

III-RESULTATS

1. OBTENCIÓ DE NUCLEOPLASMINA DE *Xenopus laevis*

La nucleoplasmina nativa de *Xenopus laevis* s'ha utilitzat com a proteïna control per als estudis físicoquímics i funcionals. Per a la seva obtenció s'ha partit d'ovaris disseccionats de granotes *Xenopus laevis* sexualment madures. L'extracció de nucleoplasmina inclou un xoc tèrmic a 80 °C, aprofitant que la nucleoplasmina és termoestable (v. II-1.1 i protocol 1). La nucleoplasmina és força resistent a la precipitació en solucions concentrades de sulfat amònic, característica que també és aprofitada per a la seva purificació. La nucleoplasmina es purifica mitjançant cromatografia de fenilsefarosa (v. II-2.2 i protocol 10) i s'elueix al principi d'un gradient de 2,25 M a 0 M de sulfat amònic en Tris 20 mM pH 7,5. A la figura III.1 es mostren el perfil cromatogràfic i les fraccions obtingudes durant la purificació.

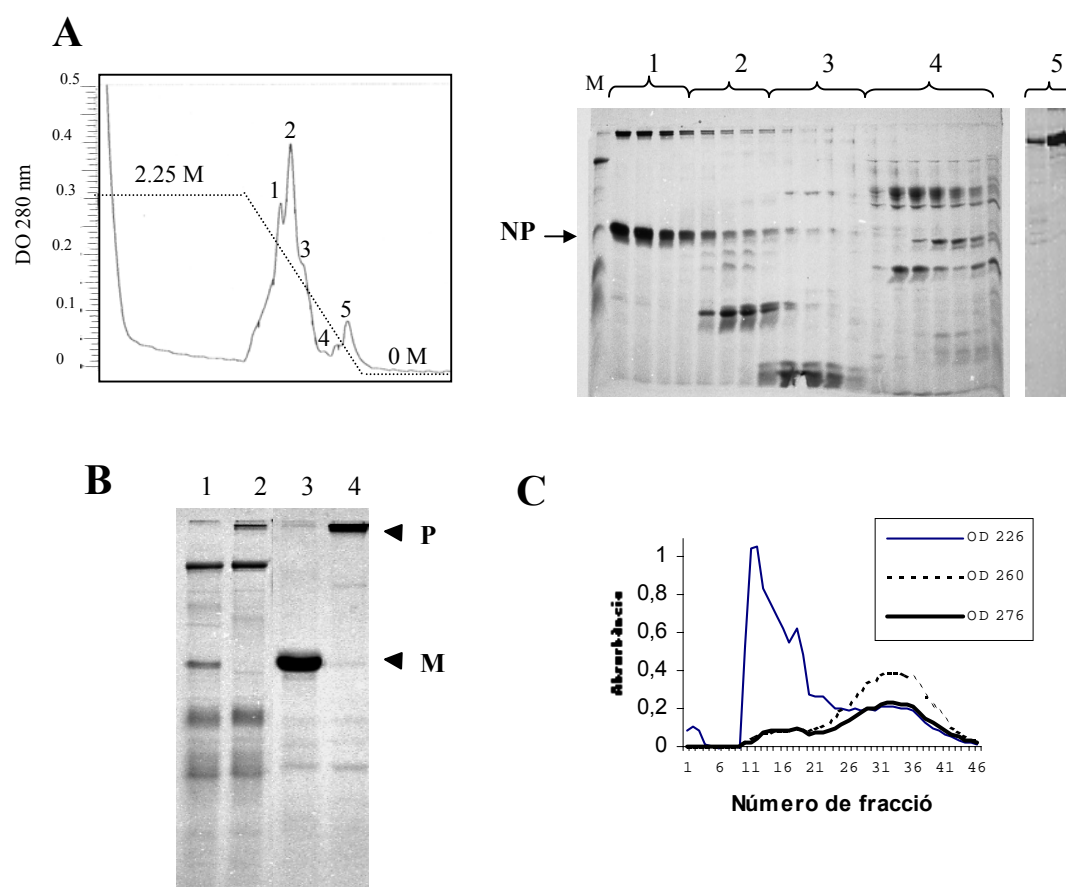


Fig. III.1 Purificació de nucleoplasmina de *X. laevis*. **A)** Cromatograma de la columna de fenilsefarosa (FS) (la línia puntejada indica la conductivitat) i SDS-PAGE 15% de fraccions corresponents als diferents pics; (M) mostra de partida que correspon al sobrenedant obtingut després de precipitar amb sulfat amònic al 55% de saturació. **B)** SDS-PAGE 15% (1) MP de columna FS, (2) mostra anterior no bullida abans de carregar-la al gel, (3) mostra purificada per FS, (4) mostra anterior no bullida abans de carregar-la al gel; (M) monòmer, (P) pentàmer. **C)** Perfil cromatogràfic obtingut en la repurificació en DEAE. El pic de proteïna (DO 226 nm) surt al principi del gradient i al final s'elueixen els àcids nucleics (DO 260 nm).

La purificació mitjançant cromatografia de fenilsefarosa permet obtenir fraccions de nucleoplasmina de puresa considerable però que presenten contaminació per àcids nucleics (reflectida per DO 260 nm > DO 276 nm). Per obtenir fraccions lliures d'àcids nucleics, es va repurificar la nucleoplasmina per cromatografia d'intercanvi aniònic DEAE (v. II-2.3 i protocol 11). Mitjançant aquest tipus de cromatografia es van obtenir fraccions pures i lliures d'àcids nucleics.

La purificació de nucleoplasmina a partir d'ovaris de *X. laevis* presenta força inconvenients: el fet d'haver de treballar amb animals vius, l'obtenció d'un rendiment baix de proteïna (de l'ordre de 0,3 mg de nucleoplasmina pura per granota) i un cost elevat. Un inconvenient addicional és l'obtenció de nucleoplasmina heterogènia, amb una barreja de proteïnes de grau de fosforilació variable, a causa de diferències en el grau de maduració dels animals, que no resulta gens idònia per a les proves de cristal·lització.

2. OBTENCIÓ DE NUCLEOPLAMINA RECOMBINANT EXPRESSADA EN *Escherichia coli*

L'obtenció de nucleoplasmina recombinant en *E. coli* va ser descrita per primera vegada per Kalinich i McClain (1994). Basant-nos en el mètode anterior, es van posar a punt les tècniques d'obtenció de nucleoplasmina recombinant a partir del cDNA cedit pel Dr. Kalinich (v. II-1.2), provinent del clon descrit per Bürglin et al. (1987). La sobreexpressió en *E. coli* permet obtenir grans quantitats de nucleoplasmina a un baix cost i ofereix la possibilitat d'obtenir-ne formes mutants.

2.1 Formes recombinants de nucleoplasmina

Tal com mostra la figura III.2, s'ha obtingut la versió recombinant de la nucleoplasmina de *X. laevis* (r-NP) així com dues formes delecionades: el mutant r-NP142 (amb una deleció C-terminal dels aminoàcids 143-198 que engloba el senyal de localització nuclear –sln– i el tram àcidic A3) i el mutant r-NP121 (amb una deleció C-terminal dels aminoàcids 122-198 que engloba el tram poliglutàmic A2, l'sln i el tram àcidic A3) (vegeu també la seqüència de la NP a la fig. I.10). S'han fet construccions de les diferents formes amb etiquetes d'histidines als extrems amino i carboxil terminals, amb l'objectiu d'utilitzar-les com a estratègia de purificació. Els detalls de la construcció dels diferents mutants han estat descrits anteriorment per Prieto (2002). La construcció dels diferents mutants es va fer en col·laboració amb la Dra. Rosa Aligué (IDIBAPS-Universitat de Barcelona) i la Dra. Núria Saperas (ETSEIB-Universitat Politècnica de Catalunya).

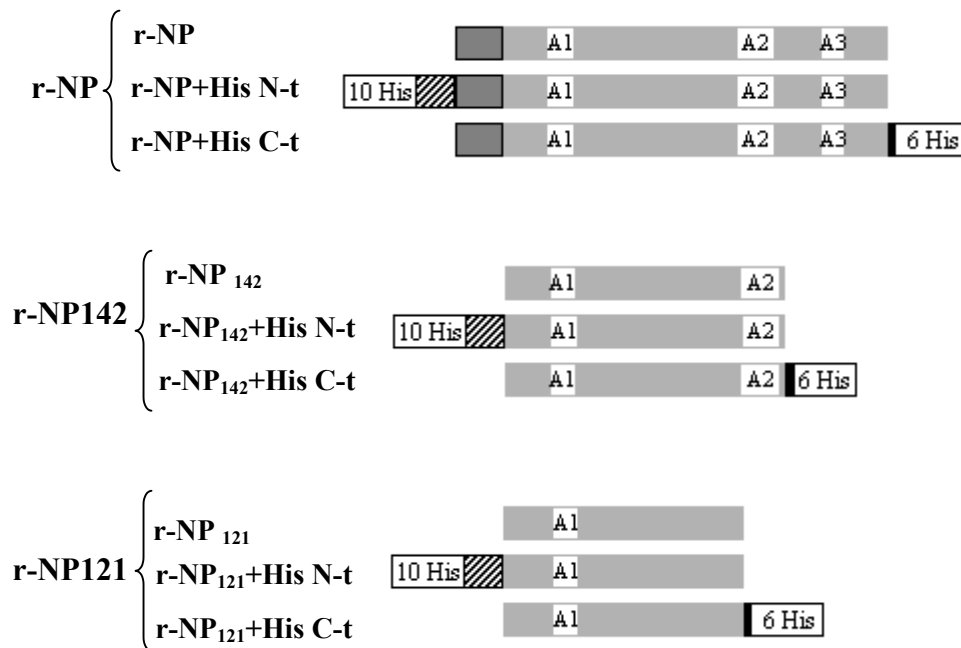


Fig. III.2 Formes de nucleoplasmina recombinant. Esquema simplificat de les diferents formes de NP recombinant de què disposem: r-NP (forma sencera), r-NP142 (mutant per deleció dels aminoàcids 143-198) i r-NP121 (mutant per deleció dels aminoàcids 122-198). A1, A2 i A3 representen els trams àcids principals de la molècula (v. fig. I.10). Els rectangles 10 His i 6 His representen les etiquetes d'histidines afegides a l'extrem amino (10 histidines) o carboxil terminal (6 histidines) respectivament. Totes les formes amb histidines a N-t comencen amb una Gly que va seguida per l'etiqueta d'histidines i posteriorment la seqüència SSGHIWGRHM (rectangle ratllat). Totes les formes de r-NP sencera porten un tram extra amino terminal de seqüència ARIRAQFR (rectangle en gris fosc) procedent de l'estratègia de clonació. Totes les formes amb histidines a C-t porten, immediatament abans de l'etiqueta d'histidines, la seqüència LE (rectangle negre). El senyal de localització nuclear no s'ha representat per fer-ho més clar; està situat entre els trams A2 i A3.

