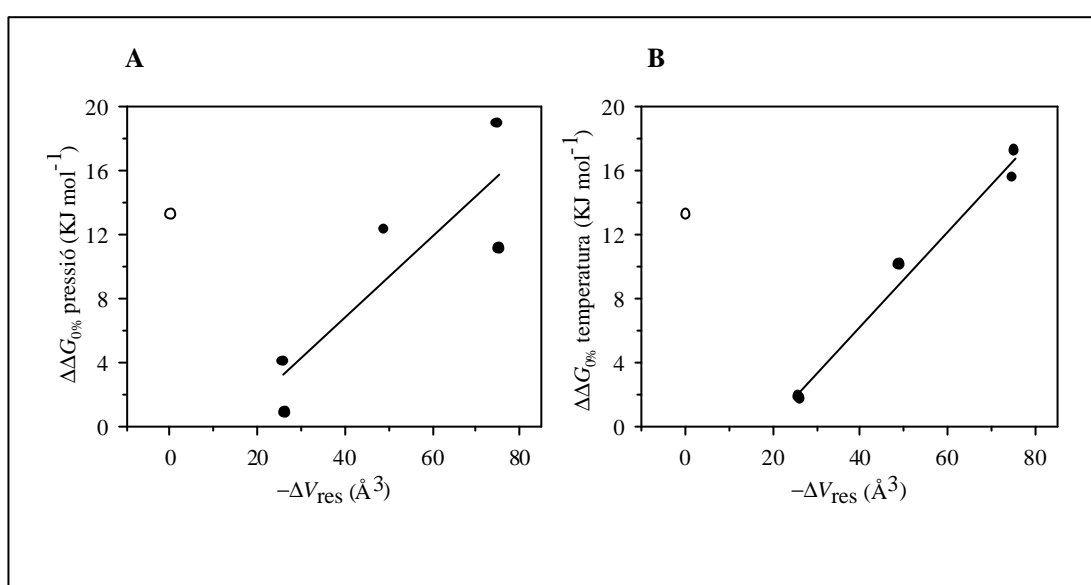
Altres paràmetres que caracteritzen les variants de la regió C-terminal l'RNasa A

Variant	Àrea accessible al solvent de la cadena lateral salvatge (\AA^2) ^a	Pèrdua d'àrea accessible al solvent que s'enterra durant el plegament respecte a la proteïna salvatge (\AA^2) ^b	Nombre de grups metil(è) + àtoms C $_{\alpha}$ < 6 \AA ^c
I106A	2.1	61.3	76
I106V	2.1	14.1	27
I106L	2.1	22.7	-
I107A	19.7	50.6	58
I107V	19.7	4	18
I107L	19.7	12.3	-
V108A	2.4	43.2	54
V108G	2.4	67.7	80
A109G	2.6	17.9	23
V116A	39.7	29	24
V116G	39.7	42.2	39
V118A	39.2	22.9	30
V118G	39.2	48.5	51

^a L'àrea exposada al solvent de les cadenes laterals en la proteïna salvatge es va calcular per mitjà del program XAM. ^b La diferència d'àrea accessible al solvent que s'enterra durant el plegament, entre la proteïna salvatge i cadascuna de les variants, es va calcular tal i com van descriure Serrano i col. (1992). ^c Resultat d'addicionar el número de grups metil(è) + àtoms C $_{\alpha}$ que es troben a una distància de menys de 6 \AA (densitat d'empaquetament) de cadascun dels grups metil(è) eliminats.

respectivament. En efecte, aquests valors són equivalents als resultats obtinguts per Serrano i col., 1992 (6.28 KJ mol⁻¹), Jackson i col., 1993 (5.56 KJ mol⁻¹), Pace i col., 1996 (5.31 KJ mol⁻¹). Per a dur a terme aquestes mitjanes es van excloure les variants que resultaven del reemplaçament d'alguns dels residus per una glicina, donat que Nemethy i col (1966) van suggerir que l'entropia conformacional associada a la cadena lateral de la glicina, o sigui, la major flexibilitat al voltant dels enllaços C-C_α (**f**) i C_α-N (**y**) veïns al C_α de la glicina respecte la cadena lateral de la proteïna salvatge, podria alterar els valors de $\Delta\Delta G_U$.

FIGURA 3.18



Correlació entre els valors mitjans de $\Delta\Delta G_U 0\%$ que resulten de cada tipus de substitució i els valors de $-\Delta V_{res}$ corresponents. La línia contínua mostra el millor ajust de les dades a una equació lineal. (A) Pressió i (B) temperatura.

En relació amb l'efecte hidrofòbic, Tanford (1980) va demostrar que aquest és directament proporcional a l'àrea accessible al solvent que es retira del contacte amb l'aigua. Així doncs, és possible quantificar el valor de la força hidrofòbica en una proteïna, mitjançant la correlació entre l'estimació de la pèrdua d'estabilitat d'una variant i posar-la en relació amb la pèrdua d'àrea accessible al solvent. Per això, per a cadascuna de les variants estudiades, es va dividir el valor de $\Delta\Delta G_U 0\%$ per la corresponent diferència en l'àrea accessible al solvent de les cadenes laterals encloses en la substitució. L'àrea accessible al solvent per les cadenes laterals en solució es va calcular amb el programa XAM. Les variants que resulten de reemplaçaments Ile→Leu no es van tenir en compte. Es va obtenir un valor mitjà de 236 J mol⁻¹Å⁻² per la pressió i 218 J mol⁻¹Å⁻² pels experiments de temperatura. Aquest resultat és similar al valor estimat en estudis de transferència de compostos alifàtics de solvents orgànics a aigua (196 J mol⁻¹Å⁻²) (Sharp i col., 1991) i a l'obtingut per la proteïna CI2 (229 J mol⁻¹Å⁻²) (Jackson i col., 1993). A més, és

equivalent a $263 \text{ J mol}^{-1}\text{Å}^{-2}$, un valor mitjà estimat per la barnasa, la nucleasa estafilococal i la proteïna del gen V del bacteriòfag f1 (Serrano i col., 1992).

3.5.3.1.1.6. Efectes estèrics

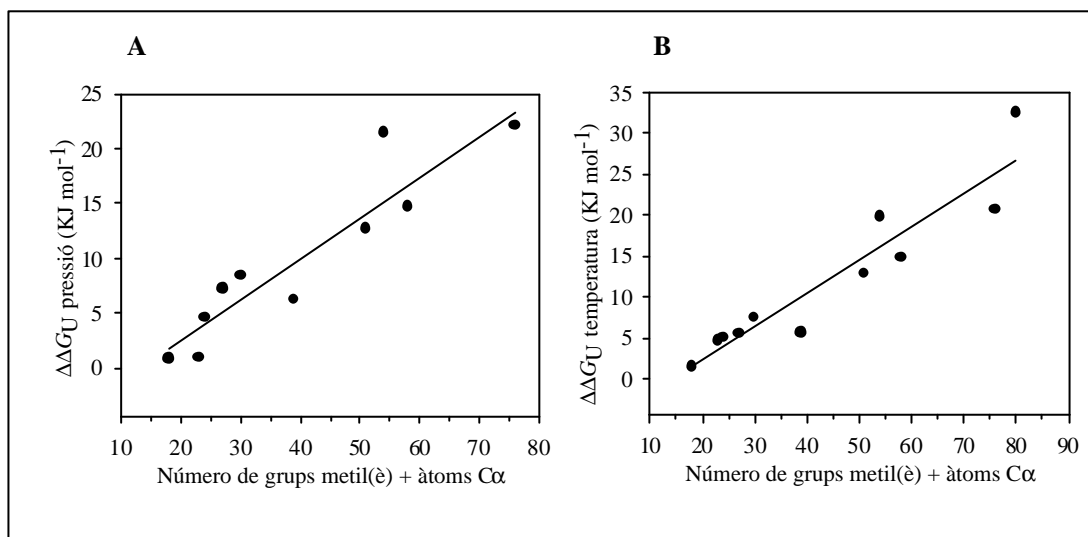
En les TAULES 3.4 i 3.5 s'evidencia que el mateix tipus de substitució en posicions diferents de la proteïna resulta en una pèrdua d'estabilitat diferent. Aquestes variacions en l'estabilitat es produeixen com a conseqüència de diferències en l'ambient que envolta els diferents residus, ja que no poden originar-se per diferències en la hidrofobicitat de la cadena lateral. En relació amb això, es va trobar una correlació entre els valors de $\Delta\Delta G_U$ obtinguts per pressió [$r = 0.701$] i temperatura [$r = 0.816$] i les corresponents diferències d'àrea accessible al solvent que queda exclosa de la fase aquosa durant el plegament, entre la proteïna salvatge i les variants (TAULA 3.7). Aquest resultat està en concordança amb els obtinguts per la barnasa (Serrano i col., 1992) i la proteïna CI2 (Jackson i col., 1993). La diferència d'àrea accessible al solvent que s'enterra durant el plegament, entre la proteïna salvatge i cadascuna de les variants, es va calcular de la següent manera, tal i com van descriure Serrano i col. (1992): en primer lloc, es va sostreure l'àrea accessible al solvent del residu en qüestió en la proteïna salvatge (estat natiu), de l'àrea accessible al solvent del mateix residu com si aquest estigués totalment exposat. Ambdós valors es van estimar a partir del model optimitzat de la proteïna salvatge en format pdb per mitjà del programa XAM. El valor que s'obté d'aquesta diferència el denominem A. A continuació, a partir del model optimitzat de la proteïna variant (estat natiu), i també mitjançant el programa XAM, s'estima l'àrea accessible al solvent del nou residu que hem introduït en la proteïna. Aleshores se sostreu aquest valor, de l'àrea accessible al solvent del mateix residu com si aquest estigués totalment exposat (estimat amb el mateix programa). El valor que s'obté d'aquesta diferència el denominem B. Finalment, la diferència entre els valors A i B dona lloc a la pèrdua d'àrea accessible al solvent que s'enterra durant el plegament de la proteïna variant respecte a la proteïna salvatge.

Així mateix, es va observar una molt bona relació lineal entre els valors de $\Delta\Delta G_U$ i la densitat d'empaquetament, expressada per mitjà del número de grups metil(è) més els àtoms C_α que es troben dins d'una esfera de 6 Å de radi del grup hidrofòbic deletionat (TAULA 3.7) (FIGURA 3.19). Pels experiments de pressió el coeficient de correlació va ser de 0.926 i pels de temperatura de 0.940. Aquest resultat suggereix que la densitat d'empaquetament al voltant d'un residu en particular és un factor que determina en gran mesura la contribució d'aquell residu a l'estabilitat de la proteïna.

Tal com s'ha dit, les diferències en la resposta de la proteïna davant d'aquest tipus de substitució es poden explicar en termes de la posició de la cadena lateral que substituïm en la proteïna. Els dos residus més importants per l'estabilitat, Val108 i Ile106, es troben fora del contacte amb el solvent, a l'interior de la molècula. Les seves cadenes laterals estan encarades vers el nucli hidrofòbic central, essent la posició de la Val108 més endinsada dins de la regió hidrofòbica. A més tal i com s'ha exposat a l'apartat 3.2, s'ha observat que els residus alifàtics d'aquesta regió

promouen contactes entre estructures secundàries diverses i es troben entre els més conservats de la proteïna. Aquest fet suggereix que en la regió 106-118 de l'RNasa A, la conservació dels residus podria conduir a un patró de plegament determinat, així com a interaccions estructurals específiques en l'estat plegat. En aquest sentit, convé ressaltar l'elevat nombre d'interaccions que s'eliminen en substituir la valina en la posició 108 per una glicina, en comparació amb la resta de reemplaçaments assajats (TAULA 3.8). Al contrari, les cadenes laterals Ile107 i Ala109 estan dirigides cap a l'exterior i, per tant, podrien no ser tant determinants. Atès que la cadena lateral Ile106 està més enterrada, un canvi en la forma de la cadena lateral hauria de ser més disruptiu. No obstant això, la variant I106L és més estable que la variant I107L. Aquest fet suggeriria que la posició Ile106 és més apte que la posició Ile107, per tal d'acomodar canvis estructurals que impliquin una modificació en la disposició de les ramificacions de la cadena lateral. La posició V118 presenta més densitat d'empaquetament que la posició V116. Els reemplaçaments en la primera posició resulten en proteïnes variants més desestabilitzades. Convé ressaltar que ambdues posicions es troben considerablement més exposades al solvent que els residus 106-109.

FIGURA 3.19



Correlació entre els valors mitjans de $\Delta\Delta G_U$ que resulten de cada tipus de substitució i la densitat d'empaquetament. La línia contínua mostra el millor ajust de les dades a una equació lineal.

En conclusió i d'acord amb el comportament general de les proteïnes globulars, el canvi d'energia lliure associat a aquest tipus de substitucions depèn en primer lloc de les característiques dels dos aminoàcids implicats. Físicament, aquest terme pot ésser expressat com la diferència d'energia requerida per a la desolvatació (transferència del solvent a l'interior de la proteïna) del residu en estudi respecte del residu pel qual serà reemplaçat. En segon lloc, depèn del context on es troba la cadena lateral en estudi dins de l'estructura tridimensional de la proteïna i en conseqüència, de com l'estructura s'ajusta en resposta a la substitució.

TAULA 3.8

Interaccions suprimides i introduïdes en les diferents variants respecte la proteïna salvatge				
Variant	Número de contactes. < 4 Å de la cadena lateral salvatge ^a	Número de contactes perduts ^b	Número de contactes guanyats ^c	Contactes guanyats - perduts ^d
I106A	29	16	5	-11
I106V	29	16	14	-2
I106L	29	15	15	0
I107A	28	12	2	-10
I107V	28	6	5	-1
I107L	28	10	10	0
V108A	34	18	2	-16
V108G	34	24	0	-24
A109G	27	15	1	-14
V116A	23	10	1	-9
V116G	23	14	0	-14
V118A	27	13	2	-11
V118G	27	19	2	-17

^a Número total de contactes (àtoms en una esfera de 4 Å de radi) entre la cadena lateral salvatge i els àtoms que l'envolten en l'estructura salvatge. ^b Número de contactes que s'estableixen en la proteïna salvatge que s'eliminen en substituir el residu corresponent. ^c Número de contactes entre la cadena lateral variant i els àtoms que l'envolten que no apareixen en l'estructura salvatge. ^d Diferència en el número de contactes en el lloc on ha tingut lloc la substitució entre les estructures variant i salvatge.

3.5.3.1.2. Espectroscòpia d'absorció a l'infraroig

Atès que l'espectroscòpia d'absorbància a l'ultraviolat de quarta derivada no permet monitoritzar els canvis a nivell d'estructura secundària que es promouen al llarg de la desnaturalització proteica, i donada la necessitat de caracteritzar estructuralment els estats no natius (parcialment plegats i desplegats) de les proteïnes per tal de comprendre els mecanismes del plegament proteic i els principis de l'estabilització proteica (Kim i Baldwin, 1990; Dill i Shortle, 1991), es va examinar el procés de desplegament de l'RNasa A comercial, recombinant salvatge i de les variants I106A, I106L, I106V, I107A, V108A, V108G, V116G, V118A i V118G enfront d'un augment gradual de pressió i de temperatura, en condicions d'equilibri, utilitzant l'espectroscòpia d'infraroig per transformada de Fourier.

Malgrat que l'espectroscòpia d'infraroig és una de les millors tècniques per determinar l'estructura secundària de les proteïnes globulars en solució (Byler i Susi, 1996; Surewick i Mantsch, 1988; Dong i col., 1990), el seu ús a l'hora de seguir els canvis conformacionals de les proteïnes durant el seu procés de desnaturalització s'ha vist limitat pel fet que la major part d'aquestes presenta agregació intermolecular durant el desplegament induït per temperatura. Gràcies al fet que en l'RNasa A no s'observa agregació durant el desplegament induït per temperatura seguit per FTIR (Clark i col., 1981), ni tampoc durant el desplegament induït per pressió (Takeda i col., 1995), i donat que la desnaturalització d'aquesta proteïna és reversible, l'RNasa A és un model ideal per tal d'aplicar la tècnica d'FTIR a l'estudi del seu procés de plegament/desplegament. En són alguns exemples clars, els treballs de Schulz i Balwin, (1992), Seshadri i col. (1994), Backmann i col. (1995) i Reinstädler i col. (1996). A més, donat que l'element predominant d'estructura secundària a l'RNasa A és el full plegat β , on s'han inserit les diferents substitucions aminoacídiques d'aquest treball, i amb motiu de l'elevada sensibilitat de l'FTIR pel que fa a aquest tipus d'estructura secundària, aquesta tècnica semblava, *a priori*, adequada per endegar un nou estudi encarat a completar els resultats obtinguts per mitjà de l'espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat. S'ha de destacar que la idoneïtat d'aquesta tècnica ve refermada pel fet que aquest estudi seria més difícil de dur a terme mitjançant altres tècniques espectroscòpiques com és ara el dicroïsme circular a l'ultraviolat llunyà, la qual, a banda d'ésser més específica per tal de seguir els canvis en l'estructura hèlix α , no s'ha pogut adequar, de moment, als estudis de desnaturalització proteica induïda per altes pressions.

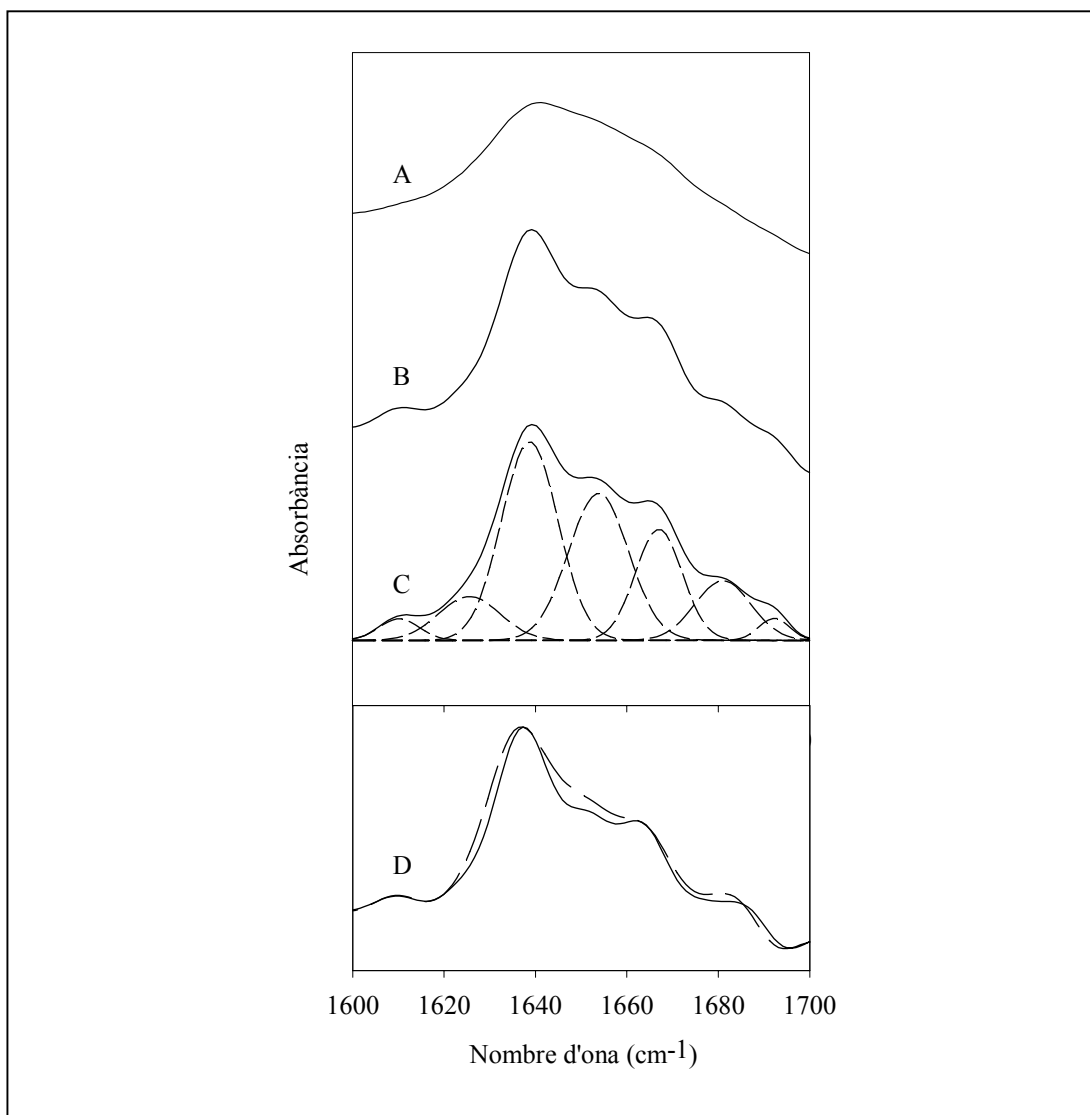
Donat que l'espectre en la regió de l'amida I' reflecteix la conformació de la cadena polipeptídica, els canvis estructurals que es van estudiar per mitjà d'aquesta tècnica no corresponen a una regió en concret, sinó al conjunt de la proteïna.

3.5.3.1.2.1. L'espectre d'infraroig en la regió de l'amida I' en condicions natives

En condicions natives i després d'un bescanvi parcial d'hidrogen per deuteri, l'espectre d'infraroig en la regió de l'amida I' de l'RNasa A salvatge i de les seves variants mostra un perfil ampli i asimètric que resulta essencialment de la

superposició de diferents bandes d'absorció. Mitjançant un procediment matemàtic anomenat FSD (*Fourier self-deconvolution*) es van amplificar els detalls espectrals (FIGURA 3.20.A-B).

FIGURA 3.20



Espectres d'infraroig en la regió de l'amida I' de l'RNasa A salvatge (A) original i (B) optimitzat per FSD. (C) Ajust de l'espectre optimitzat per FSD (línia contínua) mitjançant el mètode de Byler i Susi (1986). En línia discontinua es mostren les corbes gaussianes característiques. (D) Comparació dels espectres optimitzats i normalitzats de l'RNasa A salvatge (línia contínua) i de la variant V108G (línia discontinua). Condicions experimentals: acetat sòdic 50 mM (pD 5.0), P = 0.1 MPa, T= 12°C i una concentració de proteïna de 75 mg/mL.

Els espectres optimitzats per FSD es van ajustar mitjançant l'arranjament iteratiu de l'alçada, amplada i posició de corbes gaussianes (Byler i Susi, 1986). Per mitjà

d'aquest mètode d'ajust, es van determinar les posicions de les diferents bandes d'absorció, les quals es van assignar, considerant la precisió del mètode, a 1624, 1637, 1651, 1664, 1678 i 1686 cm^{-1} (FIGURA 3.20.C). Tal i com es detalla en la TAULA 3.9, aquestes bandes corresponen respectivament a l'absorció del full β , full β , hèlix α més estructura desordenada (*coil*), girs d'inversió, full β i girs d'inversió. Les assignacions per a cadascuna d'aquestes bandes d'absorció es basen en el treball de Byler i Susi (1986). A més, es va observar una petita banda situada a 1610 cm^{-1} , la qual s'origina com a conseqüència de la vibració de les cadenes laterals dels aminoàcids (Matsuura i col., 1996).

TAULA 3.9

Posició i assignació de les bandes d'absorció de l'RNasa A a 12°C i 0.1 MPa en tampó D₂O després d'un bescanvi parcial d'hidrogen per deuteri.

Posició de la banda (cm^{-1})	Assignació	Àrea de la banda (%)
1610	Cadenes laterals	1
1624	Full β	5
1637	Full β	45
1651	Hèlix α + estructura desordenada	22
1664	Girs d'inversió	20
1678	Full β	5
1686	Girs d'inversió	2

Cal destacar que les formes d'estructura secundària de tipus full β i gir d'inversió es van assignar cadascuna a bandes d'absorció diverses (indicades a la TAULA 3.9). Cal fer esment també que, atès que la freqüència de la vibració de tensió del grup C=O de l'amida I' d'ambdós elements d'estructura secundària és pràcticament idèntica (Dong i col., 1990), no va ser possible establir la contribució de l'hèlix α i de l'estructura desordenada d'una manera independent.

En relació amb l'ajust dels espectres d'infraroig, aquest procediment va permetre estimar la composició de l'estructura secundària de l'estat natiu de l'RNasa A salvatge i de les seves variants. Per això, es va assumir que les àrees relatives de les corbes gaussianes ajustades (TAULA 3.9), les quals plasmaven les diferents bandes d'absorció espectrals, representaven els percentatges dels diferents tipus d'estructura secundària de la proteïna. La composició de l'estructura secundària de la proteïna salvatge (comercial o recombinant) que es va determinar va ser d'un 55% de full β , 22% de girs d'inversió i 22% d'hèlix α més estructura desordenada. Aquest resultat concorda amb els percentatges d'estructura secundària obtinguts d'estudis cristal·logràfics (Wlodawer i col., 1988) i d'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear (Rico i col., 1989), la qual cosa dona major validesa les assignacions de les diferents bandes a determinats elements d'estructura secundària.

Aquesta tècnica va permetre comparar els estats nadius de les variants amb el de la proteïna salvatge. Es va dur a terme una anàlisi qualitativa del perfil dels espectres optimitzats per FSD i es va observar que, en l'estat natiu, la proteïna salvatge i les diferents variants mostren similitud estructural. D'acord amb això, en condicions natives, no es contemplen diferències en el contingut d'estructura secundària entre les diferents variants assajades respecte a la proteïna salvatge. Tanmateix, aquesta anàlisi qualitativa va evidenciar petites diferències, sobretot en els espectres d'aquelles variants amb substitucions en les posicions 108 i 118 de l'RNasa A. Per il·lustrar aquests resultats, en la FIGURA 3.20.D es mostren els espectres de l'RNasa A recombinant salvatge i la variant V108G. Aquesta observació està en concordança amb els resultats obtinguts per difracció de raigs X, per bé que, amb aquesta tècnica, només es van evidenciar diferències estructurals per la variant V108G.

Les diferències espectrals provocades per aquestes substitucions aminoacídiques, atribuïbles a variacions en la conformació de la cadena polipeptídica en l'estat natiu, augmenten en l'ordre V118G<V108A<V108G. Atès que les variacions són similars per a les tres variants, la descripció s'ha centrat en la variant V108G.

Per consegüent ens hem limitat a descriure els canvis espectrals que s'evidencien en la variant V108G, tot i que per les altres dues variants es confirmen variacions espectrals similars.

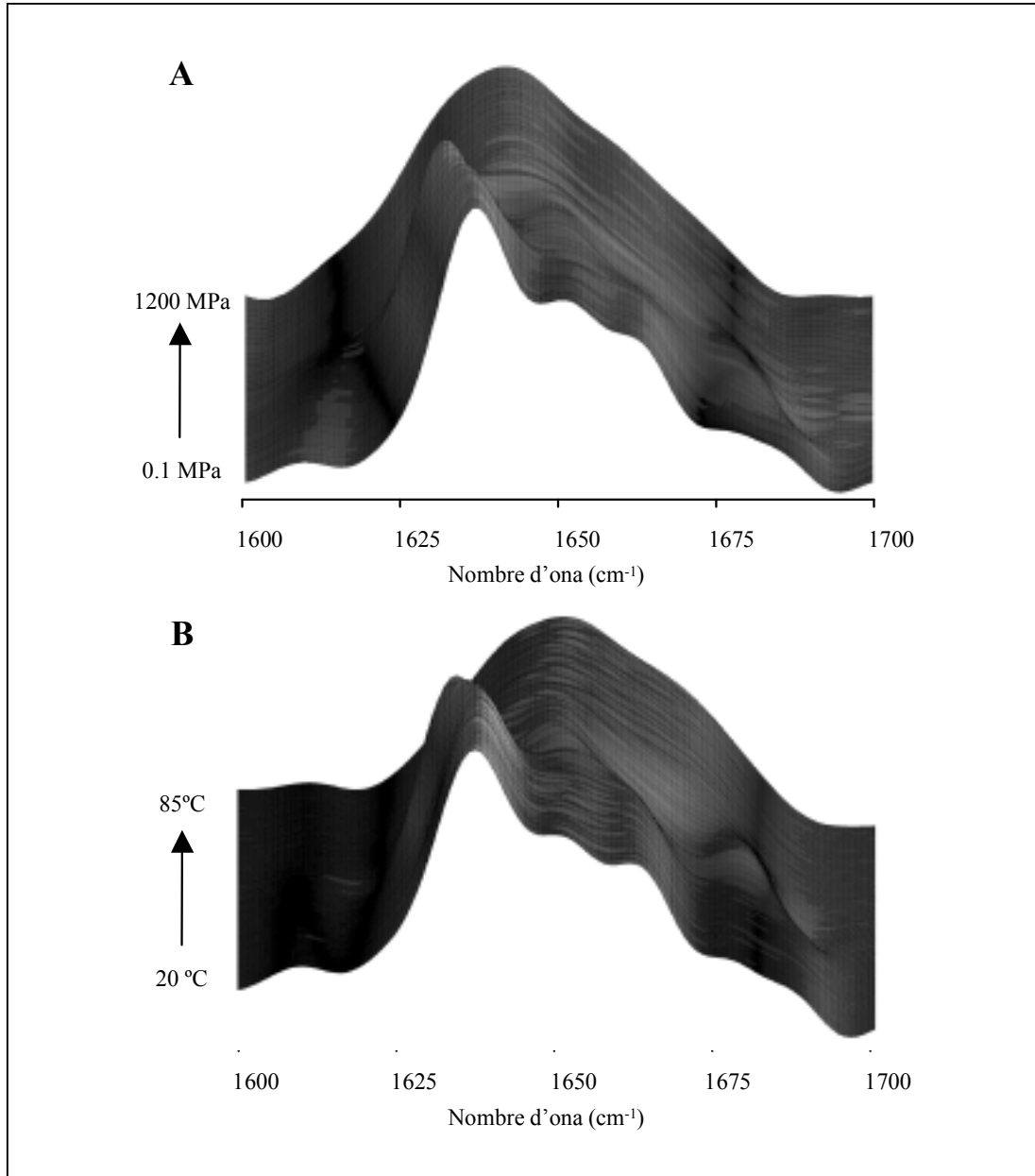
Com es mostra en la FIGURA 3.20.D, si ho comparem amb la proteïna salvatge, la variant V108G mostra un petit desplaçament de la banda de l'amida I' cap a freqüències inferiors (sobretot pel que fa a la banda d'absorció assignada a estructures en gir d'inversió, la qual es desplaça de 1686 cm^{-1} a 1684 cm^{-1}). Aquest desplaçament podria estar causat per certes variacions en el règim i en el grau de bescanvi H/D d'aquesta variant V108G.

Per a la mateixa variant V108G, la banda d'absorció a 1637 cm^{-1} presenta un perfil més ampli, la qual cosa indicaria que aquesta variant ha sofert lleugeres modificacions en el patró d'enllaços de pont d'hidrogen en les regions en full β respecte a la proteïna salvatge. A més, la major intensitat de les bandes d'absorció emplaçades a 1651 i 1684 cm^{-1} , assignades respectivament a hèlix α més estructura desordenada i girs d'inversió, seria indicativa d'un percentatge superior en aquesta variant d'aquest tipus d'estructures.

3.5.3.1.2.2. Variació de la regió de l'amida I' de l'espectre d'infraroig en funció de la pressió i de la temperatura

Per tal d'obtenir informació sobre els canvis estructurals induïts per la pressió i la temperatura en les diferents proteïnes, es va seguir l'evolució dels espectres optimitzats per FSD corresponents durant el procés de desplegament. En la FIGURA 3.21 es mostren, com a exemples, els espectres optimitzats en la regió de l'amida I' enregistrats per la variant V118G en funció de la pressió i de la temperatura (A i B, respectivament).

FIGURA 3.21



(A) Espectres optimitzats per FSD de la variant V118G en funció de la pressió entre 0.1 MPa i 1200 MPa. Condicions experimentals: MES 50 mM (pD 5.0), T = 20°C i una concentració de proteïna de 75 mg/mL. (B) Espectres optimitzats per FSD de la variant V118G en funció de la temperatura, entre 12 i 85°C. Condicions experimentals: acetat sòdic 50 mM (pD 5.0), P = 0.1 MPa i una concentració de proteïna de 75 mg/mL. L'eix de les Y (no es mostra) correspon a l'absorbància.

Com es pot comprovar, quan les proteïnes es van exposar progressivament a altes pressions o temperatures es van enregistrar canvis espectrals cooperatius, els quals corresponen a la transició entre l'estat natiu i l'estat desnaturalitzat. Tanmateix, abans de la transició de desnaturalització també es van observar canvis graduals en l'absorció.

Així, com s'il·lustra en la FIGURA 3.21, a pressions i temperatures baixes, es percep un desplaçament de l'espectre al voltant de 1637 cm^{-1} cap a una freqüència menor. Donat que en aquestes condicions no s'aprecien variacions en la intensitat d'aquesta banda d'absorció principal, aquest canvi es va assignar a un augment del procés de bescanvi H/D a l'interior de la proteïna. Cal fer esment que, per la variant V108G no s'observa un desplaçament spectral tant marcat en les primeres etapes del procés de desnaturalització, la qual cosa suggereix que aquesta proteïna presenta un bescanvi H/D més complet ja en l'estat natiu (aquest fet, per bé que no s'il·lustra en aquest apartat, es pot observar més endavant a la FIGURA 3.23). A mesura que augmenta la pressió o la temperatura, s'adverteix una disminució cooperativa de la intensitat de les bandes d'absorció. Aquest fet reflecteix la desaparició de l'estructura secundària nativa. Així mateix, té lloc un augment concomitant de la intensitat al voltant de 1645 cm^{-1} que indica l'aparició d'estructura desordenada.

Finalment, a pressions o temperatures més elevades, ja en la darrera etapa del desplegament proteic, si bé les proteïnes retenen certa estructura secundària (donada la diferència entre l'espectre de l'estat desnaturalitzat i una corba de Gauss), domina clarament la forma desordenada. La presència d'estructura secundària residual està d'acord amb els resultats obtinguts per diferents autors, mitjançant la caracterització de l'estat desnaturalitzat de la proteïna salvatge (Labhardt, 1982; Yang i col., 1986; Seshadri i col., 1994; Nicoli i Benedek, 1976; Anderle i Mendelsohn, 1987; Sosnick i Trewhella, 1992; Tamura i Gekko, 1995; Talluri i Scheraga, 1990; Neira i col., 1999).

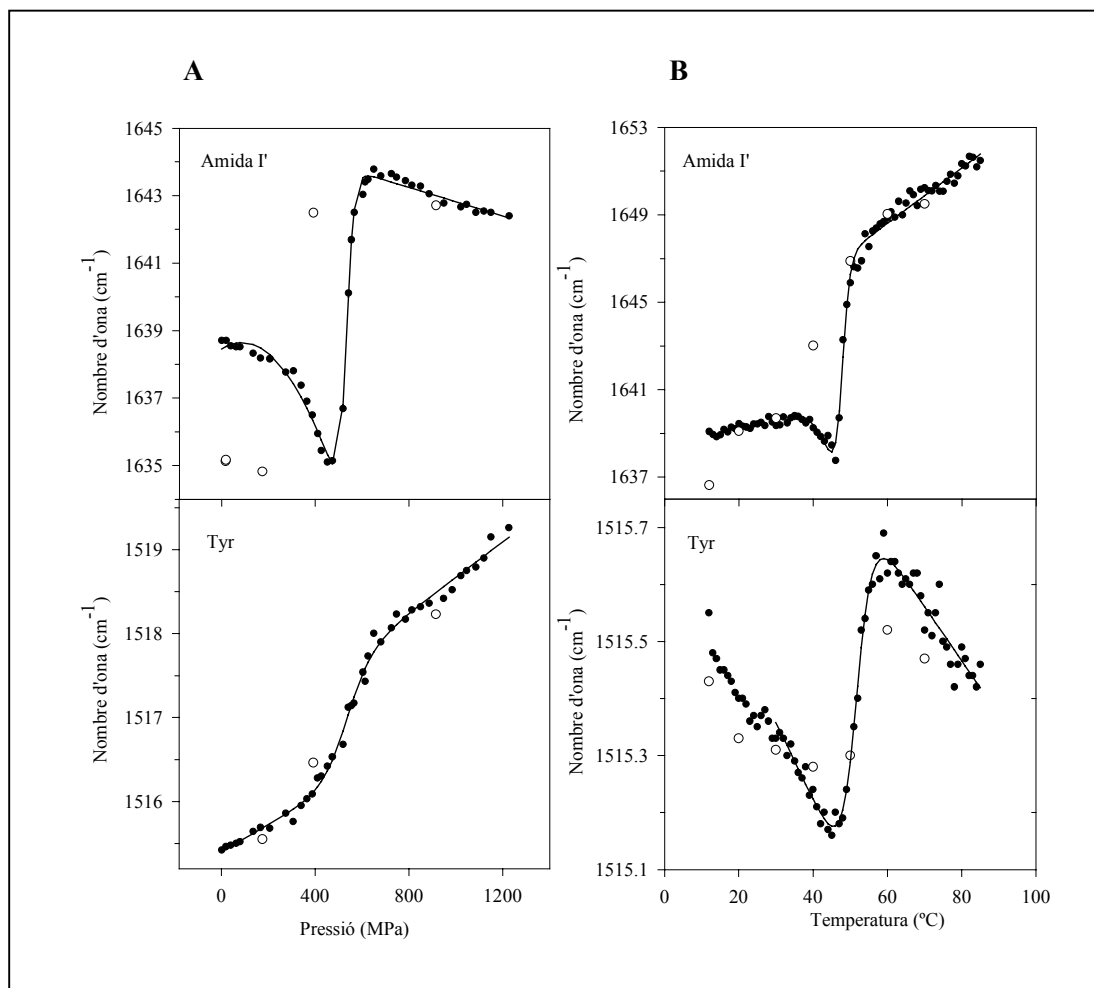
Cal destacar que, curiosament, quan es comparen els espectres d'infraroig de les proteïnes desnaturalitzades per pressió amb els corresponents espectres de l'estat desnaturalitzat per temperatura, aquests mostren uns perfils similars, però amb els màxims emplaçats a diferents freqüències (veure apartat 3.5.3.1.2.4).

3.5.3.1.2.3. Efecte de les substitucions en l'estabilitat de la proteïna

L'estabilitat de l'RNasa A salvatge i de les seves variants enfront de la desnaturalització per pressió i temperatura es va seguir analitzant l'evolució del màxim de l'espectre a la regió de l'amida I' gràcies al fet que les intensitats i els canvis espectrals en aquesta banda són un reflex de l'estat i dels canvis en la conformació de la cadena polipeptídica. Els canvis estructurals en les proteïnes es van seguir també per mitjà de monitoritzar la banda d'absorció de les cadenes laterals de les tirosines, emplaçada a 1515 cm^{-1} . La posició exacta d'aquesta banda reflecteix els canvis en l'ambient d'aquestes cadenes laterals durant el desplegament, els quals

resulten principalment d'alteracions en l'estructura terciària de la proteïna. Ambdues anàlisis dels canvis espectrals s'il·lustren en la FIGURA 3.22.

