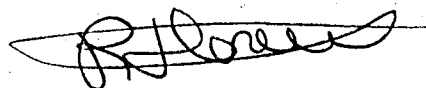


UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
FACULTAT DE CIÈNCIES

**"ESTUDI DE LA TOPOGRAFIA  
DELS SETIS DE FIXACIÓ DE LA  
RIBONUCLEASA A PER MARCATGE  
AMB NUCLEÒSIDS i NUCLEÒTIDS  
PURÍNICS HALOGENATS"**

Treball de Tesi presentat per adquirir el grau de doc-  
tor en Ciències Biològiques per RAFAEL DE LLORENS  
DURAN, llicenciat en Ciències Biològiques.


Treball realitzat al Departament de Bioquímica de la  
facultat de Ciències de la UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE  
BARCELONA i a l'INSTITUT DE BIOLOGIA FONAMENTAL VILLAR  
PALASÍ, sota la direcció del Dr. C.M. CUCHILLO i la co-  
direcció del Dr. X. PARÉS.



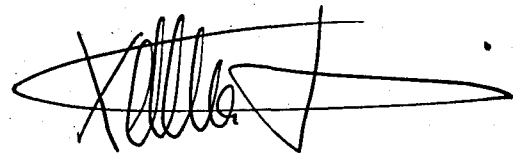
signat: R. DE LLORENS DURAN

Vist i plau del director

Vist i plau del co-director



Dr.  
CLAUDI M. CUCHILLO



Dr.  
XAVIER PARÉS CASASAMPERA

Barcelona, a 21 de Juny de 1983.



## AGRAÏMENTS

Vull expressar el meu agraïment a.

El Dr. Claudi M. CUCHILLO per iniciar-me en el treball de recerca, per la direcció d'aquesta Tesi Doctoral i per la correcció i discussió de la present memòria.

El Dr. Xavier PARÉS per la co-direcció i per la correcció i discussió de la present memòria.

Tots els companys del Departament de Bioquímica i de l'Institut de Biologia Fonamental "Villar Palasí" per la seva "immensa paciència!" i col.laboració.

L'Amadeu DOMÈNECH per l'iniciació en el món de l'informàtica, i d'altres.

Lluís SANZ per l'ajut en la confecció de les gràfiques tridimensionals.

La Carmen BALAGUÉ, ...

La família.

I, evidentment, a la Montse GARCIA, ... per tot i més.

# ÍNDEX GENERAL

Pàg.

Abreujaments

Índex de Taules

Índex de Figures

I.	INTRODUCCIÓ .....	1
I-1	Les Ribonucleases .....	2
I-2	La Ribonucleasa A .....	3
I-2.1	Obtenció de l'enzim .....	4
I-2.2	Obtenció de derivats per rotura enzimàtica de la RNAasa A .....	6
I-2.3	Mecanisme de catàlisi .....	7
I-2.4	Estudis per modificació química	
	Identificació del centre actiu .....	9
I-2.4.a	Aspectes generals de la modificació química .....	11
I-2.4.b	Estudi de la reactivitat de diferents grups de la RNAasa A .....	13
I-2.4.b.1	Reactivitat dels residus del centre actiu .....	13
I-2.4.b.2	Els residus bàsics i el seu paper en l'enzim .....	14
I-2.5	Estructura tridimensional .....	19
I-2.6	Estudis per ressonància magnètica nuclear (RMN) .....	20
I-2.7	Proves de l'existència d'un seti fixador de purines .....	20
I-2.8	Marcatge per afinitat .....	23
I-2.8.a	Aplicació de la tècnica de marcatge per afinitat a la RNAasa A .....	29
I-2.8.b	Reacció RNAasa A - Cl <sup>16</sup> -RMP a pH 5,5	33
I-3	Objectius de la Tesi .....	34

II.	MATERIALS I MÈTODES .....	36
II-1	Preparació de Ribonucleasa A: Purificació de l'enzim .....	37
II-2	Síntesi 2',3' Cp .....	38
II-3	Obtenció de l'RNA .....	39
II-4	Síntesi i purificació del mononu- cleòtid halogenat Cl <sup>6</sup> -RMP .....	39
II-5	Preparació de Ribonucleasa S. Separació del S-Pèptid i S-Proteïna	41
II-6	Espectrofotometria a l'ultraviolat	42
II-6.1	Espectrofotometria de diferència ..	42
II-6.2	Determinació de l'activitat enzi- màtica .....	44
II-6.2.a	Tècnica espectrofotomètrica emprant 2',3' fosfat cíclic (2',3' Cp) com a substrat .....	44
II-6.2.b	Tècnica espectrofotomètrica emprant RNA i POLI-C com a substrat .....	45
II-6.2.c	Tècnica espectrofotomètrica emprant dinucleòsids monofosfat com a substrat .....	45
II-6.3	Determinació de les constants cinè- tiques per a la hidròlisi del 2',3' Cp catalitzada per l'enzim natiu o derivat sota estudi .....	46
II-6.4	Determinació de les constants cinè- tiques de la hidròlisi de l'RNA ca- talicada per l'enzim natiu o el derivat sota estudi .....	47
II-7	Diàlisi .....	48
II-8	Liofilització .....	48
II-9	Reacció entre la Ribonucleasa A i el Cl <sup>6</sup> -RMP a pH 7,4 .....	48
II-9.1	Separació i purificació del derivats obtinguts .....	49
II-10	Reacció Ribonucleasa A - Cl <sup>6</sup> -RMP a diferents pH's .....	50
II-11	Reacció Ribonucleasa A - Cl <sup>6</sup> -RMP en presència d'AMP .....	51
II-12	Reacció Ribonucleasa A - 6 Cloro- purina ribosa .....	51
II-13	Control d'estabilitat de la Ribonu- cleasa A i dels marcadors 6-Cloro- purina ribosa i Cl <sup>6</sup> -RMP en les con- dicions de reacció .....	52

II-14	Determinació del coeficient d'extinció molar de diferents derivats obtinguts .....	52
II-15	Electroforesi de proteïnes en gels de poliacrilamida en presència de SDS .....	53
II-16	Determinació de l'aminoàcid N-terminal de la Ribonucleasa A i dels derivats obtinguts .....	54
II-17	Hidròlisi triptíca de la Ribonucleasa A i dels derivats obtinguts ..	56
II-17.1	Obtenció d'àcid perfòrmic .....	57
II-17.2	Hidròlisi triptíca .....	58
II-18	Estudis per ressonància magnètica nuclear (RMN) .....	59
II-19	Elaboració de les gràfiques tridimensionals de la Ribonucleasa A ...	60
III.	RESULTATS I DISCUSSIÓ .....	63
III-1	Preparació de Ribonucleasa A .....	64
III-2	Propietats espectrofotomètriques dels derivats obtinguts per reacció de la RNAasa A amb 6-Cloropurina ribosa i Cl6-RMP .....	65
III-2.1	Espectres de diferència .....	67
III-3	Consideracions sobre els grups amí de les lisines .....	68
III-4	Reacció RNAasa A - Cl6-RMP a pH 7,4 en presència d'AMP .....	71
III-5	Estudi de l'efecte de la concentració de Cl6-RMP sobre l'activitat de la RNAasa A en solució .....	72
III-6	Reaccions de marcatge per afinitat de la Ribonucleasa A amb Cl6-RMP a diferents pH's .....	75
III-6.1	Control d'estabilitat del marcador (Cl6-RMP) en les condicions de reacció .....	76
III-6.2	Reacció Ribonucleasa A - Cl6-RMP a pH: 8,0; 8,5 i 9,0 .....	77
III-6.2.a	Reacció Ribonucleasa A - Cl6-RMP a pH 8,0. Caracterització de les fraccions obtingudes .....	77
III-6.2.a.1	Purificació de la Fracció Ia .....	79

III-6.2.a.2	Repurificació de la Fracció IIa ...	82
III-6.2.b	Reacció Ribonucleasa A - C16-RMP a pH 8,5. Caracterització de les fraccions obtingudes .....	82
III-6.2.b.1	Purificació de la Fracció Ib .....	83
III-6.2.b.2	Repurificació de la fracció IIb ...	83
III-6.2.c	Reacció Ribonucleasa A - C16-RMP a pH 9,0. Caracterització de les fraccions obtingudes .....	83
III-6.2.c.1	Purificació de la Fracció Ic .....	84
III-6.3	Estudi dels resultats .....	85
III-7	Reacció Ribonucleasa A - C16-RMP a pH 7,4. Caracterització dels derivats "X" .....	87
III-7.1	Purificació de la fracció II .....	87
III-7.1.a	Caracterització de les fraccions obtingudes .....	87
III-7.1.a.1	Caracterització espectrofotomètrica de les fraccions X1, X2, X3, X4 i Derivat II .....	87
III-7.1.a.2	Espectres de diferència .....	89
III-7.1.a.3	Determinació del coeficient d'extinció molar del derivats II i X4 .	90
III-7.1.a.4	Caracterització cinètica dels derivats "X" .....	90
III-7.1.a.5	Caracterització cinètica dels derivats X4 i II. Determinació de les constants cinètiques de la hidròlisi del 2',3' Cp i RNA catalitzades per l'enzim natural, el Derivat X4 i el Derivat II .....	93
III-7.1.a.6	Obtenció de l'S-Pèptid i S-Proteïna dels derivats X4, II i de la RNAasa A .....	98
III-8	Reacció RNAasa A - 6-Cloropurina ribosa .....	101
III-8.1	Repurificació de les fraccions E i F .....	103
III-8.1.a	Caracterització espectrofotomètrica de les fraccions E, E', F i F' ....	103
III-8.1.b	Espectres de diferència de les fraccions E i F .....	104

III-8.1.c	Determinació de l'aminoàcid N-terminal de la RNAasa A i dels derivats F, F', E, XF i X4 .....	110
III-8.1.d	Obtenció de l'S-Pèptid i S-Proteïna del Derivat F .....	111
III-8.1.e	RMN aplicada a l'estudi de proteïnes Estudi per ressonància magnètica nuclear (RMN) de protó de l'S-Pèptid natural i dels S-pèptids dels derivats II i F .....	112
III-8.1.e.1	RMN de l'S-Pèptid natural, de L'S-Pèptid II i de l'S-Pèptid F .....	113
III-8.1.e.2	Estudi comparatiu dels espectres de L'S-Pèptid natural i de l'S-Pèptid F .....	122
III-8.1.f	Determinació del coeficient d'extinció molar ( $\epsilon$ ) dels Derivats F i E .....	126
III-8.1.g	Caracterització cinètica dels Derivats F, F' i II .....	126
III-8.1.g.1	Determinació de les constants cinètiques de la hidròlisi del 2',3' Cp i RNA catalitzades pels Derivats F i E .....	127
III-9	Gràfiques tridimensionals .....	134
IV.	DISCUSSIÓ FINAL .....	135
IV-1	Experiments amb DNA .....	142
IV-2	Efecte de la concentració de marcador sobre l'activitat de la RNAasa A en solució .....	145
IV-3	Reacció entre la RNAasa A i el C16-RMP en presència d'AMP .....	148
IV-4	Comparació entre els Derivats F i II .....	149
IV-5	Reacció entre la RNAasa A i el C16-RMP a pH 7,4 .....	150
IV-5.1	Intent de localització d'altres possibles sub-setis .....	158
V.	CONCLUSIONS .....	168
VI.	BIBLIOGRAFIA .....	172
VII.	APÈNDIX .....	190

## ABREUJAMENTS

A 280 nm	Absorbancia a 280 nanometres
AMP	Adenosina 5'-monofosfat
CL6-RMP	6-Cloropurina ribosid 5'-monofosfat
CM-cel.lulosa	Carboximetil-cel.lulosa
CM-Sepharose	Carboximetil-Sepharose
2',3' Cp	Citidina 2',3' fosfat cíclic
2' CMP	Citidina 2'-monofosfat
3' CMP	Citidina 3'-monofosfat
CpA	Citidilil (3'-5') adenosina
CpC	Citidilil (3'-5') citidina
CpG	Citidilil (3'-5') guanosina
CpU	Citidilil (3'-5') uridina
Kcat	Constant catalítica
Km	Constant de Michaelis
RNAasa	Ribonucleasa
RMN	Ressonancia Magnética Nuclear
Tris	Tris (hidroximetil) aminometà
UpcA	Derivat fosfonat de uridilil (3'-5') adenosina
UV	Ultraviolat
$\epsilon$	Coefficient d'extinció molar
$\lambda$	Longitud d'ona
$\#$	= # (en els llistats dels programes)



## ÍNDIX DE TAULES

<u>TAULA</u>	<u>PÀG</u>
1 .....	30
2 .....	69
3 .....	70
4 .....	73
5 .....	78
6 .....	80
7 .....	84
8 .....	88
9 .....	91
10 .....	94
11 .....	94
12 .....	96
13 .....	97
14 .....	100
15 .....	102
16 .....	104
17 .....	105
18 .....	108
19 .....	114
20 .....	118
21 .....	126
22 .....	128
23 .....	129
24 .....	154
25 .....	155

## INDEX DE FIGURES

FIGURA	DARRERA DE LA PAGINA	FIGURA	DARRERA DE LA PAGINA
-----	-----	-----	-----
1	5	37	119
2	7	38	122
3	8	39	129
4	8	40	137
5	19	41	140
6	19	42	146
7	21	43	153
8	24		
9	29		
10	33		
11	39		
12	64		
13	67		
14	71		
15	77		
16	79		
17	81		
18	82		
19	87		
20	87		
21	87		
22	89		
23	97		
24	98		
25	98		
26	99		
27	101		
28	103		
29	104		
30	107		
31	110		
32	111		
33	111		
34	111		
35	113		
36	119		

[ INTRODUCCIÓ ]

**-I- INTRODUCCIÓ**

## I-1 LES RIBONUCLEASES

Les ribonucleases constitueixen una classe d'enzims ampliament distribuïts en animals, plantes i microorganismes, i que catalitzen la degradació dels àcids ribonucleics.

Caldria, d'entrada, distingir entre les RNAases de vertebrats extracel.lulars i intracel.lulars. Les primeres són secretades pel pàncreas i les glàndules salivars de tots els mamífers i també es troben al tracte duodenal, serum, ronyó i orina. En els vertebrats, aquests enzims són els responsables de la digestió de l'àcid ribonucleic present en l'aliment. Però s'ha observat que la quantitat de ribonucleases presents en el pàncreas es molt variable entre espècies de la mateixa família. Mentre que l'home, gos, gat i conill tenen una quantitat inferior a 5 mg per gram de pàncreas, moltes espècies de bòvids i altres rumugants tenen més de 600 mg/Kg (BEINTEMA et al., 1973).

Aquesta alta concentració ha estat explicada d'acord amb que l'enzim tindria una funció específica en la fisiologia dels rumugants. Quasi tot el nitrogen proteic ingerit és assimilat per la flora bacteriana, en la qual el nitrogen present en l'RNA representa un 14% del total.

Aquests bacteris són posteriorment digerits en el ver-tader estómac. Així, la funció de la RNAasa present a alts nivells en els rumugants no seria la degradació de l'RNA de la dieta, present en poca quantitat, ans un reciclatge, o una utilització del fòsfor i nitrogen de la gran massa bacteriana, que seria essencial per l'animal com a font d'aquests dos elements (BARNARD, 1969).

Els alts nivells presents en animals no rumugants (per exemple de digestió ileocecal) s'explicaria de la mateixa manera. BEINTEMA et al. (1973) confirmen i amplien aquesta hipòtesi.

Per a les RNAases intracel.lulars BARNARD (1969) proposa les següents funcions:

- a) Degradació de l'RNA missatger.
- b) Defensa contra l'RNA viral.
- c) Una funció digestiva intracel.lular general.

## I-2 LA RIBONUCLEASA A

La Ribonucleasa A és el principal component del pàncreas boví amb activitat ribonucleàsica. Ja al 1891 SALKOWSKI havia observat "ferments" que afectaven l'àcid nucleic de llevat, però normalment es cita com el principi dels estudis de la RNAasa pancreàtica el treball de JONES (1920) que va descobrir que el pàncreas contenia un enzim termoestable que atacava l'RNA.

DUBOS i THOMPSON (1938) el varen anomenar ribonucleasa i KUNITZ (1940) la cristal·litzà. Aquest fet, junt amb la idea de que era essencial tenir quantitats suficients de proteïna pura per a poder estudiar-la amb detall va induir a una casa comercial (Armour Inc.) a preparar, als voltants de 1950, un quilogram d'enzim en forma cristal·lina amb un alt grau de puresa, que va oferir a alguns membres de la comunitat bioquímica per a que l'utilitzés. El resultat va ésser una vertadera "explosió" d'estudis que s'ha perllongat fins avui i que ha permès el desenvolupament de moltes tècniques d'ús comú en l'actualitat.

Aquest enzim és una proteïna de baix pes molecular, és relativament senzilla de purificar i és bastant estable.

S'ha de tenir en compte que les proteïnes presenten una gran varietat en el grau d'estabilitat. En general, les més petites són mes resistents. Les extracel·lulars tenen molt sovint un gran percentatge de ponts di-sulfur i són relativament més estables que les intracel·lulars (MEANS & FEENEY 1971).

Per tots aquests fets, la RNAasa A ha sigut una de les proteïnes mes estudiades. Va ésser el primer enzim i la segona proteïna (després de la insulina) de la qual es va conèixer la seqüència (REDFIELD & ANFINSEN, 1956; ANFINSEN et al., 1956; HIRS et al., 1960; SPACKMAN et al., 1960) i el primer en ésser sintetitzat químicament (HIRSCHMANN et al., 1969; GUTTE & MERFIELD, 1969). La seqüència completa es va publicar al 1960 i la formulació definitiva al 1963 (SMYTH et al.) (Figura 1).

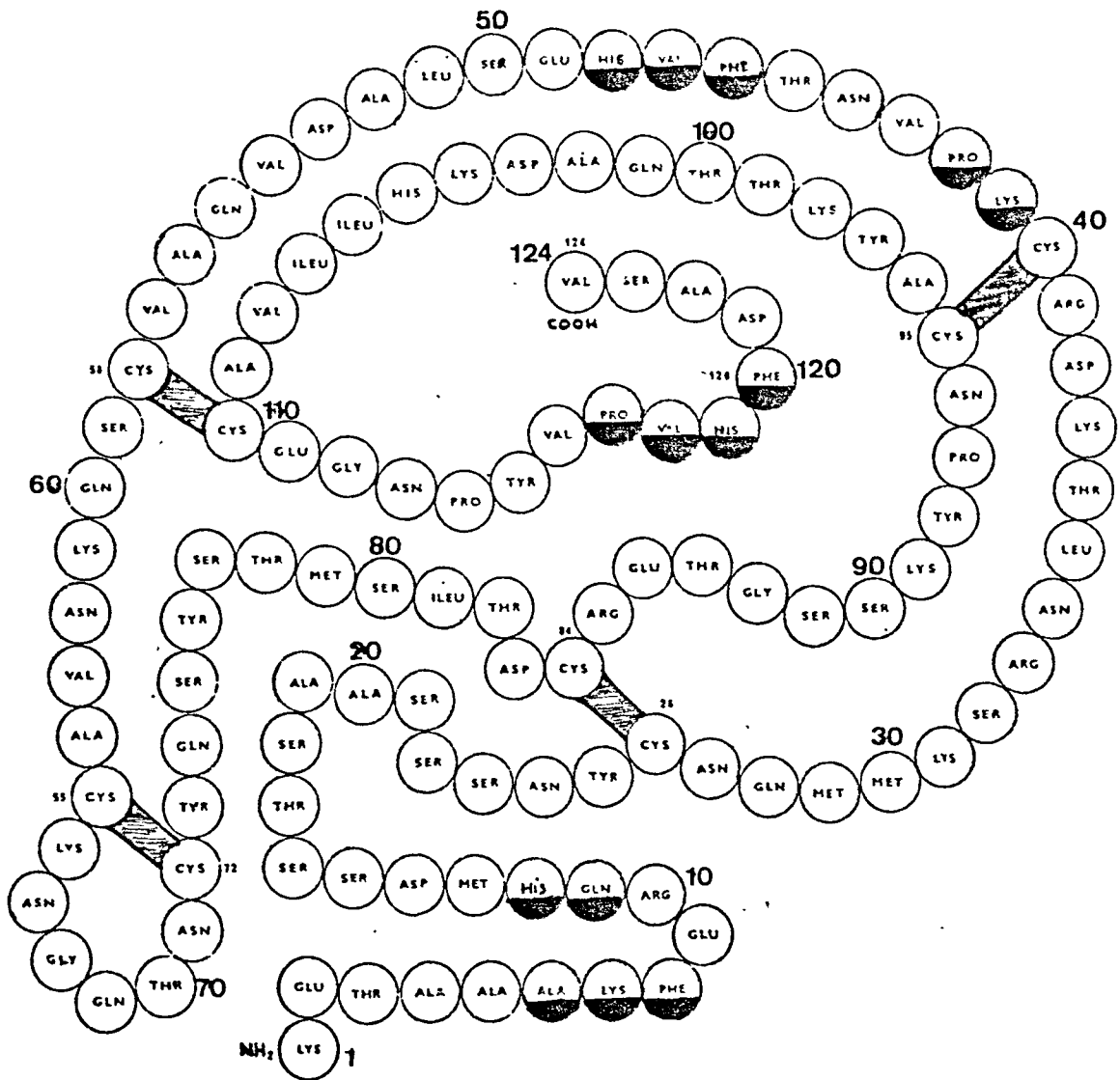


FIGURA-1

Estructura covalent de la Ribonucleasa A de pàncreas boví (prés de KARTHA et al. 1967).  
 (Els cercles ombrejats assenyalen els residus que en 1967 es consideraven constituents o propers del centre actiu).

## [ INTRODUCCIÓ ]

La RNAasa A té una sola cadena polipeptídica de 124 Aas, és de forma globular, més o menys arronyonada d'uns 3,8 x 2,8 x 2,2 nm de tamany (BLACKBURN, 1976). Té un pes molecular de 13.680 i un punt isoelèctric de 9,6 (TANFORD & HAUENSTEIN, 1956). Posseeix 8 residus de cisteïna que donen lloc a 4 ponts di-sulfur intracatenaris a les posicions 26-84, 40-95, 58-110 i 65-72.

### I-2.1 OBTENCIÓ DE L'ENZIM

El producte obtingut a partir de pàncreas boví, pel mètode de McDONALD (1955) pot ésser cristal·litzat, però les anàlisis cromatogràfiques assenyalen que la preparació no és homogènia (MARTIN & PORTER, 1951; HIRS et al., 1951).

HIRS et al. (1953), fent servir la resina de bescanvi iònic IRC-50, obtingueren dues fraccions, una de principal que denominaren A i una de minoritària, que era eluïda més ràpidament, denominada B. Estudis posteriors (PLUMMER & HIRS, 1963) varen demostrar que la part proteica de B era indiferenciable de la de la A, i amb la mateixa activitat enzimàtica. La diferència estribava en que la B estava glucosilada en la Asn-34.

TABORSKY (1959), utilitzant la CM-cel·lulosa com a resina de bescanvi iònic, trobà també una fracció majoritària que denominà D, corresponent a l'A abans esmentada.

Posteriorment fou demostrada la completa puresa i homogeneïtat d'aquest component, que ha sigut l'utilitzat en aquesta Tesi. Els components amb activitat ribonucleàsica, presents en més baixa quantitat en el pàncreas boví, són glucoproteïnes amb la part proteica indiferenciable de la RNAasa A (PLUMMER & KOSINSKI, 1968).

La RNAasa B és el component glucoproteic majoritari obtingut en la purificació clàssica de TABORSKY. La cadena de carbohidrats té un efecte negligible en la conformació de la molècula (BERMAN, 1981).

La RNAasa B està glucosilada en la Asn-34, doncs la unió dels carbohidrats a les proteïnes sembla tenir un requeriment específic per a la seqüència Asn-X-Ser/Thr (BEINTEMA,

## [ INTRODUCCIÓ ]

1973) i la cadena de sucres està formada per dues glucosamines i 6 residus de manosa (PLUMMER & HIRS, 1964). Altres components glucosilats, presents en menor quantitat, tenen diferent composició en carbohidrats.

Ha estat suggerit (SIERAKOWSKA, 1977) que les variacions en el grau de glucosilació pot ésser explicat en termes d'avantatge selectiu, ja que els carbohidrats evitarien una ràpida absorció per la paret intestinal, la qual cosa permet que l'enzim arribi al budell llarg, on podria digerir l'RNA de la flora cecal. D'aquí les RNAases amb gran contingut en carbohidrats que es troben en les espècies amb digestió cecal, tal com el cavall i el porc (BEINTEMA, 1976).

També és possible, comparant la resistència a la degradació proteolítica de les RNAases A i B, pensar en que la presència de carbohidrats confereixi una protecció significativa contra les proteases (BIRKELAND, 1975).

HAUGEN & HEATH (1979) troben que en sistemes in vitro es sintetitza una RNAasa amb 25 aminoàcids de més en l'extrem amino-terminal, que es un precursor de l'enzim. Aquesta proteïna més llarga solament es forma en absència de membranes. En un sistema in vivo el pèptid senyal N-terminal es hidrolitzat abans de que finalitzi la síntesi del C-terminal. Aquesta perllongació de la cadena aminoacídica funcionaria com un senyal que facilitaria la unió del polisoma en el reticle endoplàsmic i la penetració del precursor en l'interior del reticle. A continuació tindria lloc l'atac per enzims proteolítics, així com la introducció de carbohidrats a la molècula proteica per part dels sistemes enzimàtics associats a la membrana microsomal. Posteriorment es dirigiria a l'aparell de Golgi, per després formar els grans de zimògen. EYLAR (1965) suggereix que la inclusió de sucres facilitaria la sortida de la proteïna de la cèl.lula.

Pero UY & WOLD (1977) comenten que (tal com és el cas de la RNAasa bovina) respecte de l'aspecte específic del processat d'una proteïna es planteja un problema general, donat que tant sols es modifica una part de molècules d'un tipus. Així, la RNAasa pancreàtica bovina es secreta com una barreja de formes no glicosilades (aprox. 85%) i formes glicosilades (PLUMMER et al., 1963; PLUMMER & KOSINSKI, 1968). Per tant, això posa en dubte el significat de les anteriors hipòtesis.



## [ INTRODUCCIÓ ]

### I-2.2 OBTENCIÓ DE DERIVATS PER ROTURA ENZIMÀTICA DE LA RNAasa A

S'han obtingut diversos derivats per rotura enzimàtica selectiva de la RNAasa A. El més estudiat es l'anomenada Ribonucleasa S, producte de l'atac de l'enzim per part de la proteasa bacteriana subtilisina (RICHARDS & VITHAYATHIL, 1959). El resultat és la rotura de l'enllaç covalent entre els aminoàcids 20 i 21. La Ribonucleasa S pot separar-se en els seus dos fragments constituents: del residu 1 al 20, o S-pèptid, i la porció 21 a 124, o S-proteïna. Cada fragment, per separat, és inactiu (BERNFELD, 1965). Barrejats ambdós fragments en quantitats equimoleculars, a pH neutre i temperatura ambient, es recupera totalment l'activitat enzimàtica (RICHARDS & VITHAYATHIL, 1959). Aquest fet indica que existeix una forta interacció, no covalent, entre ambdós fragments peptídics, que mantindria l'estructura tridimensional de la proteïna en la seva conformació natural. De fet, la conformació de la RNAasa S és molt similar a la de la RNAasa A, però presenta l'extrem N-terminal en una posició més allunyada del bloc principal de l'enzim (CARLISLE et al., 1974), que determina un menor grau d'interacció entre el segment N-terminal i la resta de la molècula.

Aquest sistema permet estudiar la interacció S-proteïna S-pèptid modificat (o viceversa), per tal de determinar el paper jugat per cada aminoàcid. Aquestes modificacions poden ésser modificacions químiques dels residus aminoacídics, o obtenció de S-pèptids sintètics, en els que manqui un residu (o més), o s'hagi substituït un residu per un altre.

## [ INTRODUCCIÓ ]

### I-2.3 MECANISME DE CATÀLISI

La RNAasa A (EC 3.1.27.5) és una endonucleasa que catalitza la hidròlisi del seu substrat natural, l'àcid ribonucleic (RNA) de cadena senzilla, en dues etapes (Figura 2). Així doncs, la rotura de l'enllaç internucleotídic de l'RNA és essencialment una transfosforilació, o la hidròlisi d'un enllaç fosfodièster entre dos nucleòtids, i la transferència de l'enllaç èster fosfòric des de la posició 5' d'un nucleòtid a la posició 2' del nucleòtid adjacent, formant-se poli i mononucleòtids amb grups fosfodièster 2',3' cíclics terminals (BROCKLEHURST, 1963). En el segon pas, aquests èsters fosfat cíclics són hidrolitzats donant els corresponents nucleòsids 3'-fosfat.

L'enzim només trenca l'enllaç internucleotídic quan la base del ribonucleòtid en posició 3' és una pirimidina (MARKHAM & SMITH, 1952; BROWN & TODD, 1953; TAKEMURA et al., 1959; HUMMEL & KALNITSKY, 1964). Aquesta especificitat de l'enzim és tant sols explicable per la presència en la ribonucleasa d'un seti específic fixador dels nucleòtids pirimidínics.

La utilització d'un substrat tan heterogeni com l'RNA feia difícilment interpretables les característiques cinètiques de l'enzim, motiu pel qual es van emprar substrats més petits, tals com la citidina 2',3' fosfat cíclic (2',3' Cp) i els dinucleòsids monofosfat CpA, CpG, CpC, CpU, UpA, UpG, UpC i UpU.

Han estat proposats diversos mecanismes de catàlisi per a la RNAasa A. Cal citar com a processos acceptats que la His-119 protonaria parcialment el grup que surt (O5'R) en la primera fase de la catàlisi, mentre que tindria l'efecte oposat sobre una molècula d'aigua a la segona fase de la catàlisi. L'acció de la His-119, a la primera fase, debilitaria l'enllaç P-O5' i facilitaria l'atac "in line" del O2' sobre el fòsfor. La funció del NH de l'enllaç peptídic 119-120 juntament amb la Gln-11 (a través d'una molècula d'aigua), tindria com a funció la d'augmentar l'electrofilicitat del fòsfor, ajudant a l'atac de l'O2' sobre el P.

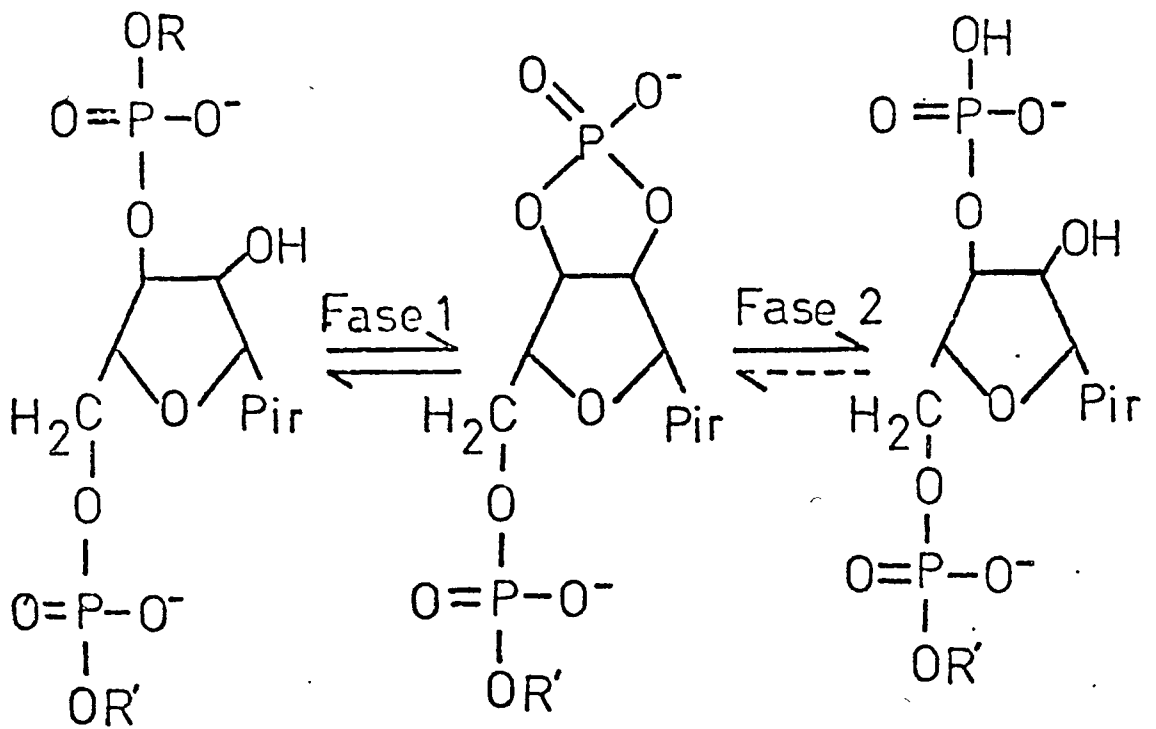


FIGURA-2

Hidròlisi de l'RNA per la Ribonucleasa A en dues fases.

R i R': cadena de polinucleòtid  
 Pir : pirimidina

## [ INTRODUCCIÓ ]

La His-12 desprotonaria l'O2' en la primera fase de la catàlisi i el protonaria en la segona. El carbonil de l'enllaç peptídic corresponent a la Thr-45 mantindria la His-12 en posició correcta per a la catàlisi. La bipiràmide trigonal seria el compost intermediari obligatori en les dues fases de la catàlisi i seria estabilitzada principalment per la Lys-41. Els estudis del grup de MARCHIORI (MARCHIORI et al., 1974) proposen que la Lys-7 podria intervenir també en aquesta estabilització.

A la Figura 3 es presenta en esquema un resum dels coneixements actuals sobre el mecanisme d'acció durant la primera fase de la catàlisi (DEAKYNE & ALLEN, 1979). El procés segueix un mecanisme de catàlisi àcid-base general per part de la His-12 i la His-119 que actuen de forma concertada com àcid o com base segons sigui la primera o segona fase. Està acceptat que a les dues fases hi ha un complex intermediari, semblant a l'estadi de transició, en el que el fosfat adopta una configuració en forma de bipiràmide trigonal (Figura 4) (USHER et al., 1970).

Tots aquests fets proporcionen una explicació al mecanisme catalític de l'enzim, però no donen resposta al problema de l'especificitat.

El lloc específic d'unió de la base pirimidínica va ésser determinat per ALLEWELL (1968) per a la RNAasa S mitjançant la difracció de raigs X. Semblen estar-hi implicats ponts d'hidrogen entre la pirimidina i els residus dels aminoàcids Thr-45 i Ser-123 i, probablement, una interacció entre la Phe-120 i l'anell de la pirimidina. Aquesta probabilitat va ésser també suggerida pels treballs de RUTERJANS & WITZEL (1969), MEADOWS et al. (1969) i HAAR et al. (1974) mitjançant la resonància magnètica nuclear.

Mitjançant estudis espectrals a l'ultraviolat DEAVIN et al. (1968) van postular una interacció entre la posició 3 o 4 de les pirimidines amb un grup bàsic de l'enzim en mitjà parcialment hidrofòbic (vàlid per a la uridina però no per a la citidina).

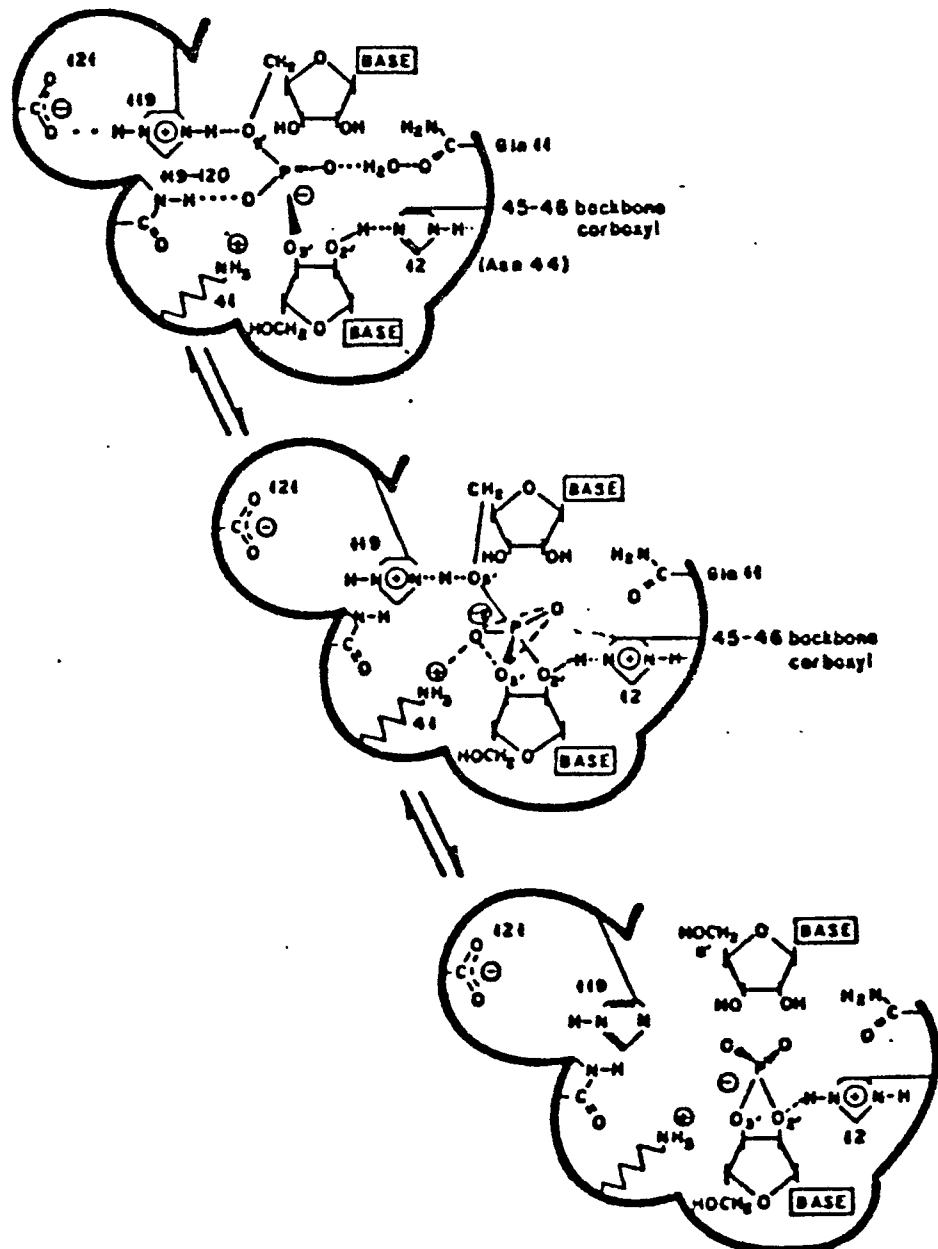
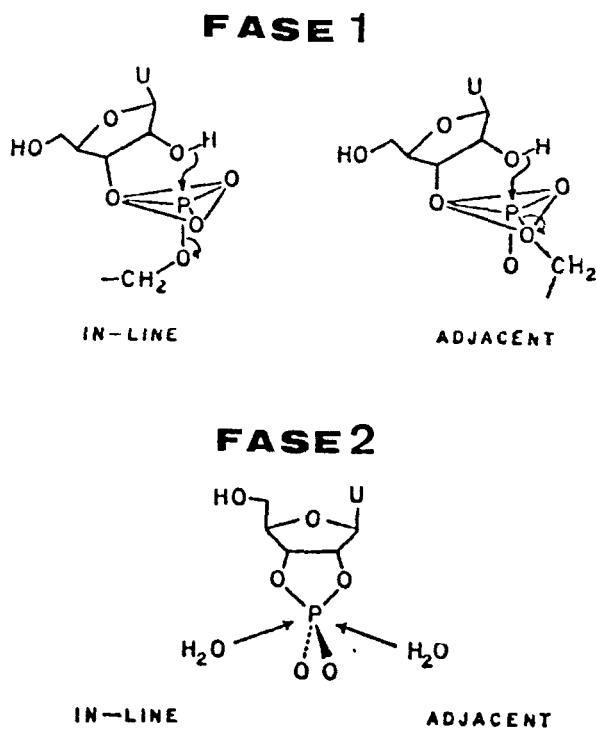


FIGURA-3

Mecanisme de catalisi de la Ribonucleasa A per a la primera fase de la reacció. (Esquema prè de DEAKY-NE & ALLEN, 1979).



**FIGURA-4**

Esquema amb les dues possibilitats per l'estereoquímica de l'acció de la Ribonucleasa A en la primera i segona fases de la catalisi (prés d'USHER et al., 1970). Les evidències experimentals recolzen la configuració "in-line".

## [ INTRODUCCIÓ ]

Cal assenyalar també que els experiments fets per WITZEL & BARNARD (1962 a i b) i FOLLMAN et al. (1967) amb dinucleòsids monofosfat com a substrats per a la primera fase de la catàlisi indicaren que la velocitat d'hidròlisi era funció del nucleòsid que ocupa la posició 5', essent l'ordre: adenina > guanina > citosina > uracil.

De tot el qual es pot deduir que la ribonucleasa posseeix un seti secundari de fixació del substrat (essent el primari el que reconeix les pirimidines en 3'), amb el que possiblement interaccionarien tots els nucleòtids en posició 5', però que seria extraordinàriament específic pels nucleòtids amb base purínica.

### I-2.4 ESTUDIS PER MODIFICACIÓ QUÍMICA

#### IDENTIFICACIÓ DEL CENTRE ACTIU

El fet fonamental d'una reacció catalitzada per un enzim es que té lloc mitjançant un complex actiu format per la combinació del substrat amb una regió de la molècula enzimàtica (el centre actiu o el seti d'unió) (KOSHLAND, 1960) per la qual té una afinitat específica. El centre actiu és, normalment, una estructura complicada que inclou una part apreciable de tota la molècula enzimàtica. Ja que diferents punts de la molècula de substrat estaran units a diferents punts del centre actiu de l'enzim, el substrat ocuparà una posició concreta respecte de l'enzim i amb una configuració definida.

L'elucidació del mecanisme d'acció d'un enzim requereix un detallat coneixement de l'estructura química i tridimensional i particularment del centre actiu; informació obtinguda en varis casos per estudis de seqüència i cristal·lografia de raigs X. L'estudi de formes mutants de l'enzim (que difereixen en la seva seqüència) ens proporciona informació de l'efecte en l'activitat quan és substituït un aminoàcid particular per altres (WELLING, 1975).

## [ INTRODUCCIÓ ]

També és important tenir informació de l'estructura tridimensional del complex enzim-substrat, tal com ha estat obtinguda en alguns casos per raigs X. Podem llavors apreciar quins grups estan involucrats en la formació d'aquest complex i com el substrat adopta la correcta posició per a que la reacció tingui lloc. Per comparació amb les estructures de l'enzim i substrat lliures es pot veure com la forma de la molècula de substrat és modificada per la combinació amb el centre actiu i, recíprocament, com la de l'enzim és canviada per combinació amb el substrat.

Tan difícil com definir els límits en que ha d'ésser considerat el centre actiu, és definir experimentalment el paper jugat per un residu particular amb certesa. Probablement el centre actiu només compren, en qualsevol enzim, una part de l'estructura proteica. El seu tamany exacte varia amb la complexitat i especificitat de la reacció enzimàtica, essent probablement més petit en enzims que actuen sobre substrats de baix pes molecular amb una petita especificitat, i gran per reaccions complexes, d'una considerable especificitat.

Els aminoàcids del centre actiu poden tenir dues funcions:

- a) Interaccionar amb les molècules de substrat.
- b) Catalitzar la modificació química del substrat.

El residu (o residus) responsable de la modificació química ha d'estar, per a que la reacció tingui lloc, en una aliniació precisa i mantenint enllaços apropiats amb el substrat. Molt probablement aquest encaix es dinàmic, en el qual les atraccions i repulsions mútues entre els grups del substrat i de l'enzim porten vers la formació del complex en el que la geometria del centre actiu és diferent d'aquella existent en l'enzim natiu. Si el compost fixat no indueix el correcte aliniament dels residus implicats en la modificació química, l'acció enzimàtica no té lloc, malgrat que tingui lloc la unió (SINGER, 1967).



## [ INTRODUCCIÓ ]

VALLEE & RIORDAN (1969) fan la següent classificació:

- Centre de catàlisi: aquells àtoms o grups laterals de la proteïna directament involucrats en la catàlisi (formació o trencament d'enllaços).
- Centre actiu: aquells grups involucrats en la interacció amb el substrat i catàlisi (aquesta definició inclou el centre de catàlisi).
- Centre de fixació: els grups involucrats directament en la unió no covalent del substrat al centre actiu.
- Seti efector: grups topològicament allunyats del centre actiu que interaccionen amb lligands i poden influenciar la unió i activitat a través d'efectes en l'estructura i conformació.
- Lligand: fa referència a una petita molècula que interacciona amb la proteïna mitjançant forces no covalents (activadors, substrats i inhibidors).

### 1-2.4.a ASPECTES GENERALS DE LA MODIFICACIÓ QUÍMICA

La caracterització dels centres actius és una de les principals fites de la química de proteïnes. Hi ha un gran nombre de mètodes per tal d'assolir aquesta caracterització i d'entre ells el més important es la determinació de l'estructura tridimensional de la molècula proteica natural o unida a lligands mitjançant la cristal·lografia de raigs X. Un altre mètode important, junt amb l'anterior i la ressonància magnètica nuclear, és el marcatge químic dels centres actius, de tal manera que la degradació enzimàtica o química de la proteïna marcada dona lloc a pèptids, alguns d'ells marcats, que poden ser detectats, aïllats i caracteritzats.

## [ INTRODUCCIÓ ]

Per estudiar enzims poden ésser utilitzats reactius que alterin un residu particular, esperant que produeixin un canvi en les propietats enzimàtiques, el qual pugui ésser relacionat amb el paper funcional jugat per un aminoàcid donat.

El seti de modificació i la intensitat d'aquesta modificació poden ésser controlats de tres formes per:

- a) Selecció de reactius i condicions de reacció.
- b) Variació de conformacions proteíniques.
- c) Alteració dels residus funcionalment significatius.

Els reactius es poden classificar en 5 categories (BLACKBURN, 1977):

1. Reactius específics de grups.
2. Pseudo-substrats.
3. Marcadors d'afinitat.
4. Reactius atrapadors d'intermediaris reactius.
5. Substrats suïcides.

S'ha de considerar que la reactivitat o naturalesa del reactiu poden veure's alterades pel medi.

S'han fet nombrosos estudis de les reactivitats relatives dels aminoàcids vers un reactiu particular. La reactivitat d'un grup funcional no sol ésser la mateixa si està en forma lliure o formant part d'una proteïna. No tan sols és freqüent d'observar variacions marcades o fins i tot inversions en les proporcions relatives, ans trobar grups de la macromolècula proteica que són considerablement més reactius que els mateixos grups en compostos més simples. Aquesta "super reactivitat" pot existir àdhuc quan el grup involucrat no té una relació directa amb la funció catalítica d'un enzim o a on el reactiu no mostra especificitat per una zona de la proteïna (COHEN, 1968).

## C INTRODUCCIÓ ]

La disminució o l'augment de reactivitat d'un grup funcional en la proteïna pot resultar de:

- a) La influència d'altres grups de la proteïna sobre el grup funcional.
- b) Interacció entre el reactiu i la proteïna.
- c) La concurrència simultània d'ambdós casos: a) i b).

### I-2.4.b ESTUDI DE LA REACTIVITAT DE DIFERENTS GRUPS DE LA RNAasa A

#### I-2.4.b.1 REACTIVITAT DELS RESIDUS DEL CENTRE ACTIU

Pel que respecte a la RNAasa A, s'han portat a terme un gran nombre d'estudis per modificació química que han permès la identificació d'alguns residus aminoacídics que formarien part del centre actiu de l'enzim.

CRESTFIELD et al. (1963) van fer reaccionar l'enzim amb iodoacetat, a pH 5,5, donant lloc a un producte sense activitat. El 85% era un monoderivat a la His-119, mentre que el 15% restant era un monoderivat a la His-12. Ambdós productes eren mutuament exclusius i semblaven formar-se simultàniament. Això els va portar a postular que les His-12 i 119 formarien part del centre actiu i estarien separades per uns 5 Å.

HIRS et al. (1962), emprant l'1-fluor 2,4 dinitrobenzè, a pH 8,0, varen aïllar un monoderivat en l' $\alpha$  amino de la Lys-1 que conservava un 60% d'activitat, mentre que el monoderivat en l' $\epsilon$  amino de la Lys-41 no tenia més que 0,1% d'activitat. La reacció sobre aquesta Lys-41 té lloc 70 vegades més ràpidament que en una lisina d'un pèptid model i és inhibida per nucleòtids, nucleòsids i ions fosfat, en ordre decreixent

## [ INTRODUCCIÓ ]

d'efectivitat, ordre completament corresponent a la seva eficàcia com a inhibidors competitius (UKITA et al., 1961). Aquestes dades demostren que la Lys-41 pertany al centre actiu. La reacció en la Lys-41 afavoreix la reacció del reactiu en la Lys-7. Àdhuc es demostra que la reacció amb la 41 és pas obligat per a que reaccioni la Lys-7 (HIRS et al., 1965).