L'objectiu de l'obtenció de les diferents formes mutants de la nucleoplasmina és, d'una banda, fer-ne una anàlisi fisicoquímica i funcional per determinar el paper de diferents dominis de la molècula i, d'altra banda, obtenir formes més curtes de la molècula que podrien ser més fàcilment cristal·litzables.

A la taula III.1 es mostren alguns paràmetres fisicoquímics per a les diferents formes de nucleoplasmina recombinant, esquematitzades a la figura III.2.

Taula III.1. Paràmetres fisicoquímics de diferents formes de nucleoplasmina recombinant. Els diferents paràmetres són: nre. aa (nombre d'aminoàcids del monòmer), PM (m) pes molecular del monòmer (en Da), PM (p) pes molecular del pentàmer (en Da), pI (punt isoelèctric teòric), càrrega (càrrega neta), coef. 276 nm (DO a 276 nm, que correspon a 1 mg/ml de proteïna, v. II-3.3.3). Els diferents paràmetres s'han calculat amb el programa ProtParam (www.expasy.org).

Paràmetres fisicoquímics						
forma	nre. aa	PM (m)	PM (p)	pI	càrrega	coef. 276 nm
r-NP	198	22045,8	110229	5,21	-8	0,62
r-NP+His N-t	219	24566,5	122832,5	6,03	-8	0,56
r-NP+His C-t	206	23110,9	115554,5	5,58	-9	0,59
r-NP ₁₄₂	142	15972,8	79864	4,36	-21	0,86
r-NP ₁₄₂ +His N-t	163	18493,4	92467	4,99	-21	0,74
r-NP ₁₄₂ +His C-t	150	17037,9	85189,5	4,62	-22	0,8
r-NP ₁₂₁	121	13500,4	67502	4,96	-7	1,01
r-NP ₁₂₁ +His N-t	142	16021,1	80105,5	6,08	-7	0,85
r-NP ₁₂₁ +His C-t	129	14565,6	72828	5,54	-8	0,94

En un principi s'utilitzava la tècnica de Bradford (v. II-3.3.1 i protocol 20) per determinar la concentració de proteïnes, fent servir com a referència una recta patró feta amb BSA. També es va provar el mètode de Lowry, amb un protocol força llarg (v. protocol 21), que va donar resultats semblants als obtinguts en el cas del de Bradford. Finalment, degut a que els mètodes anteriors requerien la utilització d'una recta patró de BSA que podia introduir un error considerable, ens va semblar que la tècnica més fiable i més ràpida per determinar la concentració de les mostres de nucleoplasmina era la quantificació directa mitjançant l'absorbància a 276 nm (v. II-3.3.3). A la taula III.1 es mostren els coeficients utilitzats per calcular la concentració de les diferents proteïnes.

2.1.1 Expressió de proteïnes

Les diferents formes de nucleoplasmina recombinant s'obtenen per expressió en *E. coli* tal com es descriu en l'apartat II-1.2 i als protocols 3 i 4. A la figura III.3 es mostren diferents extractes bacterians obtinguts mitjançant el protocol habitual.

La forma r-NP142 té una expressió força baixa en comparació amb la r-NP i sobretot amb la r-NP121 (que és la forma que s'expressa millor). Alguns autors (Looman et al., 1987) han descrit que la presència d'un codó AAA (Lys) en posició immediatament 3' de l'ATG (Met) d'inici de la traducció augmenta l'eficiència de la traducció. Aquest efecte seria determinat per una optimització de la interacció codó/anticodó en una zona propera al lloc d'unió a ribosoma (rbs). El triplet AAA és el més freqüentment utilitzat per *E. coli* per a la posició 3' respecte a l'ATG inicial. Es va mutar el codó AAC (Asn) per AAA (Lys) (v. fig. I.10) de la r-NP142 però no es va aconseguir cap millora en el nivell d'expressió de la proteïna.

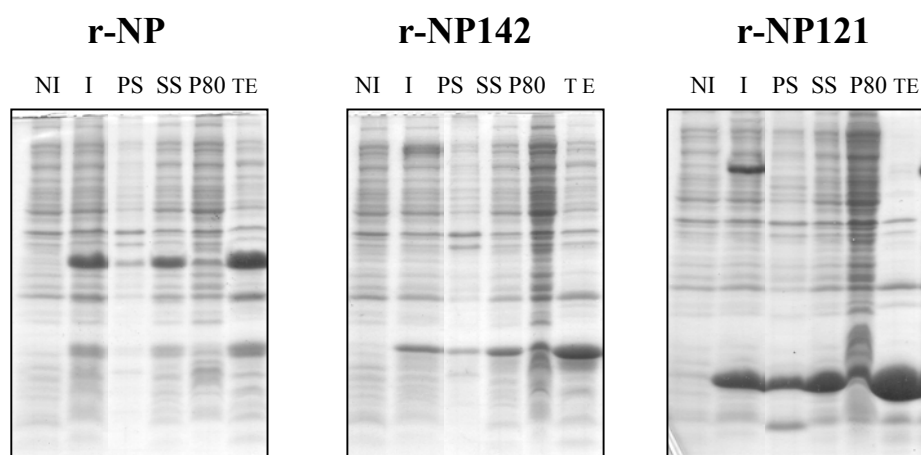


Fig. III.3 Expressió de nucleoplasmina en *E. coli*. Extractes obtinguts durant el processament dels pèl·lets bacterians. Anàlisi en SDS-PAGE 15% per a cada una de les formes (r-NP, r-NP142 i r-NP121), (NI) control: cultiu no induït; (I) cultiu induït durant 3 hores; (PS) i (SS) representen, respectivament, el pèl·let i el sobrenedant obtinguts en la centrifugació postsonicació; (P80) i (TE) representen, respectivament, el pèl·let i el sobrenedant termoestable obtinguts després del tractament tèrmic a 80 °C.

2.1.2 Formes truncades

L'expressió de nucleoplasmina al bacteri *E. coli* presenta el problema de l'aparició de formes truncades (Kalinich et al., 1994; Dutta et al., 2001; Hierro et al., 2001, Prieto, 2002). Les formes truncades són formes més curtes que el monòmer de

nucleoplasmina i que es poden associar formant pentàmers juntament amb monòmers sencers (no truncats) i donar lloc a poblacions heterogènies de pentàmers (v. fig. III.4).

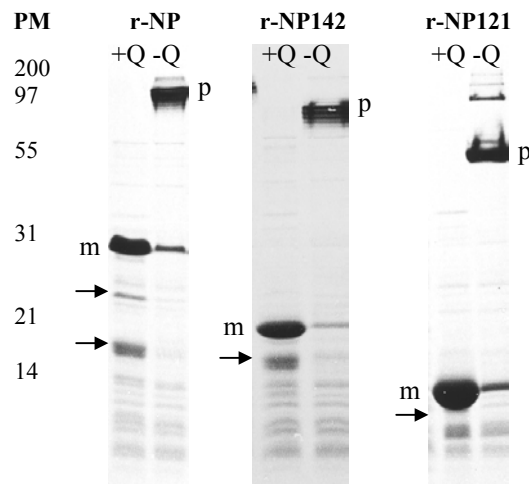


Fig. III.4 Formes truncades de nucleoplasmina. Es mostren en SDS-PAGE 15% les formes truncades (fletxes) per a cada variant: r-NP (forma amb His a C-t), r-NP142 (forma amb His a C-t) i r-NP121. Les mostres són extractes termoestables. (+Q) mostra bullida abans de carregar al gel, (-Q) mostra no bullida abans de carregar al gel, (m) monòmer, (p) pentàmer, (PM) marcador de pesos moleculars en kDa. S'observa la formació de pentàmers en les mostres que no han estat bullides. Cal esmentar que les mostres de NP presenten una migració anòmala en gels de SDS (amb un pes molecular aparent major al real) perquè s'uneixen més pobrament a l'SDS a causa de la seva elevada càrrega negativa.