FIGURA 3.22



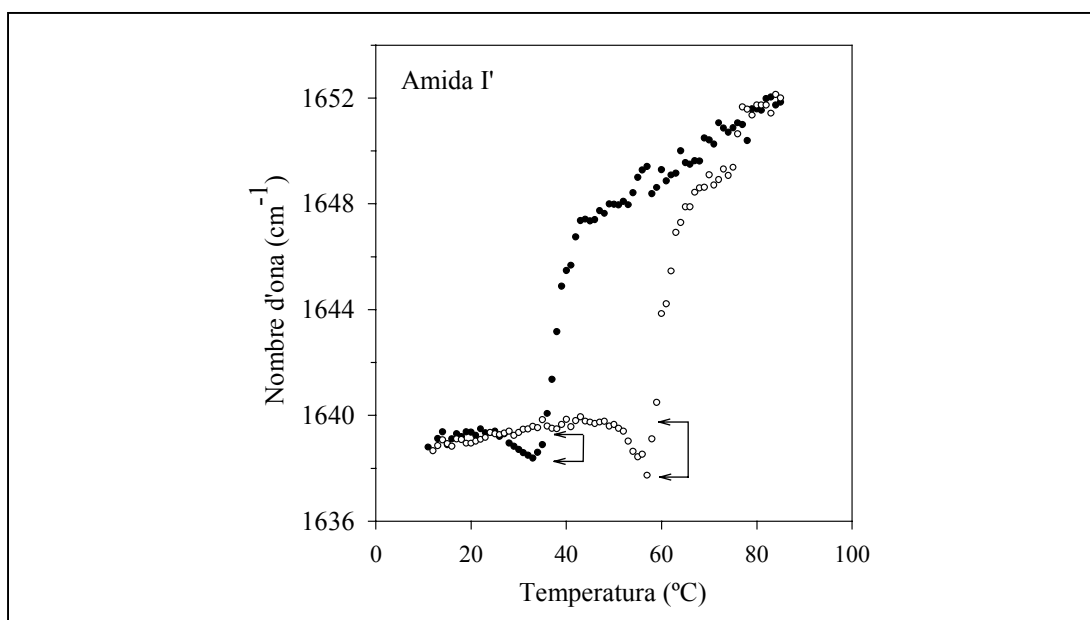
Corbes de desnaturalització per pressió (A) i per temperatura (B) de la variant V118G. La posició del màxim de l'espectre en la regió de l'amida I' i en la regió de les tirosines es va representar en funció de l'augment (●) i disminució (○) de pressió o temperatura. La línia contínua correspon a un ajust no lineal de mínims quadrats de les dades basat en un model de dos estats.

Inicialment, un augment de la pressió (FIGURA 3.22.A) al llarg de la regió de pre-transició fa que la posició del màxim de l'espectre en la regió de l'amida I' es desplaci cap a freqüències més petites, la qual cosa resulta en un pendent negatiu. Aquest efecte es coneix amb el nom del desplaçament elàstic (Frauenfelder i col., 1990) i indica un reforçament dels ponts d'hidrogen. A mesura que augmenta la pressió, just abans dels principals canvis conformacionals cooperatius, es promou un desplaçament més sobtat de l'espectre cap a freqüències més baixes. Aquest canvi

s'originaria a causa d'una millor accessibilitat del solvent a l'interior de la proteïna, cosa que estimularia el procés de bescanvi H/D. Cal assenyalar que aquest fet també és palès quan s'augmenta la temperatura (FIGURA 3.22.B).

Pel que fa a la variant V108G, tal i com s'ha esmentat abans, no s'observa un desplaçament espectral tant marcat (ni per mitjà d'un augment de pressió ni de temperatura), la qual cosa indicaria una millor accessibilitat al solvent cap a l'interior de la proteïna i, per tant, una estructura més oberta i dinàmica. Aquest fet s'evidencia per exemple a la FIGURA 3.23, on es comparen les corbes de desnaturalització per temperatura de l'RNasa A salvatge i de la variant V108G, enregistrades seguint la posició del màxim de l'espectre en la regió de l'amida I'.

FIGURA 3.23



Corbes de desnaturalització per temperatura de l'RNasa A salvatge (○) i de la variant V108G (●). La posició del màxim de l'espectre en la regió de l'amida I' es representa en funció de l'augment de temperatura. La línia contínua correspon a un ajust no lineal de mínims quadrats de les dades basat en un model de dos estats. S'indiquen amb fletxes els límits del desplaçament espectral que es promou just abans dels principals canvis conformacionals cooperatius.

Finalment, tant per la pressió com per la temperatura, s'observa un increment de la freqüència del màxim de l'amida I' que correspon al desplegament de la proteïna.

Tant en l'RNasa A salvatge com en les diferents variants assajades, aquesta transició és reversible (veure a la FIGURA 3.22, les mesures efectuades disminuint la pressió i la temperatura). No obstant això, convé ressaltar que no es recuperen íntegrament els valors inicials de freqüència, donat que no tots els protons de la proteïna es van bescanviar per deuteri en les condicions experimentals inicials.

La transició que resulta d'analitzar la banda d'absorció de les tirosines al voltant de 1515 cm^{-1} coincideix plenament amb la transició de desplegament i no amb els canvis espectrals que corresponen al bescanvi H/D en la regió de la pre-transició.

Els canvis observats durant el procés de desnaturalització (tant per pressió com per temperatura) en la posició del màxim de l'espectre en la regió de l'amida I' i de la banda d'absorció de les cadenes laterals de les tirosines, suggereixen que la pèrdua d'estructura secundària és molt cooperativa.

Totes les corbes de desplegament es van ajustar a un model termodinàmic en dos estats (Rubens, 1999). En la TAULA 3.10 es detallen els valors del punt mig de la transició de desnaturalització obtinguts a partir dels canvis induïts en la regió de l'amida I' i en la regió de les tirosines quan s'augmenta la pressió i la temperatura.

TAULA 3.10

Valors del punt mig de la transició de desnaturalització induïda per pressió i per temperatura, de l'RNasa A salvatge i les seves variants, obtinguts a partir dels canvis espectrals en la regió de l'amida I' i en la regió de les tirosines.

Proteïna	$P_{1/2}$ (MPa)		$T_{1/2}$ (°C)	
	Amida I'	Tyr	Amida I'	Tyr
RNasa A comercial	743.3	779.9	61.5	63.6
RNasa A recombinant	743.2	758.1	59.4	62.8
I106A	337.5	377.5	46.6	47.9
I106L	525.6	575.8	53.6	55.7
I106V	612.0	603.5	56.2	59.0
I107A	505.7	548.9	53.7	52.9
V108A	274.6	298.1	46.0	49.0
V108G	150.7	183.2	37.3	37.5
V116G	569.1	566.8	53.9	56.4
V118A	652.0	649.0	55.7	57.8
V118G	533.0	534.1	47.6	51.7

Els valors de $P_{1/2}$ i $T_{1/2}$ calculats per mitjà d'ambdues bandes d'absorció a l'infraroig (amida I' i tirosines) concorden de manera excel·lent. També coincideixen amb els valors obtinguts, sota condicions comparables, per espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat de quarta derivada. Aquests resultats, doncs, demostren que el desplaçament de la banda d'absorció de les tirosines en l'espectre d'infraroig i el canvi d'absorció a l'ultraviolat que tenen lloc durant el desplegament proteic reflecteixen els mateixos esdeveniments moleculars, i estan plenament d'acord amb els resultats que van obtenir Reinstädler i col. (1996) en un estudi d'FTIR realitzat sobre l'RNasa A salvatge.

A més, es pot concloure que la pèrdua de l'estructura secundària i els canvis en l'ambient de les cadenes laterals de les tirosines tenen lloc de manera simultània, la qual cosa suggereix que el desplegament induït per pressió i per temperatura de l'RNasa A, sota condicions d'equilibri, és un procés global i molt cooperatiu que implica tant l'estructura secundària com la terciària.

Arran d'aquesta equivalència entre els resultats obtinguts per mitjà d'ambdues tècniques espectroscòpiques (ultraviolat i infraroig) i considerant que calen concentracions de proteïna molt diferents per tal d'enregistrar aquests espectres (1 i 75 mg/ml, respectivament), es pot inferir que el procés de desplegament és intramolecular.

Tanmateix, convé ressaltar que els valors de $T_{1/2}$ que s'han obtingut en D_2O són sistemàticament més grans que els obtinguts per espectroscòpia d'UV en H_2O , tal i com s'ha descrit en altres treballs (Talluri i Sheraga, 1990; Yamamoto i Tasumi, 1991; Fabian i col., 1994).

Com es pot comprovar, respecte a l'RNasa A salvatge, totes les transicions de desnaturalització de les proteïnes variants estan desplaçades cap a pressions i temperatures més baixes. Cadascuna de les substitucions disminueixen en diferent grau l'estabilitat de la proteïna. Així, els valors de $P_{1/2}$ i $T_{1/2}$ de les proteïnes analitzades es troben entre 151 MPa per la V108G i 743 MPa per la proteïna salvatge, i entre 37°C per la V108G i 62°C per l'RNasa A salvatge, respectivament.

Amb relació a l'estabilitat, es pot deduir que entre les diferents variants que presenten substitucions en una mateixa posició de la proteïna, l'estabilitat decreix en l'ordre Ile>Val>Leu>Ala>Gly. Quan es comparen les posicions de la regió C-terminal estudiades, s'observa que la I106 i la V108 presenten un paper cabdal en l'estabilitat de la proteïna. Aquests resultats són del tot consistents amb els exposats anteriorment, quan es va emprar l'espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat.

Cal insistir especialment en el fet que per la variant V108G, el punt mig de les transicions de desnaturalització per pressió i per temperatura disminueix uns 592 MPa i 25°C, respectivament, respecte a la proteïna salvatge. Aquest resultat suggereix que la Val108 és un residu molt important per tal de preservar la integritat estructural de l'estat natiu de l'RNasa A, fins al punt que la substitució de la valina per una glicina minva l'estabilitat i origina petites alteracions conformacionals en l'estat natiu (apartat 3.5.3.1.2.1), les quals es podrien associar amb una major flexibilitat conformacional i amb una estructura proteica més oberta o dinàmica. Una possible causa de la pèrdua d'estabilitat podria ésser la formació d'una cavitat en la proteïna originada per la substitució de la valina per una glicina. Donat que la flexibilitat proteica està directament relacionada amb la compressibilitat, experiments de compressibilitat de la variant V108G podrien confirmar la presència de la cavitat.

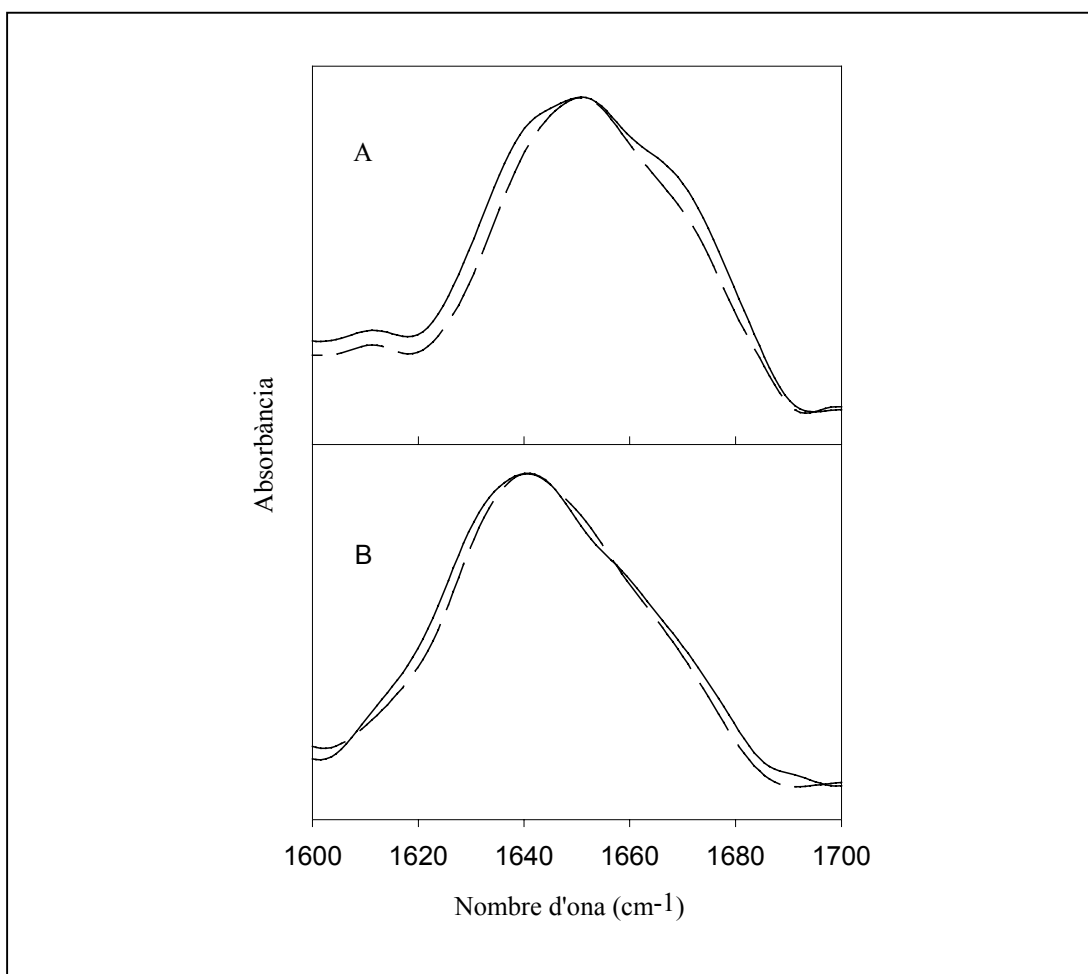
Tal i com s'ha comentat, s'ha observat que amb anterioritat al desplegament de l'estructura secundària, té lloc un desplaçament de l'espectre d'absorció a l'infraroig cap a freqüències menors. Aquest fet és degut a un bescanvi H/D d'aquelles regions amb un major grau de protecció i que per tant restaven sense bescanviar en les

condicions experimentals de partida. La banda d'absorció principal emplaçada a 1637 cm^{-1} , que correspon a l'estructura full β , en augmentar la pressió o la temperatura (just abans de la transició de desnaturalització) es desplaça de manera pronunciada cap a 1634 cm^{-1} . En contra, el desplaçament de les bandes d'absorció en la regió de l'amida I' que corresponen a girs (1664 i 1686 cm^{-1}) i estructures desordenades (1651 cm^{-1}) no és tant palès, la qual cosa pot ser indicativa de què els protons d'aquestes estructures es bescanvien durant el tractament de bescanvi previ a l'enregistrament dels espectres. Aquests resultats coincideixen amb els de diversos estudis emprant ressonància magnètica nuclear bidimensional, els quals suggereixen que les posicions que mostren un bescanvi H/D lent es localitzen en fulls β i hèlixs α , en regions enterrades en l'RNasa A nativa (Zhang i col., 1995; Talluri i Scheraga, 1990; Robertson i Baldwin, 1991; Nash i col., 1996) i en un possible lloc d'inici del plegament que comprèn principalment una regió en full β , la qual inclou la regió en estudi (Neira i col., 1999).

Anteriorment, Talluri i Scheraga (1990) van proposar que l'estat desnaturalitzat per temperatura de l'RNasa A conté estructura residual al voltant del CFIS C-terminal. Si assumim que l'estat desnaturalitzat de l'RNasa A que s'assoleix quan s'utilitza pressió o temperatura conté certa estructura secundària en aquesta regió en estudi, es pot esperar que les substitucions introduïdes, les quals impliquen la deleció d'algunes interaccions de curt i llarg abast presents en aquest estat conformacional, condueixin a canvis en la conformació de la cadena polipeptídica en l'estat desnaturalitzat. En aquest sentit, en aquest treball es mostra que les substitucions que presenten majors conseqüències en l'estabilitat, semblen provocar una disrupció més marcada de l'estructura secundària residual de l'hipotètic CFIS C-terminal en l'estat desnaturalitzat per temperatura. Això es pot constatar en la FIGURA 3.24 a partir del fet que aquests canvis condueixen a un perfil de forma més gaussiana de la banda de l'amida I' i en la desaparició del colze emplaçat al voltant de 1670 cm^{-1} .

Aquesta correspondència s'ajusta bé amb la hipòtesi que els protons que persisteixen en l'estat desnaturalitzat, és a dir, que presenten un major grau de protecció, participen de manera més significativa en l'estabilització de la proteïna (Backmann i col., 1996). Així doncs, els resultats suggeririen que els residus alifàtics del CFIS en estudi promouen interaccions importants per tal de consolidar certa estructura secundària durant les primeres etapes del plegament d'aquesta regió i per mantenir l'estabilitat i l'estructura de la proteïna plegada. Pel que fa a la desnaturalització induïda per pressió, aquesta sembla conduir a un estat desplegat en el qual s'obtenen pràcticament els mateixos espectres, tant per la proteïna salvatge com per la variant més desestabilitzada (V108G), tal i com es mostra en la FIGURA 3.24.B.

FIGURA 3.24



Espectres optimitzats per FSD i normalitzats de l'estat desnaturalitzat per temperatura (0.1 MPa, 85°C) (A) i per pressió (1200 MPa, 20°C) (B) de l'RNasa A recombinant salvatge (línia contínua) i de la variant V108G (línia discontinua).

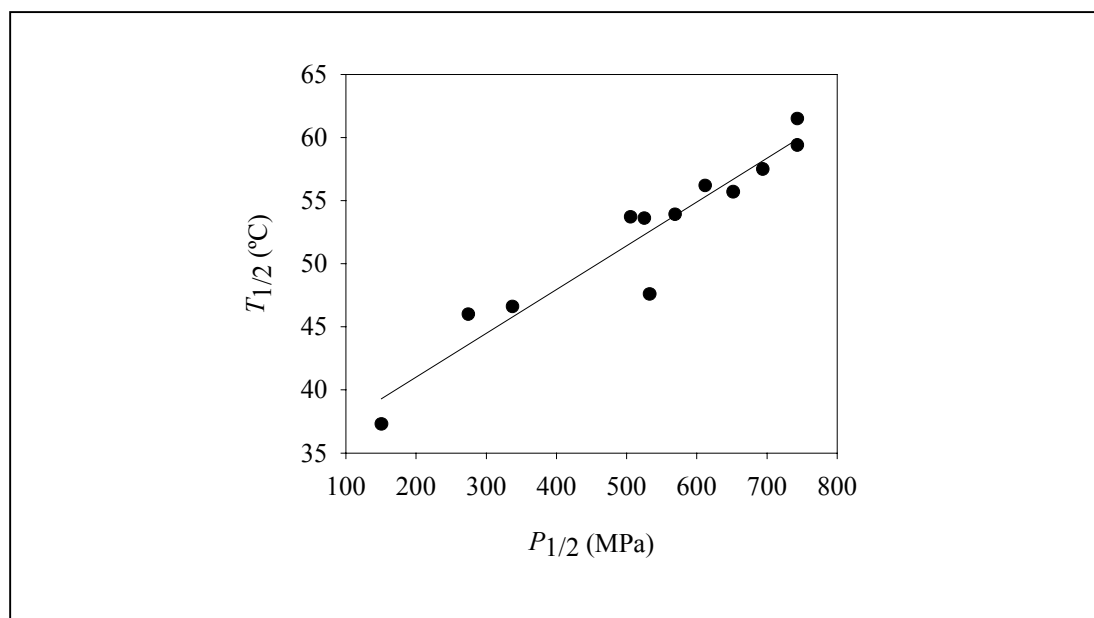
3.5.3.1.2.4. *El desplegament per pressió enfront del desplegament per temperatura*

Els canvis conformacionals en l'RNasa A salvatge i en les variants que resulten de la desnaturalització induïda per pressió, no difereixen considerablement d'aquells que s'observen quan es va utilitzar la temperatura com a agent desnaturalitzant..

En concordança amb els resultats obtinguts sota condicions d'equilibri mitjançant espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat, l'estabilitat relativa de les diferents variants de l'RNasa A és la mateixa quan es compara el desplegament induït per pressió i el desplegament per temperatura per mitjà d'FTIR. Això és, si representem $P_{1/2}$ enfront de $T_{1/2}$, calculats a partir de les transicions de desnaturalització seguides per

espectroscòpia d'infraroig, observem que la relació entre ambdues variables és lineal (FIGURA 3.25).

FIGURA 3.25



Correlació entre els punts mitjos de desnaturalització per pressió i els punts mitjos de desnaturalització per temperatura estimats per l'RNasa A salvatge i per cadascuna de les variants, a partir de les dades obtingudes emprant l'espectroscòpia d'infraroig. La línia contínua mostra el millor ajust de les dades a una equació lineal ($r = 0.954$).

La bona correlació entre $P_{1/2}$ i $T_{1/2}$ indicaria que l'assumpció d'un desplegament per temperatura en dos estats (àmpliament detallat a la bibliografia), també és aplicable al desplegament induït per pressió. A més, aquesta linealitat suggereix que les substitucions que s'han dut a terme tenen un efecte equivalent tant en el desplegament per pressió com en el de temperatura.

La desnaturalització per temperatura, a diferència de la desnaturalització per pressió, condueix, en moltes proteïnes, a la formació irreversible d'estructura intermolecular en full β i a l'agregació. Aquest procés es manifesta per un increment en la intensitat de la banda d'absorció de l'amida I' al voltant de $1615\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$. Els nostres resultats indiquen clarament l'absència d'agregació en el procés de desnaturalització per temperatura de les proteïnes assajades, d'acord amb el comportament de l'RNasa A salvatge descrit per Clark i col. (1981). Per tant, es pot afirmar que l'estat desnaturalitzat de l'RNasa A tant per pressió com per temperatura és un estat reversible.

Convé destacar, però, que el màxim de l'espectre d'infraroig en la regió de l'amida I' de l'estat desnaturalitzat de l'RNasa A salvatge, així com de les seves

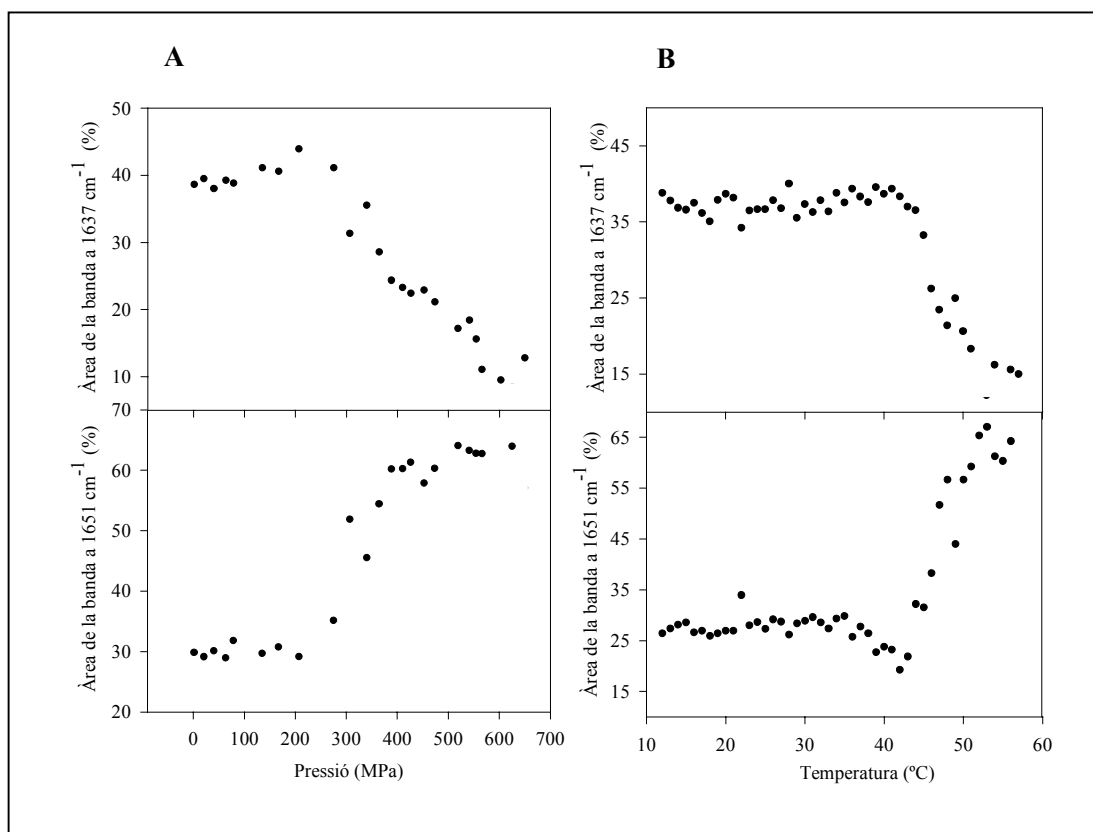
variants, se situa a una freqüència diferent, segons si s'ha emprat pressió o temperatura.

Quan s'utilitza la pressió com a agent desnaturalitzant, el màxim de l'espectre a 1200 MPa se centra en la regió de 1640 cm^{-1} , mentre que quan s'utilitza la temperatura, el màxim de l'espectre a 85°C es localitza a 1650 cm^{-1} (FIGURA 3.24). Segons Takeda i col. (1995), els quals van observar un efecte similar per l'RNasa A salvatge, aquest desplaçament suggeriria que l'esquelet polipeptídic en l'estat desplegat per pressió de l'RNasa A salvatge i de les diferents variants està més solvatat que en l'estat desnaturalitzat per temperatura. Semblaria, doncs, que la pressió promou un estat desplegat de la proteïna diferent al que s'obté per pressió. A més, d'una banda, la major intensitat a 1630 cm^{-1} en l'espectre de l'estat desnaturalitzat per pressió suggeriria un contingut superior en full β , i d'altra banda, la major intensitat a 1670 cm^{-1} en l'estat desnaturalitzat per temperatura suggeriria un contingut més elevat en girs. Això estaria d'acord amb els resultats obtinguts en anteriors treballs, on la desnaturalització induïda per pressió sembla conduir a un estat *molten globule* (Masson i Cléry, 1996; Zhang i col., 1995; Yamaguchi i col., 1995) i en canvi, l'estat desnaturalitzat per temperatura, presentaria un major desplegament de la cadena polipeptídica (Zhang i col., 1995). Aquest resultat complementa els obtinguts per absorció a l'ultraviolat, on es va comprovar que ambdós estats desnaturalitzats es caracteritzaven per presentar un increment comparable de la polaritat mitjana al voltant de les tirosines (apartat 3.5.3.1.1.1).

3.5.3.1.2.5. Variació en el contingut d'estructura secundària a partir dels canvis espectrals

Per tal de determinar els canvis conformationals de l'esquelet polipeptídic en termes de variació dels elements d'estructura secundària durant el desplegament induït per pressió i per temperatura de les proteïnes estudiades, es van ajustar una sèrie de corbes gaussianes a cadascun dels espectres enregistrats durant el procés de desnaturalització (Smeller i col., 1995) (apartat 2.2.2.2.5.2). Per l'RNasa A, la intensitat relativa de la banda a 1637 cm^{-1} és la més aparent, la qual cosa suggereix que en l'estat natiu predomina l'estructura en full β . De fet, l'àrea de les corbes gaussianes assignades a l'estructura secundària de tipus full β , gairebé correspon a la meitat de l'àrea total de l'espectre de l'estat natiu de l'RNasa A. Donat que les substitucions dels aminoàcids van tenir lloc en una regió en full β i que l'espectroscòpia d'FTIR és particularment sensible als canvis en les cadenes β de les proteïnes (Fabian i col., 1994), era d'esperar que les variacions més marcades de l'espectre s'originessin per alteracions en aquest element d'estructura secundària. Així doncs, es va representar la variació del percentatge de les dues bandes principals de l'amida I' al llarg del procés de desnaturalització induït per pressió i per temperatura. És a dir, la banda a 1637 cm^{-1} que reflecteix la pèrdua d'estructura en full β , i la banda a 1651 cm^{-1} que indica l'aparició d'estructura desordenada. Els resultats obtinguts per la variant V118G s'il·lustren en la FIGURA 3.26.

FIGURA 3.26



Efecte de la pressió (A) i de la temperatura (B) en les àrees de les bandes d'absorció del full β (1637 cm^{-1}) i estructura desordenada (1651 cm^{-1}) per la variant V118G.

Ambdues bandes mostren canvis sobtats i concomitants de la intensitat durant el procés de desnaturalització. Les transicions de desnaturalització obtingudes mitjançant el seguiment dels efectes de la pressió i de la temperatura en les àrees de les bandes d'estructura en full β i desordenada, per a cadascuna de les proteïnes assajades, concorden bàsicament amb els resultats exposats anteriorment, la qual cosa suggereix que el patró de desplegament de l'estructura en full β per a cadascuna de les proteïnes estudiades té lloc de manera coordinada al desplegament global que presenten aquestes proteïnes.

3.5.4. La variant Y115W

3.5.4.1. *Desnaturalització per pressió i desnaturalització per temperatura*

En aquest apartat s'exposen els resultats obtinguts en els experiments de desnaturalització, per pressió i temperatura, de la variant Y115W i es comparen amb els de la proteïna salvatge. Les característiques peculiars de la cadena lateral del triptòfan han de permetre el seguiment del procés de desplegament de la proteïna mitjançant espectroscòpia de fluorescència, a més de les altres tècniques presentades anteriorment per la resta de variants hidrofòbiques (apartat 3.5.3).

3.5.4.1.1. *Espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat i espectroscòpia de fluorescència*

Un canvi en l'ambient d'un residu de tirosina durant el desplegament d'una proteïna produeix una alteració de les propietats òptiques del residu en qüestió. Així doncs, l'alteració de l'espectre d'absorció d'aquest residu és conseqüència del procés de desplegament que té lloc en aquella posició concreta de la proteïna. Tanmateix, tal i com s'ha esmentat en l'apartat 3.5.3.1.1.1, donat que l'RNasa A conté sis residus de tirosina, els canvis que s'observen en l'espectre d'absorció a l'ultraviolat que acompanyen el desplegament de la proteïna representen la mitjana de cadascuna de les contribucions d'aquests residus de tirosina. Per tant, els espectres d'absorció a l'ultraviolat no ens proporcionen informació sobre regions específiques, sinó que ens aporten una percepció general del desplegament de tota la proteïna.

A fi d'aconseguir informació específica de la regió C-terminal de l'RNasa A, es va reemplaçar la Tyr115 per un triptòfan.

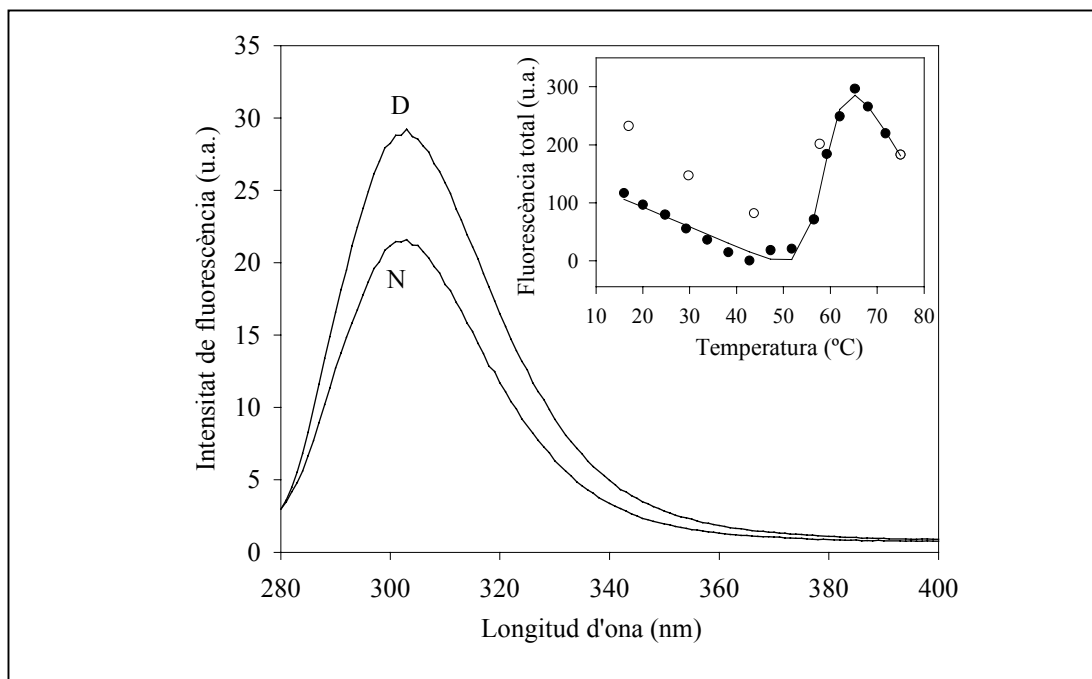
En aquest apartat es presenten els resultats obtinguts mitjançant espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat de quarta derivada i espectroscòpia de fluorescència del procés de desplegament induït per pressió i per temperatura, sota condicions d'equilibri, de la variant Y115W.

Quan es va seguir el procés de desnaturalització induït per pressió i per temperatura de l'RNasa A salvatge mitjançant espectroscòpia de fluorescència, no es van observar diferències espectrals prou marcades per tal de poder analitzar curosament la transició. Això pot ser degut a la baixa sensibilitat de la fluorescència intrínseca dels residus de tirosina als canvis en l'ambient de la proteïna. Donat que ambdós processos de desnaturalització donen lloc a resultats pràcticament idèntics, a la FIGURA 3.27 només es presenten els espectres d'emissió de fluorescència de l'RNasa A salvatge en funció de la temperatura.

Així doncs, els paràmetres que caracteritzen la transició de desnaturalització de la variant Y115W, obtinguts per ambdues tècniques físiques (absorció a l'ultraviolat i fluorescència), es van poder calcular i es comparen amb els obtinguts per la proteïna

salvatge, quan es va seguir el desplegament per mitjà d'espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat.

FIGURA 3.27



Variació de l'espectre d'emissió de fluorescència de l'RNasa A salvatge quan s'irradia amb una longitud d'ona de 265 nm en funció de la temperatura, entre l'estat natiu i el desnaturalitzat. Condicions experimentals: Acetat sòdic 50 mM (pH 5.0), $P = 0.1$ MPa i una concentració de proteïna de 0.5 mg/ml. L'insert mostra la corba de desnaturalització per temperatura de l'RNasa A salvatge. La fluorescència total entre 280 i 400 nm es va representar en funció de l'augment (●) i disminució (○) de temperatura. La línia contínua correspon a un ajust no lineal de mínims quadrats de les dades basat en un model de dos estats.

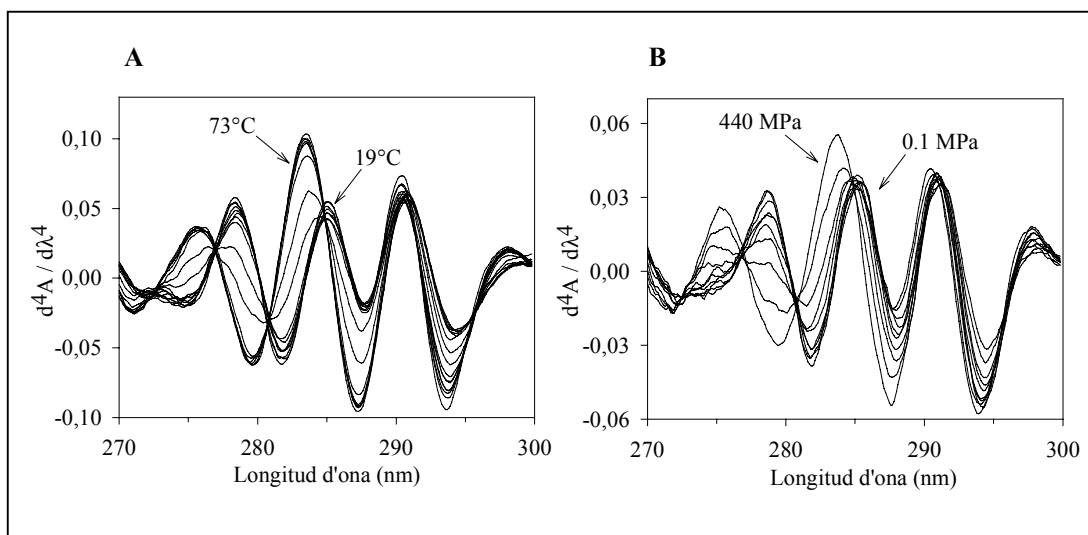
3.5.4.1.1.1. Espectre d'absorció en la regió de l'ultraviolat

En la FIGURA 3.28, es representen els espectres d'absorció de quarta derivada de la variant Y115W optimitzats per les tirosines ($\Delta\lambda = 2.6$) en funció de la pressió i de la temperatura. S'evidencia que l'estat natiu de la proteïna consta de dos pics principals: un pic situat a 291 nm, el qual és característic de l'absorció del Trp, i un altre que es troba a 286 nm i que resulta de l'absorció de les tirosines. Així doncs, és possible seguir de manera simultània, durant el desplegament de la proteïna, els canvis en l'ambient de les tirosines i del triptòfan per mitjà de seguir la variació d'ambdues regions espectrals.

Si bé el pic que correspon al triptòfan pràcticament no es troba afectat per la desnaturalització de la proteïna (tant per pressió com per temperatura), el pic que pertany a les tirosines experimenta un desplaçament cap al blau i un canvi en

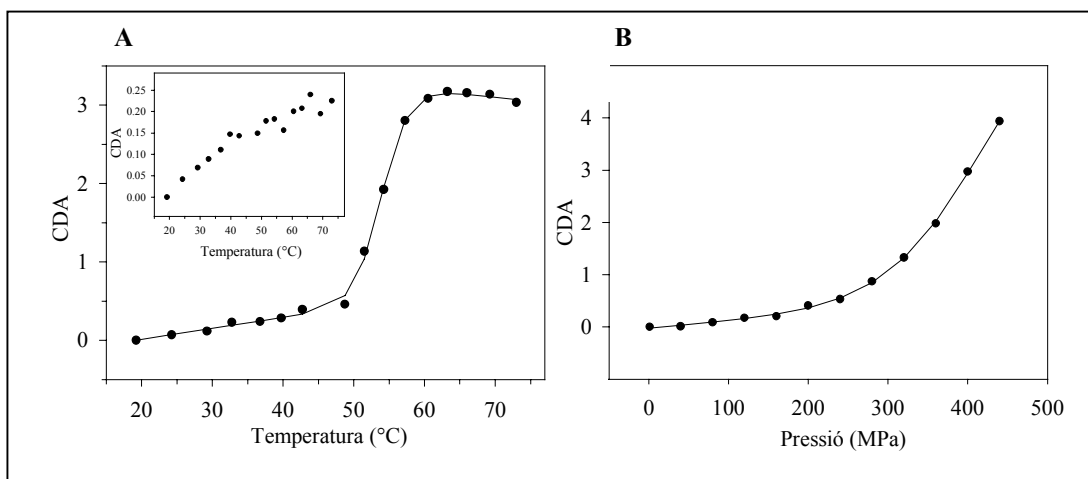
l'amplitud com a conseqüència d'una variació en la polaritat de l'ambient d'aquests residus.