D'acord amb les dades, HIRS va estimar que l' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-41 estaria a uns 6 Å del centre de l'anell pirimidínic del substrat, suposant que en la interacció entre l'enzim i els inhibidors nucleotídics estarien implicats 2 setis, un per a la interacció aniònica i l'altre per a la interacció amb la pirimidina, tal com havien proposat UKITA et al. (1961). També es va veure que era possible establir un enllaç creuat entre ambdues lisines (7 i 41) gràcies al reactiu bifuncional 1,5 difluoro-2,4-dinitro benzè (MARFEY et al., 1965). Això indica que la Lys-7 està situada a prop de la Lys-41, i, per tant, a prop del seti actiu.

L'alta reactivitat de la Lys-41 a pH 8,0 va ésser explicada d'acord amb l'anormalment baix pK del seu  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> (MURDOCK et al., 1966). Degut a aquest baix pK es va postular que aquesta lisina formaria part d'un seti fortament catiònic. Per estudis de la interacció de l'ion clorur i l'ion sulfat amb la RNAasa A SAROFF & CARROLL (1962) postularen l'existència d'un altre seti catiònic, donant així suport a la hipòtesi de HIRS (HIRS et al., 1962).

### I-2.4.b.2 ELS RESIDUS BÀSICS I EL SEU PAPER EN L'ENZIM

Donat que l'enzim poseeix 10 lisines i 4 arginines, i l'RNA (substrat natural de l'enzim) presenta grups fosfat, carregats negativament, al llarg de la molècula, hom ja suposava que els residus bàsics (carregats positivament a pH's fisiològics), tal com la lisina i l'arginina, haurien de jugar un paper important en la interacció enzim-substrat (HUMMEL & KALNITSKY, 1964).

La primera indicació de la importància dels residus de lisina va ésser el treball de HIRS et al. (1962), explicat en l'apartat anterior.

## [ INTRODUCCIÓ ]

Paral·lelament als experiments d'en HIRS, d'altres autors van utilitzar altres reactius. Així la guanidinació de tots els  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la RNAasa A produeix la pèrdua total de l'activitat (KLEE i RICHARDS, 1957). El mateix efecte és produït per la trifluoroacetilació (GOLDBERGER & ANFINSEN, 1962), la cianoetilació (RIEHM & SCHERAGA, 1966) i la metil acetimidació (REYNOLDS, 1968). Per alaninació (unió de cadenes d'alanina) van trobar-se 3 lisines que eren relativament resistents a aquesta modificació, emprant un amortidor fosfat a pH 8,0 (ANFINSEN et al., 1962) i van ésser identificades com la Lys-7, 37 i 41 (COOKE et al., 1963). Emprant grans quantitats de reactiu, la Lys-7 i la 37 reaccionen, encara que molt més lentament que els grups amí normalment reactius de la proteïna, però la Lys-41 no reacciona. Al canviar l'amortidor de fosfat a bicarbonat, la Lys41 reaccionava molt ràpidament, amb pèrdua total d'activitat. Aquest fet implicava que l'ion fosfat protegia la Lys-41, fet que està d'acord amb la dinitrofluorobenzenació, i, en menor grau, les Lys-7 i 37.

WELLNER et al. (1963) van concloure, analitzant les diferències d'activitat observades entre l'enzim natural i els derivats polialaninats en front de substrats de baix pes molecular i de l'RNA, que possiblement hi havien canvis en l'especificitat al passar d'un a l'altre tipus de substrat. Així, per exemple, observaren que un dels derivats presentava un 160% d'activitat en front de l'RNA (sobreactivació considerada per els autors en termes de canvis en la distribució de càrrega després de l'alaninació).

ROCCHI et al. (1969), eliminant la Lys-7 (mitjançant l'obtenció d'un S-pèptid sintètic - apartat I-2.2), observaren una disminució d'activitat en front de l'RNA, però no en front de substrats de baix pes molecular. D'acord amb aquest treball MARCHIORI et al. (1974) estudiaren el possible paper de la Lys-7 (residu altament invariant en les seqüències d'altres RNAases) (WELLING et al., 1974 i BEINTEMA et al., 1976), mitjançant l'eliminació de la Lys-7. Els resultats indicaren que la Lys-7 no estaria involucrada en la forta interacció no covalent entre la S-proteïna i l'S-pèptid, ni seria un residu essencial en la catàlisi, ans contribuïria a optimitzar el procés catalític. L'afinitat d'aquest derivat sense Lys-7 pel pirofosfat és molt inferior a la de la RNAasa A, indicant novament que la Lys-7 podria formar part d'un seti fixador de fosfat.

## [ INTRODUCCIÓ ]

KARTHA et al. (1967), emprant la cristal·lografia de raigs X, localitzaren el seti principal de fixació del fosfat, format per les histidines- 119 y 12 i d'altres grups que estaven a prop eren les lisines- 41 y 7, i el Glu-11 (estudis cristal·logràfics posteriors confirmarien aquestes dades, afegint-hi la Arg-39).

Un possible paper de la Lys-1 va ésser indicat per EAKER et al. (1965). Els autors van estudiar una RNAasa a la que l'hi mancava la Lys-1, i una altre sense la Lys-1 i el Glu-2. Es va observar que la deslisil-RNAasa presentava un grau de desordre lleugerament més gran que l'enzim natural, podent-se desnaturalitzar mes fàcilment, per bé que no presentava un volum molecular gaire més gran. La deslisil-RNAasa també presentava una més petita afinitat pels ions fosfat. Aquests ions fosfat no protegien a la deslisil-RNAasa de la digestió trípica tan fortament com a l'enzim natural, i encara menys fortament a la deslisildesglutamil-RNAasa (ja que la interacció amb els ions fosfat estabilitza la conformació de l'enzim). La deslisil-RNAasa presenta un 99% d'activitat en front del 2',3' Cp, i la deslisildesglutamil-RNAasa un 38%. En front de l'RNA la deslisil-RNAasa presenta una activitat lleugerament inferior al 100%, mentre que la deslisildesglutamil-RNAasa presenta un 60% d'activitat.

Els autors van concloure que la disminució de protecció, així com la disminució d'activitat observada, indicava un grau de llibertat conformacional més gran que a la RNAasa A, que podia ésser el resultat d'un menor grau d'interacció (o d'una orientació menys perfecta) del segment aminoterminal amb la resta de la molècula.

Aquestes activitats podrien ésser explicades si es pressuposa que la macromolècula d'RNA, en interaccionar amb la deslisildesglutamil-RNAasa, determina una recuperació de l'estructura tridimensional que la fa suficientment favorable per tal d'assolir fins un 60% de l'activitat de l'enzim natural. En canvi, un substrat de baix pes molecular, tal com el 2',3' Cp, al no interaccionar en tants setis, no podria provocar la mateixa recuperació de l'estructura favorable, restant la conformació del centre actiu en una estructura bastant desfavorable (GUTTE et al., 1979; ROBSON, 1980). Evidentment, la disrupció d'aquesta estructura favorable vindria donada bàsicament per la manca del Glu-2, que els mateixos autors ja comentaven

## [ INTRODUCCIÓ ]

que sembla jugar un paper "sorprenentment" important en el manteniment d'una conformació estable i activa, mentre que el de la Lys-1 seria més petit.

Els fets esmentats, doncs, indicarien que la zona N-terminal de l'enzim jugaria un paper important en les característiques de la molècula. (El fet de que la manca d'algun dels residus inicials disminueixi l'afinitat de l'enzim pel fosfat suggereix que un paper jugat per aquesta zona seria la d'un seti fixador de fosfat, tot éssent també important en el manteniment de la conformació de l'enzim).

COOKE et al. (1963) mostraren que en unir cadenes polipeptídiques a uns 8 grups  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de l'enzim, l'activitat en front del 2',3' Cp es veia poc afectada, mentre que en front de l'RNA es produïa una gran disminució, suggerint que els  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> estan directament involucrats en la interacció amb l'RNA (aquesta disminució era més pronunciada a l'emprar polipeptíds bàsics).

RIQUELME et al. (1975) feren reaccionar el fosfat de piridoxal i la RNAasa A, reduïnt a continuació la base de SCHIFF formada amb borhidrur de sodi. Aïllaren 3 derivats, amb unions en la Lys-7, 41 i l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1, amb unes activitats en front del 2',3' Cp d'un 17%, 0% i 58% respectivament.

Els estudis cristal·logràfics portats a terme per ALLEWELL et al. (1973) de la RNAasa S dinitrofenilada en la Lys-41 mostraren que el marcador estava rodejat per la Gln-11, Asn-34, Asp-38 i Arg-39.

La modificació amb fenilglioaxal de l'Arg-39 dóna lloc a un derivat inactiu (TAKAHASHI, 1968), explicant-se per una alteració de les propietats de la Lys-41. PATTHY & SMITH (1975) tractaren la RNAasa A amb ciclohexadiona modificant-se 2-3 arginines i perdent-se un 90% de l'activitat. L'Arg-39 és la que reacciona més ràpidament i la seva modificació és la que determina la major pèrdua d'activitat. L'Arg-85 també reacciona bastant ràpidament mentre que l'Arg-10 ho fa lentament i l'Arg-33 no reacciona. Tractant els derivats amb hidroxilamina (que elimina el grup marcador) dóna lloc a una recuperació total de l'activitat en aquells derivats en l'Arg-39 i 85 i un 60% en aquells derivats que havien estat també modificats en l'Arg-10. Estudiant el possible paper jugat per aquest

## [ INTRODUCCIÓ ]

residu, VALLE et al. (1977) sintetitzaren un derivat enzimàtic en el que es substituï l'Arg-10 per ornitina. L'activitat del derivat en front de l'RNA fou d'un 45%. Aquests resultats van confirmar-se amb els estudis portats a terme emprant ketoxal com a reactiu (IIJIMA et al., 1977).

Pel que fa referència a la Gln-11, d'acord amb les seqüències de diverses RNAases (WELLING et al., 1975), és un residu invariant. Segons les dades cristal·logràfiques (RICHARDS & WYCKOFF, 1973; WODACK et al., 1977; PAVLOVSKY et al., 1978), la Gln-11 interacciona amb el grup fosfat dels nucleòtids en els complexos RNAasa S/anàleg de substrat, indicant que aquest residu jugaria un cert paper en el procés enzimàtic. FILIPPI et al. (1981) substituïren la Gln-11 per d'altres en la seqüència i concluiren que, d'acord amb WELLING et al. (1975), aquest és l'únic residu que satisfà tots els requeriments necessaris, tant pel manteniment de la conformació més estable, com per a l'activitat.

Al 1975 BROWN & BRADBURY estudiaren per RMN els residus de la lisina de la RNAasa A sotmesos a metilació i proposaren una interacció entre les Lys-7 i 41 i l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> i l' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1 per explicar els seus resultats. Posteriorment (BROWN & BRADBURY, 1976), mitjançant la guanidinació de les lisines, obtingueren un derivat modificat a totes les lisines, menys la 41, que mostrava un 91% d'activitat en front del 2', 3' Cp i un 73% en front de l'RNA.

Mitjançant estudis d'acetilació de les lisines de la RNAasa A, en absència i presència d'anàlegs de substrat, WALTER & WOLD (1976) indicaren que les mostres protegides amb anàleg de substrat conservaven una activitat bastant més elevada que les no protegides i aquesta retenció d'activitat era deguda a la suma de les fraccions no acetilades de les Lys-7 i 41 i una tercera que suposaren podria ésser la 66. Observant les dades cristal·logràfiques de la RNAasa S, els autors citen 4 lisines amb un accés directe al centre actiu, la 7, 41, 66 i 104 (la Lys-1 no la citen, doncs ja s'ha esmentat que en la RNAasa S l'extrem N-terminal queda més allunyat del centre de la molècula). Assenyalen també, d'acord amb WELLING et al. (1973) que les lisines 7, 41 i 66 resten invariables en moltes de les seqüències estudiades.



## [ INTRODUCCIÓ ]

Un altre paper important jugat per aquestes zones bàsiques ha estat posat en evidència pels estudis de BLACKBURN (1977, 1979 a i b, 1980, 1982) estudiant l'interacció de la RNAasa A de pàncreas boví amb l'inhibidor de la RNAasa de placenta humana. Els autors indicaren el paper jugat per la càrrega positiva d'una sèrie de lisines de l'enzim en aquesta interacció.

### I-2.5 ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL

El primer estudi de la RNAasa mitjançant la difracció de raigs X va ésser portat a terme per FANKUCHEN en el 1941. Des de llavors s'han fet un gran nombre d'estudis tant de la RNAasa A com de la S (KARTHA et al., 1967; WYCKOFF et al., 1967-70; CARLISLE et al., 1974; MITSUI & WYCKOFF, 1975; VALLE & ZANDTII, 1977; BORKAKOTI et al., 1982; WLODAWER et al., 1982) donant com a resultat la dilucidació de l'estructura tridimensional de les dues molècules.

En la foto (Figura 5) es pot veure l'estructura de la RNAasa S construïda amb el sistema de model molecular Nicholson (comercialitzat per Labquip U.K.) obtinguda a partir de les dades cristal·logràfiques de WYCKOFF et al. (1970). En la Figura 6 es mostra la gràfica de la RNAasa A obtinguda emprant les dades cristal·logràfiques d'en CARLISLE (1974) (gentilment cedides per aquest autor), a 2,5 Å de resolució.

També s'ha pogut conèixer l'estructura dels complexos de l'enzim amb diferents inhibidors (ALLEWELL 1969-1973, RICHARDS & WYCKOFF, 1971; WODACK et al., 1977; PAVLOVSKY et al., 1978; BRAYER & Mc PHERSON, 1982). Les estructures de les RNAases A i S són molt similars en la majoria de les regions de la molècula. La S té una estructura quelcom més laxa (CARLISLE, 1974) amb la zona dels residus 16 al 23 molt diferent.

Les dades estructurals obtingudes de la proteïna en solució concorden força bé amb les aportades per la difracció de raigs X, indicant que no hi haurien grans diferències entre la forma cristal·lina i la dissolta (el fet de que no existeixen grans diferències entre ambdues formes va ésser comprovat per YU & JO, (1973 a i b) per espectroscopia Laser Raman), motiu pel qual la informació obtinguda per difracció de raigs X pot ésser aplicada a la proteïna en solució.



FIGURA-5

Foto de l'estructura de la Ribonucleasa S construïda amb el sistema de model molecular Nicholson (comercialitzat per Labquip U.K.) obtinguda a partir de les dades cristal·logràfiques de WYCKOFF et al. (1970).

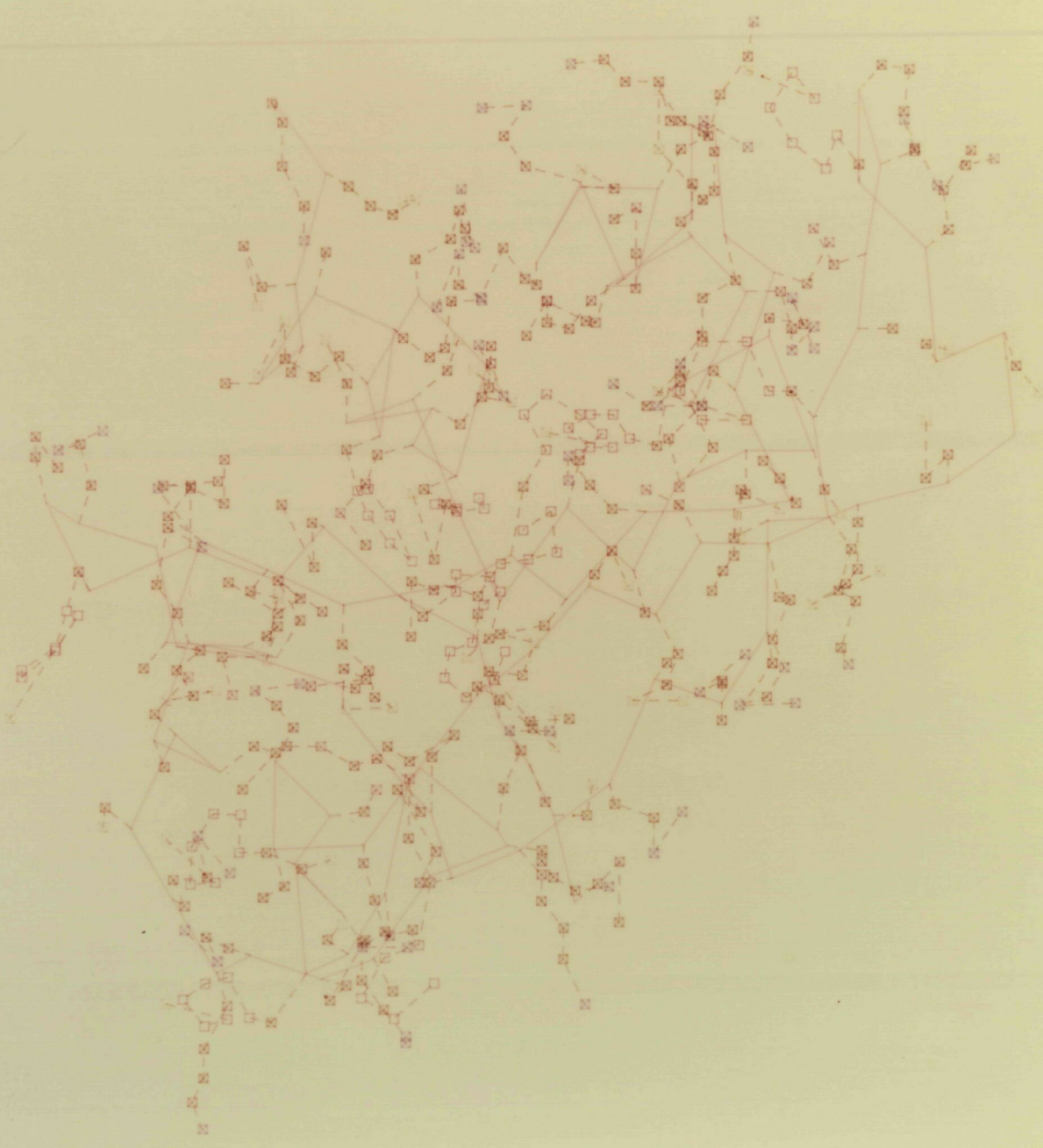


FIGURA-6 (a)

Grafica de la Ribonucleasa A obtinguda emprant les dades cristal.lografiques d'en CARLISLE (1974), a 2,5 A de resolucio.

- Piramid tetragonal negre = atom de carboni
- Piramid tetragonal blava = atom de nitrogen
- Piramid tetragonal verda = atom d'oxigen
- Piramid tetragonal vermella = anells aromatics

La linia vermella uneix els carbonis  $\alpha$  . Representacio en els eixos X-Y.

Es una altra tècnica moltament aplicada a l'estudi de la Ribonucleasa A. En aquest cas se les històries han estat més ben estudiats ja que regeixen a molt més camp, segons es veu dels altres treballs, (MARTIN i al. (1968)) van assignar cada un dels amino acids observats en els seus treballs la correspondència històrica que li corresponia. Posteriorment, van tornar a la interacció amb el grup de MURPHY i al. (1968) invertint les assignacions de la  $\alpha$ -12 i 11. Els experiments de rotolació s'ha desenvolupat a cada un dels dies que a 22 °C i 0,1 M d'acetat sòlida (MARTIN i al. 1968 i D. HARKLEY, 1975).

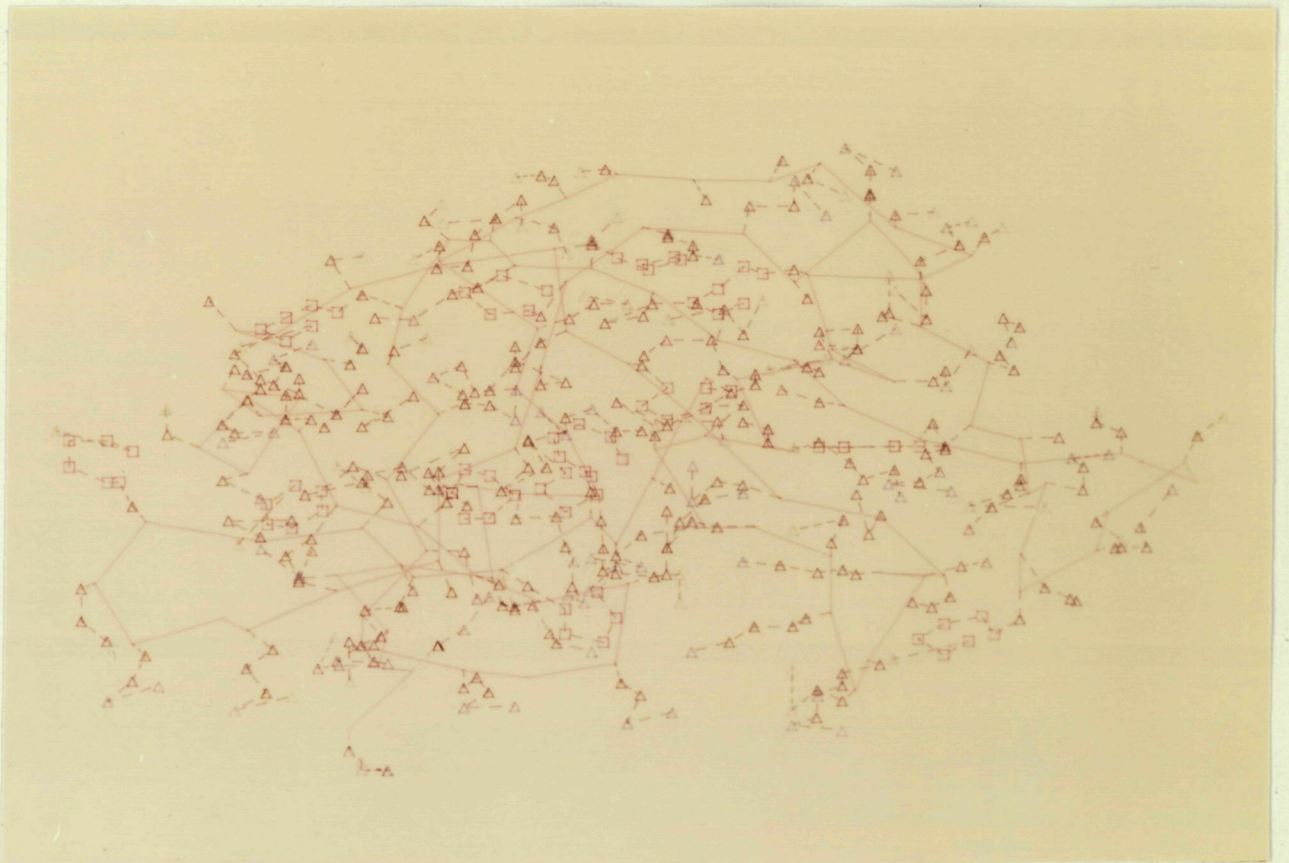


FIGURA 6 (b)

Grafica de la Ribonucleasa A. Representació en els eixos Y-Z.

Tant la representació en els eixos X-Y, com en els eixos Y-Z son fotos de la grafica original, en la que es cumpria que 1 cm = 1,58 Å (apartat II-19). En les fotografies aquestes mides ja no regeixen (per problemes d'espai).

## C INTRODUCCIÓ ]

### 1-2.6 ESTUDIS PER RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR (RMN)

És una altra tècnica àmpliament aplicada a l'estudi de la RNAasa A. Els protons C-2 de les histidines han estat els més ben estudiats ja que ressonen a molt baix camp, separant-se així dels altres senyals. MEADOWS et al. (1968) van poder assignar cada un dels quatre pics observats en els espectres a la corresponent histidina que l'originava. Publicacions més recents van corregir la interpretació donada per MEADOWS et al. (1968) invertint les assignacions de la His-12 i 119. Per experiments de titulació s'ha determinat el pK de cada histidina que, a 32 °C i 0,2 M d'acetat sòdic (PATEL et al., 1975 a i b; MARKLEY, 1975), són:

His	pK
12	6,2
48	6,4
105	6,7
119	5,8

Les corbes de titulació de les His-12 i 119 presenten desviacions respecte de l'esperat per un equilibri simple d'associació entre el grup imidazol i un protó. SCHECHTER et al. (1972) expliquen aquest fenomen postulant la interacció de la His-119 amb l'Asp-121, i de la His-12 amb la Lys-41.

Els assignaments de ressonàncies dels protons de les histidines de la RNAasa A i, donat que la 12 i 119 formen part del centre actiu, ha permès utilitzar aquests protons per estudiar les variacions observades en el desplaçament químic i el pK dels protons C2 de l'anell de les dues histidines del centre actiu de l'enzim quan aquest interacciona amb diferents lligands.

### 1-2.7 PROVES DE L'EXISTÈNCIA D'UN SETI FIXADOR DE PURINES

Les primeres dades foren aportades per estudis espectrofotomètrics a l'ultraviolat i de dispersió rotatòria òptica de les interaccions enzim-nucleòtid (DEAVIN et al., 1966 a i b). Aquests autors detectaren variacions en l'espectre del nucleòtid quan interaccionava amb l'enzim. Aquesta variació no

## [ INTRODUCCIÓ ]

s'observava ni amb el nucleòsid ni amb les bases. Això va fer pensar que la part de la molècula que és la principal responsable de la interacció és el grup fosfat. Es va demostrar que la diferència d'espectre és funció del tipus de lligand i, probablement, es deu a la pertorbació del cromòfor del nucleòtid per l'enzim.

Els treballs de RUSHIZKY (1961) i DUBE et al. (1969, a i b) indicaren que l'enzim ataca preferentment certs enllaços. Oligonucleòtids amb una o més purines i una pirimidina terminal són alliberats més ràpidament que els mononucleòtids pirimidínics de l'RNA de llevat o del virus del mosaic del tabac, indicant que la purina juga un paper important. La importància d'aquest paper va ésser posat també en evidència pels treballs de WITZEL & BARNARD (1962, a i b). En aquests treballs els autors mostraren que la velocitat de la reacció catalitzada per la RNAasa A, en emprar dinucleòtids monofosfat com a substrat, es funció del nucleòsid en 5' de l'enllaç fosfodièster, essent més elevada quan la base és una purina.

La difracció de raigs X, una de les tècniques més poderoses per a l'anàlisi de proteïnes, també demostra que a la RNAasa A existeix un seti específic per als 5'-nucleòtids purínics. RICHARDS & WYCKOFF (1971) estudiaren per raigs X la RNAasa S; no gensmenys, quasi bé totes les deduccions són aplicables a la RNAasa A, ja que CARLISLE et al. (1974) demostraren que ambdues molècules tenen les coordenades cristallogràfiques molt semblants, especialment la part del seti actiu.

El diagrama de la Figura 7 és un esquema del centre actiu (RICHARDS & WYCKOFF, 1971) deduït de les dades de raigs X de complexos enzim-anàlegs de substrat. B1, R1, P1, R2 i B2 indiquen les posicions relatives de les bases, riboses i el fosfat del nucleòtid fosfonat UpcA, un anàleg del UpA, amb un grup -CH<sub>2</sub>- en lloc de l'O (5') de la adenosina.

L'uracil ocupa B1 i l'adenina B2. Així B1, R1 i P1 són els setis ocupats predominantment pels nucleòtids pirimidínics, però que pot ésser parcialment ocupat per nucleòtids purínics (ARUS et al., 1981).

El 5'-AMP ocupa B2, R2, P1. El nucleòtid pirimidínic en 5' del dinucleòtids monofosfat pirimidínics, com el CpU, podria ocupar la posició B2', i no la B2 que sembla específica per als nucleòtids purínics.

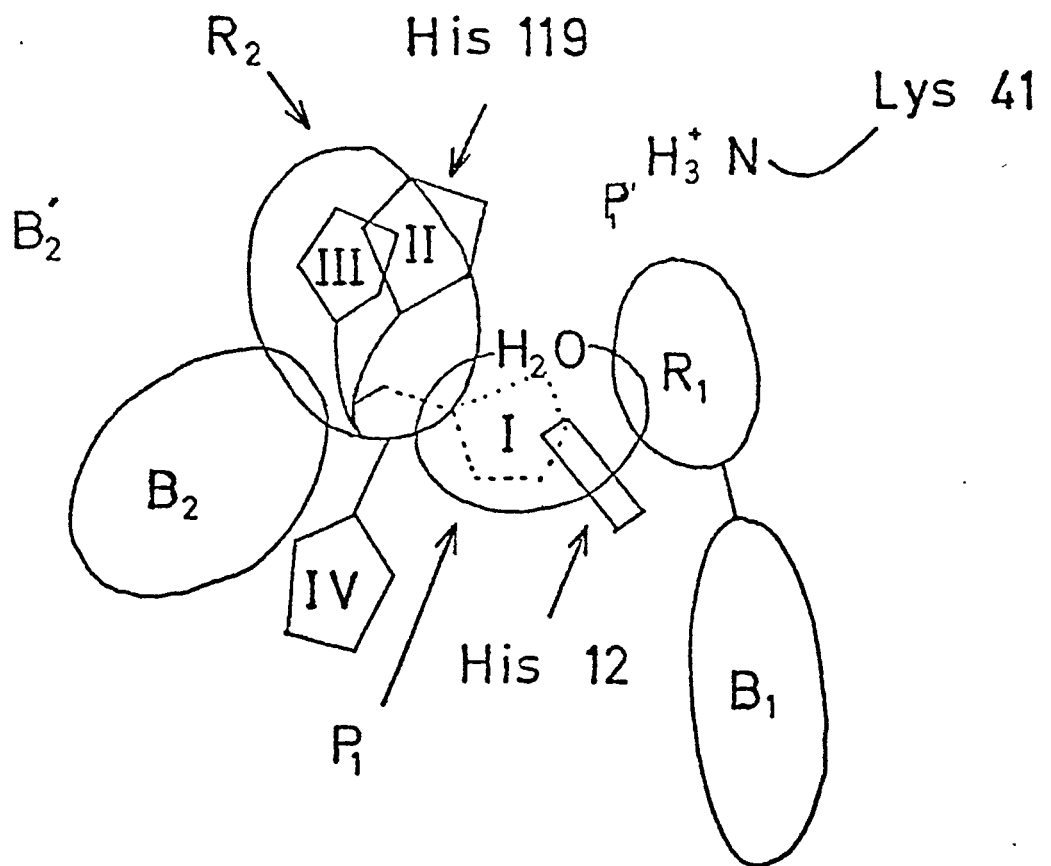


FIGURA-7

Esquema de les posicions relatives que ocupen diferents grups de la Ribonucleasa A a l'interaccionar amb el substrat (prés de RICHARDS & WYCKOFF, 1971).

## [ INTRODUCCIÓ ]

S'indiquen 4 posicions, I, II, III i IV, que pot adoptar la His-119 segons el tipus de lligands que s'uneixin a l'enzim.

HAFFNER & WANG (1973) estudiaren per RMN i cinètica enzimàtica la interacció del 5' AMP amb la RNAasa. La ressonància magnètica nuclear no mostra cap variació de la zona dels aminoàcids aromàtics, la qual cosa indicava que no hi havia interacció del nucleòtid amb cap fenilalanina i per tant no interaccionava en el seti primari. Els nucleòtids de la citidina sí que pertorben la regió aromàtica de l'espectre, pertorbació que s'interpreta com una interacció de la base amb la fenilalanina. HAAR et al. (1974) també observaren l'absència d'aquesta variació de la zona aromàtica emprant adenosina 2'-fosfat, adenosina 3'-fosfat i adenosina 5'-fosfat. Aquests fets suggereixen que la base purínica no s'uneix en el mateix lloc que la base pirimidínica. El perfil de la variació de la constant d'associació, en funció del pH, entre la RNAasa i els nucleòtids pirimidínics, i la RNAasa i l'ion ortofosfat (ANDERSON et al., 1968) és molt similar al publicat per HAFFNER & WANG, indicant que la interacció enzim-nucleòtid ve determinada essencialment per la unió del grup fosfat a l'enzim i que, encara que el seti d'unió de la base sigui diferent, el d'unió del fosfat és molt semblant pels dos tipus de nucleòtid, purínics i pirimidínics.

En llurs estudis, HAFFNER & WANG (1973) trobaren una cinètica mixta en la hidròlisi del 2',3' Cp quan hi havia 5'-AMP present. Això es traduïa en una inhibició quan la concentració del substrat era baixa i en una activació quan es treballava a saturació de 2',3' Cp. Els autors, en funció de la informació proporcionada per RMN i per raigs X, interpretaren la inhibició com una competència entre el 2',3' Cp i el 5'-AMP per al seti de fixació de fosfat i l'activació pel desplaçament del grup fosfat del 5'-AMP pel fosfat del 2',3' Cp. La base purínica de l'AMP es fixaria en el seti fixador de purines, establint amb el substrat un complex ternari que afavoriria la formació a l'enzim d'una geometria altament activa. Aquesta hipòtesi també podria explicar l'increment d'activitat enzimàtica de la RNAasa A en la hidròlisi del 2',3' Cp que és produït quan en el medi hi ha adenina o adenosina (FOLLMAN et al., 1967; CUCHILLO, 1974; ARÚS, 1981).





## [ INTRODUCCIÓ ]

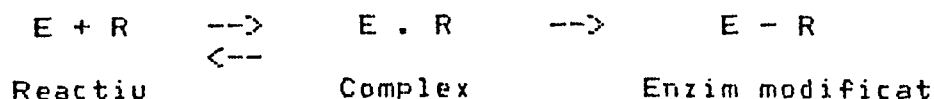
Les figures de difracció de raigs X no arriben a precisar quins són els grups de l'enzim responsables de la col·locació favorable de la base purínica. Un intent de localització d'aquest seti fixador de purines va ésser realitzat fent servir la tècnica de "Marcat per Afinitat".

### I-2.8 MARCATGE PER AFINITAT

Juntament amb l'increment de l'aplicació de les modificacions químiques, hi han hagut també canvis en el plantejament experimental. En els primers estudis, la intenció era bloquejar o bé alterar tots els grups funcionals d'un tipus particular i observar l'efecte en l'activitat enzimàtica i les propietats físiques. En els estudis més recents, l'objectiu ha estat modificar el mínim nombre de grups, amb l'esperança de fer-ho només en un, i determinar alteracions de l'especificitat del substrat, etc. També ha estat àmpliament reconeguda la possibilitat d'utilitzar modificacions químiques selectives i limitades, com un medi de determinar l'estructura terciària, traçant la topologia i detectant el canvi conformacional. També ha estat adquirida una considerable informació fent modificacions limitades en presència o absència de diversos substrats o inhibidors (COHEN, 1968).

Per tal d'assolir aquestes fites, s'ha utilitzat recentment la característica d'unió específica de l'enzim per a dissenyar un reactiu de modificació química tan sols del centre actiu. Tal és el cas si el reactiu poseeix característiques similars al substrat, adequades per a afavorir la formació d'un complex amb l'enzim sota estudi, i amb una reactivitat química que pugui assolir una modificació covalent en el centre actiu durant l'existència del complex (SHAW, 1970).

La utilitat d'aquesta aproximació pels estudis enzimàtics va ésser demostrada en el cas de la quimotripsina amb el desenvolupament del TPCK (p-toluenosulfonilfenilalanilclorometilcetona) (SCHOELLMAN & SHAW, 1963) mitjançant el qual van poder alquilar molt específicament una histidina del centre actiu de l' $\alpha$ -quimotripsina.



## [ INTRODUCCIÓ ]

La potencialitat d'aquest mètode general per a l'estudi enzimàtic va ésser apreciada no tan sols en el cas esmentat, ans també per en BAKER (1961-1967), i també per en WOFSY (1962). Foren aquests investigadors els que crearen el terme "Reactius Dirigits contra el Centre Actiu o Marcadors per Afinitat" o d'afinitat, termes que, segons SHAW (1970), poden ésser emprats indistintament.

Segons SHAW (1970) el reactiu químic pot modificar un residu component del centre actiu donant lloc a la inactivació de l'enzim. Però existeix també la probabilitat, gran, de que restant ocupat el centre actiu, la modificació química sigui perifèrica i sense un aparent significat funcional. Per això l'ús dels marcadors d'afinitat és probablement el mètode més efectiu per identificar grups funcionals que poden estar involucrats directament en l'activitat catalítica, o de grups que no juguen un paper catalític important (tal com els responsables de la interacció amb el substrat).

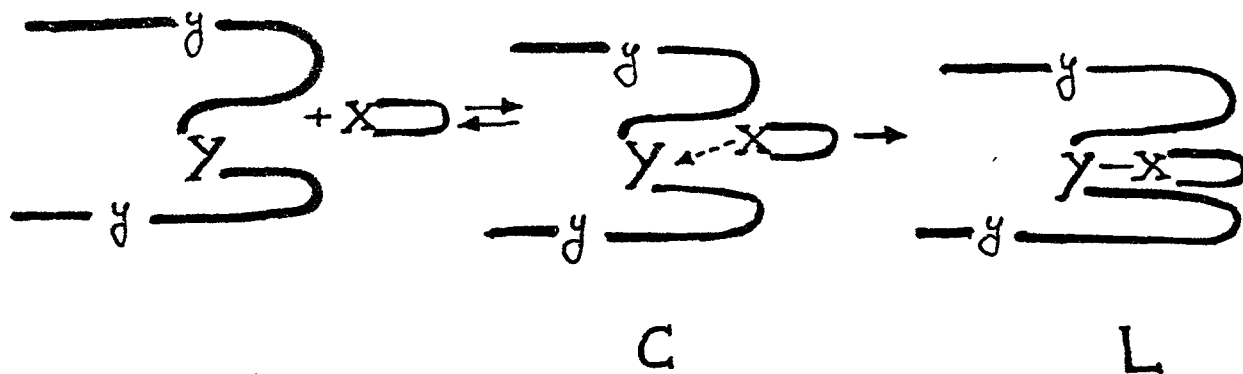


FIGURA - 8

## [ INTRODUCCIÓ ]

Segons SINGER (1967), un reactiu de marcatge per a un particular centre actiu és tal que:

1. Per virtut de la complementaritat estèrica amb el centre actiu, primer es combina específicament i reversiblement amb el seti (complex C, Figura B).
2. Per virtut d'un petit grup reactiu X de la molècula marcadora, el més petit possible, aquest pot reaccionar amb un o més tipus de residus aminoacídics (Y en el seti), formant unions covalents irreversibles. Tenint la possibilitat d'utilitzar un grup X d'alta reactivitat s'ha de tenir en compte que aquest pot reaccionar també molt ràpidament amb altres grups similars "y" de la molècula proteica. Per tal d'augmentar la probabilitat de formar un producte marcat en el centre actiu, el grup X ha de reaccionar, preferentment en proporcions considerables, sota unes condicions donades, amb el més gran nombre de tipus possibles de residus.

La formació del complex reversible inicial (C, Figura B) incrementa la concentració local del reactiu marcador en el centre actiu, comparada amb la concentració lliure en la solució, de tal manera que la reacció amb el grup Y és marcadament afavorida respecte de la reacció amb algun grup similar fora del centre actiu.

La demostració de que el reactiu reacciona com un anàleg de substrat depèn d'un cert nombre de criteris (GLAZER, 1975):

1. La dependència de la velocitat de reacció respecte de la concentració de reactiu ha d'indicar la saturació d'un o més setis de fixació.

## C INTRODUCCIÓ 1

2. La incorporació del reactiu ha de mantenir una relació estequiomètrica amb el nombre de setis de fixació del lligand normal.
3. La presència del lligand normal (substrat o inhibidor) ha de disminuir la proporció de reacció amb l'anàleg químicament reactiu.

Hi ha molts exemples en els que l'ús de marcadors d'afinitat no asseguren una modificació en un únic lloc, ja que degut a l'alta reactivitat de molts residus del centre actiu, es possible obtenir un cert nombre de derivats enzimàtics diferents.

En el marcatge d'afinitat, de vegades s'ha posat en dubte que el reactiu pugui formar realment un complex inicial reversible amb el centre actiu. D'ésser cert aquest dubte, la subsequënt reacció del marcador amb un residu de la proteïna no estaria necessàriament localitzada en el centre actiu. Així, la concentració del reactiu podria incrementar-se, no tan sols en el centre actiu, ans també a prop d'ell.

Però, si s'observa un gran increment de reacció en el centre actiu, existeixen bones raons teòriques per a suposar que el reactiu d'afinitat reacciona en una posició relativament restringida, en el centre actiu (amb el grup Y). En cas contrari, el grau de la reacció de marcat es veuria reduït en gran manera.

Finalment, per al marcatge dels centres actius, s'han de tenir en compte una sèrie de factors:

1. La possibilitat i senzillesa de la síntesi del reactiu de marcat per afinitat.

## [ INTRODUCCIÓ ]

- Per a dissenyar un reactiu de marcatge per afinitat és de gran valor tenir alguna informació respecte dels tipus de residus aminoacídics que poden estar presents en el centre actiu en estudi.
  
  - La síntesi d'aquest reactiu representa, molt sovint, una tasca àrdua, però queda justificada donat l'interès de l'estudi dels centres actius. A més a més, les modificacions resultants d'un marcat per afinitat són molt més fàcils d'interpretar que les resultants de la utilització d'altres reactius (per exemple els de grup), ja que l'aminoàcid modificat ha d'estar en el centre actiu, o a prop, o bé en el seti d'unió del lligand. Fins i tot, si el reactiu de marcat per afinitat resulta ineficient, pot ésser la base per a dissenyar altres reactius.
2. La necessitat de detectar la formació del producte marcat (per exemple, mitjançant dades espectroscòpiques o per radioactivitat). Poden servir com a monitors grups amb propietats espectrals i que es vegin afectats per l'envoltall. Reactius que s'uneixen covalentment a la proteïna i que poseeixen un cromòfer que té unes propietats espectrals sensibles a l'entorn han estat denominats Grups de Referència (BURR & KOSHLAND, 1964; KOSHLAND et al., 1964). L'espectre dels reactius enllaçats canvia sota variacions del pH o de la polaritat de l'entorn i és per això que poden ésser utilitzats com a monitors (espectre directe i diferència d'espectre)
3. L'estabilitat de l'enllaç covalent format pel reactiu. Evidentment, els experiments han de fer-se en condicions tals que el derivat de la proteïna sigui estable.

4. Certs enzims amb activitat sobre diferents substrats, a l'ésser modificats, poden presentar diferents variacions d'activitat segons sigui el substrat. És més, la pèrdua d'activitat en front d'un d'ells podria, àdhuc, anar acompanyada d'un increment d'activitat en front d'un altre (MEANS & FEE-NEY, 1971).

Es coneixen nombrosos exemples d'alteracions en l'activitat vers substrats macromoleculars però no vers substrats simples; vers un tipus de macromolècula però no vers una altra, i vers un tipus de substrat simple i no vers un altre (COOK, 1963; WELLNER, 1963; YAMASAKI, 1968; COHEN, 1970; BROWN & BRADBURY, 1976). Les alteracions en l'activitat poden resultar d'un canvi en la  $K_m$  o  $V_{max}$ , o ambdues. Per permetre una diferenciació dels dos fenòmens s'han de fer els mesuraments apropiats (KOTAKI, 1968; COHEN, 1970).

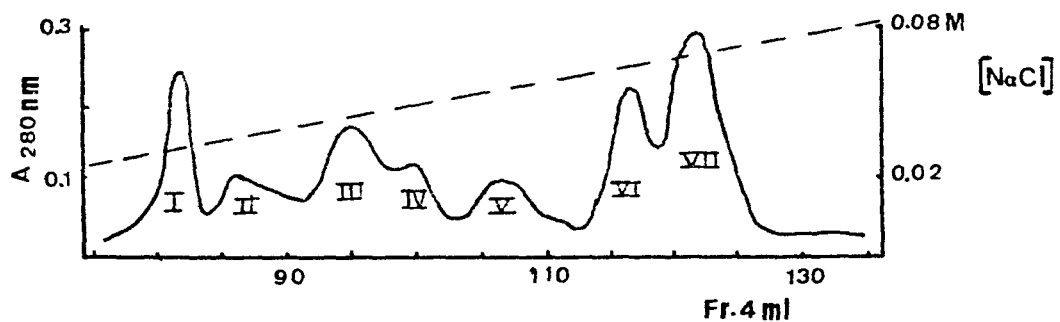
També cal fer esment que una explicació freqüentment emprada quan s'observa una pèrdua d'activitat deguda a la modificació de grups que no formin part del centre actiu estan basades en el bloqueig estèric degut al reactiu afegit, i també a canvis conformacionals.

I-2.8.a APLICACIÓ DE LA TÈCNICA DE MARCATGE PER AFINITAT A LA RNAasa A

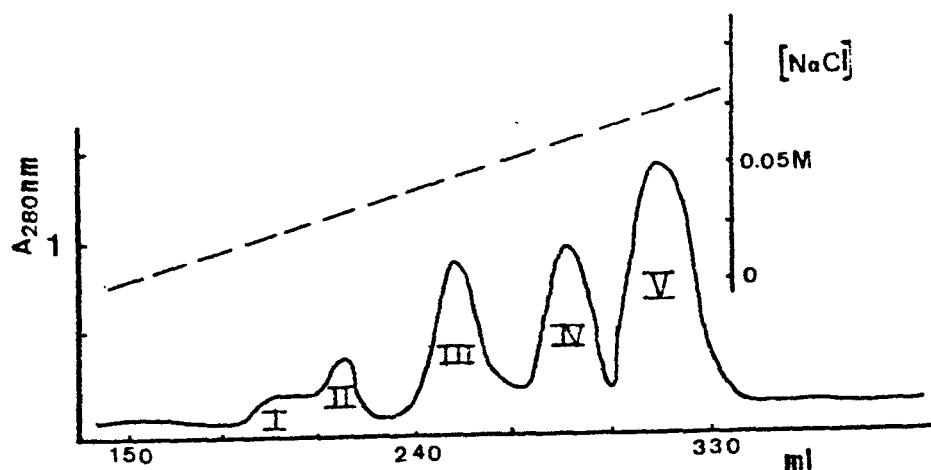
Els treballs de WITZEL & BARNARD (1962 a i b) (apartat I-2.7) van ésser interpretats pel grup de MATHIAS & RABIN (DEAVIN et al., 1966 a i b) com a suport de la hipòtesi de l'existència d'un seti d'interacció amb preferència per a les purines. D'altres estudis, emprant diferents tècniques tal com la diferència d'espectre (DEAVIN et al., 1968), l'RMN (HAFFNER & WANG, 1973; HAAR et al., 1974) i la cristal·lografia de raigs X (RICHARDS & WYCKOFF, 1971; WODAK et al., 1977; MITSUI et al., 1978), han intentat dilucidar la naturalesa d'aquest seti de fixació de purina, que avui dia està àmpliament acceptat.

Per tal de precisar quins són els grups responsables de la col·locació favorable de la base purínica, el grup de MATHIAS & RABIN (RABIN et al., 1970; CUCHILLO, 1974) realitzaren un intent de localització del seti fixador de purines fent servir la tècnica de marcat per afinitat de la RNAasa A. L'objectiu principal de la reacció entre la RNAasa A i el marcador (una base purínica halogenada) era l'obtenir un derivat marcat en el seti fixador de purines. El marcador escollit va ésser la 6-Cloropurina, un anàleg de l'adenina amb un clor a la posició 6 en lloc d'un grup NH<sub>2</sub>. Obtingueren una sèrie de derivats. Els estudis cinètics d'alguns d'aquests derivats permeteren pensar que la reacció havia bloquejat el seti fixador de purines o bé una zona pròxima, però com que el nombre de derivats que s'obtenia era elevat i el rendiment era baix, no van poder localitzar aquest seti.

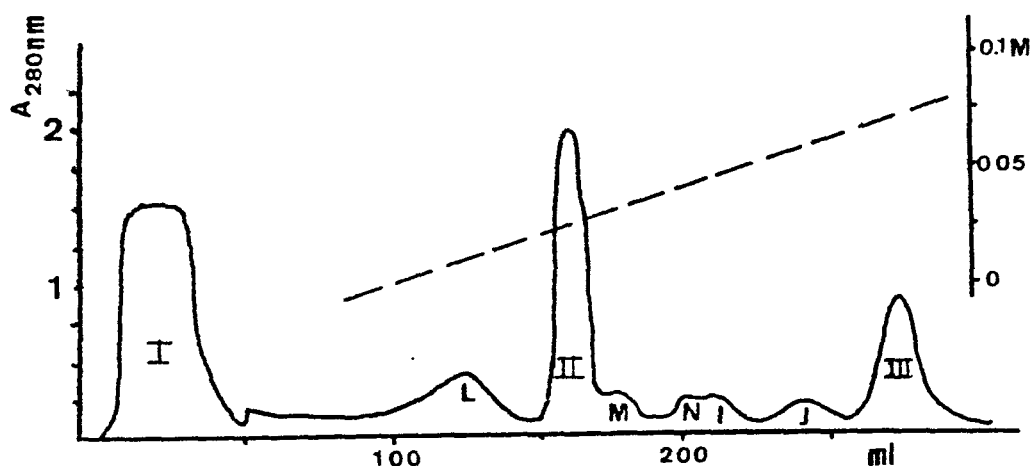
Els treballs esmentats han estat continuats en el nostre laboratori fent servir marcadors molt més específics: la 6-Cloropurina ribosa (que posseeix, a més de la base, el sucre) i la 6-Cloropurina ribosa 5'-monofosfat (Cl6-RMP) (que té, a més de la base, el sucre i el fosfat). Aquesta especificitat augmenta d'acord amb els estudis d'UKITA et al. (1961) i PINCUS et al. (1975), en els quals es demostra que la força de la interacció enzim-lligand augmenta per conversió de la base en el seu nucleòsid, i augmenta encara més en la subseqüent conversió en el nucleòtid. Aquesta major especificitat del marcador emprat en la direcció base < nucleòsid < nucleòtid queda reflectida en el fet de la reducció del nombre de derivats obtinguts a l'augmentar la complexitat del marcador i anar-se fent més semblant al substrat natural de l'enzim (Figura 9, a, b i c).



a



b



c

FIGURA-9

- a) Separació dels derivats de la reacció Ribonucleasa A - 6 Cloropurina. Perfil de l'elut i del gradient salí de la cromatografia en CM-cel.lulosa (RABIN et al., 1970; CUCHILLQ, 1974).
- b) Separació dels derivats de la reacció Ribonucleasa A - 6 Cloropurina ribosa. Perfil de l'elut i del gradient salí de la cromatografia en CM-cel.lulosa (PARES, 1977).
- c) Separació dels derivats de la reacció Ribonucleasa A - Cló-RMP. Perfil de l'elut i del gradient salí de la cromatografia en CM-cel.lulosa (PARES, 1977).