S'han postulat diferents hipòtesis sobre l'origen de les formes truncades, una de les quals seria la proteòlisi de la nucleoplasmina a l'interior dels bacteris. S'han detectat més de 70 proteases diferents a *E. coli* repartides entre els diferents compartiments del bacteri i alguna d'elles podria ser la responsable de la truncació. Altres possibles hipòtesis serien l'aturada prematura de la transcripció per presència d'estructures secundàries en l'mRNA o l'aturada prematura de la traducció per presència de codons de baixa freqüència d'ús pel bacteri (Carstens i Waesche, 1999) (v. taula III.2). D'altra banda, l'elevada presència de Glu al tram A2 podria causar un esgotament dels corresponents tRNAs (O'Brien et al., 1998).

La utilització de la soca d'*E. coli* BL21-codon plus(DE3)RIL, que porta còpies extres pels tRNA de baixa freqüència d'ús en *E. coli* com els que reconeixen AGA i AGG (per l'arginina), AUA (per la isoleucina) i CUA (per la leucina), no va frenar l'aparició de formes truncades. Aquest fet no descarta que les truncades s'originin per la presència d'altres codons poc utilitzats pel bacteri.

Malgrat els múltiples esforços, realitzats en treballs anteriors (Kalinich i McClain, 1994; Saperas et al., 1999; Prieto, 2002), per determinar l'origen d'aquestes formes, no s'ha aconseguit trobar una causa clara que justifiqui la seva aparició. La seqüenciació amino terminal de la r-NP i de les formes truncades associades va posar de manifest que totes les formes tenien l'extrem N-terminal comú, cosa que confirma que l'origen de les formes truncades es troba a l'extrem carboxil terminal de la molècula (Prieto, 2002).

Taula III.2 Codons de baixa freqüència d'ús a *E. coli*. Dades extretes de Codon Usage Database (www.kazusa.or.jp/codon). La freqüència d'ús de codons es representa en tant per mil. Per a la nucleoplasmina, s'indica el nombre de codons de cada tipus i entre parèntesis la seva posició en la seqüència de Bürglin et al. (1987) (v. fig I.10).

Ús de codons			
Codó	<i>E. coli</i>	<i>Xenopus</i>	nucleoplasmina
Arg AGA	3,7	14,7	2 (146, 184)
Arg AGG	2,1	12,2	1 (182)
Arg CGA	3,8	6	0
Arg CGG	5,9	6	1 (97)
Cys UGU	5,2	11	3 (15, 35, 45)
Cys UGC	6,1	11,6	0
His CAC	9,3	13,2	2 (55, 111)
Ileu AUA	7	11	3 (28, 56, 59)
Leu CUA	4,2	8,4	1 (75)
Pro CCA	8,6	20,4	7 (69, 93, 104, 137, 140, 173, 186)
Pro CCC	5,4	13,7	3 (8, 81, 141)
Pro CCU	7,5	18,2	3 (77, 92, 147)
Ser UCA	9	16,1	1 (119)
Ser UCC	9,1	13,7	2 (10, 102)
Ser UCG	8,5	4	0
Thr ACA	9,4	19,3	3 (23, 43, 61)

2.2 Purificació de formes sense etiqueta d'histidines

2.2.1 Purificació de r-NP

La nucleoplasmina sencera recombinant s'ha purificat mitjançant cromatografia d'hidroxiapatita (v. II-2.1 i protocol 9) i s'ha eluït en un gradient de 0,1 a 0,3 M de fosfat potàssic en 20 mM Hepes pH 7,5. A la part inicial del gradient

apareixen fraccions amb una gran quantitat de formes truncades, les quals van disminuint fins a desaparèixer quasi totalment a les darreres fraccions del gradient.

A la figura III.5 es mostra el perfil cromatogràfic i les fraccions corresponents a la purificació de la r-NP. Algun cop les mostres purificades presenten contaminació per àcids nucleics (reflectida per DO 260 nm > DO 276 nm) i caldrà repurificar-les mitjançant cromatografia d'intercanvi aniònic DEAE (v. II-2.3 i protocol 11).

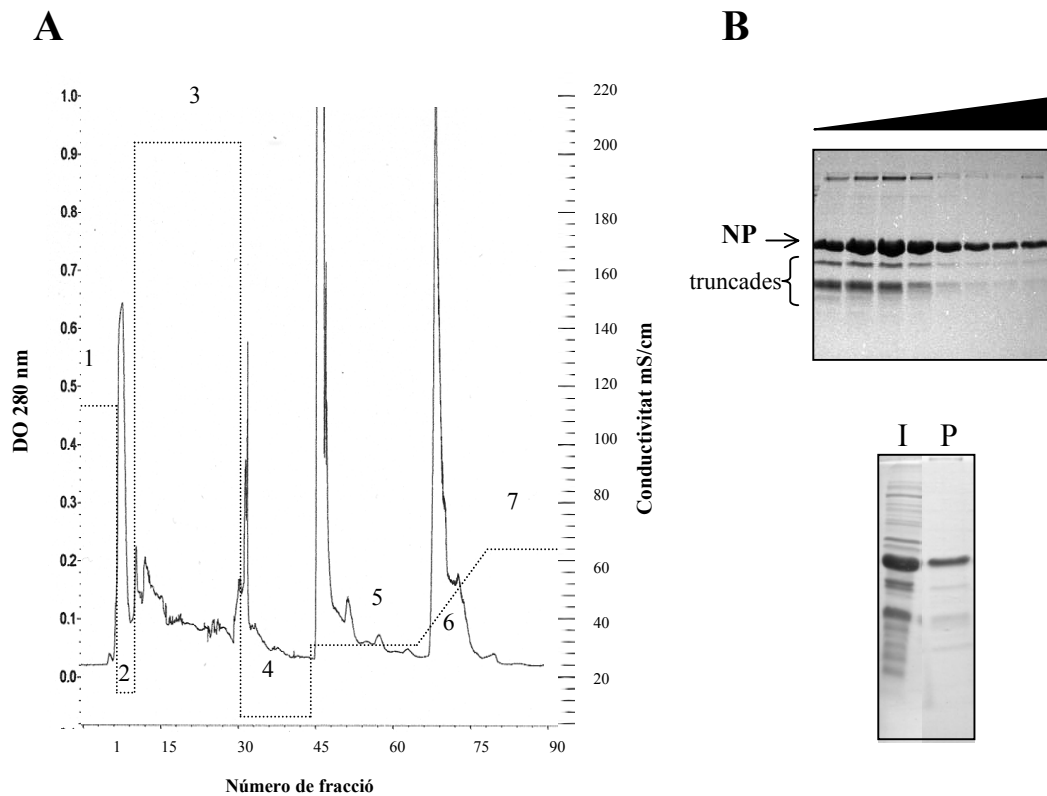


Fig. III.5 Purificació de r-NP. **A)** Cromatograma d'una columna d'hidroxiapatita (HAP), on (1) rentat-equilibrat amb 1 M NaCl, (2) eluït durant el carregat de la mostra (*flow through*), (3) rentat amb 2 M NaCl, (4) rentat amb 10 mM K_2HPO_4 , (5) rentat amb 0,1 M de K_2HPO_4 , (6) gradient de 0,1 a 0,3 M de K_2HPO_4 , (7) rentat amb 0,3 M K_2HPO_4 (v. el protocol 9 per a més detalls). La línia puntejada indica la conductivitat. **B)** SDS-PAGE 15% (superior) corresponent a les fraccions del gradient (6), on s'observa la disminució progressiva de les formes truncades de nucleoplasmina; (inferior) (I) fracció abans de purificar, (P) fracció purificada per HAP.

Les fraccions obtingudes es dialitzen enfront del tampó desitjat i finalment es concentren. Les mostres de proteïna se solen guardar congelades a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Algun cop s'han mantingut les proteïnes a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Es va observar que proteïnes mantingudes a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant períodes llargs de temps (més de 15 dies) es degradaven amb facilitat i augmentava la proporció de formes truncades, sobretot de mida semblant a la de la forma r-NP142 (la qual correspon a la regió resistent a la tripsina) (Dingwall et al., 1987).

2.2.2 Purificació de r-NP142

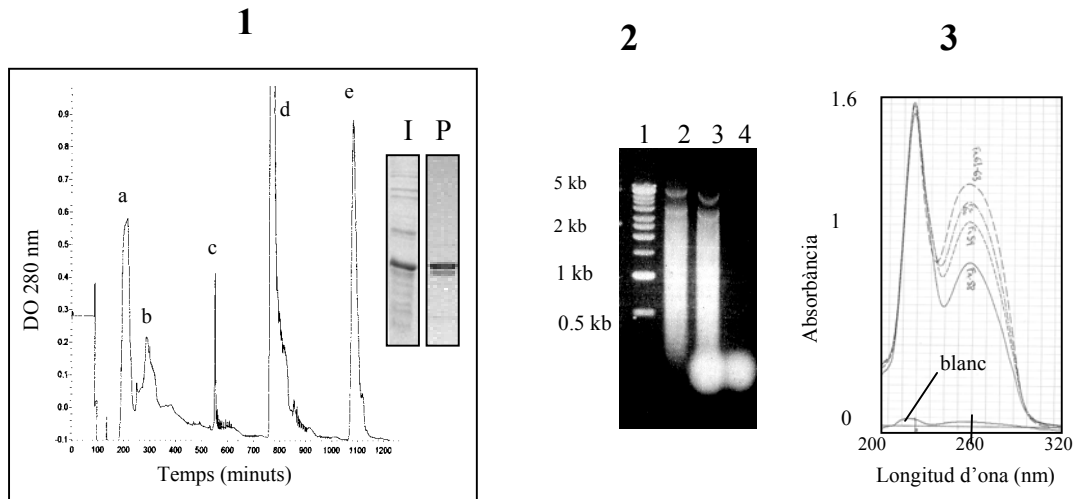
La forma r-NP142 s'ha purificat mitjançant cromatografia d'hidroxiapatita i s'ha eluït en un gradient de 0,1 a 0,3 M de fosfat potàssic en 20 mM d'Hepes pH 7,5 (v. II-2.1 i protocol 9). En aquest tipus de cromatografia, les mostres de r-NP142 tenen una gran tendència a copurificar-se juntament amb àcids nucleics (DNA i RNA) tal com mostra la figura III.6A. Per evitar aquest problema, es van provar diferents condicions d'incubació dels extractes bacterians amb DNasa i RNasa. El tractament conjunt amb RNasa 30 $\mu\text{g/ml}$ en tampó TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8) i DNasa 20 $\mu\text{g/ml}$ en presència de 10 mM de MgCl_2 , incubant a 37°C durant mitja hora, va donar resultats satisfactoris. La tècnica però, presentava l'inconvenient d'haver de sotmetre la mostra de proteïna a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, la qual cosa podria activar proteases que ens podrien degradar la proteïna.