FIGURA 3.28



(A) Espectre d'absorció a l'ultraviolat de quarta derivada de la variant Y115W en funció de la temperatura, entre 19 i 73°C. Condicions experimentals: acetat sòdic 50 mM (pH 5.0), P = 0.1 MPa i una concentració de proteïna de 1 mg/ml. (B) Espectre d'absorció a l'ultraviolat de quarta derivada de la variant Y115W en funció de la pressió, entre 0.1 i 440 MPa. Condicions experimentals: MES 50 mM (pH 5.0), T = 40°C i una concentració de proteïna de 1 mg/ml.

FIGURA 3.29



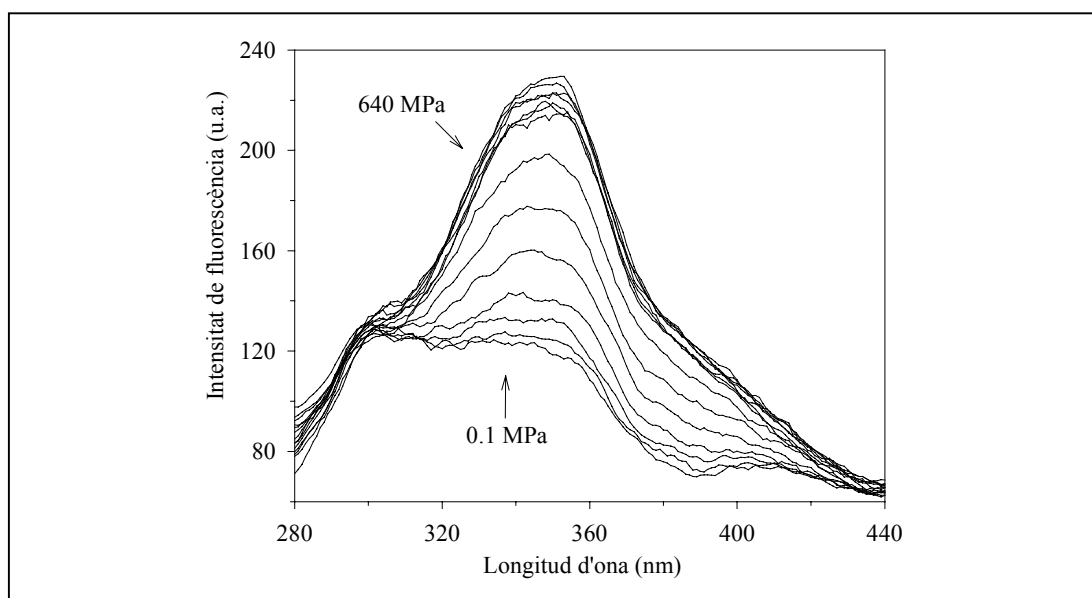
Corba de desnaturalització per temperatura (A) i per pressió (B) de la variant Y115W seguida pels canvis en la regió de les tirosines de l'espectre d'absorció a l'ultraviolat de quarta derivada, optimitzat per aquest tipus d'aminoàcid ($\Delta\lambda = 2.6$). La línia contínua correspon a un ajust no lineal de mínims quadrats de les dades basat en un model de dos estats. L'insert mostra el seguiment del procés de desnaturalització per temperatura per mitjà d'enregistrar els canvis en la regió del triptòfan de l'espectre d'absorció a l'ultraviolat de quarta derivada, optimitzat per aquest tipus d'aminoàcid ($\Delta\lambda = 1.6$).

Quan es van monitoritzar els canvis en la regió de les tirosines (275-290 nm) de l'espectre d'absorció de quarta derivada optimitzat per aquest tipus d'aminoàcid, l'efecte de la pressió i de la temperatura s'ajusta bé a una transició de desnaturalització en dos estats (FIGURA 3.29). Cal assenyalar que quan es va seguir el procés de desplegament, per pressió i per temperatura, mitjançant els canvis en la regió d'absorció del triptòfan (290-295 nm) de l'espectre d'absorció de quarta derivada optimitzat per aquest tipus d'aminoàcid ($\Delta\lambda = 1.6$), no es va observar cap transició aparent, tal i com s'indica a l'insert de la FIGURA 3.29 que correspon al procés de desnaturalització per temperatura. Aquest fet suggereix que la banda d'absorció del triptòfan no es troba afectada per la desnaturalització de la proteïna i que per tant, aquesta variant no presenta canvis significatius en la polaritat al voltant d'aquest residu durant el desplegament.

3.5.4.1.1.2. Fluorescència del triptòfan

En l'espectre d'emissió de fluorescència de la variant Y115W quan s'excita a 265 nm s'evidencia, tant en l'estat natiu com en l'estat desnaturalitzat (per pressió i per temperatura), l'emissió dominant del Trp115 (al voltant de 350 nm) i l'emissió secundària de les cinc tirosines (centrat al voltant de 302 nm) (FIGURA 3.30). Tenint en compte que els resultats obtinguts per ambdós processos de desnaturalització són molt similars, a continuació s'exposa com a exemple el canvi que s'observa en l'espectre d'emissió de fluorescència de la variant Y115W en funció de la pressió.

FIGURA 3.30

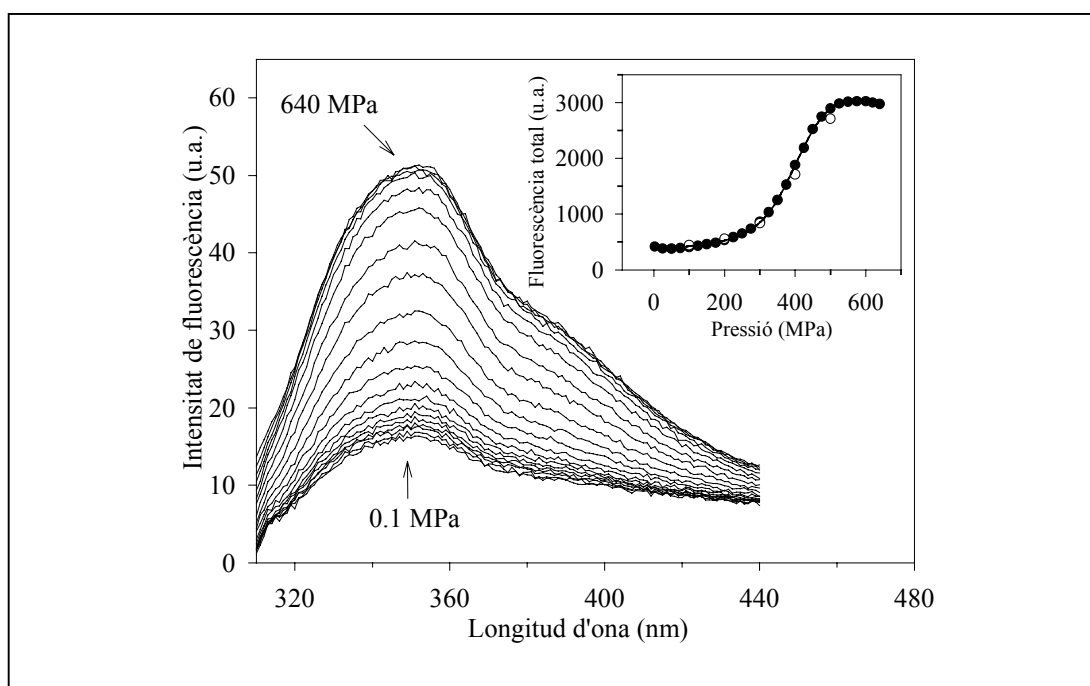


Variació de l'espectre d'emissió de fluorescència de la variant Y115W quan s'irradia amb una longitud d'ona de 265 nm en funció de la pressió, entre 0.1 i 640 MPa. Condicions experimentals: MES 50 mM (pH 5.0), T = 40°C i una concentració de proteïna de 0.5 mg/ml.

Aquest fet s'explica perquè les propietats fluorescents del residu de triptòfan que s'ha introduït són dominants respecte a la contribució dels residus de tirosina i fenilalanina, ja que tant la seva absorbància en la longitud d'ona d'excitació com el seu rendiment quàntic d'emissió són molt més grans que els valors corresponents als residus de tirosina i fenilalanina. En aquest procés, la llum absorbida per un cromòfor es transfereix a un altre que absorbeix a una longitud d'ona més llarga, el qual emetrà l'energia en forma de fluorescència. Atès que les longituds d'ona d'absorció dels aminoàcids aromàtics estan ordenades segons Phe<Tyr<Trp, les proteïnes que contenen els tres tipus de residus, com ara la variant Y115W, generalment emeten fluorescència típica de Trp.

Quan aquesta variant s'excita a 295 nm, l'espectre de fluorescència que s'obté resulta únicament de l'emissió del triptòfan (FIGURA 3.31). Això es deu al fet que les tirosines no absorbeixen a aquesta longitud d'ona. Així doncs, és possible excitar únicament el Trp115 per mitjà d'irradiar amb una longitud d'ona de 295 nm.

FIGURA 3.31



Variació de l'espectre d'emissió de fluorescència de la variant Y115W quan s'irradia amb una longitud d'ona de 295 nm (excitant només el triptòfan) en funció de la pressió, entre 0.1 i 640 MPa. Condicions experimentals: MES 50 mM (pH 5.0), $T = 40^{\circ}\text{C}$ i una concentració de proteïna de 0.5 mg/ml. L'insert mostra la corba de desnaturalització per pressió de la variant Y115W. La fluorescència total entre 310 i 440 nm es va representar en funció de l'augment (●) i disminució (○) de pressió. La línia contínua correspon a un ajust no lineal de mínims quadrats de les dades basat en un model de dos estats.

3.5.4.1.1.3. Anàlisi del desplegament local i efecte de la substitució en l'estabilitat

En la FIGURA 3.31 es presenten els canvis en l'espectre d'emissió de fluorescència durant el desplegament per pressió quan s'irradia la mostra a 295 nm. En el desplegament per temperatura, es van obtenir resultats molt similars. Ambdós processos de desnaturalització (per pressió i per temperatura) s'ajusten bé a un mecanisme de desplegament en dos estats.

Atès que les propietats fluorescents dels residus de tirosina són poc marcades, la introducció del triptòfan suposa un augment considerable en les propietats fluorescents de la molècula. L'apaivagament o extinció de l'emissió de fluorescència del Trp115 en l'estat natiu de la proteïna indica que aquest participa en algun tipus d'interacció amb un o més residus que l'envolten. Els canvis en l'espectre d'emissió durant el desplegament s'originen o poden ser atribuïts a alteracions en l'entorn del triptòfan.

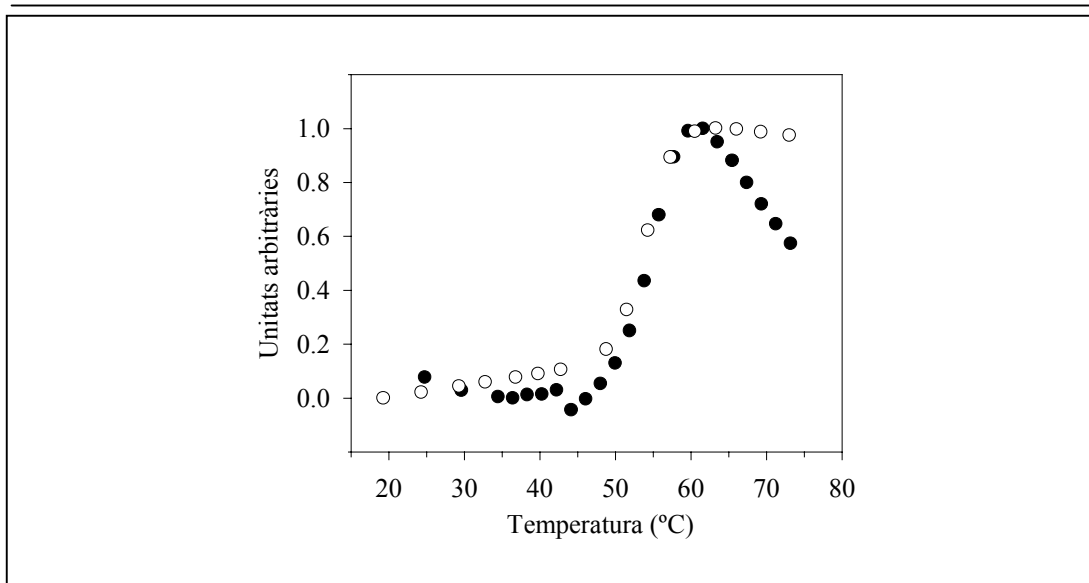
Generalment s'accepta que no hi ha cap correlació entre el rendiment quàntic del triptòfan i la seva accessibilitat al solvent (Eftink, 1991). Tanmateix, el desplaçament de la $\lambda_{\text{màx}}$ de l'emissió de fluorescència d'un residu de triptòfan entre l'estat plegat i el desplegat d'una proteïna ens indica la diferència de polaritat de l'ambient del residu entre ambdós estats (Lange i col., 1996). Quan es va representar la variació del centre de masses espectral (Silva i col., 1986) en funció de la pressió o de la temperatura no es va observar cap transició. Això indicava, confirmant els resultats obtinguts per absorció de quarta derivada optimitzats pel triptòfan, que no hi ha variacions en la polaritat al voltant d'aquest residu durant el procés de desnaturalització.

Quan es va representar l'emissió de fluorescència total (entre 315 i 400 nm) enfront de la pressió o de la temperatura, es va obtenir una corba de desnaturalització característica com la que es presenta en l'insert de la FIGURA 3.31. Aquesta transició es va ajustar al mateix model de desplegament en dos estats que en els experiments d'absorció (apartat 3.5.3.1.1).

Els valors dels paràmetres termodinàmics obtinguts per pressió i per temperatura, així com els valors de $P_{1/2}$ i $T_{1/2}$ per ambdues tècniques de seguiment es presenten respectivament en la TAULA 3.11 i 3.12.

La fluorescència ens proporciona paràmetres termodinàmics similars als obtinguts per absorció a l'ultraviolat de quarta derivada, tant per pressió com per temperatura. En la FIGURA 3.32 es mostra com la transició de desnaturalització per temperatura que s'obté per ambdues tècniques de seguiment és completament sobreposable. Considerant que la intensitat de fluorescència depèn de l'ambient local on es troba emplaçat el triptòfan i que els espectres d'absorció de quarta derivada reflecteixen canvis generals en l'estructura de la proteïna, aquest resultat reforça la hipòtesi que el procés de desplegament és molt cooperatiu i en dos estats.

FIGURA 3.32



Corbes de desnaturalització per temperatura de la variant Y115W monitoritzades per mitjà de la fluorescència total (●) i de l'absorció a l'ultraviolat de quarta derivada (○) optimitzada per observar els canvis en les tirosines, ambdues a pH 5.0 i 0.1 MPa.

TAULA 3.11

Paràmetres que caracteritzen la desnaturalització per pressió de la variant Y115W a 40°C i 0.1 MPa i la seva comparació amb l'RNasa A recombinant salvatge^a.

Proteïna ^b	ΔG_U (KJ mol ⁻¹)	ΔV (cm ³ mol ⁻¹)	$P_{1/2}$ (MPa)	λ_N (nm) ^c	λ_D (nm) ^d
Rec. salvatge	24.61 (0.70)	-46.5 (fixat)	529	285.4	285.0
Y115W abs.	18.12 (1.39)	-43.2 (4.4)	419	285.6	284.1
Y115W fluor.	19.66 (0.44)	-47.6 (1.2)	413	-	-

^a Els números entre parèntesi són els errors estàndard. ^b Rec. salvatge: recombinant salvatge; abs.: absorció; fluor.: fluorescència. ^c Longitud d'ona de la màxima amplitud de quarta derivada a 0.1 MPa més pròxima al punt isobèstic de 283.5 nm. ^d Longitud d'ona de la màxima amplitud de quarta derivada a 440 MPa més pròxima al punt isobèstic de 283.5 nm.

TAULA 3.12

Paràmetres que caracteritzen la desnaturalització per temperatura de la variant Y115W al punt mig de la transició i a 0.1 MPa i la seva comparació amb l'RNasa A salvatge^a.

Proteïna ^b	$\Delta H_{T_{1/2}}$ (KJ mol ⁻¹)	$T_{1/2}$ (°C)	$\Delta G_{U_{40^\circ C}}$ (KJ mol ⁻¹) ^c	λ_N (nm) ^d	λ_D (nm) ^e
Rec. salvatge	437 (12)	58.0 (0.1)	21.16 (0.67)	285.5	283.9
Y115W abs.	416 (19)	54.2 (0.1)	16.39 (0.82)	284.6	283.3
Y115W fluor.	378 (17)	55.3 (0.2)	15.67 (0.81)	-	-

^a Els números entre parèntesi són els errors estàndard. ^b Veure Taula 3.11 ^c Energia lliure de desplegament calculada a 40°C. ^d Longitud d'ona de la màxima amplitud de quarta derivada a 25°C més propera al punt isobèstic de 283.5 nm. ^e Longitud d'ona de la màxima amplitud de quarta derivada a 75°C més propera al punt isobèstic de 283.5 nm.

D'altra banda, les similituds entre els valors dels paràmetres termodinàmics i els valors de $P_{1/2}$ i $T_{1/2}$ obtinguts per la variant Y115W respecte als obtinguts per la proteïna salvatge indiquen que la substitució de la tirosina per un triptòfan no altera de manera remarcable l'estabilitat de l'RNasa A. Aquest resultat suggereix que aquesta variant pot ser emprada com a sonda fluorescent de la regió en estudi.

3.5.4.1.2. Espectroscòpia d'absorció a l'infraroig

En la Taula 3.13 s'exposen els valors del punt mig de la transició de desnaturalització per pressió i temperatura obtinguts a partir dels canvis induïts en la regió de l'amida I' i en la regió de les tirosines.

TAULA 3.13

Valors del punt mig de la transició de desnaturalització induïda per pressió i per temperatura, de l'RNasa A salvatge i la variant Y115W, obtinguts a partir dels canvis espectrals en la regió de l'amida I' i en la regió de les tirosines.

Proteïna	$P_{1/2}$ (MPa)		$T_{1/2}$ (°C)	
	Amida I'	Tirosines	Amida I'	Tirosines
Recombinant salvatge	743.2	758.1	59.4	62.8
Y115W	694.5	716.3	57.5	59.8

Els valors de $P_{1/2}$ i $T_{1/2}$ estimats per mitjà d'ambdues bandes d'absorció a l'infraroig (amida I' i tirosines) coincideixen plenament. Els valors de $T_{1/2}$ es corresponen amb els valors obtinguts, sota condicions comparables, per espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat de quarta derivada i espectroscòpia de fluorescència. Tanmateix, els valors de $P_{1/2}$ estimats no poden ésser comparats directament, donat que la temperatura a la qual es van dur a terme aquests experiments diferia en 20°C.

Es va dur a terme una anàlisi qualitativa del perfil dels espectres optimitzats per FSD i es va observar que, en l'estat natiu, la proteïna salvatge i la variant Y115W mostren similitud estructural. D'acord amb això, en condicions natives, no es contemplen diferències en el contingut d'estructura secundària entre aquesta variant i la proteïna salvatge, la qual cosa està d'acord amb els resultats obtinguts per dicromisme circular.

3.5.4.2. Desnaturalització per urea

3.5.4.2.1. Espectroscòpia de fluorescència

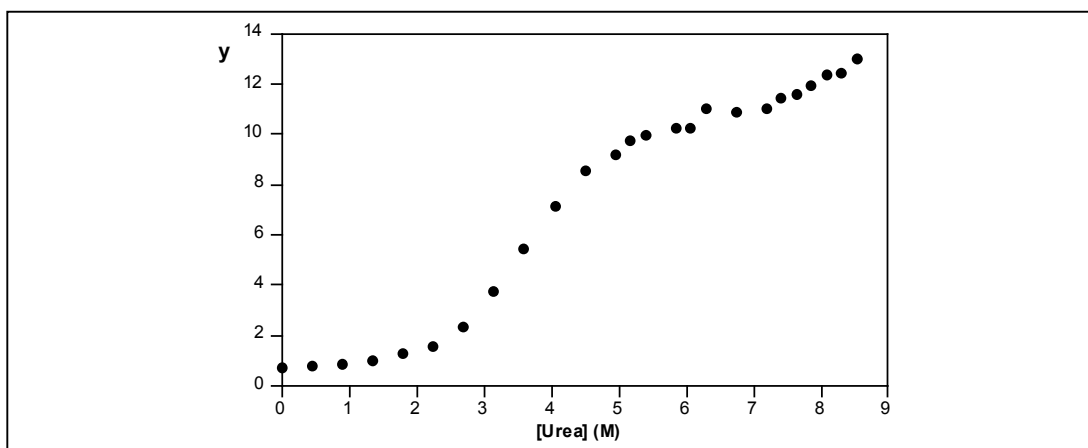
El seguiment del procés de desnaturalització mitjançant fluorescència de l'RNasa A salvatge (comercial i recombinant) i de la variant Y115W emprant urea com agent desnaturalitzant es va dur a terme mesurant la intensitat de fluorescència d'emissió a diferents concentracions d'urea.

La longitud d'ona d'excitació que es va emprar va ser de 278 nm. Per bé que per a la proteïna salvatge l'emissió de la fluorescència es va mesurar a 305 nm, per la variant Y115W es va enregistrar a 350 nm. En aquestes longituds d'ona s'observen les màximes diferències d'intensitat de fluorescència d'emissió entre els espectres de proteïna nativa i els espectres de proteïna desnaturalitzada.

Per tal de mesurar l'estabilitat de les proteïnes en estudi a partir de les dades de fluorescència, es van seguir els passos que es detallen a continuació. Donat que aquest procediment és idèntic per a les dues proteïnes estudiades, aquest només es descriu per la proteïna variant Y115W.

En primer lloc, les dades d'intensitat de fluorescència (y) enregistrades en l'equilibri es van representar gràficament en funció de la concentració d'urea (FIGURA 3.33).

FIGURA 3.33



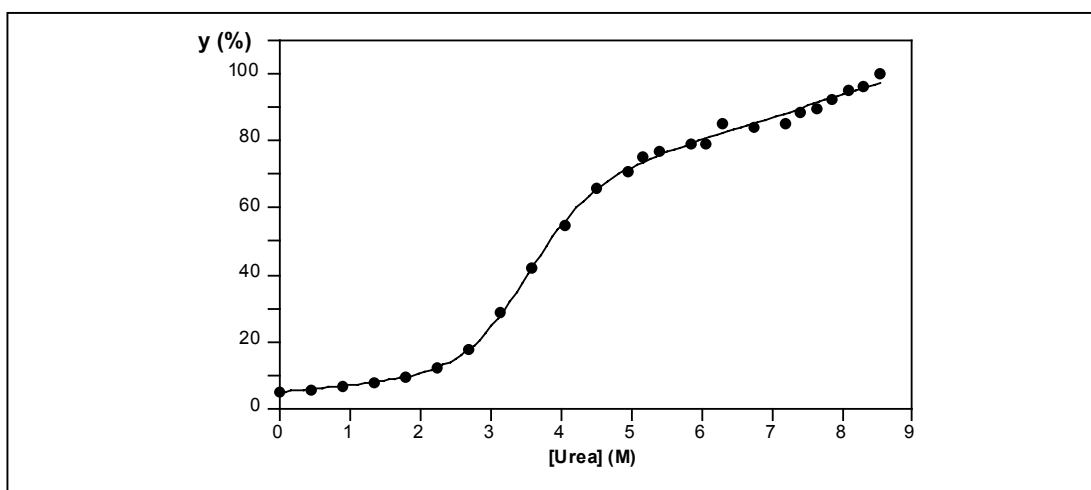
Desnaturalització per urea de la variant Y115W en amortidor acetat sòdic 50 mM (pH 5.0), 37°C i una concentració de proteïna de 100 µg/ml.

En segon lloc, a partir de les dades d'intensitat de fluorescència enregistrades en l'equilibri es van calcular els percentatges (y (%)), prenent com a 100% el valor de la fluorescència de l'estat desnaturalitzat a la màxima concentració d'urea emprada, i es van representar gràficament en funció de la concentració d'agent desnaturalitzant. El resultat d'aquesta representació es mostra en la FIGURA 3.34. Els valors d'intensitat de fluorescència en percentatges s'han ajustat a l'equació:

$$y_{\text{obs}} = [(\alpha_f + \beta_f \cdot [D]) + (\alpha_u + \beta_u \cdot [D]) \cdot e^{\{m([D] - [D]_{1/2})/RT\}}] / [1 + e^{\{m([D] - [D]_{1/2})/RT\}}] \quad (3.3)$$

Aquesta equació ens permet calcular els paràmetres que caracteritzen les regions pre- i post-transició (α_f , β_f , α_u , β_u), així com els paràmetres propis de la regió de transició (m i $[D]_{1/2}$).

FIGURA 3.34



Desnaturalització per urea de la variant Y115W en amortidor acetat sòdic 50 mM (pH 5.0) i a una concentració de proteïna de 100 µg/ml.

Tot seguit, per tal de calcular la fracció de proteïna desnaturalitzada, es va normalitzar la corba assumint un model de dos estats. La fracció de proteïna desnaturalitzada (F_U) es pot escriure com:

$$F_U = (y_f - y_{\text{obs}}) / (y_f - y_u) \quad (3.4)$$

on y_f i y_u són les variables intensitat de fluorescència de la conformació nativa i desnaturalitzada, respectivament, i y_{obs} la intensitat de fluorescència mesurada.

Es considera que y_f i y_u són linealment dependents de la concentració d'agent desnaturalitzant. Tenint en compte aquest fet, es pot escriure que:

$$y_f = \alpha_f + \beta_f \cdot [D] \quad (3.5)$$

$$y_u = \alpha_u + \beta_u \cdot [D] \quad (3.6)$$

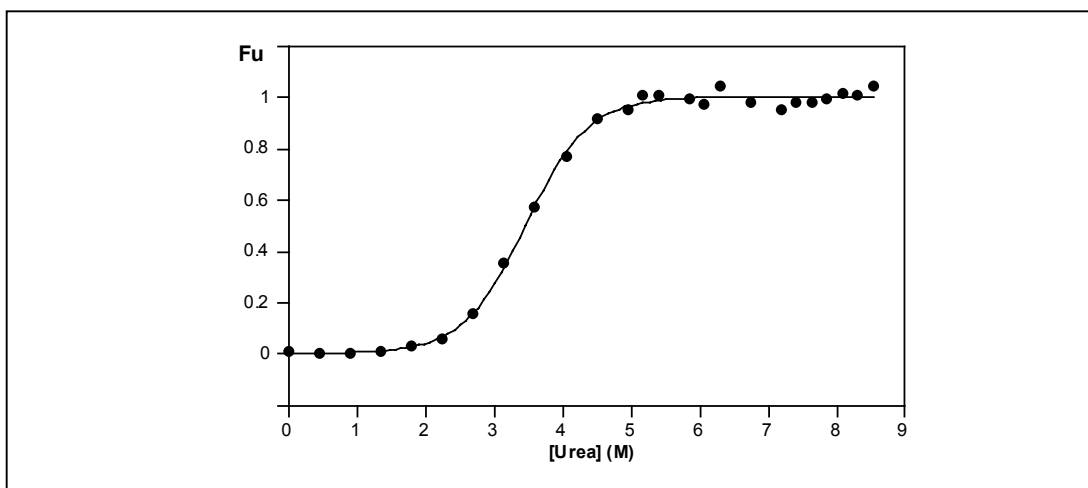
on α_f i α_u són els punts de tall amb l'eix de les y i β_f i β_u són els pendents de les regions pre i post-transició, respectivament. $[D]$ fa referència a la concentració d'agent desnaturalitzant.

Aleshores:

$$F_U = ((\alpha_f + \beta_f \cdot [D]) - y_{obs}) / (\alpha_f - \alpha_u + [D] \cdot (\beta_f - \beta_u)) \quad (3.7)$$

Finalment, els valors obtinguts, corresponents a la fracció de proteïna desnaturalitzada (F_U), es van representar gràficament en funció de la concentració d'urea (FIGURA 3.35).

FIGURA 3.35



Desnaturaizació per urea de la variant Y115W en amortidor acetat sòdic 50 mM (pH 5.0), 37 °C i una concentració de proteïna de 100 µg/ml.

La corba de desnaturaizació normalitzada s'ajusta, mitjançant una anàlisi no lineal de mínims quadrats, a l'equació:

$$F_u = 1 / (1 + e^{\{-m \cdot ([D] - [D]_{1/2}) / RT\}}) \quad (3.8)$$

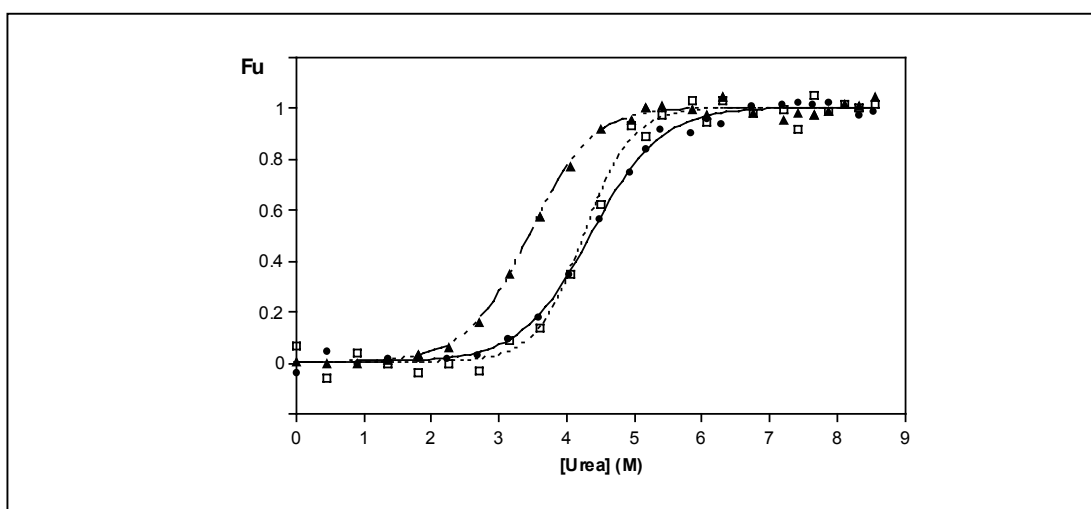
Els paràmetres que caracteritzen la regió de transició (m i $[D]_{1/2}$) també vénen donats per aquesta equació. Convé ressaltar que el paràmetre m és la pendent de la

transició i $[D]_{1/2}$ és la concentració d'agent desnaturalitzant en la qual el 50% de la proteïna està desplegada.

El procediment que es va emprar per representar les corbes de desnaturalització normalitzades i per calcular els paràmetres m i $[D]_{1/2}$ de l'RNasa A salvatge (comercial i recombinant) va ser el mateix que el que s'ha descrit per la variant Y115W.

Les corbes de desnaturalització per urea normalitzades de l'RNasa A salvatge comercial, l'RNasa A salvatge recombinant i de la variant Y115W es mostren a la FIGURA 3.36.

FIGURA 3.36



Corbes de desnaturalització per urea, normalitzades, de l'RNasa A salvatge comercial (●), l'RNasa A salvatge recombinant (□) i de la variant Y115W (▲). Condicions experimentals: acetat sòdic 50 mM (pH 5.0), 37°C i concentració de proteïna 100 µg/ml.

Clarke i Fersht (1993) van assenyalar que petits errors en l'estimació del pendent de la transició donen lloc, en l'extrapolació, a grans errors en l'estimació de $\Delta G_{(H_2O)}$. Aleshores van proposar de calcular aquest paràmetre amb el valor mitjà del paràmetre m , obtingut per a cadascuna de les proteïnes estudiades, de manera que l'equació 2.30 utilitzada per estimar l'estabilitat de cada proteïna esdevé:

$$\Delta G_{(H_2O)} = m_{avr} \cdot [D]_{1/2} \quad (3.9)$$

Els paràmetres calculats com a valor mig de tres determinacions es mostren a la TAULA 3.14.

TAULA 3.14

Paràmetres que caracteritzen la desnaturalització per urea seguida per fluorescència de la RNasa A salvatge natural, salvatge recombinat i de la variant Y115W a pH 5.0 i 37°C

Proteïna	m (KJ mol ⁻¹) ^a	$[D]_{1/2}$ (M) ^b	$\Delta G_{(H_2O)}$ (KJ mol ⁻¹) ^c
Comercial	6.23	4.34	24.7
Rec. salvatge	5.31	4.34	24.7
Y115W	5.48	3.50	19.9

^a m és la pendent de la transició. ^b $[D]_{1/2}$ és la concentració d'urea en què el 50% de la proteïna està desnaturalitzada. ^c Calculat a partir de $\Delta G_{(H_2O)} = m_{avr} \cdot [D]_{1/2}$. El valor de m_{avr} és 5.69.

Es comprova que el valor de $\Delta G_{(H_2O)}$ calculat per ambdues proteïnes salvatges és idèntic. Això ens indica que l'estabilitat conformacional és la mateixa. La variant Y115W presenta uns valors de $\Delta G_{(H_2O)}$ i $[D]_{1/2}$ força semblants a la proteïna salvatge. Aquest resultat concorda amb els obtinguts mitjançant desnaturalització induïda per pressió i temperatura a 40°C, ja sigui quan es va monitoritzar per espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat o per espectroscòpia de fluorescència.

3.5.4.2.2. Electroforesi en gel de poliacrilamida amb gradient transversal d'urea

En un gel de poliacrilamida amb gradient transversal d'urea (veure apartat 2.2.3.2), la desnaturalització d'una proteïna s'evidencia per un decrement en la mobilitat electroforètica, ja que la proteïna desplegada té un volum hidrodinàmic més gran.

Quan es va analitzar el procés de desnaturalització de l'RNasa A salvatge (comercial i recombinant) i de la variant Y115W, es va observar sempre una petita transició sigmoïdal entre els dos estats de la proteïna (natiu i desnaturalitzat) dins d'un marge de concentració d'urea molt estret. Aquest tipus de transició és indicatiu d'un desplegament molt cooperatiu.

A la vegada, la cinètica de la transició queda reflectida en la continuïtat de la banda de proteïna en el gel (Goldenberg, 1989). Es va observar per a les tres proteïnes, comercial, recombinant salvatge i Y115W, una banda contínua i marcada en la regió de la transició, la qual era indicativa d'un ràpid equilibri entre les conformacions que s'interconverteixen.

A concentracions d'urea per sota o per sobre d'aquesta transició no s'observa cap canvi en la mobilitat. Cal assenyalar que les tres proteïnes presenten la mateixa mobilitat electroforètica i per tant el mateix volum hidrodinàmic a una concentració 9 M urea.

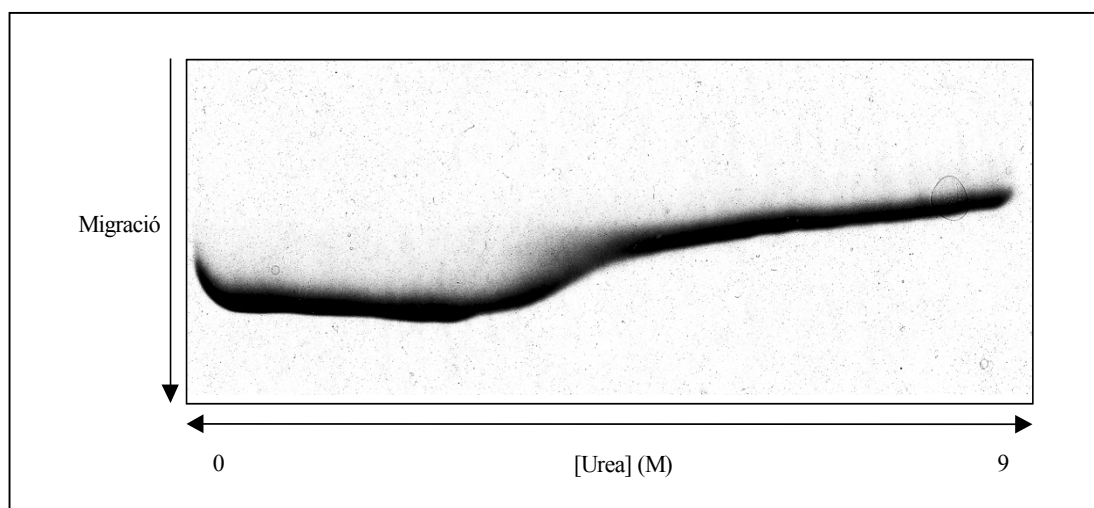
Els resultats obtinguts per l'RNasa A salvatge són coherents amb els descrits en altres treballs i amb el mecanisme de desnaturalització en dos estats que presenta l'RNasa A (Creighton, 1979a).

De la mateixa manera que en la desnaturalització per urea seguida mitjançant fluorescència, per tal d'estimar l'energia lliure de desnaturalització en absència d'agent desnaturalitzant, la regió de la transició s'extrapola linealment a una concentració zero d'urea. Ara bé, aquesta extrapolació presenta diversos problemes. D'una banda, la urea sol difondre durant la preparació del gel i durant la realització de l'electroforesi. D'altra banda, donat que els quatre enllaços de pont disulfur que presenta la proteïna impossibiliten l'aparició de conformacions més desplegades de la proteïna, el canvi en la mobilitat electroforètica de l'RNasa A és molt petit i per tant la transició de desnaturalització és molt reduïda. Finalment, cal tenir en compte la incertesa a l'hora d'assignar un valor de concentració d'urea a cadascuna de les posicions del gel.

Amb motiu d'aquests problemes, el càlcul dels paràmetres termodinàmics no es va fer com es descriu en el treball de Hollecker i Creighton (1982), sinó que es va seguir el procediment que s'exposa tot seguit. Donat que aquest procediment és idèntic per a les tres proteïnes estudiades, aquest només es descriu per l'RNasa A comercial. Bàsicament, es tracta d'aplicar el model de Clarke i Fersht que es va emprar per analitzar les corbes de desnaturalització per urea monitoritzades mitjançant fluorescència i que s'exposen a l'apartat 3.5.4.2.1, però substituint el paràmetre intensitat de fluorescència per la mobilitat electroforètica.

En primer lloc, amb un escàner es va digitalitzar la informació del gel de poliacrilamida (FIGURA 3.37).

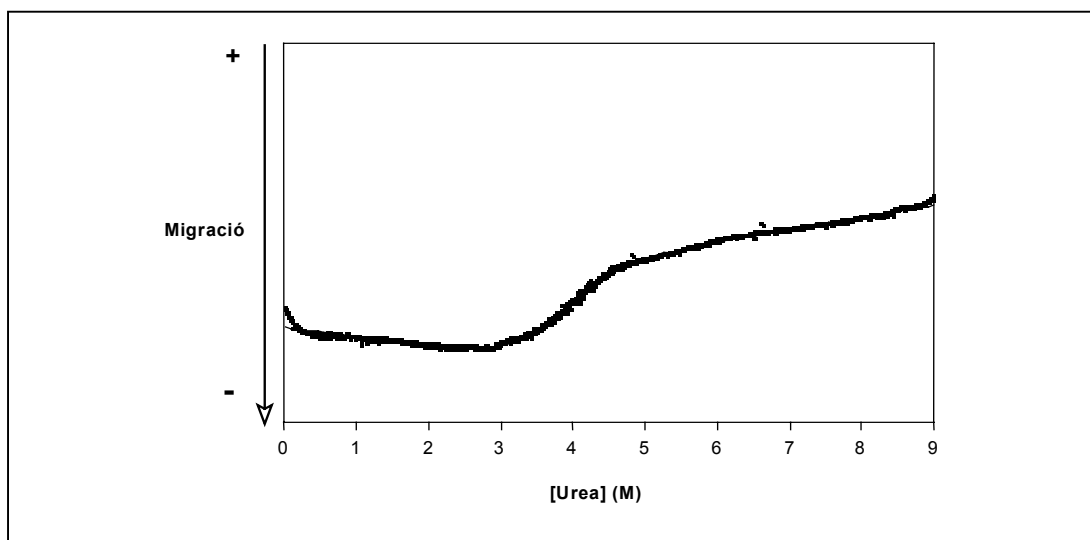
FIGURA 3.37



Resultat de l'escaneig del gel de poliacrilamida amb gradient transversal d'urea (0-9M) de l'RNasa A a pH 4.0 i 37°C.