[ INTRODUCCIÓ ]

Així, la presència de la ribosa incrementa apreciablement la direccionalitat de la reacció, però és el grup fosfat el que restringeix la reacció majoritàriament a un punt de la molècula. En la TAULA I s'indiquen les característiques espectrofotomètriques dels productes de les cromatografies b i c de la Figura 9.

TAULA 1.-

-----  
 CARACTERÍSTIQUES ESPECTROFOTOMÈTRIGUES DE LES FRACCIIONS DE LA CROMATOGRÀFIA EN CM-CEL.LULOSA DE LA REACCIÓ RNAasa A-6 CLOR-PURINA RIBOSA A PH 7,4  
 -----

FRACCIÓ	$\lambda$ (nm)		A 280/A 260	A 270/A 260	A 250/A 260
	MÀX	MÍN			
I	269	246	0,95	1,18	0,64
II	269	246,5	0,92	1,17	0,52
III	273,5	247,5	1,06	1,28	0,57
IV	270	247	0,94	1,18	0,63
V	277,5	252	1,93	1,61	0,72

En: Tris/HCl 0,005 M, pH 8,0, I variable de 0 a 0,15 M en NaCl  
 -----

-----  
 CARACTERÍSTIQUES ESPECTROFOTOMÈTRIGUES DE LES FRACCIIONS DE LA CROMATOGRÀFIA EN CM-CEL.LULOSA DE LA REACCIÓ RNAasa A - C16-RMP A PH 7,4  
 -----

FRACCIÓ	$\lambda$ (nm)		A 280/A 260	A 270/A 260	A 250/A 260
	MÀX	MÍN			
I	267	245	0,65	1,06	0,64
II	270	247	0,96	1,24	0,61
III	277,5	252	2,07	1,73	0,75
L	268,5	246	1,04	1,14	0,66
M	273	250	0,98	1,15	0,68
N	275,5	249	1,30	1,23	0,80
I	274	250	1,10	1,23	0,62
J	270	248	0,90	1,18	0,61

En: Tris/HCl 0,005 M, pH 8,0, I variable de 0 a 0,15 M en NaCl  
 -----

Tal com s'aprecia en la Figura 9, la reacció amb 6-Cloropurina dóna lloc a 6 derivats separables (a). La reacció amb 6-Cloropurina ribosa a 4 (b). I la reacció amb el nucleòtid (C16-RMP) dóna lloc a diversos derivats minoritaris, i un de majoritari anomenat Derivat II (c) que a l'ésser recromatografiat per a purificar-lo indica que està impurificat amb d'altres derivats. El darrer pic de totes les cromatografies és RNAasa A que no ha reaccionat.

Una altra característica diferenciable entre les 3 reaccions és la més gran reactivitat del C16-RMP en comparació amb la base i el nucleòsid, cosa que es comprova determinant la quantitat d'enzim natiu que roman sense reaccionar (un 50% per a les dues primeres -a i b a la Figura 9, i un 28% pel tercer cas -c a la Figura 9).

Davant d'aquests resultats, PARÉS (1977) va hipotetitzar que en reaccionar amb l'enzim, el C16-RMP es col·loca en una posició favorable per a la reacció amb una part específica de la molècula d'enzim (el seti de reconeixement - o fixador - dels nucleòtids purínics) éssent el Derivat II el producte d'aquest marcat per afinitat. Per a comprovar la hipòtesi es va procedir a caracteritzar el Derivat II, demostrant-se que el marcador s'ha unit en l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1.

Cal assenyalar en aquest punt que es feren tots els controls necessaris tant pel que respecte als productes per sí mateixos, com barrejats, per tal d'assolir les millors condicions de reacció entre el C16-RMP i la RNAasa A.

Així, per exemple:

- En la interacció RNAasa A-marcador (ARÚS, 1977; PARÉS et al., 1978), es va determinar que el derivat purínic halogenat (C16-RMP) interacciona amb la RNAasa A amb una força similar a la dels nucleòtids naturals AMP i GMP i en un lloc en el que l'entorn fisicoquímic és similar.
- Es va comprovar la naturalesa covalent de l'enllaç enzim-marcador.
- Es determina l'estequiometria de la interacció i la constant d'associació.

## [ INTRODUCCIÓ ]

- Es determina l'estabilitat tant de l'enzim com del marcador en les condicions de reacció.
- Es va comprovar que no es produïa inactivació de l'enzim durant la reacció.
- Es van estudiar els efectes de les condicions experimentals (pH i temperatura) sobre les característiques de la reacció (PARES, 1977).

Per a que la reacció sigui específica, s'ha de realitzar en condicions en que no es vegi reduïda l'afinitat del nucleòtid per l'enzim. Una vegada el marcador s'ha col·locat en el seti fixador de purines, pot tenir lloc la unió covalent entre el marcador i l'enzim, i així assolir-se el marcat per afinitat. La constant d'associació de la RNAasa A amb la major part dels nucleòtids, a 25°C de temperatura presenta un màxim a pH 5,5 (ANDERSON et al., 1968). La constant d'associació probablement disminueix a l'augmentar la temperatura (HAFFNER & WANG, 1973; CUCHILLO, 1974). A pH 6,0 i 23°C de temperatura la reacció entre el CL6-RMP i la ribonucleasa és lenta en comparació amb la que té lloc a pH i temperatura més elevats. La reacció entre la 6-Cloropurina i l'enzim presenta característiques similars (CUCHILLO, 1974).

Aquests fets indicaren que les condicions òptimes d'interacció entre el nucleòtid i l'enzim no són les més idònies per a que tingui lloc la reacció, probablement degut a les característiques del grup nucleòfil de la ribonucleasa que reacciona amb el CL6-RMP. Per tal d'accelerar la reacció les condicions finalment emprades van ésser pH 7,3 i 40°C de temperatura, durant 48 hores. A pH 7,3 encara es detecta una considerable interacció entre la ribonucleasa i els nucleòtids (essent de 5 a 10 vegades inferior al valor de la constant d'associació) (ANDERSON et al., 1968). A valors de pH superiors a 7,5, la constant d'associació disminueix ràpidament per pèrdua del protó de les histidines responsables de la fixació del grup fosfat (HAAR et al., 1974), però HAFFNER i WANG (1973) van detectar encara interacció entre l'AMP i la ribonucleasa a pH 8,5, emprant concentracions de nucleòtid de l'ordre de 15 vegades superior a la d'enzim.

## [ INTRODUCCIÓ ]

Com ja s'ha dit, l'augment de la temperatura probablement disminueix la força d'interacció enzim-marcador, però MEADOWS et al. (1969) detectaren una considerable interacció àdhuc a 32°C i pH 7,0. Encara que a 40°C la constant d'associació disminueixi, es molt probable que la interacció ribonucleasa-nucleòtid halogenat persisteixi, interacció afavorida per l'elevada concentració relativa del nucleòtid. Així doncs, les condicions de reacció emprades (pH 7,3 , 40°C), tot i no impedir la unió covalent del nucleòtid en un altre lloc de la molècula d'enzim, fan factible el marcat de la RNAasa A en el centre específic de fixació dels nucleòtids purínics.

### I-2.8.b REACCIÓ RNAasa A-CL6-RMP a pH 5,5

Com a control de que realment les condicions de reacció escollides (pH 7,4) eren les més adequades, es va procedir a fer reaccionar la RNAasa A amb el CL6-RMP a pH 5,5, restant iguals les altres condicions. El perfil de l'elutit de la cromatografia en CM-Celul.losa (Figura 10) va indicar que la intensitat relativa dels pics havia canviat, disminuint molt les fraccions corresponents als derivats monosubstituïts i augmentant fins al 80% la quantitat d'enzim natiu que quedava sense reaccionar. Pel que fa al rendiment de la reacció era més petit, encara que potser era més específica.

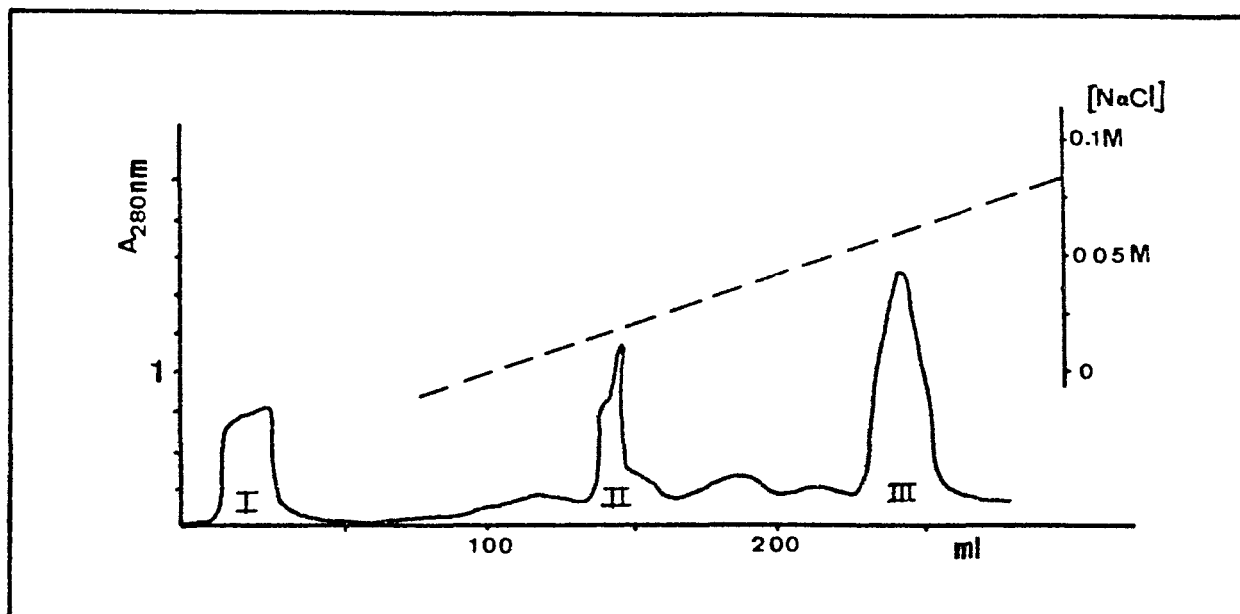


FIGURA-10

Separació dels derivats de la reacció Ribonucleasa A - C16-RMP a pH 5,5. Perfil de l'elut i del gradient salí de la cromatografia en CM-cel.lulosa (PARES, 1977).

## [ INTRODUCCIÓ ]

### I-3 OBJECTIUS DE LA TESI

El present treball és perllongació dels estudis duts a terme pel grup del Dr. CUCHILLO en el Departament de Bioquímica de la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona per tractar de caracteritzar el sub-seti fixador de purines de la RNAasa A.

Al final de la introducció s'explicava que aquests estudis es basaven en el marcat per afinitat de la RNAasa A i que, havent-se emprat un marcador cada cop més específic, s'obtenia un derivat majoritari monosubstituit, anomenat Derivat II i una sèrie de derivats minoritaris, donat que la reacció entre la RNAasa A i el Cl6-RMP no és absolutament específica. Aquest Derivat II va poder ésser caracteritzat, veient-se que el marcat havia tingut lloc en l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1.

L'objectiu primordial d'aquest treball ha estat el d'estudiar més a fons el marcat per afinitat de l'enzim emprant 6-Cloropurina ribosa i Cl6-RMP per tractar d'assolir un millor coneixement del seti de fixació de purines de la RNAasa A.

Al final del seu treball PARÉS (1977) es plantejava una sèrie de preguntes respecte del resultat del marcat de la RNAasa A pel Cl6-RMP. El derivat monosubstituit majoritari obtingut, o Derivat II, és un derivat en l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la lisina N-terminal, fet que resulta inesperat i que no estaria d'acord amb les dades obtingudes per cristal·lografia de raigs X amb complexos entre la RNAasa S i inhibidors, tals com el Up(CH<sub>2</sub>)A (RICHARDS & WYCKOFF, 1971) i el C2'-5'A (WODAK et al., 1977).

Segons les dades de cristal·lografia de raigs X, la zona de la molècula de RNAasa corresponent a la Lys-1 està poc definida. La part N-terminal es troba en el extrem de l'esclletxa que forma el centre actiu (posició externa i relativament exposada al dissolvent). Aquesta lisina terminal està quelcom "allunyada" del seti fixador de fosfat de l'enzim (His-12, His-119): a 13,4 Å l' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>, a 18,5 Å l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> i a 17,35 Å el C- $\alpha$ . La distància entre l'àtom de fòsfor i el C(6) de la base purínica en el Cl6-RMP és d'uns 10,5 Å. Així doncs les dades cristal·logràfiques no s'oposen a la hipòtesi de que una vegada fixat el nucleòtid en el seti fixador de purines, tingui lloc la reacció entre la Lys-1 i la base clorada. Cal tenir també en compte que la molècula de Cl6-RMP pot adoptar, en

## C INTRODUCCIO 1

solucio, estructures espacials diferents a la de la forma cristal·lina i llavors la distancia entre el grup fosfat i el C(6) pot esser inferior a 10,5 Å essent factible que el Cl<sub>6</sub>-RMP reaccionés amb grups més proxims al seti fixador de fosfat de l'enzim (Lys-7, Lys-41).

D'acord amb el que s'ha esmentat, hom pot plantejar-se la pregunta de la Lys-1 una funcio important en la fixacio dels substrats amb un nucleotid purinic en la posicio 5'. PARFIS (1977) indica que la Lys-1 podria formar part o es trobava proxima al seti fixador de purines, encara que no semblaria jugar un paper important, i conclueix que "per elucidar quina es la regio de l'enzim responsable de la fixacio dels 5'-nucleotids purinics son indispensables estudis nous i mes precisos".

En primer lloc es va decidir de portar a terme una serie de controls addicionals als esmentats a la introduccio, per tal de comprovar l'especificitat de la reaccio RNAasa A-Cl<sub>6</sub>-RMP. Així, d'acord amb el criteri (GLAZER, 1975) de que la presència d'un lligand normal ha de disminuir la proporció de reaccio amb l'analog quimicament reactiu, estudiar la reaccio de marcatge en presència d'AMP. Estudiar, també, l'efecte del marcador sobre l'activitat de la RNAasa A en solucio.

Apart dels controls esmentats, es va creure convenient, per caracteritzar el seti fixador de purines

- a) D'acord amb els treballs de GOLDFARB & MARTIN (1976 a i b), estudiar l'efecte del pH en la reaccio de marcatge, efectuant-la a pH's mes basics, per veure si aquesta elevacio afavoria la formacio d'un altre derivat per marcat en el seti fixador de purines que no fos el Derivat II.
- b) Procedir a la caracteritzacio d'altres derivats (tant per reaccio de l'enzim amb el Cl<sub>6</sub>-RMP com amb la 6-Cloropurina ribosa) i veure si, a mes del seti fixador de purines, s'han marcat altres setis i, en aquest cas, estudiar-los i caracteritzar-los.
- c) Per tal de poder relacionar i intentar explicar les dades, portar a terme l'elaboracio d'una grafica tridimensional de la RNAasa A amb ordenador, emprant les dades per cristal·lografia de raigs X (CARLISLE, 1974).

[ MATERIALS I MÉTODES ]

**-II- MATERIALS I MÉTODES**



## II-I PREPARACIÓ DE RIBONUCLEASA A: PURIFICACIÓ DE L'ENZIM

L'enzim emprat provenia de 3 cases comercials: CALBIOCHEM (Los Angeles, USA), CAMBRIAN CHEMICALS (Croydon, Surrey, U.K.) i BIOZYME (South Wales, U.K.).

La RNAasa A és la fracció majoritària que s'obté emprant la resina de bescanvi iònic IRC-50 (HIRS et al., 1953) i que correspon a la fracció anomenada D si s'utilitza com a resina la carboximetil-celul·losa (CM-celul·losa) (TABORSKY, 1959). Aquest últim ha sigut el mètode emprat. Com a única variació cal assenyalar la substitució de la resina CM-celul·losa (CM-52 WHATMAN, Springfield Mill, U.K.) per la CM-Sepharose CL-6B (PHARMACIA FINE CHEMICALS, Uppsala, Suècia), que permet fluxos més elevats (sota la influència dels quals no es compacta) i no és necessari desmontar la columna després de cada utilització (com era el cas de la CM-52 WHATMAN) podent-se regenerar dintre mateix de la columna.

També cal assenyalar la notòria repetitivitat que es va poder obtenir en totes les separacions fetes emprant la segona resina. Així mateix, s'observa també una significativa major resolució.

Un altre avantatge d'aquest tipus de resina és que la matriu, la Sepharose, és inert en front de l'atac microbià, essent l'única precaució necessària per evitar-la l'eliminar la proteïna o amortidor que hagués pogut restar en el seu interior, passant-hi un amortidor d'elevada força iònica i després aigua destil·lada. Així es logra conservar la columna llarg temps sense problemes.

En una purificació típica, 1 g de RNAasa A comercial es dissol en 40 ml de l'amortidor Tris/HCl 0,015 M, pH 8,0. S'ajusta el pH a 8,0 amb NaOH (0,5 M). Aquest ajust és important, doncs la RNAasa A, en tan gran concentració, sobrepassa la capacitat amortidora del Tris/HCl 0,015 M emprat.

Aquests 40 ml a pH 8,0 s'apliquen a una columna de 2,6x50 cm (LKB 2137, Suècia) empaquetada amb CM-Sepharose CL-6B equilibrada amb Tris/HCl 0,015 M, pH 8,0, amb un flux de 30 ml/h (mantingut amb una bomba peristàltica LKB Varioperpex

12.000, Suècia). Una vegada entrada la mostra, es renta amb l'amortidor d'equilibració de la columna fins que la conductivitat i el pH de l'elut siguin iguals als d'entrada. La mostra s'elueix llavors amb 1200 ml del gradient linial de 0 a 0,15 M NaCl dissolt en l'amortidor emprat. Es recullen fraccions de 5 ml gràcies a un col·lector de fraccions Ultrorac (LKB) i es controla el líquid elut amb un detector d'absorció a 260 nm (Uvicord II, LKB) connectat a un registrador gràfic.

Les diferents fraccions obtingudes es junten i es des-salen per dialisi en front d'aigua destil·lada (fins una conductivitat de 90  $\mu$ S o inferior). Es congelen i liofilitzen i es guarden en dessecador a  $-20^{\circ}$  C fins al moment de la seva utilització. Les concentracions de RNAasa en cada fracció es determinen espectrofotomètricament emprant el coeficient d'extinció molar ( $\epsilon$ ) de la RNAasa A.

La resina de la columna es regenera fent-hi passar Tris/HCl 0,5 M, pH 8,0 a un flux de 80 ml/h (que provoca la sortida d'un pic amb característiques espectrofotomètriques de RNAasa) i tot seguit es reequilibra amb l'amortidor inicial si es vol tornar a fer servir immediatament, o amb aigua destil·lada per a conservar-la.

## II-2 SÍNTESI DE 2',3'Cp

Donat que el 2',3' Cp comercial presenta normalment contaminació amb 2'-CMP i 3'-CMP, potents inhibidors competitius de la RNAasa A (UKITA et al., 1961), es va procedir a la seva síntesi.

Es va seguir el mètode de SZER & SHUGAR (1963) per ciclar la barreja d'isòmers 2'(3')CMP (CAMBRIAN CHEMICALS), en solució de metanol anhidre (MERCK) i per mitjà de dicitclohexilcarbodiimida (MERCK) com a agent ciclador. El 2',3'Cp, en forma amònica, es va passar a sal sòdica amb una columna de bescanvi iònic Dowex AG50 Wx8 (BioRad). El producte final va ésser analitzat, quant a puresa, per capa fina amb el dissolvent: sulfat amònic saturat, isopropanol, acetat sòdic 1M (78: 2: 20 en vol.) donant una sola taca amb un Rf de 0,49 (Rf 2'(3')CMP : 0,67).

### II-3 OBTENCIÓ DE L'RNA

L'RNA emprat en els estudis cinètics va ésser purificat en el nostre laboratori a partir de germen de blat pel mètode de GLITZ & DECKER (1963) i comprovada la seva estabilitat (NOGUÉS, 1978). En alguns casos s'ha emprat RNA comercial (SIGMA, Munchen, West Germany).

### II-4 SÍNTESI I PURIFICACIÓ DEL MONONUCLEÒTID HALOGENAT C16-RMP

Es va sintetitzar a partir de 6-Cloropurina ribosa (CAMBRIAN CHEMICALS). El procés de síntesi, purificació i caracterització emprat és el descrit en els treballs de GELPÍ et al. (1976), PARÉS (1977) i PARÉS et al. (1978), amb petites modificacions dirigides principalment a augmentar el rendiment de la reacció i de la posterior purificació (Figura 11). En un procés típic es prenen 230 mg de 6-Cloropurina ribosa (0,8 mmols) es dissolen en 1 ml de trimetilfosfat (8,5 mmols), i s'hi afegeixen 0,4 ml de triclorur de fosforil (4,13 mmols). El trimetilfosfat emprat va ésser el comercial amb un pH de 6,5 portat a 2,2 amb àcid fosfòric, ja que es va poder comprovar que gràcies a aquest tractament s'augmentava considerablement el rendiment.

La barreja es col·loca en un bany amb gel i sal. La reacció es deixa 17 hores a 4° C, amb agitació (procurant que la barreja no s'escalfi per acció de l'aparell d'agitació). Al final es torna a refredar en un bany de gel i sal i s'hi afegeixen 1,4 ml d'aigua i 12,3 ml de LiOH 1 M.

En aquest punt el pH de la barreja era de 1,5. S'hi afegeix acetat bàric 1 M. El precipitat es centrifuga, i el nucleòtid del sobrenadant es precipita amb etanol. Es centrifuga i el nucleòtid s'extreu per successives addicions de quantitats petites d'aigua. Es junten totes les extraccions, es precipita el nucleòtid amb 2 volums d'etanol, es centrifuga i el precipitat es renta amb etanol i éter i se seca.

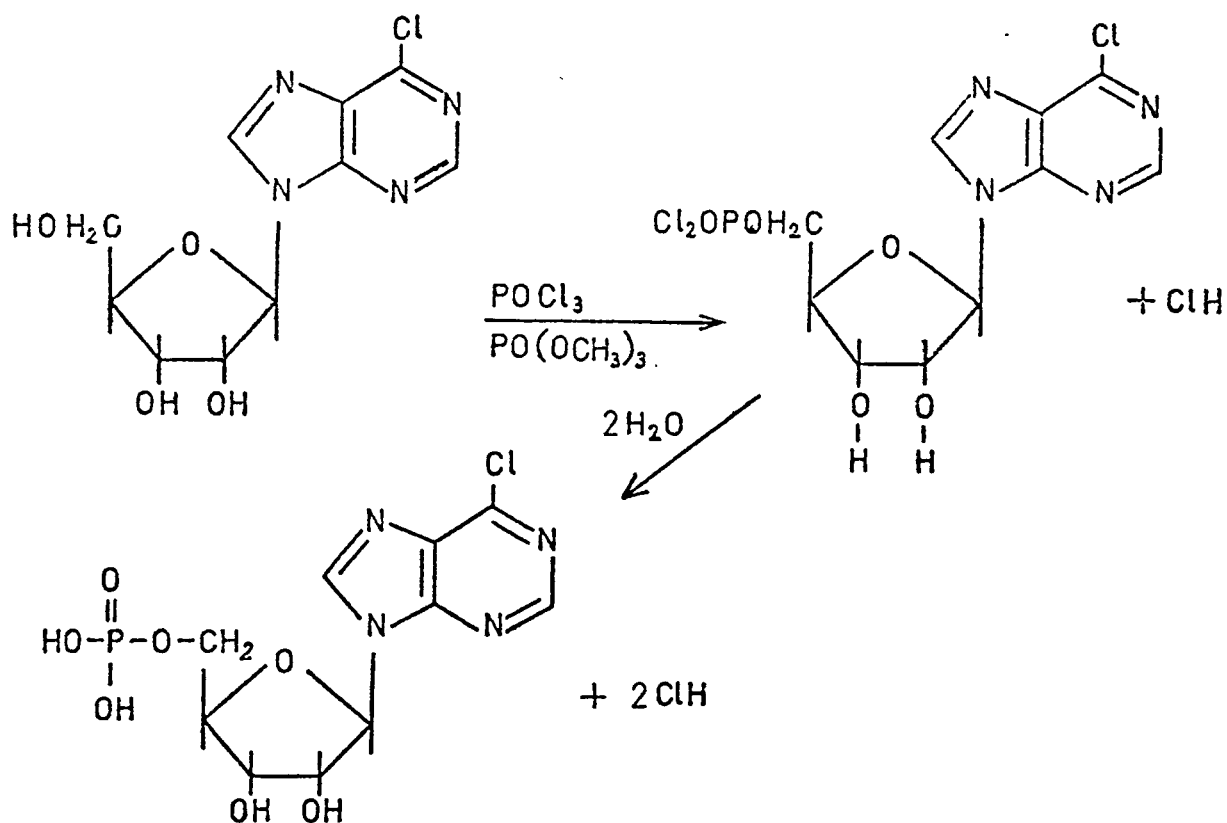


FIGURA-11

Síntesi de Cl6-RMP segons el mètode de YOSHIKAWA et al. (1969).

## C MATERIALS I MÈTODES ]

S'obtenen rendiments molars, respecte del producte de partida, del 70%, amb un producte final d'un 96% de puresa. La quantitat de producte obtingut es va calcular a partir de dades espectrofotomètriques, emprant-se un coeficient d'extinció molar ( $\epsilon$ ) de  $8.560 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

La puresa es va comprovar per cromatografia en capa fina sobre cromatofolis de cel.lulosa (20x20 cm) MERCK. Les mostres ( $40 \mu\text{l}$  d'una solució 1 mg/ml d'aigua) s'aplicaren amb xeringa Hamilton (Reno, USA) a uns 1,5 cm de l'extrem inferior del cromatofoli, secant-se amb un secador d'aire. La placa s'introduí en una cubeta de cromatografia (ATOM, Barcelona), previament saturada amb els eluïents, que foren: n-butanol-àcid acètic-NH<sub>4</sub>OH 25%-acetona-aigua destilada (45:10:10:15:20 en vol.) (RANDERATH, 1961; RANDERATH & STRUCK, 1961) i es deixa unes 6 hores, per a un desenvolupament ascendent, després de les quals la placa se seca a l'estufa a uns 40 °C durant uns 30 minuts.

El Cl<sub>6</sub>-RMP té un R<sub>f</sub> en aquestes condicions de 0,47, idèntic al del Cl<sub>6</sub>-RMP sintetitzat per HAMPTON & MAGUIRE (1961), apreciand-se una sola taca a l'observar la placa sota una làmpara ultraviolada Uvatom (ATOM) de doble longitud d'ona 254 nm i 360 nm) ja que el producte i d'altres possibles impuresas absorbeixen en la regió ultraviolada (la tècnica poseeix un grau tal de sensibilitat que permet apreciar fins  $1 \mu\text{g}$  de substància present).

L'anàlisi de la puresa de la 6-Cloropurina ribosa, (CAMBRIAN CHEMICALS, lot. C-112, 3983) es va comprovar també mitjançant cromatografia en capa fina. Els dissolvents, en aquest cas, van ésser: solució saturada de sulfat amònic, acetat sòdic 1 M, isopropanol (80:18:2 en vol.) (MARKHAM & SMITH, 1952). La placa es deixa desenvolupar en forma ascendent durant 5 hores i se seca a l'estufa a 40 °C durant una mitja hora. El resultat s'observa amb la làmpara ultraviolada. La 6-Cloropurina ribosa mostra un R<sub>f</sub> de 0,33.

## II-5 PREPARACIÓ DE RIBONUCLEASA S. SEPARACIÓ DEL S-PÈPTID I S-PROTEÏNA

La hidròlisi de la RNAasa A i dels derivats obtinguts mitjançant la subtilisina, i la separació de l'S-pèptid (aminoàcids 1 a 20) de la S-proteïna (aminoàcids 21 a 24) s'ha realitzat mitjançant la metodologia emprada per CUCHILLO (1974) i PARÉS (1977), amb petites modificacions.

La subtilisina emprada va ésser la Subtilopeptidasa A, tipus VIII, proteasa alcalina extreta de *Bacillus subtilis* (SIGMA, St. Louis, Missouri, USA).

En una preparació típica, uns 100 mg d'enzim natiu o uns 20 mg de derivat, dessalats i liofilitzats es dissolen en 1 ml de Tris/HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, pH 8,0. Se l'hi afegeix un 1% del pes de mostra de subtilisina dissolta en el mateix amortidor. La barreja es deixa 30 minuts a 4 °C. La reacció s'atura afegint-hi 0,3 ml de HCl 2 M i 0,5 ml d'àcid acètic 0,2 M (aquestes condicions desnaturalitzen irreversiblement la subtilisina. RICHARDS & VITHAYATHIL, 1959). Els dos fragments, l'S-pèptid i la S-proteïna, se separen per cromatografia en columna de Bio-Gel P6 (Bio Rad) (2,2x150 cm) equilibrada amb àcid acètic 0,2 M. L'elució es realitza a un flux de 35 ml/h, també amb acètic 0,2 M (per destruir les possibles interaccions de tipus no covalent entre els dos fragments). L'ús del gel BioGel P6, en lloc de Sephadex G-25 emprat per altres autors, es deu a raons quasi idèntiques a les ja esmentades en el cas de l'ús de la CM-Sepharose, o sia, possibilitat de fluxos més elevats, no compactació del gel, unes molt menors interaccions inespecífiques entre el gel i les mostres, no contaminació microbiana i una major resolució.

Es recullen fraccions de 3 ml, i es llegeixen a l'espectrofotòmetre a 230, 260 i 280 nm. Juntades les fraccions, es congelen, liofilitzen i es guarden en dessecador a 4°C.

## II-6 ESPECTROFOTOMETRIA A L'ULTRAVIDLAT

Tots els espectres a l'ultraviolat, tant directes com de diferència, així com les mesures de concentració de proteïnes, de nucleòtids i les de determinació d'activitat enzimàtica van ésser fets amb un espectrofotòmetre Varian Cary 219 de doble feix amb cambra per a cubetes termostatitzada. S'han emprat, excepte en el cas de l'espectrofotometria de diferència, cubetes de quarç de 10 i de 2 mm de camí òptic (Thermal Syndicate Limited - England) que es van tenir 2-3 minuts en barreja cròmica després de cada experiment, ja que se sap que la RNAasa A s'enganxa a les parets de vidre o quarç per interaccions de tipus electrostàtic inespecífiques (HUMMEL & ANDERSON, 1965). El mateix tractament va rebre tot el material de vidre que hagués d'estar en contacte amb les solucions de substrat.

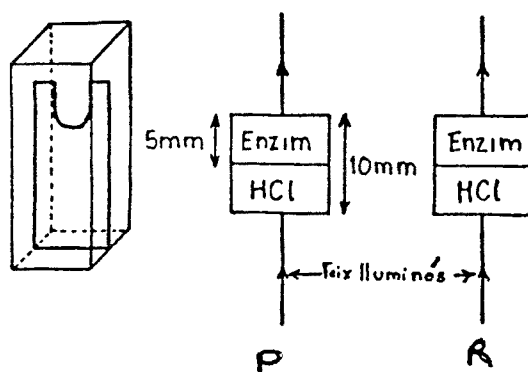
### II-6.1 ESPECTROFOTOMETRIA DE DIFERÈNCIA

Donat que la RNAasa A (que no té cap triptòfan en la seva seqüència) no presenta diferència d'espectre al baixar el pH de neutre a àcid (d'acord amb el comportament teòric, doncs el cromòfor principal, la tirosina, no presenta cap modificació al baixar el pH, i el grup fenòlic no presenta ionització), es pot obtenir informació dels espectres de diferència referits a l'envoltall i localització de cromòfors naturals o artificials units covalentment, o no, a la proteïna.

Així, al pertorbar d'alguna manera l'entorn d'aquests cromòfors en solució, els podem afectar provocant una diferència d'espectre mesurable. Aquests cromòfors els podem afectar fent-los interaccionar amb una proteïna, o per canvis de pH, temperatura, etc. Si aquest cromòfor (per exemple nucleòsid o nucleòtid) està unit covalentment a la proteïna, el podem afectar, per exemple, per canvis de pH.

Per obtenir els espectres de diferència es van fer servir cubetes compartimentades, amb un camí òptic de 5 mm cada compartiment. (Figura següent).

## [ MATERIALS I MÈTODES ]



Les cubetes amb la mostra problema (P) i amb la de referència (R) es van omplir de la mateixa manera: 1ml de la solució amb la mostra de la que es vol determinar la diferència d'espectre dissolta en aigua a pH neutre i la solució àcida en l'altre. En primer lloc s'estableix la línia de base fent l'espectre de la cubeta P respecte de la R, desde 320 nm fins a 230 nm, a una escala de 0-0,1 unitats d'absorbància. La plumeta es col·loca al mig del registre gràfic. Tot seguit es barreja el contingut de la cubeta P i es registra l'espectre de diferència. Finalment es barreja el de la R i es registre un altre cop l'espectre, havent-se de recuperar la línia de base. Es rebutgen els espectres en els quals la línia de base inicial i final no concideixin.

DEAVIN et al. (1968) observaren que l'ordre dels compartiments respecte al feix no té cap efecte sobre l'espectre.

Totes les solucions d'enzim o de derivats emprades presentaven una densitat òptica no superior a 0,5 a 280 nm, en aigua destil·lada a pH neutre (solucions d'enzim o de derivat d'una concentració 0,1 mM que passa a ésser 0,05 mM al final de l'experiment). El HCl emprat era 0,05 M i el pH final de la barreja era de 0,6 a 1. La temperatura habitual de treball va ésser de 25°C.



## 11-6.2. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA

Es van emprar diversos mètodes per mesurar l'activitat tant de l'enzim natural com dels diversos derivats, escollint-se en cada cas el més adient:

### 11-6.2.a. TÈCNICA ESPECTROFOTOMÈTRICA EMPRANT 2',3' fosfat cíclic (2',3' Cp) COM A SUBSTRAT. (CROOK et al., 1960).

Es mesura la formació de producte al llarg del temps, mesurant l'increment d'absorbància que té lloc a 284 nm, per hidròlisi del 2',3' Cp a 3'-CMP. Es va utilitzar una concentració de 2',3' Cp de 0,3 mM en amortidor Tris/HCl 0,1 M, pH 7,4, més NaCl per assolir una força iònica de 0,2. En altres casos s'utilitza acetic/acetat sòdic 0,2 M, pH 5, sempre a 25°C de temperatura.

S'han emprat cubetes de 10 mm. de camí òptic, amb 2,5 ml. de solució de substrat. La reacció s'iniciava afegint 0,05 ml. de la solució enzimàtica als 2,5 ml. de la cubeta de la mostra, agitant-se a continuació. La cubeta de referència contenia els 2,5 ml de solució de substrat més 0,05 ml de tampó (per a que les dissolucions finals, en ambdues cubetes, fossin les mateixes). Les velocitats inicials es van obtenir medint la tangent a l'origen de la progressió de la cinètica, fàcilment determinable, ja que sota aquestes condicions l'increment d'absorbància és lineal durant els primers minuts de la reacció (HERRIES et al., 1962). Totes les medicions s'efectuaren normalment per duplicat (com a mínim).

Les concentracions d'enzim i de substrat es determinaren espectrofotomètricament amb els següents coeficients d'extinció molar:

$$\text{RNAasa A.} = \epsilon \text{ a } 278 \text{ nm} = 9800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

(SELA & ANFINSEN, 1957)

$$2',3'\text{Cp} = \epsilon \text{ a } 268 \text{ nm} = 8650 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

(WIGLER, 1968)

#### II-6.2.b. TÈCNICA ESPECTROFOTOMÈTRICA EMPRANT RNA i POLI-C COM A SUBSTRAT.

A 25°C s'omplen les cubetes amb 2,5 ml d'una solució d'RNA (obtingut de germen de blat, i en alguns casos, aquest RNA ve ésser de font comercial - SIGMA, München, West Germany) de 0,1 mg/ml en amortidor Tris/HCl 0,1 M pH 7,4 o bé acètic/acetat sòdic 0,2 M pH 5. Es va llegir l'increment d'absorbància a 260 nm degut a l'efecte hipercròmic, a aquesta longitud d'ona, produït per la despolimerització dels àcids nucleics.

Quan s'empraren solucions d'RNA d'1 mg/ml, degut a la seva gran absorció a l'ultraviolat, es va llegir la disminució d'absorbància a 300 nm, deguda a la hipocromicitat del fosfat cíclic respecte dels oligonucleòtids o nucleòtids lliures (mètode de KUNITZ, 1946).

Les concentracions d'RNA van ésser preparades per pesada, tenint en compte un contingut d'aigua i sals del 10%.

Emprant poli-C es segueix la mateixa metodologia que per l'RNA.

#### II-6.2.c. TÈCNICA ESPECTROFOTOMÈTRICA EMPRANT DINUCLEÒSIDS MONOFOSFAT COM A SUBSTRAT.

Les solucions de substrat (CpA, CpG, CpC i CpU - SIGMA, St Louis, Missouri, USA) es preparen en 2,5 ml d'amortidor Tris/HCl 0,1 M, pH 7,4 amb 0,1 M en NaCl, a 25°C. La reacció s'inicia afegint 0,05 ml de solució enzimàtica a aquesta solució, llegint-se la disminució d'absorbància que es produeix al llarg del temps a 286 nm (WITZEL & BARNARD, 1962).

Les concentracions de dinucleòsids monofosfat emprades van ésser de l'ordre de 0,1 mM i es van determinar espectrofotomètricament amb els següents coeficients d'extinció molar:

CpA  $\epsilon$  a 261 nm : 10.500 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

CpG  $\epsilon$  a 254 nm : 10.100 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

CpC  $\epsilon$  a 268 nm : 8.470 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

CpU  $\epsilon$  a 264 nm : 8.530 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

(TRIM & PARKER, 1970; TUAL et al., 1968)

Les concentracions d'enzim van ésser molt baixes, de l'ordre de 1 nM, degut a la gran rapidesa de la hidròlisi d'aquests substrats.

### II-6.3. DETERMINACIÓ DE LES CONSTANTS CINÈTIQUES PER A LA HIDRÒLISI DEL 2',3' Cp CATALITZADA PER L'ENZIM NATIU O DERIVAT SOTA ESTUDI

Es va seguir la metodologia de HERRIES et al. (1962).

Es preparen 7 dissolucions de 2',3'Cp de concentracions 0,1 ; 0,14 ; 0,22 ; 0,43 ; 0,65 ; 1 i 1,5 mM, en amortidor acètic/acetat sòdic 0,1 M, NaCl 0,1 M, pH 5.

La dissolució enzimàtica va ésser de l'ordre de 30 nM. Per a cada concentració de substrat es va medir l'increment d'absorbància a 296 nm, ja que a 284 nm les solucions més concentrades de substrat absorben massa i escapaven a la sensibilitat de l'aparell. S'ha de tenir en compte que a aquesta longitud d'ona, 296 nm, la diferència d'absorbàncies entre el substrat i el producte format, el 3'-CMP, es encara apreciable (PARÉS, 1977).

La constant de MICHAELIS (Km) de la reacció es va calcular mitjançant la representació gràfica de LINEWEAVER & BURK (1934), d'EADIE (1942) i HOFSTEE (1952), i d'ATKINS et al. (1975) i de CORNISH-BOWDEN & EISENTHAL (1978) en alguns casos.

Els punts representats van ésser ajustats a la recta de regressió calculada per computadora mitjançant un programa especial (CASTRO M.M. 7030060). Aquest programa calculava directament, mitjançant els tres tipus de representació abans esmentats,  $K_m$  i  $V$ , el coeficient de correlació de la recta ( $r$ ), i el marge d'error dels paràmetres calculats.

#### II-6.4. DETERMINACIÓ DE LES CONSTANTS CINÈTIQUES DE LA HIDRÒLISI DE L'RNA CATALITZADA PER L'ENZIM NATIU O EL DERIVAT SOTA ESTUDI

Aquesta determinació proporciona informació de les dues fases de l'acció enzimàtica. Es va seguir la metodologia de KUNITZ (1946). Com a substrat va ésser emprat l'RNA de germen de blat o comercial (SIGMA-München, West Germany) dissolt en amortidor acetat sòdic/HCl 0,1 M, 0,1 M en NaCl a pH 5, a 25°C de temperatura.

La metodologia emprada està descrita a l'apartat II-1.3.b., tant per a les medicions de la disminució d'absorbància a 300 nm per a concentracions de substrat elevades (més de 0,5 mg/ml), com l'augment d'absorbància a 260 nm per a baixes concentracions (per sota de 0,5 mg/ml).

La dissolució enzimàtica va ésser de l'ordre de 23  $\mu$  M en les determinacions a 300 nm, i 6  $\mu$  M en les determinacions a 260 nm.

Les concentracions de substrat emprades van ésser, per les determinacions a 300 nm, entre 0,5 i 5 mg/ml (ja que 5 mg/ml era la màxima concentració que podia ésser emprada a 300 nm sense sobrepassar el límit de sensibilitat de l'aparell). Per a determinacions a 260 nm van ésser entre 0,01 i 0,5 mg/ml (ja que 0,5 mg/ml era la màxima concentració que podia ésser emprada, a 260 nm).

En alguns casos es van obtenir les constants cinètiques pels mètodes esmentats a l'apartat II-1.4. En d'altres només es van fer les representacions directes de la velocitat inicial en front de la concentració de substrat, degut a consideracions que es discutiran més endavant.

## II-7 DIÀLISI

S'utilitzaren sacs de diàlisi de cel·lulosa (VISKING-TUBING, Scientific Instrument Ltd. London, U.K.) de 30 nm de diàmetre de porus. Els sacs van ésser sotmesos, per a disminuir el tamany de porus, a ebullició en  $\text{CO}_3\text{HNa}$  al 10% durant 10 minuts, dues vegades. A continuació, a ebullició en etanol durant 10 minuts i, finalment, en aigua destil·lada amb una petita quantitat d'EDTA (MERCK).

Es conserven en aigua amb unes gotes de cloroform per evitar contaminacions microbianes. Abans d'ésser emprats es netegen exhaustivament amb aigua destil·lada.

La diàlisi s'efectua en front d'un volum de líquid de 100 a 200 vegades superior al volum de mostra. El sistema es manté a 4 °C, amb agitació magnètica, canviant-se el líquid de diàlisi 4 vegades, durant 24h.

## II-8 LIOFILITZACIÓ

Després de congelar-se, les mostres es sotmeten a liofilització fins a la total eliminació del líquid. S'utilitza un aparell Criobloc i bomba de buit TELSTAR (Terrassa) (pressió interna inferior a 0,1 mm de columna de mercuri).

## II-9 REACCIÓ ENTRE LA RIBONUCLEASA A i EL CL6-RMP A pH 7,4

Hom segueix el procés descrit per PARÉS (1977) i PARÉS et al. (1980 a).

Condicions de reacció: 500 mg d'RNAasa A ( $36,5 \mu\text{mols}$ ) més 850 mg de CL6-RMP (sal bàrica) ( $1690 \mu\text{mols}$ ) dissolts en 25 ml d'amortidor Tris/HCl 0,1 M, pH 7,4. La barreja (que té un pH de 7,4) s'incuba 48 hores a 40 °C. El pH final és de 7,2.

II-9.1 SEPARACIÓ i PURIFICACIÓ DELS DERIVATS  
OBTINGUTS

II-9.1.a Eliminació del CL6-RMP que no ha reaccionat, per cromatografia en columna de Bio-Gel P2 (1,6x90 cm), equilibrat amb Tris/HCl 0,015 M, pH 8,0. S'elueix la columna amb el mateix amortidor a un flux de 25 ml/h, recullint-se fraccions de 4 ml.

II-9.1.b Separació dels components de la fracció proteica de la cromatografia precedent, per cromatografia de bescanvi catiònic en columna (1,5x45 cm) de CM-Sepharose CL-6B, equilibrada amb Tris/HCl 0,015 M, pH 8,0, i aplicant un gradient lineal de 0-0,15 M de NaCl (en el mateix amortidor). El gradient s'assoleix mitjançant un sifó entre 2 vasos de precipitats, un amb 400 ml d'amortidor i NaCl 0,15 M i l'altre amb 400 ml d'amortidor sense NaCl (ALM et al., 1952) sotmes a agitació magnètica per a obtenir una bona barreja a cada moment. Es aquest segon vas el que es connecta a la columna. Prèviament s'ha eliminat el gas de les solucions, per tal d'evitar la formació de bombolles d'aire a l'interior de la columna.

El perfil d'elució el dóna automàticament el registrador de l'aparell abans esmentat, i es verifica a l'espectrefotòmetre medint l'absorbància a 280 nm. També es fa un control del gradient salí de l'elució medint la conductivitat de les fraccions.

II-9.1.c Una vegada separats, els derivats es desassenen per diàlisi en front d'aigua destil·lada a 4°C, es congelen i liofilitzen, conservant-se en dessecador a -20°C.

II-9.1.d Recromatografia. Per tal de purificar els diferents derivats obtinguts, es sotmeten a una cromatografia en columna de CM-Sepharose CL-6B (1,5x45 cm) equilibrada en Tris/HCl 0,015 M, pH 7,2 a un flux de 25 ml/h, recullint-se fraccions de 4 ml. L'elució s'efectua mitjançant un gradient de força iònica i de pH, gràcies a dues dissolucions connectades per pont sifonat. La força iònica del gradient varia, depenent de cada derivat, essent en molts casos el pH de 8,5. Cada fracció va ésser juntada, dialitzada, congelada i guardada.

II-9.1.e Cromatografia de bescanvi aniònic. La fracció proteïca que no va restar retinuda en la resina de bescanvi catiònic, va ésser recromatografiada en columna de DEAE-Sepharose (1x30 cm) equilibrada amb Tris/HCl 0,015 M, pH 8,0, flux de 20 ml/h, recullint-se fraccions de 3 ml. L'elució va tenir lloc a l'aplicar-se un gradient linial de 0-0,25 M de NaCl.

El pic majoritari, després de reunir-se les fraccions i ésser dialitzat en front de Tris/HCl 0,015 M, pH 8,0, va ésser recromatografiat en columna de DEAE-Sepharose (1x30 cm) i l'elució es va portar a terme amb un gradient mixt de força iònica i pH, des de l'amortidor inicial, abans esmentat, fins l'amortidor Tris/HCl 0,2 M, pH 7,2.

## II-10 REACCIÓ RIBONUCLEASA A - CL6-RMP A DIFERENTS PH'S

La metodologia emprada va ésser la ja esmentada a la secció II-9, excepte el pH de l'amortidor que va ésser de 8,0; 8,5 o 9,0. Les quantitats emprades van ésser, en els 3 casos, 50 mg de RNAasa A i 100 mg de CL6-RMP en 11 ml d'amortidor (0,0035 mmols i 0,2 mmols respectivament).

## II-11 REACCIÓ RIBONUCLEASA A - CL6-RMP EN PRESEN- CIA D'AMP

Condicions de reacció: 100 mg de RNAasa A es dissolen en 22 ml d'amortidor Tris/HCl 0,05 M, pH 7,4, i aquesta solució es divideix en dues parts:

a) a 11 ml de la barreja s'hi afageixen 100 mg de CL6-RMP (0,2 mmols). Aquesta és la reacció patró.

Feta la barreja, es comprova el pH, portant-lo, si és necessari, a 7,4 amb NaOH 0,1 M.

b) als restants 11 ml s'hi afageixen 100 mg de CL6-RMP i 500 mg d'AMP (1,4 mmols).

Feta la barreja, es comprova el pH, portant-lo a 7,4.

Ambdues solucions s'incuben 48 hores a 40°C. El pH final d'ambdues reaccions va ésser de 7,3.

Per separar els derivats obtinguts es va emprar la mateixa metodologia de la reacció RNAasa A - CL6-RMP, a pH 7,4 abans esmentada, o sigui: eliminació del CL6-RMP i del CL6-RMP i AMP per cromatografia en columna de Bio-Gel P2 i separació dels components de la fracció proteica per cromatografia de bescanvi catiónic en columna de CM-Sepharose CL-6B. Finalment els derivats separats es dessalen per diàlisi, congelen i liofilitzen.

## II-12 REACCIÓ RIBONUCLEASA A - 6 CLOROPURINA RIBOSA

Les condicions emprades son idèntiques a les de l'apartat II-9, amb la diferència de que els nucleòsids presenten una constant d'associació amb l'enzim unes 20 vegades inferior a la dels nucleòtids (UKITA et al., 1961) i aquest fet va determinar l'ús d'una quantitat de 6-Cloropurina ribosa més gran (3,5 mmols) per afavorir la interacció amb la RNAasa A.



La reacció es va fer a pH 7,4 durant 48 horas i a 40°C

L'eliminació del marcador no reaccionat va ésser efectuada per diàlisi en front de l'amortidor Tris/HCl 0,015 M, pH 8,0 i procedint-se posteriorment a la cromatografia de bescanvi catiónic de la fracció proteica i posteriors recromatografies per purificar les fraccions obtingudes.