Finalment, per eliminar la contaminació per àcids nucleics es va optar per la repurificació mitjançant cromatografia d'intercanvi iònic DEAE (v. protocol 10), eluint la proteïna en un gradient de 0,1 a 0,5 M de NaCl en 25 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA (v. fig. III.6B).

Tot i que les mostres de r-NP142 tenen menys proporció de formes truncades que la r-NP, al final del procés de purificació sempre arrosseguen una forma truncada de mida lleugerament inferior a la del monòmer. La repurificació per DEAE no aconsegueix eliminar aquesta forma truncada (v. fig. III.6B), però permet obtenir proteïna lliure d'àcids nucleics.

La forma r-NP142 correspon al nucli resistent a tripsina (*core*) de la nucleoplasmina (Dingwall et al., 1987). Aquesta forma té el tram poliglutàmic molt exposat i és la forma amb càrrega neta més negativa, factors que fan que sigui una forma molt inestable (v. III-2.3.2).

A HAP



B DEAE

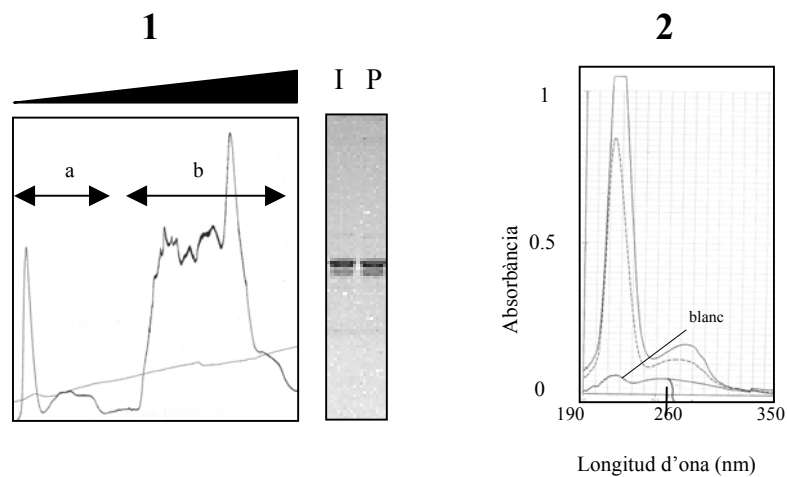


Fig. III.6 Purificació de r-NP142. **A)** Purificació per cromatografia d'hydroxiapatita; 1) Perfil cromatogràfic on els pics corresponen a (a) eluït durant el carregat de la mostra (*flow through*), (b) 2 M NaCl, (c) 10 mM K_2HPO_4 , (d) 0,1 M K_2HPO_4 , (e) gradient de 0,1 M a 0,3 M de K_2HPO_4 (v. el protocol 9); detall gel SDS-PAGE 15%, on (I) mostra inicial i (P) mostra purificada per HAP; 2) Gel d'agarosa 1% (1) marcador Kilobase DNA Marker (Pharmacia), (2) mostra tractada amb RNasa, (3) mostra control contaminada amb DNA i RNA, (4) mostra tractada amb DNasa; 3) Espectres de diferents fraccions purificades per hydroxiapatita; el pic a 260 nm indica contaminació per àcids nucleics. **B)** Purificació per cromatografia DEAE; 1) Perfil cromatogràfic corresponent al gradient de 0,1 a 0,5 M de NaCl, on (a) elució de proteïna i (b) elució d'àcids nucleics; detall gel SDS-PAGE 15%, on (I) mostra inicial i (P) mostra purificada per DEAE; 2) Espectres de diferents fraccions després de purificar per DEAE; no s'observa contaminació per àcids nucleics.

2.2.3 Purificació de r-NP121

La forma mutant més petita de què disposem és la r-NP121. Aquesta forma té un gran nivell d'expressió i presenta un baix nombre de truncades, característica que concorda amb el fet que les formes truncades ho són per l'extrem C-terminal (Prieto, 2002). L'obtenció final de proteïna pura es troba al voltant de 80 mg/L cultiu i és aproximadament 5 vegades superior a la de la nucleoplasmina sencera i fins a 15 vegades superior a la de la r-NP142 (v. taula III.3).

Taula III.3 Rendiments de purificació de nucleoplasmina. Es mostren els rendiments aproximats de proteïna purificada per a diferents formes de NP.

Rendiments de purificació			
o-NP	r-NP	r-NP142	r-NP121
0,3 mg/granota	15-20 mg/L cultiu	5 mg/L cultiu	80 mg/L cultiu

La forma r-NP121 es purifica directament mitjançant cromatografia d'intercanvi aniónic DEAE i s'elueix mitjançant un gradient de 0,1 a 0,4 M de NaCl en Tris 25 mM pH 7,5, 1 mM EDTA. A la figura III.7 es mostra el cromatograma obtingut i les fraccions corresponents a l'elució de r-NP121.

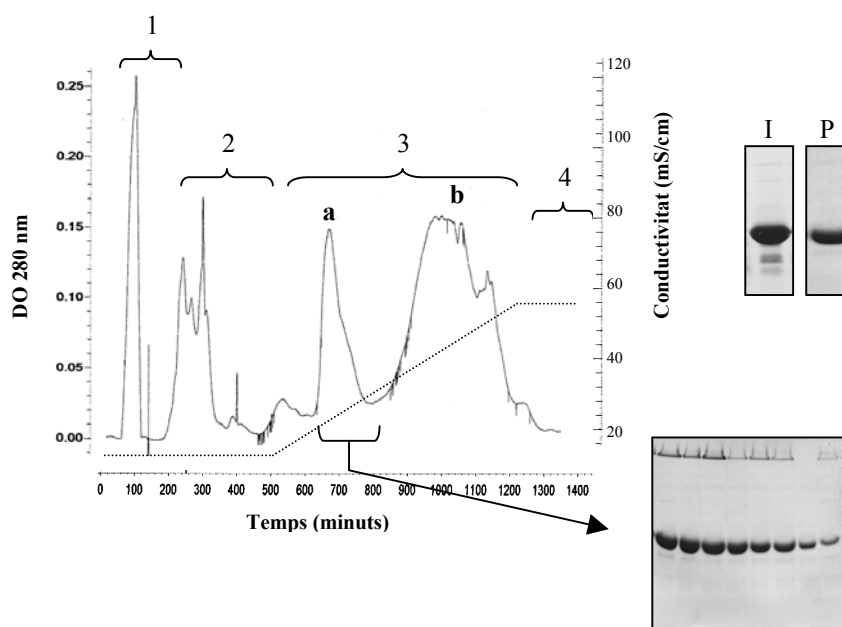


Fig. III.7 Purificació de r-NP121. Cromatografia d'intercanvi iònic DEAE. (Esquerra) cromatograma on (1) eluït durant el carregat de la mostra (*flow through*), (2) rentat amb 0,1 M NaCl, (3) gradient de 0,1 a 0,4 M de NaCl, (4) rentat amb 0,4 M NaCl (v. protocol 11). La línia puntejada indica la conductivitat. (Dreta) SDS-PAGE 15%, on (I) mostra inicial no purificada, (P) mostra purificada per DEAE; el gel de la part inferior correspon a les fraccions del pic (a) del gradient; el pic (b) correspon a l'elució d'àcids nucleics.

2.3 Purificació de formes amb etiqueta d'histidines

Es van obtenir diferents formes de nucleoplasmina recombinant que contenen una etiqueta de 10 histidines a l'extrem N-terminal o bé una etiqueta de 6 histidines a l'extrem C-terminal. Les histidines formen part de les regions de clonatge dels diferents plasmidis utilitzats per a l'expressió d'aquestes proteïnes: pET16b (permet expressar histidines a l'extrem N-terminal) i pET20b (permet expressar histidines a l'extrem C-terminal) (v. II-1.2 i fig. II.1). Aquestes formes es van construir per facilitar la purificació de proteïnes mitjançant cromatografia de quelació amb níquel (v. II-2.4). La forma amb la qual s'ha treballat més en aquesta part del treball ha estat la r-NP142 amb presència d'etiqueta d'histidines a la part C-terminal degut a les seves peculiaritats (vegeu més endavant).

2.3.1 Formes amb histidines a l'extrem amino terminal

Totes les proteïnes amb histidines a l'extrem amino terminal s'han purificat de manera similar mitjançant cromatografia de quelació amb níquel en condicions natives (v. protocol 12). A la figura III.8 es mostren les diferents fraccions obtingudes de la proteïna r-NP142+His N-t en aquest tipus de columna.