En segon lloc, mitjançant el programa DATATHIEF (Kees Huyser i Jan van der Laan, Symantec Corp. 1995), la corba de desnaturalització de la proteïna es va transformar a coordenades cartesianes i es va representar gràficament en uns eixos de coordenades. El resultat d'aquesta representació es mostra a la FIGURA 3.38.

FIGURA 3.38

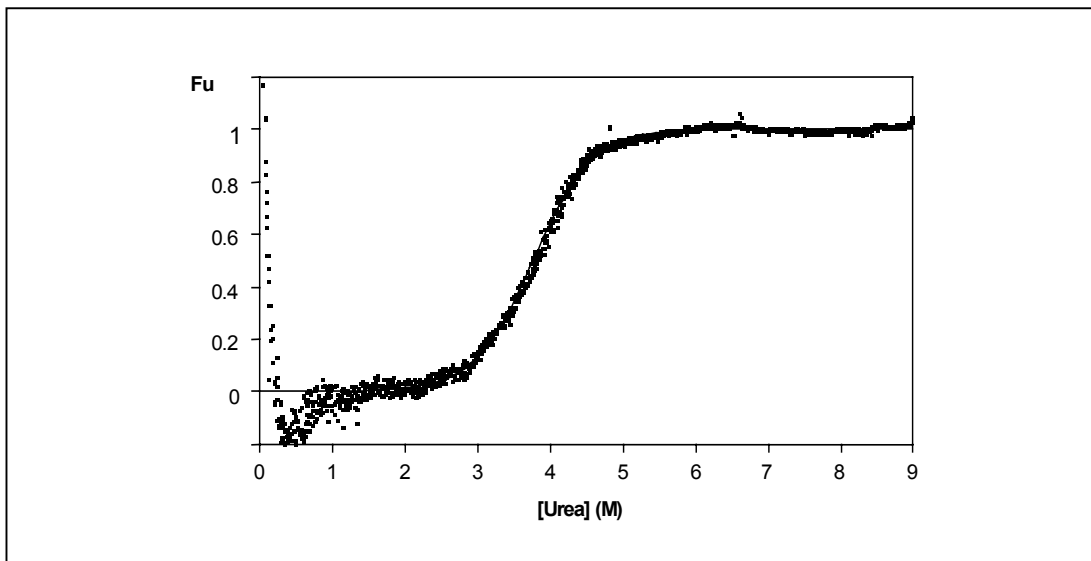


Corba de desnaturalització de l'RNasa A, a pH 4.0 i 37°C, per mitjà de l'electroforesi en gradient d'urea, obtinguda a partir de l'escaneig del gel original i de la transformació de les dades a coordenades cartesianes emprant el programa DATATHIEF. Les dades es van ajustar a l'equació 3.3 descrita a l'apartat 3.5.4.2.1.

Donat que la transició de desnaturalització, induïda per urea, s'ajusta a un model en dos estats (Creighton, 1979a), la mobilitat de la banda de proteïna a través del gel està directament relacionada amb la fracció de proteïna desnaturalitzada, F_U . A fi de calcular la fracció de proteïna desnaturalitzada es va normalitzar la corba mitjançant l'equació 3.7 (apartat 3.5.4.2.1).

Els valors que es van obtenir, corresponents a la fracció de proteïna desnaturalitzada (F_U), es van representar gràficament en funció de la concentració d'urea (FIGURA 3.39).

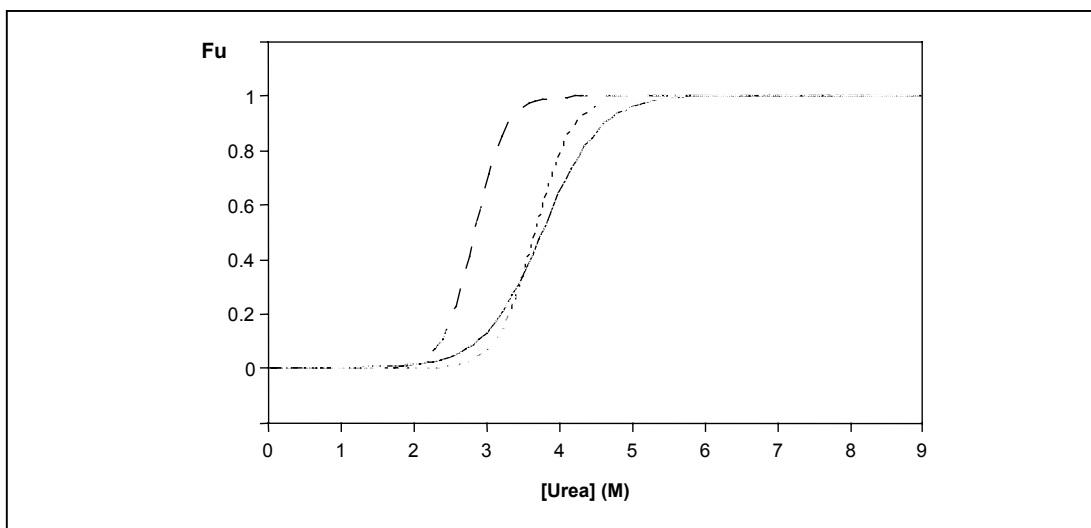
FIGURA 3.39



Corba de desnaturalització normalitzada de l'RNasa A, a pH 4.0 i 37°C, seguida per mitjà de l'electroforesi en gradient d'urea. Les dades es van ajustar, mitjançant una anàlisi no lineal de mínims quadrats, a l'equació 3.8 (apartat 3.5.4.2.1).

Les corbes de desnaturalització per urea normalitzades de l'RNasa A salvatge (comercial i recombinant) i de la variant Y115W es mostren a la FIGURA 3.40.

FIGURA 3.40



Corbes de desnaturalització normalitzades de l'RNasa A salvatge comercial (—), l'RNasa A salvatge recombinant (·····) i la variant Y115W (-----), a pH 4.0 i 37°C.

Els paràmetres que es van estimar a partir d'aquestes transicions de desnaturalització es mostren a la TAULA 3.15.

TAULA 3.15

Paràmetres que caracteritzen la desnaturalització per urea seguida per electroforesi en gel de poliacrilamida amb gradient transversal de la RNasa A salvatge comercial, salvatge recombinat i de la variant Y115W, a pH 4.0 i 37°C.

Proteïna	m (KJ mol ⁻¹ M ⁻¹) ^a	[D] _{1/2} (M) ^b	$\Delta G_{(H_2O)}$ (KJ mol ⁻¹) ^c
Comercial	6.36	3.77	36.5
Rec. salvatge	10.59	3.69	35.7
Y115W	12.05	2.83	27.4

^a m és la pendent de la transició. ^b [D]_{1/2} és la concentració d'urea en què el 50% de la proteïna està desnaturalitzada. ^c Calculat a partir de $\Delta G_{(H_2O)} = m_{avr} \cdot [D]_{1/2}$. El valor de m_{avr} és 9.67.

Els paràmetres termodinàmics calculats per la proteïna comercial són pràcticament idèntics als de la proteïna salvatge recombinant. Pel que fa a la proteïna variant, el valor de $\Delta G_{(H_2O)}$ obtingut (27.4 KJ mol⁻¹) indica que la substitució de la tirosina 115 per un triptòfan no altera de manera marcada l'estabilitat conformacional de la proteïna.

S'ha de destacar que, atès que aquests experiments de desnaturalització s'han dut a terme a pH 4.0, els valors de ΔG estimats no es poden comparar directament amb els obtinguts per mitjà de les altres tècniques emprades pel seguiment del procés de desnaturalització.

Els resultats obtinguts il·lustren com el desplegament d'una proteïna es pot seguir amb electroforesi, fins i tot quan l'estat desnaturalitzat presenta enllaços de pont disulfur. Així mateix, demostren que aquesta tècnica pot ésser vàlida per comparar l'estabilitat de diferents variants d'una proteïna, malgrat hagi estat considerada per alguns autors com a una tècnica semiquantitativa (Creighton, 1980)

3.6. Discussió general

L'enginyeria de proteïnes ha obert un nou camí experimental per determinar quantitativament els factors que governen l'estabilitat d'una proteïna. La informació que proporciona aquest mètode aporta la base per endegar el redisseny racional de les proteïnes a fi d'assajar la seva possible aplicació en biotecnologia o medicina. Amb tot, els esforços van encaminats a assolir un objectiu, per ara llunyà, d'importància cabdal per a la ciència: s'anhela resoldre el que s'anomena *problema del plegament proteic*. Dit d'una altra manera, es pretén predir l'estructura tridimensional d'una proteïna a partir de la seva seqüència d'aminoàcids.

El creixent interès per trobar respostes a aquesta qüestió ha desencadenat una gran amalgama de treballs sobre diverses proteïnes, tant des d'un punt de vista estructural com funcional.

Un dels interessos del grup de recerca en el qual s'integra aquest treball se centra en l'estudi de l'estabilitat i el plegament de les proteïnes per mitjà del disseny, obtenció i caracterització de variants de ribonucleases.

L'RNasa A, tal i com s'ha esmentat en la introducció, ha estat una de les proteïnes més exhaustivament estudiades tant des d'una vessant estructural, com de les vessants mecànica i funcional. Tanmateix però, la investigació del seu procés de plegament mitjançant mutagènesi dirigida s'ha centrat en discernir la importància dels residus de prolina en les reaccions de plegament lent i de cisteïna en la cinètica de formació dels ponts disulfur.

Generalment s'accepta que el plegament proteic s'inicia per mitjà d'interaccions hidrofòbiques de curt abast que promouen la formació d'una o més regions iniciadores del plegament proteic (CFIS) dins d'una cadena polipeptídica. Per l'RNasa A s'han proposat diversos CFIS, dels quals el més estable s'estén des del residu 106 al 118 (Matheson i Scheraga, 1978; Némethy i Scheraga, 1979; Beals i col., 1991). Aquesta regió és una zona molt hidrofòbica, altament conservada en la superfamília de les ribonucleases (Beintema i col., 1997), que en l'estat natiu de la proteïna comprèn una part d'un full β antiparal·lel (Wlodawer i col., 1988).

Per bé que diferents treballs han continuat aportant dades experimentals que corroboren la importància d'aquesta regió com a centre d'iniciació del plegament de l'RNasa A (Udgaonkar i Baldwin, 1995; Dodge i Scheraga, 1996; Neira i col., 1999), en cap d'ells s'ha plantejat caracteritzar els efectes originats per una alteració sistemàtica dels residus que en formen part.

Considerant, d'una banda, que l'efecte hidrofòbic és la principal força conductora del plegament proteic (Dill, 1990) i, d'altra banda, que aquesta regió podria acomplir un paper fonamental en les etapes inicials del procés plegament (en bona part a causa del seu marcat caràcter hidrofòbic), es va plantejar d'entrada com a un dels objectius generals del treball comprovar la importància de la hidrofobicitat, la mida i la forma

de les cadenes laterals alifàtiques dels residus hidrofòbics d'aquest hipotètic CFIS en l'estabilitat de la proteïna i la seva possible contribució en la consecució de l'estructura nativa.

Amb aquesta finalitat s'han obtingut, per mitjà de mutagènesi dirigida per oligonucleòtid sobre el gen que codifica per l'RNasa A i l'expressió en procarïotes, una sèrie de variants en les quals els residus I106, I107, V108, A109, V116 i V118 han estat substituïts per altres residus, on la hidrofobicitat i la mida de la cadena lateral era reduïda progressivament.

A fi de minimitzar els reordenaments estructurals i la possible contribució d'efectes estèrics, la major part de les substitucions assajades han estat conservatives, és a dir, delecions no disruptives de grups metil/metilè en aquestes cadenes laterals.

En aquest treball s'ha desenvolupat un sistema de purificació ràpid, repetitiu i que assegura la puresa i homogeneïtat de les proteïnes recombinants per a la seva posterior caracterització. Això ha permès obtenir les proteïnes variants I106A/L/V, I107A/L/V, V108A/G, A109G, V116A/G i V118A/G, en quantitats suficients per poder endegar la caracterització que hom va prendre com a objectiu del present treball.

Atès que ha estat descrit per altres proteïnes (Shortle, 1989; Alber i col., 1987) que certs reemplaçaments que alteren l'estructura i l'estabilitat d'un enzim poden tenir alhora efectes dràstics en la seva activitat, es va analitzar l'efecte de les substitucions dutes a terme en les propietats catalítiques de l'RNasa A. Els paràmetres cinètics determinats per les variants obtingudes, quan s'utilitza C>p i poli(C) com a substrats, indiquen que totes elles presenten propietats catalítiques equivalents o molt similars a l'enzim salvatge, tant d'origen boví com recombinant. Aquests resultats estan d'acord amb el tipus de substitucions introduïdes, ja que aquestes no afecten residus que participen directament en la catàlisi ni que pertanyen als subconjunts d'interacció amb el substrat. Per tant, d'aquesta similitud en el comportament cinètic en podem concloure que molt probablement, l'estructura tridimensional de la proteïna, si més no l'estructura del centre actiu de les ribonucleases variants, és, si no idèntica, semblant a la conformació nativa de l'RNasa A salvatge.

Es va dur a terme una anàlisi més detallada a fi de distingir si hi havia diferències estructurals entre els estats nadius de les diferents proteïnes. Per això es va emprar tant l'espectroscòpia de diòisme circular (CD) com l'espectroscòpia d'infraroig per transformada de Fourier (FTIR). Els resultats obtinguts suggereixen que la proteïna salvatge (comercial i recombinant) i les diferents variants mostren en general similitud estructural. Això no obstant, per FTIR s'evidencien petites diferències en les variants que comprenen substitucions en les posicions 108 i 118, mentre que per CD tant sols es perceben petites variacions en l'estructura de la variant V108G.

Donat que en l'estat natiu de l'RNasa A predomina l'estructura en full β i que les diferents substitucions es van efectuar dins d'aquest element d'estructura secundària, era d'esperar que les principals variacions espectrals s'originessin per alteracions en

aquest tipus d'estructura. Els resultats obtinguts reflecteixen, doncs, d'acord amb el que està descrit en la bibliografia, el major potencial i sensibilitat de l'FTIR per determinar variacions en l'estructura secundària de tipus full β respecte del CD, el qual és particularment sensible als canvis en l'estructura de tipus hèlix α . En conseqüència, les característiques singulars de l'FTIR, si bé deixen per resoldre el detall molecular de l'estructura han permès establir una comparació més acurada dels estats nadius de les diverses variants a nivell d'estructura secundària.

En general, el procés de desnaturalització de les proteïnes s'ha induït mitjançant la utilització de calor o agents químics (detergents), com el clorur de guanidini o la urea. No obstant això, el potencial d'aquests mètodes per a l'estudi de l'estabilitat i el procés de plegament/desplegament de les proteïnes es troba limitat principalment a causa de dos factors: d'una banda, a temperatures elevades, la desnaturalització de les proteïnes és sovint irreversible i, d'altra banda, en presència de detergents és difícil efectuar l'extrapolació dels paràmetres termodinàmics, així com fer una abstracció de la interacció específica que s'estableix entre la proteïna i el detergent.

La utilització de la pressió hidrostàtica (Mozhaev i col., 1996) és un procediment alternatiu als dos mètodes prèviament exposats, el qual adquireix cada vegada més rellevància en l'estudi de l'estabilitat i plegament/desplegament proteic.

La pressió modifica els equilibris químics i actua afavorint la ruptura de les interaccions electrostàtiques i la solvatació dels grups hidrofòbics. Atès que els canvis conformacionals induïts per la pressió són generalment reversibles, és possible seguir el procés de desnaturalització etapa per etapa, i per tant, caracteritzar qualsevol intermediari de desplegament que es pugui generar. A més de la possibilitat d'estudiar els equilibris estat natiu – intermediari de desplegament – estat desnaturalitzat, la utilització de la pressió també permet abordar aspectes dinàmics del replegament de les proteïnes. En aquest sentit, els experiments que es basen en salts de pressió permeten desplaçar ràpidament un equilibri, i per tant, seguir la cinètica de reequilibrat que es promourà. Aquest mètode pot ésser doncs molt adequat a fi de poder determinar de manera òptima les etapes elementals del replegament proteic, i en concret, pel que fa a una de les perspectives de continuïtat d'aquest treball, poder analitzar la importància de la regió 106-118 en les primeres etapes del plegament de l'RNasa A.

L'associació de les ciències de la vida i el coneixement adquirit en els darrers anys de recerca bàsica emprant la pressió obre noves direccions per aplicar aquest paràmetre físic, com a una eina neta i que permeti un estalvi d'energia per al tractament de materials biològics, no només en la indústria alimentària sinó també en medicina. Així mateix, el coneixement dels efectes de la pressió i de la temperatura sobre l'estructura proteica, pot contribuir de manera molt positiva en el disseny, mitjançant mutagènesi dirigida per oligonucleòtid, de biocatalitzadors que resisteixin condicions extremes i per tant, puguin ésser emprats en processos industrials. Això podria permetre la substitució d'un procés químic per un d'enzimàtic, el qual pot resultar més estereoespecífic i menys contaminant.

Així doncs, a causa del creixent interès dels investigadors per aplicar la pressió en diversos processos biotecnològics, es fa imprescindible conèixer com actua aquest paràmetre enfront del sistema en estudi.

Tanmateix, ja que la major part dels estudis de desplegament de proteïnes s'han dut a terme mitjançant la utilització de reactius químics o temperatura, pràcticament és desconegut el lligam entre la desnaturalització induïda per pressió i els altres processos de desnaturalització que utilitzen agents desnaturalitzants més corrents o d'ús més habitual.

Considerant que es disposava d'un conjunt de variants de l'RNasa A, aquestes es van emprar com a proteïnes model per tal de comparar el procés de desnaturalització induït per pressió amb el procés de desnaturalització induït per temperatura, i així acomplir els dos objectius generals d'aquest treball: d'una banda, caracteritzar l'estabilitat de les proteïnes variants i d'altra banda, aprofundir en el coneixement dels efectes de la pressió sobre l'estructura proteica.

El procés de desnaturalització induït per pressió i el procés de desnaturalització induït per temperatura de l'RNasa A salvatge i de les seves variants s'ha seguit, en condicions d'equilibri, mitjançant espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat de quarta derivada i espectroscòpia d'absorció a l'infraroig per transformada de Fourier. Aquests estudis s'han dut a terme gràcies a la col·laboració establerta amb el laboratori del Dr. Reinhard Lange (INSERM U128, Montpellier-França) i el laboratori del Dr. Karel Heremans (Katholieke Universiteit Leuven, Leuven-Bèlgica), dins d'una xarxa europea (COST) que sosté, entre d'altres, la formació de joves investigadors europeus.

Quant als canvis estructurals enregistrats, tant a nivell d'estructura terciària com a nivell d'estructura secundària, que acompanyen el desplegament de l'RNasa A, s'ha observat que no ens aporten informació sobre regions específiques, sinó que ens proporcionen una percepció general del desplegament global de la proteïna.

Enfront d'un augment gradual tant de pressió com de temperatura, l'estructura terciària i els elements d'estructura secundària de les proteïnes estudiades es perden de manera reversible. Aquestes variacions estructurals que es promouen descriuen un procés de desplegament molt cooperatiu i en dos estats.

Zhang i col. (1995), mitjançant un estudi per NMR del procés de desnaturalització per pressió de l'RNasa A, van observar que diferents regions de la proteïna no es despleguen de manera cooperativa. Així doncs, aquesta apreciació en principi contradictòria respecte els resultats obtinguts en aquest treball, vindria donada per la dependència que hi ha entre la interpretació experimental i la tècnica de seguiment que s'empra.

S'ha de destacar el fet que les diferències de barostabilitat ($\Delta P_{1/2}$) i termostabilitat ($\Delta T_{1/2}$) de qualsevol variant assajada respecte a la proteïna salvatge són molt similars, tant si s'enregistra mitjançant espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat com si s'enregistra mitjançant espectroscòpia d'absorció a l'infraroig. Considerant que

ambdues tècniques utilitzen cadascuna un règim de concentració proteica molt diferent, podem inferir que el procés de desplegament per pressió i per temperatura és intramolecular.

Paral·lelament, s'ha dut a terme un estudi per DSC del procés de desnaturalització per calor de cadascuna de les variants de l'RNasa A (Coll i col., 1999). Per les variants de la posició V108, es va trobar un valor de la relació entre entalpia calorimètrica i entalpia de van't Hoff inferior a 1, el qual es va atribuir a una possible autoassociació de molècules en solució per formar dímers. Atès que no es va observar la presència de dímers en l'estat natiu de les variants, es va proposar que les interaccions intermoleculares es promourien durant el procés de desnaturalització. S'hauran de dur a terme més estudis per tal de refermar aquesta hipòtesi.

A la vegada, fruit de la nostra investigació, podem concloure que la pèrdua de l'estructura secundària i de l'estructura terciària té lloc de manera concomitant, d'acord amb la idea que el desplegament de l'RNasa A, sota condicions d'equilibri, és un procés global i molt cooperatiu que afecta tant l'estructura secundària com la terciària.

Tot i que està generalment acceptat que la pressió i la temperatura provoquen canvis estructurals diferents (Lassalle i col., 2000) s'ha observat que les variacions en l'energia lliure de desplegament (ΔG_U) que s'obtenen, utilitzant ambdós agents desnaturalitzants, són idèntiques dins dels límits de detecció. Aquesta observació és vàlida per tota la sèrie de 16 proteïnes assajades dins d'un interval que s'estén de -9 a $+25$ KJ mol^{-1} i no depèn dels mètodes de seguiment utilitzats en aquest estudi. De fet, els valors de ΔG_U calculats en el present treball es correlacionen bé amb els respectius valors obtinguts per DSC i desnaturalització induïda per calor presentats per Coll i col. (1999). Aquesta conformitat suggereix que les substitucions que s'han dut a terme tenen un efecte equivalent tant en el desplegament per pressió com en el de temperatura i que el mecanisme de desplegament, tant a nivell d'estructura terciària com secundària, per ambdós processos de desnaturalització probablement sigui molt semblant. Per tant, la pressió ens proporciona un camí alternatiu a la temperatura per tal de caracteritzar l'estabilitat proteica.

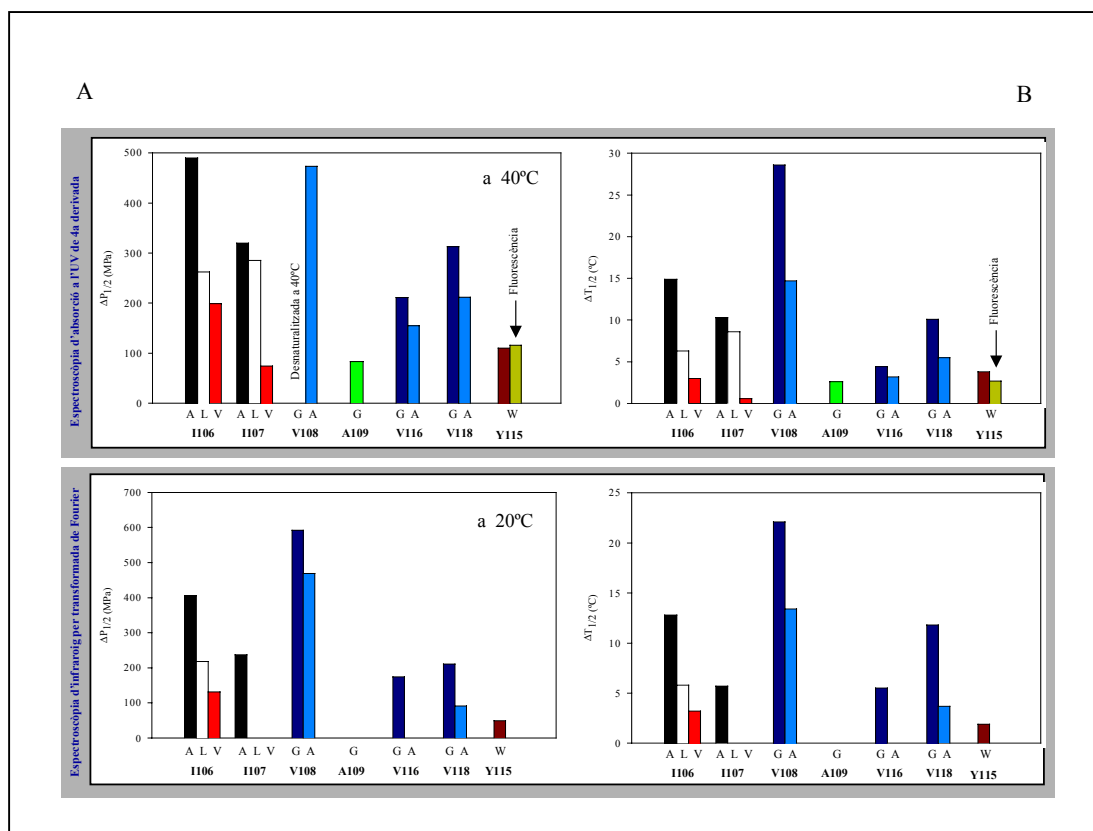
Convé ressaltar que, segons el nostre coneixement, aquest treball suposa la primera comparació directa de l'estabilitat d'un conjunt ampli de variants d'una proteïna, sota les mateixes condicions experimentals, emprant pressió i temperatura com agents desnaturalitzants.

Amb anterioritat, Royer i col·laboradors (Royer i col., 1993; Vidugiris i col., 1996; Frye i col., 1996; Frye i col., 1998; Panick i col., 1999), emprant la nucleasa estafilococal (salvatge i diverses variants) com a model, van iniciar un estudi dels efectes de la pressió, la temperatura i agents químics sobre l'estructura proteica, encara que sota condicions experimentals diferents.

3. Resultats i discussió

En la FIGURA 4.1 es presenta una síntesi, per mitjà d'un diagrama de barres, de la barostabilitat i de la termostabilitat de cadascuna de les variants assajades respecte a la proteïna salvatge, estimades per espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat de quarta derivada i per espectroscòpia d'infraroig.

FIGURA 4.1



Comparació dels valors de $\Delta P_{1/2}$ (A) i $\Delta T_{1/2}$ (B) estimats per a cadascuna de les variants estudiades respecte a la proteïna salvatge.

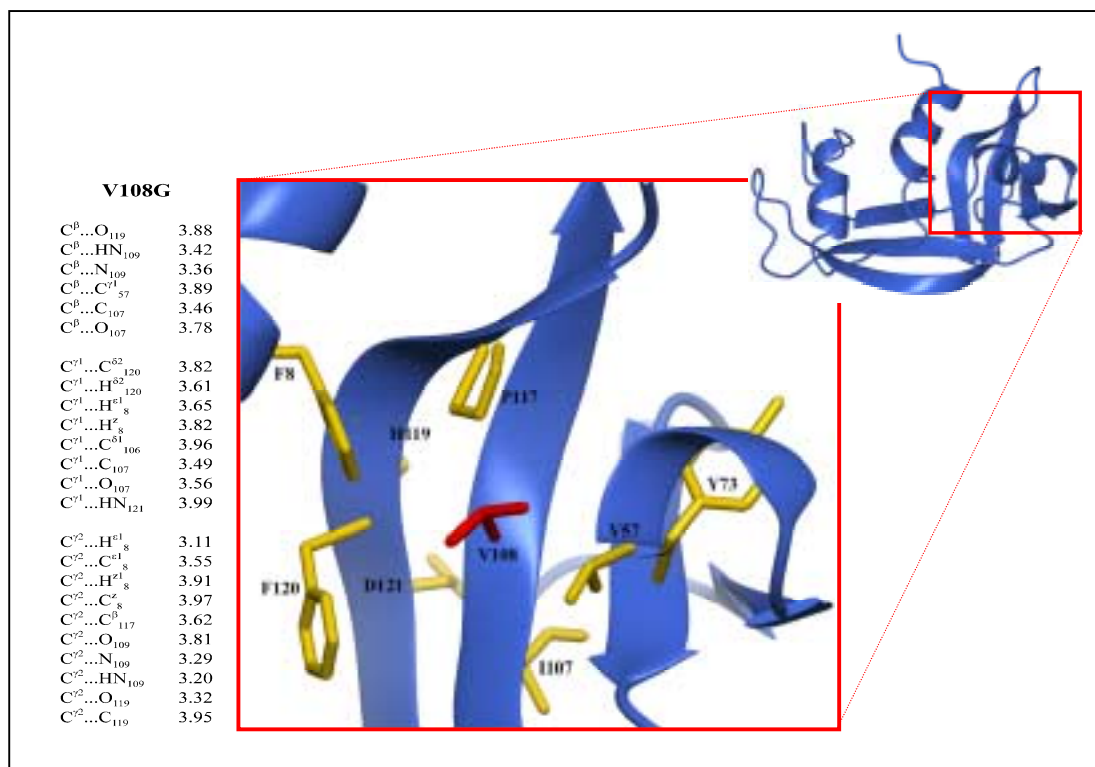
Respecte a la desestabilització observada en les diferents variants, s'ha constatat que part d'aquesta es deu principalment als canvis en les característiques de la cadena lateral substituïda. Això suggereix que la hidrofobicitat i el volum de les cadenes laterals alifàtiques de la regió en estudi intervenen de manera molt notable en l'estabilització de la proteïna. Així doncs, entre les diferents variants que resulten de substitucions en una mateixa posició, l'estabilitat de la proteïna decreix a mesura que es delecionen més grups metil/metilè de la cadena lateral alifàtica i per tant segueix l'ordre Ile>Val>Leu>Ala>Gly. L'efecte restant resulta de les diferències en l'ambient que envolta les cadenes laterals en cada posició, essent de molta importància el nombre d'interaccions de van der Waals que s'estableixen entre els

àtoms d'una cadena lateral i els àtoms circumdants. Així, la contribució estèrica determina l'estret lligam entre la magnitud de la desestabilització i el context de la cadena lateral reemplaçada en l'estructura tridimensional de la proteïna. D'acord amb aquests resultats i de manera similar a altres estudis (Pace, 1992; Serrano i col., 1992; Jackson i col., 1993), s'han trobat correlacions estadístiques entre els valors de $\Delta\Delta G_U$, $\Delta P_{1/2}$ i $\Delta T_{1/2}$ obtinguts per cadascuna de les variants estudiades i diversos paràmetres que defineixen la naturalesa de la cadena lateral substituïda (hidrofobicitat i volum) així com l'ambient on es troba aquesta cadena lateral (densitat d'empaquetament i exposició al solvent). Les conclusions que se'n deriven estan en concordança amb aquests estudis previs on s'han utilitzat altres proteïnes com a model. Així mateix, els resultats mostren que aquesta regió es comporta com a un nucli hidrofòbic.

Cal insistir especialment en el fet que el punt mig de la transició de desnaturalització per pressió i per temperatura de l'RNasa A disminueix 592 Mpa i 25°C, respectivament, com a conseqüència de la deleció de tres grups metil en la posició 108 de la seqüència amoniocídica. Per altres proteïnes s'han dissenyat variants amb el mateix tipus de substitucions que presenten efectes comparables, tot i que no tant dràstics, en la disminució de l'estabilitat conformacional enfront d'un augment de temperatura. Aquestes variants impliquen de manera majoritària substitucions de residus hidrofòbics per alanina. N'és un exemple clar, la variant L68A de l'inhibidor de quimotripsina 2, la qual presenta una termostabilitat 21.5 °C inferior respecte de la proteïna salvatge (Jackson i col., 1993), o la variant L133A, 18.1°C inferior (Zhang i col., 1992). Pel que fa a l'efecte d'aquest tipus de substitucions puntuals enfront d'un augment de pressió no existeix cap referent en la bibliografia. La Val108 és, doncs, un residu molt important per tal de preservar l'estabilitat i la integritat estructural de l'estat natiu de l'RNasa A, fins al punt que la substitució de la valina per una glicina minva molt l'estabilitat de la proteïna i origina petites alteracions conformacionals en l'estat natiu que es reflecteixen tal i com s'ha comentat, en variacions en els espectres de CD i FTIR. Concretament, per aquesta darrera tècnica, s'observa que la variant V108G presenta un bescanvi H-D en l'estat natiu més complet que la proteïna salvatge, la qual cosa es podria associar amb una major flexibilitat conformacional i amb una estructura proteica més oberta o dinàmica.

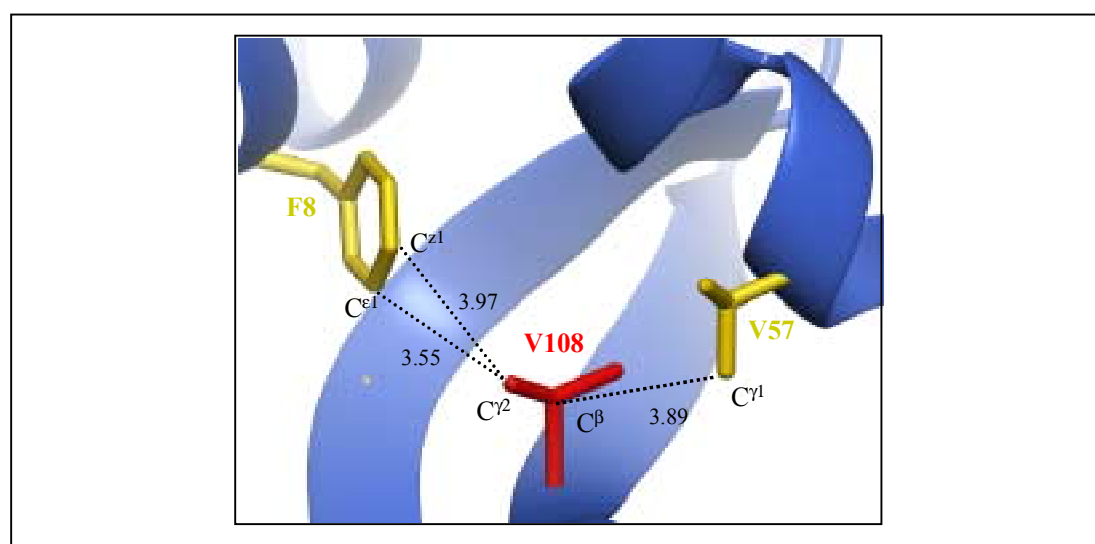
Considerant que la flexibilitat proteica està directament relacionada amb la compressibilitat, experiments de compressibilitat proteica podrien confirmar el comportament diferencial de la variant V108G. Així mateix, per una correcta interpretació del procés de bescanvi H/D i la seva correlació amb l'estructura tridimensional d'aquesta proteïna, caldria endegar un estudi comparatiu per NMR de l'RNasa A salvatge i la variant V108G.

FIGURA 4.2



Representació esquemàtica d'una part del nucli hidrofòbic de l'RNasa A. S'il·lustren aquelles cadenes laterals que es troben a menys de 4 Å de la cadena lateral de la Val108. També es presenten en el llistat que acompanya la figura, els contactes que estableix la cadena lateral de la Val108 amb els àtoms que es troben a menys de 4 Å i que es perden en la variant V108G. Les distàncies estan expressades en Å.

FIGURA 4.3



Detall d'una regió de l'RNasa A que mostra els residus de la posició 108 (valina), 8 (fenilalanina) i 57 (valina). S'indiquen, mitjançant una línia de punts, les distàncies inferiors a 4 Å dels àtoms de carboni de la cadena lateral V108 respecte dels àtoms de carboni de les cadenes laterals P8 i V57.

Els resultats obtinguts per aquesta variant es podrien justificar per la supressió de possibles interaccions que s'estableixen en la proteïna salvatge entre la Val108 i l'hèlix α_1 (residus 4-12), en concret amb el residu Phe8 (FIGURA 4.2 i 4.3). La pèrdua d'aquestes interaccions podria augmentar la flexibilitat del gir d'inversió que s'estén dels residus 14 a 17 i en conseqüència, aquest gir podria operar com a frontissa entre l'S-pèptid (residus 1-20) i l'S-proteïna (residus 21-124) originant més llibertat conformacional en aquesta regió. La importància de la Phe8 per aferrar l'S-pèptid amb l'S-proteïna ha estat recentment descrita (Goldberg i Baldwin, 1999). Així mateix, la total conservació d'aquest residu al llarg de la superfamília de les ribonucleases (Beintema i col., 1997) emfatitza la seva importància estructural. En aquest sentit convé destacar també la pèrdua de possibles interaccions amb la Val57 que forma part d'una altra estructura en hèlix (hèlix α_3), una de les cares de la qual es disposa enfront de la regió en estudi (FIGURA 4.2 i 4.3). Els residus Val57-Cys58 d'aquest element d'estructura secundària es troben en contacte amb els residus Tyr73-Ser75 i Val106-Val108, els quals han estat proposats com a integrants d'un nucli hidrofòbic d'excel·lent estabilitat, per una banda en base a estudis de bescanvi H/D i NMR (Neira i col., 1999) i, per l'altra banda, relacionant-ho amb aquells protons que queden protegits en etapes primerenques del plegament per experiments de *quench-flow* i 2DNMR (Udgaonkar i Baldwin, 1990). L'elevada conservació de la Val57 en la família de les ribonucleases pancreàtiques (2 canvis per una isoleucina) evidencia, molt probablement, la transcendència de les interaccions que s'estableixen amb aquest residu per tal de mantenir cohesionat el nucli hidrofòbic. Probablement, l'aplicació de l'enginyeria de proteïnes al llarg de tot aquest nucli hidrofòbic i l'estudi comparat del procés de bescanvi H/D de cadascuna de les variants obtingudes respecte a la proteïna salvatge, permetria descriure en major detall la singularitat de tota aquesta regió i els residus que confereixen estabilitat a l'RNasa A.

A fi d'aconseguir informació específica de la regió 106-118 de l'RNasa A es va reemplaçar la Tyr115 per un triptòfan. Atès que l'RNasa A no conté cap residu de triptòfan, aquest reemplaçament ens havia de proporcionar una única sonda fluorescent en la molècula per tal de seguir el plegament/desplegament d'aquesta regió.