#### II-13 CONTROL D'ESTABILITAT DE LA RIBONUCLEASA A i DELS MARCADORS 6-CLOROPURINA RIBOSA i CL6-RMP EN LES CONDICIONS DE REACCIÓ

Aquest control ja va ésser realitzat en estudis anteriors (PARÉS, 1977), determinat-se que tant l'enzim com el marcador emprat es mantenen estables.

En aquest treball el control es va fer emprant la metodologia descrita en a l'apartat II-4, tant per al 6-Cloropurina ribosa com pel CL6-RMP.

Per la 6-Cloropurina ribosa no es va detectar la formació de cap producte de degradació al llarg del temps.

Per al CL6-RMP, emprant ambdues metodologies, i sembrant mostres al llarg del temps, es va detectar l'aparició de traces de nucleòsid (6-Cloropurina ribosa) a partir de les 24 hores d'incubació a 40 °C en les reaccions fetes a pH bàsic (pH 8,0; 8,5 i 9,0).

#### II-14 DETERMINACIÓ DEL COEFICIENT D'EXTINCIÓ MOLAR DE DIFERENTS DERIVATS OBTINGUTS

Per poder conèixer la concentració d'alguns derivats obtinguts, per espectrofotometria, es va determinar el coeficient d'extinció molar ( $\epsilon$ ) d'aquests derivats emprant la metodologia descrita per NOGUÉS (1982). Aquesta metodologia es basa en el mètode de LOWRY (1965) modificat per HARTREE (1972) (per a determinació de la quantitat de proteïna present en una

mostra). Es construeix una recta patró fent servir una dissolució d'RNAasa A de concentració coneguda, en presència d'adenosina en proporció 1:1 (en mols) per tenir en compte la possible interferència del nucleòtid marcador del derivat amb el mètode de LOWRY. Es determina per triplicat la concentració del derivat pel mètode de LOWRY, emprant la recta patró, del qual previament s'ha determinat la seva absorptivitat a la longitud d'ona en que és màxima. Substituint els paràmetres obtinguts en l'equació de Beer-Lambert es dedueix el coeficient d'extinció molar.

## II-15 ELECTROFORESI DE PROTEÏNES EN GELS DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS

Com a control del grau de formació d'RNAasa S, i dels derivats S, i donada la poca quantitat de mostra disponible en molts casos, es va emprar l'electroforesi en gel de poliacrilamida en presència de SDS (WEBER & OSBORN, 1975; LAEMMLI, 1970), que fa que la mobilitat de les proteïnes sigui, bàsicament, només funció dels seus pesos moleculars.

En el nostre cas es va emprar un tipus d'electroforesi discontinua, en el que es fan córrer les proteïnes a través de dos gels de poliacrilamida de diferent porositat (o tamany de malla) posats un a continuació de l'altre.

El primer gel és de malla grossa (5% en acrilamida) per l'aplicació i concentració de les mostres, i el segon de malla petita pel desenvolupament de l'electroforesi (19% en acrilamida). A més, tant el tampó d'aplicació de les mostres, com el del gel superior i inferior tenen un pH i una composició iònica diferent, que dóna lloc a que les diferents proteïnes que componen la mostra entrin succesivament en el gel inferior concentrades en un espai molt petit, el que dóna lloc a bandes molt fines al temps que incrementa la resolució.

## C MATERIALS I MÈTODES ]

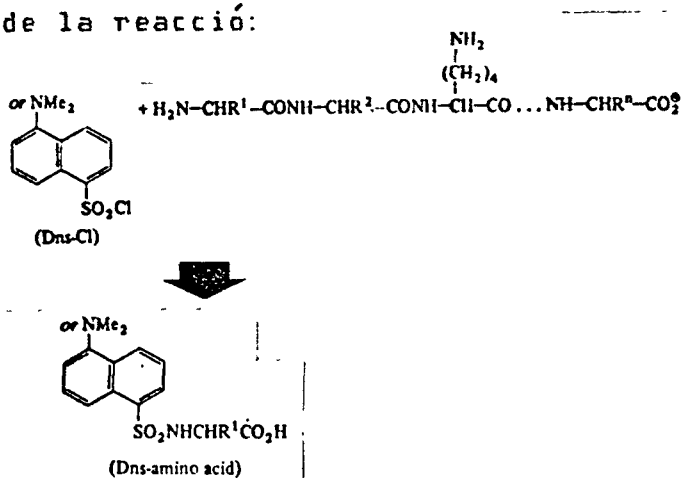
Per poder visualitzar els resultats es va emprar la fluorescamina (4-fenilspiro[*furan-2(3H),1'-ftalan]-3,3'-diona*) (SIGMA) que reacciona amb els grups amí primaris de les proteïnes, donant lloc a derivats fluorescents (WEIGELE et al, 1972; UDENFRIEND, 1972). Aquest reactiu s'utilitza degut al baix pes molecular de l'S-pèptid obtingut (2.000) que fa que difongui i surti fora del gel si s'utilitza la tinció normal amb Coomassie Blue. Un cop finalitzat l'experiment, la posició de les mostres es visualitza observant el gel sota la làmpara ultraviolada.

La reacció amb fluorescamina es va realitzar de la següent manera: a la solució de proteïnes s'afegeix 200  $\mu$ l d'una solució de 0,5 mg en 1 ml d'acetona o de dimetil sulfòxid MERCK (que garantitzi que sigui suficientment pur com per que no porti aigua, que hidrolitza la fluorescamina). La fluorescamina lliure s'hidrolitzarà al córrer la mostra en el gel i només se detectarà la que hagi reaccionat amb la proteïna.

## II-16 DETERMINACIÓ DE L'AMINOÀCID N-TERMINAL DE LA RIBONUCLEASA A i DELS DERIVATS OBTINGUTS

La metodologia emprada per marcar el grup amí va ésser la utilització del reactiu clorur de dansil (Cl-DNS) (clorur de l'àcid 5-dimetilamino-1-naftale sulfònic, MERCK), reactiu introduït per GRAY & HARTLEY (1963), seguit d'una hidròlisi àcida.

Esquema de la reacció:



## [ MATERIALS I MÈTODES ]

El protocol es basa en el de FELGUER & WILSON (1977) i STEHELIN & DURANTON (1969) però sotmès a importants modificacions. En una reacció típica es parteix de 30 nmols d'enzim natural o de derivat, (0,4 mg) en 110  $\mu$ l d'aigua destil.lada i desionitzada + 12  $\mu$ l de SDS al 10%. La barreja es calenta 5 minuts a 100°C. Després s'hi afegixen 120  $\mu$ l de NaHCO<sub>3</sub> 1M, pH 9,5 preparat un moment abans. A continuació 120  $\mu$ l de Cl-DNS (12,5 mg en 0,5 ml de dimetilformamida anhidra MERCK) i es deixa dues hores a les fosques. S'afegixen 85  $\mu$ l d'àcid tricloro acètic al 100% (queda finalment en la solució al 20%), que provoca la precipitació de la proteïna. Es centrifuga 10 minuts a 6.000 rpm en una centrífuga tipus Sorvall (Dupont USA). El sobrenadant s'elimina amb molta cura. Al precipitat s'hi afegixen 0,4 ml de HCl 1M per rentar. Es centrifuga 10 minuts a 6.000 rpm i s'elimina el sobrenadant. S'efectua un altre rentat amb acetona MERCK, centrifugant-se i eliminant-se el sobrenadant. El precipitat s'asseca amb corrent de nitrogen. Finalment s'hi afegixen 50  $\mu$ l de HCl 6M MERCK mes 25  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol. El tub es tanca a la flama aplicant-hi el buit, i es deixa 18 hores a 105°C.

Passat aquest temps es trenca la boca del tub i es deixa en dessecador una nit. Al dematí següent s'afegixen 25  $\mu$ l d'aigua destil.lada i desionitzada, i s'asseca en dessecador. Es repeteix aquest rentat i finalment el precipitat es dissol amb 10  $\mu$ l d'una barreja acetona/àcid acètic 3:2 (v/v).

Se sembren, amb xeringa Hamilton, a uns 1,5 cm de l'extrem inferior d'una placa de Silicagel MERCK, 4  $\mu$ l de les mostres i també patrons de lisina dansilada. Donat que la RNAasa té una lisina a l'extrem amino terminal, si el derivat està marcat en el grup amí ( $\alpha$  o  $\epsilon$ ) d'aquesta lisina, la reacció amb el Cl-DNS donaria lloc a una lisina monodansilada en el grup amí  $\epsilon$  o  $\alpha$  respectivament. Si el derivat no està modificat en la Lys-1, el resultat del marcatge amb Cl-DNS seria el d'una lisina bidansilada. Això implica que els patrons a emprar siguin la lisina mono i bidansilada.

### PREPARACIÓ DE LISINA BIDANSILADA

A 10  $\mu$ l d'una solució de lisina (1,46 mg en 0,1 ml d'aigua destil.lada i desionitzada) s'afegixen 90  $\mu$ l de NaHCO<sub>3</sub> 1M, pH 9,5 (recentment preparat) + 100  $\mu$ l d'una solució de

## [ MATERIALS I MÈTODES ]

Cl-DNS de 34 mg en 1 ml d'acetona. La barreja es deixa 1 hora a temperatura ambient, a les fosques. Després de l'hora s'hi afegeixen 800  $\mu$ l d'àcid fòrmic al 10%, deixant-ho reposar 2h abans d'esser emprat.

La monodansil.lisina es prepara de la mateixa manera, però emprant una solució de Cl-DNS d'una concentració de 2,8 mg en 1 ml d'acetona i deixant-ho reaccionar 10 minuts.

### CROMATUGRAFIA EN CAPA FINA

La placa de silicagel es deixa córrer en una cubeta durant 2 hores amb els dissolvents toluè, etanol, NH<sub>4</sub>OH (del 25%), aigua (15:50:2:2: en vol.) (barreja de caràcter bàsic).

La placa s'asseca durant 10 minuts a 100 °C, i 10 minuts a temperatura ambient.

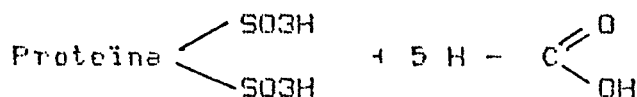
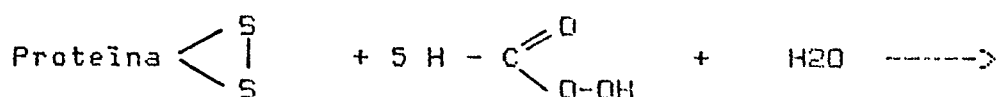
Es torna a introduir en una cubeta per desenvolupar-la ascendentment en una barreja de tipus àcid: cloroform, n-butanol, àcid acètic (45:30:11:25 en vol.) durant 3 hores. Després s'asseca de la mateixa manera que abans i el resultat s'observa sota la llum ultraviolada de 365 nm, marcant-se amb un llapis les taques fluorescents.

### II-17 HIDRÒLISI TRÍPTICA DE LA RIBONUCLEASA A i DELS DERIVATS OBTINGUTS

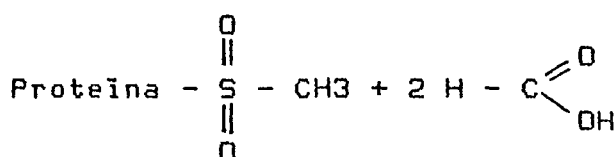
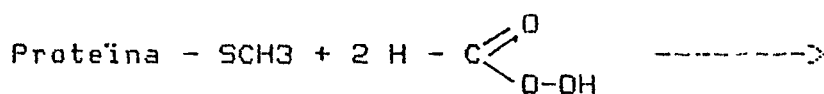
Donada la resistència de la RNAasa A a l'atac per la tripsina, abans de la hidròlisi tríptica es va procedir a obrir els ponts di-sulfur oxidativament (desnaturalitzant la proteïna i permetent l'accés a tota la molècula de la tripsina) mitjançant l'ús de l'àcid perfòrmic segons la metodologia emprada per HIRS (1956), per NEUMANN et al. (1962) i NEUMANN (1969).

La reacció procedeix de la següent manera:

C MATERIALS I MÈTODES ]

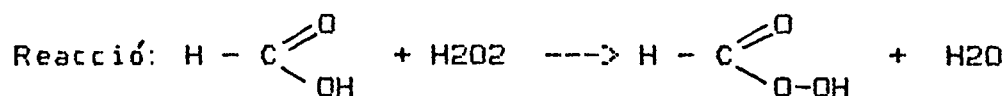


El perfòrmic també oxida la metionina:



El perfòrmic és un oxidant molt poderós i també degrada el triptòfan a formilquinurenina i d'altres productes, essent aquesta la principal contraindicació del seu ús, però, donat que la RNAasa A no en té de triptòfan, es pot emprar per tractar aquesta proteïna. També oxida la tirosina, serina i treonina, però molt més lentament i, normalment, en condicions dràstiques, per això en HIRS treballa a 0 °C, adicionant metanol per evitar la congelació. Per deturar la reacció HIRS diluï primer amb un gran volum d'aigua i després congelà la mostra (HIRS 1967).

II-17.1 OBTENCIÓ D'ÀCID PERFÒRMIC



A 0,5 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (del 30%) s'afegeixen 9,5 ml d'àcid fòrmic del 99%. Es deixa 2 hores a temperatura ambient, en un tub tapat amb tap de rosca.

## [ MATERIALS I MÈTODES ]

De 5 a 10 mg d'enzim natiu o d'un derivat es dissolen en 0,2 ml d'àcid fòrmic del 99% i 0,05 ml d'alcohol metílic i s'agita.

L'àcid perfòrmic, la mostra i aigua destil.lada i desionitzada es posen 30 minuts a 0 °C amb gel. Després dels quals s'afegeixen 0,5 ml de perfòrmic al tub amb la mostra i es deixa 2,5 hores a 0 °C. Al final s'afegeixen 2 ml d'aigua destil.lada a 0 °C i la barreja es passa a un tub amb 15 ml d'aigua destil.lada a 0 °C. El contingut es congela i liofilitza. El residu es redissol amb 1 ml d'aigua destil.lada i desionitzada i es congela i liofilitza de nou.

### II-17.2 HIDRÒLISI TRÍPTICA

La tripsina hidrolitza la cadena polipeptídica per les zones bàsiques determinades per la situació de lisines i arginines. Degut a aquesta especificitat de la tripsina, la modificació per reactius que eliminin o canviïn la càrrega de les lisines per exemple, o que bloquegin l'ε-NH<sub>2</sub>, protegirà aquest aminoàcid de l'atac tríptic (THOMAS, 1974). Això reduirà el nombre total de fragments peptídics obtinguts. La modificació prop d'un residu sensible pot produir el mateix efecte.

Cal assenyalar que la tripsina no hidrolitzarà l'enllaç peptídic format per una lisina o arginina seguides d'una prolina.

A la mostra tractada amb perfòrmic i liofilitzada s'hi afegeixen 0,2 mg de tripsina (SIGMA, amb TPCK inhibidor específic de la Quimotripsina) dissolts en 1 ml de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> CO<sub>3</sub> 0,5 M, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM, pH 8,0.

La barreja es deixa 4 hores a 37 °C, es congela i liofilitza.

II-18 ESTUDIS PER RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR  
(RMN) DE PROTÓ

L'S-pèptid de la RNAasa A, i dels derivats II i F van ésser analitzats per RMN en un espectròmetre Varian XL 200 amb transformada de Fourier, realitzant-se el seu enregistrament al Servei de Ressonància Magnètica Nuclear de la Facultat de Ciències Físiques i Químiques de la Universitat de Barcelona.

Els tubs emprats es netegen per immersió en HCl MERCK, durant 30 minuts. Finalment es renten amb aigua destil·lada i acetona i se sequen amb trompa de buit.

Deuteració de les mostres: es va seguir la metodologia de PATEL et al. (1975, a), emprant D<sub>2</sub>O del 99,8% i del 99,9% (Scharlau DE 038 U.K.). Es dissol la mostra amb un petit volum d'aigua deuterada del 99,8% i es llegeix el pH portant-se a neutralitat amb NaOD. La lectura de l'electrode de calomela, que mesura el pH de dissolucions aquoses, s'ha de rectificar per un valor de 0,4 donat que  $pD = pH + 0,4$  (REDFIELD, 1978), però les dades presentades en funció del pH, medit amb l'electrode de calomela, donen una idea més acertada del pH que les que venen donades en pD, ja que el pKa de la ionització, per pèrdua d'un deuteró del D<sub>2</sub>O, es veu també incrementat unes 0,4 unitats per a molts grups ionitzables.

Es calenta a 40°C durant 15 minuts, es congela i liofilitza. Es repeteix l'operació i al final la mostra es dissol amb 0,8 ml de D<sub>2</sub>O del 99,95%, es calenta a 40°C 15 minuts, es congela i liofilitza. La deuteració té dues funcions: en primer lloc simplificar l'espectre eliminant les ressonàncies dels protons intercanviables (principalment els protons amí-dics de l'enllaç peptídic) i en segon lloc, eliminar, en el que sigui possible, el senyal degut als protons de l'aigua, ja que la seva gran concentració faria inobservables els altres senyals.

La mostra es dissol en aigua deuterada i s'hi afageix DSS ( (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> Si (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>.SO<sub>3</sub>Na) que serveix de referència.



Els desplaçaments químics venen donats en parts per mil·lió (ppm) a camps inferiors a la freqüència de ressonància del DSS. La temperatura de la mostra durant l'enregistrament va ésser de 25 °C.

Quantitats de mostra emprada:		pH
S-pèptid natural	3,27 mg	7
S-pèptid II	1,4 mg	7,7
S-pèptid F	1,5 mg	7,6

Cada espectre es va obtenir per una acumulació de registres mitjançant el càlcul de transformada de Fourier. Per tal d'augmentar la resolució dels espectres s'ha fet servir una manipulació matemàtica que es basa en multiplicar l'espectre normal per una funció exponencial negativa, i restar el resultat obtingut de l'espectre normal. Aquesta manipulació incrementa la resolució, permetent diferenciar o "resoldre" pics molt junts, o pics aguts superposats a d'altres molt amples (CAMPBELL et al., 1973; OPELLA, 1977).

## II-19 ELABORACIÓ DE LES GRÀFIQUES TRIDIMENSIONALS DE LA RNAasa A

El grup de CARLISLE (CARLISLE et al., 1974) cristal·litza la RNAasa A en dissolució etanòlica al 40% i determina la seva estructura terciària per cristal·lografia de raigs X amb una resolució de 2,5 Å. Els autors transformaren les coordenades dels plànols de densitat electrònica en coordenades ortogonals. Van ésser aquestes coordenades les que el Dr. CARLISLE va tenir la gentilesa de remetre'ns. Aquestes coordenades han sigut les emprades per confeccionar les gràfiques tridimensionals portades a terme mitjançant un sistema gràfic interactiu CALMA, amb un sistema operatiu CGI i amb un aparell de dibuixat de les gràfiques GERBER - 6542.

## [ MATERIALS I MÈTODS ]

A l'apèndix (apartat VII) s'enumeren els llistats dels programes emprats.

S'han portat a terme 4 gràfiques:

- 1) representació de la cadena principal, que només inclou els C- $\alpha$  de la cadena polipeptídica (cada vèrtex de la figura).
- 2) representació de la cadena principal a la que s'hi sobreimposen les cadenes laterals:
  - a) una representació des dels eixos X Y.
  - b) una representació des dels eixos Y Z.
- 3) representació de la cadena principal en la que es sobreimposen únicament 39 cadenes laterals, las que resten més a prop del pentanucleòtid que es fa interaccionar amb l'enzim (tal com es veurà en l'apartat IV). Aquestes cadenes laterals són las dels següents aminoàcids de la seqüència de la RNAasa A:

Lys-1, Glu-2, Thr-3, Ala-4, Lys-7, Phe-8, Arg-10,  
Gln-11, His-12, Lys-31, Asn-34, Leu-35, Thr-36,  
Lys-37, Asp-38, Arg-39, Lys-41, Pro-42, Val-43,  
Asn-44, Thr-45, Val-47, Cys-65, Lys-66, Asn-67,  
Gln-69, Asn-71, Cys-72, Ile-81, Arg-85, Lys-104,  
Val-108, Ala-109, Glu-111, Val-118, His-119,  
Phe-120, Asp-121, Ala-122, Ser-123, Val-124.

ESCALA DE REPRESENTACIÓ: cada 0,054 unitats de les coordenades ortogonals emprades corresponen a 1 cm. Cada 0,034 unitats ortogonals corresponen a 1 Å, o sia:

$$1 \text{ cm} = 1,58 \text{ Å}$$

## [ MATERIALS I MÈTODES ]

S'ha dissenyat un pentanucleòsid pentafosfat (ApApCpApAp) com a oligonucleòtid model per fer interaccionar amb la molècula d'RNAasa A. L'estructura i les distàncies interatòmiques emprades han estat extretes dels treballs de OLSON & FLORY (1972), SUSSMAN & SEEMAN (1972), SUCK et al. (1973), TS'O (1974), ROSENBERG et al. (1976) i EINSPAHR et al. (1981), adaptant les distàncies a l'escala emprada per l'elaboració de les gràfiques tridimensionals.

Per posicionar la molècula de l'oligonucleòtid en l'esclatxa del centre actiu de l'enzim s'han tingut en compte les dades de RICHARDS & WYCKOFF (1973) (interacció de la RNAasa S amb el UpcA), CARLSON (1976) (interacció de la RNAasa S amb el UpcA), WODAK et al. (1977) (interacció del citidilil-2', 5'- adenosina amb la RNAasa S), PAVLOVSKY et al. (1978) (interacció entre la RNAasa S i el 2'-F-dUpA) i IWAHASHI et al. (1981) (interacció RNAasa A i RNAasa S - timidina 3',5' difosfat).

Per tal de poder visualitzar millor el resultat, s'ha construït el pentanucleòtid model amb el mateix kit (Labquip) amb que està construït el model tridimensional de la RNAasa S, i s'ha "inclòs" aquest pentanucleòtid a l'esclatxa del centre actiu, en la posició que compleixi totes les dades que es coneixen actualment.

[ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

### **III- RESULTATS I DISCUSSIÓ**

### III-1 PREPARACIÓ DE RIBONUCLEASA A

La RNAasa A s'ha obtingut d'acord amb la metodologia de l'apartat II-1. En la Figura 12 es pot veure el perfil d'absorció a 280 nm de la cromatografia en CM-Sepharose. La RNAasa A (pic IX) es el pic majoritari, i elueix a 13 mS de conductivitat, perfectament separada dels altres components proteics i no proteics de la RNAasa comercial.

Aquesta metodologia permet obtenir una major resolució que l'obtinguda amb CM-cel·lulosa, doncs el pic IX, corresponent a la RNAasa A (fracció D en la separació de TABORS-KY, 1959), està perfectament separat dels altres components i apareix un nombre més gran de pics que elueixen abans que la RNAasa A -del II al VIII- el que indica una major resolució dels components glucosilats. També ha permès l'aplicació de quantitats més grans de mostra.

Si es parteix d'un gram de RNAasa comercial, s'obtenen quelcom més de 500 mg de RNAasa A, indicant doncs un rendiment del 50% de la purificació. La suma de totes les fraccions (per pes, després d'ésser dialitzades i liofilitzades) dona un 90% del total de mostra aplicada a la columna. El 10% restant correspon al pic XI o proteïna retinguda per la resina.

Finalment cal assenyalar que aquesta metodologia ha permès d'obtenir una gran repetitivitat. S'ha obtingut el mateix perfil d'elució a 280 nm sempre que la mostra fos del mateix origen comercial. RNAases d'altres cases comercials tindran perfils similars però amb algunes variacions.

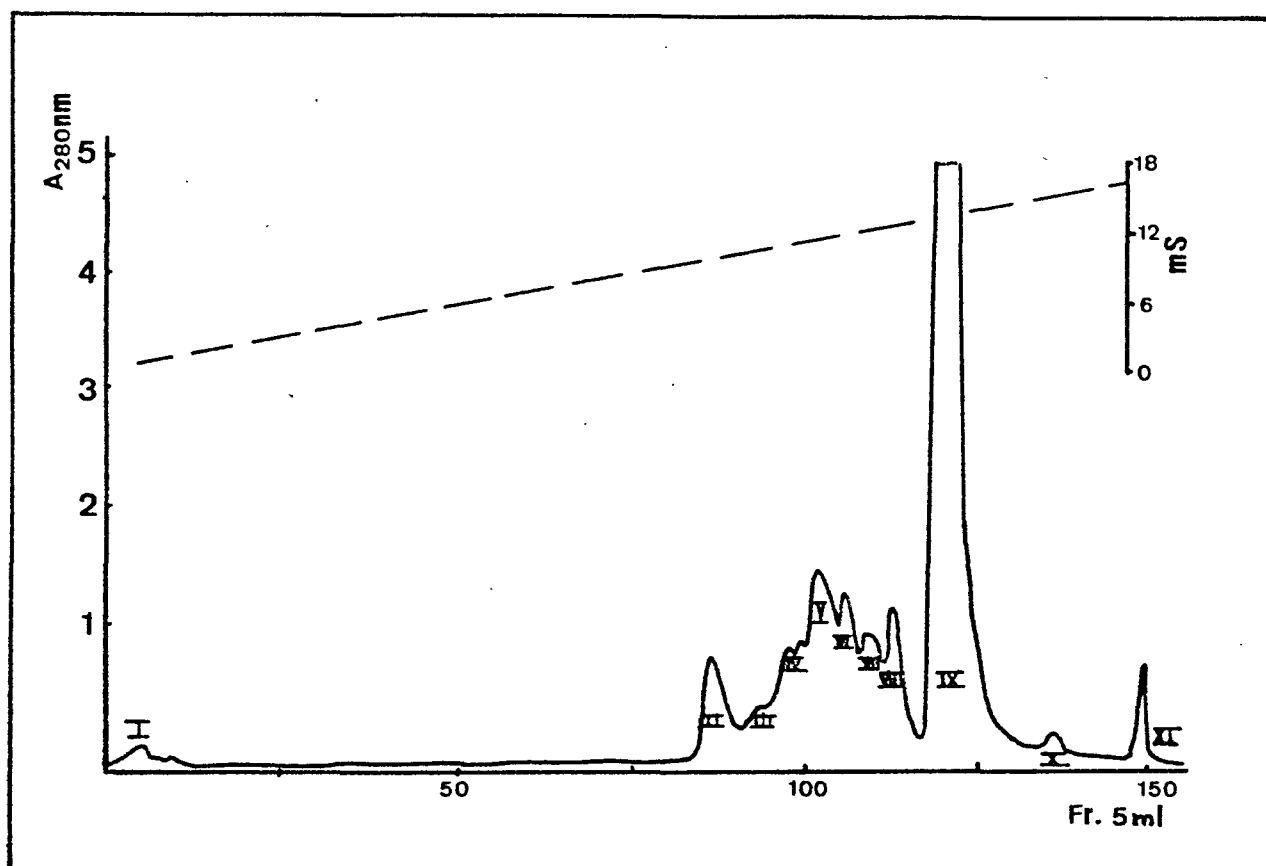


FIGURA-12

Perfil d'absorbància a 280 nm i del gradient salí de la cromatografia de purificació de la RNAasa A en columna de CM-Sepharose CL-6B.

- Pic I : polinucleòtid contaminant que no és hidrolitzat per l'enzim.
- Pic II a Pic VIII : RNAases glucosilades.
- Pic IX : RNAasa A.
- Pic X : correspon a la fracció E de TABORSKY (1959).
- Pic XI : és el pic obtingut al rentar la resina, per regenerar-la, amb Tris/HCl 0,5, pH 8,0. Les seves característiques espectrofotomètriques indiquen que es tracta de proteïna, i el seu espectre es idèntic al de la RNAasa, així com la seva activitat en front de 2':3' Cp, indicant que es tracta de proteïna retinguda per la resina per interaccions suficientment fortes com per que no s'elueixi amb el gradient.

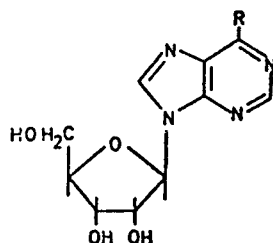
## [ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

### III-2 PROPIETATS ESPECTROFOTOMÈTRIGUES DELS DERIVATS OBTINGUTS PER REACCIÓ DE LA RNAasa A AMB 6-CLOROPURINA RIBOSA i CL6-RMP.

La RNAasa A i els nucleòtids tenen un espectre ultraviolat característic, i perfectament diferenciable, motiu pel qual l'espectre de cada derivat pot indicar la proporció del marcador en cada derivat. A més, segons sigui el grup nucleofílic de l'enzim que reaccioni amb el marcador, el derivat tindrà un espectre ultraviolat característic. Per tal de poder relacionar el grup de l'enzim que ha reaccionat, donant lloc a un espectre determinat, es van emprar (PARÉS, 1977) compostos model formats per nucleòtids i nucleòsids substituïts per grups anàlegs als de l'enzim (com a pas previ es van estudiar els grups de la RNAasa A que poden ésser candidats per reaccionar amb el Cl6-RMP). Per aquest motiu es van sintetitzar, o adquirir comercialment, diversos compostos derivats de la purina ribòsid. El ribòtid té les mateixes propietats espectrofotomètriques.

Gràcies a aquests estudis es va concloure que el 6-metilaminopurina ribòsid era un bon model espectrofotomètric pels derivats de la RNAasa A en els que la 6-cloropurina ribosa i el Cl6-RMP hagin reaccionat amb un  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la lisina o en l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> terminal, i que el 6-metoxipurina seria probablement un bon model pels derivats resultants de la reacció entre el nucleòsid i nucleòtid clorats i el grup OH d'una treonina o d'una serina de l'enzim.

#### FÒRMULES ESTRUCTURALS



R = -NH-CH<sub>3</sub>

R = -O-CH<sub>3</sub>-

6-metilaminopurina ribosid

6-metoxipurina ribosid

## [ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

Les característiques espectrofotomètriques d'aquests compostos model són les següents:

---

COMPOST	$\lambda$ (nm)		A 280/A 260	A 270/A 260	A 250/A 260
	màx	mín			
6-metilami- no purina ribòsid	266	230	0,64	1,06	0,55
6-metoxi- purina ribòsid	249	---	0,00	0,02	1,61

---

(Mesures efectuades amb amortidor fosfat 50 mM, pH 7,0).

L'espectre d'un derivat sintetitzat en la reacció RNAasa A-marcador pot considerar-se com el resultat de la suma dels espectres del marcador unit a l'enzim, més el propi de l'enzim.

Emprant compostos model tals com el 6-metilaminopurina ribòsid, es va determinar que gairebé tots els derivats eren monosubstituïts (relació A 280/A 260 és menor que 0,9) i que les característiques espectrofotomètriques tipus eren molt semblants a les de la barreja RNAasa A - 6-metilaminopurina ribòsid, el que va permetre considerar els grups  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> o l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la lisina com a llocs probables d'unió del marcador a aquests derivats. Aquesta consideració va venir recolzada per l'obtenció dels espectres de diferència esmentats més endavant.



### III-2.1 ESPECTRES DE DIFERÈNCIA

Estudis anteriors (CUCHILLO 1974) per espectrofotometria de diferència per canvi de pH de neutre a àcid (seguint la metodologia esmentada en l'apartat II-6.1) indicaren que gairebé tots els derivats obtinguts en la reacció de la RNAasa A amb la 6-Cloropurina (apartat I-2.8.a) presentaven una diferència d'espectre àcida molt similar al del compost model 6-metilaminopurina. Es va concloure que el derivat resultant de la reacció del marcador (la 6-Cloropurina) amb un grup  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> d'una lisina seria una 6-alquilaminopurina, d'acord amb la Figura 13, on es pot apreciar que el grup 6-amí es transforma en una amina secundària, en lloc d'una primària, com és en l'adenina.

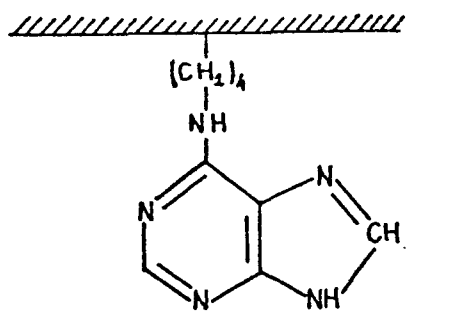


FIGURA 13

Així doncs, els espectres de diferència dels derivats obtinguts indicaren que el marcatge de l'enzim amb 6-cloropurina havia tingut lloc en un grup amí d'una lisina.

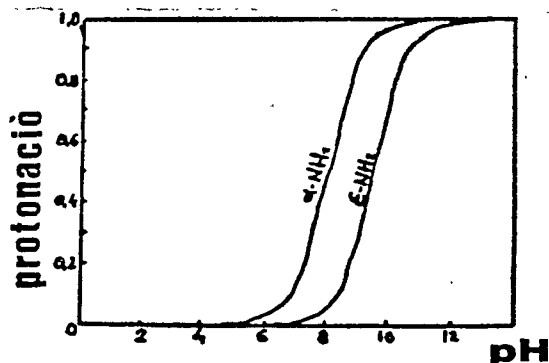
### III-3 CONSIDERACIONS SOBRE ELS GRUPS AMÍ DE LES LISINES

A l'interior de molècules proteíniques rarament es troben residus carregats. La generalitat d'aquesta observació, que sorgí inicialment de l'examen de l'estructura cristal·lina de la mioglobina (KENDREW, 1961), ha estat àmpliament suportada pels subseqüents estudis cristal·logràfics en un gran nombre de proteïnes. És particularment vàlid que les cadenes laterals de les lisines en proteïnes presenten una considerable llibertat de moviment.

S'han fet nombrosos estudis en proteïnes natives, en les quals els residus de lisina han estat completament o parcialment convertits a derivats catiónics o neutres.

Les anteriors consideracions són, presumiblement, responsables de l'alt grau de retenció d'activitat biològica d'enzims que s'han unit a una gran varietat de suports insolubles a través de grups amí per alquilació o arilació (SILMAN & KATCHALSKY, 1966; EPTON & THOMAS, 1971).

Molts dels residus presents en una proteïna poden estar protonats o desprotonats, depenent de les condicions, i, donat que ambdues formes presenten propietats químiques molt diferents, el pH té una gran influència en la modificació química d'aquests grups. Els grups amí són grups que estan positivament carregats, excepte a alts pH's.



Estats teòrics de ionització dels grups  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> i  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de les lisines, en funció del pH. (MEANS & FEENEY, 1971).

## [ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

Només la forma no carregada, que predomina a valors de pH més alts que el seu pK, és reactiva com a nucleòfil. Per aquest motiu, a l'elevat el pH, normalment s'incrementa la seva reactivitat amb molts reactius. Així doncs, l'ús d'un determinat pH és un camí important per controlar el curs de moltes modificacions. Malauradament, el pK de molts residus pot variar en un ampli marge. Així per exemple, per a la lisina, el pK del grup  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> es de 10,7 i de 9,2 per l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub>. Emprant cadenes laterals de proteïnes lineals no estructurades STEINHARDT & REYNOLDS (1969) van trobar els valors de 10,4 pels  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> i de 7,5 per l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub>. La disminució del pK seria deguda a la substitució d'un grup carboxil per un grup peptídic (BRADBURY et al., 1978).

La molècula de RNAasa posseïx 10  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> i un  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>. La TAULA 2 mostra els pK's dels grups titrables de la RNAasa, segons TANFORD & HAUENSTEIN (1956).

A partir de la corba de titració.

GRUP	RESIDU	pKa esperat	Nº de grups	pKa trobat
$\alpha$ -CO <sub>2</sub> H	carboxi-terminal	2,1-2,4	11	4,7
$\beta$ -CO <sub>2</sub> H	aspartat	3,7-4,0		
-CO <sub>2</sub> H	glutamat	4,2-4,5		
imidazol	histidina	6,7-7,1	4	6,5
$\alpha$ -NH <sub>2</sub>	amino-terminal	7,6-8,0	1	7,8
$\epsilon$ -NH <sub>2</sub>	lisina	9,3-9,5	10	10,2
-SH	cisteïna	8,8-9,1	0	---
fenòlic	tirosina	9,7-10,1	3+3	9,95, >12
	arginina	>12	4	>12

- TAULA 2 - pK's dels grups titrables de la RNAasa.

[ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

Aquestes dades han estat revisades i ampliades, per d'altres autors:

Grup amí de la lisina	pK	Autor
Lys-41 ( $\epsilon$ NH <sub>2</sub> )	8,8	MURDOCK et al. (1966)
Lys-1 ( $\alpha$ NH <sub>2</sub> )	7,3	GIROTTI & BRESLOW (1970)
altres lisines ( $\epsilon$ -NH <sub>2</sub> )	10,2	WODAK (1977)
$\alpha$ -NH <sub>2</sub> i els $\epsilon$ -NH <sub>2</sub> de les 10 lisines	7,3-7,5 i 9,3-9,7	GOLDFARB & MARTIN (1976 a i b)

- TAULA 3 -

Ambdues TAULES indiquen que les diferències dels valors entre la proteïna estructurada i la linial són, presumiblement, degudes a influències pertorbadores de l'envoltall proteic. Dades similars s'han observat en altres proteïnes. A més, la reactivitat pot ésser afectada, més o menys, per grups veïns. També cal esmentar que els valors de pK poden variar segons el mètode utilitzat per obtenir-los.

### III-4 REACCIÓ RNAasa A - Cl6-RMP A pH 7,4 EN PRESENCIA D'AMP

GLAZER (1975) va enunciar (apartat I-2.8) una sèrie de criteris per a la demostració de que el reactiu reacciona com un anàleg de substrat. El tercer criteri indica que la presència del lligand normal ha de disminuir la proporció de reacció amb l'anàleg químicament reactiu. D'acord amb aquest criteri, la presència en la barreja de reacció de nucleòtids purínics provocaria una competència entre aquest i el marcador, donat que el Cl6-RMP és un derivat halogenat purínic, motiu pel qual interaccionarà amb el seti fixador de purines de la RNAasa A.

Per tal de comprovar-ho es va fer reaccionar la RNAasa A amb el marcador, el Cl6-RMP, en presència d'AMP, i la proporció de reacció va ésser establerta comparant la reacció RNAasa A + Cl6-RMP + AMP amb un control, portat a terme en les mateixes condicions, però sense AMP, d'acord amb la metodologia descrita a l'apartat II-11. Es va portar a terme un control de l'estabilitat del marcador, tant en la reacció patró, com en la que hi ha AMP, d'acord amb la metodologia descrita a l'apartat II-13, no observant-se, en cap cas, la formació de cap producte de degradació.

La Figura 14 mostra els perfils d'elució obtinguts per a les dues reaccions a l'aplicar la fracció proteica a una columna de CM-Sepharose CL-6B. Els tres productes majoritaris obtinguts (Ia, IIa, IIIa i Ib, IIb, IIIb) van ésser dialitzats, liofilitzats, pesats i posteriorment caracteritzats espectrofotomètricament i es va medir la seva activitat (d'acord amb la metodologia esmentada a l'apartat II-6.2) front de 2',3' Cp i RNA. Aquesta caracterització va demostrar que es tractaven dels mateixos productes majoritaris que els obtinguts en la reacció RNAasa A-Cl6-RMP a pH 7,4, descrita a l'introducció, corresponent el Ia i Ib al pic I (que es tractava d'una barreja de bi(multi)derivats amb més d'una molècula de marcador per molècula d'enzim. Els pics IIa i IIb corresponien al Derivat II i els pics IIIa i IIIb a la RNAasa A sense reaccionar. Així doncs, la reacció entre l'enzim i el marcador en presència d'AMP, ha tingut lloc, però tan sols en una proporció calculada d'un 50% d'obtenció de Derivat II respecte de la reacció sense AMP. Pel que es posa en evidència que s'estableix una competència pel seti fixador de purines entre el nucleòtid halogenat i els naturals, en aquest cas l'AMP.

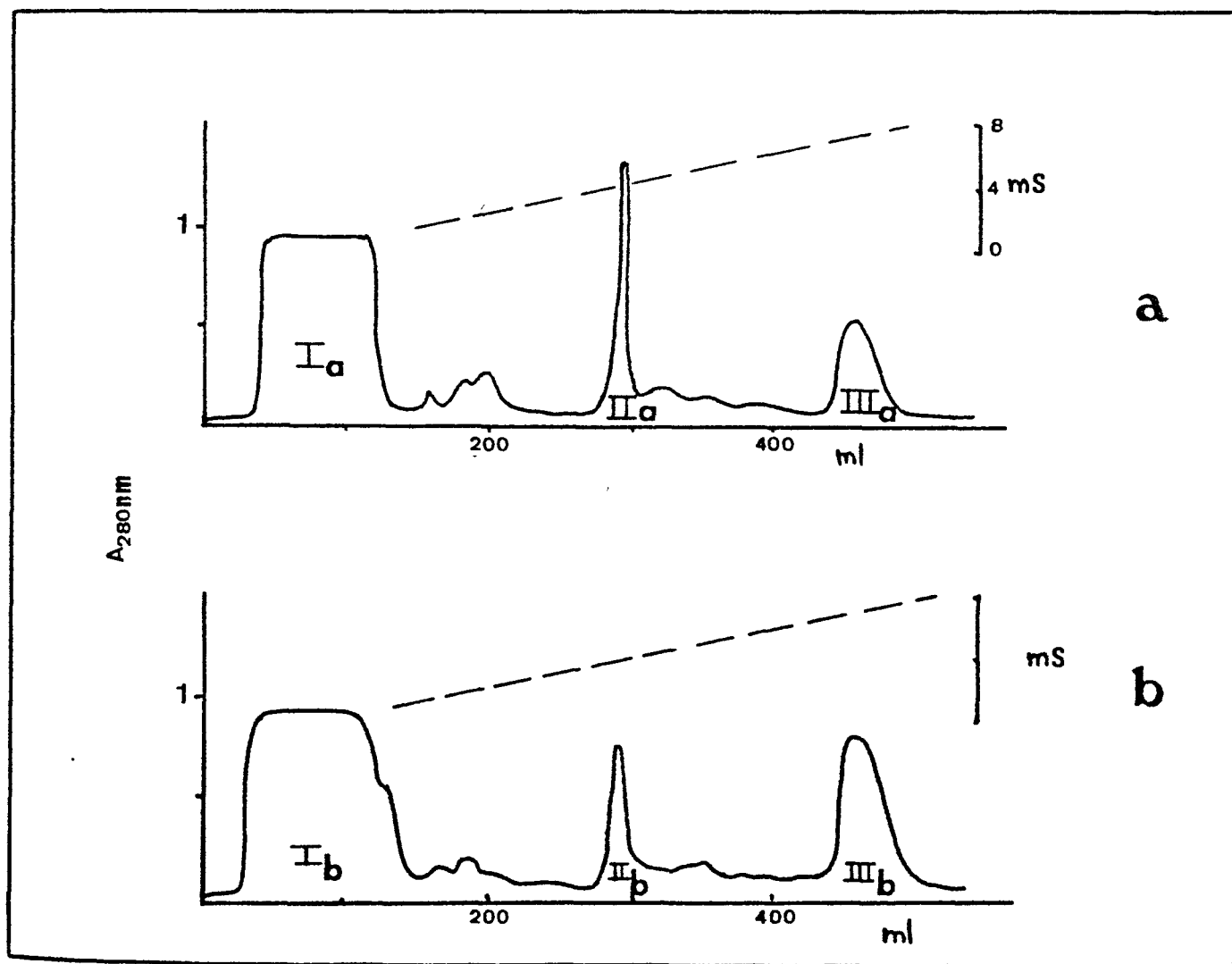


FIGURA-14

Separació dels derivats de la reacció RNAasa A - C16-RMP i RNAasa A - C16-RMP en presència d'AMP, en amortidor Tris/HCl 0,5M, pH 7,4. Perfil d'elució i gradient salí de la cromatografia en CM-Sepharose CL-6B:

- a) de la reacció patró RNAasa A - C16-RMP.
- B) de la reacció RNAasa A - C16-RMP en presència d'AMP.

### III-5 ESTUDI DE L'EFECTE DE LA CONCENTRACIÓ DE C16-RMP SOBRE L'ACTIVITAT DE LA RNAasa A EN SOLUCIÓ

Aquest estudi es va dur a terme mitjançant la medició d'activitats de la RNAasa A front de 2'3' Cp (0,3 mM) i RNA (0,1 mg/ml) a diferents concentracions de C16-RMP i a diferents temps.

En primer lloc es va dur a terme un estudi de concentracions idònies de marcador i d'enzim, d'acord amb les constants de dissociació calculades (ARÚS, 1977; PARÉS et al., 1978).

La constant de dissociació enzim-marcador té un valor de 10 mM a pH 7,4. D'acord amb aquest valor es van preparar tres barreges de reacció en les que la concentració del C16-RMP va variar de la següent manera:

- 1) RNAasa A 0,1 mM + C16-RMP 5 mM
- 2) RNAasa A 0,1 mM + C16-RMP 10 mM
- 3) RNAasa A 0,1 mM + C16-RMP 40 mM

Condicions: amortidor Tris/HCl 0,1 M, pH 7,4, deixant les barreges incubant-se a 40°C.

Com a control previ de la influència del C16-RMP en les determinacions d'activitat, es va afegir a la solució d'enzim (0,85  $\mu$ M en cubeta), la quantitat necessària de C16-RMP (32  $\mu$ M, 65  $\mu$ M i 260  $\mu$ M en cubeta, respectivament, d'acord amb les barreges de reacció 1, 2 i 3 exposades anteriorment), un moment abans de procedir a la determinació. Les activitats de les tres barreges (amb cadascuna de les concentracions de C16-RMP emprades) va ésser d'un 102,5%, 106% i 138% respectivament, comparades amb l'activitat de l'enzim a la mateixa concentració, front de 2',3' Cp, completament corresponents a les dades d'activitat de la barreja de reacció a temps 0, tal com es pot observar en la TAULA 4.

En front d'RNA les activitats van ésser d'un 99%, 80% i 69% respectivament.

[ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

De les 3 barreges incubades a 40 °C es van extreure alíquotes a diferents temps i es va determinar la seva activitat front de 2',3' Cp i d'RNA, comparant-la amb l'activitat de l'enzim natiu (0,1 mM en el mateix amortidor) deixat a 40°C.

La TAULA 4 mostra els resultats obtinguts emprant 2',3' Cp i RNA com a substrats.

TAULA 4 .-

ACTIVITATS DE BARREGES RNAasa A - C16-RMP front de 2',3' Cp i RNA A DIVERSOS TEMPS.

TEMPS (hores)	CONCENTRACIÓ DE C16-RMP					
	5 mM		10 mM		40 mM	
	2',3' Cp	RNA	2',3' Cp	RNA	2',3' Cp	RNA
0	103%	99,2%	141%	80%	139%	69%
4	135%	19%	186%	22%	143%	8%
12	115%	16%	161%	11%	122%	5%
18	100%	7%	152%	0	107%	0
28	95%	0	131%	0	100%	0
43	94%	0	120%	0	97%	0

Condicions: Totes les mostres en amortidor Tris/HCl 0,1 M, pH 7,4 a 40°C de temperatura.



## [ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

Observant les dades de la TAULA 4 resulta evident l'aparició d'una activació de l'enzim front de 2',3' Cp al llarg del temps, ja desde temps 0, i essent màxima a les 4 hores, per anar decreixent després. A 10 mM de concentració de marcador es manté una activitat superior a la de l'enzim natural, fins al menys les 43 hores d'incubació (aquesta activació ja s'havia posat de manifest en el control).

Front d'RNA s'observa una disminució de l'activitat, que arriba a ésser nula a partir de les 18 hores.

Donat que front de 2',3' Cp l'activitat es manté sempre molt elevada, però resulta ésser d'un 69% amb RNA, a 40 mM de marcador a temps 0, hom va pensar que, durant el temps de la determinació de l'activitat, l'RNA podia sofrir un procés de degradació, ja que l'RNA es manté dissolt durant las determinacions. Si l'RNA es degradava durant aquest temps, l'activitat mesurada podria veure's afectada. Per tal de detectar-ho es va realitzar un control d'estabilitat al llarg del temps de l'RNA (0,1 mg/ml) dissolt en el mateix amortidor, observant-se que es mantenia estable, en aquestes condicions, durant més de 12 hores.

Aquest estudi de l'efecte del marcador sobre l'activitat de l'enzim podria haver servit per a comprovar si la reacció RNAasa A - Cl<sub>6</sub>-RMP es tracta d'un marcatge per "afinitat" o d'una reacció de tipus BIMOLECULAR, d'acord amb el tractament teòric dut a terme per BAKER (1967). Però nosaltres no podem aplicar aquest tractament a la reacció RNAasa A - Cl<sub>6</sub>-RMP degut a que no es forma un sol derivat, i el que es forma majoritàriament no es inactiu.

Per intentar explicar, tant la activació observada en el cas de les mesures front de 2',3' Cp com la gran disminució de l'activitat front d'RNA, són necessaris una serie de conceptes desenvolupats en la discussió final (apartat IV-2).

III-6 REACCIONS DE MARCATGE PER AFINITAT DE LA RIBONUCLEASA A AMB C16-RMP A DIFERENTS pH's

A les TAULES 2 i 3 s'indicaven els valors de pK dels  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de les 10 lisines i l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la RNAasa A. Els últims valors van ésser calculats per GOLDFARB & MARTIN (1976). Aquests autors estudiaren la cinètica de les reaccions dels grups amí de la RNAasa A emprant el reactiu àcid trinitrobenzenosulfònic (TNBS) que reacciona específicament amb els grups amí (en la forma no protonada) de les proteïnes. La reactivitat dels grups amí és molt sensible als canvis de pH i temperatura (GOLDFARB, 1970). En aquests estudis es va determinar que els valors de pK pels grups amí de la RNAasa A estaven entre 7,9 i 8,32, quelcom inferiors als valors assenyalats per TANFORD & HAUENSTEIN (TAULA 1).