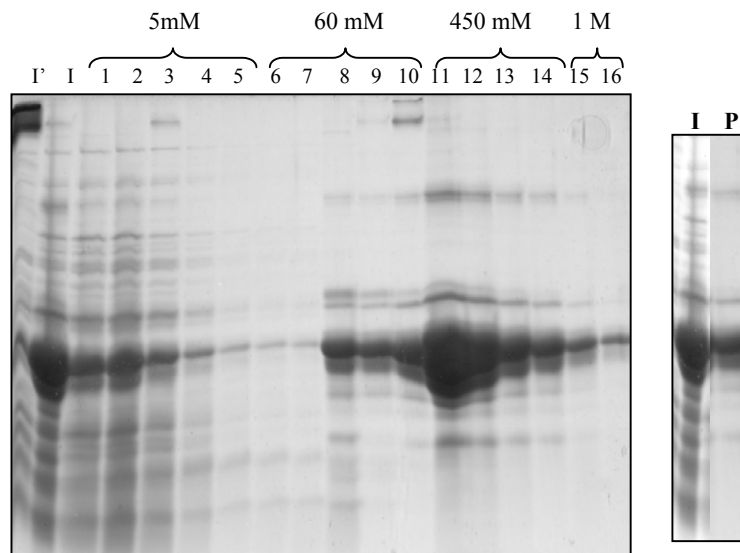


Fig. III.8 Purificació de r-NP142+His N-t. Gel SDS-PAGE 15% on es mostren les diferents fraccions obtingudes mitjançant cromatografia de níquel. (I) mostra de partida (sobrenedant termoestable) (v. protocol 12). (I) mostra inicial (sobrenedant termoestable), (I') mostra inicial no bullida abans de carregar al gel, (1-5) rentat amb 5 mM imidazole, (6-10) rentat amb 60 mM imidazole, (11-14) elució amb 450 mM imidazole, (15-16) elució amb 1 M imidazole, (P) mostra purificada.

El resultat que s'obté és semblant per a les diferents variants de nucleoplasmina amb histidines a l'extrem amino terminal. En tots els casos s'obté una barreja de monòmers sencers i monòmers truncats. Les formes truncades ho són per l'extrem carboxil terminal; per tant, tots els monòmers tenen l'etiqueta d'histidines amino terminal i es poden unir a la columna de níquel. Així doncs, es va abandonar aquesta estratègia de purificació.

2.3.2 Formes amb histidines a l'extrem carboxil terminal

Mitjançant construccions de nucleoplasmina amb histidines a l'extrem carboxil terminal, es pretenia purificar la molècula sense presència de formes truncades. Només els monòmers sencers tindrien la cua d'histidines a C-terminal, ja que les truncades ho són per l'extrem C-terminal (v. III-2.1.2).

2.3.2.1 Purificació per elució amb imidazole

Les mostres de nucleoplasmina recombinant amb presència d'etiqueta d'histidines a l'extrem C-terminal, una vegada purificades mitjançant columna de níquel en condicions natives, continuaven presentant una barreja de monòmers sencers i monòmers truncats. Els monòmers truncats (sense cua d'histidines) s'uneixen als monòmers sencers (amb cua d'histidines) per l'extrem amino terminal i constitueixen pentàmers truncats que es poden unir a la columna de níquel.

Per desfer-nos dels monòmers truncats, es va intentar purificar les proteïnes mitjançant condicions desnaturalitzants (6 M clorur de guanidina, 8 M urea) i reductores (20 mM β -mercaptoetanol). Aquestes condicions ens permetran separar els diferents monòmers i aconseguir que només s'uneixin a la columna els monòmers sencers que tenen la cua d'histidines (v. protocol 15).

L'elució en condicions desnaturalitzants i reductores es dona amb menys imidazole que en condicions natives. Concretament, per a la forma r-NP142+His C-t, en condicions natives calen 200 mM d'imidazole per eluir la proteïna; en condicions desnaturalitzants s'elueix amb una concentració de 20 mM o menys. A la figura III.9 es comparen diferents fraccions de r-NP142+ His C-t purificades per columna de Ni en condicions natives i en condicions desnaturalitzants i reductores. S'han obtingut resultats semblants amb la forma r-NP+His C-t.

Mitjançant la purificació de les formes de nucleoplasmina amb histidines a l'extrem carboxil terminal per cromatografia de níquel en condicions desnaturalitzants i reductores, es van obtenir fraccions de nucleoplasmina pura sense formes truncades.

El pas posterior a la purificació és la diàlisi de les mostres purificades per treure l'imidazole i les sals. Les mostres amb urea es renaturalitzen mitjançant diàlisi gradual amb passos de 6 M→4 M→2 M→0 M urea i sempre amb presència d'agents reductors (preferiblement 10 mM DTT). Finalment es pot fer un darrer pas de diàlisi amb absència d'agent reductor.

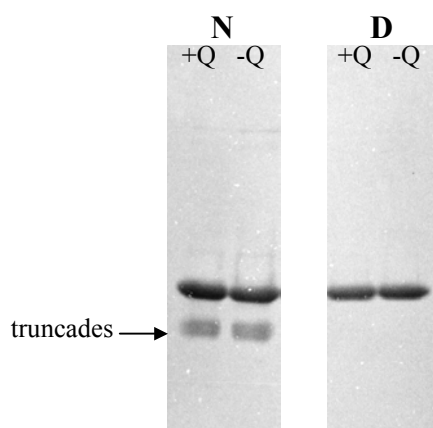


Fig. III.9 Purificació de r-NP142+His C-t. SDS-PAGE 15% on es compara la purificació de la proteïna per cromatografia de níquel en condicions natives (N) o en condicions desnaturalitzants i reductores (D). Les mostres purificades per un mètode o l'altre no són capaces de formar pentàmer quan es carreguen sense bullir (-Q). S'observa la presència de formes truncades quan es purifica en condicions natives.

Inestabilitat de la forma r-NP142 + His C-t

Es va observar que mostres de r-NP142+His C-t sotmeses a purificació per columna de níquel i eluïdes amb imidazole (tant en condicions natives com desnaturalitzants) mostraven una gran tendència a la monomerització, amb la qual cosa la formació de pentàmer quedava dificultada (v. fig. III.10).

Les mostres de r-NP142+His C-t es troben constituint pentàmers tant després del processament de pèl·lets bacterians com quan es troben en la fracció de sobrenedant termoestable. En canvi, després de la seva purificació mitjançant columna de níquel i elució amb imidazole (tant en condicions natives com desnaturalitzants), s'obtenen fraccions amb una gran proporció de monòmer, tal com es mostra a la PAGE nativa (fig. III.10). Algun cop s'observa un seguit de bandes que formen una escala de pes molecular creixent que pensem que podrien correspondre a diferents

associacions de monòmers, que donarien lloc a dímers, trímers, tetràmers, pentàmers, etc. Quan la mostra és dialitzada, s'observa una recuperació important de la fracció pentamèrica, però tot i així bona part de la proteïna encara es troba en forma de monòmer.

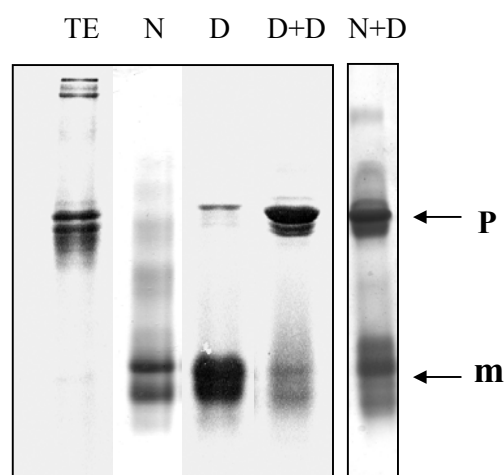


Fig. III.10 Inestabilitat de r-NP142+His C-t. Purificació en columna de níquel per elució amb imidazole. PAGE 10% nativa on (TE) sobrenedant termoestable, (N) mostra purificada en condicions natives (no dialitzada), (D) mostra purificada en condicions desnaturalitzants i reductores (no dialitzada), (D+D) mostra purificada en condicions desnaturalitzants i reductores i dialitzada, (N+D) mostra purificada en condicions natives i dialitzada; (m) monòmer, (p) pentàmer.

Algun cop les mostres que havien estat prèviament dialitzades i que es presentaven en un 50% en forma de pentàmer, al ser sotmeses a processos de congelació/descongelació tornaven a mostrar el comportament monomèric postcolumna i, en alguns, casos es repetia el patró en forma d'escala de pesos moleculars creixents. Aquest fet posa de manifest de nou la gran inestabilitat de la proteïna.

S'han descrit casos d'oxidació parcial de proteïnes eluïdes en reïnes cromatogràfiques amb metalls immobilitzats, com les de Ni-NTA i altres, catalitzada per la pèrdua d'ions metàl·lics de la columna (Gaberc-Porekar i Menart, 2001). Alguns aminoàcids, especialment histidines, lisines, cisteïnes, arginines i metionines, són susceptibles a l'oxidació catalitzada per metalls. També s'ha descrit el cas concret de la proteïna MAP-quinasa, la qual una vegada purificada en columna de Ni-NTA i analitzada en PAGE nativa mostra una heterogeneïtat de càrrega inesperada (Ramage et al., 2002). Es va pensar que la forma r-NP142+His C-t també podria patir alguna oxidació o modificació en ser purificada mitjançant Ni-NTA i que aquesta oxidació podria explicar el seu comportament heterogeni en PAGE nativa.

Per tal de determinar si la presència d'ions níquel provocava algun canvi en la proteïna, es van incubar sobrenedants termoestables de r-NP142+His C-t en presència d'1 mM i 10 mM de sulfat de níquel en Tris 20 mM pH 7,5. En aquestes condicions no es va observar cap canvi en la proteïna i, per tant, els ions níquel no serien responsables ni de la monomerització, ni del comportament heterogeni de la mostra r-NP142+His C-t.