Considerant que la Tyr115 està emplaçada pròxima a la superfície de la proteïna, en un gir d'inversió de tipus VI, era d'esperar que la introducció d'un triptòfan no alterés l'estabilitat ni l'estructura nativa de la proteïna. Per tal de caracteritzar l'estabilitat d'aquesta variant, el seu procés de desnaturalització en condicions d'equilibri, induït tant per pressió com per temperatura, es va seguir mitjançant espectroscòpia de fluorescència, espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat de quarta derivada i espectroscòpia d'absorció a l'infraroig per transformada de Fourier. Paral·lelament els resultats es van comparar amb els obtinguts per la proteïna salvatge. Així mateix, també es va caracteritzar el procés de desnaturalització induït per urea, en condicions d'equilibri, per mitjà d'espectroscòpia de fluorescència i electroforesi en gel de poliacrilamida amb gradient transversal d'urea i es va comparar respecte a la proteïna salvatge. S'ha observat que la substitució de la

Tyr115 per un residu de triptòfan dóna lloc a una variant biològicament activa, equivalent a l'enzim salvatge. Aquesta no presenta cap pertorbació de l'estructura secundària nativa que es pugui detectar per CD o FTIR i només mostra una estabilitat conformacional lleugerament inferior a la proteïna salvatge. Les similituds entre els valors dels paràmetres termodinàmics i els valors de $P_{1/2}$ i $T_{1/2}$ obtinguts per fluorescència i les altres tècniques de seguiment refermen que el procés de desplegament és molt cooperatiu i en dos estats. L'augment de les propietats fluorescents de la molècula i la petita alteració de la seva estabilitat i estructura suggereixen que la presència d'una cadena lateral de triptòfan en el CFIS en estudi proporciona una sonda conformacional sensible per dur a terme estudis de cinètica de plegament/desplegament, ja sigui d'aquesta variant puntual o bé de variants dobles.

4. *Conclusions*

1. La introducció en el gen de l'RNasa A de les diverses mutacions objecte d'estudi en aquest treball no altera l'expressió heteròloga d'aquest gen. Així mateix, el rendiment de purificació de les variants no es veu afectat a excepció de la variant V108G, la qual ha presentat una recuperació lleugerament inferior.
2. Els paràmetres cinètics determinats per cadascuna de les ribonucleases variants, quan s'utilitza C>p i poli(C) com a substrats, indiquen que aquestes proteïnes presenten propietats catalítiques equivalents a l'enzim salvatge, fet que permet afirmar que l'estructura del seu centre actiu, és, sinó idèntica, semblant al de l'RNasa A salvatge.
3. La caracterització de l'estat natiu de les ribonucleases en estudi, mitjançant espectroscòpia de dicroïsmo circular i espectroscòpia d'infraroig per transformada de Fourier, indica que la proteïna salvatge i les diferents variants mostren en general similitud estructural. Això no obstant, s'evidencien petites diferències en algunes variants i sobretot en l'estructura de la variant V108G.

4. L'estudi i comparació del procés de desplegament del conjunt de variants de l'RNasa A, així com de la proteïna salvatge, sota les mateixes condicions experimentals, seguit per mitjà de l'espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat de quarta derivada i espectroscòpia d'infraroig per transformada de Fourier, mostra que enfront d'un augment gradual tant de pressió com de temperatura, l'estructura terciària i els elements d'estructura secundària de les proteïnes estudiades es perden de manera conjunta. Aquestes variacions estructurals, que es promouen, descriuen un procés de desplegament global, molt cooperatiu i en dos estats, que implica ambdós tipus d'estructura. En tots els casos el procés de desnaturalització ha estat reversible.
5. Els canvis conformacionals en l'RNasa A salvatge i en les variants que resulten de la desnaturalització induïda per pressió, no difereixen considerablement d'aquells que s'observen quan s'utilitza la temperatura com a agent desnaturalitzant. Ambdós estats desnaturalitzats que s'obtenen es caracteritzen per presentar un increment comparable de la polaritat mitjana al voltant de les tirosines, per bé que el màxim de l'espectre d'infraroig en la regió de l'amida I' de l'estat desnaturalitzat per pressió, se situa a una freqüència diferent al que s'obté per temperatura.
6. Les diferències de barostabilitat ($\Delta P_{1/2}$) i termostabilitat ($\Delta T_{1/2}$) de qualsevol variant assajada respecte a la proteïna salvatge són molt similars, tant si s'enregistra el procés de desplegament mitjançant espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat com si s'enregistra mitjançant espectroscòpia d'absorció a l'infraroig. Ja que ambdues tècniques utilitzen cadascuna un règim de concentració proteica molt diferent, els resultats indiquen que el procés de desplegament per pressió i per temperatura és intramolecular.
1. Els valors d'energia lliure de desplegament (ΔG_U) que s'obtenen quan s'utilitza la pressió com a agent desnaturalitzant són idèntics, dins dels límits de detecció, als que s'obtenen quan s'utilitza temperatura. Aquesta observació és vàlida per a tota la sèrie de 16 proteïnes assajades dins d'un interval que s'estén de -9 a $+25$ KJ mol^{-1} . Això suggereix que les substitucions que s'han dut a terme, tenen un efecte equivalent tant en el desplegament per pressió com en el de temperatura, i que el mecanisme de desplegament per ambdós processos de desnaturalització és probablement molt semblant.
8. Una part de la desestabilització observada en les diferents variants es deu principalment als canvis en les característiques de la cadena lateral substituïda. S'han trobat correlacions estadístiques entre els valors de $\Delta\Delta G_U$, $\Delta P_{1/2}$ i $\Delta T_{1/2}$ obtinguts per cadascuna de les variants estudiades i diversos paràmetres que defineixen la naturalesa de la cadena lateral substituïda (hidrofobicitat i volum). Això suggereix que la hidrofobicitat i el volum de les cadenes laterals alifàtiques de la regió en estudi intervenen de manera molt notable en l'estabilització de la proteïna. Així doncs, entre les diferents variants que resulten de substitucions en

4. Conclusions

una mateixa posició, sense tenir en compte les substitucions disruptives, l'estabilitat de la proteïna decreix a mesura que es delecten més grups metil/metilè de la cadena lateral alifàtica i per tant segueix l'ordre Ile>Val>Ala>Gly.

9. L'efecte restant en la desestabilització proteica resulta de les diferències en l'ambient que envolta les cadenes laterals en cada posició, essent de molta importància el nombre d'interaccions de van der Waals que s'estableixen entre els àtoms d'una cadena lateral i els àtoms circumdants. S'han trobat correlacions estadístiques entre els valors de $\Delta\Delta G_U$, $\Delta P_{1/2}$ i $\Delta T_{1/2}$ obtinguts per cadascuna de les variants estudiades i diversos paràmetres que defineixen l'ambient on es troba aquesta cadena lateral (densitat d'empaquetament i exposició al solvent).
10. La Val108 és un residu molt important per tal de preservar l'estabilitat i la integritat estructural de l'estat natiu de l'RNasa A, fins al punt que la substitució de la valina per una glicina minva molt l'estabilitat de la proteïna i origina petites alteracions conformacionals en l'estat natiu.
11. L'augment de les propietats fluorescents de la variant Y115W respecte a la proteïna salvatge i la semblança d'ambdues proteïnes, tant en estabilitat com en estructura, suggereixen que la presència d'una cadena lateral de triptòfan en la regió en estudi proporciona una sonda sensible als canvis conformacionals per dur a terme estudis de cinètica de plegament/desplegament, bé d'aquesta variant puntual o bé de variants dobles.

5. *Bibliografia*

- Aguilar, C. F., Thomas, P. J., Mills, A., Moss, D. S. i Palmer, R. A. (1992) *J. Mol. Biol.* **224**, 265-267.
- Aguilar, C. F., Thomas, P. J., Moss, D. S., Mills, A. i Palmer, R. A. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1118**, 6-20.
- Alber, T., Dao-pin, S., Wilson, K., Wozniak, J. A., Cook, S. P. i Matthews, B. W. (1987) *Nature* **330**, 41-46.
- Allen, D.L. i Pielak, G.J. (1998) *Protein Sci.* **7**, 1262-1263.
- Alonso, J., Nogués, M. V. i Cuchillo, C. M. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* **246**, 681-689.
- Altmann, K.-H. i Scheraga, H. A. (1990). *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 4926-4931.
- Anderle, G. i Mendelsohn, R. (1987) *Biophys. J.* **52**, 69-74.
- Anfinsen, C. B., Flavin, M. i Fansworth, J. (1952). *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 468.
- Anfinsen, C. B., Haber, E., Sela, M. i White, F. H. Jr. (1961) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **47**, 1309-1314.

- Arrondo, J. L., Muga, A., Castresana, J. i Goni, F. M. (1993) *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **59**, 23-56.
- Arrondo, J. L., Young, N. M. i Mantsch, H. H. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **952**, 261-268.
- Arús, C. (1981) Tesi Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.
- Avbelj, F. i Moulton, J. (1995) *Proteins* **23**, 129-141.
- Axe, D. D., Foster, N. W. i Fersht, A. R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5590
- Backmann, J., Schultz, C., Fabian, H., Hahn, U. i Saenger, W. (1996) *Proteins* **24**, 379-387.
- Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K. i Masson, P. (1992) "High pressure and biotechnology" (Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K. i Masson P., Eds.). Colloque INSERM, Vol. **224**. John Libbey, Londres.
- Barnard, E. A. (1969a) *Nature* **221**, 340-343.
- Barnard, E. A. (1969b) *Ann. Rev. Biochem.* **38**, 677-732.
- Basset, J. i col., *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 195 (1932), 1431; 196 (1933) 67.
- Baynes, J. W. i Wold, F. (1970) *J. Biol. Chem.* **243**, 6016-6024.
- Beals, J. M., Haas, E., Krausz, S. i Scheraga, H. A. (1991) *Biochemistry* **30**, 7680-7692.
- Beintema, J. J. (1987) *Life Chem. Rep.* **4**, 333-389.
- Beintema, J. J., Breukelman, H. J., Carsana, A. i Furia, A. (1997) "Ribonucleases: Structures and Functions" (D'Alessio, G. i Riordan, J. F., Eds.). Pp. 245-269. Academic Press, Nova York.
- Beintema, J. J., Schüller C., Irie, M. i Carsana, A. (1988) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **51**, 165-192.
- Better, M., Chang, C. P., Robinson, R. R. i Horwitz, A. H. (1988) *Science* **240**, 1041-1043.
- Bierzynski, A., Kim, P. S. i Baldwin, R. L. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2470-2474.
- Biler, D. M. i Susi, H. (1986) *Biopolimers* **25**, 469-487.
- Birdsall, D. L. i McPherson, A. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 22230-22236.
- Birnboim, H. C. i Doly, J. (1979) *Nucleic. Acids. Res.* **7**, 1513-1523.
- Blackburn, P. i Moore, S. (1982) "The Enzymes" (Boyer, P. D., Ed.). Vol. **15**, pp. 317-433. Academic Press, Nova York.
- Blank, A., Sugiyama, R. H. i Dekker, C. A. (1982) *Anal. Biochem.* **120**, 267-275.
- Boix, E. (1993) Tesi Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra.

5. Bibliografia

- Boqué, L., Coll, M. G., Ribó, M., Cuchillo, C. M., Fita, I. i Vilanova, M. (1998) *Protein Peptide Lett.* **5**, 101-108.
- Boqué, L., Coll, M. G., Vilanova, M., Cuchillo, C. M. i Fita, I. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 19707-19712.
- Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-252.
- Brandts, J. F., Halvorson, H. R. i Brennan, M. (1975) *Biochemistry* **14**, 4953-4963.
- Brandts, J. F., Oliveirea, R. J. i Westort, C. (1970) *Biochemistry* **9**, 1038-1047.
- Bravo, J., Fernández, E., Ribó, M., De Llorens, R. i Cuchillo, C. M. (1994) *Anal. Biochem.* **219**, 82-86.
- Bridgman, P. W. (1914) *J. Biol. Chem.* **19**, 511-512.
- Buckle, A. M., Cramer, P. i Fersht, A. R. (1996) *Biochemistry* **35**, 4298-4305.
- Buckle, A. M., Henrick, K. i Fersht, A. R. (1993) *J. Mol. Biol.* **234**, 847-860.
- Buckler, D. R., Haas, E. i Scheraga, H. A. (1995) *Biochemistry* **34**, 15965-15978.
- Butler, W. L. (1979) *Methods Enzymol.* **56**, 501-515.
- Canals, A. (1998) Treball de Recerca, Universitat de Girona, Girona.
- Carsana, A., Confalone, E., Palmieri, M., Sorrentino, S., Libonati, M. i Furia, A. (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**, 5491-5502.
- Chan, H.S. i Dill, K.A. (1998) *Proteins* **30**, 2-33.
- Chavez, L. G. i Scheraga, H. A. (1980) *Biochemistry* **19**, 1005-1012.
- Cheftel, J. C. (1992) "High Pressure and Biotechnology" (Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K. i Masson P., Eds.). Colloque INSERM, Vol. **224**, pp. 195-209. John Libbey, Londres.
- Chirgadze, Y. N. i Nevskaya, N. A. (1976) *Biopolymers* **15**, 607-625.
- Chirgadze, Y. N. i Nevskaya, N. A. (1976) *Biopolymers* **15**, 627-636.
- Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., McDonald, R. J. i Rutter, W. J. (1979) *Biochemistry* **18**, 5294-5299.
- Chou, P. Y. i Fasman, G. D. (1977) *J. Mol. Biol.* **115**, 135-175.
- Clark, A.H., Saunderson, D.H.P. i Suggett, A. (1981) *J. Pept. Protein Res.* **17**, 353-364.
- Clarke, J. i Fersht. A. R. (1993) *Biochemistry* **32**, 4322-4329.
- Clothia, C. (1974) *Nature* **248**, 338-339.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. i Hsu, L. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **69**, 2110-2114.
- Coll, M. G. (1994) Treball de Recerca, Universitat de Girona, Girona.

- Coll, M. G., Protasevich, I. I., Torrent, J., Ribó, M., Lobachov, V. M., Makarov, A. A. i Vilanova, M. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**, 356-360.
- Cook, K. H., Schimid, F. X. i Baldwin, R. L. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 6157-6161.
- Creighton, T. E. (1979a) *J. Mol. Biol.* **129**, 235-264.
- Creighton, T. E. (1979b) *J. Mol. Biol.* **129**, 411-431.
- Creighton, T. E. (1980) *J. Mol. Biol.* **137**, 61-80.
- Creighton, T. E. (1986) *Methods Enzymol.* **131**, 156-172.
- Creighton, T. E. (1993) "*Proteins: structures and molecular properties*" 2nd edit. W.H. Freeman and Company, Nova York.
- Creighton, T. E. (1994) "*Mechanism of protein folding*" (Pain, R. H., Ed.). Pp. 1-25. IRL Press, Nova York.
- Crook, E. M., Mathias, A. P. i Rabin, B. R. (1960) *Biochem. J.* **74**, 234-238.
- Cuchillo, C. M., Vilanova, M. i Nogués, M. V. (1997) "*Ribonucleases: Structures and Functions*" (D'Alessio, G. i Riordan, J.F., Eds.). Pp. 271-304. Academic Press, Nova York.
- Cuchillo, C.M., Parés, X., Guasch, A., Barman, T., Travers, F. i Nogués, M. V. (1993) *FEBS Lett.* **333**, 207-210.
- Dalby, P. M., Oliveberg, M. i Fersht, A. R. (1998) *J. Molec. Biol.* **276**, 625-646.
- delCardayré, S. B. i Raines, R. T. (1994) *Biochemistry* **33**, 6031-6037.
- delCardayré, S. B. i Raines, R. T. (1995) *J. Mol. Biol.* **252**, 328-336.
- delCardayré, S. B., Ribó, M., Yokel, E. M., Quirk, D. J., Rutter, W. J. i Raines, R. T. (1995) *Protein Eng.* **8**, 261-273.
- delCardayré, S. B., Thompson, J. E. i Raines, R. T. (1994) "*Techniques in Protein Chemistry V*" (Crabb, J. W., Ed.). Pp. 313-320. Academic Press, San Diego, CA.
- delCardayré, S.B., Ribó, M., Yokel, E.M., Quirk, D.J., Rutter, W.J. i Raines, R.T. (1995) *Protein Eng.* **8**, 261-273.
- Deléage, G. i Geourjon, C. (1993) *Comp. Appl. Biosc.* **9**, 197-199.
- Dill, K. A. (1990) *Biochemistry* **29**, 7133-7155.
- Dodge, R. W. i Sheraga, H. A. (1996) *Biochemistry* **35**, 1548-1559.
- Dodge, R. W., Laity, J. H., Rothwarf, D. M., Shimotakahara, S. i Scheraga, H. A. (1994) *J. Protein Chem.* **13**, 409-421.
- Dong, A., Huang, P. i Caughey, W. S. (1990) *Biochemistry* **29**, 3303-3308.
- Edelhoch, H. (1967) *Biochemistry* **6**, 1948-1954.
- Eftink, M. R. (1991) *Methods Biochem. Anal.* **35**, 127-205.

- Eftink, M. R. i Biltonen, R. L. (1987) “*Hydrolytic enzymes*” (A. Neuberger i K. Brocklehurst, Eds.). Pp. 333-376. Elsevier Science Publishers, Nova York.
- Elwell, M.L. i Schellman, J. A. (1977) *Biochim Biophys Acta* **494**, 367-383.
- Erijman, L., Paladini, A. A., Lorimer, G. H. i Weber, G. J. (1993) *Biol. Chem.* **268**, 25914-25919.
- 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.
- Fabian, H., Schultz, C., Backmann, D., Hahn, U., Saenger, W., Mantsch, H.H. i Naumann, D. (1994) *Biochemistry* **33**, 10725-10730.
- Fankuchen, I. (1941) *J. Gen. Physiol.* **24**, 315-316.
- Fauchère, J.L. i Pliska, V. (1983) *Eur. J. Med. Chem.* **18**, 369-375.
- Fersht, A. R. (1999) “*Structure and Mechanism in protein Science*” (W.H. Freeman and Co. Ed.). Nova York.
- Fersht, A. R. i Serrano, L. (1993) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 75-83.
- Findlay, D., Herries, D. G., Mathias, A. P., Rabin, B. R. i Ross, C. A. (1961) *Nature (Londres)* **190**, 781-785.
- Fisher, M. T. i Sligar, S. G. (1985) *Biochemistry* **24**, 6696-6701.
- Fontecilla-Camps, J. C., de Llorens, R., Le Du, M. H. i Cuchillo, C. M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 21526-21531.
- Frauenfelder, H., Alberding, N.A., Ansari, A., Braunstein, D., Cowen, B.R., Hong, M.K., Iben, I.E.T., Johnson, J.B., Luck, S., Marden, M.C., Mourant, J.R., Ormos, P., Reinisch, L., Scholl, R., Schulte, A., Shyamsunder, E., Sorensen, L.B., Steinbach, P.J., Xie, A., Young, R.D. i Yue, H.T. (1990) *J. Phys. Chem.* **94**, 1024-1037.
- Frye, K. J. i Royer, C. A. (1998) *Protein Sci.* **7**, 2217-2222.
- Frye, K.J., Perman, C.S. i Royer, C.A. (1996) *Biochemistry* **35**, 10234-10239.
- Fu, D., Chen, L. i O’Neill, R. A. (1994) *Carbohydrate Res.* **261**, 173-186.
- Gassner, N. C., Baase, W. A. i Matthews, B. W. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12155-12158.
- Gibson, R. E. i Loeffler, O. H. (1941) *J. Amer. Chem. Soc.* **63**, 898-906.
- Gibson, T. J. (1984) Tesi Doctoral. Cambridge University, Anglaterra.
- Gill, S. C. i von Hippel, P. H. (1989) *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Gilliland, G. L. (1997) “*Ribonucleases: Structures and Functions*” (D’Alessio, G., i Riordan, J. F., Eds.). Pp. 305-341. Academic Press, Nova York.
- Glasoe, P. K. i Long, E. A. (1960) *J. Phys. Chem.* **64**, 188-190.
- Goldberg, J. M. i Baldwin, R. L. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2019-2024.

- Goldenberg, D. P. (1989) "Protein Structure" (Creighton, T. E., Ed.). Pp. 225-250. IRL Press, Oxford, Anglaterra.
- Goldenberg, D. P. i Creighton, T. E. (1984) *Anal. Biochem.* **138**, 1-18.
- González, C., Santoro, J. i Rico, M. (1997) "Ribonucleases: Structures and Functions" (D'Alessio, G., i Riordan, J. F., Ed.), pp. 343-381. Academic Press, Nova York.
- Goossens, K., Smeller, L., Frank, J. i Heremans, K. (1996) *Eur. J. Biochem.* **236**, 254-262.
- Grathwohl, C. i Wüthrich, K. (1981) *Biopolymers* **20**, 2623-2633.
- Gross, M. i Jaenicke, R. (1994) *Eur. J. Biochem.* **221**, 617-630.
- Gross, P. i Ludwing, H. (1992) "High Pressure and Biotechnology" (Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K. i Masson, P., Eds.) Colloque INSERM, Vol **224**, pp. 57-59. John Libbey, Londres.
- Gutte, B. i Merrifield, R. B. (1969) *Am. Chem. Soc.* **91**, 501-502.
- Haas, E., Montelione, G. T., McWherter, C. A. i Scheraga, H. A. (1987) *Biochemistry* **26**, 1672-1683.
- Haber, E. i Anfinsen, C. B. (1961) *J. Biol. Chem.* **236**, 422-426.
- Hantgan, R. R., Hammes, G. G. i Scheraga, H. A. (1974) *Biochemistry* **13**, 3421-3431.
- Haris, M. J., T. Higuchi, T. i J. H. Rytting (1973) *J. Phys. Chem.* **77**, 2694.
- Haris, P. I. i Chapman, D. (1995) *Biopolymers* **37**, 251-263.
- Harpaz, Y., Gerstein, M. i Chothia, C. (1994) *Structure.* **2**, 641-649.
- Hawley, S. A (1971) *Biochemistry* **10**, 2436-2442.
- Hayashi, R. (1992) "High Pressure Bioscience and Food Science" San-Ei Shuppan.
- Heremans, K. (1982) *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **11**, 1-21.
- Heremans, K. (1992) "High Pressure and Biotechnology" (Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K. i Masson, P., Eds.) Colloque INSERM, Vol **224**, pp. 37-44. John Libbey, Londres.
- Heremans, K. i Smeller, L. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1386**, 353-370.
- Hermann, R. B. (1972) *J. Phys. Chem.* **76**, 2754.
- Herries, D. G., Mathias, A. P. i Rabin, B. R. (1962) *Biochem. J.* **85**, 127-134.
- Hirs, C. H. W., Moore, S. i Stein, W. H. (1960) *J. Biol. Chem.* **235**, 633-647.
- Hirsch, R. E., Friedman, J. M., Harrington, J. P. i Scarlata, S. F. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**, 1635-1640.
- Hite, B. H. (1989) *Am. Chem. J.* **22**, 80.

- Hofsteenge, J. (1997) "Ribonucleases: Structure and Functions" (d'Alessio, G., Riordan, J. F., Eds.). Pp. 621-658. Academic Press, Nova York.
- Hollecker, M. i Creighton T. E. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **701**, 395-404.
- Horovitz, A., Matthews, J. M. i Fersht, A. R. (1992) *J. Mol. Biol.* **227**, 560-568.
- Houry, W. A. i Scheraga, H. A. (1996a) *Biochemistry* **35**, 11719-11733.
- Houry, W. A. i Scheraga, H. A. (1996b) *Biochemistry* **35**, 11734-11746.
- Houry, W. A., Rothwarf, D. M. i Scheraga, H. A. (1994) *Biochemistry* **33**, 2516-2530.
- Houry, W. A., Rothwarf, D. M. i Scheraga, H. A. (1995) *Nat. Struct. Biol.* **2**, 495-503.
- Howlett, J. R., Ismail, A. A., Armstrong, D. W. i Wong, P. T. T. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1159**, 227-236.
- Irie, M., Mikami, F., Monma, K., Ohgi, K., Watanabe, H., Yamaguchi, R. i Nagase, H. (1984b) *J. Biochem. (Tokyo)* **96**, 89-96.
- Irie, M., Watanabe, H., Ohgi, K., Tobe, M., Matsumura, G., Arata, Y., Hirose, T., i Inamaya, S. (1984a) *J. Biochem. (Tokyo)* **95**, 751-759.
- Ish-Horowicz, D. i Burke, J. F. (1981) *Nucleic Acid Res.* **9**, 2989.
- Ismail, A. A., Mantsch, H. i Wong, P. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1121**, 183-188.
- Iwaoka, M., Juminaga, D. i Scheraga, H. A. (1998) *Biochemistry* **37**, 4490-4501.
- Jackson, S. E., Moracci, M., elMasry, N., Johnson, C. M. i Fersht, A. R. (1993) *Biochemistry* **32**, 11259-11269.
- Jiménez, M. A., Nieto, J. L., Herranz, J., Rico, M. i Santoro, J. (1987) *FEBS Lett.* **221**, 320-324.
- Jiménez, M. A., Rico, M., Herranz, J., Santoro, J. i Nieto, J. L. (1988) *Eur. J. Biochem.* **175**, 101-109.
- Jiménez, M. A., Rico, M., Herranz, J., Santoro, J. i Nieto, J. L. (1990) *Biochim. et Biophys. Acta* **1038**, 322-329.
- Jonas, J. i Jonas (1994) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 287-318.
- Jones, W. J. (1920) *Am. Physiol.* **52**, 203-207.
- Juminaga, D., Wedemeyer, W. J. i Scheraga, H. A. (1998) *Biochemistry* **37**, 11614-11620.
- Juminaga, D., Wedemeyer, W. J., Garduño-Juárez, R., McDonald, M. A. i Scheraga, H. A. (1997) *Biochemistry* **36**, 10131-10145.
- Juncosa, M. (1995) Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.
- Juncosa, M., Pons, J., Planas, A. i Querol, E. (1994) *Biotechniques* **16**, 820-824.
- Karpeisky, M. Y. i Yakovlev, G. I. (1981) *Sov. Sci. Rev., Sect. D2*, 145-257.

- Kartha, G., Bello, J. i Harker, D. (1967) *Nature* **213**, 862-865.
- Katoh, H., Yoshinaga, M., Yanagita, T., Ohgi, K., Irie, M., Beintema, J. J. i Meinsma, D. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **873**, 367-371.
- Kauppinen, J. K., Moffat, D., Mantsch, H. H. i Cameron, D. G. (1981) *Appl. Spectrosc.* **35**, 271-276.
- Kauzmann, W. (1954) "The Mechanism of Enzyme Action" (McElroy, W. D., i Glass, B., Eds.). Pp. 70. Johns Hopkins Press, Baltimore, MD.
- Kauzmann, W. (1959) *Adv. Protein Chem.* **14**, 1-63.
- Kauzmann, W. (1959) *Adv. Protein Chem.* **16**, 1-64.
- Kell, G. S. (1973) "Handbook of Chemistry and Physics" (Weast RC, Ed.) 54 ed, F5.
- Kellis, J. T. J., Nyberg, K. i Fersht, A. R. (1989) *Biochemistry* **28**, 4914-4922.
- Kellis, J. T. J., Nyberg, K., Sali, D. i Fersht, A. R. (1988) *Nature* **333**, 784-786.
- Kim, J. S., Soucek, J., Matousek, J. i Raines, R. T. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 10525-10530.
- Kim, P. S. i Baldwin, R. L. (1980) *Biochemistry* **19**, 6124-6129.
- Kim, P. S. i Baldwin, R. L. (1990) *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 631-660.
- Kim, P.S. i Baldwin, R. L. (1990) *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 459-489.
- Kim, P.S., Bierzynsky, A. i Baldwin, R. L. (1982) *J. Mol. Biol.* **162**, 187-199.
- Kitamura, Y. i Itoh, T. (1987) *J. Sol. Chem.* **16**, 715-725.
- Klink, T. A., Woycechowsky, K. J., Taylor, K. M. i Raines, R. T. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 1-8.
- Kornblatt, J. A., Kornblatt, M. J. i Hui Bon Hoa G. (1995) *Biochemistry* **34**, 1218-1223.
- Krimm, S. i Bandekar, J. (1986) *Adv. Protein Chem.* **38**, 181-364.
- Kunitz, M. (1939) *Science* **90**, 112-113.
- Kunitz, M. i McDonald, M. R. (1953) *Biochem. Prepr.* **3**, 9-19.
- Kunitz, M. J. (1940) *Gen. Physiol.* **24**, 15-32.
- Kunugi, S. (1993) *Prog. Polym. Sci.* **18**, 805-838.
- Labhardt, A.M. (1982) *J. Mol. Biol.* **157**, 331-355.
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
- Laity, J. H., Lester, C. C., Shimotakahara, S., Zimmerman, D. E., Montelione, G. T. i Scheraga, H. A. (1997) *Biochemistry* **36**, 12683-12699.
- Laity, J. H., Shimotakahara, S. i Scheraga, H. A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 615-619.
- Landt, O., Grunnert, H-P. i Hahn, U. (1990) *Gene* **96**, 125-128.

- Lange, R., Bec, N., Mozhaev, V.V. i Frank, J. (1996b) *Eur. Biophys. J.* **24**, 284-292.
- Lange, R., Frank, J., Saldana, J. L. i Balny, C. (1996a) *Eur. Biophys. J.* **24**, 277-283.
- LaPlanche, L. A. i Rogers, M. T. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 337-341.
- Lassalle, M. W., Hiroaki, Y. i Akasaka, K. (2000) *J. M. B.* **298**, 293-302.
- Leatherbarrow, R. J. (Ed.) (1987) Elsevier Biosoft, Cambridge.
- Lee, F. S. i Vallee, B. L. (1993) *Prog. Nucl. Acid Res. Mol.* **44**, 1-30.
- Leland, P.A., Schultz, L. W., Kim, B. M. i Raines, R.T. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10407-10412.
- Li, Y.-J., Rothwarf, D. M. i Scheraga, H. A. (1995) *Nat. Struc. Biol.* **2**, 489-494.
- Liang, C. J., Yamashita, K. i Kobata, A. (1980) *J. Biochem. (Tokyo)* **88**, 51-58.
- Lim, W. A. i Sauer, R. T. (1989) *Nature* **339**, 31-36.
- Lim, W. A., Farruggio, D. C. i Sauer, R. T. (1992) *Biochemistry* **31**, 4324-4333.
- Lustig, B. i Fink, A. L. (1992a) *Biochim. Biophys. Acta* **1119**, 205-210.
- Lustig, B. i Fink, A. L. (1992b) *Biochim. Biophys. Acta* **1121**, 229-233.
- Makhatadze, G. I. i Privalov, P. L. (1995) *Adv. Protein Chem.* **47**, 307-425.
- Masson, P. i Cléry (1996) "High Pressure Bioscience and Biotechnology" (R. Hayashi i C. Balny, Ed.). Pp. 117-125. Elsevier Science B. V.
- Masson, P., Arciero, D. M., Hooper, A. B. i Balny, C. (1990) *Electrophoresis* **11**, 128-133.
- Matheson, R. R., Jr. i Scheraga, H. A. (1978) *Macromolecules* **11**, 819-829.
- Matouschek, A. i Fersht, A. R. (1991) *Methods Enzymol* **202**, 82-112.
- Matsuura, H., Hasegawa, K. i Miyazawa, T. (1986) *Spectrochim. Acta* **42A**, 1181-1192.
- Matsuura, M., Becktel, W. J. i Matthews, B. W. (1988) *Nature* **334**, 406-410.
- Matthews, C. R. (1993) *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 653-683.
- McGeehan, G. i Benner, S. A. (1989) *FEBS Lett.* **247**, 55-56.
- McPherson, A., Brayer, G. D. i Morrison, R. D. (1986b) *Biophys. J.* **49**, 209-219.
- McPherson, A., Brayer, G., Cascio, D. i Williams, R. (1986a) *Science* **232**, 765-768.
- Milburn, P. J. i Scheraga, H. A. (1988) *J. Protein Chem.* **7**, 377-398.
- Mitchinson, C. i Baldwin, R. L. (1986) *Proteins* **1**, 23-33.
- Mitsui, Y., Urata, Y., Torii, K. i Irie, M. (1978) *Biochem. Biophys. Acta* **535**, 229-308.

- Mombelli, E., Afshar, M., Fusi, P., Mariani, M., Tortora, P., Connelly, J. P. i Lange, R. (1997) *Biochemistry* **36**, 8733-8742.
- Montelione, G. T. i Scheraga, H. A. (1989) *Acc. Chem. Res.* **22**, 70-76.
- Montelione, G. T., Arnold, E., Meinwald, Y. C., Stimson, E. R., Denton, J. B., Huang, S.-G., Clardy, J. i Scheraga, H. A. (1984) *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 7946-7958.
- Moody, P. C. E. i Wilkinson, A. (1990) *J. Protein Engineering*. IRL Press. Nova York.
- Morild, E. (1981) *Adv. Prot. Chem.* **34**, 93-166.
- Moussaoui, M., Guash, A., Boix, E., Cuchillo, C. M. i Nogués, M. V. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 4687-4692.
- Mozhaev, V. V., Heremans, K., Frank, J., Masson, Pl. i Balny, C. (1994) *Trends Biotechnol.* **12**, 493-501.
- Mozhaev, V. V., Heremans, K., Frank, J., Masson, Pl. i Balny, C. (1996) *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **24**, 81-91.
- Mozo-Villarias, A., Morros, A. i Andreu, J. M. (1991) *Eur. Biophys. J.* **19**, 295-300.
- Nakamaye, K. i Eckstein, F. (1986) *Nucl. Acids Res.* **14**, 9679-9698.
- Nambiar, K. P., Stackhouse, J., Presnell, S. R. i Benner, S. A. (1987) *Eur. J. Biochem.* **163**, 67-71.
- Nambiar, K. P., Stackhouse, J., Stauffer, D. M., Kennedy, W. P., Eldredge, J. K. i Benner, S. A. (1984) *Science* **223**, 1299-1301.
- Nash, D., Lee, B.S. i Jonas, J. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1297**, 40-48.
- Neira, J. L. i Rico, M. (1997) *Folding Des.* **2**, R1-R11.
- Neira, J. L., Sevilla, P., Menéndez, M., Bruix, M. i Rico, M. (1999) *J. Mol. Biol.* **285**, 627-643.
- Némethy, G. i Scheraga, H. A. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 6050-6054.
- Némethy, G., Leach, S. J. i Scheraga, H. A. (1966). *J. Phys. Chem.* **70**, 998-1004.
- Nevskaya, N. A i Chirgadze, Y. N. (1976) *Biopolymers* **15**, 637-648.
- Nicoli, D.F. i Benedek, G.B. (1976) *Biopolymers* **15**, 2421-2437.
- Nogués, M. V., Moussaoui, M., Boix, E., Vilanova, M., Ribó, M. i Cuchillo, C. M. (1998) *Cell. Mol. Life Sci.* **54**, 766-774.
- Oka, M., Montelione, G. T. i Scheraga, H. A. (1984) *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 7959.
- Okorokov, A. L., Panov, K. I., te Poele, R. H., Breukelman, H. J., Furia, A., Karpeisky, M. Y. i Beintema, J. J. (1995) *Protein Expression Purif.* **6**, 472-480.
- Orr, N., Yavin, E., Shinitzky, M. i Lester, D. S. (1990) *Anal. Biochem.* **191**, 80-85.

- Pace, C. N. (1986) *Methods Enzymol.* **131**, 266-279.
- Pace, C. N. (1995) *Methods Enzymol.* **259**, 538-554.
- Pace, C. N., Grimsley, G. R., Thomas, S. T. i Makhatadze, G. I. (1999) *Protein Sci.* **8**, 1500-1504.
- Pace, C.N., Shirley, B.A., McNutt, M. i Gajiwala, K. (1996) *FASEB* **10**, 75-83.
- Pace, N. (1992) *J. Mol. Biol.* **226**, 29-35.
- Padrós, E., Duñach, M. i Sabés, M. (1984b) *Biochim. Biophys. Acta* **769**, 1-7.
- Padrós, E., Duñach, M., Morros, A., Sabés, M. i Mañosa, J. (1984a) *TIBS* 508-510.
- Panick, G., Vidugiris, G.J.A., Malessa, R., Rapp, G., Winter, R. i Royer, C.A. (1999) *Biochemistry* **38**, 4157-4164.
- Panov, K. I., Kolbanovskaya, E. Y., Okorokov, A. L., Panova, T. B., Terwisscha van Scheltinga, A. C., Karpeisky, M. Y. i Beintema, J. J. (1996) *FEBS Lett.* **398**, 57-60.
- Parés, X., de Llorens, R., Arús, C. i Cuchillo, C. M. (1980) *Eur. J. Biochem.* **105**, 571-579.
- Parés, X., Nogués, M. V., de Llorens, R. i Cuchillo, C. M. (1991) *Essays Biochem.* **24**, 89-103.
- Plummer, T. H., Jr. (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 6016-6024.
- Prehoda, K.E., Mooberry, E.S. i Markley, J.L. (1998) *Biochemistry* **37**, 5785-5790.
- Prieur, D., Erauso, G., Llanos, J., Deming, J. W. i Baros, J. (1992) "High Pressure and Biotechnology" (Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K. i Masson, P., Eds.). Colloque INSERM, Vol. **224**, pp. 19-23. John Libbey, Londres.
- Privalov, P. L., Tiktoupoulo, E. I., Venyaminov, S. Yu., Griko, Y. V. Makhatadze, G. I. i Khechinashvili, N. N. (1989) *J. Mol. Biol.* **205**, 737-750.
- Ptitsyn, O. B. (1992) "Protein Folding" (Creighton, T. E., Ed.). Pp. 243-300. Freeman, Nova York.
- Ptitsyn, O. B. (1995) "Trends in Biochemical Sciences" **20**, 376-379.
- Ptitsyn, O. B. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 74-78.
- Ptitsyn, O.B. (1994) *Protein Engineering* **7**, 593-596.
- Raines, R. T. (1991) "Metabolism and Enzymology of Nucleic Acids Including Gene and Protein Engineering" (Bazan, F. , Ed.). Pp. 47-53. Slovak Academy of Sciences, Bratislava.
- Raines, R. T. (1998). *Chem. Rev.* **98**, 1045-1065.
- Raines, R. T. i Rutter, W. J. (1989) "Structure and Chemistry of Ribonucleases: Proceedings of the First International Meeting" (Pavlovsky, A. G., Polyakov, K., Eds.). Pp. 95-100. Academy of Sciences, Moscow.