Els autors indiquen que TANFORD & HAUENSTEIN treballaren a 25°C, mentre que ells treballaren a 16°C. Aquests estudis van continuar-se a 27°C (GOLDFARB & MARTIN, 1976 a i b) determinant-se unes variacions del pK amb el pH de tipus "bifàsic" en el sentit de que es determinaren 2 valors de pK, un de 7,3 a 7,5 (a l'interval de pH entre 7,0 i 8,3) i un segon de 9,3 a 9,7 (a l'interval de pH entre 8,5 i 9,9).

El primer pK (7,3 a 7,5) resta bastant allunyat del valor de 10,2 determinat per titració (TANFORD & HAUENSTEIN, 1956). Però els autors aporten una sèrie de dades de la bibliografia que estarien d'acord amb els seus resultats. Així, BARNETT & BULL (1960) i SASAKAWA & WALTER (1972) indicaren regions isoelèctriques, més que punts. Els primers autors troben una regió entre pH 8,2 i 9,6 i els segons entre 7,2 i 9,6. També fan referència a que el pK de 7,5, restant allunyat del valor obtingut per titració, està, en canvi, d'acord amb els valors inferiors necessaris per explicar els estudis per electroforesi, de distribució (determinació de pK's per isotacoforesi) i de canvis específics de volum amb el pH (RASPER & KAUZMANN, 1962). Tot el qual els porta a considerar que ambdós valors, el baix (7,5) i el més alt (10) són significatius, tenint en compte les condicions experimentals.

## [ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

Finalment cal mencionar que els mateixos autors, davant d'aquest comportament "bifàsic", van comparar els estudis portats a terme amb la molècula d'enzim estructurada i amb la desestructurada. Van tractar, doncs, la RNAasa A amb àcid per-  
fòrmic, trobant que en aquest cas tan sols l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1 mostra un comportament bifàsic (pK de 7,3 en l'interval de pH 7,0-8,0 i pK de 8,13 en l'interval 8,2-9,5) mentre els restants 10 grups  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de les lisines mostraren un comportament monofàsic, amb un valor de pK de 8,0-8,1.

D'acord amb tot el que s'ha esmentat, es va procedir a estudiar la reacció RNAasa A - C16-RMP a pH's més alcalins (superiors a 7,3), ja que a aquest pH sembla afavorida la reacció amb l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1. Aquest estudi-control permetria veure si, a l'elevat el pH de la reacció, s'afavoriria la formació d'un(s) altre(s) derivat(s), diferents al Derivat II. L'estudi d'aquests derivats permetria assolir un millor coneixement del seti fixador de purines de l'enzim.

Aquest estudi es va portar a terme emprant 3 pH's: 8,0; 8,5 i 9,0 (marge que permetia abarcar els pK's indicats pels estudis de GOLDFARB & MARTIN, 1976).

### III-6.1 CONTROL D'ESTABILITAT DEL MARCADOR (C16-RMP) EN LES CONDICIONS DE REACCIÓ

Abans de procedir a la reacció propiament dita, es va procedir a controlar l'estabilitat del C16-RMP durant 48 hores a 40°C a pH: 8,0 - 8,5 i 9,0. Tal com ja s'ha esmentat en l'apartat II-13, es van detectar traces de nucleòsid a partir de les 24 hores d'incubació, i que s'incrementa lleugerament la quantitat a mida que el pH es fa cada vegada més bàsic. De fet, doncs, la degradació detectada no sembla important i es pot considerar que el marcador roman suficientment estable.

PARÉS (1977) va portar a terme un control de la reacció a 40°C a pH: 6,0; 7,5 i 8,5 (zona de pH en que l'enzim és molt estable i presenta un màxim d'activitat) per control de l'activitat en front de 2',3' Cp i d'RNA, observant que a pH 8,5 la reacció era més "energica".

III-6.2 REACCIÓ RIBONUCLEASA A - C16-RMP  
A pH: 8,0; 8,5 i 9,0

La reacció RNAasa A - C16-RMP a diferents pH's va dur-se a terme d'acord amb la metodologia de l'apartat II-10 (es pot observar que han estat emprades quantitats de marcador de l'ordre de 50 vegades superiors a les d'enzim, que són bastant més elevades que les quantitats en les que HAFFNER & WANG (1973) encara detectaren interacció entre l'enzim i l'AMP - apartat I-2.8.a).

Així doncs, es van fer reaccionar 50 mg de RNAasa A amb 100 mg de C16-RMP a pH: 8,0; 8,5 i 9,0 durant 48 hores a 40°C.

Després de cada reacció es va eliminar el marcador que no havia reaccionat mitjançant cromatografia en columna de Bio-Gel P2 i la fracció proteica obtinguda es va aplicar a una columna de CM-Sepharose CL-6B per separar els seus components. Els perfils d'elució obtinguts estan representats a la Figura 15.

III-6.2.a REACCIÓ RIBONUCLEASA A - C16-RMP a pH 8,0  
CARACTERITZACIÓ DE LES FRACCIONS OBTINGUDES

En el perfil d'elució de la Figura 15 a) apareixen 3 pics principals: I<sup>a</sup>, II<sup>a</sup> i III<sup>a</sup>. El pic I<sup>a</sup> no queda retintut per la resina d'intercanvi catiónic i es eluït en el volum d'exclusió. Els pics II<sup>a</sup> i III<sup>a</sup> elueixen a concentracions de NaCl de 0,035M i 0,085 M respectivament. També apareixen altres pics menys importants quantitativament. Les relacions espectrals de les tres fraccions majoritàries es presenten a la Taula 5.

El pic I<sup>a</sup> presenta propietats espectrofotomètriques més pròpies de nucleòtid que de proteïna. Donat que no ha quedat retintut en la columna, aquesta fracció no ha sofert cap separació selectiva i, per tant, s'haurà de sotmetre a un procés de purificació com a pas previ a d'altres estudis analítics.

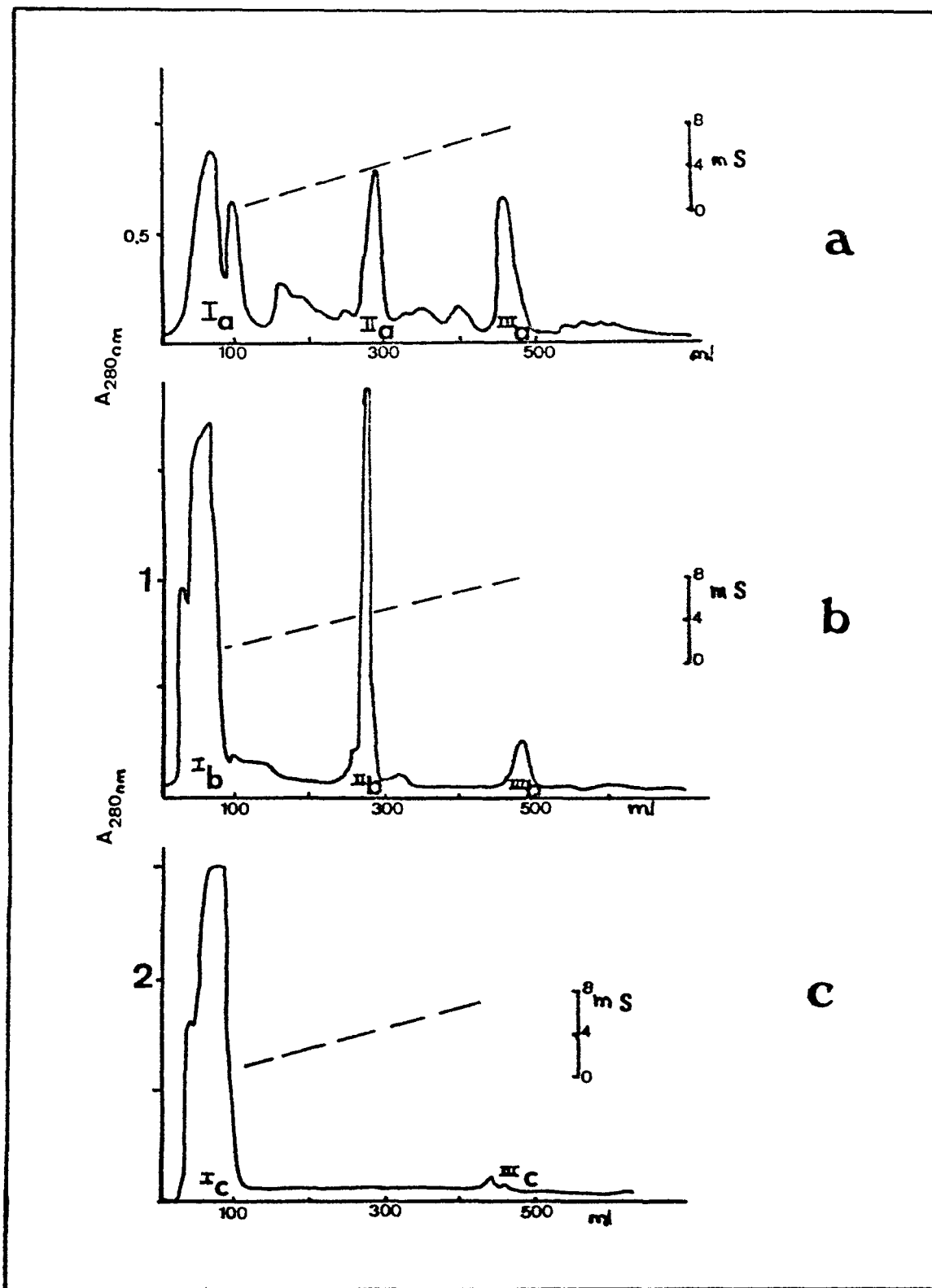


FIGURA-15

Separació dels derivats de la reacció RNAasa A - C16-RMP. Perfil d'elució i gradient salí de la cromatografia en CM-Sephacrose CL-6B de la reacció a pH 8,0 (a), a pH 8,5 (b) i a pH 9,0 (c).

TAULA 5.-

CARACTERÍSTIQUES ESPECTROFOTOMÈTRIQUES DE LES FRACCIONS DE LA CROMATOGRAFIA EN CM-SEPHAROSE DE LA REACCIÓ RNAasa A - C16-RMP a pH: 8,0; 8,5 i 9,0.

FRACCIÓ	$\lambda$ (nm)		A 280/A 260	A 270/A 260	A 250/A 260
	MÀX	MÍN			
Ia	264,5	241	0,6	0,88	0,7
IIa	270	247	1	1,2	0,65
IIIa	277,5	253	1,96	1,7	0,8
Ib	265	241	0,62	0,9	0,75
IIb	269	248	0,96	1,22	0,64
IIIb	277,5	252	1,97	1,7	0,77
Ic	265	241	0,6	0,91	0,74
IIIc	277,5	252	1,96	1,68	0,78

L'espectre de les fraccions va ésser realitzat directament de l'elució cromatogràfica, en la que es va utilitzar Tris/HCl 0,015 M, pH 8,0 i força iònica variable de 0 a 0,15 M en NaCl.

## C RESULTATS I DISCUSSIÓ 3

El pic IIa presenta característiques espectrals intermitges entre la proteïna i el nucleòtid. Si es comparen amb les característiques espectrofotomètriques de les barreges model de la TAULA 6 es pot deduir que es tracta d'un derivat monosubstituit.

El pic IIIa presenta un espectre ultraviolat idèntic al de la RNAasa A natural i elueix a la mateixa força iònica que aquesta. Correspon, doncs, a la fracció de proteïna que no ha reaccionat amb el nucleòtid. És la última en eluir de la columna de bescanvi catiònic degut a la seva basicitat.

### ACTIVITAT DE CADA FRACCIÓ

Cada fracció majoritària obtinguda (Ia-IIa-IIIa) va ésser dialitzada, congelada, liofilitzada i pesada (veure TAU-LA 7). Posteriorment es va determinar l'activitat de cadascuna front del substrat 2',3' Cp. L'activitat del pic Ia va resultar ser nul·la i la del pic IIa d'un 90% (respecte de l'activitat de la fracció IIIa, que es la RNAasa A nativa que ha sofert els mateixos tractaments experimentals que la resta de derivats). La concentració de derivat, pel cas de la fracció IIa, va ésser calculada emprant un coeficient d'extinció molar de 22.100, calculat pel metode de LOWRY (apartat II-14 i III-7 .1.a.3).

### III-6.2.a.1 PURIFICACIÓ DE LA FRACCIÓ Ia

La fracció Ia es va repurificar d'acord amb les condicions descrites en l'apartat II-9.1.e. El perfil d'elució es mostra a la Figura 16. En ella s'observa que apareixen dues fraccions diferenciades. Les seves característiques espectrofotomètriques venen indicades en la TAULA 6.

Les característiques espectrofotomètriques de la fracció Ia1 indiquen que es tracta de Cló-RMP sobrant que no havia sigut eliminat del tot en la cromatografia sobre Bio-Gel P2 i que en la cromatografia en CM-Sepharose CL-6B (Figura 16 a) no havia quedat retingut per la resina, degut a la càrrega negativa que l'hi confereix el fosfat.

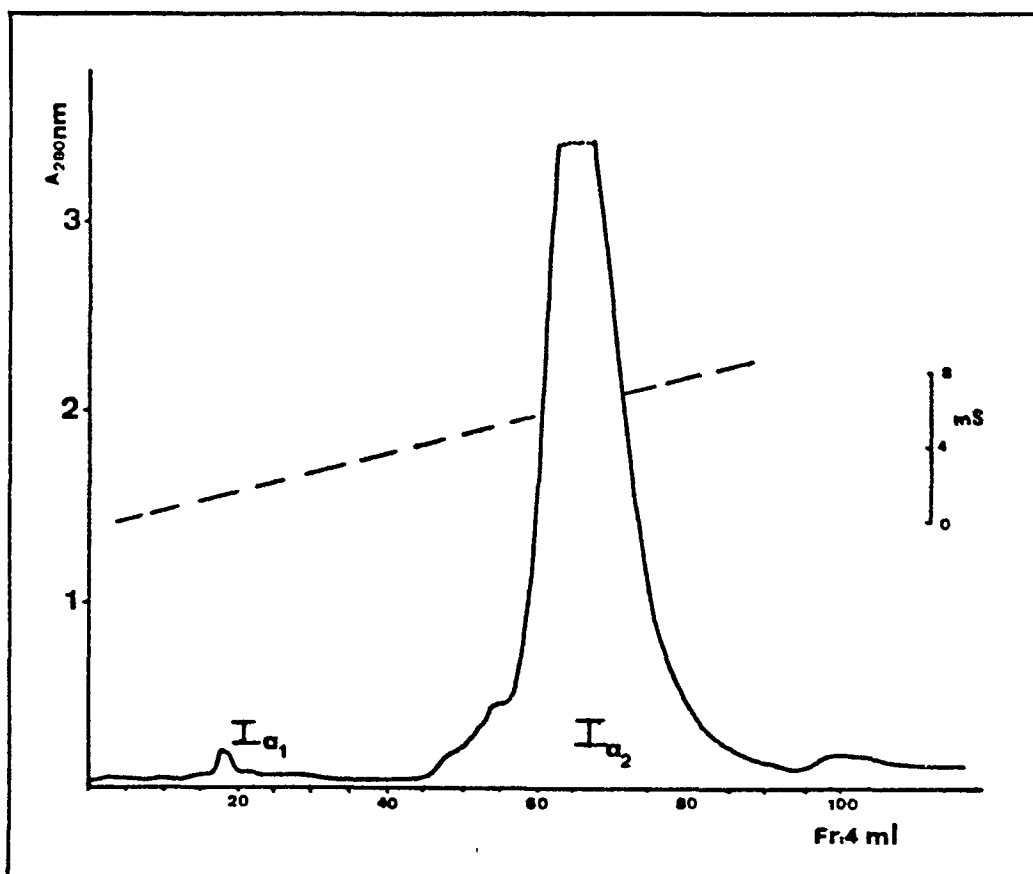


FIGURA-16

Separació dels derivats de la reacció RNAasa A - Cl<sub>6</sub>-RMP a pH 8,0, 40 °C, força iònica 0,015 M en Tris/HCl. Perfil d'elució i gradient salí de la cromatografia de repurificació de la fracció Ia en DEAE-Sepharose.



[ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

TAULA 6 -

CARACTERÍSTIQUES ESPECTROFOTOMÈTRIQVES DE LA RNAasa A, RNAasa A + 6-METILAMINOPURINA RIBOSA, DE LES FRACCIONS Ia1, Ia2, i Ib1 a Ib8, i DEL MARCADOR C16-RMP (Figures 16 i 17).

	$\lambda$ (nm)		A 280/A 260	A 270/A 260	A 250/A 260
	MÀX	MÍN			
RNAasa A	277,5	252	1,97	1,68	0,77
RNAasa A + 6-metilamino purina ribòsid (1:1)	270	247	0,92	1,18	0,63
RNAasa A + 6-metilamino purina ribòsid (1:2)	268	245	0,76	1,11	0,62
FRACCIÓ Ia1	264	226,5	0,2	0,92	0,72
Ia2	266	242	0,71	0,92	0,66
Ib1	264	243	0,6	0,96	0,76
Ib2	266	241	0,64	1,06	0,63
Ib3	266	242	0,72	1,05	0,64
Ib4	266	241	0,75	1,08	0,67
Ib5	266	240	0,74	1,06	0,76
Ib6	262	240	0,65	0,96	0,7
Ib7	262	240	0,56	0,8	0,72
Ib8	261	244	0,6	0,9	0,75
C16-RMP	264	226,5	0,19	0,92	0,73

L'espectre de les fraccions va ésser realitzat directament de l'elució cromatogràfica, amortidor Tris/HCl 0,015, M pH 8, i de 0 a 0,25 M en NaCl per les fraccions Ia1 i Ia2, i el mateix amortidor però de 0,015 M, pH 8,0 a 0,2 M, pH 7,2, per a les fraccions Ib1 a Ib8.

## CARACTERITZACIÓ DE LA FRACCIÓ Ia2

La fracció Ia2 presenta un augment d'absorció per des-sota de 241 nm, característic de l'enllaç peptídic. Les seves característiques espectrofotomètriques (TAULA 6) indiquen que es tracta d'enzim-marcador més aviat en la proporció 1:2 que 1:1, suggerint que hi ha més d'una molècula de marcador unit per molècula de proteïna. Donat que el marcador té càrrega negativa, això dona a l'enzim una càrrega general molt més negativa, el que determina que aquestes molècules no quedin retin-gudes en la columna de bescanvi catiònic i en canvi quedin més retingudes en la de bescanvi aniònic que el marcador.

L'activitat d'aquesta fracció Ia2 en front del 2',3' Cp va resultar ésser nul·la, el que implica que les substitucions han afectat al centre actiu de l'enzim, per bloqueig o per alteració de l'estructura enzimàtica.

Degut a la indicació per dades espectrofotomètriques de que es tractava de derivats bi (o multi) substituïts, es va pensar de que segurament es tractava d'una barreja de varis tipus de bi (o multi) derivats. Per aquests motius es va pro-cedir a repurificar la fracció Ia2.

## SEPARACIÓ DELS DERIVATS DE LA FRACCIÓ Ia2

La fracció Ia2 es va repurificar per cromatografia en columna de bescanvi aniònic (apartat II.9.1.e) però emprant un gradient mixte de força iònica i pH. El perfil d'elució obtin-gut es mostra a la Figura 17. El perfil demostra la presència d'una barreja complexa de molts tipus de bi(multi)derivats. A la TAULA 6 es mostren les característiques espectrofotomètri-ques de totes les fraccions obtingudes, comparades amb les de l'enzim natural, el marcador i barreges 1:1 i 1:2 entre l'en-zim i el 6-metilaminopurina ribosid. Exceptuant la Ia1, que, com ja s'ha dit, es tracta clarament de marcador, les altres fraccions serien derivats amb un grau de derivatització supe-rior a una molècula de marcador per molècula d'enzim. L'acti-vitat de totes les fraccions en front de 2',3' Cp va ésser nul·la.

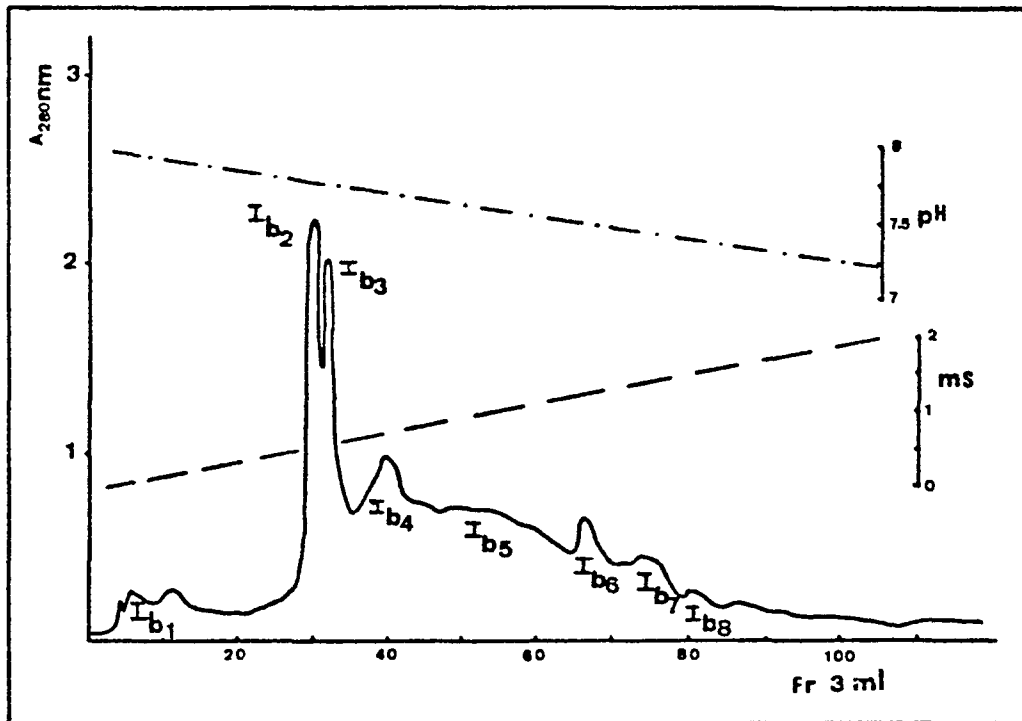


FIGURA-17

Separació dels derivats de la fracció Ia2, de la cromatografia, en DEAE-Sepharose (Figura 16).  
 Perfil d'elució i gradient salí i de pH de la cromatografia de la fracció Ia2. El gradient mixt de força iònica i pH va portar-se a terme emprant dos amortidors:

- 1) Tris/HCl 0,015 M, pH 8,0
- 2) Tris/HCl 0,15 M, pH 7,2

tal com s'explica a l'apartat II-9.1.e.

### III-6.2.a.2 REPURIFICACIÓ DE LA FRACCIÓ IIa

La fracció IIa de la cromatografia en CM-Sepharose CL-6B va ésser recromatografiada emprant la metodologia descrita a l'apartat II-9.1.d, donat que està constituïda per varis derivats (apartat I-2.8.a). El perfil d'elució obtingut es representa a la Figura 18. Les característiques espectrofotomètriques de cada fracció van resultar idèntiques a les mostrades en la TAULA 8 corresponents als derivats de la fracció II de la cromatografia en CM-Sepharose CL-6B de la reacció RNAasa A - Cl<sub>6</sub>-RMP a pH 7,4 (apartat III-7) anomenats X1, X2, X3, X4 i Derivat II, amb les següents correspondències: IIa1 --> X1; IIa2 --> X2; IIa3 --> X3; IIa4 --> X4; IIa5 --> Derivat II. Cada fracció va ésser dialitzada, congelada i liofilitzada i es va determinar la seva activitat en front de 2',3' Cp (activitat expressada en tant per cent respecte de l'activitat de la RNAasa A fracció IIIa que ha sofert els mateixos tractaments). Els resultats van ésser completament coincidents als expressats en la TAULA 9, corresponents als dels derivats X (X1, X2, X3 i X4) i al del Derivat II respectivament.

### III-6.2.b REACCIÓ RIBONUCLEASA A - Cl<sub>6</sub>-RMP a pH 8,5 CARACTERITZACIÓ DE LES FRACCIONS OBTINGUDES

En el perfil d'elució de la Figura 15 b) apareixen 3 pics principals: I<sup>b</sup>, II<sup>b</sup> i III<sup>b</sup>. El pic I<sup>b</sup> no és retinut i elueix en el volum d'exclusió. Els pics II<sup>b</sup> i III<sup>b</sup> elueixen a concentracions de NaCl de 0,035 M i 0,08 M respectivament. Les relacions espectrals d'aquestes fraccions es presenten a la TAULA 5, on s'aprecia que corresponen a les de les fraccions Ia, IIa i IIIa de la separació de les fraccions a pH 8,0. Les tres fraccions van ésser dialitzades, liofilitzades i pesades, obtenint-se les quantitats indicades a la TAULA 7.

L'activitat de cada fracció va ésser també la mateixa que la de les fraccions corresponents de la reacció a pH 8,0.

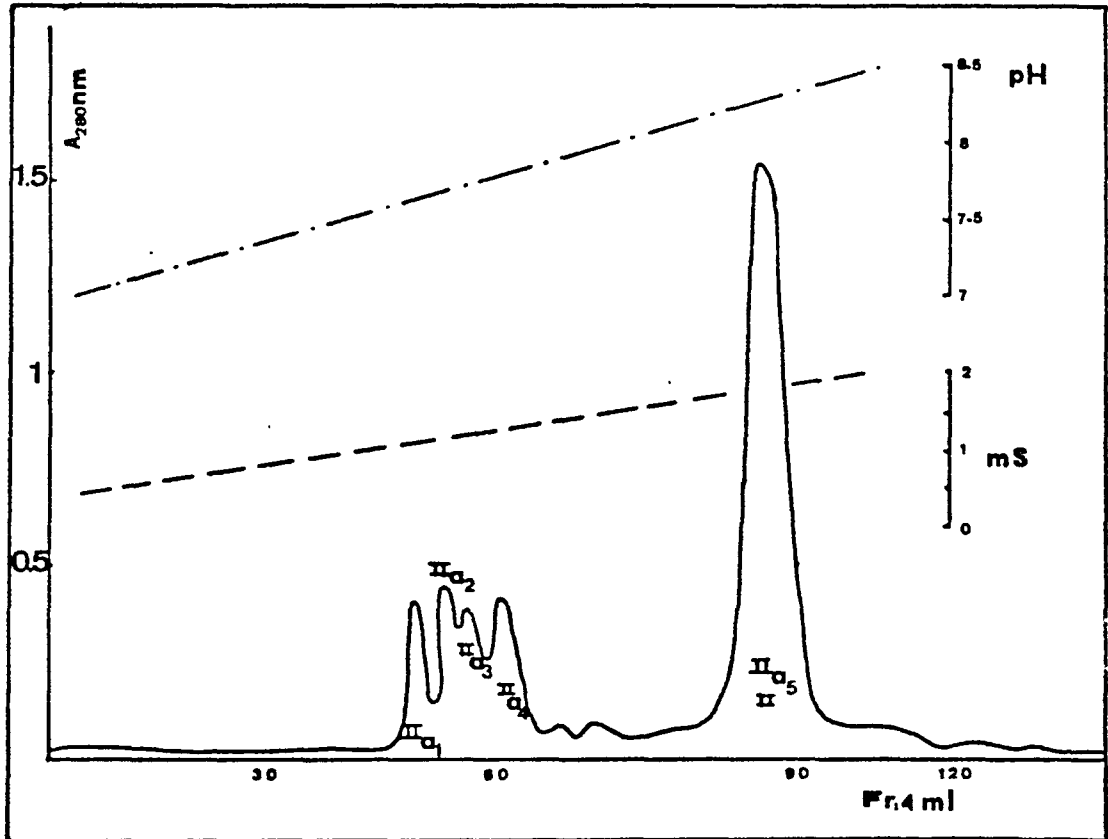


FIGURA-18

Separació dels derivats de la fracció IIa, de la cromatografia en CM-Sepharose CL-6B de la reacció RNAasa A - C16-RMP a pH 8,0 (Figura 16 a). Perfil d'elució i gradient salí i de pH de la recomatografia de la fracció IIa en CM-Sepharose CL-6B.

### III-6.2.b.1 PURIFICACIÓ DE LA FRACCIÓ Ib

Aquesta fracció va ésser purificada igual que la Ia de la reacció a pH 8,0. El perfil d'elució va ésser molt similar, així com les característiques espectrofotomètriques de les dues fraccions obtingudes. L'activitat de la fracció Ib2 en front de 2',3' Cp va ésser nula. Aquesta fracció majoritària Ib2 va ésser repurificada de la mateixa manera que la Ia2, obtenint-se un perfil d'elució molt similar a l'obtingut en la Figura 18. Les característiques espectrals de les fraccions foren corresponents a les de les fraccions obtingudes en la mateixa repurificació de la fracció Ia2 i l'activitat de cada fracció en front del 2',3' Cp també va ésser nula.

### III-6.2.b.2 REPURIFICACIÓ DE LA FRACCIÓ I Ib

La fracció I Ib de la cromatografia en CM-Sepharose CL-6B va repurificar-se de la mateixa manera que la IIa. El perfil d'elució obtingut va ésser molt similar, obtenint-se 5 fraccions amb unes característiques espectrofotomètriques i d'activitat idèntiques a les indicades a la TAULA 8 pels derivats "X" i el Derivat II, i a les activitats en front de 2',3' Cp indicades a la TAULA 9.

### III-6.2.c REACCIÓ RIBONUCLEASA A - C16-RMP a pH 9,0 CARACTERITZACIÓ DE LES FRACCIONS OBTINGUDES

En el perfil d'elució de la Figura 15 c) apareixen 2 pics principals, l'Ic i el IIIc. El pic Ic no és retinut i elueix en el volum d'exclusió. El pic IIIc elueix a una concentració de NaCl de 0,08 M. Les relacions espectrals d'aquestes dues fraccions venen indicades a la TAULA 5, i són idèntiques a les de les fraccions Ia i Ib pel que respecte a la primera fracció (la Ic); i a la de les fraccions IIIa i IIIb

[ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

pel que respecte a la IIIc. Ambdues fraccions van ésser dialitzades, liofilitzades i pesades i les quantitats obtingudes venen indicades a la TAULA 7. L'activitat de la fracció Ic va ésser nula.

III-6.2.c.1 PURIFICACIÓ DE LA FRACCIÓ Ic

Essent purificada igual que la Ia i Ib, el resultat va ésser completament comparable. Es va repurificar la fracció majoritària (Ic2) i els resultats van ésser en tot iguals als ja esmentats pel cas de les fraccions obtingudes al repurificar els pics Ia2 i Ib2.

TAULA 7.-

REACCIÓ DE LA RNAasa A i CL6-RMP A DIFERENTS pH's. PES DE LES FRACCIONS OBTINGUES.

REACCIÓ a pH	FRACCIÓ I	FRACCIÓ II	FRACCIÓ III (RNAasa A)
8 (a)	22 mg	10 mg	7 mg
8,5 (b)	33 mg	7 mg	2 mg
9 (c)	45 mg	---	0,5 mg
7,4	50 mg	41 mg	55 mg

Mgns. recuperats de cada fracció dels perfils d'elució de les cromatografies en CM-Sepharose CL-6B de les reaccions RNAasa A - CL6-RMP a pH: 8,0; 8,5 i 9,0 després d'ésser dialitzada, liofilitzada i pesada cada fracció obtinguda (figura 15).

### III-6.3 ESTUDI DELS RESULTATS

Comparant, tant el perfil d'elució de la cromatografia en CM-Sepharose CL-6B (Figura 15 a) com les característiques espectrofotomètriques i d'activitat de cada fracció majoritària de la reacció RNAasa A - Cl6-RMP a pH 8,0 amb el perfil d'elució i característiques espectrals i d'activitat de la reacció RNAasa A - Cl6-RMP a pH 7,4 (Figura 9 c, Figura 20) es pot comprovar que s'obté una separació molt similar, essent cada fracció idèntica. D'aquí es va deduir que estàvem en front de les mateixes fraccions, el que implicava que la fracció IIa coincidia amb la fracció II obtinguda a pH 7,4, eluint ademes ambdues fraccions a la mateixa força iònica: entre 35 i 40 mM en NaCl.

Evidentment, la fracció IIb (de la reacció a pH 8,5) és el Derivat II, obtingut a pH 7,4. El mateix paral·lelisme pot establir-se respecte de les fraccions obtingudes en la repurificació de les fraccions IIa i IIb. Tant en ambdós casos com en el cas de la repurificació de la fracció II obtinguda a pH 7,4 (Figura 21) s'obté un perfil d'elució similar i les característiques de cada fracció indiquen que són completament idèntiques, podent-se inferir que el Derivat II està impurificat en els 3 casos amb el mateix nombre (4) de derivats i que totes les dades indiquen que es tracte dels mateixos 4 derivats.

D'aquesta anàlisi es va concloure, que augmentant el pH, no s'obtenia cap derivat majoritari monosubstituit diferent al ja conegut Derivat II, obtingut per reacció a pH 7,4, ans aquest mateix derivat i els "X" que l'acompanyen. Aquestes dades confirmarien l'especificitat de la reacció del marcador amb l'enzim, a pH 7,4.

La simple comparació dels 3 perfils d'elució (Figura 15 a, b i c), junt amb el rendiment de cada reacció, expressat per la quantitat obtinguda de cada fracció, indica que l'eficàcia del marcatge arriba a ésser molt gran, doncs el pic III, corresponent a l'enzim natural que roman sense reaccionar, és progressivament més petit. Respecte de les dades de la Taula 7 cal assenyalar que les quantitats de cada fracció obtinguda són bastant comparables entre sí, donat que el pes molecular



## [ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

de cada derivat no és gaire diferent del de la RNAasa A, ja que el marcador unit a la molecula d'enzim aporta un pes molecular bastant inferior al de l'enzim natural.

A pH 8,5 apareix un únic derivat monosubstituït majoritari (el pic II) i els altres derivats minoritaris quasi han desaparegut. A pH 9,0 ja no s'observa que hi hagin monoderivats. Per contra, el pic I es va fent cada vegada més important. Així doncs, el rendiment del marcat ha sigut cada cop més elevat, fins ésser gairebé total (la quantitat de RNAasa A que queda sense reaccionar és molt petita en el cas de la reacció a pH 9,0 - pic IIIc).

Aquest fet, unit al progressiu augment del primer pic (pic I), constituït per bi(multi)derivats, va fer pensar en que el rendiment augmentava a costa de la formació de bi(multi)derivats. Formació afavorida per l'elevació de pH, cada cop més bàsic, en els que el pH arriba a ésser igual al pK de la Lys-41 (8,8) i s'acosta molt al pK dels grups  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de les restants 9 lisines de l'enzim (TAULA 3). Es el marcatge de la Lys-41, que pertany al seti actiu, el que explica l'activitat nul·la de les fraccions I, i de les obtingudes en ésser repurificades.

Així, fins a pH 8,5, el derivat majoritari monosubstituït continua essent el Derivat II, per reacció en l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1. Els altres marcats, menys afavorits, han tingut lloc a altres grups de l'enzim, com podrien ésser les histidines i les lisines (d'acord amb la TAULA 2 i 3) després d'haver sigut marcat l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub>. Amb el que ens trobem amb una sèrie de bi (o potser multi) derivats, amb la característica d'ésser, sinó tots, en gran part inactius.

La no detecció d'un altre derivat monosubstituït majoritari diferent del II, junt amb la dificultat que en principi sembla comportar la purificació dels biderivats, que a més son inactius, ens va fer traslladar l'atenció dels estudis vers uns altres derivats monosubstituïts susceptibles d'ésser estudiats, encara que no essent en principi majoritaris com el II. Aquests derivats monosubstituïts foren els denominats "X" (X1, X2, X3 i X4) que s'obtenen al repurificar la fracció II.

### III-7 REACCIÓ RIBONUCLEASA A - C16-RMP a pH 7,4 CARACTERITZACIÓ DELS DERIVATS "X"

D'acord amb la metodologia esmentada a l'apartat II-9.1.a es van fer reaccionar RNAasa A amb C16-RMP a pH 7,4, durant 48 hores a 40°C. El C16-RMP que no havia reaccionat s'elimina per cromatografia en columna de Bio-Gel P2. La Figura 19 presenta el perfil d'elució d'aquesta cromatografia. Les relacions espectrofotomètriques indicaren que el pic 1 corresponia a la fracció proteica i el pic 2 al nucleòtid que no havia reaccionat.

La fracció proteica (pic 1) es va recromatografiar en columna de CM-Sepharose CL-6B (metodologia de l'apartat II-9.1.b). La Figura 20 representa el perfil d'elució i del gradient salí.

#### III-7.1 PURIFICACIÓ DE LA FRACCIÓ II

D'acord amb la metodologia de l'apartat II-9.1.d, la fracció denominada II en la cromatografia de CM-Sepharose CL-6B (Figura 20) es va recromatografiar en columna de CM-Sepharose CL-6B, eluint-se amb gradient de força iònica i pH. El perfil d'elució es mostra en la Figura 21. Tal com s'aprecia en aquesta figura, s'obtenen 5 fraccions, de les que la 5 correspon al Derivat II ja caracteritzat (PARÉS, 1977).

#### III-7.1.a CARACTERITZACIÓ DE LES FRACCIONS OBTINGUES

D'acord amb l'apartat II-9.1.c, després d'ésser dialitzades, liofilitzades i pesades, les diferents fraccions van ésser caracteritzades.

##### III-7.1.a.1 CARACTERITZACIÓ ESPECTROFOTOMÈTRICA DE LES FRACCIONS X1, X2, X3, X4 I DERIVAT II

En la Taula B estan indicades les característiques espectrofotomètriques de les fraccions obtingudes. Comparant les

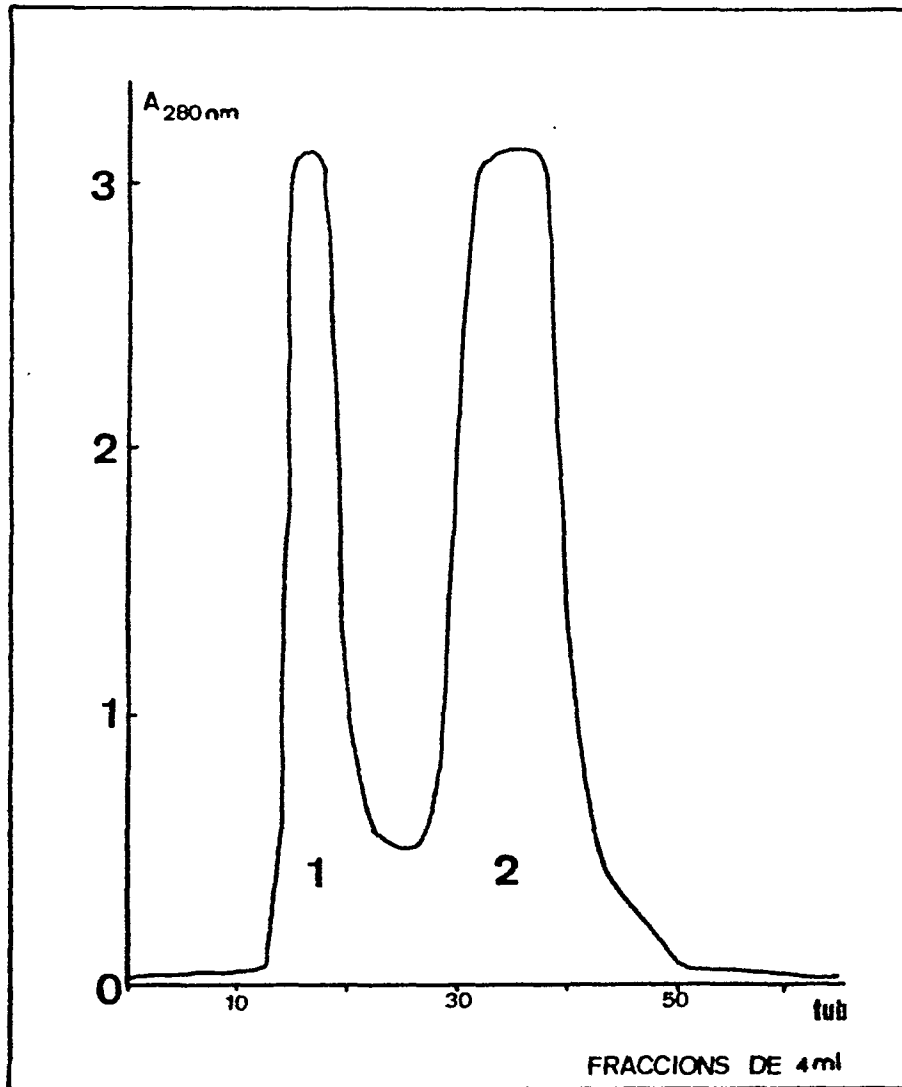


FIGURA-19

Eliminació del marcador no reaccionat de la reacció RNAasa A - C16-RMP a pH 7,4. Perfil d'elució de la cromatografia en BIO--GEL P2.

Pic 1: fracció proteica

Pic 2: marcador (C16-RMP) no reaccionat

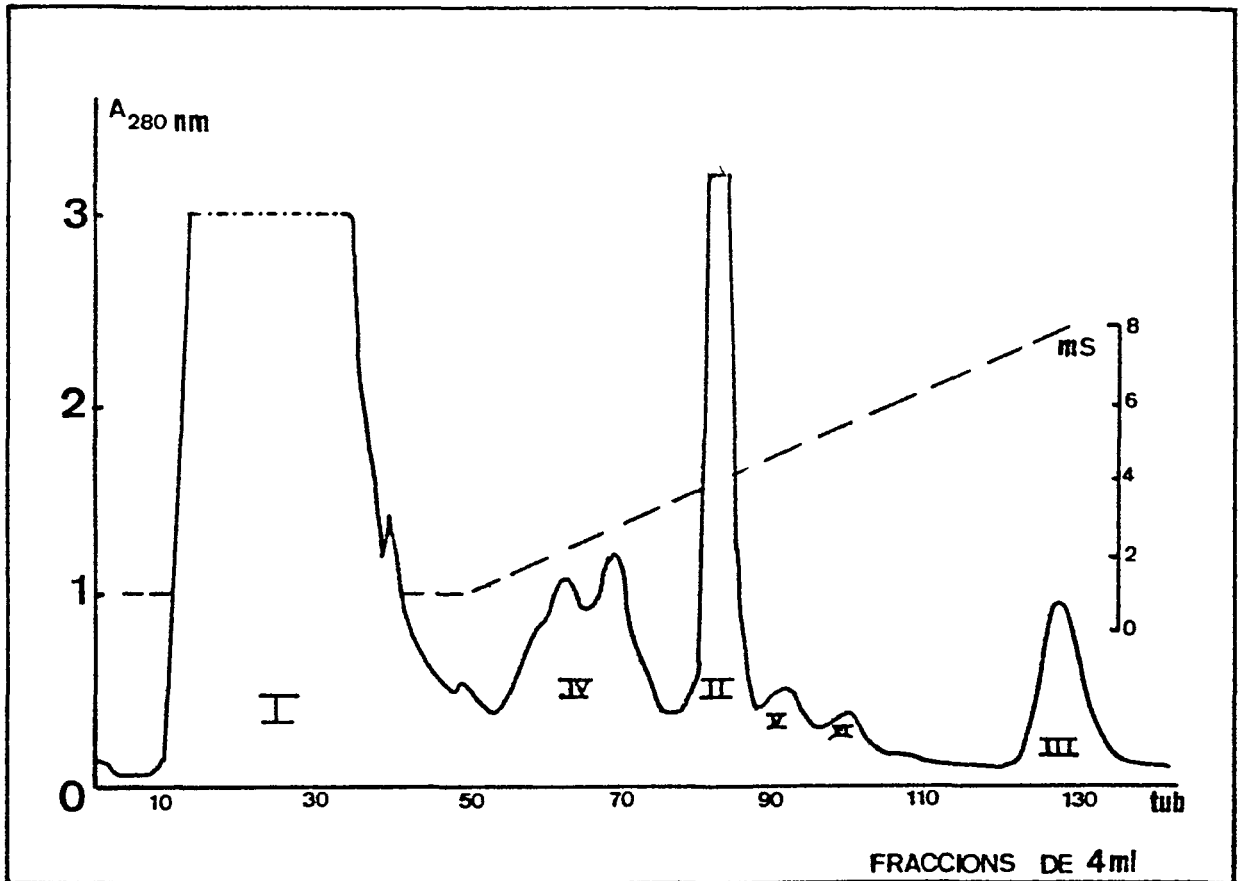


FIGURA-20

Separació dels derivats de la reacció RNAasa A - Cl<sub>6</sub>-RMP a pH 7,4. Perfil d'elució i gradient salí de la cromatografia en columna de CM-Sepharose CL-6B, equilibrada amb Tris/HCl 0,015 M, pH 8,0, gradient lineal de 0 - 0,15 M en NaCl, del pic 1 separat per BIO-GEL P2 (Figura 19). El rendiment de la reacció està indicat a la TAULA 7.

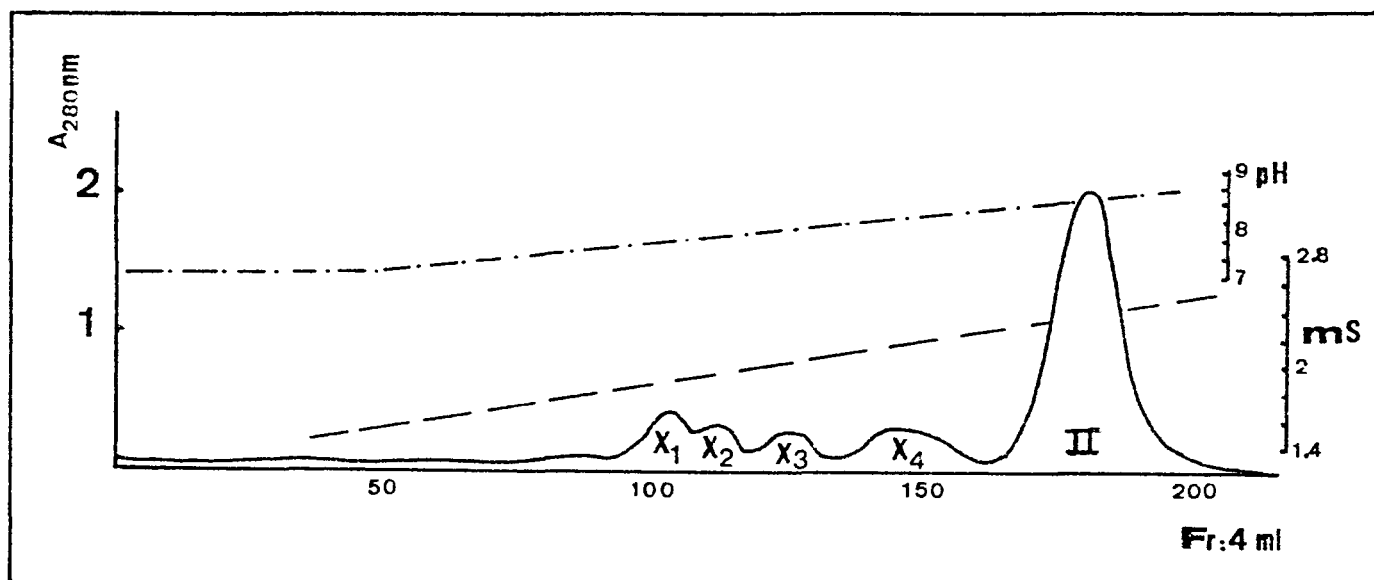


FIGURA-21

Separació dels derivats de la reacció RNAasa A - Cl<sub>6</sub>-RMP a pH 7,4. Perfil d'elució i gradient salí i de pH de la recomatografia del Pic II en CM-Sepharose CL-6B.

[ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

dades de la Taula B amb les de la Taula 6, es pot veure que totes les fraccions corresponen, molt probablement, a derivats monosubstituïts, i amb unes característiques molt semblants a les de la barreja RNAasa A i 6-metilaminopurina ribòsid (1:1), que permeten considerar els grups  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de les lisines i l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la terminal com a llocs probables d'unió del marcador en aquests derivats. Aquest fet vindrà recolzat pels resultats de l'espectrofotometria de diferència explicats més endavant.

TAULA B.-

CARACTERÍSTIQUES ESPECTROFOTOMÈTRIQUES DE LES FRACCIONS X1, X2 X3, X4 i DERIVAT II					
FRACCIÓ	$\lambda$ (nm)		A 280/A 260	A 270/A 260	A 250/A 260
	MÀX	MÍN			
X1	273	248	1,1	1,22	0,73
X2	274	248	1,2	1,3	0,68
X3	274	248	1,2	1,31	0,69
X4	274	247	1,12	1,23	0,66
Derivat II	270	247	1	1,23	0,66

Mesures efectuades amb amortidor Tris/HCl 5 mM, pH 8,0.