D'altra banda, es va voler determinar quina era la influència de l'imidazole en la monomerització de la proteïna r-NP142+His C-t. Si incubàvem la proteïna amb imidazole, a concentracions iguals o superiors a 0,5 M d'imidazole, les mostres de r-NP142+His C-t es trobaven majoritàriament en forma de monòmer (v. fig. III.11B), i per tant eren més sensibles a la monomerització. En canvi, si es feia la mateixa prova amb la forma r-NP+His N-t es trobava que formava pentàmer a concentracions d'imidazole entre 0 i 1 M (fins i tot quan s'analitzaven en SDS-PAGE) (fig. III.11A). L'imidazole afavoria la monomerització i el comportament heterogeni de la mostra r-NP142+His C-t.

La tendència a la monomerització de la forma r-NP142+His C-t podria veure's accentuada per la presència de ponts disofre inespecífics entre les cisteïnes de la molècula. Així doncs, es va observar que les incubacions amb l'agent reductor DTT afavorien la recuperació de la forma pentamèrica (v. III-5.2.2 i fig. III.26).

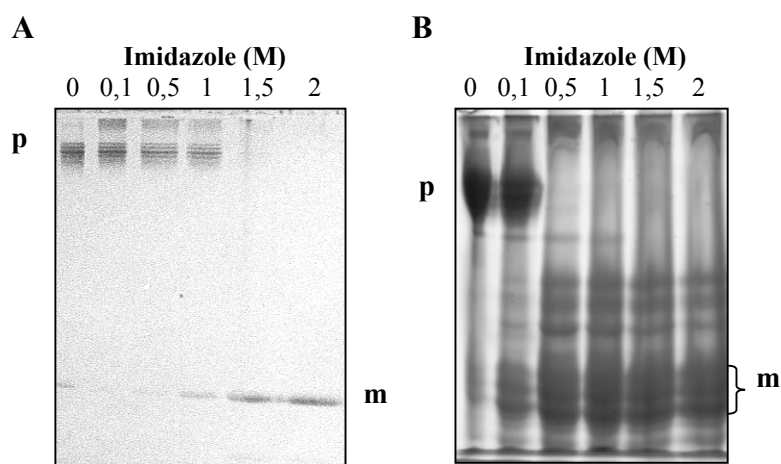


Fig. III.11 Influència de l'imidazole en la monomerització. A) SDS-PAGE 12% de la mostra r-NP+His N-t (purificada) incubada amb diferents quantitats d'imidazole (de 0 a 2 M). B) PAGE 10% nativa de la mostra r-NP142+His C-t (extracte termoestable) incubada amb diferent quantitat d'imidazole (de 0 a 2 M); (m) monòmer, (p) pentàmer.

El comportament de la forma r-NP142+His C-t va portar força problemes durant la purificació de la mostra i la cerca d'estratègies per separar la fracció monomèrica de la pentamèrica. Les mostres r-NP+His C-t i r-NP121+His C-t no

presenten el problema de la monomerització pel fet d'estar purificades en columna de níquel i eluïdes amb imidazole.

2.3.2.2 Estratègies de separació de pentàmers i monòmers de r-NP142+His C-t

Es van provar diverses estratègies per separar la fracció monomèrica i la fracció pentamèrica de les mostres de r-NP142+His C-t purificades per columna de níquel i eluïdes amb imidazole.

Precipitació amb sulfat amònic

Les fraccions de r-NP142+His C-t purificades mitjançant cromatografia de níquel es mostren més sensibles a precipitar amb sulfat amònic (precipiten majoritàriament al 45% de saturació), mentre que la mateixa mostra no purificada i en forma de sobrenedant termoestable es mostrava soluble al 55% de saturació. Es pretenia determinar si la fracció monomèrica i pentamèrica de r-NP142+His C-t tenien diferent sensibilitat a precipitar en presència d'aquesta sal i s'aconseguia la seva separació. Amb la utilització d'aquesta estratègia no es va aconseguir separar la fracció pentamèrica de la monomèrica.

Cromatografia de filtració en gel

Es va utilitzar la columna de filtració en gel Superdex 75 (Pharmacia Biotech), que teòricament permet separar proteïnes de pesos moleculars compresos entre 3.000 i 70.000 Da. L'objectiu en utilitzar aquesta tècnica era la separació de la fracció pentamèrica de la monomèrica.

Es va dur a terme una estratègia de purificació que consistia a eluir la proteïna en condicions natives semblants a les utilitzades habitualment per PAGE nativa i en les quals s'havia observat la proteïna en forma de pentàmer i monòmer de manera conjunta (v. fig. III.10, pou D+D). La mostra es trobava en 0,062 M Tris pH 6,8 i era eluïda amb 25 mM Tris pH 8,3. Aquesta estratègia no va permetre separar la fracció monomèrica de la pentamèrica.

Electroforesi preparativa

Aquest mètode consisteix a eluir la proteïna directament a partir d'un gel PAGE (v. II-3.1.5). L'estratègia es va basar en la utilització d'una PAGE nativa on la mostra r-NP142+His C-t purificada per columna de níquel es mostrava part com a monòmer i part com a pentàmer (v. fig. III.12).

Amb aquesta tècnica es va aconseguir separar el pentàmer del monòmer, i fins i tot diferents espècies de monòmers de diferent mobilitat, en fraccions diferenciades. El principal inconvenient de la tècnica és la baixa rendibilitat que s'obté. Les diferents fraccions estan molt diluïdes i cal concentrar-les i posteriorment dialitzar-les. Al llarg de tot el procés de manipulació es perd molta proteïna, que va quedant enganxada per les parets dels tubs, concentradors i bosses de diàlisi. D'altra banda, aquest tipus d'electroforesi es va fer de manera *casolana*, ja que no disposem de cap aparell optimitzat per a aquest tipus de purificació, i va portar força problemes tècnics en la posada a punt.

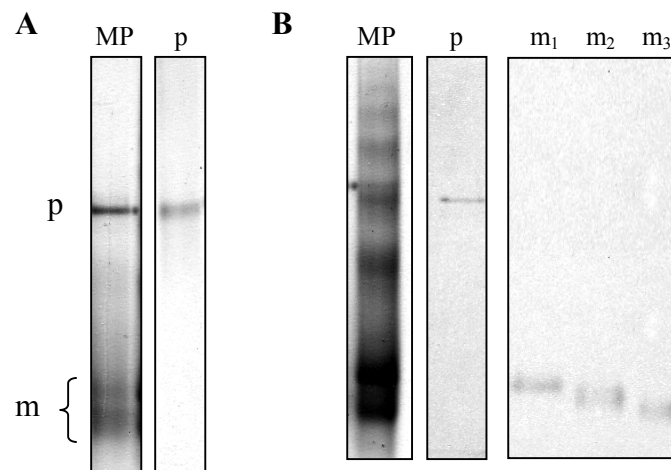


Fig. III.12 Electroforesi preparativa. PAGE 10% nativa de mostres r-NP142+His C-t **A)** (MP) mostra de partida procedent de columna de níquel eluïda amb imidazole que es troba en forma de monòmer (m) + pentàmer (p), (p) fracció pentamèrica eluïda. **B)** (MP) mostra de partida procedent de columna de níquel eluïda amb imidazole que es troba formant una escala de proteïnes de pesos moleculars creixents, (p) fracció pentamèrica eluïda, (m₁, m₂, m₃) diferents fraccions monomèriques eluïdes (vegeu-ne detalls a l'apartat II-3.1.5).

2.3.2.3 Purificació per elució per canvi de pH

A causa de la gran quantitat de problemes que suposava la purificació de la forma r-NP142+His C-t per elució amb imidazole, es va voler provar de purificar-la

mitjançant columna de níquel amb elució per canvis de pH (v. protocol 14). A la figura III.13 es mostra el perfil cromatogràfic i les fraccions obtingudes amb aquest tipus de cromatografia.

La purificació mitjançant aquesta estratègia no aconsegueix eliminar totalment les formes truncades, però aquestes apareixen amb menor quantitat que en la purificació per columna de Ni eluïda amb imidazole en condicions natives. Com a gran avantatge addicional tenim que la proteïna és capaç de formar pentàmers de manera normal. Per tant, aquest tipus de purificació és molt més adequada per a la mostra r-NP142+His C-t.

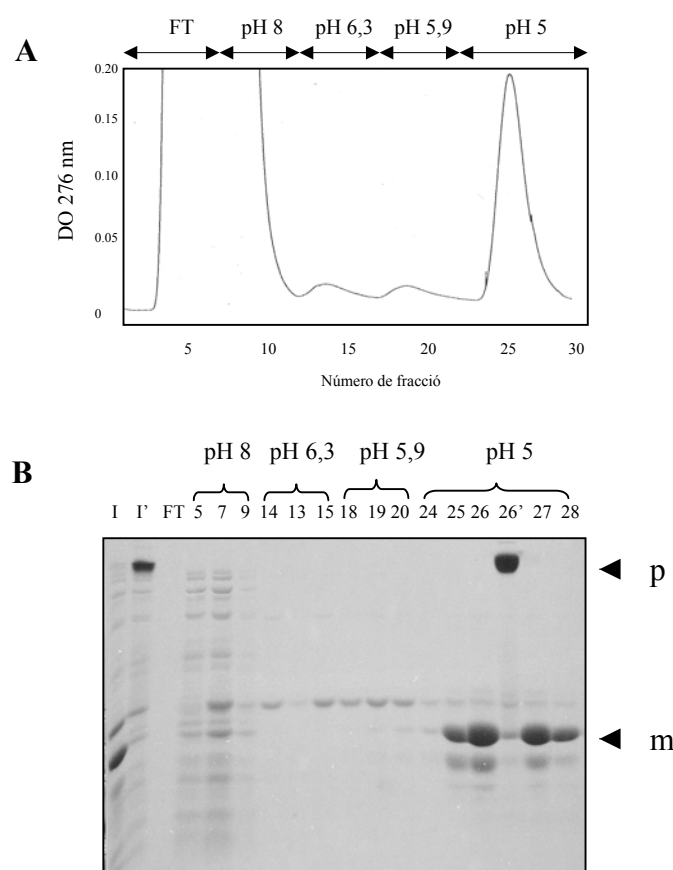


Fig. III.13 Cromatografia de níquel (elució per canvis de pH). **A)** Perfil cromatogràfic obtingut en la purificació de la mostra r-NP142+His C-t, (FT) fracció eluïda durant el carregat de la mostra (*flow through*). **B)** SDS-PAGE 15% de les fraccions obtingudes en la purificació: (5 a 28) fraccions corresponents al cromatograma anterior (I) mostra inicial, (I' i 26') mostres no bullides abans de carregar al gel, (p) pentàmer, (m) monòmer.