- Raleigh, D. P., Evans, P. A., Pitkeathly, M. i Dobson, C. M. (1992) *J. Mol. Biol.* **228**, 338-342.
- Regnard, P. (1887) *C. R. Seanc. Soc. Biol.* **39**, 265-269.
- Reichardt, C. (1990) VCH, Winheim. Pp. 295-319.
- Reinstädler, D., Fabian, H., Backmann, J. i Naumann, D. (1996) *Biochemistry* **35**, 15822-15830.
- Reynolds, J. A., Gilbert, D. B. i Tandford, C. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 2925.
- Richards, F. M. i Wyckoff, H. W. (1971) "The Enzymes" (P. D. Boyer, Ed.). Vol. **4**, pp 647-806. Academic Press, Nova York.
- Rico, M., Bermejo, F. J., Santoro, J., Nieto, J.L., Gallego, E., Herranz, J., Voskuyl-Holtkamp, I. i Schattenkerk, C. (1987) *Int. J. Pept. Propein Res.* **29**, 193-206.
- Rico, M., Bruiz, M., Santoro, J., González, C., Neira, J. L., Nieto, J.L. i Herranz, J. (1989) *Eur. J. Biochem.* **183**, 623-638.
- Rico, M., Nieto, J. L., Santoro, J., Bermejo, F. J., Herranz, J. i Gallego, E. (1983) *FEBS Lett.* **162**, 314-319.
- Rico, M., Santoro, J., Bermejo, F. J., Herranz, J., Nieto, J.L., Gallego, E. i Jiménez, M. A. (1986) *Biopolymers* **25**, 1031-1053.
- Rico, M., Santoro, J., González, C., Bruix, M., Neira, J. L., Nieto, J.L. i Herranz, J. (1991) *J. Biomol. NMR* **1**, 283-298.
- Rico, M., Santoro, J., González, C., Bruix, M., Neira, J. L., Nieto, J. L. (1993) *Appl. Magn. Reson.* **4**, 385-415.
- Robertson, A. D. i Baldwin, R. L. (1991) *Biochemistry* **30**, 9907-9914.
- Robertson, A. D., Purisima, E. O., Eastman, M. A. i Scheraga, H. A. (1989) *Biochemistry* **28**, 5930-5938.
- Robertson, A.D. i Baldwin, R.L. (1991) *Biochemistry* **30**, 9907-9914.
- Rodgers, K. K. i Sligar, S. G. (1991) *J. Mol. Biol.* **221**, 1453-1460.
- Roth, J. S. (1967) *Methods Cancer Res.* **3**, 153-242.
- Rothwarf, D. M. i Scheraga, H. A. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 6293-6294.
- Rothwarf, D. M. i Scheraga, H. A. (1993a) *Biochemistry* **32**, 2671-2679.
- Rothwarf, D. M. i Scheraga, H. A. (1993b) *Biochemistry* **32**, 2680-2689.
- Rothwarf, D. M. i Scheraga, H. A. (1993c) *Biochemistry* **32**, 2690-2697.
- Rothwarf, D. M. i Scheraga, H. A. (1993d) *Biochemistry* **32**, 2698-2703.
- Rothwarf, D. M., Li, Y.-J. i Scheraga, H. A. (1995) *Protein Sci.* **4**, 237-245.
- Rothwarf, D. M., Li, Y.-J. i Scheraga, H. A. (1998a) *Biochemistry* **37**, 3760-3766.
- Rothwarf, D. M., Li, Y.-J. i Scheraga, H. A. (1998b) *Biochemistry* **37**, 3767-3776.

5. Bibliografia

- Roussel, A. i Cambilleau, C. (1989) TURBO-FRODO. Pp. 77–79. Silicon Graphics, Mountain View, CA.
- Royer, C.A., Hinck, A.P., Loh, S.N., Prehoda, K.E., Peng, X., Jonas, J. i Markley, J.L. (1993) *Biochemistry* **32**, 5222-5232.
- Royer, C.A., Hinck, A.P., Loh, S.N., Prehoda, K.E., Peng, X., Jonas, J., and Markley, J.L. (1993) *Biochemistry* **32**, 5222-5232.
- Ruan, K., Lange, R., Bec, N. i Balny, C. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **239**, 150-154.
- Rubens, P (1999) Tesi Doctoral, Katholieke Universiteit Leuven.
- Rudd, P. M., Scragg, I. G., Coghill, E. C. i Dwek, R. A. (1992) *Glycoconjugate J.* **9**, 86-91.
- Rushizky, G. W., Knight, C. A. i Sober, H. A. (1961) *J. Biol. Chem.* **236**, 2732-2737.
- Sandberg, W. S. i Terwilliger, T. C. (1991a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1706-1710.
- Sandberg, W. S. i Terwilliger, T. C. (1991b) *Trends Biotechnol.* **9**, 59-63.
- Sanger, F. i Coulson, A. R. (1978) *FEBS Lett.* **87**, 107-110.
- Sanger, F., Nicklen, S. i Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Santoro, J., González, C., Bruix, M., Neira, J. L., Nieto, J. L., Herranz, J. i Rico, M. (1993) *J. Mol. Biol.* **229**, 722-734.
- Saunders, M., Wishnia, A. i Kirkwood, J. G. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3289-3290..
- Sayers, J. R. , Schmidt, W. i Eckstein, F. (1988) *Nucl. Acids Res.* **16**, 791-802.
- Schein, C. H., Boix, E., Haugg, M., Holliger, K. P., Hemmi, S., Frank, G. i Schwalbe, H. (1992) *Biochem. J.* **283**, 137-144.
- Scheraga, H. A., Konishi, Y. i Ooi, T. (1984) *Adv. Biophys.* **18**, 21-41.
- Schmid, F. X. (1982) *Eur. J. Biochem.* **128**, 77-80.
- Schmid, F. X. i Baldwin, R. L. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 4764-4768.
- Schmid, F. X. i Baldwin, R. L. (1979) *J. Mol. Biol.* **133**, 285-287.
- Schmid, F. X. i Blaschek, H. (1981) *Eur. J. Biochem.* **114**, 111-117.
- Schmid, F. X., Grafl, R., Wrba, A. i Beintema, J. J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 872-876.
- Schultz, D. A. i Baldwin, R. L. (1992) *Protein Sci.* **1**, 910-915.
- Sela, M. i Anfinsen, C. B. (1957) *Biochem. Biophys. Acta* **24**, 229.
- Sela, M., White, F. H. Jr. i Anfinsen, C. B. (1957) *Science* **125**, 691-692.

- Serrano, L., Kellis, J. T., Jr., Cann, P., Matouschek, A. i Fersht, A. R. (1992) *J. Mol. Biol.* **224**, 783-804.
- Seshadri, S., Oberg, K. A. i Fink, A. L. (1994) *Biochemistry* **33**, 1351-1355.
- Sharp, K. A., Nicholls, A., Friedman, R. i Honig, B. (1991) *Biochemistry* **30**, 9686-9697.
- Sherman, W. F. i Stadtmuller, A. A. (1987) “*Experimental Techniques in High-Pressure Research*”. John Willey & Sons, Nova York.
- Shimotakahara, S., Ríos, C. B., Laity, J. H., Zimmerman, D. E., Scheraga, H. A. i Montelione, G. T. (1997) *Biochemistry* **36**, 6915-6929.
- Shortle, D. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 10 5315-105318.
- Shortle, D. i Meeker, A. K. (1986) *Proteins* **1**, 81-89.
- Shortle, D., Stites, W. E. i Meeker, A. K. (1990) *Biochemistry* **29**, 8033-8041.
- Silva, J. L., Silveira, C. F., Corrier, A. i Pontes, L. (1992) *J. Mol. Biol.* **223**, 545-555.
- Silva, J. L. i Weber, G. (1993) *Annu. Rev. Phys. Chem.* **44**, 89-113.
- Silva, J.L., Miles, E.W. i Weber, G. (1986) *Biochemistry* **25**, 5780-5786.
- Silverman, D. N., Kotelchuck, D., Taylor, G. T. i Scheraga, H. A. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* **150**, 757-766.
- Smeller, L., Goossens, K. i Heremans, K. (1995) *Vibrat. Spectr.* **8**, 199-203.
- Smyth, D. G., Stein, W. H. i Moore, S. (1963) *J. Biol. Chem.* **238**, 227-234.
- Sorrentino, S. i Libonati, M. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **312**, 340-348.
- Sosnick, T.R. i Trehwella, J. (1992) *Biochemistry* **31**, 8329-8335.
- Stark, G. R., Stein, W. H. i Moore, S. (1960) *J. Biol. Chem.* **235**, 3177-3181.
- Stewart, D. E., Sarkar, A. i Wampler, J. E. (1990) *J. Mol. Biol.* **214**, 253-260.
- Stimson, E. R., Montelione, G. T., Meinwald, Y. C., Rudolph, R. K. E. i Scheraga, H. A. (1982) *Biochemistry* **21**, 5252-5262.
- Studier, F. W. i Moffatt, B. A. (1986) *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. i Dudendorff, J. W. (1990) *Methods Enzymology* **185**, 60-89.
- Surewicz, W. K., Mantsch, H. H. i Chapman, D. (1993) *Biochemistry* **32**, 389-394.
- Takano, K., Ogasahara, K., Kaneda, H., Yamagata, Y., Fujii, S., Kanaya, E., Kikuchi, M., Oobatake, M., Yutani, K. (1995) *J. Mol. Biol.* **254**, 62-76.
- Takeda, N., Kato, M. i Taniguchi, Y. (1995) *Biochemistry* **34**, 5980-5987.
- Talluri, S. i Scheraga, H.A. (1990) *Biochem.Biophys.Res.Communic.* **172**, 800-803.

- Talluri, S., Falcomer, C. M. i Scheraga, H. A. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 3041-3047.
- Talsky, G. (1994) *“Derivative Spectrophotometry; Low and High Order”*. VCH, Weinheim.
- Tamura, Y. i Gekko, K. (1995) *Biochemistry* **34**, 1878-1884.
- Tanford, C. (1980) *“The hydrophobic effect”*. Wiley & Sons, Nova York.
- Tarragona-Fiol, A., Taylorson, C. J., Ward, J. M. i Rabin, B. R. (1992) *Gene* **118**, 239-245.
- Taylor, J. W., Ott, J. i Eckstein, F. (1985) *Nucleic Acids Res.* **13**, 8764-8785.
- Torrent, J. (1996) Treball de Recerca, Universitat de Girona, Girona.
- Udgaonkar, J. B. i Baldwin, R. L. (1988) *Nature (Londres)* **335**, 694-699.
- Udgaonkar, J. B. i Baldwin, R. L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8197-8201.
- Udgaonkar, J. B., i Baldwin, R. L. (1995) *Biochemistry* **34**, 4088-4096.
- van Gunsteren, W. F. i Berendsen, H. J. C. (1991) Groningen Molecular Simulations (GROMOS), Biomos, The Netherlands.
- Vasanth, N. i Fipula, D. (1989) *Gene* **76**, 53-60.
- Vidugiris, G.J.A., Truckses, D.M., Markley, J.L. i Royer, C.A. (1996) *Biochemistry* **35**, 3857-3864.
- Vieira, J. i Messing, J. (1987) *Methods Enzymology* **153**, 3-11.
- Walkenhorst, W.F., Green, S.M. i Roder, H. (1997) *Biochemistry* **36**, 5795-5805.
- Wetlaufer, D. B. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 697-701.
- White, F. H. Jr. (1961) *J. Biol. Chem.* **236**, 1353-1360.
- White, F. H. Jr. i Anfinsen, C. B. (1959) *Ann. N. Y. Sci.* **81**, 515.
- Wigler, P. W. (1968) *Biochem. Prep.* **12**, 107.
- Wlodawer, A. (1985) *“Biological Macromolecules and Assemblies”*, Vol. **2**, pp 395-439. Nucleic Acids and Interactive Proteins, Jornak, F. A., McPherson, A., Eds. Wiley: Nova York.
- Wlodawer, A. i Sjölin, L. (1983) *Biochemistry* **22**, 2720-2728.
- Wlodawer, A., Svensson, L. A., Sjölin, L. i Gilliland, G. (1988) *Biochemistry* **27**, 2705-2717.
- Wlodawer, A., Svensson, L. A., Sjölin, L. i Gilliland, G. L. (1988) *Biochemistry* **27**, 2705-2717.
- Wong, P. T. T. i Heremans, K. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **956**, 1-9.
- Wong, P. T. T. i Moffat, D. J. (1989) *Appl. Spectrosc.* **43**, 1279-1281.
- Xia, T.H. (1992) Tesi Doctoral, ETH Zurich.

5. Bibliografia

- Xu, J., Baase, W. A., Baldwin, E. i Matthews, B. W. (1998) *Protein Sci.* **7**, 158-177.
- Xu, X., Rothwarf, D. M. i Scheraga, H. A. (1996) *Biochemistry* **35**, 6406-6417.
- Yamamoto, T. i Tasumi, M. (1991) *J. Mol. Struct.* **242**, 235-244.
- Yang, J.T., Wu, C.S. i Martínez, H.M. (1986) *Methods Enzymol.* **130**, 208-269.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. i Messing, J. (1985) *Gene* **33**, 103-119.
- Yutani, K., Ogasahara, K., Tsujita, T., i Sugino, Y. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 4441-4444.
- Zegers, I., Maes, D., Dao-Thi, M,-H., Poortmans, F., Palmer, R. i Wyns, L. (1994) *Protein Sci.* **3**, 2322-2339.
- Zhang, J., Peng, Z., Jonas, A. i Jonas, J. (1995) *Biochemistry* **34**, 8631-8641.
- Zimmerman, S. S. i Scheraga, H. A. (1976) *Macromolecules* **9**, 408-416.

APÈNDIX METODOLÒGIC

MATERIAL BIOLÒGIC	<ul style="list-style-type: none"> • Microorganismes A.1 • Vectors A.1 <ul style="list-style-type: none"> <i>Vectors de clonatge</i> A.1 <i>Vectors d'expressió</i> A.2
MÈTODES MICROBIOLÒGICS	<ul style="list-style-type: none"> • Medis de cultiu A.2 • Manteniment de les soques A.2 • Creixement de cultius A.3
MÈTODES DE TREBALL AMB DNA	<ul style="list-style-type: none"> • Obtenció de DNA dels vectors A.3 <ul style="list-style-type: none"> <i>Obtenció de DNA de vectors plasmídics</i> A.3 <i>Minipreparacions de DNA plasmídic</i> A.3 <i>Obtenció de DNA de vectors derivats d'M13</i> A.4 <i>Propagació del vector</i> A.4 <i>Obtenció d'RF DNA</i> A.4 <i>Obtenció d'ssDNA a petita escala</i> A.4 • Electroforesi de DNA en gels d'agarosa A.5 • Purificació de fragments de DNA A.5 • Concentració del DNA A.6 • Estimació de concentracions de DNA A.6 <ul style="list-style-type: none"> <i>Determinació espectrofotomètrica</i> A.7 <i>Estimació per electroforesi en gels d'agarosa</i> A.7 • Amplificació de DNA mitjançant PCR A.7 • Tractament amb enzims de restricció A.7 • Reacció de lligament amb la DNA ligasa de T4 A.8 • <i>Obtenció de cèl·lules d'E. coli competents</i> A.8 • Transformació de cèl·lules d'E.coli competents A.8 • Transformació de cèl·lules d'E.coli competents amb RFDNA de bacteriòfags A.9 • Mutagènesi dirigida per oligonucleòtid (SDM) A.9 <ul style="list-style-type: none"> <i>Disseny dels oligonucleòtids</i> A.9 <i>Mètode SDM per PCR</i> A.9 • Seqüenciació de DNA A.10
MÈTODES D'EXPRESSIONI DE PROTEÏNES RECOMBINANTS	<ul style="list-style-type: none"> • Condicions per a l'expressió en E. coli A.10 <ul style="list-style-type: none"> <i>Inoculació i creixement del cultiu</i> A.10 <i>Inducció del cultiu</i> A.11 • Obtenció de fraccions de cultius d'E. coli A.11
MÈTODES DE TREBALL AMB PROTEÏNES	<ul style="list-style-type: none"> • Obtenció de l'RNasa A salvatge d'origen natural A.11 • Purificació de les proteïnes recombinants A.11 <ul style="list-style-type: none"> <i>Procediment de purificació A</i> A.11 <i>Procediment de purificació B</i> A.12 <i>Emmagatzematge de la proteïna pura</i> A.13 • Determinació de la quantitat de proteïna A.13 <ul style="list-style-type: none"> <i>Mètode espectrofotomètric</i> A.13 <i>Mètode de Bradford</i> A.13 • Electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS A.13 • Determinació de l'activitat RNasa A.14 <ul style="list-style-type: none"> <i>Zimograma</i> A.14 <i>Determinacions espectrofotomètriques</i> A.15 • Modelatge de l'estructura terciària per ordinador ... A.15

Material i mètodes d'ús general

MATERIAL BIOLÒGIC

Microorganismes

Durant aquest treball s'han emprat les següents soques de l'espècie *Escherichia coli*, el genotip de les quals es troba detallat a la Taula 1:

E. coli TG1 (Gibson, 1984)

Aquesta soca, distribuïda per Amersham Ltd. (Anglaterra), ha estat utilitzada de manera general com a hoste dels vectors M13mp19, pUC119, pET22b(+) i dels seus respectius derivats que es van obtenir dels clonats precedents a l'expressió del gen. Es tracta d'una soca idònia per a la propagació i manipulació de vectors donat que creix molt bé en medis rics i presenta una elevada taxa de transformació genètica.

E. coli XL1-Blue (Stratagene Cloning Systems 1994 Catalog)

En determinades ocasions s'ha utilitzat aquesta soca com a substituta de la soca TG1 per les operacions bàsiques de clonatge en els vectors esmentats. Aquesta soca ha estat subministrada per Stratagene Ltd. (EUA).

E. coli BL21(DE3) (Studier i Moffatt, 1986)

Aquesta soca ha estat utilitzada per a l'expressió de les diferents construccions obtingudes a partir del vector pET22b(+). Ha estat facilitada per Novogene (EUA). Presenta la particularitat que en el gen int del genoma bacterià s'hi ha inserit el bacteriòfag DE3 (derivat del fag λ). Conseqüentment, el gen int bacterià resta inactivat. La inactivació del gen int fa que el bacteriòfag DE3 no es pugui escindir del genoma ni tornar-se a integrar, de manera que resta com a lisògen estable. El bacteriòfag DE3 porta un fragment de DNA que conté el promotor lacUV5, un fragment inicial del gen lacZ i el gen que codifica per l'RNA polimerasa de T7. En aquestes condicions, l'únic promotor capaç de conduir la transcripció de l'RNA polimerasa de T7 és el promotor lacUV5, el qual és induïble per isopropil- β -D-tiogalactopiranosid (IPTG). En afegir IPTG a un cultiu d'aquesta soca en fase de creixement, es transcriu l'RNA polimerasa de T7 que alhora transcriu el gen que ha estat clonat darrera del

promotor reconegut per aquesta polimerasa en el plasmidi pET22b(+).

TAULA 1

Característiques genotípiques de les soques utilitzades

E. coli TG1

supE hsdD5 thi D(lac-proAB)[F' traD36 proAB⁺ lacI^qZDM15]

E. coli XL1-Blue

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 [F' proAB lacI^qZDM15 Tn10 (Tet^r)] relA1 lac

E. coli BL21(DE3)

F' dcm ompT hsdS(r_B-m_B-) gal I(DE3)

Vectors

S'han utilitzat dues categories de vectors, per una banda els anomenats vectors de clonatge, emprats per a la manipulació del DNA fins arribar a obtenir les diferents construccions d'interès, i per altra banda, els vectors d'expressió, utilitzats per a la producció de les proteïnes.

VECTORS DE CLONATGE

M13mp19 (Yanisch-Perron i col., 1985)

És un vector de 7250 pb, derivat del bacteriòfag filamentós salvatge M13. Es caracteritza per tenir la seva informació genètica en el format de DNA de cadena doble (forma replicativa) mentre es troba a l'interior del bacteri infectat, i en el format de DNA de cadena senzilla quan està en forma de virió (ssDNA envoltat de proteïnes), ja a l'exterior de la cèl·lula bacteriana. M13mp19 conté, a més dels gens d'M13, un segment de l'operó lac d'*E. coli* que codifica per un fragment de l'extrem N-terminal de la β -galactosidasa (lacZ \square). Aquest fragment, la síntesi del qual pot ser induïda per IPTG, possibilita la complementació amb una forma defectiva de la β -galactosidasa codificada per una cèl·lula hoste adequada. Entre els codons que codifiquen per als 6è i 7è residu del polipèptid lacZ \square , hi ha un fragment amb diverses dianes de restricció úniques, de manera que qualsevol inserció en aquest fragment de clonatge múltiple és suficient per desfer la possibilitat de complementació. La soca d'*E. coli* que es va emprar com a hoste d'M13mp19 en aquest

treball fou la soca TG1, la qual és portadora d'una deleció de l'operó lac i dels gens veïns que són necessaris pel metabolisme de síntesi de la prolina. Aquesta deleció és parcialment complementada per un episoma F' que a més codifica pel fragment defectiu de la β -galactosidasa. Les soques amb aquestes característiques es cultiven en plaques de medi mínim com ara M9 (vegeu més endavant). Aquest medi de cultiu està mancat de prolina, la qual cosa assegura el manteniment de l'episoma F' i, per tant, que totes les cèl·lules conservin el pili sexual, el qual és indispensable per possibilitar la infecció pels fags M13mp19. Si es fa créixer sobre una placa d'LB una capa de cèl·lules confluents d'*E. coli* TG1 infectades per un bacteriòfag del tipus M13mp19 i, a més, s'hi afegeix al medi IPTG (inductor de l'operó lac) i X-gal (substrat cromogènic 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosidasa, el qual adquireix coloració blavosa en ésser processat per la β -galactosidasa), s'observa que les clapes de retard en el creixement produïdes per aquest bacteriòfag tenen coloració blavosa. En canvi, si l'esmentat M13mp19 porta un fragment clonat en el lloc de clonatge múltiple, aleshores s'impossibilita la complementació i les clapes de retard són blanquinoses. Aquesta estratègia permet diferenciar els clons M13 portadors d'un insert d'aquells que no en duen. Aquest vector ens permet obtenir DNA de cadena senzilla o monocadena (ssDNA) (+) de gran puresa que pot resultar útil com a motlle en processos de seqüenciació i/o mutagènesi dirigida.

pUC119 (Vieira i Messing, 1988)

És un vector derivat del pUC19. A diferència d'aquest, duu les seqüències necessàries per la iniciació, terminació i empaquetament del fag M13, raó per la qual també se l'anomena fagèmid. Gràcies a aquestes seqüències es pot obtenir també DNA de cadena senzilla. A més, els plasmidis de la família pUC són d'alt nombre de còpies (de 500 a 700 de mitjana per cèl·lula), fet que els fa molt interessants per l'obtenció de gran quantitat de DNA a fi de dur a terme clonats i altres manipulacions. Cal assenyalar que el lloc de clonatge múltiple (polycloning site) del pUC119 és idèntic al d'M13mp19, fet que facilita moltíssim el pas d'un fragment de DNA d'un vector a l'altre.

VECTORS D'EXPRESSIÓ

pET22b(+) (Studier i Moffat, 1986)

Presenta un promotor del tipus T7lac, la

qual cosa significa que està format per la fusió de l'operador lac i el promotor de la T7 RNA polimerasa. A més, el plasmidi codifica pel repressor lac (lacI) i és portador del gen de resistència a l'ampicil·lina. Quan aquest vector s'utilitza en lisògens del tipus DE3 per l'expressió dels gens forans, el repressor lac actua tant sobre el promotor lacUV5 de la soca hoste per reprimir la transcripció de l'RNA polimerasa de T7, com sobre el promotor de la T7 RNA polimerasa del plasmidi per bloquejar la transcripció del gen forà per qualsevulla RNA polimerasa de T7 que es pugui trobar. El sistema descrit serveix per regular l'expressió de la seqüència senyal pelB de 63 pb que codifica per un pèptid senyal d'exportació periplasmàtica. Darrera d'aquesta seqüència es poden inserir els gens forans a través de les dianes MscI i Sall, expressant-se la proteïna per la qual codifiquen fusionada al pèptid pelB. Aquest pèptid està dissenyat per exportar les proteïnes heteròlogues al periplasma de la cèl·lula bacteriana (Better i col., 1988).

El gen de l'RNasa A obtingut a partir d'una llibreria de cDNA de pàncrees de vaca es va lligar al vector d'expressió pET22b(+) a través de les dianes MscI i Sall. La construcció resultant es va anomenar pBXR (on BXR es refereix a Bacterial eXpression of RNase A). Aquesta construcció, cedida pel Dr. Ronald T. Raines del Departament de Bioquímica de la Universitat de Wisconsin-Madison (Wisconsin, EUA), es va utilitzar per transformar cèl·lules d'E. coli BL21(DE3).

MÈTODES MICROBIOLÒGICS

Sempre que es treballa en medis de cultiu cal prendre les màximes precaucions per evitar contaminacions. En aquests casos s'ha treballat sempre al costat d'una flama i dins d'una cabina de flux laminar, prèviament esterilitzada per exposició a la radiació ultraviolada.

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 s'exposen a continuació. Els medis líquids s'han conservat a temperatura ambient, mentre que els medis sòlids han estat guardats a 4°C en plaques de Petri. La bactotripton, l'extracte de llevat i l'agar han estat subministrats per Difco (Difco Laboratories, EUA).

Medi LB (1 litre)

Bactotripton	10 g
Extret de llevat	5 g
NaCl	10 g
Aigua destil·lada	1 L

Per a l'obtenció de medi sòlid per plaques de cultiu s'afegeixen 15 g d'agar (1.5% final). En la selecció de transformants β -galactosidasa negatius (experiments de clonatge en vectors derivats d'M13) es va utilitzar el que s'anomena agar tou o de cobriment, pel qual cal afegir 7 g d'agar (0.7% final). En tots els casos cal ajustar el pH a 7.5 amb NaOH i posteriorment s'esterilitza amb autoclau a 120°C durant 20 minuts.

El medi LB (Luria-Bertrani) és un medi ric d'ús general en biologia molecular. Durant aquest treball s'ha emprat pel cultiu de totes les soques per a l'obtenció i manipulació dels vectors.

Medi mínim M9 (1 litre)

Sals M9 (5x)	200 mL
MgSO ₄ 1 M	2 mL
CaCl ₂ 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 durant 20 minuts a 120°C a l'autoclau, tret de la solució de tiamina que s'esterilitza per filtració. Per a l'obtenció de medi sòlid per cultiu en placa, cal afegir 15 g d'agar (1.5% final).

SALS M9 5X (1 litre):

Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	32.3 g
KH ₂ PO ₄	15 g
NH ₄ Cl	5 g
NaCl	2.5 g
Aigua destil·lada	1 L

Un cop barrejades totes les sals s'ajusta el pH a 7.4 i s'esterilitza a l'autoclau durant 20 minuts a 120°C.

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

Medi TB (1 litre)

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. S'esterilitza tot per separat (sals, bactotripton amb extret de llevat, i glicerol) sotmetent-ho a 120°C durant 20 minuts a l'autoclau. Una vegada estèril, tots tres components es reuneixen per assolir les concentracions esmentades, mantenint les condicions d'esterilitat necessàries.

El medi TB (Terrific Broth) és un medi especialment ric que s'ha utilitzat per a l'expressió de les diferents proteïnes recombinants (salvatge i variants) en cultius d'E. coli BL21(DE3).

ADDICIÓ D'ANTIBIÒTICS AL MEDI DE CULTIU

Quan es treballa amb soques transformades amb vectors, els medis de cultiu s'han de suplementar amb els antibiòtics pels quals el vector confereix resistència. D'aquesta manera creixen només les cèl·lules portadores del vector i la soca no perd la informació genètica. Per suplementar els medis, s'ha partit sempre d'una solució mare d'antibiòtic (solució d'emmagatzematge), preparada per separat i de manera estèril.

Durant aquest treball s'ha utilitzat únicament l'antibiòtic ampicil·lina (Ap), i la solució d'emmagatzematge ha estat sempre de 25 mg/mL en aigua destil·lada. Una vegada preparada aquesta solució, s'esterilitza per filtració (0,22 μ m de diàmetre de porus) i es guarda aliquotada a -20°C. Per al seu ús, la solució mare es descongela en gel picat, i s'addiciona al medi en condicions estèrils. Una vegada descongelada, aquesta solució mare es conserva durant aproximadament una setmana si es manté a 4°C. La concentració de treball d'ampicil·lina en els diferents medis de cultiu ha estat de 50 μ g/mL o bé de 400 μ g/mL.

Si cal suplementar un medi sòlid (en placa), l'antibiòtic s'afegeix quan el medi ja s'ha refredat prou, just abans de dispensar-lo a les plaques. Aquestes plaques es poden mantenir en condicions òptimes durant uns dies a 4°C, però si l'emmagatzematge es perllonga massa, és recomanable tornar a suplementar les plaques amb l'antibiòtic abans del seu ús.

Manteniment de les soques

Per al manteniment a curt termini (des d'uns dies fins a tres mesos) de les soques d'E. coli esmentades anteriorment, portadores de plasmidis o no, es van sembrar en plaques de Petri amb el medi adequat i es van guardar a 4°C en posició invertida. Per al seu manteniment a llarg termini es van guardar en forma de glicerinat a -80°C. El procés que es va seguir per a l'obtenció d'un glicerinat va ser el següent:

1. Inocular una colònia de la soca desitjada en 3 mL del medi de cultiu adequat.
2. Incubar a 37°C en agitació (250 r.p.m.) entre 12 i 18 hores.
3. Prendre una al·lquota de 1 mL del cultiu, transferir-la a un tub Eppendorf estèril i afegir 0.315 mL d'una solució de glicerol 80% esterilitzada a l'autoclau (20% final).
4. Mesclar invertint el tub Eppendorf i des

a -80°C.

Per inocular un cultiu a partir d'un d'aquests estocs congelats, es toca amb una nansa de Kolle, esterilitzada a la flama, la superfície del glicerinat (superficialment descongelat) i es realitza una estria en medi sòlid. Posteriorment se selecciona una colònia i s'inocula en un nou medi líquid. El glicerinat es retorna al congelador sense que s'hagi deixat descongelar completament.

Creixement dels cultius

Per als cultius líquids s'han aplicat les normes generals següents:

- S'ha intentat sempre que el volum de medi de cultiu fos com a màxim 1/5 part del volum total del flascó.
- Els cultius de menys de 4 mL s'han preparat sempre a partir d'una colònia única. Pels cultius de volum superior sempre s'ha fet créixer abans un pre-inòcul de volum adequat, per després afegir-lo al medi de cultiu amb una proporció 1:100 (inòcul:medi)
- La temperatura de creixement per als cultius ha estat sempre de 37°C.
- Tots els cultius líquids s'han incubat en agitació, al voltant de 250 r.p.m.
- El temps d'incubació ha estat sempre d'entre 12 i 15 hores. Incubacions més llargues són desaconsellables pel fet que poden aparèixer 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.

Per als cultius en placa de Petri, les condicions han estat la incubació a 37°C fins a l'aparició de colònies clares sense colònies satèl·lit. Les colònies satèl·lit apareixen després de períodes perllongats d'incubació, i es promouen per la degradació de l'antibiòtic al voltant de les colònies que són realment portadores del vector.

MÈTODES DE TREBALL AMB DNA

Cal fer esment de l'esterilitat del material i la cura de l'operador, per tal d'evitar la contaminació amb nucleases o amb altres vectors. Així, cal esterilitzar per autoclau les puntes de pipeta, els tubs Eppendorf i qualsevol material que hagi de tenir un contacte directe amb el DNA. Pel mateix

motiu, també s'han de sotmetre a l'autoclau totes les solucions que han de prendre contacte amb el DNA, i sovint és aconsellable l'ús de quelants d'ions divalents (com l'EDTA) que impossibilitin l'acció de nucleases. Així mateix, és molt recomanable manipular el material amb guants de làtex.

Obtenció de DNA dels vectors

OBTENCIÓ DE DNA DE VECTORS PLASMÍDICS

Minipreparacions de DNA plasmídic

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

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 minuts i s'emmagatzema a 4°C.

Solució II: NaOH 0.2 N, Dodecil sulfat sòdic (SDS) 1%. Cal preparar aquesta solució immediatament abans d'emprar-la, per la qual cosa es parteix d'una solució NaOH 2 N i d'una solució SDS 10%. Aquestes solucions no han d'estar de manera imprescindible esterilitzades en l'autoclau i es poden tenir a temperatura ambient.

Solució III: 60 mL d'acetat potàssic 5 M; 11,5 mL d'àcid acètic glacial; 28,5 mL d'aigua milli-Q. La solució resultant es 3 M respecte el potassi i 5 M respecte l'acetat. Se sotmet a l'autoclau durant 20 minuts a 120°C i es desa a 4°C.

Solució fenol:cloroform:alcohol isoamílic (25:24:1): S'ha partit de fenol preparat comercialment, a pH 8,0, i guardat protegit de la llum a 4°C. Es barregen 25 volums de fenol, amb 24 volums de cloroform i amb 1 volum d'alcohol isoamílic. El fenol és altament tòxic, i per tant, és molt recomanable manipular-lo a dins d'una campana de gasos.

Solució cloroform:alcohol isoamílic (24:1): Es barregen 24 volums de cloroform amb 1 volum d'alcohol isoamílic.

PROCEDIMENT

1. Inocular una colònia de la soca desitjada, que ha estat prèviament transformada i sembrada en placa, en 3-5 mL d'LB amb

l'antibiòtic adequat. Incubar entre 12 i 15 hores a 37°C amb agitació suau a 250 r.p.m.

2. Distribuir el cultiu en tubs Eppendorf, en alíquotes de 1.5 mL. Centrifugar a 12000 xg durant 5 minuts en una centrífuga de taula. Alternativament es poden realitzar diverses centrifugacions d'un mateix cultiu en un mateix tub, per tal d'acumular el vector en una única mostra (fins a un màxim de 10 mL).
3. Eliminar el sobrenedant per aspiració i deixar el sediment format per les cèl·lules bacterianes el més sec possible.
4. Resuspèndre el sediment en 100 µL de solució I amb una micropipeta o bé agitant vigorosament en vòrtex. Mantenir 5 minuts en gel picat.
5. Afegir 200 µL de solució II acabada de preparar. Barrejar les fases que es formen invertint el tub ràpidament diverses vegades. És molt important no agitar amb el vòrtex. Mantenir en gel 5 minuts.
6. Afegir 150 µL de la solució III refredada a 4°C. Agitar amb vòrtex durant 20-30 segons. Mantenir el tub en gel durant 5 minuts.
7. Centrifugar a 12000 xg (en minifuga) durant 15 minuts per aconseguir la formació d'un sediment sòlid. El sobrenedant, on es troba dissolt la major part del DNA plasmídic, es transfereix a un nou tub estèril, anant amb compte de no arrossegar part del sediment.
8. Afegir un volum igual de fenol:cloroform:alcohol isoamílic (25:24:1). Barrejar agitant en vòrtex fins a formar una emulsió i centrifugar a 12000 xg durant 2 minuts. Transferir la fase aquosa (superior) a un nou tub estèril.
9. Afegir-hi un volum igual de cloroform:alcohol isoamílic (24:1). Barrejar agitant amb vòrtex per a formar una emulsió. Centrifugar a 12000 xg en minifuga durant 30 segons. Transferir la fase aquosa (superior) a un nou tub estèril.
10. Precipitar el DNA plasmídic afegint-hi 2.5 volums d'etanol fred (-20°C). Mesclar invertint el tub diverses vegades. Mantenir el tub durant 30 minuts a -85°C.
11. Centrifugar a 12000 xg durant 10 minuts.
12. Eliminar el sobrenedant per aspiració.
13. Afegir-hi 1 mL d'etanol 70% refredat prèviament a -20°C. Decantar 2-3 vegades el tub.
14. Centrifugar a 12000 xg durant 5 minuts.
15. Eliminar el sobrenedant. Tornar a centrifugar a 12000 xg en minifuga durant 5-10 segons per concentrar les restes de líquid. Eliminar-les per aspiració utilitzant la punta d'una pipeta Pasteur.
16. Deixar assecar el sediment posant el tub invertit sobre un paper net en la taula i deixar assecar durant 5-10 minuts.
17. La resuspensió del sediment es fa en volums variables (10-50 µL) d'aigua milli-Q prèviament esterilitzada a l'autoclau. Es pot escalfar 10 minuts a 70°C per tal d'eliminar possibles restes

de nucleases, i alhora facilitar la resuspensió del sediment. Si no està previst fer-ne un ús immediat és millor guardar el DNA a -20°C.

De manera opcional, es pot resuspendre el sediment amb una solució d'RNasa a una concentració de 0.1 mg/mL, per tal d'eliminar les restes d'RNA que inevitablement s'ha purificat juntament amb el DNA plasmídic.

El DNA que s'ha obtingut per aquest procediment pot ésser emprat per a transformacions i digestions amb enzims de restricció. A més, el DNA obtingut es manté estable durant mesos a -20°C. És altament recomanable desar congelat el DNA plasmídic de les construccions més importants com a mesura de seguretat, per si es malmet alguna de les soques portadores dels mateixos plasmidis que es guarden en forma de glicerinat.

OBTENCIÓ DE DNA DE VECTORS DERIVATS D'M13

Propagació del vector

La propagació del vector M13mp19 tant en cultiu líquid com en placa requereix condicions sensiblement diferents a les dels altres vectors utilitzats en aquest treball. Tot seguit s'indiquen els procediments utilitzats per a la propagació d'aquest vector, tant en placa com en cultiu líquid.

CULTIU EN PLACA

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

1. Es fa créixer un cultiu de nit de 5 mL d'LB inoculat a partir d'una colònia de d'E. coli TG1 crescuda en plaques de medi M9.
2. S'escalfa fins a fondre l'agar tou o de cobriment prèviament preparat i esterilitzat. Es distribueixen 3.5 mL d'aquest agar tou en una sèrie de tubs estèrils (tants com transfeccions es vulguin fer) i es guarden en un bloc tèrmic a 47°C per evitar la solidificació de l'agar.
3. En cada tub s'afegeixen:
 - 20 µL IPTG 20 mg/mL (en aigua Milli-Q)
 - 20 µL X-gal 20 mg/mL (en dimetilformamida)
 - 150 µL Cultiu de nit d' E. coli TG1
 - Un volum variable de dissolució que conté el bacteriòfag. Tant pot ser una mescla de transformació de la soca hoste amb RF DNA com una dilució d'una dissolució de partícules fàgiques.

La dissolució d'IPTG es prepara dissolent 200 mg d'IPTG en 7-8 mL d'aigua Milli-Q, ajustant-ho a 10 mL un cop dissolt i esterilitzant-la per filtració. Aquesta

solució es pot guardar aliquidada i congelada a -20°C. No és recomanable conservar-la massa temps d'aquesta manera ja que l'IPTG es força inestable en dissolució.

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

4. Barrejar suauement, però sense entretenir-se, i abocar sobre una placa d'LB-1.5% agar temperada prèviament. Es fa girar la placa suauement per aconseguir una distribució uniforme de l'agar de cobriment.
5. Deixar reposar les plaques uns minuts a temperatura ambient, fins que l'agar solidifiqui. Incubar les plaques a 37°C en posició invertida. A partir de les 8-12 hores les clapes provocades pel fag han de ser sensiblement visibles. Cada clapa aïllada deriva d'una única molècula de DNA víric inicial.

CULTIU LÍQUID

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

1. Fer créixer durant la nit anterior un cultiu de 3 mL d'LB inoculat a partir d'una colònia d'E. coli TG1 crescuda en plaques de M9.
2. Barrejar en un tub estèril 3 mL de medi LB líquid i afegir-hi 30 µL (1:100) del cultiu de nit d'E. coli TG1. Amb un escuradents estèril tocar la superfície de la clapa que es vulgui cultivar o afegir 30 µL de la solució de partícules fàgiques.
3. Aquesta barreja es deixa créixer incubant-la a 37°C amb agitació. Per tal de minimitzar la possibilitat de delecions espontànies en el DNA del fag és convenient no deixar-ho créixer més de 5 hores.
4. Passat aquest temps el cultiu es distribueix de forma estèril en tubs Eppendorf en alíquotes de 1.5 mL. Centrifugar en minifuga 10 minuts a 12000 xg.
5. Retirar estèrilment el sobrenedant a nous tubs Eppendorf amb cura de no arrossegar el sediment que conté les cèl·lules. Aquest sediment es pot emprar per extreure'n l'RF DNA del fag.
6. El sediment es torna a centrifugar 10 minuts a 12000 xg i es passa novament el sobrenedant a altres tubs Eppendorf de forma estèril. La solució de virions que s'ha obtingut d'aquesta manera pot

guardar-se indefinidament a -20°C sense perdre la capacitat d'infecció, o bé pot servir per obtenir-ne l'ssDNA del fag.