Recordant que tots els derivats obtinguts en la reacció a pH 7,4 entre l'enzim i el marcador eluïen a una força iònica menor que la de l'enzim natural, es podia deduir que els derivats posseïen una càrrega neta positiva inferior a la de l'enzim, explicable per la càrrega negativa aportada pel grup fosfat del marcador i per l'eliminació d'una càrrega positiva en el cas de que fos una lisina l'aminoàcid marcat. En el cas present de la separació de les fraccions del pic II, es tracta de derivats tots ells monosubstituïts, el que implica que tots posseïen una molècula de marcador per molècula de proteïna. La separació entre ells podria haver estat deguda a

una pèrdua del fosfat per part d'algun d'ells, que, evidentment significaria una càrrega positiva neta superior. Aquesta fracció hauria estat eluïda després de les que conservessin el grup fosfat, el Derivat II inclòs, que és l'últim en eluir. Donat que cap de les fraccions denominades "X" va eluir després del Derivat II (o fracció 5), hom podia suposar que cap fracció "X" havia perdut el fosfat durant el procés de recromatografiat, encara que podia perdre'l durant tractaments posteriors (fet que va ésser comprovat en la caracterització del Derivat II - PARES, 1977).

La separació entre les fraccions "X", que suposadament conservaven el grup fosfat, només podria explicar-se suposant un marcatge en diferents grups nucleòfils de l'enzim, que determinés una càrrega neta positiva diferent per a cada derivat, a més d'un possible bloqueig estèric d'una càrrega positiva veïna. Aquests diferents grups nucleòfils podrien ser lisines amb diferents pK's cadascuna d'elles. També cal tenir en compte la provocació de diferents canvis conformacionals en la molècula. Tot això recolza la suposició de que els derivats obtinguts serien diferents entre si degut, principalment, al marcat en un grup diferent en cada cas.

Davant, doncs, de la separació obtinguda i de que molt probablement es tracta de derivats monosubstituïts per reacció en un grup de l'enzim diferent de l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1 (Derivat II), es va decidir de caracteritzar aquests derivats "X".

### III-7.1.a.2 ESPECTRES DE DIFERÈNCIA

Van ésser realitzats segons la metodologia descrita en l'apartat II-6.1. Els espectres obtinguts es mostren en la Figura 22. Els espectres de diferència de les fraccions "X" són molt similars, en la zona superior a 245 nm, al del 6-metilaminopurina ribòsid. Aquest fet està d'acord amb la hipòtesi de que el marcador ha reaccionat amb grups  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de diferents residus de lisina de la RNAasa A. En canvi, l'espectre de diferència del Derivat II és molt diferent. La qual cosa és sorprenent, donat que és un derivat amb el marcador unit en l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1. Aquesta gran diferència es discutirà posteriorment, quan s'estudiïn els espectres de diferència d'altres derivats.

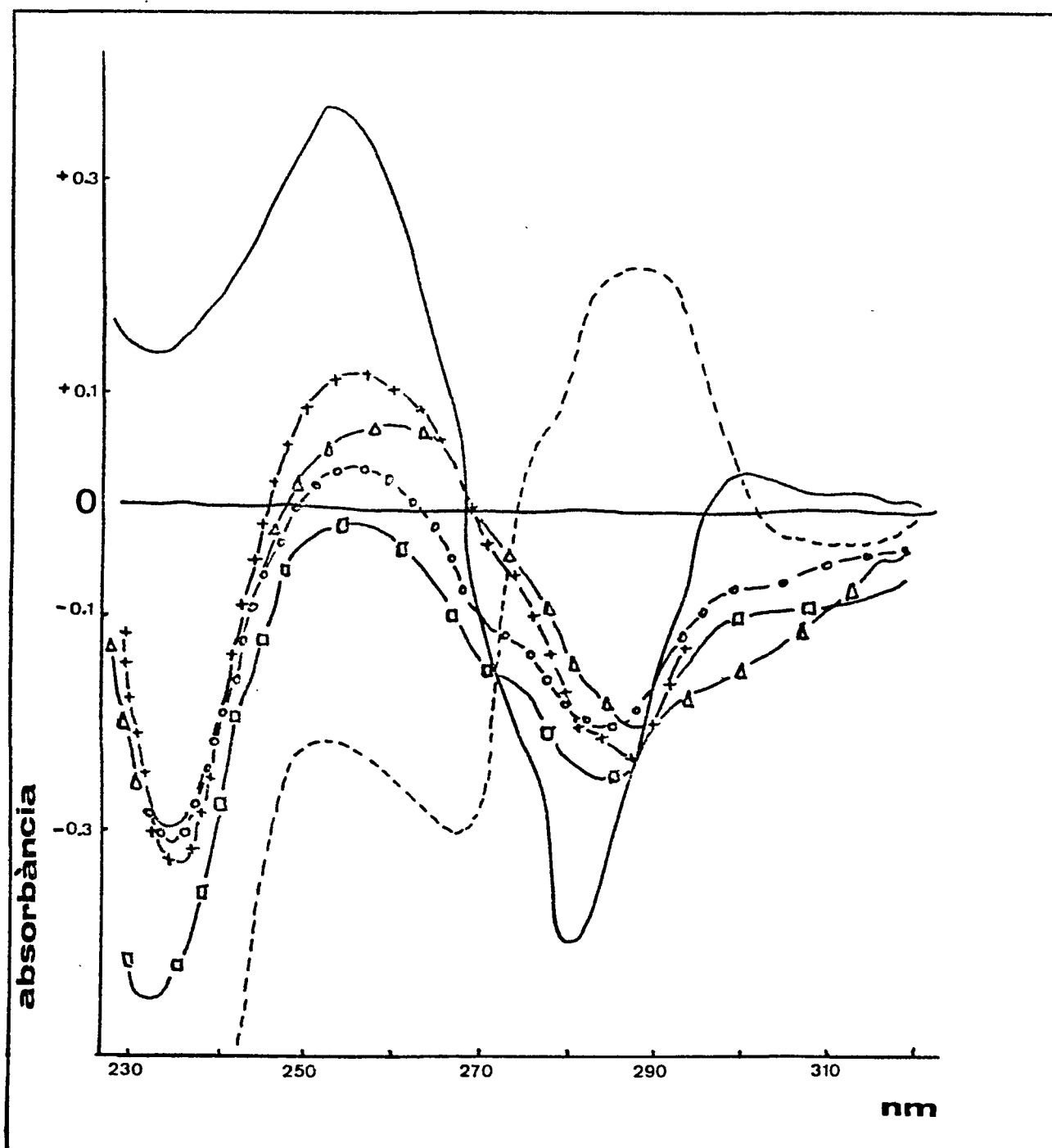


FIGURA-22

Espectres de diferència dels derivats X1, X2, X3, X4, Derivat II i del 6-metilaminopurina ribòsid originats per canvi de pH de neutre a àcid. Dissolucions 0,1 M de cada mostra en aigua, i la solució er porta a pH 7,0, pH inicial 7, pH final entre 0,6 i 1, t = 25 °C.

- 6 metilaminopurina ribòsid
- Derivat II
- X1
- △-△-△ X2
- X3
- ++++ X4



III-7.1.a.3 DETERMINACIÓ DEL COEFICIENT D'EXTINCIÓ MOLAR DELS DERIVATS II i X4

D'acord amb la metodologia de l'apartat II-14, es van obtenir els següents valors:

DERIVAT II :  $\epsilon_a$  270 nm = 22.100

DERIVAT X4 :  $\epsilon_a$  274 nm = 22.250

(donat que els altres derivats també són monosubstituïts, es pot suposar que tindran un coeficient d'extinció molar molt semblant al del Derivat II i X4. Tal com es veurà posteriorment, d'altres derivats monosubstituïts presenten valors molt similars- apartat III-8.1.f).

III-7.1.a.4 CARACTERITZACIÓ CINÈTICA DELS DERIVATS "X"

Es determina l'activitat dels derivats "X": X1, X2, X3, X4, Derivat II i de les fraccions IV, V i VI de la cromatografia en CM-Sepharose CL-6B de la separació dels components de la fracció proteica (Figura 20). Aquestes dades poden donar informació de l'acció del marcador sobre l'activitat catalítica del derivat, i, indirectament, sobre la posició del marcador en la molècula proteica.

En la TAULA 9 venen indicades aquestes activitats en front de 2',3' Cp i en front de RNA, respecte de l'activitat de la RNAasa A natural, recuperada de la reacció, que ha sofert els mateixos tractaments que els derivats. Aquestes venen representades en percentatges.

Les dades de la TAULA 9 indiquen clarament que, en tots els casos, el marcatge no ha afectat cap residu catalític crític, donat que no es perd totalment l'activitat en cap cas, especialment front de 2',3' Cp.

TAULA 9.-

DERIVAT	SUBSTRAT	
	2',3' CP	RNA 0,1 mg/ml
X1	66	6,1
X2	45	2,3
X3	47	4
X4	53,5	3
II	90	23
IV	61,4	8,3
V	100	15
VI	97	13

Front de 2',3' Cp (2 fase de la catàlisi: hidròlisi del nucleòtid cíclic) s'observen diferències entre els diferents derivats. Els derivats "X" són els que presenten una menor activitat (exceptuant el IV). Això semblaria indicar, en principi, que el marcador, en aquests derivats, està quelcom més "a prop" del seti B1 R1 P1 on es fixa el 2',3' Cp, que en els altres derivats. El marcador exerciria així un impediment estèric més gran, o una disminució de la càrrega neta positiva del seti catiònic de l'enzim, deguda a la presència del grup fosfat del marcador.

## [ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

El Derivat II mostra una activitat d'un 90% amb 2', 3' Cp, i, conseqüentment, amb el marcador situat en l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1, el grup marcador (i el grup fosfat carregat negativament) roman allunyat del B1 R1 P1 (a 8 Å del seti fixador de fosfat P1 - apartat 1-3), el que està d'acord amb el resultat de la determinació de les constants cinètiques del Derivat II emprant 2',3' Cp. També s'ha demostrat que el fosfat del marcador no està situat (o no ocupa el seti) en P1, per ressonància magnètica nuclear (ARÚS, 1981), ans un altre sub-seti que es parlarà en la discussió final (apartat IV) i que va ésser denominat P2. Aquestes dades estan, doncs, completament d'acord amb la hipòtesi anterior de que els derivats "X" serien uns derivats amb el marcador situat quelcom més "a prop" de B1 R1 P1, evidentment, en un grup amí diferent de l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub>. El marcador exerciria un impediment estèric més gran a l'entrada del substrat, o provocaria una disminució de la càrrega positiva del seti catiònic de l'enzim més elevada.

Front d'RNA, les diferències no són tan acusades, però amb la particularitat d'ésser totes les activitats molt baixes. Aquesta gran disminució d'activitat podria explicar-se si es té en compte la rigidesa de la molècula d'RNA (LEE, 1975). Existeixen dades que assenyalen que la cadena d'RNA pot interaccionar en diversos punts de la molècula d'enzim (aspecte del que s'en tornarà a parlar més endavant). Aquesta rigidesa impossibilitaria que la molècula d'RNA "s'adaptés" correctament, doncs es trobaria amb un impediment estèric bastant important, no podent-se fixar correctament al centre actiu del derivat. Aquesta impossibilitat vindria agreujada pel fet de que el marcador incorpora una molècula de fosfat carregada negativament, i l'RNA posseïx molts d'aquests grups, establint-se una repulsió de càrregues.

III-7.1.a.5 CARACTERITZACIÓ CINÈTICA DELS DERIVATS X4 i II. DETERMINACIÓ DE LES CONSTANTS CINÈTIQUES DE LA HIDRÒLISI DEL 2',3' Cp i RNA CATALITZADES PER L'ENZIM NATURAL, EL DERIVAT X4 i EL DERIVAT II.

D'acord amb el que s'ha exposat a l'apartat anterior, es va procedir a determinar les constants cinètiques d'un dels derivats obtinguts, l'X4 (escollit bàsicament per criteris de puresa i de quantitat disponible), del Derivat II i de la RNAasa A recuperada.

La metodologia emprada està descrita en els apartats II-6.3 i II-6.4 . Per a cada concentració de substrat, les mesures van ésser fetes per duplicat en els tres casos. El tractament de dades ha sigut l'esmentat a l'apartat II-6.3 pel que respecte a les determinacions amb 2',3' Cp en tots els casos (dades que, com ja s'ha esmentat en el mateix apartat, van ésser objecte de posteriors estudis pel que respecte a la RNAasa A).

En la TAULA 10 venen indicats els valors de les constants cinètiques: Km i kcat, emprant 2',3' Cp com a substrat. En la TAULA 11 venen indicades les constants cinètiques calculades per HERRIES et al. (1962) i per PARÉS (1977). Els valors de Km obtinguts per la RNAasa A són molt semblants en els 3 casos, així com els de kcat.

El Derivat II presenta una Km idèntica a la de la RNAasa A, en el cas dels estudis de PARÉS, i lleugerament superior a la de la RNAasa A comparant les dades d'aquest treball (TAULA 10).

TAULA 10.-

CONSTANTS CINÈTIQUES, Km i kcat, DE LA RNAasa A, DERIVAT II i DERIVAT X4 EMPRANT 2',3' Cp COM A SUBSTRAT			
MÈTODE DE CàLCUL	RNAasa A	DERIVAT II	DERIVAT X4
LINEWEAVER- BURK	Km: 0,526(±0,4)mM	0,743(±0,9)mM	0,701(±0,2)mM
	kcat: 54,5±0,4 min <sup>-1</sup>	46,3±10 min <sup>-1</sup>	2,61±0,32 min <sup>-1</sup>
EADIE- HOFSTEE	Km: 0,507(±0,004)mM	0,533(±0,006)mM	0,81(±0,2)mM
	kcat: 53,7±0,3 min <sup>-1</sup>	37,5±3 min <sup>-1</sup>	2,75±0,22 min <sup>-1</sup>
CORNISH- BOWDEN	Km: 0,54(±0,08)mM	0,62(±0,7)mM	0,82(±0,3)mM
	kcat: 54,2±0,2 min <sup>-1</sup>	31,3±4,2 min <sup>-1</sup>	3,05±0,26 min <sup>-1</sup>
Condicions: amortidor acetat sòdic/HCl 0,1 M, pH 5,0 , NaCl 0,1 M, temperatura: 25°C.			

TAULA 11.

CONSTANTS CINÈTIQUES DE LA RNAasa A i DEL DERIVAT II OBTINGUES PER PARÉS (1977) i PER HERRIES et al. (1962).		
	Km	kcat
RNAasa A	0,437(± 0,7)mM	79,1 ± 10,9 min <sup>-1</sup>
DERIVAT II	0,435(± 0,69)mM	51,8 ± 7 min <sup>-1</sup>
§ RNAasa A	0,402(± 0,37)mM	62 ± 5,8 min <sup>-1</sup>
§: valors trobats per HERRIES et al. (1962) .		
Condicions: amortidor acetat sòdic/HCl 0,1 M, pH 5,0 NaCl 0,1 M, temperatura: 25°C.		

## [ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

El fet de que el Derivat II presenti una  $K_m$  molt similar a la de la RNAasa A significaria que té una afinitat semblant pel substrat de baix pes molecular i per tant que, aparentment, el marcador no dificulta la fixació del substrat. Aquest fet es podria explicar tenint en compte que l'enzim presenta dos setis diferents, un que fixaria els nucleòtids purínics i l'altre els pirimidínics. El marcador estaria fixat al seti de purines, mentre que el substrat ocuparia, principalment, el seti de pirimidines. Entre ambdós existiria un cert solapament, solament a nivell de la fixació del grup fosfat.

RICHARDS & WYCKOFF (1971) assenyalen una probable separació de 2 Å entre els llocs de fixació del grup fosfat de l'AMP i del 2',3' Cp, aquesta separació no sembla suficient per impedir un solapament estèric d'ambdós llocs i aquest fet donaria lloc a una competència pels residus aminoacídics (His-12, His-119 i Lys-41) que formen el seti principal de fixació de fosfat de l'enzim. Així, la presència del grup fosfat del marcador en aquest seti dificultaria la fixació del grup fosfat del substrat, el que disminuiria l'afinitat del derivat pel 2',3' Cp i, en conseqüència, augmentaria la  $K_m$ . Donat que això no s'observa, aquest fet sembla indicar que el grup fosfat del nucleòtid marcador no està situat en el seti principal fixador de fosfat (P1). Com ja s'ha esmentat, dades de RMN indiquen també que el grup fosfat no ocuparia el P1, ans un altre sub-seti (ARUS, 1981).

El quocient  $k_{cat}/K_m$  presenta sempre un valor inferior al de l'enzim natural, indicant una menor eficiència catalítica del Derivat II respecte de la RNAasa A. Aquesta lleugera disminució es deguda a l'existència d'una inhibició aparentment no-competitiva, atribuïda solament a la presència del marcador unit covalentment a la proteïna.

Pel que respecte al Derivat X4, les dades de la TAULA 10 indiquen que aquest derivat presenta una  $K_m$  lleugerament superior a la de l'enzim natural, o sia, una lleugera menor afinitat pel 2',3' Cp. Aquest Derivat X4 presenta un quocient  $k_{cat}/K_m$  bastant inferior al de l'enzim natural, que suposa una eficiència catalítica d'hidròlisi del substrat bastant menor, fet ja comprovat (TAULA 9), essent de l'ordre del 50% inferior. També suposaria una inhibició de caràcter no-competitiu, o mixta, doncs la  $K_m$  augmenta lleugerament.

## [ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

La disminució de la  $k_{cat}$  del Derivat X4 respecte de l'enzim natural estaria d'acord amb la hipòtesi esmentada de la presència del grup marcador quelcom més aprop del seti de fixació del substrat B1 R1 P1.

### DETERMINACIONS CINÈTIQUES AMB RNA

Pel que respecte a las determinacions amb RNA, el tractament de dades va ésser fet amb la metodologia de l'aparat II-6.4 per a la RNAasa A i el Derivat II. Pel Derivat X4 es va fer la representació directa de la velocitat inicial en front de la concentració de substrat i la representació dels dobles recíprocs ( $1/V$  en front de  $1/S$ ) de LINEWEAVER & BURK (1934).

Emprant RNA com a substrat es van obtenir el següents valors de  $K_m$  (en mg/ml) per a la RNAasa A i el Derivat II, indicats en la TAULA 12.

TAULA 12 .-

VALORS DE $K_m$ (en mg/ml) DE LA RNAasa A i DEL DERIVAT II EMPRANT RNA COM A SUBSTRAT		
MÈTODE	RNAasa A	DERIVAT II
LINEWEAVER-BURK	0,377 $\pm$ 0,05	0,71 $\pm$ 0,08
EADIE-HOFSTEE	0,39 $\pm$ 0,1	0,76 $\pm$ 0,15
CORNISH-BOWDEN	0,41 $\pm$ 0,1	0,77 $\pm$ 0,14

Condicions: acetat sòdic/HCl 0,1 M, 0,1 M en NaCl, pH 5,0 i 25°C de temperatura.

## [ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

Valors que indiquen una menor afinitat del Derivat II per l'RNA.

Determinacions de la Km de la RNAasa A front de l'RNA han estat fetes per d'altres autors i venen indicades en la TAULA 13.

TAULA 13 .-

VALORS DE Km DE LA RNAasa A FRONT D'RNA					
INTERVAL ES] mg/ml	FORÇA IÒNICA	pH	T°C	Km	AUTOR
0,08-0,8	0,1	5	24,2	0,668	MARZOTTO (1970)
0,02-0,1	0,2	5,2	25	0,046	NOGUÉS (1978)
1 - 8	0,1	5,3	35	77,78	BATT & HOUCK (1964)
1 - 8	0,1	5,8	35	14,79	BATT & HOUCK (1964)
0,2 - 8	0,2	7	25	0,68	PARÉS et al. (1980a)

La TAULA precedent indica clarament una gran discrepància entre els valors obtinguts. Es troba el mateix valor a pH 5 i 7, però a una força iònica una mica diferent (MARZOTTO, 1970; PARÉS 1980 a). Però el marge de concentracions emprat és diferent. En canvi, variant el pH mitja unitat, de 5,3 a 5,8 i variant el marge de concentracions, BATT & HOUCK (1964) troben 2 valors bastant diferents entre sí, i enormement diferents respecte dels demés.

Davant dels resultats experimentals, hom va pensar en la conveniència de realitzar estudis més detallats.

Pel que respecte al Derivat X4 la Figura 23 mostra les gràfiques de la representació directa de la velocitat inicial front de la concentració de substrat i la dels dobles recíprocs de la hidròlisi de l'RNA pel Derivat X4.



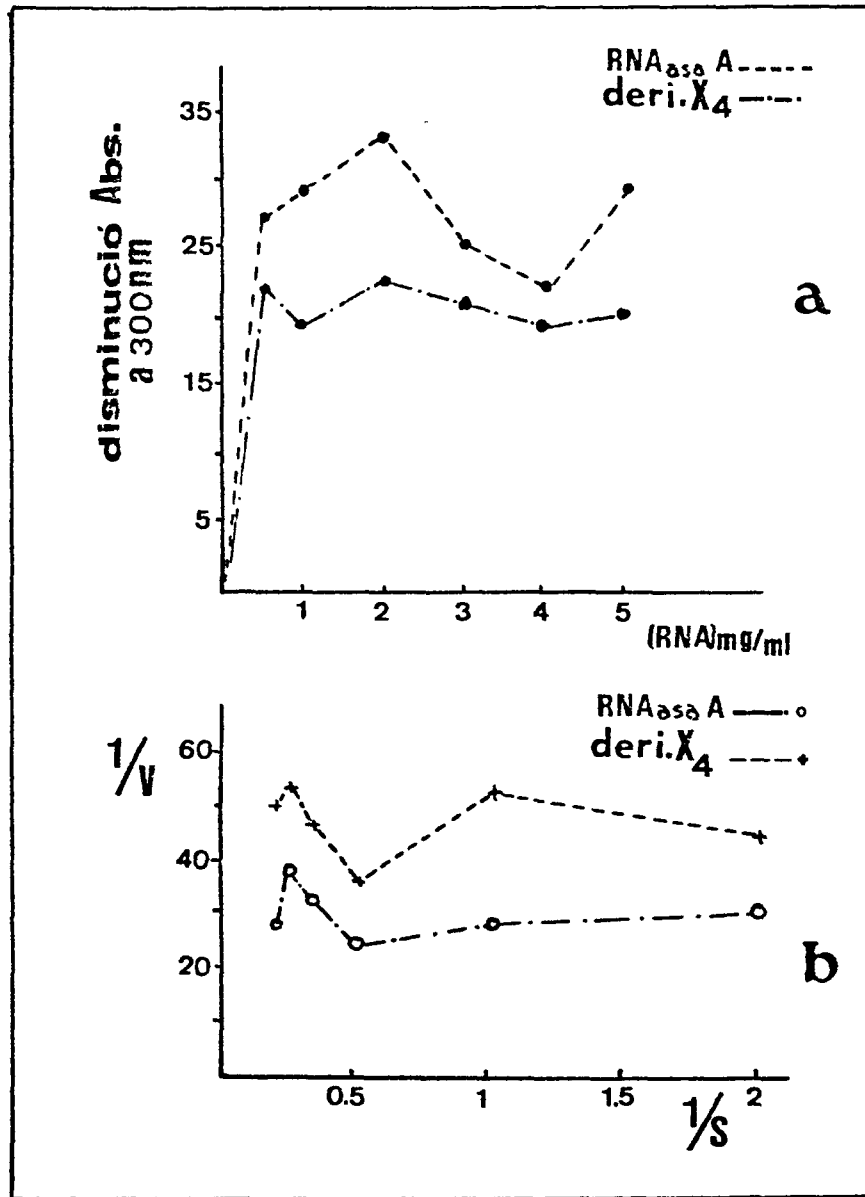


FIGURA-23

- a) Representació dels valors de la velocitat inicial per a la hidròlisi de diferents concentracions d'RNA pel Derivat X4 i de la RNAasa A. Els valors de velocitat venen donats en unitats arbitràries (disminució d'absorbància produïda en 2 minuts a 300 nm).
- b) Representació dels dobles recíprocs.

Condicions: acetat sòdic/HCl 0,2 M pH 5,5, 25 C de temperatura. RNA de germen de blat.

## [ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

Tal com s'aprecia a la Figura 23 a), es fa bastant difícil de parlar de cinètica hiperbòlica, o típicament Michaeliana, el que resulta evident en la representació de LINEWEAVER-BURK, en la que es fa impossible tracar una recta. En els casos en que s'havia traçat una recta, s'ha pogut comprovar que depenia bàsicament del marge de concentracions de substrat emprat, i de l'ajust matemàtic.

De fet, estudis detallats duts a terme per RUBSAMEN et al. (1974), WALKER et al. (1975-1978) i ARÚS (1982) van concloure que la cinètica de la RNAasa A en front de 2',3' Cp no segueix un comportament de tipus Michaelia. La interpretació d'aquest comportament serà discutida més endavant. Pel que respecte a l'RNA, els estudis cinètics van indicar un comportament similar a l'indicat en la Figura 23 a) i b). De fet, cal assenyalar que diversos autors ja havien assenyalat la dificultat d'obtenir informació de la hidròlisi per l'enzim d'un substrat com l'RNA, heterogeni i d'alt pes molecular, que determina una reproductibilitat dels resultats molt pobre (HUMMEL & KALNITSKY, 1964).

### III-7.1.a.6 OBTENCIÓ DE L'S-PÈPTID i S-PROTEÏNA DELS DERIVATS X4, II i DE LA RNAasa A

Els derivats X4, II i la RNAasa A es van hidrolitzar amb subtilisina donant lloc a l'S-pèptid (aminoàcids 1 a 20) i la S-proteïna (aminoàcids 21 a 124) dels derivats i l'enzim natural; l'S-pèptid i la S-proteïna obtinguts es van separar segons la metodologia de l'apartat II-8. La Figura 24 mostra els perfils d'elució obtinguts en els tres casos.

Les fraccions obtingudes van ésser congelades i liofilitzades. Els espectres ultraviolats de les fraccions obtingudes venen representats a la Figura 25.

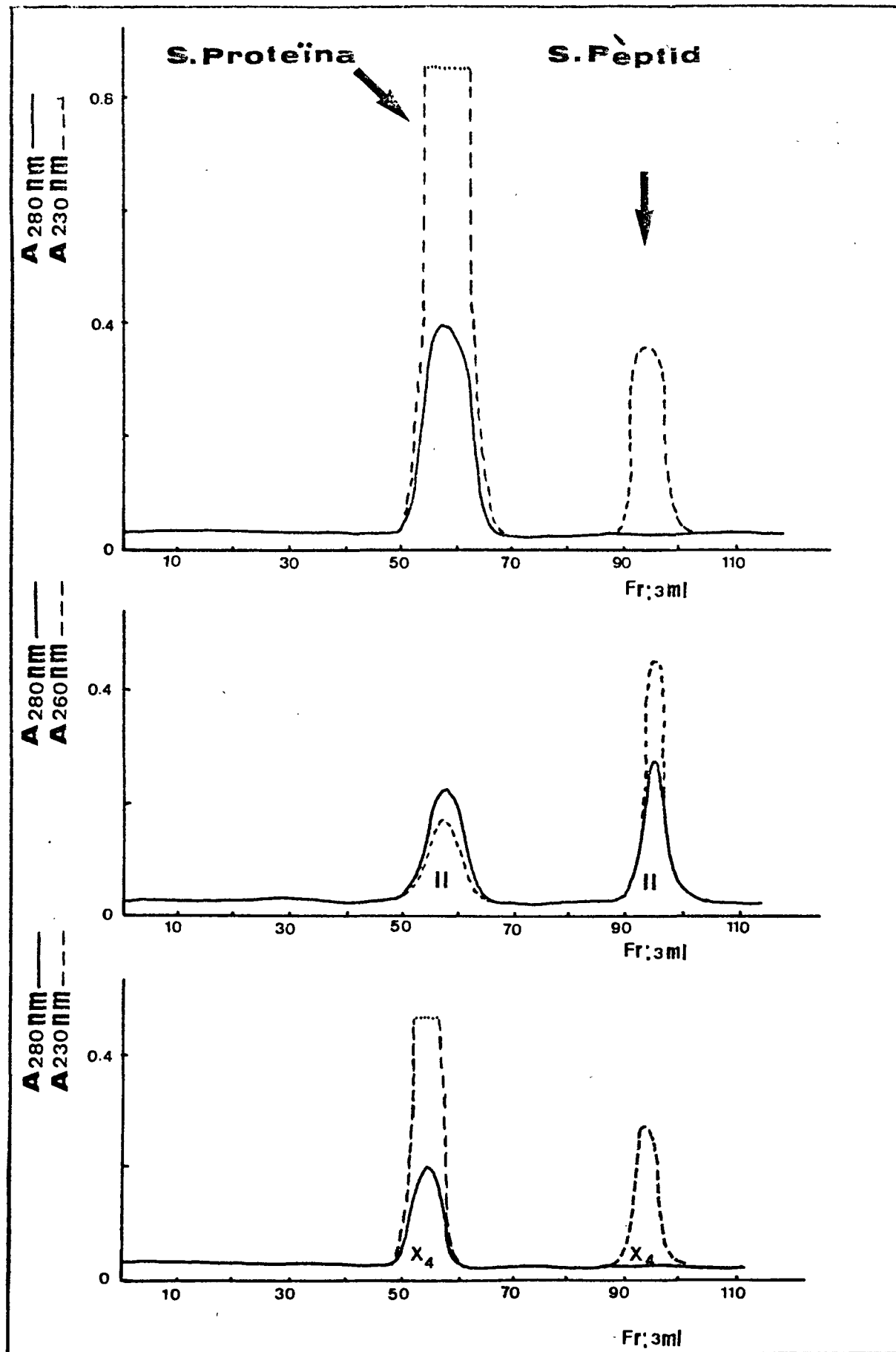


FIGURA-24

Perfil d'elució de la separació de l'S-pèptid i de la S-proteïna mitjançant cromatografia en BIO-GEL P6 a) de la RNAasa A; b) del Derivat II; c) del Derivat X4. (Columna equilibrada amb acetat 0,2 M, eluït amb acetat 0,2 M).

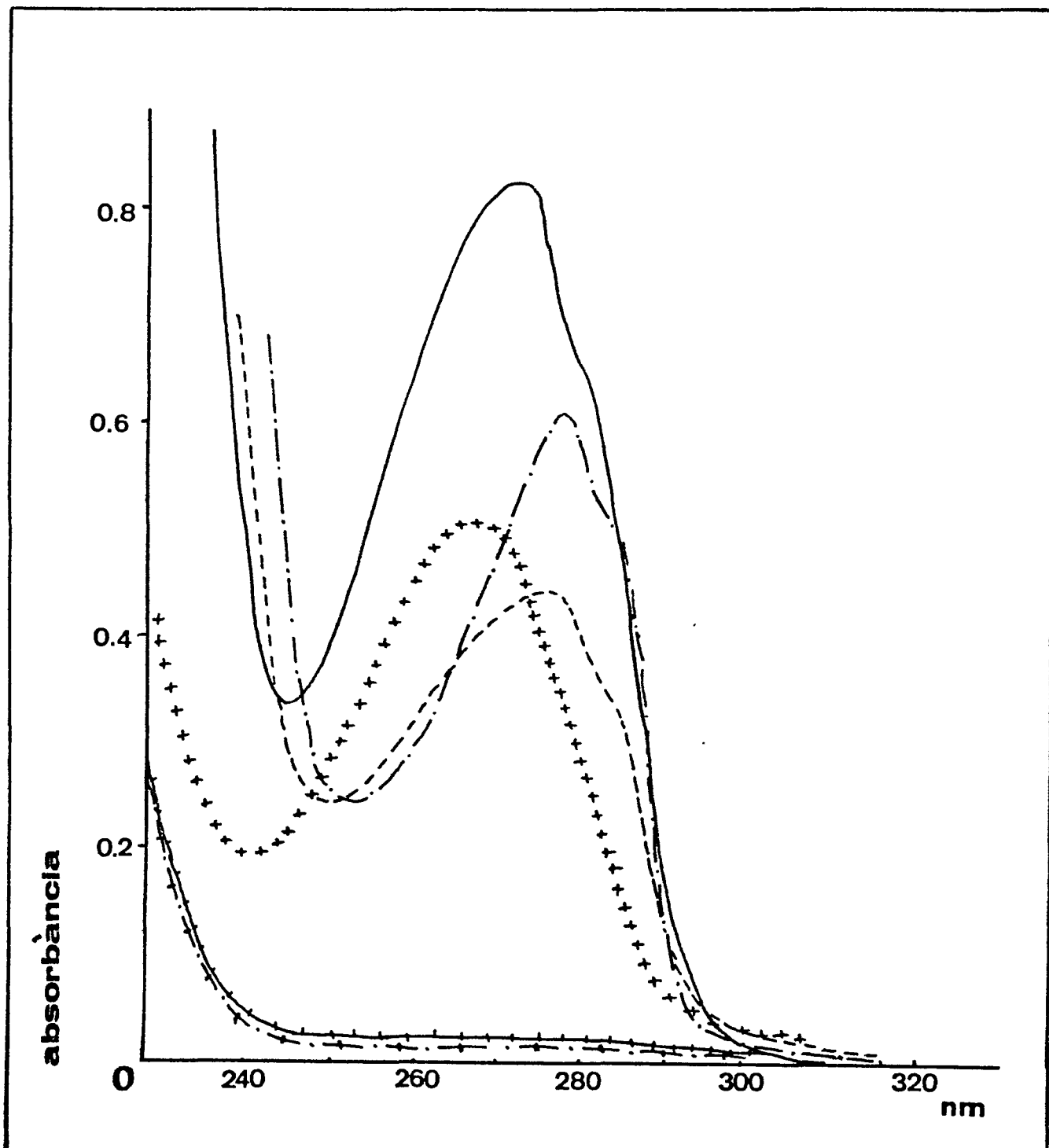


FIGURA-25

Espectres ultraviolats de:

- a) S-peptid (+·+·+·) i S-proteina (-·-·-·) naturals.
- b) S-peptid (+·+·+·+·) i S-proteina (-·-·-·) II.
- c) S-peptid (+·+·+·+·) i S-proteina (—) X4.

Totes les mostres dissoltes en Tris/HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, pH 7,4.

## C RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

L'S-pèptid natural presenta una absorbància molt petita en la zona aromàtica, doncs no té tirosina, ans només una fenilalanina. L'increment d'absorbància a partir de 230 nm és degut a l'enllaç peptídic. És per aquest fet que es representa l'absorbància a 230 nm de la zona de l'S-pèptid en el perfil d'elució de la separació de les fraccions de l'enzim natural (figura 24). La S-proteïna natural presenta un espectre molt similar al de la RNAasa natural. L'S-pèptid II presenta una gran absorbància en la zona aromàtica, amb unes característiques similars a las dels nucleòtids purínics, però amb un increment a 230 nm que indica la naturalesa peptídica del compost. Això demostra que el nucleòtid està unit a algun dels primers 20 aminoàcids del Derivat II. La S-proteïna II presenta un espectre idèntic al de la S-proteïna natural, pel que cal suposar que la separació entre l'S-pèptid i la S-proteïna II ha estat total, així com l'eficiència de la hidròlisi per la subtilisina.

L'S-pèptid X4 presenta una absorbància molt petita en la zona aromàtica, indicant clarament que el marcatge no ha tingut lloc en els 20 primers aminoàcids. En canvi, la S-proteïna X4 presenta un espectre similar al del derivat X4 sencer, indicant la presència del marcadore. Això demostra que el nucleòtid està unit a algun dels aminoàcids 21 a 124 del Derivat X4. En la TAULA 14 es mostren les característiques espectrofotomètriques de cada fracció obtinguda.

D'acord amb la metodologia de l'apartat II-15 es va procedir, mitjançant l'electroforesi de proteïnes amb gel de poliacrilamida en presència de SDS, a efectuar un control de l'eficiència de la hidròlisi amb subtilisina de la RNAasa A, el Derivat II i el X4. Aquest control es va efectuar donat que es tenien indicis de que la subtilisina no hidrolitzava el 100% del Derivat II (PARÉS, 1977). L'hidròlisi es va dur a terme a dues concentracions de subtilisina:

- a) 1% pes/pes respecte de la quantitat d'enzim i
- b) 4% pes/pes

A les dues concentracions van ésser emprats temps de 30 i 60 minuts. La Figura 26 mostra un esquema dels resultats obtinguts.

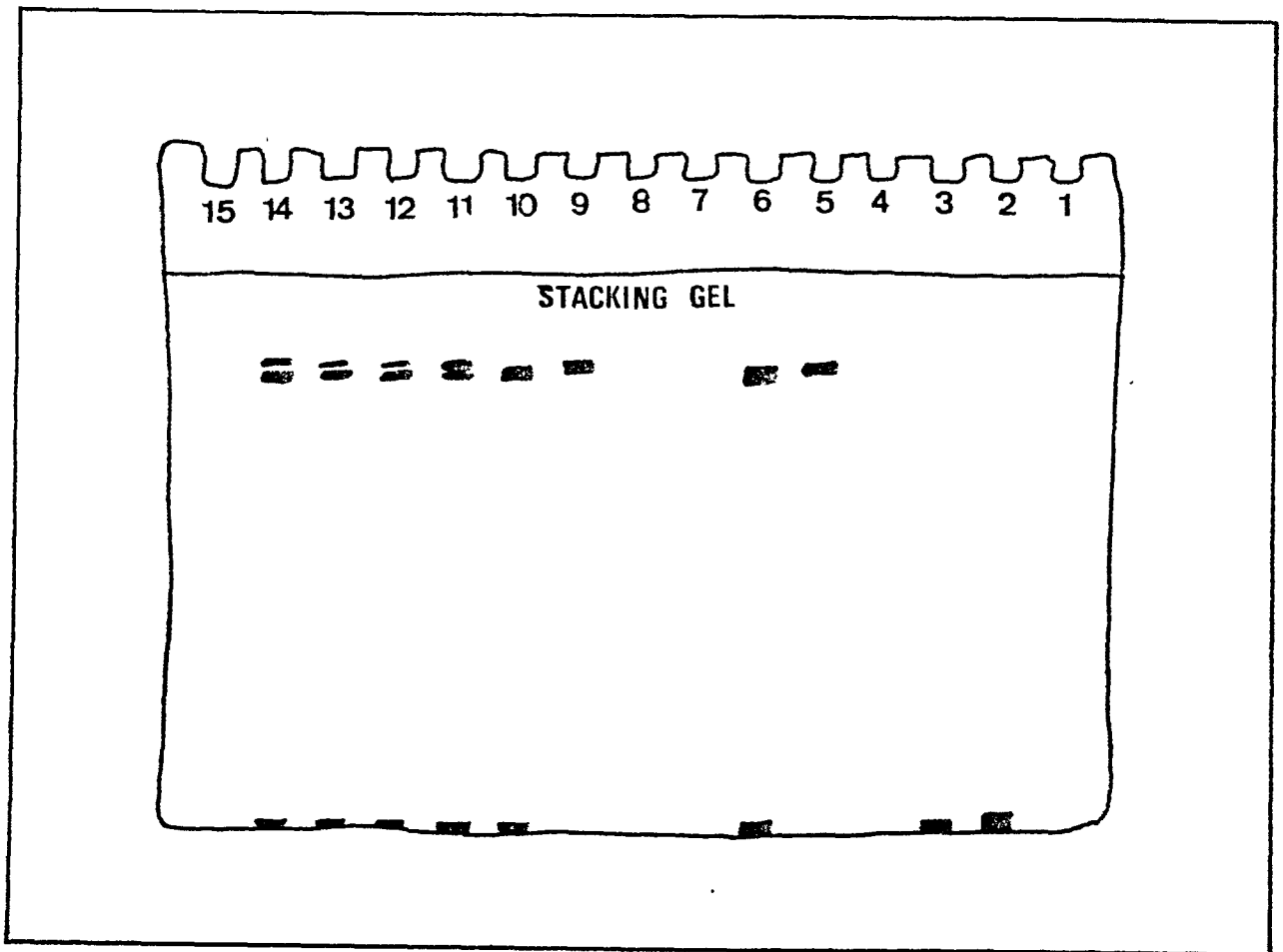


FIGURA-26

Esquema de l'electroforesi en gel de poliacrilamida, en presència de SDS.

Gel superior: 5% de acrilamida (Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8).

Gel inferior (stacking gel): 19% de acrilamida (Tris/HCl 0,5 M, pH 8,8).

S'apliquen mostres dissoltes en Tris/HCl 25 mM, pH 8,4, glicina 200 mM, 0,1% SDS.

- núm. 2 - blau de bromofenol.  
 3 - S-pèptid.  
 5 - RNAasa A.  
 6 - RNAasa A + Subtilisina al 1%, durant 30 min.  
 9 - Derivat II.  
 10 - Derivat II + Subtilisina al 1%, 30 min.  
 11 - Derivat X4 + Subtilisina al 1%, 30 min.  
 12 - Derivat X4 + Subtilisina al 1%, 60 min.  
 13 - Derivat X4 + Subtilisina al 4%, 30 min.  
 14 - Derivat X4 + Subtilisina al 4%, 60 min.

[ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

Els resultats van indicar que, en tots els casos, es produïa el trencament amb gran eficiència, exceptuant el cas del Derivat X4, en el que es podia apreciar que, si bé hi havia hagut trencament, encara restava derivat sense ésser hidrolitzat. Devant d'aquesta resistència a l'hidròlisi per part del Derivat X4, hom podia suposar que aquesta resistència no més podia ésser deguda a l'incorporació del marcador. Aquest exerciria un impediment al trencament, o determinaria una major compactació de l'enzim, que dificultaria l'hidròlisi per la subtilisina.

TAULA 14 .-

CARACTERÍSTIQUES ESPECTROFOTOMÈTRIQUES DELS DIFERENTS S-PÈPTIDS i S-PROTEÏNES OBTINGUTS						
FRACCIÓ	$\lambda$ (nm)					
	MAX	MIN	A 280/A 260	A 270/A 260	A 250/A 260	
S-PÈPTID natural	>230	---	---	---	---	---
S-PROTEÏNA natural	277	252	1,9	1,73	0,75	
S-PÈPTID II	266	240	0,56	1,08	0,58	
S-PROTEÏNA II	277,5	251	2,14	1,44	0,7	
S-PÈPTID X4	>230	---	---	---	---	---
S-PROTEÏNA X4	272	245	0,94	1,23	0,58	

Condicions: mostres dissoltes en Tris/HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, pH 7,4.



### III-B REACCIÓ RNAasa A - 6-CLOROPURINA RIBOSA

Les dades cinètiques del Derivat II en front del 2',3' Cp (apartat III-7.1.a.5) indicaren la possibilitat de que el grup fosfat del marcador no estigués situat en el seti de fixació del fosfat de l'enzim, donat que el derivat presenta la mateixa afinitat pel 2',3' Cp que la ribonucleasa. La  $k_{cat}$  presenta un valor inferior, indicant que el marcador (unit a la Lys-1) exerceix algun tipus d'efecte que determina una inhibició no-competitiva. Les dades en front de l'RNA indicaren que el Derivat II mostra una activitat menor, resultat explicat en termes de rigidesa de la molècula d'RNA i de repulsió entre les càrregues negatives del fosfat del nucleòtid marcador i dels grups fosfodièster de l'RNA adjacents al que es fixa en el seti fixador principal de fosfat de l'enzim.

Aquests fets van suggerir la idea d'estudiar el paper jugat pel grup fosfat del marcador quan esta unit a l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1 (Derivat II) i es va pensar en la possibilitat d'obtenir un derivat en aquest  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1 que no tingués el grup fosfat, o sia, un derivat marcat amb el 6-Cloropurina ribosa.

D'acord amb les dades de la reacció RNAasa A 6-Cloropurina ribosa (apartat I-2.8.a) es va procedir a estudiar els diferents derivats obtinguts per tractar de comprovar si algun d'ells corresponia a un derivat per modificació de l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1.

D'acord amb la metodologia descrita en l'apartat II-12 es va fer reaccionar RNAasa a amb 6-Clorpurina ribosa a pH 7,4. El control de l'estabilitat del marcador va ésser fet d'acord amb la metodologia de l'apartat II-13.

El 6-Cloropurina ribosa no reaccionat va ésser eliminat per diàlisi en front d'amortidor Tris/HCl 15 mM pH 8,0. La fracció proteica es va purificar per cromatografia en columna de bescanvi catiònic de CM-Sepharose CL-6B. El perfil d'elució es mostra a la Figura 27 en el que apareixen 7 fraccions que van ésser caracteritzades espectrofotomètricament (TAULA 15).



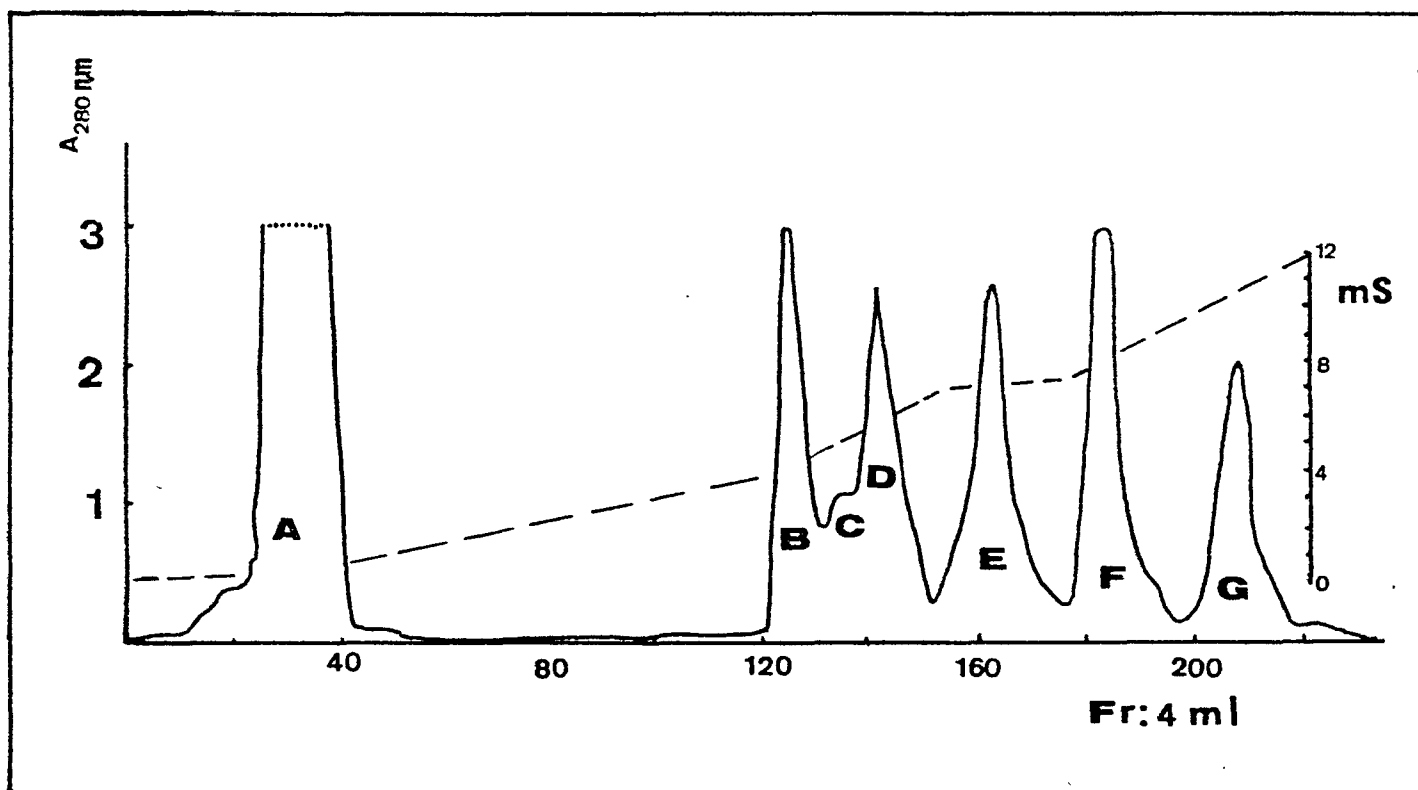


FIGURA-27

Separació dels derivats de la reacció RNAasa A - 6 Cloropurina ribòsid. Perfil d'elució i gradient salí de la cromatografia en CM-Sepharose CL-6B, equilibrada amb Tris/HCl 15 mM, pH 8,0. Gradient 0 - 0,15 M en NaCl.

TAULA 15 .-

CARACTERÍSTIQUES ESPECTROFOTOMÈTRIQUES DE LES FRACCIIONS OBTINGUES EN LA CROMATOGRAFIA AMB CM-Sepharose CL-6B DE LA REACCIÓ RNAasa A - 6 CLOROPURINA RIBOSA.					
FRACCIÓ	$\lambda$ (nm)		A 250/A 260	A 270/A 260	A 280/A 260
	MÀX	MÍN			
A (no retin- guda)	267	243	0,58	1,16	0,63
B	269	244	0,56	1,15	0,95
C	269	245	0,6	1,2	0,95
D	268	245	0,61	1,17	0,91
E	270,5	246	0,61	1,2	0,93
F	270	246,5	0,61	1,21	0,88
G (RNAasa)	277,5	250	0,8	1,51	1,87

Condicions: mostres dissoltes en Tris/HCl 0,1 M, 0,1 M en NaCl, pH 7,4.

Les relacions espectrals de la fracció A (no retin-  
guda) indiquen que es tracta de derivats amb més d'un nucleòsid  
marcador per molècula de proteïna. L'última fracció (G), tant  
per les dades de la TAULA 15, com per la força iònica d'elu-  
ció, és la RNAasa A no reaccionada. Els demés derivats presen-  
ten relacions espectrals similars a les dels derivats mono-  
substituïts de la reacció entre la RNAasa A i el Cl6-RMP (TAU-  
LA 1).

## E RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

El que cada fracció elueixi a diferent força iònica indica que, a l'ésser retinguts amb diferent força per la resina, la càrrega neta de cada fracció és diferent, el que demostra que el marcaatge ha tingut lloc en un punt diferent de la molècula enzimàtica en cada derivat.