3. OBTENCIÓ I ANÀLISI DE PROTEÏNES D'*Echinaster sepositus*

3.1 Obtenció de proteïnes espermàtiques bàsiques

El component proteic de la cromatina espermàtica dels equinoderms està constituït majoritàriament per histones (Subirana i Palau, 1968; Kasinsky, 1989). Per obtenir les PEB de l'estrella de mar *Echinaster sepositus* es va partir de cinc exemplars de mascles sexualment madurs i es van obtenir aproximadament 16 mg de proteïnes espermàtiques bàsiques (PEB) per cada gram de gònada masculina (v. protocol 5).

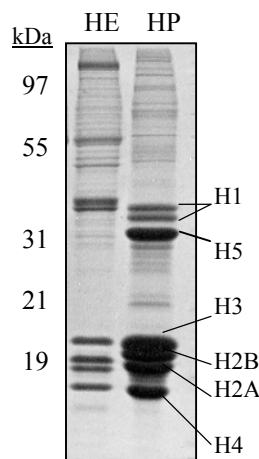


Fig. III.14 PEB d'*E. sepositus*. SDS-PAGE 15%, on (HE) PEB d'*E. sepositus*, (HP) control d'histones d'eritròcit de pollastre.

Tal com s'observa a la figura III.14, a la cromatina espermàtica d'*Echinaster sepositus* es troba la dotació completa d'histones: H1, H2A, H2B, H3 i H4.

3.2 Obtenció de proteïnes de l'oòcit

Es van obtenir proteïnes de l'oòcit de l'estrella de mar *Echinaster sepositus* per fer un estudi de la possible presència de proteïnes amb característiques i funcions semblants a la nucleoplasmina.

Es van processar els oòcits amb el mateix protocol utilitzat per a l'extracció de nucleoplasmina de *X. laevis* (v. II-1.3 i protocol 1), però assajant dues condicions de precipitació amb sulfat amònic en paral·lel (35% i 55% de saturació). A la figura III.15 es mostren els diferents extractes obtinguts.

En l'extracte d'oòcits de l'estrella de mar es va poder observar l'existència d'una proteïna majoritària, que era termoestable i parcialment resistent a la precipitació amb sulfat amònic al 35% i al 55% de saturació. Aquesta proteïna presenta un pes molecular aparent d'uns 20 kDa en gels SDS-PAGE (menor al de la nucleoplasmina) però en canvi en gels de poliacrilamida natius apareix amb un pes molecular superior al del pentàmer de nucleoplasmina (v. fig. III.15B). Aquesta observació pot indicar que la proteïna sigui de tipus oligomèric, tot i que no es pot descartar que es tracti d'agregats inespecífics. Per poder caracteritzar millor la proteïna, se'n va fer una anàlisi aminoacídica (v. II.3.4.3, protocol 22 i taula III.4).

L'anàlisi de la composició aminoacídica de la proteïna majoritària de l'estrella, corresponent a la fracció del sobrenedant després de precipitar amb sulfat amònic al 55% de saturació, va posar de manifest que es tracta d'una proteïna àcida amb aproximadament un 21% d'aminoàcids àcids (v. fletxes a la taula III.4). La nucleoplasmina presenta un 26% d'aminoàcids de naturalesa àcida segons la seqüència de Bürklin (Bürklin et al., 1987) i un 28% segons la seqüència de Dingwall (Dingwall et al., 1987).

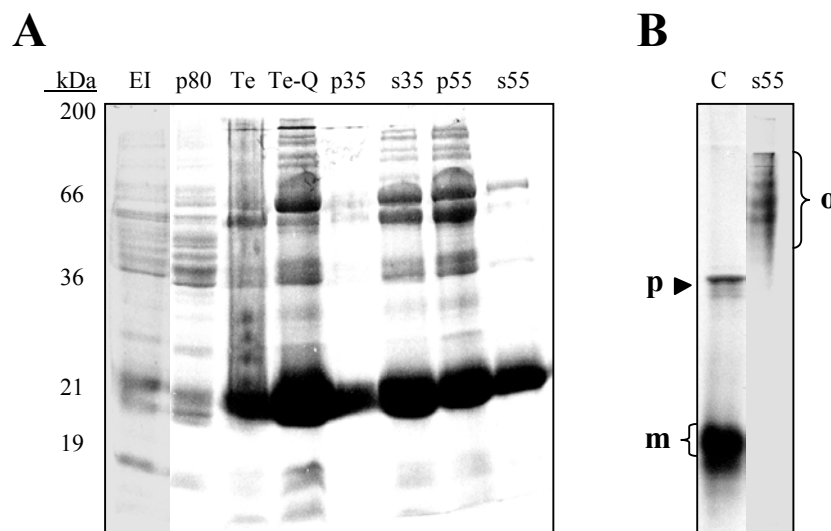


Fig. III.15 Proteïnes de l'oòcit d'*E. sepositus*. **A)** SDS-PAGE 15%, (EI) extracte inicial, (p80) proteïnes precipitades després del tractament a 80 °C, (Te) sobrenedant termoestable, (Te-Q) termoestable no bullit abans de carregar al gel, (p35) precipitat al 35% de saturació amb sulfat amònic (SA), (s35) fracció soluble al 35% SA, (p55) precipitat al 55% SA, (s55) fracció soluble al 55% SA. **B)** PAGE 10% nativa. (C) control de r-NP142+His C-t, (p) pentàmer, (m) monòmer, (o) oligòmer. El pentàmer de r-NP té una movilitat electroforètica molt similar a la de r-NP142+His C-t en PAGE nativa.

Aquests resultats indiquen que els oòcits de l'estrella de mar contenen una proteïna amb algunes característiques semblants a les de la nucleoplasmina: és termoestable, força resistent al sulfat amònic, àcida i probablement capaç de formar

oligòmers (v. també III-8.1.2). Un altre assaig addicional per ajudar a determinar la naturalesa *nucleoplasmin-like* d'aquesta proteïna és la immunodetecció mitjançant anticossos policlonals anti-NP (v. III-4.2).

Taula III.4 Anàlisi d'aminoàcids. Es compara la composició aminoacídica de la proteïna majoritària d'*E. sepositus* amb la nucleoplasmina de l'òocit de *X. laevis* (Earnshaw et al., 1980) i la nucleoplasmina clonada per Bürglin et al. (1987) i Dingwall et al. (1987). Els diferents valors s'expressen en tant per cent. Les fletxes marquen els aminoàcids de naturalesa acídica.

Anàlisi d'aminoàcids				
	<i>Echinaster</i>	<i>Xenopus</i>	<i>Bürglin</i>	<i>Dingwall</i>
Ala	9,0	7,2	8,5	9,1
Arg	3,3	2,2	2,7	2,5
Asx	9,5	9,2	6,4 ¹	7,1 ³
Cys	4,2	-	1,6	1,5
Glx	11,2	20,0	20,2 ²	20,8 ⁴
Gly	7,6	8,2	6,9	7,1
His	1,4	2,2	1,6	1
Ile	6,7	3,2	4,3	3,6
Leu	5,8	6,2	5,3	6,1
Lys	6,9	11,3	13,8	12,7
Met	2,8	1,0	1,6	1,5
Phe	3,9	2,3	2,1	2
Pro	7,4	7,3	7,4	6,1
Ser	3,1	6,7	5,9	6,6
Thr	7,2	5,4	4,8	5,6
Trp	-	-	-	-
Tyr	3,5	2,1	1,1	1
Val	6,5	6,2	5,9	5,6

¹ (4,7% Asp i 1,6% Asn); ² (17,4% Glu i 2,6% Gln); ³ (5,5% Asp i 1,5% Asn); ⁴ (17,5 Glu i 3% Gln).

3.3 Anàlisi funcional de la proteïna majoritària d'*E. sepositus*

Per determinar si la proteïna majoritària trobada a l'òocit d' *E. sepositus* presenta l'activitat descondensadora de nuclis espermàtics que caracteritza la nucleoplasmina, es van incubar nuclis espermàtics amb l'extracte d' *E. sepositus* soluble al 55% de saturació amb sulfat amònic (s55) (v. fig. III.16). Es van utilitzar nuclis espermàtics del peix *Dicentrarchus labrax* (llobarro) (v. II-8).