A partir d'un cultiu líquid és possible obtenir tant la forma de doble cadena com la forma de cadena senzilla

Les partícules fàgiques d'M13 i els seus derivats són bastant resistents a les condicions ambientals i poden dispersar-se fàcilment. Per això és convenient, quan es treballa amb aquest tipus de bacteriòfags, prendre el màxim de mesures de precaució per tal d'evitar els riscos de contaminació.

Obtenció d'RF DNA

L'obtenció de la forma replicativa o RF (de doble cadena) del DNA dels vectors derivats d'M13 és molt semblant a l'obtenció de DNA plasmídic. S'estableix un cultiu líquid del clon d'M13mp19 desitjat i se centrifuga durant 10 minuts a 12000 xg per tal d'obtenir-ne el sediment cel·lular. L'RF DNA del fag s'extreu seguint el protocol de lisi alcalina descrit prèviament. Donat que la densitat dels cultius portadors d'M13mp19 sol ser inferior a la de cultius de cèl·lules transformades amb pUC119 o pET22b(+), convé acumular el sediment d'un volum superior de cultiu.

Obtenció d'ssDNA a petita escala

Per a l'obtenció de DNA de cadena senzilla dels bacteriòfags amb la finalitat de seqüenciar-lo es fa servir el protocol que es descriu a continuació, el qual es basa en precipitar els virions amb polietilenglicol (PEG) i el posterior alliberament del DNA de la seva capsula proteica mitjançant fenol. Cal assenyalar que aquest protocol es pot escalar per tal d'obtenir quantitats més grans d'ssDNA d'aquest bacteriòfag, necessari en determinats protocols de mutagènesi dirigida.

Solució TE (Tris-EDTA): La seva composició és Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM. Per preparar-la 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, per després esterilitzar-la per autoclau.

1. Establir un cultiu líquid del clon d'M13mp19 desitjat i centrifugar-lo dues vegades durant 10 minuts a 12000 xg per tal d'obtenir la solució de virions lliure de cèl·lules.
2. Prendre 1.2 mL d'aquesta solució i afegir-hi 0.3 mL de la solució de PEG8000 al 20%, NaCl 2.5 M. Barrejar-ho bé per inversió del tub. La solució PEG i NaCl s'esterilitza per filtració i es pot guardar a temperatura ambient.
3. Deixar reposar durant 30 minuts a temperatura ambient.
4. Centrifugar durant 15 minuts a 12000 xg. Retirar i descartar el sobrenedant en

el qual hi romandran aquelles partícules fàgiques que no hagin precipitat.

5. Tornar a centrifugar durant 2 minuts i eliminar tot el sobrenedant amb una pipeta Pasteur. Un cop eliminat tot el sobrenedant, ha de fer-se visible un petit sediment de virions. En cas que això no sigui així, no és necessari continuar amb el procés d'extracció.
6. Addicionar 100 µL de TE i resuspendre el sediment mitjançant agitació vigorosa en vòrtex.
7. Afegir 50 µL de fenol amortit. Barrejar amb vòrtex durant 15-30 segons. De manera opcional, es pot mantenir a temperatura ambient durant 10 minuts i barrejar novament amb vòrtex 15-30 segons.
8. Centrifugar en minifuga a 12000 xg durant 5 minuts. Transferir la fase aquosa a un nou tub.
9. Afegir a la fase aquosa 50 µL de cloroform. Barrejar amb vòrtex.
10. Centrifugar en minifuga a 12000 xg durant 5 minuts. Transferir la fase aquosa a un nou tub.
11. A continuació cal precipitar l'ssDNA per tal de concentrar-lo, per la qual cosa s'afegeix 0.1 volums d'acetat sòdic 3 M (pH 5.5-6.0) i 2.5 volums d'etanol absolut fred. Mantenir a -70°C com a mínim 1 hora o bé alternativament durant tota la nit a -20°C.
12. Centrifugar en minifuga 15 minuts a 12000 xg, preferentment a 4°C.
13. Rentar el precipitat amb 1 mL d'etanol absolut fred. Sovint aquest sediment no és visible.
14. Assecar el sediment i resuspendre'l en TE. De forma rutinària es va resuspendre en un volum de 22 µL dels quals 2 µL foren carregats en un gel d'agarosa al 0.8% amb bromur d'etidi.
Si l'extracció ha funcionat correctament, s'ha d'apreciar una clara banda corresponent a l'ssDNA. És aconsellable quan es fa aquesta extracció, treballar de forma simultània amb un clon del vector original el qual pot ésser emprat com a marcador de massa molecular en el gel d'electroforesi.

Aquest protocol permet obtenir entre 5-10 µg d'ssDNA per mL de cultiu original, i pot utilitzar-se directament per les reaccions de seqüenciació.

Electroforesi de DNA en gel d'agarosa

Aquesta tècnica, s'ha utilitzat per analitzar preparacions de DNA plasmídic, productes de digestió amb enzims de restricció i productes de PCR, a banda de ser l'etapa preliminar per a la purificació del DNA i un mètode excel·lent d'estimació de la

concentració de DNA.

Per a la preparació dels gels s'ha utilitzat agarosa de baixa electroendòsmosi (Ecogen, Espanya) i els equips MT-1001 i MT-1002 d'Ecogen. Pel que fa al percentatge d'agarosa per a la preparació del gel, ha oscil·lat sempre entre un 0.8% i un 1.4%, depenent de la longitud dels fragments que es volien separar (percentatges elevats per a fragments més petits). El procés dut a terme ha estat el que es detalla a continuació.

SOLUCIONS NECESSÀRIES

Amortidor TAE 50x (1 litre):

Tris-base	242 g
Àcid acètic glacial	157.1 mL
EDTA	18.6 g
Aigua destil·lada	fins a 1 litre

No és necessari ajustar el pH.

La solució de treball (1x) té la composició final següent: Tris-acetat 40 mM, EDTA 2 mM (pH 8.0).

Amortidor de càrrega 10x (100 mL):

Ficoll-400	15 g
Blau de bromofenol	250 mg
Xilen cianol	250 mg
Aigua milli-Q	fins a 100 mL

La concentració final és 15% Ficoll-400, 0.25% BPB i 0.25% XC.

PROCEDIMENT

1. Pesar la quantitat necessària d'agarosa d'acord amb el percentatge final desitjat del gel i ficar-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 i, si s'escau, el bromur d'etidi, a una concentració final de 0,5 µg/mL. Mesclar bé i esperar fins que la temperatura sigui inferior als 50°C abans d'abocar-ho en el motllo. En aquest procés d'abocar l'agarosa, prèviament al qual haurem col·locat la pinta per la formació de les butxaques, cal anar en compte que no es formin bombolles que podrien interferir en el posterior corriments de les mostres.
4. Un cop abocat es deixa gelificar l'agarosa, procés que pren més temps com menor sigui el percentatge del gel. Mentre està gelificant es prepara l'amortidor d'elució diluint l'amortidor concentrat utilitzat en la preparació del gel i afegint si s'escau, bromur d'etidi.

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

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

CARREGA DEL GEL I CONDICIONS D'ELECTROFORESI:

1. Afegir a les mostres que es volen carregar 1/10 (v/v) d'amortidor de càrrega x10. De manera opcional, les mostres es poden escalfar a 65°C durant 10 minuts refredant-les a continuació en gel picat.
2. Aplicar les mostres en les butxaques. Juntament amb les mostres s'han carregat els marcadors de massa molecular adequats, segons els requeriments de cada cas. Aquests se subministren dissolts sense amortidor de càrrega, per la qual cosa es diluïren en un volum igual d'amortidor de càrrega i 8 volums d'aigua milli-Q. De la dissolució resultant se n'aplicaren 10 µL.
3. Per a l'electroforesi s'utilitzà un voltatge de 80-100 V. L'electroforesi es va prolongar fins que el primer colorant (BPB) assoleix els 3/4 del recorregut del gel.
4. La tinció dels àcids nucleics s'ha dut a terme emprant bromur d'etidi, de dues maneres diferents. En el primer cas s'ha afegit directament a l'agarosa, abans d'abocar-la al motllo, bromur d'etidi 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.
El procediment alternatiu consisteix en submergir el gel durant 15-30 minuts en 200 mL de bromur d'etidi 0.5 µg/mL en el mateix amortidor d'electroforesi. A continuació per eliminar l'excés de bromur d'etidi se submergeix el gel durant 15-30 minuts en 200 mL d'aigua destil·lada.
5. Els gels situats sobre un transil·luminador 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'utilitzà una obertura de diafragma de 5.6 i un temps d'exposició de 8 segons.

Purificació de fragments de DNA

L'aïllament i purificació d'un fragment de DNA de doble cadena lineal, provinent de la digestió d'un vector amb enzims de restricció, esdevé un pas imprescindible per a moltes manipulacions posteriors com ara digestions amb altres enzims de restricció i lligaments. La purificació de DNA ha estat també necessària per obtenir 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 plasmidi. Depenent de la longitud dels fragments de DNA a purificar, s'ha optat pel sistema GENE CLEAN (BIO101 Inc., EUA) o bé pel MERmaid (BIO101 Inc., EUA).

PURIFICACIÓ DE FRAGMENTES DE DNA DE MÉS DE 200 PB: GENE CLEAN

El GENE CLEAN és un sistema per purificar dsDNA o ssDNA amb una longitud superior a 200 pb, ja sigui a partir d'un gel d'agarosa, o bé directament de la solució en la que es troba. A més, tal i com es comentarà més endavant, també és un mètode vàlid per a la concentració del DNA, donat que es tracta d'un procés ràpid i senzill amb un percentatge de recuperació de DNA prou acceptable. Aquest mètode es va utilitzar també per a la purificació de DNA en solució quan es duen a terme digestions dobles en què 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 que es detalla a continuació a partir del punt 7).

1. Carregar les mostres en un gel d'agarosa utilitzant TAE com a amortidor d'elució de l'electroforesi.
2. Es tenyeix el gel amb bromur d'etidi.
3. Il·luminar el gel amb llum ultraviolada d'ona llarga i un cop localitzada la banda d'interès, retallar-la amb una ganiveta estèril i introduir-la en un tub Eppendorf que prèviament s'haurà pesat. S'ha de procurar agafar la menor quantitat d'agarosa innecessària i evitar temps d'exposició massa llargs del DNA a la llum ultraviolada.
4. Tornar a pesar l'Eppendorf que conté la banda i afegir-hi 3 mL de la solució saturada de NaI per a cada g de banda d'agarosa.
5. Submergir l'Eppendorf en un bany escalfat anteriorment a 55°C, fins que tota l'agarosa es fongui (8-10 minuts).
6. Per recomanació de la casa comercial és aconsellable, afegir 10 µL d'una solució al 10% (v/v) d'àcid acètic glacial un cop l'agarosa està fosa, quan es volen eluir fragments de DNA amb longituds compreses entre els 250 i 500 pb. Aquest fet millora el rendiment d'unió del fragment de DNA a les boles de vidre.
7. Afegir a continuació 4 µL de solució de la suspensió de boles de vidre. Agitar en vòrtex uns segons i tot seguit incubar en gel picat durant 5 minuts, agitant en vòrtex cada 1-2 minuts.
8. Centrifugar 5 segons a 12000 xg en minifuga. Descartar el sobrenedant per aspiració amb una pipeta Pasteur.
9. A continuació es renta 3 cops el precipitat amb 0.6 mL de la solució

alcohòlica que haurà estat guardada en gel durant tot el procés. En cada rentat resuspendre el precipitat pipetejant amunt i avall per a seguidament centrifugar durant 5 segons en minifuga i descartar el sobrenedant.

10. Després del tercer rentat afegir al sediment 10-20 µL d'aigua milli-Q esterilitzada en autoclau. Resuspendre amb cura amb una pipeta automàtica i incubar a 55°C durant 2-3 minuts. No és aconsellable agitar en vòrtex, perquè el sediment es pot distribuir per la paret, la qual cosa fa la seva recuperació molt difícil degut al petit volum que es manipula.
11. Centrifugar durant 2-3 minuts en minifuga a 12000 xg. El sobrenedant on es troba el DNA es transvasa a un nou tub Eppendorf estèril.
12. De manera opcional, es poden repetir els punts 10 i 11.

PURIFICACIÓ DE FRAGMENTES DE DNA DE MENYS DE 200 PB: MERMAID

El MERmaid és un sistema de purificació de fragments de DNA de baix pes molecular (entre 10 i 200 pb), tant de cadena senzilla com de cadena doble. De la mateixa manera que el GENE CLEAN, es pot partir tant de DNA en solució com de DNA contingut en un fragment d'agarosa. En aquest treball s'ha utilitzat per a la purificació, a partir de gel d'agarosa, de fragments de DNA resultants d'una amplificació per PCR que no assolien els 200 pb. El procediment a seguir s'indica tot seguit:

1. Mesurar el volum de la solució on es troba el DNA, o bé el pes del fragment d'agarosa on es troba el DNA. Afegir-hi tres volums de solució salina (High Salt Binding Solution), o 3 mL d'aquesta solució per gram d'agarosa. Si es vol purificar DNA a partir d'agarosa, cal dissoldre-la completament per agitació al vòrtex un cop s'hi ha afegit la solució salina.
2. Agitar amb el vòrtex el tub que conté la solució de boles de vidre "GLASSFOG" durant una estona per tal que totes les boles es resuspendin. Dispensar-ne 8 µL per cada µg de DNA al tub on aquest es troba dissolt.
3. Incubar a temperatura ambient durant 5-15 minuts. Durant aquest període d'unió del DNA a les boles de vidre, és interessant que es dugui a terme una agitació constant del tub, mitjançant un vòrtex. D'aquesta manera s'aconsegueix una major eficiència d'unió de fragments curts de DNA.
4. Centrifugar en una microcentrífuga a 12000 xg durant uns segons per acumular les boles de vidre al sol del tub, i descartar completament el sobrenedant. És important assegurar-se que no queden

restes d'agarosa si el vol purificar el DNA a partir d'un gel.

5. Afegir 300 µL d'ETHANOL WASH i resuspendre el precipitat format per les boles de vidre amb l'ajut d'un vòrtex. Aquest rentat elimina les sals i altres compostos que podrien inhibir alguns enzims.
6. Centrifugar breument a 12000 xg per descartar el sobrenedant, i repetir el rentat amb ETHANOL WASH dues vegades més. Després del darrer rentat, centrifugar el tub durant uns segons per tal de poder eliminar la totalitat del líquid restant amb l'ajut d'una micropipeta
7. Resuspendre el precipitat amb un volum petit d'aigua (5-20 µL) i incubar a 45-55°C durant 5 minuts per tal que el DNA s'elueixi de les boles de vidre.
8. Centrifugar durant 3 minuts a 12000 xg i transferir el sobrenedant, que ja conté el DNA, a un nou tub. Opcionalment, i per aconseguir un major rendiment, es pot repetir l'elució una vegada i ajuntar totes dues elucions en un mateix tub.

Concentració del DNA

Per a la concentració del DNA s'han utilitzat al llarg d'aquest treball diversos procediments. En primer lloc, es pot optar per un GENE CLEAN, tot resuspendent a l'etapa final amb un volum inferior a l'inicial. Un segon mètode és la precipitació del DNA, prèvia extracció amb fenol o cloroform, afegint 0,1 volums d'acetat sòdic 3 M i 2 volums d'etanol, per al final resuspendre amb un petit volum d'aigua Milli-Q. En determinades ocasions, com després d'una amplificació per PCR, en el moment de la precipitació s'ha utilitzat l'acrilàmida com a carrier dels fragments de DNA (detallat més endavant). També s'ha concentrat DNA sotmetent-lo a rotovapor o Speed-Vac, connectat a una bomba de buit a fi de reduir el volum de la mostra que contenia el DNA.

Estimació de concentracions de DNA

Per a fer una estimació de la quantitat de DNA present en una dissolució, s'han emprat dos sistemes: la determinació espectrofotomètrica i l'estimació per electroforesi en gel.

DETERMINACIÓ

ESPECTROFOTOMÈTRICA

Aquest mètode és senzill i ràpid i consisteix en mesurar l'absorbància a 260 nm de la

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

ESTIMACIÓ PER ELECTROFORESI EN GELS D'AGAROSA

Sovint els volums de les dissolucions de DNA purificat són massa petits o aquestes estan massa diluïdes i es fa difícil estimar la seva concentració per espectrofotometria. En les reaccions de lligament de fragments de DNA lineal de doble cadena és molt pràctic l'estimació de la concentració a partir d'electroforesi en gel d'agarosa. Per dur a terme aquest tipus d'estimació cal prèviament realitzar una electroforesi analítica, per una banda de la dissolució de DNA de la qual es vol fer l'estimació de concentració i per l'altra de marcadors de massa molecular adequats. Atès que es pot calcular quina quantitat de DNA hi ha en cada una de les bandes dels marcadors, es pot inferir la quantitat de DNA present en la banda de la dissolució problema, tenint en compte el volum aplicat, per comparació de la seva intensitat amb la de les bandes dels marcadors més propers.

Amplificació de DNA mitjançant PCR

La reacció en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction o PCR) és un mètode ràpid per a l'amplificació enzimàtica in vitro de fragments específics de DNA (Mullis i col., 1986).

Durant aquest treball, la PCR ha estat utilitzada en determinades ocasions per a l'amplificació de les diferents construccions gèniques clonades en M13mp19 o en pUC119, utilitzant com a encebadors el Forward Universal Primer (FUP) i Reverse Universal Primer (RUP), que reconeixen zones situades als extrems de la zona de clonatge múltiple (polycloning site), idèntica en ambdós vectors. A banda de l'amplificació com a tal, 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 per una descripció general del procés seguit normalment, vegeu la descripció següent:

PROCÉS GENERAL PER A UNA PCR

Durant aquest treball s'han hagut d'amplificar per PCR fragments de DNA, generalment insertats als plasmidis de clonatge M13mp19 o pUC119, pels quals es disposava de dos primers molt específics (FUP i RUP). El procés dut a terme ha estat sempre el següent:

BARREJA DE REACCIÓ:

Vent Buffer (x10)	10 µL
dNTPs 10 mM (0.2 mM final)	2 µL
dsDNA motlle (~50 ng)	10 µL
• M13mp19+insert	
• pUC119+insert	
Primer univ. FUP (20 pmol)	5 µL
Primer univ. RUP (20 pmol)	5 µL
Aigua Milli-Q estèril	68 µL
Deep Vent DNA Pol. (1 U)	0.5 µL
Oli mineral	40 µL

PROGRAMA (TERMOCICLADOR):

1 min a 94°C
 Repetició de 30 cicles:
 1 min 15 seg a 94°C (desnaturalització)
 1 min a 55°C (annealing)
 1 min a 72°C (extensió)
 5 min a 72°C (extensió final)
 Indefinidament a 4°C

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.

L'últim component de la reacció en afegir-se ha de ser la DNA polimerasa Deep Vent, que pel fet de tenir activitat exonucleasa podria degradar els primers 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.

Cal assenyalar que 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 de primers i DNA motlle, així com amb la temperatura de l'etapa d'annealing.

Tractament amb enzims de restricció

Durant aquest treball s'han utilitzat enzims de restricció de tipus II per obtenir fragments de DNA amb extrems cohesius, els quals es poden purificar i unir per donar lloc a molècules de DNA quimèriques.

L'activitat dels enzims de restricció es troba directament relacionada amb el pH, la força iònica i la temperatura a la qual la reacció es duu a terme. Així les condicions d'incubació

per a cada digestió dependran dels requeriments específics de l'enzim a fi d'assolir el seu màxim d'activitat. Tanmateix, les condicions generals que es van emprar es resumeixen a continuació:

- La quantitat de DNA que es va fer servir fou variable, entre 0.5 i 10 µg, dependent de si el propòsit de la digestió era analític o preparatiu, i de la mida esperada dels fragments. En qualsevol cas, la relació entre enzim i DNA sempre ha estat superior a 1 U/mg de DNA.
- El volum d'enzim de restricció addicionat a la reacció no fou mai superior al 10% del volum final de la digestió. Això és degut a que els enzims de restricció són subministrats en solucions al 50% de glicerol i per a molts d'ells, una concentració de glicerol superior al 5% en la barreja de reacció els fa perdre l'especificitat de reconeixement. Aquesta pèrdua d'especificitat també es pot manifestar, si la concentració d'enzim respecte la de DNA és massa elevada (> 25 U/µg de DNA).
- El tampó de restricció que sol acompanyar cada enzim ve en una presentació x10 (per raons de conservació i emmagatzemament). Per tant, cal afegir-ne 0,1 volums respecte el total de la reacció. Per acabar d'arribar al volum total desitjat, s'afegeix aigua Milli-Q sotmesa a l'autoclau.
- Les barreges de restricció es van incubar a 37°C entre 2-6 hores, en el cas de restriccions analítiques, o bé entre 6-12 hores quan es duen a terme digestions preparatives amb la finalitat de purificar algun fragment o dobles digestions. En aquest darrer cas, l'addició dels enzims era simultània quan tots dos presentaven activitat òptima en les mateixes condicions, és a dir, en el mateix amortidor. En cas que les condicions òptimes no coincidissin o no fossin compatibles per tots dos enzims, la segona digestió va anar precedida d'una purificació, utilitzant com a eina el GeneClean.

Els enzims de restricció utilitzats en aquest treball, l'amortidor recomanable i la casa comercial de la qual s'han obtingut es presenten a la Taula 2.

TAULA 2

Enzims de restricció utilitzats en aquest treball		
Enzim	Amortidor	Seqüència diana ^a
HindIII	B	A□AGCTT
BamHI	B	G□GATCC
XbaI	H	T□CTAGA
SaI	H	G□TCGAC

^a Els amortidors de digestió utilitzats en cada cas han estat subministrats per la pròpia casa comercial on s'han comprat els enzims (Boehringer Mannheim - Alemanya). Tot i que són subministrats en solucions concentrades 10x, a continuació s'especifica la concentració 1x: Amortidor B de BM: Tris-HCl 10 mM; MgCl₂ 5 mM; NaCl 100 mM; 2-Mercaptoetanol 1 mM; (pH 8.0). Amortidor H de BM: Tris-HCl 50 mM; MgCl₂ 10 mM; NaCl 100 mM; Ditiocitrol 1 mM; (pH 7.5).

Reacció de lligament amb la DNA ligasa de T4

Aquesta tècnica permet inserir fragments de DNA forans en vectors o bé unir molècules de DNA per tal d'obtenir construccions per a un determinat propòsit. En el nostre cas, l'enzim utilitzat ha estat sempre la DNA ligasa de T4 distribuïda per Boehringer Mannheim (Alemanya).

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

1. Digerir el vector i el DNA forà amb els enzims de restricció i purificar-los, preferentment a partir d'electroforesi en gels d'agarosa.
2. En amortidor de ligasa, es barregen els fragments de DNA que es volen lligar. Idealment s'aconsella, que la concentració sigui 1 pmol/mL de DNA de vector per 4 pmol/mL de DNA d'insert, quan els extrems són cohesius i 0.5 pmol/mL de DNA de vector quan els extrems són llisos. L'amortidor que s'utilitza pel lligament pot ser variable pel que fa a les concentracions dels components i fins i tot en la composició. En aquest treball s'ha utilitzat l'amortidor que proporciona Boehringer Mannheim amb la ligasa de T4. Aquest amortidor és recomanable guardar-lo en alíquotes de 5-10 µL a -20°C.
3. Afegir la ligasa de DNA de T4 (Boehringer Mannheim) en una proporció de 0.1-0.5 Unitats/µg de DNA.
4. Incubar la reacció de lligament a 16°C durant 15-20 hores. Sovint, degut al fet que se sol treballar amb concentracions més elevades de ligasa (fins a 5 Unitats/µg de DNA), es pot optar, sobretot en lligaments d'extrems cohesius, per incubacions de 2-4 hores a temperatura ambient. S'ha constatat que aquestes funcionen igualment bé, alhora que redueix el risc de degradació dels components de la mescla.
5. La reacció s'atura per escalfament a 65°C durant 10-15 minuts i a continuació es refreda en gel. En el cas d'un lligament

vector-insert que no requereix manipulacions posteriors, aquesta mescla pot utilitzar-se directament per a transformar cèl·lules competents. S'aconsella no utilitzar mai tota la mescla de lligament en una única transformació. En el cas que no es pensi utilitzar immediatament, es pot guardar a -20°C.

6. Si el lligament que s'ha realitzat requereix manipulacions enzimàtiques, és recomanable purificar el fragment desitjat a partir de gels d'agarosa.

Obtenció de cèl·lules Escherichia coli 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 CaCl₂ fredes. Cal fer esment que les cèl·lules bacterianes només incorporen de forma estable, per transformació, molècules de DNA de doble cadena circulars.

Pel que fa al procés d'obtenció de cèl·lules E. coli competents que es descriu a continuació cal fer especial esment de la necessitat que el procés s'ha de dur a terme amb les màximes garanties d'esterilitat.

1. Inocular 1 mL del cultiu de nit en 100 mL de medi LB líquid fresc. Aquest cultiu es deixa créixer fins assolir una Abs₅₅₀ nm de 0.5 unitats de densitat òptica, per agitació constant a 250 r.p.m. a 37°C.
2. Deixar reposar el cultiu en gel durant 30 minuts.
3. Centrifugar a 5000 xg a 4°C durant 10 minuts.
4. Resuspendre el sediment cel·lular en CaCl₂ 100 mM amb la meitat del volum original (en aquest cas 50 mL) i deixar reposar en gel picat durant 1 hora.
5. Centrifugar a 5000 xg i 4°C durant 10 minuts.
6. Resuspendre les cèl·lules en 1/4 del volum original amb dissolució de CaCl₂ 100 mM refredada a 0°C. Deixar una altra hora en gel.
7. Centrifugar a 5000 xg i 4°C durant 10 minuts.
8. Resuspendre les cèl·lules en 1/15 del volum original (aproximadament 6 mL) amb una dissolució de CaCl₂ 100 mM refredada a 0°C. Deixar una altra hora en gel.
9. Afegir glicerol fins arribar a una concentració final del 15% (1.3 mL de glicerol 80%). Distribuir en alíquotes de 100 µL en tubs Eppendorf refredats prèviament i congelar a -80°C.

Aquest protocol permet obtenir unes 70 alíquotes de 100 µL i encara es pot escalar a partir de volums de cultiu més grans. En qualsevol cas el volum de dissolució de CaCl₂

utilitzat en les diferents resuspensions ha de mantenir les proporcions exposades respecte el volum de cultiu original.

Transformació de cèl·lules d'Escherichia coli competents

Les cèl·lules competents poden ésser transformades amb DNA provinent d'un lligament o obtenció minipreparativa. El procediment seguit fou el que es descriu a continuació:

1. Es descongelen les alíquotes de cèl·lules competents congelades a -70°C necessàries, segons el número de transformacions que es vulguin fer, transferint els tubs Eppendorf a gel picat.
2. Afegir a cada fracció de cèl·lules competents (100 µL), un màxim de 50 ng de DNA en un volum que no sobrepassi 1/10 del volum de la fracció o alíquota. Agitar suauement per tal de mesclar bé la solució del DNA amb la de les cèl·lules.
3. Incubar en gel durant 30 minuts.
4. Transferir els tubs Eppendorf a un bany a 42°C durant 2 minuts.
5. Incubar els tubs en gel durant 10 minuts.
6. A continuació, afegir 1 mL de medi LB líquid fresc a cada tub Eppendorf i incubar a 37°C en agitació suau com a mínim durant 45 minuts.
7. Resuspendre suauement les cèl·lules i sembrar alíquotes de 0.1 mL en plaques d'LB-agar, suplementades amb l'antibiòtic pel qual el vector que s'està manipulant proporcioni resistència. En tots els casos, aquest antibiòtic fou l'ampicil·lina.
8. Incubar les plaques en una estufa a 37°C fins que s'observin les colònies transformants (12-15 hores). Cal evitar incubacions massa llargues per tal que no apareguin colònies satèl·lit que dificultarien la selecció dels transformants.

En totes les transformacions realitzades es van incloure els controls següents: d'una banda es van sembrar dues alíquotes de cèl·lules competents, a les quals es va afegir 10 µl d'aigua destil·lada, una en una placa de medi suplementada amb antibiòtic (si creixen colònies indicaria contaminació de les cèl·lules competents) i l'altra en una placa de medi sense antibiòtic (si les cèl·lules competents són viables, hi ha d'aparèixer una capa de cultiu confluent). Per altra banda, en el cas de transformacions amb DNA provinent d'una reacció de lligament es van incloure dos controls addicionals en plaques de medi amb antibiòtic, un amb una alíquota de cèl·lules competents transformada amb vector sense tallar, circular (si les cèl·lules tenen un bon nivell de competència, han d'aparèixer nombroses colònies transformants), i l'altre amb una alíquota

transformada amb la barreja de lligament sense el DNA insert (hi hauria d'aparèixer un número significativament menor de colònies transformants que amb la transformació amb la barreja de lligament del vector i de l'insert, donat que la reacció de religament d'un vector amb ell mateix és molt poc probable si la digestió amb enzims de restricció ha estat completa).

Transformació de cèl·lules d'Escherichia coli competents amb RFDNA de bacteriòfags

El procediment que es va seguir per a la transformació de cèl·lules competents d'E.coli amb RF DNA de vectors derivats d'M13 es detalla tot seguit:

1. Si es fan servir cèl·lules competents guardades a -70°C, deixar-les descongelar en gel picat.
2. Afegir a cada mostra de cèl·lules competents un màxim de 50 ng d'RF DNA dissolt en un volum que sigui com a màxim 1/10 del volum de les cèl·lules. Agitar amb molta suavitat.
3. Incubar en gel durant 30 minuts.
4. Transferir els tubs Eppendorf a un bany de 42°C durant 2 minuts. Tornar els tubs al gel i deixar-ho uns 5 minuts.
5. Afegir 0.5 mL de medi LB líquid i afegir-ho a la barreja que conté IPTG, X-gal i cèl·lules d'un cultiu de nit i se sembla en una placa d'LB-agar. El volum sembrat és variable dependent del número de transformants esperat
6. Incubar les plaques a 37°C, de forma invertida, fins que s'observin les clapes.

SELECCIÓ DE LES COLÒNIES TRANSFORMANTS

Un cop obtingudes les colònies transformants, s'han de seleccionar aquelles que porten el vector amb l'insert, ja que és possible que hagi tingut lloc alguna reacció de religament del vector sense que s'hagi incorporat el fragment de DNA que es volia inserir. Amb aquesta finalitat es fa una extracció minipreparativa del DNA plasmídic d'algunes colònies aparegudes en la placa després de la transformació. Tot seguit aquest DNA es va sotmetre a digestió amb els enzims de restricció per a comprovar la presència de l'insert a la construcció incorporada per les cèl·lules. Una alíquota de la mescla de restricció es va aplicar en un gel d'agarosa juntament amb els marcadors de massa molecular i una digestió del vector sense insert digerit amb els mateixos enzims de restricció com a control.

Mutagènesi dirigida per oligonucleòtid (SDM)

La mutagènesi dirigida per oligonucleòtid (SDM, de l'anglès Site-Directed Mutagenesis) és una tècnica que permet introduir qualsevol mutació que es desitgi en una seqüència de DNA coneguda. Existeixen diverses variants de la tècnica, de les quals en aquest treball se n'han assajat dues, la desenvolupada per Eckstein i col·laboradors (Taylor, 1985; Nakamaye i Eckstein, 1986; Sayers i col. 1988) utilitzant ssDNA com a motlle, i la tècnica de SDM mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) (Juncosa, 1994) que és una modificació del mètode descrit per Landt i col. (1990) i que utilitza dsDNA com a motlle i una polimerasa amb activitat correctora 3' → 5', la Deep Vent DNA polimerasa (New England Biolabs, EUA). De les dues variants, només la darrera ens va donar resultats satisfactoris, per tant serà l'única que entrarem en detall en aquest treball.

DISSENY DELS OLIGONUCLEÒTIDS

Es tracta de dissenyar oligonucleòtids que tinguin una seqüència complementària a una de les cadenes de la construcció que es vol mutar, excepte en els punts d'incorporació de les mutacions desitjades. Atès que en principi es va utilitzar el mètode d'Eckstein i que, per tant, les modificacions s'havien d'introduir a fragments de DNA (gen de l'RNasa A) clonats en el vector M13mp19, es va prendre com a motlle la seqüència de la cadena del fragment que passa a les partícules víriques (cadena +) i es van dissenyar els oligonucleòtids (oligo#1 a oligo#7) complementaris a aquesta seqüència introduint-hi, però, la mutació desitjada. La resta de mutacions es van introduir a fragments de DNA clonats en el vector pUC119, de manera que es va treballar indistintament amb qualsevol de les dues cadenes que formen aquest plasmídi.

Pel que fa a la longitud de l'oligonucleòtid, si la mutació consisteix en el canvi d'una única base per una altra, és suficient que l'oligonucleòtid tingui una longitud de 21 bases, amb la mutació 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 cada costat de la regió de mutació. La longitud de cada braç s'ajusta de manera que la temperatura teòrica d'hibridació sigui aproximadament 42°C d'acord amb la fórmula següent:

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

Els oligonucleòtids dissenyats d'aquesta manera han estat sintetitzats i adquirits a Boehringer Mannheim (MWG-Biotech, Syntesis Lab., Alemanya) sense purificar i liofilitzats.

MÈTODE SDM PER PCR

Com ja s'ha esmentat, tots els mutants produïts en aquest treball s'han obtingut pel sistema de SDM mitjançant PCR. És un sistema que ha resultat ser molt ràpid (3-4 dies) i és possible, de forma rutinària, obtenir eficiències de mutagènesi d'un 95%. A més, permet treballar amb DNA de doble cadena, cosa que facilita totes les etapes preliminars encaminades a l'obtenció de DNA motlle.

Es parteix del fragment que es vol mutar (DNA motlle), inserit en un vector adequat per al qual es tenen dos oligonucleòtids que s'hibriden als extrems del seu polycloning site, a cadenes complementàries (primers universals). En una primera PCR s'amplifica una part del fragment inserit, la compresa entre les regions a les que s'hibriden el primer mutagènic i un dels primers universals. Una de les cadenes del producte d'aquesta primera PCR, degudament purificat tal i com s'explicarà, servirà com a primer per a una segona PCR, en la que el DNA motlle segueix essent el vector que porta incorporat el fragment a mutar, i el segon primer és el primer universal contrari al que s'ha utilitzat en la primera PCR. El producte final de la segona PCR és digerit amb dos enzims de restricció, i inserit a un vector de clonatge amb el que es transformen cèl·lules competents. D'entre les colònies transformants obtingudes, se selecciona les que han incorporat correctament la mutació, cosa que es comprova per seqüenciació del DNA.

A continuació es detallen els programes del termociclador utilitzats per dur a terme, tant de la primera com de la segona PCR, així com les concentracions dels diferents components de la barreja de reacció. Convé ressaltar que les dues reaccions són molt semblants, i que la diferència principal és la utilització de primers. El fet d'emprar el producte de la primera PCR com a primer per a la segona fa canviar les condicions, obligant a baixar la temperatura d'annealing del programa per a la segona PCR.

Condicions de les PCR per a SDM

PRIMERA PCR

PROGRAMA

30·(94°C·1'15" + 55°C·1' + 72°C·1') + 72°C·5' + 4°C·ON

Els programes de PCR s'expressen com a fórmules matemàtiques seguint els següents principis:

- El primer número indica el nombre total de cicles.
- Entre parèntesi figura les temperatures i els temps de les tres etapes de què es compona cada cicle: separació o desnaturalització, anellament o

hibridació i extensió (en l'ordre esmentat).

- Després del parèntesi segueix la temperatura i el temps d'extensió final i la temperatura de conservació dins de l'aparell termociclador.

CONDICIONS

Afegir els components en l'ordre esmentat i en condicions d'asèpsia. Totes les reaccions es fan a un volum final de 100 µL. És aconsellable que aquest procés es dugui a terme a 0-4°C utilitzant un bany de gel.

Aigua Milli-Q estèril	fins a 100 µL
Tampó x10 (Vent buffer)	10 µL
dNTPs 10 mM (0.2 mM final)	2 µL
dsDNA motlle (~50 ng)	10 µL
• M13mp19.BPR	
• pUC119.BPR	
RUP (20 pmols)	5 µL
Primer mutagènic (20 pmols)	5 µL

Afegir l'enzim just abans de la PCR. Si tenim moltes mostres cal mantenir-les en gel per tal d'evitar que l'activitat exonucleasa destrueixi els encebadors. El termociclador s'ha escalfat prèviament a 94°C.

Deep Vent polimerasa (1 U)	0.5 µL
Oli mineral	40 µL

SEGONA PCR

PROGRAMA

30:(94°C:1'15" + 45°C:1'30" + 72°C:1'15")
+ 72°C:10' + 4°C:ON

CONDICIONS

Aigua Milli-Q estèril	fins a 100 µL
Tampó x10 (Vent Buffer)	10 µL
dNTPs (400 µM final)	4 µL
DNA motlle (40-50 ng)	10 µL
• M13mp19.BPR	
• pUC119.BPR	
FUP (20 pmols)	5 µL
Producte purificat de 1a PCR	10 µL
Deep Vent polimerasa (1 U)	0.5 µL
Oli mineral	40 µL

Extracció amb cloroform i precipitació del DNA utilitzant acrilamida com a carrier

Després de cada PCR és necessària la purificació del producte resultant. Això s'ha fet sempre mitjançant una extracció amb cloroform amb posterior precipitació amb etanol i acetat sòdic utilitzant acrilamida com agent co-precipitant o carrier, tot seguint els passos que es descriuen en aquest apartat. La mostra resultant s'aplica a un gel d'agarosa 1,4%, i finalment es purifica a partir d'agarosa mitjançant el sistema GENE CLEAN o MERmaid, depenent de la longitud del fragment.

Aquest mètode de precipitació del DNA (Juncosa, 1995) es basa en una polimerització parcial, en absència de bisacrilamida, de l'acrilamida. Això permet que la solució no esdevingui compacta. Aquesta acrilamida no interfereix en posteriors manipulacions del DNA (electroforesi, restriccions, lligament i transformació).

1. Retirar 90 µL de la 1a PCR amb compte de no arrossegar oli mineral.
2. Barrejar els 90 µL de la mostra amb un volum igual de cloroform:alcohol isoamílic 24:1.
3. Agitar fortament amb vòrtex i centrifugar en minifuga a 12000 xg durant 10 minuts.
4. Recuperar la fase aquosa superior i afegir 9 µL d'acetat sòdic 3 M (pH 5.6) i 8 µL d'acrilamida 0.25% (20 µg). Agitar fortament amb vòrtex.
5. Afegir 275 µL d'etanol absolut fred (-20°C) i barrejar invertint el tub.
6. Deixar 10 minuts a -80°C o, de manera opcional, tota la nit a -20°C.
7. Centrifugar 10 minuts a 12000 xg.
8. Retirar el sobrenedant per aspiració i rentar el sediment amb 1 mL d'etanol 70% fred (-20°C).
9. Centrifugar 5 minuts a 12000 xg.
10. Retirar el sobrenedant i deixar assecar el sediment durant 2 minuts.
11. Resuspendre en 15 µL d'aigua Milli-Q.