Les diferents fraccions obtingudes van ésser dialitzades i liofilitzades. La quantitat de RNAasa A recuperada (fracció G), que no havia reaccionat, correspongué a un 2% de la quantitat inicial. La quantitat de fracció E obtinguda va correspondre a un 16,7% i la de la F a un 17%.

### III-8.1 REPURIFICACIÓ DE LES FRACCIONS E i F

Amb la finalitat d'ésser caracteritzades posteriorment, es va procedir a repurificar les fraccions E i F, mitjançant una cromatografia en CM-Sepharose CL-6B amb gradient mixt de força iònica i pH. Els perfils d'elució obtinguts es mostren en la Figura 28.

La repurificació de la fracció E mostra la presència d'una fracció majoritària (E) i d'una minoritària (E') que es eluïda més tard. La de la fracció F mostra també un derivat majoritari (F), però que en aquest cas es eluït mes tard, i d'un minoritari (F'). Cada fracció va ésser dialitzada, congelada i liofilitzada i es va caracteritzar per diversos mètodes.

#### III-8.1.a CARACTERITZACIÓ ESPECTROFOTOMÈTRICA DE LES FRACCIONS E, E', F i F'.

Les característiques espectrofotomètriques de les fraccions obtingudes, presentades en la TAULA 16, indiquen que aquestes fraccions són, molt probablement, derivats monosubstituïts. A més, per comparació amb les característiques espectrofotomètriques de la barreja equimolecular RNAasa A i 6-metilaminopurina ribòsid (TAULA 5), es pot concloure que, molt probablement, són derivats substituïts en els grups  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> i  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de lisines.

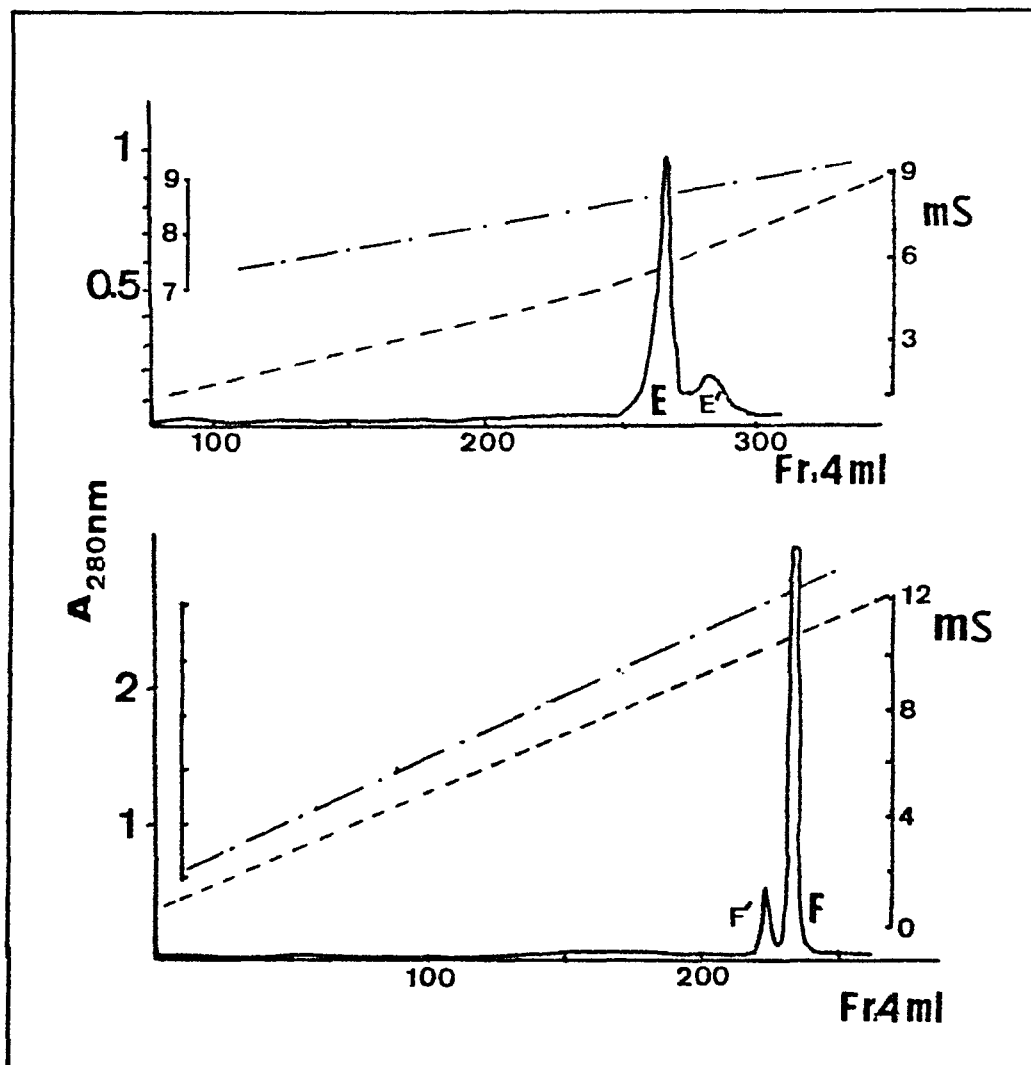


FIGURA-28

Separació dels derivats de la reacció RNAasa A - 6 Cloropurina ribosa. Perfil d'elució i gradient salí i de pH de la recromatografia en CM-Sepharosa CL-6B de les fraccions E (a) i F (b). Amortidor inicial: Tris/HCl 15 mM, pH 7,2. Gradient salí i de pH assolit amb l'amortidor Tris/HCl 0,2 M, pH 8,5.

TAULA 16 .-

CARACTERÍSTIQUES ESPECTROFOTOMÈTRICHES DE LES FRACCIONS OBTINGUES EN LA RECROMATOGRÀFIA.					
FRACCIÓ	$\lambda$ (nm)				
	MÀX	MÍN	A 250/A 260	A 270/A 260	A 280/A 260
E	272,5	247,5	0,65	1,3	1,08
E'	272,5	248,5	0,7	1,2	1,08
F	269	246	0,64	1,16	0,81
F'	272	247	0,7	1,22	1,02

Condicions: Tris/HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, pH 7,4.

### III-8.1.b ESPECTRES DE DIFERÈNCIA DE LES FRACCIONS E i F .

Realitzats segons la metodologia de l'apartat II-6.1, els espectres obtinguts es mostren en la Figura 29.

Els espectres de diferència dels derivats F' i E són molt similars al del 6-metilaminopurina ribòsid, però el del Derivat F és molt diferent, i en canvi molt semblant al del Derivat II (Figura 22).

Quedava clar que els Derivats F' i E eren derivats monosubstituïts en una lisina, però en canvi no s'explicava tant bé pel cas del Derivat II i del F, ja que hom sabia que el Derivat II estava modificat en l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1. Però si s'observa l'espectre de diferència àcida del 6-metilaminopurina emprat com a referència, es pot observar que els espectres de diferència dels Derivats II i F són similars al d'aquest compost model.

Per tractar d'explicar aquestes diferències d'espectre dels Derivats II i F, el primer que calia estudiar era les diferències d'espectre dels compostos model: 6-metilaminopurina i 6-metilaminopurina ribòsid, donat que ambdós compostos mos-

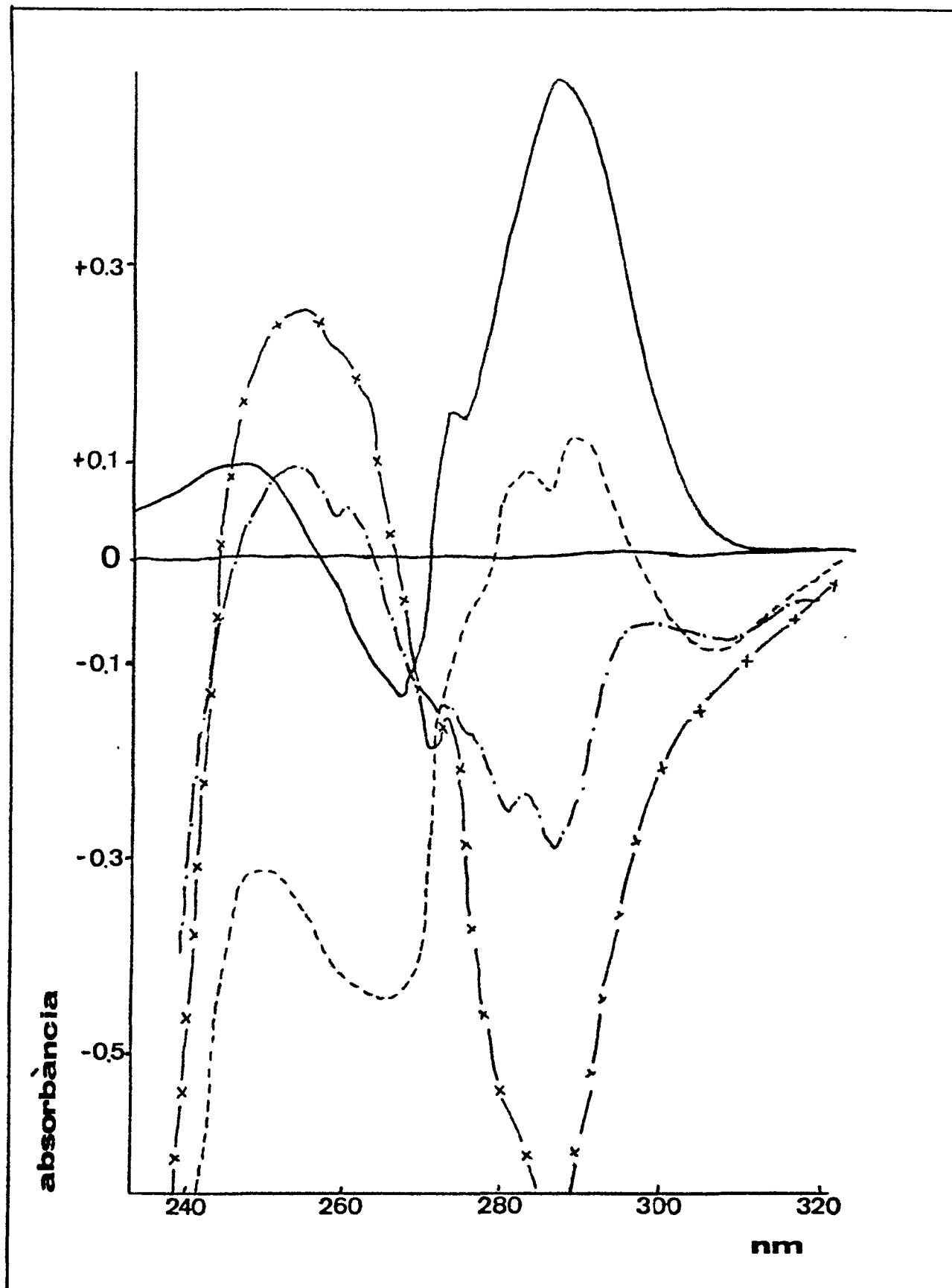


FIGURA-29

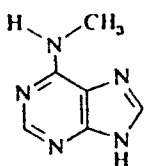
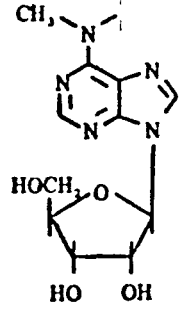
Espectres de diferència dels derivats: E (—x—x) F' (—·—·) F (-----) i del 6-metilaminopurina (————) originats per canvi de pH de neutra a àcid. Dissolucions 0,1 M de cada mostra en aigua, i la solució es porta a pH 7,0. pH inicial 7,0, pH final entre 0,6 i 1. 25 °C de temperatura.

[ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

traven una diferència d'espectre acusadament "diferent". El primer mostra un increment d'absorbància al voltant de 285 nm mentre que el segon mostra, en la mateixa zona, una disminució d'absorbància.

L'única diferència estructural entre ambdós és la presència o no de ribosa. La TAULA 17 mostra les característiques espectrofotomètriques d'ambdós compostos a diferents pH's.

TAULA 17 .-

CARACTERÍSTIQUES ESPECTROFOTOMÈTRIQUES DEL 6-METILAMINOPURINA i DEL 6-METILAMINOPURINA RIBOSID.										
6-metilaminopurina							M: 149,16			
							pK: 1 - 4,2/10			
pH	$\lambda$ Màx	$\lambda$ Mín	A230	A240	A250	A270	A280	A290	$\epsilon$	
1	267	232	0,22	0,31	0,64	1,06	0,7	0,32	15.300	
7	266	231	0,13	0,24	0,55	0,98	0,55	0,07	16.200	
13	273	231	0,77	0,39	0,55	1,48	1,19	0,25	15.900	
6-metilaminopurina ribosa							M: 281,27			
							pK: 4			
pH	$\lambda$ Màx	$\lambda$ Mín	A230	A240	A250	A270	A280	A290	$\epsilon$	
1	262	231	0,2	0,31	0,66	0,88	0,41	0,13	16.600	
7	266	229	0,17	0,22	0,57	1,09	0,68	0,24	15.900	
13	266	232	0,17	0,22	0,57	1,09	0,68	0,24	15.900	

## [ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

Pel que respecta al 6-metilaminopurina, al passar de pH 7,0 a pH 1,0, s'observa un clar augment d'absorbància en la zona de 280-290 nm, que es reflecteix en el seu espectre de diferència, donant lloc al primer pic.

Pel que respecta al 6-metilaminopurina ribòsid, observem en la mateixa zona, una clara disminució que indica la seva disminució d'absorbància donant lloc, doncs, a la diferència tant apreciable entre els espectres de diferència d'un i de l'altre.

Això podria induir-nos a pensar que la diferència entre els espectres de diferència àcida dels Derivats II i F respecte dels demés derivats fos també deguda a que el Derivat F hagués perdut la ribosa i el Derivat II la ribosa i el fosfat. Però aquest fet resulta difícil d'acceptar per quant els estudis per ressonància magnètica nuclear de protó de l'S-peptid II (PARÉS, 1977-1980 b) van demostrar la presència de ribosa. Per altre part, i tal com s'indicarà més endavant (apartat III-B.1.e.1), els espectres de ressonància magnètica nuclear del Derivat F també demostren la presència de ribosa en aquest derivat.

Resta per explicar la diferència d'espectre a l'ultraviolat tant apreciable observada per ambdós derivats.

Una possible explicació seria que a l'obtenir la diferència d'espectre, per adició de HCl, donat que l'enllaç nucleossídic és bastant làbil, dongués lloc a l'aparició de ribosa lliure. Però aquest fet resulta difícil d'acceptar per quan no s'observa la diferència d'espectre "anòmala" per als derivats en els que el marcatge ha tingut lloc en els  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de les lisines, ni en el cas del compost model 6-metilaminopurina ribosa.

Una altra possible explicació seria la influència que en la ionització del marcador podrien exercir els grups corresponents de la lisina, propers a la posició N-6 de la purina (4 metilens en el cas del marcador unit a l' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>, i l'enllaç peptídic en el cas del marcador unit en la posició  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>). Per tal de donar suport a aquesta hipòtesi es van cercar en la bibliografia diferències d'espectre àcides de compostos model el més semblants possible a l'estructura del marcador unit a l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub>, i a la posició  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> (Figura 30), tant amb sucre com sense, per veure si també presentaven aquest comportament anòmal.



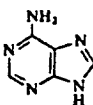
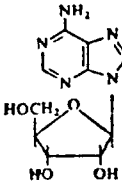
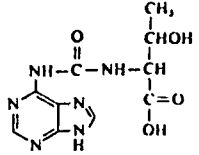
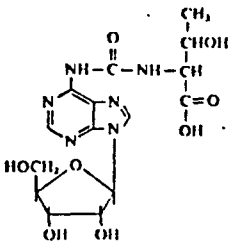
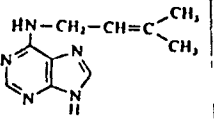
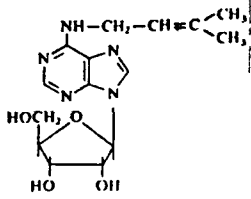


TAULA 18.-

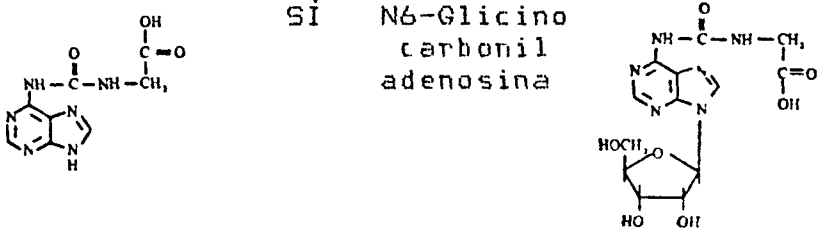
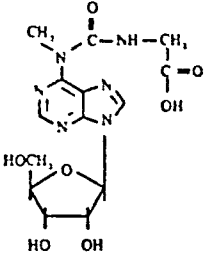
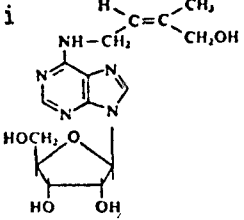
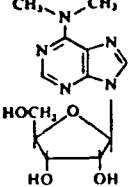
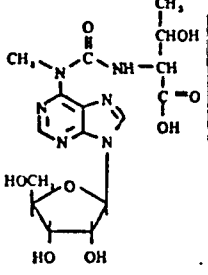
DIFERÈNCIA D'ESPECTRE ÀCIDA DE L'ADENINA i DIVERSOS COMPOSTOS SUSTITUÏTS EN L'N-6, COMPARATS AMB ELS ESPECTRES DE DIFERÈNCIA DELS RESPECTIUS RIBONUCLEÒSIDS

SÍ = Presenta una diferència d'espectre àcida similar a la de la 6-metilaminopurina (per a compostos que només tinguin la base), o a la del 6-metilaminopurina ribòsid (per als ribonucleòsids corresponents).

NO = No presenta la mateixa diferència d'espectre.

BASE	NUCLEÒSID
Adenina 	SÍ Adenosina  NO
N6-Treonino carbonil adenina 	SÍ N6-Treonino carbonil adenosina  NO
N6-Isopentiladenina 	SÍ N6-Isopentiladenosina  NO

[ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

BASE	NUCLEÒSID
N6-Glicino carbonil adenina	SÍ N6-Glicino carbonil adenosina NO 
	N6-metil-N6- glicinocarbo- niladenosina NO 
	N6-(4-hidroxi isopentenil) adenosina SÍ 
	N6-N6-dimetil adenosina SÍ 
	N6-metil-N6- treonino- carbonil adenosina SÍ 

## C RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

Les dades de la TAULA 18 han estat extretes del "Handbook of Biochemistry and Molecular Biology" 3rd Edition. Nucleic Acids Vol. 1, G. D. FASMAN. CRC Press (1975).

---

El fet de que el Derivat II, marcat a l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> (PARÉS, 1977), i el Derivat F presentin la mateixa diferència d'espectre a l'àcid suggereix que el Derivat F també estaria marcat pel nucleòsid en el grup  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>. Per tant, el Derivat F seria idèntic al Derivat II, però sense fosfat. Això ens permetria estudiar l'efecte del grup fosfat en les característiques del marcatge, per comparació de les propietats d'ambdós derivats.

Per tal de confirmar que el marcatge en el Derivat F havia tingut lloc en l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1, es va procedir a determinar l'aminoàcid N-terminal d'aquest derivat i d'altres derivats obtinguts, i a l'obtenció de l'S-pèptid F per a comprovar que el marcat havia tingut lloc en l'S-pèptid i, en tal cas, per a obtenir el seu espectre de ressonància magnètica nuclear.

### III-B.1.c DETERMINACIÓ DE L'AMINOÀCID N-TERMINAL DE LA RNAasa A i DELS DERIVATS F, F', E, X3 i X4.

La metodologia emprada és la descrita a l'apartat II-16. Els resultats estan representats en la Figura 31.

Observant la Figura 31 es pot veure que a la part superior de la placa de capa fina es situen les lisines bidansilades, i corresponentment, la lisina terminal de la RNAasa A bidansilada en l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> i en l' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>. En el procés de preparació del patró de lisina monodansilada (apartat II-16) s'ha emprat lisina amb ambdós grups NH<sub>2</sub> sense bloquejar. Donat que el Clorur de Dansil és molt reactiu, en la preparació de lisina monodansilada es produeix una certa quantitat de lisina bidansilada. Com es pot apreciar, el Derivat F no dóna taca en la zona de la lisina bidansilada, donant-la forta en la zona corresponent als monodansilats, amb un R<sub>f</sub> igual al de la taca corresponent a la lisina monodansilada. Això indica que la Lys-1 del Derivat F només s'ha monodansilat, el que implica que té l'altra grup NH<sub>2</sub> bloquejat, lògicament pel marcador. Es pot, per tant, afirmar que el marcatge ha tingut lloc en la Lys-1.

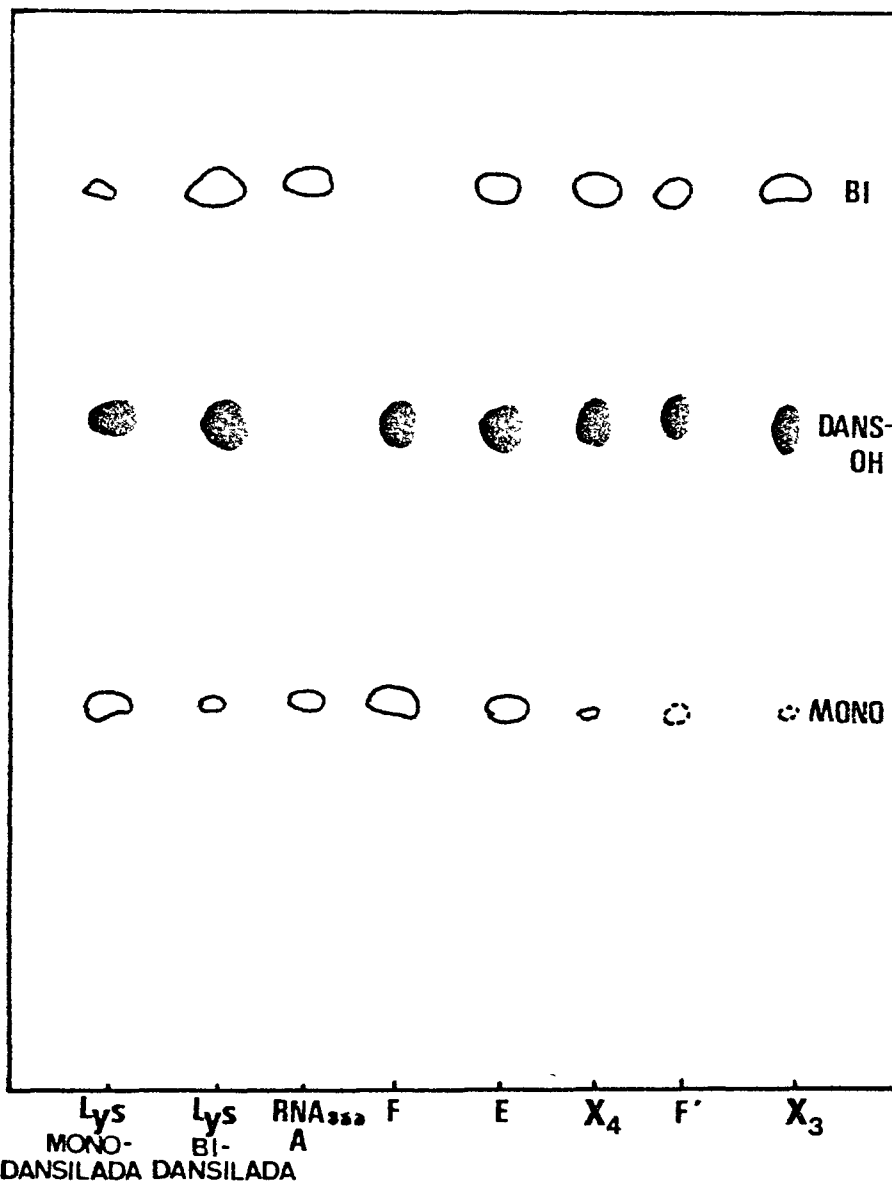


FIGURA 31

Determinació de l'aminoàcid N-terminal de la RNAasa A i dels Derivats F, E, X3, X4 i F'.

Condicions: 30 nmols de RNAasa A, o de Derivat. tractats amb SDS i amb Cl-DNS dissolt en NaHCO<sub>3</sub> 1M, pH 9,5. Posterior hidròlisi àcida amb HCl 6M. El sediment sec es dissol en 10  $\mu$ l d'acetona/acètic 3:2 i se sembren 4  $\mu$ l en placa de Silicagel.

Dissolvents: 1-Tolué, etanol, NH<sub>4</sub>OH 25%, H<sub>2</sub>O (15:50:2:2 en vol.) 2-Cloroform, n-butanol, acètic (45:30:11:25 en vol.)

En la mateixa placa se sembren patrons de lisina monodansilada i lisina bidansilada, preparats d'acord amb la metodologia esmentada a l'apartat II-16.

## [ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

Observant la Figura 31, a la part superior se situen les lisines bidansilades i s'aprecia que els derivats E, F', X3 i X4 donen una taca de mateix Rf que les lisines bidansilades, indicant que el marcatge no ha tingut lloc en la Lys-1. En resum, només el Derivat F està marcat en la Lys-1, mentre que tots els altres ho estan en altres grups de l'enzim.

### III-8.1.d OBTENCIÓ DE L'S-PÈPTID I S-PROTEÏNA DEL DERIVAT F.

El Derivat F va hidrolitzar-se amb subtilisina, donant lloc a l'S-pèptid F i a la S-proteïna F que van separar-se d'acord amb la metodologia de l'apartat II-5. La Figura 32 mostra el perfil d'elució obtingut.

Els espectres ultraviolats de les fraccions obtingudes estan representats a la Figura 33.

L'S-pèptid F absorbeix en la zona aromàtica, indicant que el marcatge ha tingut lloc en aquest extrem N-terminal, i a partir de 230 nm, el que indica la naturalesa peptídica del compost.

Paral·lelament, i de manera anàloga, es va obtenir l'S-pèptid del Derivat II i l'S-pèptid natural. Es va procedir a realitzar els espectres de diferència àcida de l'S-pèptid II i S-pèptid F que es mostren a la Figura 34.

Tal com s'aprecia a la Figura 34, ambdós espectres són molt similars entre sí, i molt similars als dels derivats sense (Figura 29). Aquest fet indica que la característica esmentada de la diferència d'espectre "anòmala" que presentaven els Derivats II i F es manté en els seus respectius S-pèptids. Això demostra que la molècula proteica no juga cap paper detectable en les diferències d'espectre obtingudes, i que és, bàsicament, el marcadore i el grup de marcat els que determinen aquestes característiques.

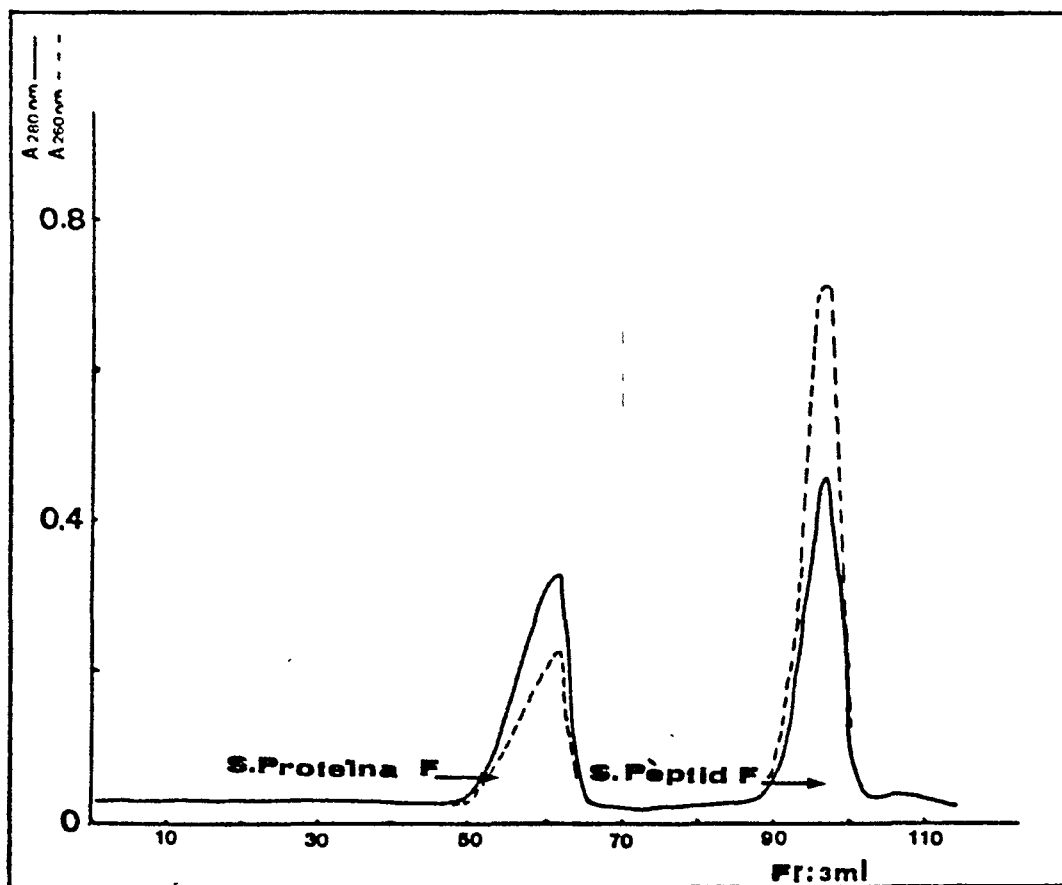


FIGURA-32

Perfil d'elució de la separació de l'S-pèptid i S-proteïna del Derivat F, en columna de BIO-GEL P6 equilibrada amb àcid acètic 0,2 M. Elució amb acètic 0,2 M.

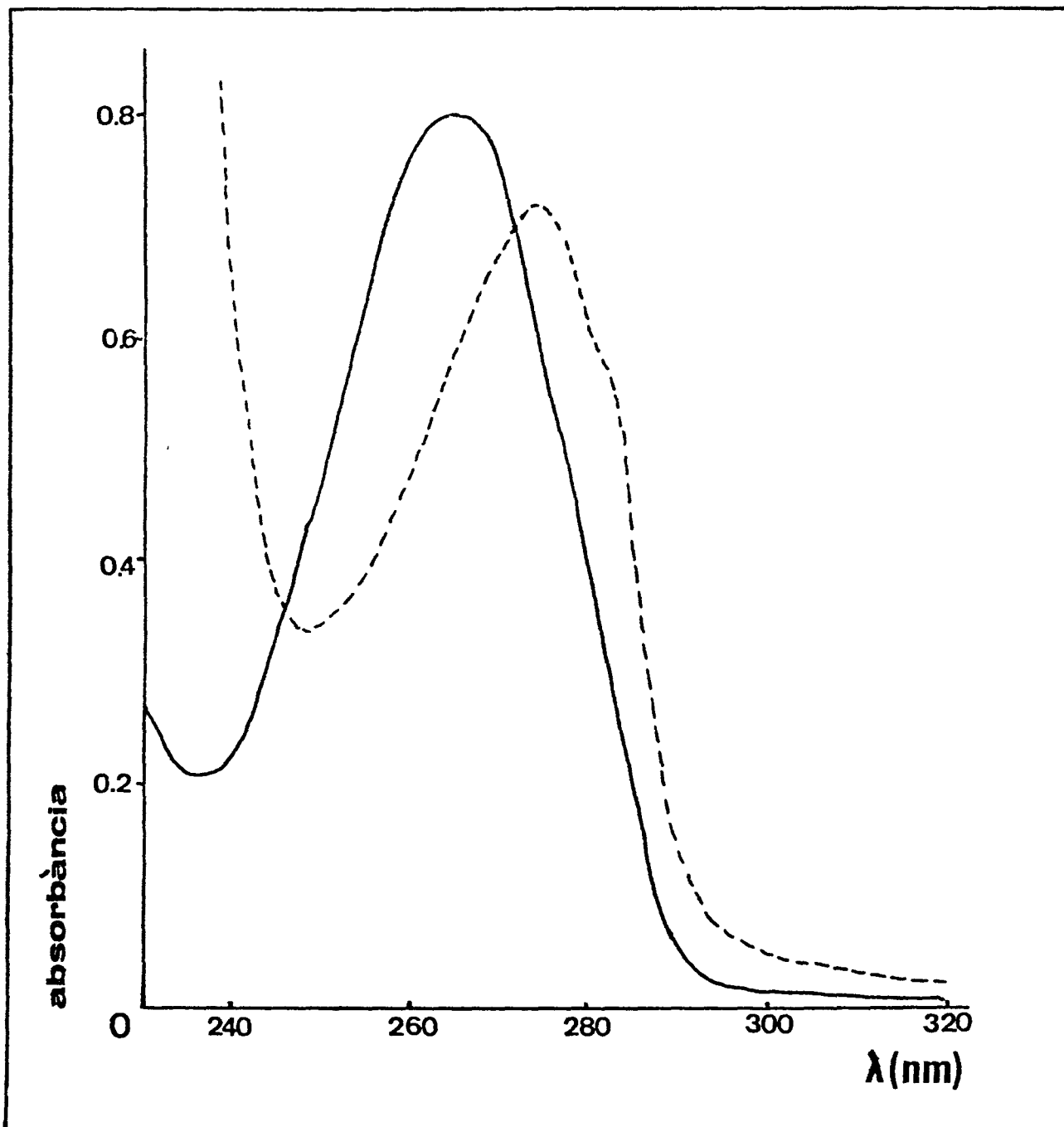


FIGURA-33

Espectres ultraviolats de la fracció 1 corresponent a la S-proteïna, i de la 2 corresponent a l'S-pèptid, del Derivat F. Mostres dissoltes en amortidor Tris/HCl 0,005 M, pH 8,0.

----- S-proteïna  
 ————— S-pèptid



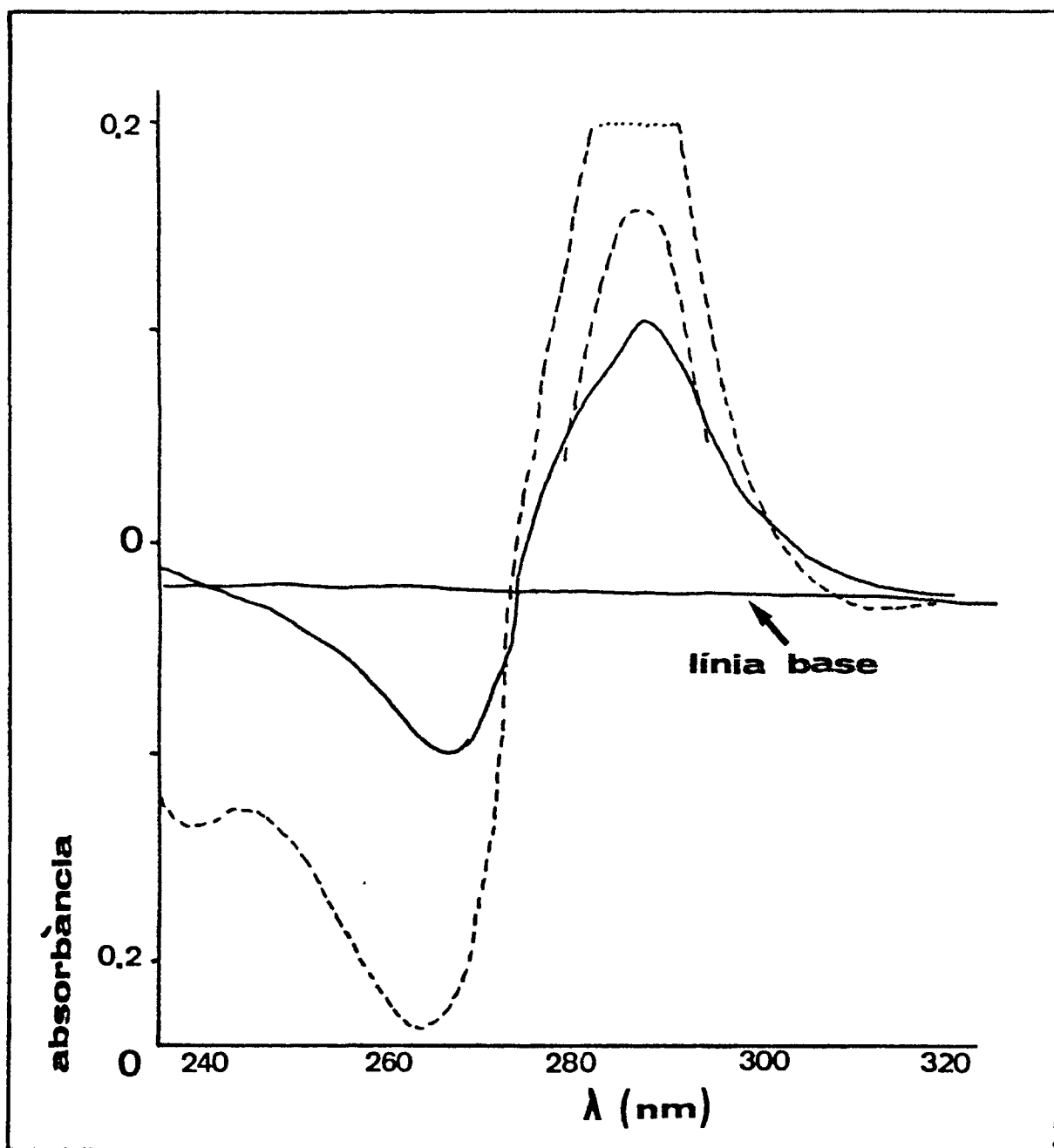


FIGURA-34

Espectres de diferència àcida dels S-pèptids II i F. Mateixes condicions que les indicades en el peu de la Figura 29.

## E RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

Una vegada obtinguts l'S-pèptid natural, l'S-pèptid II i l'S-pèptid F es van enregistrar els seus espectres per ressonància magnètica nuclear de protó (apartat següent) per a determinar:

- 1- si el marcador conserva la ribosa, tant en l'S-pèptid II com en l'S-pèptid F.
- 2- per a confirmar que el Derivat F havia sigut marcat en la Lys-1 i determinar quin dels dos grups amí ( $\alpha$  o  $\epsilon$ ) era el lloc de la reacció de la RNAasa amb el 6-cloropurina ribòsid.

### III-B.1.e RMN APLICADA A L'ESTUDI DE PROTEÏNES. ESTUDI PER RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR (RMN) DE PROTÓ DE L'S-PÈPTID NATURAL i DELS S-PÈPTIDS DELS DERIVATS II i F.

La ressonància magnètica nuclear és una tècnica molt emprada a l'anàlisi estructural de proteïnes i d'altres biomolècules (WUTHRICH, 1974, 1976). Entre les diferents modalitats d'aquesta tècnica, aquella que estudia els efectes de ressonància dels nuclis dels protons és i ha estat la més utilitzada, degut a la seva gran sensibilitat i a la gran abundància d'aquests nuclis a les biomolècules.

La posició i multiplicitat de les bandes d'absorció (ressonàncies) dels nuclis estudiats depèn de la naturalesa del grup químic en que es troben (el que permet la seva identificació) i de la situació conformacional d'aquest grup (informació conformacional).

Apareix com a nova tècnica en 1946 (BLOCH, i PURCELL et al.) i es va aplicar a l'estudi de les macromolècules per primera vegada en el 1957 quan SAUNDERS et al. obtingueren l'espectre de la RNAasa A. A partir de llavors ha anat adquirint una extraordinària importància en el camp de l'estudi de les proteïnes, gràcies a l'adveniment en el mercat de magnetos superconductors (NELSON & WEAVER, 1964), i de l'aplicació de la transformada de FOURIER (ERNST & ANDERSON, 1966).

III-8.1.e.1 RMN DE L'S-PÈPTID NATURAL, DE L'S-PÈPTID II i DE L'S-PÈPTID F.

L'S-pèptid natural va ésser analitzat per RMN per SILVERMAN et al., 1972; IHNAT, 1972; FINN et al., 1972 i GALLEGO et al., 1982, entre d'altres. L'S-pèptid natural i l'S-pèptid II han estat analitzats per RMN per PARÉS (1977; 1980 b).

La ressonància magnètica nuclear s'ha emprat en el present treball per a comprovar la presència de ribosa, tant en l'S-pèptid II com en l'S-pèptid F, i per localitzar l'NH<sub>2</sub> marcat de la Lys-1.

La preparació de mostres i tractament de dades s'han realitzat d'acord amb la metodologia de l'apartat II-18.

Les unitats de desplaçament químic emprades en tots els espectres van ésser parts per mil·lió (ppm) en l'escala  $\delta$ . El zero és la ressonància del 2,2-dimetil-2-silapenta-5-sulfonat sòdic (DSS).

L'S-pèptid natural, corresponent als 20 primers aminoàcids de la RNAasa A, conté 144 protons, 41 units a oxigen i nitrogen essent intercanviables amb el deuteri del dissolvent (D<sub>2</sub>O), mentre que els altres 103 donen lloc a l'espectre il·lustrat en la Figura 35. En la TAULA 19 s'assignen els protons que originen cadascun dels pics de l'espectre de l'S-pèptid natural a pD 3,0 (GALLEGO et al., 1982).

En el cas de tractar-se de grups ionitzables, donat que els nostres experiments es van realitzar a pH 7,0; 7,6 i 7,7, s'indica l'assignament a aquests pH's (TAULA 20).

La TAULA 20 mostra els grups ionitzables de l'S-pèptid natural, l'assignació dels seus protons i el seu pK.

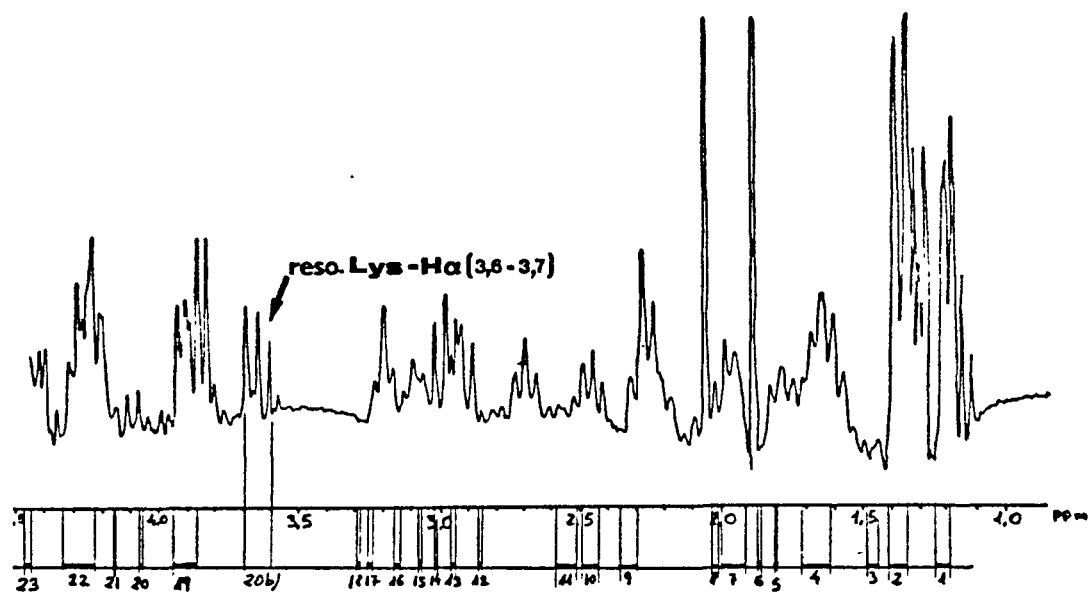
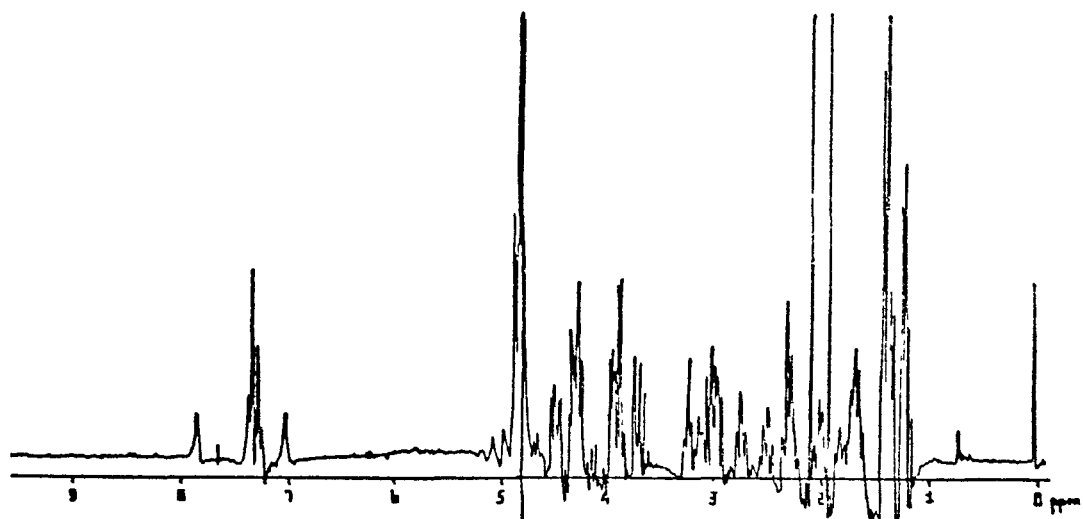


FIGURA-35

Espectre de ressonància magnètica nuclear de protó de l'S-pèptid natural. (5162 scans) (ressolució augmentada matemàticament d'acord amb l'apartat II-18).  
 A la part inferior es mostra l'espectre detallat entre 1 i 4,5 ppm.

[ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

TAULA 19 .-

ASSIGNACIÓ DELS PROTONS DE L'S-PÈPTID NATURAL				
BANDA	DESPLAÇAMENT QUÍMIC (a)	GRUP ASSIGNAT	RESIDU	NOMBRE DE PROTONS
1	1,212	CH <sub>3</sub>	Thr-17	3
	1,245	CH <sub>3</sub>	Thr-3	3
	1,250	H- $\gamma'$	Lys-7	1
2	1,360	H- $\gamma$	Lys-7	1
	1,374	CH <sub>3</sub>	Ala-6	3
	1,389	CH <sub>3</sub>	Ala-5	3
	1,398	CH <sub>3</sub>	Ala-19	3
	1,412	CH <sub>3</sub>	Ala-4	3
	---	CH <sub>3</sub>	Ala-20	3
3	1,442	H- $\gamma'$	Lys-1	1
	1,482	H- $\gamma$	Lys-1	1
4	1,624	H- $\delta$	Lys-7	1
	1,624	H- $\delta'$	Lys-7	1
	1,640	H- $\gamma'$	Arg-10	1
	1,667	H- $\beta'$	Lys-7	1
	1,699	H- $\gamma$	Arg-10	1
	1,715	H- $\delta$	Lys-1	1
	1,715	H- $\delta'$	Lys-1	1
	1,724	H- $\beta$	Lys-7	1
5	1,81	H- $\beta'$	Arg-10	1
6	1,880	H- $\beta'$	Lys-1	1

TAULA 19.- (continuació).

BANDA	DESPLAÇAMENT QUÍMIC (a)	GRUP ASSIGNAT	RESIDU	NOMBRE DE PROTONS
7	1,917	H- $\beta'$	Gln-11	1
	1,935	H- $\beta$	Arg-10	1
	1,949	H- $\beta$	Lys-1	1
	1,977	H- $\beta$	Gln-11	1
	1,983	H- $\beta'$	Glu-9	1
	1,994	H- $\beta'$	Glu-2	1
8	2,080	H- $\beta$	Glu-2	1
	2,084	H- $\beta$	Met-13	1
	2,084	CH <sub>3</sub>	Met-13	3
	2,121	H- $\beta$	Glu-9	1
9	2,297	H- $\gamma'$	Gln-11	1
	2,356	H- $\gamma$	Gln-11	1
10	2,429	H- $\gamma'$	Glu-9	1
	2,456	H- $\gamma$	Glu-9	1
	(2,27)(b)			
	2,481	H- $\gamma'$	Glu-2	1
	2,481	H- $\gamma$	Glu-2	1
(2,29)(b)				
11	2,512	H- $\gamma'$	Met-13	1
	2,578	H- $\gamma$	Met-13	1
12	2,839 (2,65-2,75)(b)	H- $\beta'$	Asp-14	1
13	2,933	H- $\epsilon'$	Lys-7	1
	2,933	H- $\epsilon$	Lys-7	1
	2,946	H- $\beta$	Asp-14	1

C RESULTATS I DISCUSSIÓ 1

TAULA 19.- (continuació).

BANDA	DESPLAÇAMENT QUÍMIC (a)	GRUP ASSIGNAT	RESIDU	NOMBRE DE PROTONS
14	3,008	H- $\epsilon'$	Lys-1	1
	3,008	H- $\epsilon$	Lys-1	1
15	3,061	H- $\beta'$	Phe-8	1
16	3,13	H- $\beta'$	His-12	1
	(3,10) (b) 3,159	H- $\beta$	Phe-8	1
17	3,224	H- $\delta'$	Arg-10	1
	3,224	H- $\delta$	Arg-10	1
18	3,227 (3,25) (b)	H- $\beta$	His-12	1
19	3,862	H- $\beta'$	Ser-15	1
	3,869	H- $\beta'$	Ser-16	1
	3,869	H- $\beta$	Ser-16	1
	3,890	H- $\beta'$	Ser-18	1
	3,930	H- $\beta$	Ser-15	1
	3,944	H- $\beta$	Ser-18	1
20	4,069 (3,6-3,7) (b) 3,56 (c)	H- $\alpha$	Lys-1	1
21	4,143	H- $\alpha$	Lys-7	1

[ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

TAULA 19.- (continuació).