LA SOLUCIÓ DE POLIACRILAMIDA 0.25% ES PREPARA SEGONS EL SEGÜENT PROTOCOL:

1. Es prepara una solució estoc d'acrilamida 5%, Tris 40 mM, acetat sòdic 20 mM, EDTA 2 mM.

Acrilamida	1.25 g
Tris 1 M	1 mL
Acetat sòdic 3 M	167 µL
EDTA 0.5 M (pH 7.8)	100 µL
Aigua destil·lada	fins a 25 mL

Per polimeritzar la solució anterior, afegir:

Persulfat amònic 10%	250 µL
TEMED	25 µL

Deixar a temperatura ambient fins a la completa polimerització.

2. Agafar una al·lquota d'aquesta solució (5mL) i afegir acetat sòdic fins a una concentració final de 0.3 M.
3. Afegir 3 volums d'etanol absolut, i precipitar el polímer durant 5 minuts a 0°C (-20°C).
4. Centrifugar en minifuga 5 minuts a 10000 xg. Retirar el sobrenedant.
5. El sediment es renta amb etanol 70%. Centrifugar en minifuga 5 minuts a 10000 xg. Retirar el sobrenedant.
6. El sediment es deixa assecar i es dissol en 100 mL d'aigua destil·lada (concentració final 0.25%).

7. La solució estoc es guarda a -20°C i la solució de treball de poli(acrilamida 0.25% a temperatura ambient o bé a 4°C

Seqüenciació de DNA

La seqüenciació del DNA corresponent a les construccions realitzades en aquest treball ha estat el mètode que ha permès validar els diferents clons obtinguts, normalment després del procés de mutagènesi dirigida. El mètode seguit ha estat sempre el mètode enzimàtic de Sanger (Sanger i col., 1977; Sanger i Coulson, 1978), també anomenat mètode del dideoxi, utilitzant la tinció amb nitrat de plata com a mètode per a la detecció de les cadenes de DNA.

Les quatre etapes bàsiques per a la seqüenciació del DNA són les que es descriuen a continuació. En primer lloc, s'ha de preparar el DNA a seqüenciar fins a tenir-lo amb un grau de puresa suficient com per poder-lo sotmetre a la segona etapa, la reacció. La tercera etapa té com a objectiu separar les cadenes còpia en funció de la seva longitud, per la qual cosa s'utilitza una electroforesi en gel d'acrilamida-urea. La quarta i última etapa consisteix en la detecció de les cadenes de DNA separades durant l'electroforesi, en el nostre cas, a través de la tinció del gel amb nitrat de plata. Per dur a terme cadascuna d'aquestes etapes es va seguir el protocol detallat per Canals (1998).

MÈTODES D'EXPRESSIONI DE PROTEÏNES RECOMBINANTS

Condicions per a l'expressió en E. coli

Les condicions dels cultius de la soca E. coli BL21 (DE3), encaminats a la producció de les diferents proteïnes recombinants, van ser les que s'exposen a continuació:

INOCULACIÓ I CREIXEMENT DEL CULTIU

Es va establir un cultiu de nit, a fi d'utilitzar-lo com a inòcul per al cultiu d'expressió, inoculant una única colònia de la soca desitjada en 3 mL de medi líquid TB suplementat amb ampicil·lina 400 µg/mL. Aquest cultiu s'incuba a 37°C i en agitació

(250 r.p.m.) durant 12-18 hores.

Després d'aquest temps d'incubació, s'inocula 1 L de medi líquid TB suplementat amb ampicil·lina 50 µg/mL amb 1/100 del volum provinent del cultiu de nit. Es deixa créixer el cultiu a 37°C i en agitació (250 r.p.m.) durant 3-4 hores, fins que s'assoleix un valor d'absorbància a 550 nm de 0.8-1.0.

INDUCCIÓ DEL CULTIU

En aquest moment, s'afegeix l'IPTG necessari per tal que la seva concentració final al cultiu sigui 1 mM. Es va partir d'una solució mare d'IPTG 100 mM, preparada just abans d'induir i esterilitzada per filtració.

Es deixa créixer el cultiu induït entre 3-4 hores i tot seguit, es centrifuga a 10000 xg durant 20 minuts per tal de recollir les cèl·lules. Aquestes es guarden a -20°C fins al moment de començar el procés de purificació.

Obtenció de fraccions de cultius d'E. coli

Per tal d'analitzar la producció de proteïna recombinant durant la inducció, es prenen mostres d'1 mL de cultiu en el moment anterior a la inducció i en diferents temps al llarg d'aquesta. Les mostres se centrifuguen a 10000 xg, durant 4 min a temperatura ambient, s'elimina el sobrenedant per aspiració, es resuspèn el sediment cel·lular en 200 mL de tampó d'aplicació de proteïnes 1x, i es bull durant 5-10 min. Finalment s'analitzen les proteïnes per SDS-PAGE.

MÈTODES DE TREBALL AMB PROTEÏNES

Obtenció de l'RNasa A salvatge d'origen natural

L'RNasa A salvatge d'origen natural es va obtenir per purificació de l'RNasa pancreàtica bovina (tipus I-A) subministrada per Sigma Chemical Co. (EUA). Es va seguir el procediment de purificació descrit per Alonso i col. (1986), el qual suposa la realització d'una cromatografia de bescanvi catiónic mitjançant una reïna de tipus CM-Sephrose CL-6B (Pharmacia Fine Chemicals, Suècia). Convé ressaltar que totes les cromatografies descrites en aquest treball

es van dur a terme a temperatura ambient.

Així doncs, per a la purificació de l'RNasa A salvatge natural, es dissol 1 g d'RNasa A tipus I-A (Sigma Chemical Co., EUA) en 40 mL d'amortidor Tris-HCl 15 mM (pH 8.0) i s'aplica a una columna empaquetada amb la reïna abans esmentada. Les característiques i condicions d'aquesta cromatografia s'indiquen a continuació:

- Dimensions de la 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 la 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) (600 mL + 600 mL)
- Enregistrament: 280 nm

En la Figura 1 es presenta el perfil d'elució enregistrat a partir de la lectura d'absorbància de cada fracció a 280 nm. L'RNasa A s'elueix en el pic principal que s'emplaça al final del gradient, aproximadament a un valor de conductivitat entre 9 i 10 mS·cm⁻¹. Els pics minoritaris que apareixen en el cromatograma corresponen a la mateixa proteïna, però amb diferents graus de glicosilació.

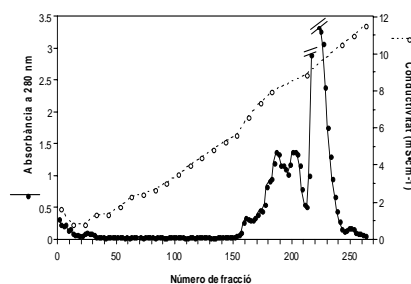


Figura 1: Perfil d'elució corresponent a la cromatografia de bescanvi catiónic emprada per a la purificació de l'RNasa A salvatge natural. El pic corresponent a la fracció no glicosilada (fraccions 215-239) s'elueix a un valor de conductivitat entre 9 i 10 mS·cm⁻¹.

Les fraccions corresponents al pic de l'RNasa A no glicosilada s'ajunten i es dialitzen enfront d'aigua Milli-Q (5 L) durant 24 hores, realitzant un canvi a les 12 hores. Es liofil·litza i es guarda a -20°C fins al moment del seu ús.

Purificació de les proteïnes recombinants

Atès que els gens que codifiquen per les RNases recombinants amb les quals s'ha treballat es troben cadascun fusionats darrera el pèptid senyal pelB, les proteïnes estan preparades per ser exportades a l'espai periplasmàtic de la cèl·lula bacteriana. No obstant, convé ressaltar que en centrifugar el cultiu cel·lular després d'un xoc osmòtic d'aquest, no es detecta activitat ribonucleasa en el sobrenedant (delCardayré i col., 1995). A més, la major part de la producció de les proteïnes recombinants obtingudes en aquest treball es troba en forma de cossos d'inclusió, és a dir, agregats de molècules de proteïna i mRNA que s'originen per la baixa solubilitat de la proteïna expressada en grans quantitats.

Així doncs, la purificació s'inicia partint del sediment cel·lular d'un cultiu d'1 L de la soca portadora del plasmidi d'interès, fet créixer i induït sota les condicions que s'han detallat anteriorment.

Al llarg d'aquest treball es van emprar dos procediments diferents per tal de purificar les proteïnes recombinants. El protocol d'ambdós procediments, anomenats A i B, es troba detallat tot seguit.

PROCEDIMENT DE PURIFICACIÓ A

Aquest procediment, afí amb el descrit per delCardayré i col. (1995), es basa en la solubilització dels cossos d'inclusió i en el trencament de les cèl·lules amb un amortidor que conté urea com a agent desnaturalitzant, DTT com a agent reductor dels enllaços pont disulfur, i PMSF i EDTA com a inhibidors de proteases. Després d'aquesta solubilització, el sobrenedant se sotmet a una cromatografia de bescanvi catiónic a pressió atmosfèrica en una columna de CM-Sephrose CL-6B. Es reuneixen i es dialitzen les fraccions amb activitat ribonucleasa per tal de reoxidar i permetre el plegament de la proteïna recombinant, tot utilitzant la parella redox [GSSG]/[GSH]. Aleshores, la mostra se sotmet a una segona etapa cromatogràfica, també de bescanvi catiónic, però per HPLC, en una columna Mono-S.

Solubilització del sediment cel·lular

1. Se centrifuga el cultiu a 10000 xg i a 4°C durant 20 minuts per tal de recollir les cèl·lules.
2. El sediment que s'obté es dissol en 200 mL d'amortidor de solubilització, la composició del qual és: Tris-HCl 20 mM, Urea 6 M, EDTA 1 mM, PMSF 0.2 mM (dissolt en 500 µL d'isopropanol), DTT 20 mM (pH 7.8).
3. Una vegada s'ha resuspès completament el sediment s'incuba durant 1 hora a 37°C i en agitació constant a 250 r.p.m.
4. Se centrifuga novament a 10000 xg a 4°C durant 20 minuts.
5. El sobrenedant, anomenat S₁, 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 sobrenedant, anomenat S_2 , s'ajunta amb el sobrenedant S_1 i el sediment es resuspèn en 100 mL d'amortidor de solubilització.
8. Es repeteixen de nou els passos 3 i 4.
9. Finalment aquest sobrenedant, anomenat S_3 , s'ajunta amb la barreja de sobrenedants S_1 i S_2 per a constituir la mostra ($S_1+S_2+S_3$), la qual serà posteriorment sotmesa a cromatografia de bescanvi catiònic.

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

A continuació, es porta a terme una cromatografia de bescanvi catiònic, a pressió atmosfèrica, en presència d'urea i DTT, és a dir, mantenint la proteïna desnaturalitzada i reduïda. Amb aquesta cromatografia s'aconsegueix separar la proteïna d'interès de la major part de proteïnes que s'inclouen en els cossos d'inclusió. Es va emprar una reina del tipus CM-Sephrose CL-6B (Pharmacia Fine Chemicals, Suècia). Les característiques i condicions d'aquesta cromatografia s'indiquen a continuació:

- Dimensions de la 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, urea 6 M (pH 7.8) (250 mL)
 - C) Tris-HCl 20 mM, urea 6 M, DTT 2 mM (pH 7.8) (100 mL)
- Volum de la mostra: 500 mL ($S_1+S_2+S_3$)
- Amortidor de rentat: Tris-HCl 20 mM, urea 6M, DTT 2 mM (pH 7.8) (200 mL)
- Gradient: 0-0.5 M NaCl en Tris-HCl 20 mM, urea 6M, DTT 2 mM (pH 7.8) (250+250 mL)
- Enregistrament: 280 nm

Els grups amino lliures de les proteïnes reaccionen amb els ions isocianat (NCO), la qual cosa resulta en la carbamilació de les proteïnes (Stark, 1965). Donat que la urea està en equilibri amb els ions isocianat, quan s'utilitzen elevades concentracions d'aquest agent desnaturalitzant, les proteïnes són susceptibles a aquesta modificació. Aquestes modificacions es poden evitar si la solució d'urea 6 M, utilitzada tant en la solubilització de la proteïna com en les diferents etapes cromatogràfiques, es desionitza mitjançant la reina de bescanvi aniónic AG 501-X8(D) (Sigma Chemical Co., EUA). Aquesta es va afegir directament a la solució i es va mantenir en agitació fins al moment del seu ús. Finalment, es va filtrar la solució per tal de retirar la reina. Aquesta reina presenta la particularitat que conté un colorant unit de manera irreversible, el qual canvia de color

blau a groc quan s'exhaureix la capacitat bescanviadora.

Replegament i reoxidació de la proteïna

Les fraccions amb activitat ribonucleasa es van detectar per electroforesi en gels de poliacrilamida-SDS amb poli(C) revelats per activitat. Es reuneixen les fraccions amb activitat ribonucleasa, se'n determina la concentració i es dilueix, si s'escau, amb amortidor Tris-HCl 20 mM (pH 7.8). Tot seguit, es duen a terme les diàlisis amb sacs Spectra/Por de 3.500 Da de MWCO (Spectrum, USA) que s'exposen a continuació:

- 1- Diàlisi enfront de l'amortidor Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.1 M, GSH (glutatió reduït) 1 mM, GSSG (glutatió oxidat) 0.2 mM (pH 7.8). Aquesta diàlisi permet eliminar la urea i el DTT, alhora que permet el procés de reoxidació dels quatre ponts disulfur. Temps de diàlisi: 24 hores amb un canvi. Volum: 2 L.
- 2- Diàlisi enfront de l'amortidor Tris-HCl 20 mM (pH 7.8) per tal d'eliminar completament la urea i el DTT i alhora descartar la sal i el glutatió de la diàlisi anterior. Temps de diàlisi: 24 hores amb un canvi. Volum: 2 L.

Finalment i com que el volum de la mostra era gran, es va dialitzar enfront d'aigua Milli-Q per tal de poder-la concentrar per liofilització. El temps i el volum de diàlisi han estat els mateixos que en les diàlisis anteriors. Una vegada dialitzada, es va centrifugar la mostra a 10000 xg durant 20 minuts per tal d'eliminar la fracció de proteïna no soluble.

Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)

L'HPLC es va emprar tant de forma preparativa (en ser una de les etapes del procés de purificació) com de forma analítica (per tal de comprovar la puresa de la mostra).

1. Cromatografia de bescanvi iònic per HPLC

El liofilitzat es va resuspendre amb l'amortidor A i es va centrifugar a 12000 xg a 4°C durant 15 minuts. El sobrenedant es va injectar a l'equip d'HPLC. Les condicions de la cromatografia de bescanvi catiònic utilitzades es descriuen a continuació:

- Amortidors:
 - A) Tris-HCl 20 mM (pH 8.0)
 - B) Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 M (pH 8.0)
- Columna: Mono S HR 5/5 (Pharmacia Biotech, Suècia)
- Flux: 1 mL/min
- Rentat: 10 minuts amb l'amortidor A
- Gradient: 0-25% B en 60 min
25-100% B en 5 min
100% B durant 10 min

- Enregistrament: 280 nm

Una vegada obtingut el perfil d'elució d'aquesta cromatografia es van reunir les fraccions corresponents al pic majoritari i es va dialitzar enfront d'aigua Milli-Q durant 24 hores. Finalment es va liofilitzar per a la seva conservació.

2. Cromatografia de fase reversa per HPLC

En casos puntuals s'ha dut a terme una cromatografia de fase reversa per HPLC, sobretot per comprovar tant la puresa de la mostra, com la seva homogeneïtat (absència de diferents conformacions de la mateixa proteïna).

- Amortidors:
 - A) TFA 0.1% en aigua Milli-Q
 - B) Acetonitril + TFA 0.09%

• Columna: 214TP Vydac C-4 (USA)

- Flux: 0.5 mL/min
- Rentat: 10 minuts amb l'amortidor A
- Gradient: 10% B durant 20 min
10-20% B en 15 min
20-35% B en 60 min
35-100% B en 5 min
100% B durant 15 min
- Enregistrament: 280 nm

PROCEDIMENT DE PURIFICACIÓ B

Es va decidir seguir un nou procediment, modificació del descrit per Kim i col (1995), i que comença amb l'expressió heteròloga de la proteïna com es feia fins al moment. A diferència del mètode de solubilització utilitzat en el procediment de purificació A, purament químic, la utilització de clorur de guanidini (Gnd-HCl), com a agent desnaturalitzant dels agregats que es formen durant l'expressió de la proteïna, va precedida d'un trencament cel·lular per mitjans físics, com és ara la premsa de French. El procés continua amb la reducció amb DTT i una diàlisi enfront d'àcid acètic 20 mM. La mostra desnaturalitzada i reduïda, es dilueix en un amortidor de replegament fins a una concentració de proteïna de 0.3 mg/mL. Donat que en aquest estadi la mostra es troba molt diluïda, aquesta es va concentrar per ultrafiltració tangencial fins a un volum que es podia dialitzar enfront de l'amortidor adequat per a la posterior cromatografia de bescanvi catiònic, en una columna Mono-S d'HPLC.

Fraccionament cel·lular

1. Les cèl·lules provinents d'1 L de cultiu es recullen per centrifugació a 10000 xg a 4°C durant 20 min. El sediment obtingut s'acumula en dos tubs i es resuspèn en 50 mL de Tris-HCl 20 mM, EDTA 10 mM (pH 8.0).
2. La suspensió cel·lular es congela a -85°C durant tota la nit.

- Es descongelen les cèl·lules en un bany a 37°C i se sotmeten 3 vegades a la premsa de French a 1000 Psi. El millor indicatiu d'un bon fraccionament cel·lular és la disminució de la viscositat de la solució.
- Se centrifuga a 12000 xg durant 1 h a 4°C.

Solubilització i reducció dels cossos d'inclusió

- Es descarta el sobrenedant i es solubilitza el sediment (repartit en dos tubs) que conté els cossos d'inclusió amb una solució desnaturalitzant: Tris-HCl 20 mM Gdn-HCl 6 M EDTA 10 mM (pH 8.0). S'utilitzen 6 mL per cada tub. Per a la solubilització d'aquest sediment, cal deixar-ho en agitació suau durant 1 hora.
- S'afegeix DTT en pols fins a una concentració final de 0.1 M. Intentar desenganxar el sediment de les parets del tub amb una micropipeta i es continua l'agitació suau per tal de facilitar la solubilització durant 1 hora més.
- Se centrifuga a 10000 xg durant 30 min a 4°C a fi d'eliminar el material insoluble.
- Tot seguit, es dialitza la solució enfront de 4 L d'àcid acètic 20 mM. Es canvia la dialisi després de 3-4 hores i es continua dialitzant durant tota la nit.
- Se centrifuga la solució a 10000 xg, durant 30 min a 4°C.

Replegament i reoxidació de la proteïna

- Es determina la concentració de proteïna mesurant l'absorbància de la solució a 275 nm.
- El replegament de la mostra s'inicia amb la dilució d'aquesta, fins a una concentració de proteïna de 0.3 mg/mL, en l'amortidor de replegament o de renaturalització. La composició d'aquest amortidor és: Tris-acetat 100 mM, GSH 3.0 mM i GSSG 0.6 mM (pH 8.0).
- La mostra s'incuba 15 hores o tota la nit en agitació suau.
- S'afegeix àcid acètic glacial (1/100 del volum), lentament i en agitació suau, per tal d'aturar l'oxidació.

Concentració de la mostra per ultrafiltració tangencial

- Es duu a terme la concentració per ultrafiltració tangencial amb l'equip Acrylic Minitan II amb 4 plaques de doble filtre de cel·lulosa de 5000 Da de NMWL (Cutoff). Aquest sistema va permetre una concentració ràpida i eficient de la mostra fins a 30 mL. Es va treballar sempre a una pressió mitjana transmembrana d'entre 14 i 15 Psi.

A fi d'obtenir la proteïna dissolta en el tampó apropiat per a dur a terme la cromatografia líquida d'alta resolució tal i com s'ha descrit

en el procediment de purificació A, es va dur a terme una diàlisi enfront de tampó Tris-HCl 20 mM (pH 8.0).

EMMAGATZEMATGE DE LA PROTEÏNA PURA

La proteïna, producte dels processos de purificació, ha estat generalment emmagatzemada a -20°C en un recipient tancat, després d'haver estat liofilitzada. La proteïna, desada d'aquesta manera, es manté en òptimes condicions durant mesos.

Per aquest fi, les mostres es congelen prèviament a -80°C durant varies hores, en funció del seu volum. El recipient que conté la mostra congelada es cobreix amb un Parafilm foradat amb una agulla, per tal que la liofilització sigui efectiva però sense que la mostra pugui sortir del recipient. Si la mostra estava dissolta en algun amortidor en medi aquós, es va realitzar un pas previ de diàlisi enfront d'aigua Milli-Q per tal d'eliminar les sals. Si la mostra estava dissolta en algun dissolvent orgànic, com l'acetoni-tril en el cas de cromatografies de fase reversa, aquesta diàlisi prèvia no era necessària.

Determinació de la quantitat de proteïna

MÈTODE ESPECTROFOTOMÈTRIC

La concentració de les diferents proteïnes es va determinar per espectrofotometria, a partir del valor d'absorbància a 278 nm i utilitzant el coeficient d'extinció molar a aquesta longitud d'ona $\epsilon_{278} = 9800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Sela i Anfinsen, 1957). Per la variant Y115W es va utilitzar el coeficient d'extinció molar següent: $\epsilon_{278} = 14800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, calculat segons el mètode descrit per Gill i von Hippel, (1989).

El mètode de Gill i von Hippel es basa en calcular el coeficient d'extinció molar de la proteïna desnaturalitzada en Gdn-HCl 6M ($\epsilon_{\text{Gdn-HCl}}$) a partir de l'equació:

$$\epsilon_{\text{Gdn-HCl}} = a \cdot \epsilon_{\text{tirosina}} + b \cdot \epsilon_{\text{triptofan}} + c \cdot \epsilon_{\text{cistina}} \quad \text{Eq. 1}$$

on a, b corresponen respectivament al nombre de residus de tirosina i de triptòfan, i c al nombre de cistines. $\epsilon_{\text{tirosina}}$, $\epsilon_{\text{triptofan}}$, $\epsilon_{\text{cistina}}$ són els corresponents coeficients d'extinció molar dels compostos model en aquesta dissolució (Edelhoc, 1967).

Per determinar el coeficient d'extinció molar de la proteïna nativa (ϵ_{hativa}), es mesura l'espectre de la proteïna nativa i desnaturalitzada (en Gdn-HCl 6M) a la mateixa concentració i se'n determina el

valor d'absorbància a 278 nm. Aleshores, ϵ_{hativa} es calcula a partir de l'equació següent:

$$\epsilon_{\text{hativa}} = (\text{Abs}_{\text{hativa}}) (\epsilon_{\text{Gdn-HCl}}) / (\text{Abs}_{\text{Gdn-HCl}}) \quad \text{Eq. 2}$$

MÈTODE DE BRADFORD

Les estimacions de quantitat de proteïna total en les diferents etapes del procés de purificació de les ribonucleases recombinants es va determinar pel mètode de Bradford (1976). Aquest mètode es basa en el canvi del màxim d'absorció, de 465 nm a 595 nm, del colorant Coomassie Brilliant Blue G-250 en solució àcida quan s'uneix a proteïna. El reactiu utilitzat va ser subministrat per Bio-Rad (EUA). El procediment que es va seguir per a l'assaig s'indica a continuació:

- Es prepara amb la major exactitud possible, una dissolució 0.1 mg/mL d'albumina sèrica bovina (BSA) en aigua destil·lada. Aquesta dissolució es pot conservar congelada a -20°C durant un temps.
- A partir de la dissolució anterior, es prepara una recta patró amb les següents dilucions: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 i 15 µg/mL de proteïna en 800 µL d'aigua Milli-Q.
- Es preparen diferents dilucions de les mostres a analitzar de 800 µL de volum, corresponents a les diferents etapes de la purificació, fins que el valor d'absorbància es trobi dins del marge comprès per la recta patró.
- S'afegeixen 200 µL de reactiu de Bradford sense diluir i s'agita immediatament invertint el tub diverses vegades.
- Esperar un mínim de 5 minuts i un màxim de 15 minuts ja que el color disminueix per la precipitació de la proteïna en medi àcid (aquest fet es veu accentuat a concentracions de proteïna més elevades) i mesurar l'absorbància a 595 nm enfront d'un blanc preparat amb 800 µL d'aigua Milli-Q i 200 µL de reactiu. Cal utilitzar cubetes de plàstic o de vidre.
- Finalment es construeix el gràfic d'A595 versus concentració de proteïna (µg/mL) per a la recta patró i s'hi interpolen les diferents mostres, tenint en compte el factor de dilució utilitzat per a cadascuna.

Electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS

L'electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS ha estat el mètode analític utilitzat de manera rutinària per a la determinació del contingut proteic de cadascuna de les fraccions cel·lulars, i el seguiment dels processos de purificació, així com per a la determinació del grau de puresa de les mostres obtingudes al final del procés.

En aquest treball s'ha utilitzat el mètode d'electroforesi discontinua descrit per Laemmli (1970). Aquest mètode es caracteritza per emprar un gel superior, que té la funció de concentrar les proteïnes, i un gel inferior, el qual permet la separació d'aquestes. En tots els casos s'ha utilitzat l'aparell d'electroforesi Mini-Protean II (Bio-Rad, EUA) i s'han preparat gels de dimensions: 9 x 6 x (0.075 o 0.15) cm.

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

Dissolució A:

Acrilamida 30%-bisacrilamida 0.8%

Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0.8 g
Aigua Milli-Q	fina a 100 mL

Dissolució B:

Amortidor del gel separador (4x)

SDS	0.4 g
Tris	18.2 g
Aigua Milli-Q	fina a 100 mL

Ajustar el pH a 8.6-8.8 amb HCl.

La composició de la solució preparada concentrada 4x és: Tris-HCl 1.5 M, SDS 0.4% (pH 8.8)

Dissolució C:

Amortidor del gel concentrador (4x)

SDS	0.4 g
Tris	6.0 g
Aigua Milli-Q	fins a 100 mL

El pH s'ajusta a 6.8 amb HCl.

La composició de la solució preparada concentrada 4x és: Tris-HCl 0.5 M, SDS 0.4% (pH 6.8)

Dissolució D:

Amortidor d'elució (10x)

Tris	30.3 g
Glicina	144.1 g
SDS	10 g
Aigua Milli-Q	fins a 1 litre

Aquesta barreja sol donar un pH al voltant de 8.3-8.5 i no s'ha d'ajustar amb HCl.

La composició de la solució preparada 10x és: Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS 0.1% (pH 8.3-8.5).

Dissolució E:

Amortidor d'aplicació de mostres (4x)

Tris	15 g
Glicerol 80% (v/v)	40 mL
SDS	8 g
Blau de bromofenol	0.05 g
Aigua Milli-Q	fins a 100 mL

El pH s'ajusta a 6.8 amb HCl.

La composició final de l'amortidor d'aplicació de mostres 4x és: Tris-HCl 120 mM, glicerol 40% (v/v), SDS 8% (p/v), blau de bromofenol 0.05% (p/v) (pH 6.8).

Dissolució F:

Blau de Comassie

Metanol 45% (v/v)

Àcid acètic 7% (v/v)
Aigua Milli-Q 45%
Coomassie Blue R-250 0.1% (p/v)

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

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

El gel separador al 15% d'acrilamida es va preparar barrejant les següents dissolucions (per a dos gels):

Dissolució A	8 mL
Dissolució B	4 mL
Aigua Milli-Q	4 mL
TEMED	6 µL
Persulfat amònic 10% (p/v)	64 µL

Es prepara l'aparell d'electroforesi i s'aboca la dissolució del gel separador en el suport evitant la formació de bombolles. Tot 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. Es deixa polimeritzar el gel i s'elimina la capa d'aigua amb paper secant.

El gel concentrador es va preparar tal i com s'indica a continuació (per a dos gels):

Dissolució A	0.6 mL
Dissolució C	1.5 mL
Aigua Milli-Q	3.9 mL
TEMED	6 µL
Persulfat amònic 10% (p/v)	60 µL

S'aboca el gel concentrador, es col·loca la pinta i es deixa polimeritzar.

Un cop els gels han polimeritzat, l'amortidor d'elució 10x es dissol 1/10 amb aigua Milli-Q i s'omple la cubeta d'electroforesi evitant la formació de bombolles en l'extrem inferior dels gels per tal d'impedir que aquestes puguin afectar el corrent electroforètic de les mostres.

Per preparar les mostres s'afegeix 1 volum d'amortidor d'aplicació de mostres (4x) per cada 3 volums de mostra. Les mostres s'escalfen durant 5 minuts a 90°C abans d'ésser carregades en el gel.

Es van utilitzar els marcadors prenyits de Bio-Rad: fosforilasa B (142.900 Da), Albúmina de sèrum boví (97.200 Da), ovoalbúmina (50.000 Da), anhidrasa carbònica (35.100 Da), inhibidor de tripsina de soja (29.700 Da) i lisozim (21.900 Da).

Les electroforesis es van fer córrer a temperatura ambient i amb una intensitat de corrent de 20 mA i es van aturar uns 5 minuts després que el colorant blau de bromofenol sortís del gel.

Tinció amb blau de Coomassie

Aquest mètode de tinció permet detectar fins

a 0.3-1 µg per bana de proteïna. Totes les etapes que s'indiquen a continuació es van dur a terme a temperatura ambient i amb agitació suau.

1. Fixar el gel submergint-lo durant un període mínim de 30 minuts en una solució fixadora (metanol 50%, àcid acètic 7%).
2. Retirar la solució fixadora i submergir el gel durant com a mínim 15 minuts en una dissolució de blau de Comassie.
3. Eliminar la solució de tinció i realitzar uns quants rentats amb àcid acètic 7% per tal d'eliminar l'excés de colorant.
4. Els gels es poden conservar per períodes de temps prolongats en àcid acètic 7% i a 4°C.

Determinació de l'activitat RNasa

Per a la determinació de l'activitat ribonucleasa, ja sigui de forma qualitativa o de forma quantitativa, es van emprar diferents mètodes:

ZIMOGRAMA: GEL DE

POLIACRILAMIDA-SDS AMB

POLI(C) REVELAT PER ACTIVITAT

Es tracta d'un sistema de detecció i seguiment de l'activitat ribonucleasa, el qual es basa en una tinció negativa. A més de l'elevada sensibilitat i especificitat, aquest sistema presenta l'avantatge respecte altres mètodes de detecció d'activitat ribonucleasa que, alhora que determina si una fracció és o no activa, permet visualitzar quina o quines espècies moleculars són 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 fraccions d'una purificació.

El mètode de tinció negativa de gels de poliacrilamida-SDS amb poli(C) (Bravo i col. 1994) que es detalla a continuació, 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 l'RNasa A, el poli(C), que s'afegeix durant el procés d'entrecruament de les cadenes d'acrilamida. Es tracta de separar primer, mitjançant una electroforesi convencional, les proteïnes. Llavors s'elimina l'SDS del gel 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 el gel amb colorants que tenyeixen els àcids nucleics.

1. Tot el material (vidres, separadors i pintes) s'ha de netejar amb etanol 70% abans de l'electroforesi. Tots els gels d'activitat s'han realitzat utilitzant separadors de 0.75 mm.
2. Es prepara un gel separador segons les especificacions següents:
 - a. Es dispensa en un vas de precipitats l'aigua i en un altre l'amortidor del gel separador i la solució d'acrilamida.
 - b. En el vas de precipitat 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 quant i pinces prèviament submergides en àcid nítric 30% i esbandides en aigua destil·lada.
 - c. Aquesta dissolució s'incuba tapada amb paper d'alumini en una estufa a 55°C durant 10 minuts. Aquest pas facilita la dissolució del poli(C).
 - d. Una vegada dissolt el poli(C), s'aboca sobre el vas que conté la barreja de la solució d'acrilamida i l'amortidor del gel separador.
 - e. S'afegeixen les quantitats de TEMED i persulfat amònic 10% que pertoquin i s'agita suaument la solució tot fent girar el vas sobre una superfície plana.
 - f. S'aboca la dissolució del gel separador en el suport i s'hi afegeix amb una pipeta Pasteur una fina capa d'aigua Milli-Q per tal de facilitar la polimerització i permetre que el front del gel no es deformi. Un cop polimeritzat s'elimina l'aigua amb un paper secant.
3. Es prepara el gel concentrador.
4. Les mostres es preparen amb amortidor d'aplicació de mostres 4x.
5. Les condicions d'electroforesi han estat les mateixes que les d'una electroforesi discontinua de poli(acrilamida)-SDS, corrent a 20 mA fins a 5 minuts després que el colorant blau de bromofenol surti del gel.
6. Per revelar el gel:
 - a. S'elimina el SDS del gel submergint aquest en amortidor Tris-HCl 10 mM, isopropanol 20% (pH 8.0), amb agitació suau. Aquest rentat dura 15 minuts i es realitza dues vegades, utilitzant 50-100 mL per a cada rentat.
 - b. L'isopropanol s'elimina incubant el gel en l'amortidor Tris-HCl 10 mM (pH 8.0) en agitació suau. Aquest rentat també dura 15 minuts 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 al màxim la difusió. El temps d'incubació va ser de 30 minuts.
 - d. Incubar el gel durant 10 minuts amb agitació, en amortidor Tris-HCl 10 mM (pH 8.0).
 - e. Els gels es tenyeixen per un període de 10-15 minuts, submergint-los en una dissolució de blau de toluidina 0.1% (p/v), Tris-HCl 10 mM (pH 8.0). Aquest

pas tenyeix el poli(C) que no ha estat digerit.

f. S'elimina l'excés de colorant, per mitjà de rentar 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.

Alternativament, 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) embolicada amb paper de plàstic transparent i il·luminant amb llum ultraviolada de 254 nm mitjançant una làmpada de llum UV 6W (Sankio Denki). Aquest sistema presenta l'avantatge que permet seguir l'aparició de les bandes d'activitat a mesura que aquestes es van generant, passant a la tinció amb toluidina quan creiem convenient, evitant problemes d'excés de digestió.

DETERMINACIONS ESPECTROFOTOMÈTRIQUES

Aquests estudis es van realitzar mitjançant un espectrofotòmetre Hewlett Packard 8452 A (EUA) equipat amb una cambra de cubetes termostatitzada i amb un detector tipus Diode Array.

Seguiment espectrofotomètric de la hidròlisi de citidina 2',3'-fosfat cíclic (C>p)

Els paràmetres cinètics de les ribonucleases utilitzant com a substrat C>p 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 C>p, corresponent a la segona etapa del mecanisme de catalisi de la ribonucleasa A, es mesura seguint l'increment d'absorbància a 296 nm produït pel trencament de l'enllaç cíclic i la formació de 3'-CMP. Les condicions d'assaig foren les següents:

Amortidor: Acetat sòdic 0.2 M (pH 5.5)

Substrat: Es van assajar 8 dilucions de C>p (Sigma Chemical Co., EUA) entre 0.1 i 3 mM en amortidor acetat sòdic 0.2 M (pH 5.5). Les concentracions de les diferents solucions es van comprovar a partir del coeficient d'extinció molar del substrat C>p a 268 nm: $\epsilon_{268} = 8650 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Wigler, 1968).

Enzim: La concentració final d'enzim fou de 0.1 μM per tots els casos assajats.

Volum de reacció: 1 mL de la reacció de substrat + 25 μL d'enzim. Les cubetes utilitzades foren de quars, amb 1 cm de pas de llum i 1 mL de capacitat.

Temps de reacció: La reacció és lineal durant 3-5 minuts a partir dels 20-30 segons. Es

van prendre mesures de 300 segons.

Unitats: V_{max} en mM/min, K_m en mM i k_{cat} en min^{-1} . Es va utilitzar l'increment d'absorció del 3'-CMP respecte al cCMP a 296 nm: $\epsilon_{296} = 516.4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Arús, 1981).

Seguiment espectrofotomètric de la hidròlisi de poli(C)

Els paràmetres cinètics es van determinar també espectrofotomètricament, utilitzant poli(C) com a substrat, mitjançant el mètode de mesura de la disminució d'absorbància a 294 nm (Boix, 1993). La determinació de l'activitat utilitzant com a substrat el poli(C) permet estudiar el mecanisme catalític de l'RNasa A enfront de substrats d'alt pes molecular. Les condicions d'assaig es descriuen a continuació:

Amortidor: acetat sòdic 0.2 M (pH 5.5)

Substrat: S'han assajat 8 dilucions de poli(C) (Sigma Chemical Co., EUA) entre 0.1 i 2.5 mg/mL en amortidor acetat sòdic 0.2 M (pH 5.5). Cal tenir molta cura al pesar el poli(C), utilitzant guants i pinces prèviament submergides en àcid nítric al 30% i esbandides amb aigua destil·lada.

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

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

Pel càlcul dels paràmetres K_m i V_{max} , tant en els assajos amb poli(C) com amb C>p, es va utilitzar el programa d'anàlisi 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.

Modelatge de l'estructura terciària per ordinador

Es va utilitzar una estació de treball de Silicon Graphics (model INDY, EUA) amb un processador R4000 a 100 MHz i amb el sistema operatiu IRIX 5.2.

SUBSTITUCIONS DE RESIDUS

Per tal de modelar l'estructura terciària de les variants de l'RNasa A, es va emprar d'entrada el programa TURBO-FRODO versió 5.5 (Roussel i Cambilleau, 1989). Aquest possibilita la visualització de gràfics a partir d'un arxiu de dades (anomenat Heap File), el qual pot incloure dades de cristal·lografia de raigs X, de ressonància magnètica nuclear o de modelats

d'estructures tridimensionals. En aquest treball es van emprar les dades cristal·logràfiques de l'RNasa A (codi PDB:7rsa) (Wlodawer i col. 1988), per bé que amb exclusió de les molècules d'aigua. Amb el mateix programa, es van reemplaçar els residus d'interès i es van generar les coordenades dels models (fitxers pdb) de les proteïnes variants estudiades en aquest treball.

MINIMITZACIÓ D'ENERGIA

Una vegada obtingudes aquestes coordenades per cadascuna de les proteïnes modificades, així com les de la proteïna salvatge, es van reajustar les seves distàncies intramoleculares per tal de trobar l'estructura més estable (és a dir, de mínima energia lliure). Es va permetre, en simulació per ordinador per mitjà del programa GROMOS (Groningen Molecular Simulations, 1991), que l'estructura del model de cada proteïna variant experimentés un número molt elevat de petites permutacions de la seva conformació mitjançant la rotació al voltant dels enllaços individuals (10 processos d'optimització, els quals cotnenen cadascun 1000 passos de minimització d'energia).

TRANSFORMACIÓ DE LES COORDENADES OPTIMITZADES A FORMAT PDB I ANÀLISI DEL MODEL GENERAT

A fi de poder visualitzar el modelat de l'estructura terciària de les proteïnes variants mitjançant el programa TURBO-FRODO, les coordenades moleculars optimitzades d'aquestes proteïnes es van transformar de nou en format pdb amb el programa XAM (Xia, 1992). A més, el programa XAM va permetre estimar l'àrea accessible al solvent a partir dels models optimitzats de les proteïnes.