BANDA	DESPLAÇAMENT QUÍMIC (a)	GRUP ASSIGNAT	RESIDU	NOMBRE DE PROTONS
22	---	H- $\alpha$	Ala-20	1
	4,220	H- $\alpha$	Ala-6	1
	4,231	H- $\alpha$	Arg-10	1
	4,238	H- $\alpha$	Gln-11	1
	4,238	H- $\alpha$	Ala-5	1
	4,267	H- $\alpha$	Glu-9	1
	4,276	H- $\alpha$	Ala-4	1
	4,292	H- $\beta$	Thr-3	1
	4,292	H- $\beta$	Thr-17	1
	4,311	H- $\alpha$	Ala-19	1
	4,330	H- $\alpha$	Thr-3	1
23	4,429	H- $\alpha$	Thr-17	1
	4,464	H- $\alpha$	Met-13	1
24	4,486	H- $\alpha$	Ser-16	1
	4,502	H- $\alpha$	Ser-15	1
	4,523	H- $\alpha$	Glu-2	1
	4,544	H- $\alpha$	Ser-18	1
	4,573	H- $\alpha$	Phe-8	1
25	4,651	H- $\alpha$	His-12	1
26	4,740	H- $\alpha$	Asp-14	1
27	7,255 (7,03) (b)	CH-4	His-12	1
28	de 7,2 a 7,4		Phe-8	5
29	8,589 (7,87) (b)	CH-2	His-12	1
TOTAL				= 103



TAULA 19.- (continuació).

- (a): Els desplaçaments químics són els assignats per GALLEGÓ et al. (1982) a pD 3,0.
- (b): Ressonància d'aquests grups en l'espectre de l'S-pèptid detectades en el nostre experiment a pD 7,4). Les variacions respecte a l'assignació de GALLEGÓ et al. (1982) són degudes a la diferència de pD.
- (c): A pH 7,62 BRADBURY et al. (1978) assigna com 3,56 per l'H- $\alpha$  de la Lys-1 modificada amb ftalil4-tiocarbamil en l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub>.

TAULA 20 .-

RESIDUS IONITZABLES DE L'S-PÈPTID NATURAL

AMINOÀCID	GRUP ASSIG.	( $\delta_{HA}$ ) ASSIG. a pD 3,0	( $\delta_{A^-}$ ) ASSIG. de la forma desprotonada	pKa
Lys-1	-CH $\alpha$	4,072	3,425	7,6
Lys-1	-CH <sub>2</sub> $\epsilon$	3,007	2,626	11
Lys-7	-CH <sub>2</sub> $\epsilon$	2,937	2,555	10,9
Glu-2	-CH <sub>2</sub> $\gamma$	2,516	2,296	4,3
Glu-9	-CH <sub>2</sub> $\gamma$	2,470	2,274	4,2
His-12	-C <sub>2</sub> H	8,590	7,662	6,8
	-C <sub>4</sub> H	7,253	6,915	6,9
	-CH $\beta$	3,272	3,087	6,8
	-CH $\beta'$	3,122	3,000	6,8
Arg-10	-CH <sub>2</sub> $\gamma$	3,227	<3,094	>12,8
Asp-14	-CH $\beta$	3,003	2,763	3,8
	-CH $\beta'$	2,888	2,667	3,8

(GALLEGÓ et al., 1982)

## [ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

### RMN DE L'S-PÈPTID II

L'espectre està il·lustrat en la Figura 36. En la zona aromàtica s'identifiquen clarament les ressonàncies dels protons corresponents al marcador, per comparació amb l'espectre de l'S-pèptid natural i els espectres de l'S-pèptid natural i de l'S-pèptid II mostrats per PARÉS (1977), i PARÉS et al. (1980 b).

Així, a 6,1 i 6,2 ppm s'assignen els 2 doblets de l'H-1' de la ribosa. Els demés protons del sucre ressonen a camps superiors i els senyals queden superposats amb els corresponents als protons del pèptid, o eliminats amb el senyal del D<sub>2</sub>O. A 8,3 ppm s'assigna el senyal del doblet de l'H-2 de l'anell purínic i a 8,6 ppm l'H-8.

El desdoblament de les ressonàncies dels protons H-1' i H-2 va ésser explicat per PARÉS (1977) i PARÉS et al. (1980 b) per la coexistència de dues formes de marcador, nucleòsid i nucleòtid amb un 25% i 75% respectivament.

Per comparació dels espectres de RMN del 6-metilamino-purina ribòsid i el de l'S-pèptid natural amb el de l'S-pèptid II es va concloure que el marcatge havia tingut lloc en l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1 (PARÉS, 1977).

### RMN DE L'S-PÈPTID F.

L'espectre està il·lustrat en la Figura 37. En la zona aromàtica s'identifiquen clarament les ressonàncies dels protons corresponents al marcador, particularment a l'H-1' (de 6 a 6,1 ppm) de la ribosa, el que indica clarament, tant en aquest cas com en el de l'S-pèptid II, la presència de la ribosa, però que podria estar en forma lliure:

- L'espectre de ressonància magnètica nuclear de protó de la ribosa lliure, en D<sub>2</sub>O mostra que l'H-1' ressona a 5,1 ppm quan el sucre presenta la conformació piranòsica (LEMIEUX & STEVENS, 1966), i a 4,7 ppm en la furanòsica (RUDRUM & SHAW, 1965) emprant DSS com a referència. Donat que en els nucleòsids i nucleòtids adopten la forma furanòsica, l'espectre de la 5-D-metil-D-ribosa, amb la forma furanòsica, mostra que l'H-1' ressona a 5,4-5,51 ppm (LEMIEUX, 1966), respec-

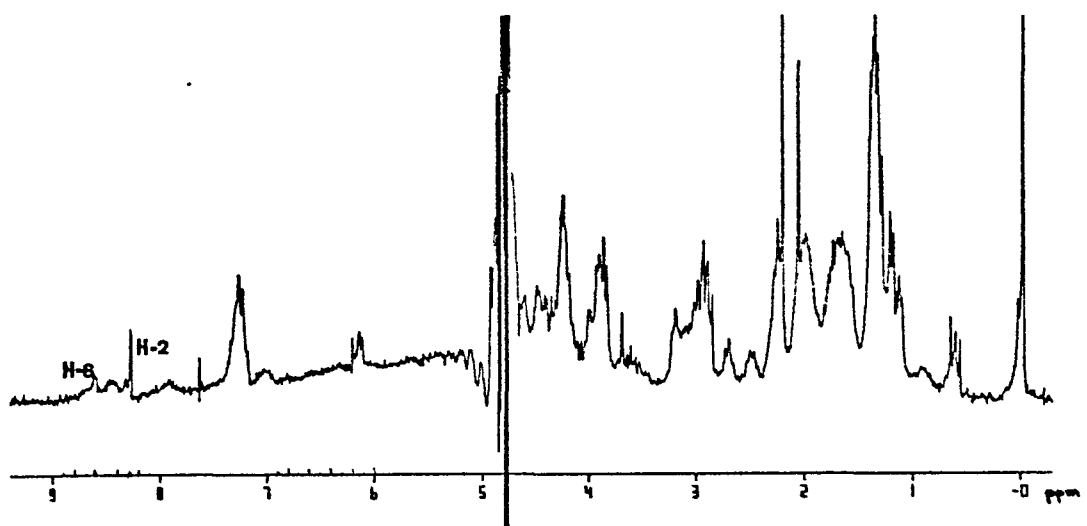


FIGURA-36

Espectre de ressonància magnètica nuclear de protó de l'S-pèp-  
tid del Derivat II (5100 scans).

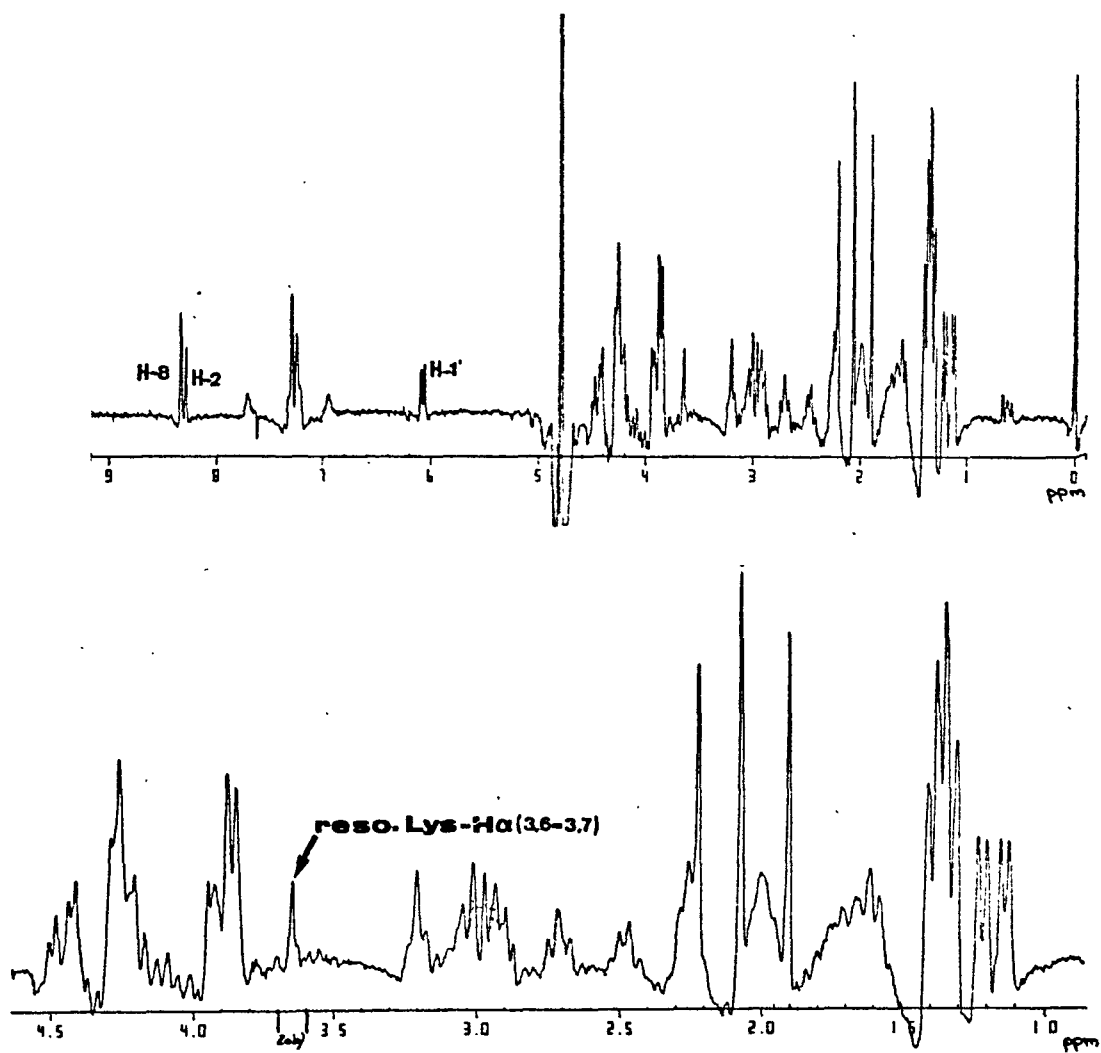


FIGURA-37

Espectre de ressonància magnètica nuclear de protó de l'S-peptid del Derivat II (7024 scans). A la part inferior es mostra l'espectre ampliat entre 1 i 4,5 ppm.

## [ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

ta de TMS (tetrametilsila) com a referència. Per a poder comparar aquests desplaçaments químics ( $\delta$ ) amb les dades d'en RUDRUM amb DSS com a referència externa, cal restar dels valors de  $\delta$ , obtinguts amb TMS, 0,47 ppm (WUTHRICH, 1976). Si restem 0,47 ppm a 5,4 i 5,51 ppm, ens queden uns valors de 4,93 i 5,04 ppm similars als obtinguts per en RUDRUM & SHAW (1965).

- L'espectre de ressonància magnètica de protó, amb D<sub>2</sub>O de l'adenosina indica que l'H-1' de la ribosa ressona a 6,04 ppm (FOLLMANN & GREMELS, 1974).
- L'espectre del 5'-AMP indica que l'H-1' ressona a 6,03 -6,06 ppm (DAVIES & DANYLUK, 1974), i al voltant de 6,115 ppm segons SON & CHACHATY (1973), emprant DSS com a referència. Emprant TMS, IKEHARA et al. (1972) troben un valor de 6,31 ppm, que restant-li 0,47 ppm dona un valor de 5,84 ppm.
- L'espectre de la N6-metiladenilil-uridina, emprant DSS com a referència, mostra que l'H-1' de la ribosa del nucleòsid adenílic, ressona a 6,0 ppm (ALTONA et al., 1974).
- L'espectre del 6-metilaminopurina ribòsid (PARÉS, 1977) indica que l'H-1' ressona a 6,37 ppm, emprant DSS com a referència. Però el senyal corresponent als protons de l'aigua residual està a 5,15 ppm mentre que en els espectres obtinguts en el nostre treball, aquests protons ressonen a 4,8 ppm, essent doncs 0,35 ppm la diferència. Restant aquest valor a 6,37 ppm ens dona un valor de 6,02 completament coincident amb l'esperat.

Totes les dades esmentades indiquen que quan el sucre està unit covalentment a l'adenina, adoptant la forma furanòsica, el protó H-1' ressona sobre els 6,0 ppm, mentre que en el sucre lliure ressona a uns 5,0 ppm.

Si en el cas de l'S-pèptid II i de l'S-Pèptid F el protó H-1' ressona sobre els 6,0 ppm, això significa que la ribosa està unida covalentment a la base purínica. Els espectres d'ambdós pèptids mostren els següents valors:

DESPLAÇAMENT QUÍMIC DE L'H-1' (en ppm)		
	1er doblet	2nd doblet
S-pèptid II	6,12 - 6,14 6,12 - 6,15 (*)	6,2
S-pèptid F	6,06 - 6,1	---

(\*): dades de PARÉS (1977)

Així doncs, les dades de ressonància magnètica nuclear indiquen que la ribosa resta unida covalentment a la base, tant en l'S-pèptid II com en l'S-pèptid F.

Continuant observant l'espectre de l'S-pèptid F, a més de l'H-1', en la zona aromàtica s'identifiquen les ressonàncies de l'H-2 (a 8,3 ppm) i de l'H-8 (a 8,31 ppm) de l'anell purínic.

Cal assenyalar, pel que fa referència a aquests tres pics que:

- el corresponent a l'H-1' no es desdobla en dos dobles, com era el cas del Derivat II, sinó en un de sol degut al protó veí H-2. Això està d'acord amb la existència d'una forma de marcador, el nucleòsid. En l'espectre del Derivat II, el doble doblet de l'H-1' s'interpretava per la coexistència de dues formes de marcador: nucleòsid i nucleòtid.
- els corresponents als protons H-2 i H-8 estan més junts en l'espectre del Derivat F ( $\Delta\delta = 0,04$ ) que en l'espectre del Derivat II ( $\Delta\delta = 0,35$ ). Això està d'acord amb TS'O (1974), que va demostrar que el desplaçament de la ressonància de l'H-8 a valors menors de camp era deguda a la presència del grup fosfat en la posició 5' de la ribosa. Això provocaria la interacció directa del fosfat amb l'H-8 de l'anell purínic i la càrrega negativa del primer

polaritzaria l'enllaç (C-8)-H provocant el desplaçament observat. En canvi, resten molt junts en els nucleòsids i també en l'espectre del 6-metilaminopurina ribòsid (PARÉS, 1977) (8,5 ppm per l'H-2 i 8,6 ppm per l'H-8). No s'observa desdoblament del protó H-2, contràriament al que es detecta en l'espectre del Derivat II. Aquest fet es pot interpretar de la mateixa manera que l'absència de desdoblament del senyal de l'H-1'.

Quedaria per suposar la coexistència de dues formes de marcador, amb i sense sucre, però això implicaria un desdoblament d'ambdues ressonàncies, corresponent a l'H-8 i a l'H-2, segons PARÉS (1977) i TS'Ó (1969), que serien de 0,16 ppm per l'H-2 i 0,23 ppm per l'H-8. Aquest desdoblament no s'observa, indicant la absència de molècules marcades només amb la base.

### III-B.1.e.2 ESTUDI COMPARATIU DELS ESPECTRES DE L'S-PÈPTID NATURAL I DE L'S-PÈPTID F

#### DETERMINACIÓ DEL SETI D'UNIÓ DEL MARCADOR

Per tal de determinar el seti d'unió del marcador a la molècula enzimàtica, es van seguir els mateixos raonaments que els emprats per PARÉS, raonaments que van rebre suport posteriorment amb l'assignació de l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1 portada a terme per GALLEGU et al. (1982).

En comparació amb l'espectre de l'S-pèptid natural, l'S-pèptid F presenta les següents diferències (Figura 38):

- Diferències en la banda 1 (entre 1,2 i 1,25 ppm)
- Diferències en la banda 2 (entre 1,36 i 1,41 ppm)
- Diferències en la banda 3 (entre 1,44 i 1,485 ppm)
- Diferències en la banda 5 (a 1,8 ppm)
- Diferències en la banda 7 (entre 1,9 i 2,0 ppm)

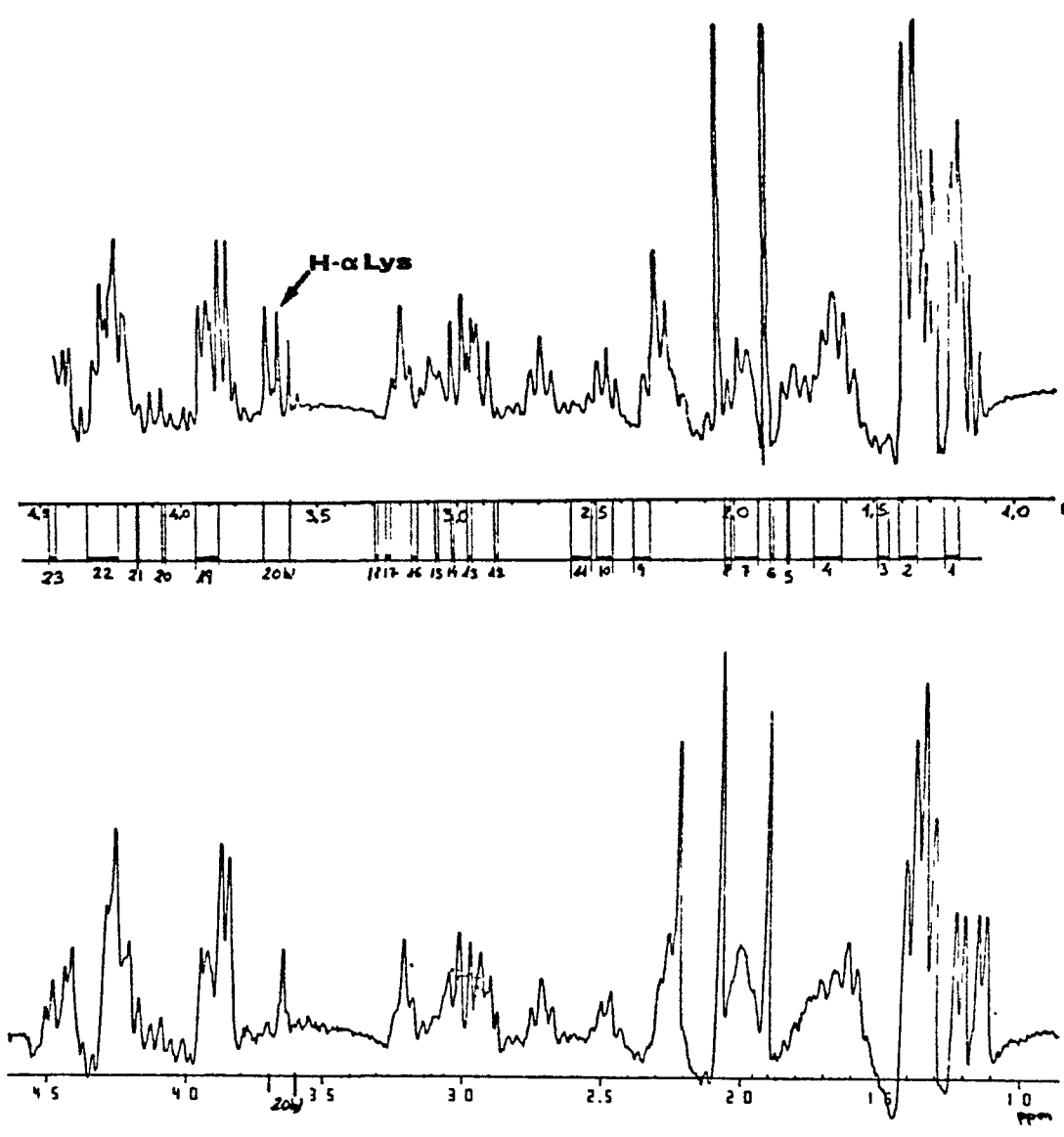


FIGURA-38

Comparació dels espectres de RMN de protó dels S-pèptid natural (part superior) i de l'S-pèptid del Derivat F (part inferior).



## [ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

- Diferències en la banda 8 (entre 2,0 i 2,12 ppm)
- Diferències en la banda 13 i 14 (entre 2,93 i 3,01 ppm)
- Diferències en la banda 18 (a 3,25 ppm)
- Diferències en la banda 20 (a 3,6-3,7 ppm)
- Diferències en la banda 22 (entre 4,22 i 4,33 ppm)
- Diferències en la banda 27 (a 7,03 ppm)
- Diferències en la banda 28 (entre 7,2 i 7,4 ppm)
- Diferències en la banda 29 (a 7,87 ppm)

i, evidentment, les diferències ja esmentades degudes a la presència del marcador (protons H-1' H-2 i H-8 de la ribosa).

Aquestes variacions solament poden ésser degudes a les tres úniques diferències existents entre ambdues mostres, l'S-pèptid natural per un costat i els S-pèptids F i II per l'altra:

- al pH (7 en front de 7,6 i 7,7)
- les diferents quantitats emprades (apartat II-18)
- i la presència del marcador, tant en l'S-pèptid F com en l'S-pèptid II

Les diferències en la banda 1 i 22 (corresponents als metils de la Thr-3 i 17, i als protons H- $\alpha$  i H- $\beta$  de la Thr-3) poden explicar-se suposant una interacció entre el metil i la base purínica del marcador que provocaria un apantallament (BOVEY, 1969) donant com a resultat un desdoblament d'aquesta banda en dos doblets, un corresponent a la Thr-17 (a 1,212 ppm) i l'altra a la Thr-3, que ressona a camps més alts, a 1,15 ppm, degut a l'apantallament esmentat. Aquest desdoblament també s'observa en el cas en que el marcador sigui un nucleòtid (Figura 36 i PARES, 1980 b).

## [ RESULTATS I DISCUSSIO ]

Les diferències en les bandes 3-7-13-14 i 20 (corresponents als protons H- $\gamma$  i H- $\delta$ ; H- $\beta$ ; H- $\epsilon$  i H- $\zeta$ ; i l'H- $\alpha$  de la Lys-1 s'explicarien per la presència del marcador unit a la Lys-1.

- La presència del marcador unit a un  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> provocaria un desplaçament de la ressonància de l' $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> cap a valors menors (bandes 13 i 14). El mateix efecte es produeix en el compost model 6-metilaminopurina ribòsid en el que el metil ressona a 3,4 ppm i consegüentment, si l' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> estigués modificat, pel que respecta a l'S-peptid F (i al II), també ressonaria en aquesta zona. Una banda de ressonància amb aquest desplaçament estaria perfectament separada de la banda corresponent a l' $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> no modificada. Aquesta nova ressonància, als voltants de 3,4 ppm, no s'observa en l'espectre de l'S-peptid F (i de l'S-peptid II), indicant que l' $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> no és el grup modificat.
- El protó H- $\alpha$  de la Lys-1 (banda 20), presenta un desplaçament químic de 4,069 ppm, en l'espectre de l'S-peptid natural (Figura 35), a pD 3,0 (GALLEGO et al. 1982, TAULA 19). Aquesta diferència és deguda a que està a prop d'un grup ionitzable i l'experiment s'ha portat a terme a un pH entre 7 i 7,7 (TAULA 20, a pD 3 ressona a 4,069 ppm i la forma desprotonada a 3,425 ppm). En els nostres experiments, portats a terme a pH 7,0, aquest protó ressona a 3,6-3,7 ppm pel cas de l'S-peptid natural (Figures 35 i 38-banda 20 b). En l'espectre de l'S-peptid F, a pH 7,6, també ressona a 3,6 i 3,7 ppm (Figures 37 i 38). BRADBURY et al. (1978), a pH 7,62, assigna el pic observat a 3,56 ppm com el corresponent a aquest protó. Comparant ambdós pics (Figura 38, banda 20 b), s'observa que:
  - la banda 20 b) presenta tres pics en l'espectre de l'S-peptid natural, molt similars als que presenta la banda 20 en l'espectre de GALLEGO et al. (1982).
  - En l'espectre de l'S-peptid F, la banda 20 b) presenta tan sols un pic.

## [ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

La diferència observada es molt acusada i només pot ésser deguda a la presència del marcador unit a l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1. Aquesta diferència també es pot observar en els espectres realitzats per PARÉS (1977) i PARÉS et al. (1980 b), emprant com a marcador el CL6-RMP.

- Les diferències observades en les bandes 7 i 8 (corresponents als protons H- $\beta'$  i H- $\beta$  del Glu-2) són explicables per la proximitat del marcador al Glu-2 i un possible corriment de la ressonància del proto H- $\beta$  de la Lys-1.
- Les diferències observades en les bandes 18, 27 i 29 (corresponents als protons H- $\beta$  CH-4 i CH-2 de la His-12) són degudes als diferents pH als que s'han dut a terme els espectres de l'S-pèptid natural i de l'S-pèptid F.
- La diferència en la banda 28 (corresponent als protons de l'anell aromàtic de la Phe-8) són degudes, bàsicament, a una major resolució en el cas de l'S-pèptid natural, deguda, probablement, a haver emprat el doble de quantitat de mostra d'aquest pel que respecta a l'S-pèptid F.

## [ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

### III-8.1.f DETERMINACIÓ DEL COEFICIENT D'EXTINCIÓ MOLAR ( $\epsilon$ ) DELS DERIVATS F i E.

D'acord amb la metodologia de la secció II-14 es van obtenir els següents valors:

$$F: \epsilon \text{ a } 269 \text{ nm} = 22.200$$

$$E: \epsilon \text{ a } 272,5 \text{ nm} = 22.450$$

### III-8.1.g CARACTERITZACIÓ CINÈTICA DELS DERIVATS F, E i II.

Es determina l'activitat d'aquests derivats en front de 2',3' Cp del poli-C, RNA i dels dinucleòsid monofosfat: CpG CpA, CpU i CpC (d'acord amb la metodologia de l'apartat II-6.2) respecta de l'activitat de la RNAasa A recuperada de la reacció amb 6-cloropurina ribosa. Aquestes activitats venen representades en percentatges en la TAULA 20:

TAULA 21 .-

ACTIVITATS DELS DERIVATS F, E i II, EN FRONT DE DIFERENTS SUBSTRATS

SUBSTRAT	DERIVAT F	DERIVAT E	DERIVAT II
2',3' Cp (43 mM)	100%	50%	88%
RNA (0,1 mg/ml)	160%	22%	40%
Poli-C (0,1 mg/ml)	120%	100%	37%
Poli-C (1 mg/ml)	125%	50%	74%
CpG (0,1 mM)	100%	75%	68%
CpA (0,2 mM)	78%	78%	63%
CpC (0,1 mM)	175%	100%	70%
CpU (0,1 mM)	125%	70%	70%

L'activitat s'expressa en percentatges respecte de l'activitat de la RNAasa A.

## [ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

Les dades de la Taula 21 indiquen que en cap dels derivats es perd totalment l'activitat, lo qual indica que no ha estat modificat cap residu catalític essencial.

Front del 2',3' Cp, el Derivat F conserva el 100% d'activitat mentre que l'E conserva tant sols un 50%.

Front de substrats d'alt pes molecular, com l'RNA i el poli-C, s'observa una clara activació per part del Derivat F. L'activitat de l'E decreix en front de l'RNA, es manté idèntica a la de la RNAasa A en front de poli-C 0,1 mg/ml, i decreix a l'augmentar la concentració d'aquest substrat.

Front dels dinucleòsids monofosfat, el Derivat F continua essent més actiu (excepte per al CpA). L'activitat del Derivat E decreix excepte pel CpC, presentant un comportament similar que front del poli-C 0,1 mg/ml.

La major activitat observada del Derivat F front de substrats d'alt pes molecular queda reflectida en l'estudi de les seves característiques cinètiques en front de l'RNA (corba de velocitat inicial per a la hidròlisi de diferents concentracions de substrat)(Figura 39).

### III-0.1.9.1. DETERMINACIÓ DE LES CONSTANTS CINÈTIQUES DE LA HIDRÒLISI DEL 2',3' Cp i RNA CATALITZADES PELS DERIVATS F i E.

Es va emprar la metodologia descrita a l'apartat II-6.3 i II-6.4. En la Taula 22 venen indicats els valors de les constants cinètiques  $K_m$  i  $k_{cat}$  en front de 2',3' Cp com a substrat. Les dades de la Taula 22 indiquen:

- a) pel que respecta al Derivat F, comparat amb l'enzim natural, tant la  $K_m$  com la  $k_{cat}$  no han sofert cap variació, indicant que el marcatge no afecta a cap d'aquests paràmetres en emprar com a substrat el 2',3' Cp.

## C RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

Pel que respecta al Derivat F comparat amb el Derivat II (TAULA 23), ambdós presenten Km similar, indicant una afinitat semblant pel substrat i semblant a la de l'enzim natural.

Per tant, ambdós derivats presenten una afinitat similar pel substrat de baix pes molecular, mentre que l'eficiència catalítica (Kcat/Km) es veu disminuïda en un 30% quan el marcador presenta el grup fosfat. La qual cosa indica que seria precisament aquest grup l'únic responsable de les variacions cinètiques observades. El fosfat del marcador no dificultaria la fixació del substrat de baix pes molecular, però determinaria una inhibició no-competitiva.

TAULA 22 .-

CONSTANTS CINÈTIQUES DELS DERIVATS F i E, EMPRANT 2',3' Cp COM A SUBSTRAT				
Mètode de càlcul:		RNAasa A	DERIVAT F	DERIVAT E
LUFFWEAVER- BURK	Km:	0,539(+0,5)mM	0,543(+0,9)mM	2(+1)mM
	kcat	53,5±0,3 min	51±7,4 min	53,7±6,6 min
EADIE- HOPESTE	Km:	0,51(+0,003)mM	0,52(+0,007)mM	1,86(+0,07)mM
	kcat	50,3±0,4 min	49,6±4 min	54,8±2,2 min
CURNISH- BLVDEN	Km:	0,55(+0,06)mM	0,567(+0,1)mM	2,23(+0,32)mM
	Kcat	52,2±0,1 min	50,2±3,6 min	51,2±1,3 min
Condicions: pH 7,4, I = 0,1 M en Tris/HCl, 0,1 M NaCl, t= 25°C				

TAULA 23 .-

COMPARACIÓ DE LES CONSTANTIS CINÈTIQUES,  $K_m$  i  $k_{cat}$  DELS DERIVATS II i F, EMPRANT 2',3' Cp COM A SUBSTRAT

Metode de càlcul		DERIVAT II	DERIVAT F
LINeweaver-BURK	$K_m$	0,743 (+0,9)mM	0,543 (+0,9)mM
	$k_{cat}$	46,3±10 min	51±7,4 min
LADIE-HOFSTEE	$K_m$	0,533 (±0,006)mM	0,52 (±0,007)mM
	$k_{cat}$	37,5±3 min	49,6±4 min
CORNFISH-BOWDEN	$K_m$	0,62 (+0,7)mM	0,567 (±0,1)mM
	$k_{cat}$	31,3±4,2 min	50,2±3,6 min

- b) pel que respecta al Derivat E, s'observa que disminueix un 75% l'afinitat del Derivat pel substrat (major  $K_m$ ), el que podria indicar que el marcador ofereix un impediment de tipus estèric a la interacció derivat-substrat. L'eficiència catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) també ha disminuït considerablement (75%), però no la  $k_{cat}$  que es manté idèntica a la de la RNAasa A.

Emprant RNA com a substrat, i d'acord amb l'esmentat per al Derivat X4 (apartat III 6.1.a.5), s'han dut a terme les representacions directes de la velocitat inicial en front de la concentració de substrat i la representació dels dobles recíprocs (LINeweaver & BURK, 1934). La figura 39 presenta aquestes gràfiques per als quatre casos RNAasa A, Derivat II, Derivat F i Derivat E.

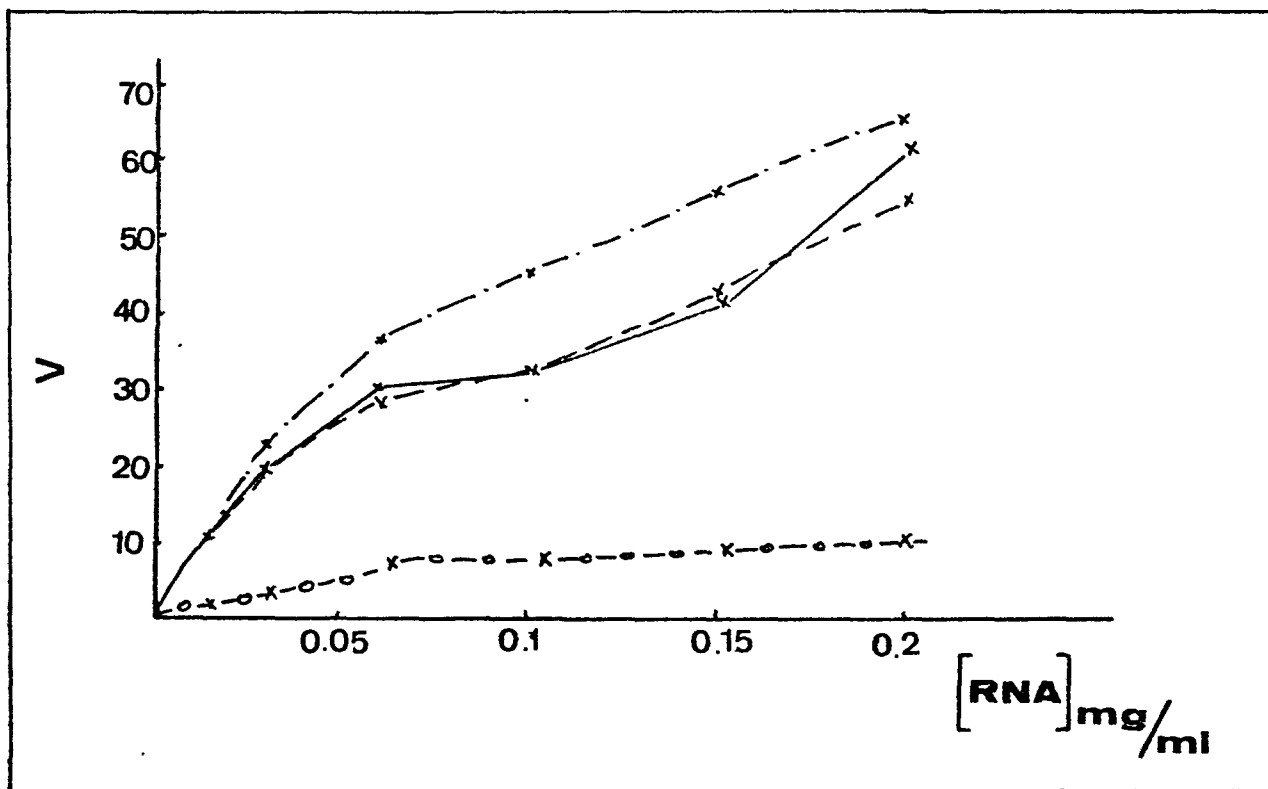


FIGURA-39 a)

Representació dels valors de la velocitat inicial per a l'hidròlisi de diferents concentracions de RNA per:

RNAasa A      —————  
 Derivat II    - - - - -  
 Derivat F    - . . . . -  
 Derivat E    - o - o - o -



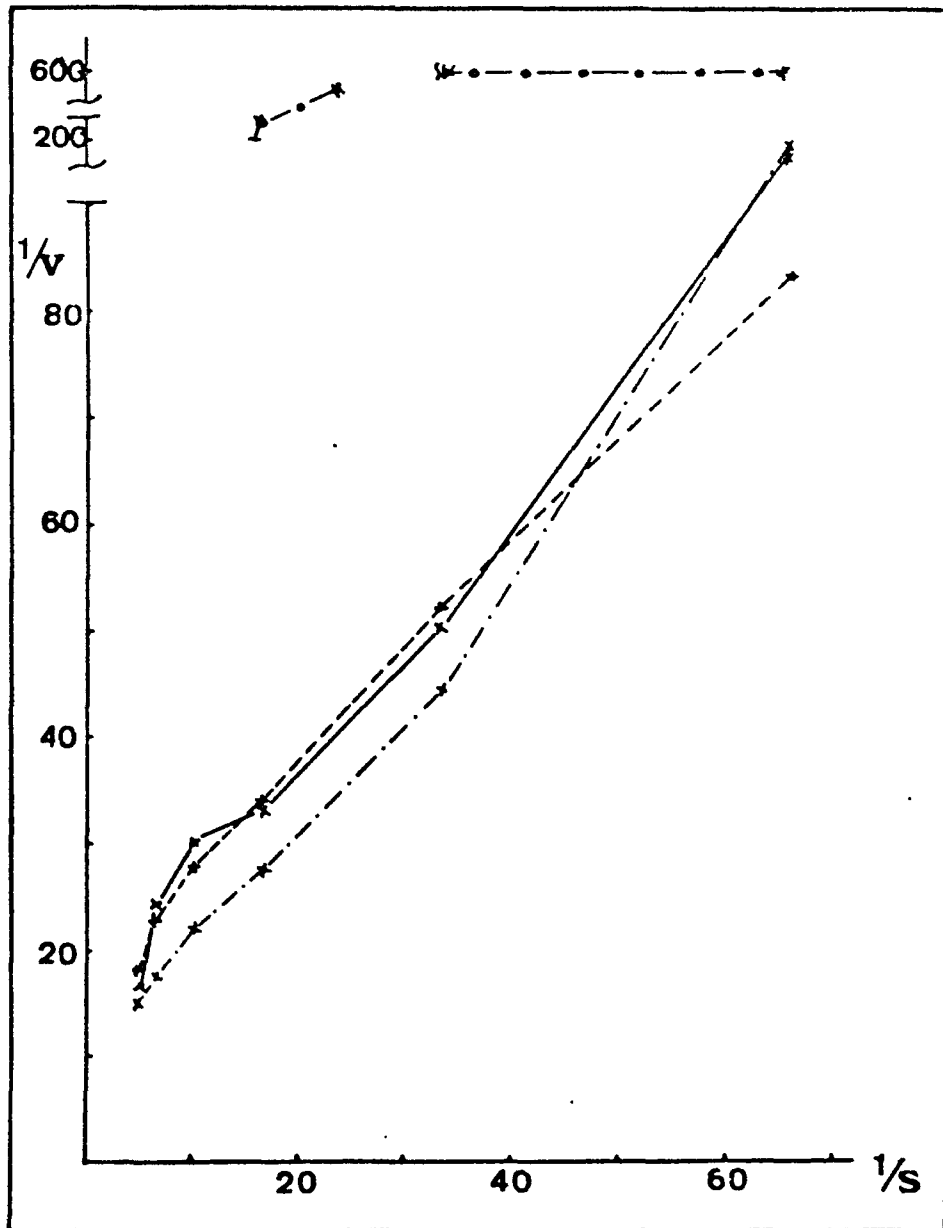


FIGURA-39 b)

Representació dels dobles recíprocs

RNAasa A —————  
 Derivat II - - - - -  
 Derivat F - · - · -  
 Derivat E - o - o - o -

Condicions: acetat sòdic/HCl 0,2 M pH 5,5, 25 °C. RNA Comercial (Sigma München, West Germany).

## C RESULTATS I DISCUSSIÓ I

La representació de la velocitat inicial front de la concentració de substrat mostra unes desviacions en la hiperbolicitat similars a les que presenta la RNAasa A nativa front l'RNA. Aquesta falta d'hiperbolicitat es reflecteix, evidentment, en la representació dels dobles recíprocs en la que s'observen desviacions d'una recta teòrica.

Aquest comportament de tipus no michaëlià, i d'acord amb l'esmentat en l'apartat III-7.1.a.5, va ésser objecte d'estudis més detallats (ARUS, 1981). En ells va estudiar-se la cinètica de la RNAasa A front del 2',3' Cp i dels dinucleòsids monofosfat a pH 5,5, força iònica 0,2 i 25°C de temperatura. Per explicar aquest comportament no michaëlià, es va suposar l'existència en solució de fins a tres formes d'enzim en diferents concentracions. El pH, la força iònica i la concentració de substrat determinarien la concentració relativa de cadascuna d'elles.

D'avant d'aquest comportament no-hiperbolic, s'ha procedit a fer un recull bibliogràfic que s'exposa a continuació.

Aquest comportament no-michaëlià i la subseqüent postulació de la coexistència de diferents formes enzimàtiques ja havia estat suggerida per diferents autors:

FRENCH & HAMMES (1965), en mesurar la interacció de la RNAasa A amb diversos nucleòtids, van postular que l'enzim s'isomeritza a 25°C i pH neutre.

HAMMES & WALTZ (1969), ZABORSKY & MILLIMAN (1972) i BENZ & ROBERTS (1975) interpretaren els resultats dels seus treballs d'acord amb que l'enzim pot existir en varies conformacions, totes natives. El predomini d'una forma sobre les altres vindria condicionat per la temperatura.

## E RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

Per estudis cinètics amb 2',3' Cp es van observar cinètiques no hiperbòliques (RÜBSAMEN et al., 1974; WALKER et al., 1975 i ARÚS, 1981).

RÜBSAMEN et al. (1974) van interpretar els resultats mitjançant un mecanisme de tipus mnemònic semblant al proposat per RICARD et al. (1974) que considera com a postulat l'existència de dues formes d'enzim amb propietats catalítiques diferents. WALKER et al. (1975) postulaven un mecanisme de tipus al·lostèric amb interacció de les molècules de substrat en sub-setis fixadors diferents del centre actiu, que provocarien els supostos canvis conformationals.

Treballs posteriors del grup de WALKER (1976-1978 a i b) van estudiar l'efecte del pH, la força iònica, lligands, conservació i obtenció de l'enzim trobant una gran dependència entre aquests factors i la forma de la transició observada entre les diferents formes enzimàtiques. Els autors relacionen aquest procés amb una pèrdua de grups amí per part de l'enzim, que afectaria la seva càrrega neta i per tant la seva interacció amb el substrat.

Al 1976 GOLDFARB & MARTIN (a) estudiaren la variació, front del pH, de les constants de velocitat de la reacció entre els grups amí de la RNAasa A i l'àcid trinitrobencenosulfònic. Indicaren una transició entre dues formes d'enzim, a 16°C i pH neutres, que estaria d'acord amb l'existència de formes isomèriques i una altra transició a valors de pH al voltant de 8,4. Donat que per altres estudis no semblava haver-hi indicació de grans canvis conformationals a aquest pH, van concloure que aquestes transicions podrien ésser degudes a petites alteracions en l'envoltall dels grups amí. En un treball posterior (GOLDFARB & MARTIN, 1976 b) apuntaren una tercera transició a pH(s) bàsics, entre 8,5 i 10. Les transicions les explicaren pels diferents grups amí implicats en cada cas, depenent del pH i de la concentració d'enzim.

## [ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

Al 1978 GUTIE, estudiant l'efecte de varis nucleòtids en el plegament i propietats cinètiques d'un anàleg sintètic de l'enzim, comparat amb l'enzim natiu, conclueix que durant la reoxidació en presència de varis nucleòtids, es formen isòmers conformationals, amb propietats cinètiques alterades, tant de l'anàleg com de l'enzim natiu.

D'acord doncs amb aquestes dades, ARÚS (1981) desenvolupa un model teòric de tractament dels resultats cinètics per combinació de diverses hipèrboles. La contribució relativa de cada forma en variar la concentració de substrat, va ésser calculada mitjançant la utilització d'una funció pes, la qual va permetre calcular els valors de  $K_m$ ,  $k_{cat}$  i concentració de cada forma d'enzim en absència de substrat.

Cal afegir que, per estudis cinètics emprant RNA, HUMMEL & KALNITSKY (1958) indicaren que l'RNA pot presentar-se en forma d'agregats de polinucleòtids amb una configuració extesa, en dissolució aquosa. En presència d'electrolits diluïts pot adoptar una configuració més compacta i una estructura altament cooperativa, o sia, estructura secundària. Donat que l'RNA de doble brí és resistent a l'atac per la RNAasa A (BILLETER et al., 1966), la presència d'RNA amb estructura secundària pot complicar considerablement els estudis cinètics en emprar RNA com a substrat. A més, en el 1968 PREISS, mitjançant estudis de dispersió òptica, indica que es poden formar grans agregats enzim-RNA.

Tots els fets abans esmentats poden donar una idea de la complexitat de la hidròlisi de l'RNA per la RNAasa, i d'acord amb aquesta complexitat, una possible explicació del comportament cinètic de l'enzim emprant 2',3' Cp i sobre tot RNA com a substrat que reflecteixi el comportament no-michaelià que trobem en els nostres experiments amb RNAasa A i seus els derivats.

## [ RESULTATS I DISCUSSIÓ ]

Quedaria per explicar, d'acord amb les dades cinètiques obtingudes, la activació observada en el cas del Derivat F, en emprar substrats d'alt pes molecular.

En aquest cas es difícil explicar-ho per un fenomen similar al que provoca l'adenina i els seus corresponents nucleòsid i nucleòtid (WIEKER & WITZEL, 1967; HAFFNER & WANG, 1973), que activen la hidròlisi del 2',3' Cp per la RNAasa A, donat que la hidròlisi d'aquest substrat pel Derivat F no es veu modificada.

D'acord amb la hipòtesi de la coexistència de diverses formes enzimàtiques, una possible explicació seria que el marcatge determinés, en el derivat, una forma enzimàtica precisa, amb unes particulars característiques cinètiques. Aquesta forma enzimàtica resultaria ésser més activa que la suma de les altres possibles formes que coexisteixen de l'enzim natural en solució. O bé que el marcador reaccionés preferentment amb una de les possibles formes enzimàtiques. Aquesta forma enzimàtica "preferencial" podria ésser la majoritària a la temperatura, pH, força iònica i concentració de substrat.

Una última explicació seria la basada en les importants interaccions que es donen entre les bases puríniques i pirimidíniques, per aparellament de bases complementàries i "stacking". La interacció per apilament o "stacking", entre una base amb forma monomèrica i un polinucleòtid, provoca la desestabilització del polinucleòtid (per transició d'una estructura secundària en helix alfa a la de cabdell). D'entre les cinc bases possibles, l'adenina és la que provoca una més forta desestabilització, donat que és la que presenta un "stacking" més elevat (TS'0 1969, 1974). Donat que el marcador no presenta el grup fosfat, com era el cas del Derivat II, no es presentarà repulsió per càrrega entre el grup fosfat negatiu del marcador i els de l'RNA. Les bases d'aquest polímer, que adopta normalment estructura secundària en dissolució, interactuaran amb l'estructura final de la reacció de marcatge amb 6-Cloropurina ribosa (veure Figura 13) posicionada en un extrem de l'esclletxa del centre actiu de l'enzim. L'interacció seria per aparellament, si es una base complementària, o "stacking", desestabilitzant l'estructura secundària del polímer i facilitant l'acció hidrolítica de l'enzim. Evidentment, hom pot suposar la intervenció simultània dels fenòmens involucrats en les explicacions esmentades.

### III-9 GRÀFIQUES TRIDIMENSIONALS

Tal com s'indicarà posteriorment en la discussió final, es va portar a terme l'elaboració d'una representació tridimensional de la molècula d'RNAasa A per relacionar d'una manera molt més precisa totes les dades obtingudes, a més de les assenyalades en la bibliografia. Per tal de donar suport a les dades assenyalades, englobades en una hipòtesi general d'interacció RNAasa A - RNA, s'ha posicionat la molècula de RNAasa A amb un pentanucleòtid model, l'ApApApCpAp, indicant-se els residus de l'enzim que resten a prop de cada grup del oligonucleòtid model.

La importància de relacionar les dades tridimensionals d'una molècula, amb les aportades per d'altres mètodes per tractar d'assolir un millor coneixement de les propietats d'un sistema macromolecular, ja ha sigut assenyalada per diferents autors (LESK & HARDMAN, 1982; GRAEDEL & Mc GILL, 1982; DEARING, 1982), i emprada pel cas de la RNAasa S i l'UpcA per en RICHARDS & WYCKOFF (1973) a l'"Atlas of Molecular Structures in Biology" i "Ribonuclease-S".

Per tal de poder visualitzar d'una manera el més comprensible possible les dades obtingudes amb les representacions tridimensionals s'ha fotografiat el model de la RNAasa S construït amb el kit Labquip i s'hi ha posicionat l'oligonucleòtid model, tal com es discutirà en la discussió final.