Es van posar en contacte 2 μl de suspensió nuclear que contenia aproximadament $3,6 \cdot 10^5$ nuclis desmembranats de *D. labrax* en tampó EM (0,1 M KCl, 2 mM MgCl_2 , 10 mM Tris pH 7,4) amb el mateix volum d'una dilució 0,1 mg/ml de Hoescht (v. II-8) i 5 μl d'extracte s55 d'*E. sepositus* en tampó EM a una concentració d'1 mg/ml (determinada pel mètode de Bradford). En les incubacions de nuclis de *D. labrax* amb nucleoplasmina de *X. laevis* (tant nativa com recombinant), la descondensació dels nuclis espermàtics és força ràpida i aproximadament en un minut i escaig ja s'observa un augment considerable del diàmetre del nucli. En el cas de les incubacions de nuclis espermàtics de *D. labrax* amb la proteïna majoritària d'extractes d'oòcits d'*Echinaster sepositus*, malgrat allargar el temps d'incubació fins a 30 minuts, no es va poder observar un canvi apreciable en el diàmetre del nucli espermàtic.

Els resultats obtinguts mostren una manca d'activitat descondensadora de la proteïna majoritària d'*E. sepositus* en aquest sistema (v. fig.III.16). Seria interessant fer el mateix assaig a partir de nuclis espermàtics d'*E. sepositus* per determinar si la proteïna té activitat descondensadora en un sistema homòleg. També seria interessant poder determinar la seqüència aminoacídica de la proteïna i comprovar si té regions característiques comunes a les proteïnes que pertanyen a la família de la nucleoplasmina (v. fig. I.12).

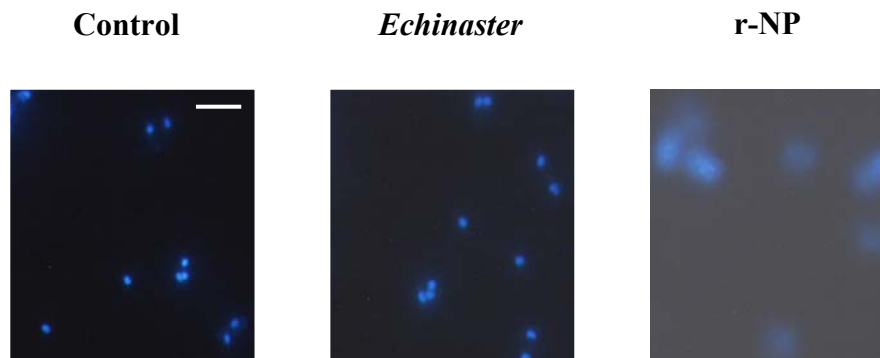


Fig. III.16 Assaig de descondensació de nuclis espermàtics de *D. labrax* amb la proteïna majoritària d'oòcits d'*E. sepositus*. Micrografies obtingudes al microscopi de fluorescència. Els nuclis han estat incubats amb EM (control), amb la proteïna majoritària dels oòcits d' *E. sepositus* (*Echinaster*), o amb la NP recombinant de *X. laevis* (r-NP). La barra correspon a una mida aproximada de 10 μm .

4. OBTENCIÓ D'ANTICOSSOS ANTINUCLEOPLASMINA

4.1 Obtenció i purificació d'anticossos

Es van obtenir anticossos policlonals anti-NP de *X. laevis* en ous de gallina. Alguns autors han descrit que els ous provinents de gallines immunitzades són una font alternativa d'obtenció d'anticossos de manera senzilla i econòmica (Jensenius et al., 1981). Hi ha una gran diferència en la destresa necessària i el treball que comporta haver de sagnar conills o bé el fet de simplement recollir els ous.

S'han obtingut anticossos policlonals contra la forma r-NP121 de la nucleoplasmina. Es va triar la r-NP121 com a antigen perquè aquesta forma correspon a la regió globular de la proteïna a la qual manca el tram poliglutàmic i el senyal de localització nuclear (sln). La manca de l'sln ens servirà com a estratègia per evitar reaccions encreuades amb altres proteïnes amb sln, present en un bon nombre de proteïnes no relacionades amb la nucleoplasmina com ara: receptors d'hormones esteroïdals, factors de transcripció i altres proteïnes nuclears (Dingwall i Laskey, 1991).

La mínima quantitat d'antigen capaç d'induir una resposta immune i la consegüent producció d'anticossos dependrà tant de la naturalesa de l'antigen com de l'hoste. Per immunitzar les gallines es van utilitzar fragments de proteïna directament retallats a partir d'un gel de poliacrilamida en presència d' SDS (v. II-6.1), ja que els antigens particulats solen ser més immunogènics que els solubles (Harlow i Lane, 1988).

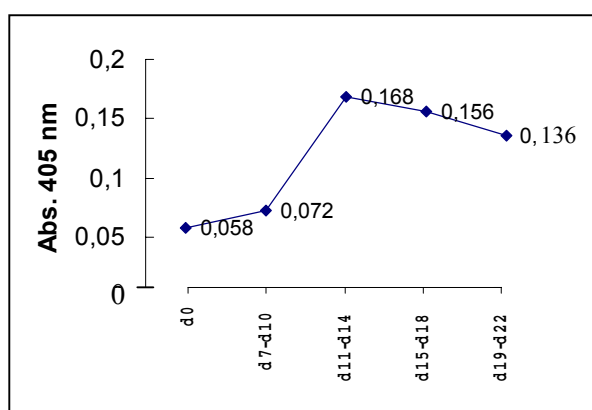


Fig. III.17 Producció d'anticossos anti-r-NP121 en ous de gallina. Es mostra la producció d'anticossos, quantificada mitjançant ELISA, on: (d0) correspon al preimmune (ous recollits just abans d'immunitzar la gallina), (d7-d10) grup de quatre ous recollits entre els dies 7 i 10 després de la darrera immunització. Anàlogament, es representen (d11-d14), (d15-d18), (d19-d22).

La quantitat d'anticossos present al rovell de l'ou és igual o lleugerament superior a la quantitat present al sèrum de la gallina. Està descrit que els anticossos apareixen al rovell al cap d'una setmana després d'immunitzar i es manté la seva producció durant 15 dies més aproximadament (Bar-Joseph i Malkinson, 1980). A la fig. III.17 es mostren els nivells d'anticossos obtinguts en funció del temps postimmunització .

El principal inconvenient de treballar amb anticossos obtinguts en ous de gallina es troba en el procés de purificació, que suposa la separació de les IgY, dels lípids i la vitel·lina del rovell. Un inconvenient addicional és la baixa afinitat dels anticossos de gallina per la proteïna A de *S. aureus*, fet que impossibilita la utilització de columnes d'afinitat amb proteïna A com a estratègia de purificació (Harlow i Lane, 1988).

Per a la purificació de les IgY s'ha utilitzat una modificació de la tècnica descrita per Polson i von Wechmar (1980) en la qual s'utilitza la precipitació amb polietilenglicol (PEG) (v. protocol 29). En una primera precipitació a baixa concentració de PEG, s'aconsegueix separar els lípids. Posteriorment, a més concentració de PEG, precipiten les IgY. Cal tenir en compte que, juntament amb la fracció d'anticossos, també hi trobarem algunes proteïnes associades que coprecipitaran amb les IgY.

Alguns autors han descrit una purificació d'IgY mitjançant cromatografia d'interaccions hidrofòbiques, seguida d'una cromatografia de filtració en gel (Hassl i Aspöck, 1988). Aquest mètode permet obtenir anticossos d'una elevada puresa, però amb un rendiment menor que pel mètode de precipitació amb PEG.

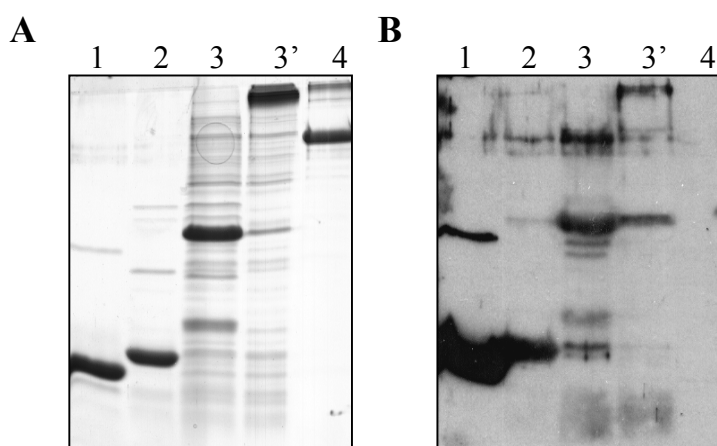


Fig. III.18 Transferència Western (utilitzant extracte cru d'anticossos de gallina). **A)** Gel SDS-PAGE 15% on: (1) control negatiu lisozim d'ou, (2) r-NP121 (sobrenedant termoestable), (3) r-NP+His C-t (sobrenedant termoestable), (3') mostra 3 sense bullir abans de carregar al gel, (4) control negatiu BSA. **B)** Transferència Western corresponent al gel anterior (incubació amb extracte cru d'ou de gallina a una dilució 1:500).

Per determinar l'activitat dels extractes d'anticossos obtinguts, es va utilitzar la tècnica de transferència Western (v. II-6.2 i protocols 32, 33 i 34). A la figura III.18 es mostra una transferència Western obtinguda amb un extracte cru d'anticossos de gallina.

En l'extracte cru hi ha anticossos que reaccionen contra la forma r-NP121 i contra la forma r-NP+His C-t. Aquests anticossos també reaccionen amb diferents bandes presents en la mostra r-NP+His C-t (forma que no està purificada), algunes de les quals corresponen a formes truncades de la nucleoplasmina. En la mostra no bullida s'observa reacció tant en les restes del monòmer com també en el pentàmer. Pel que fa als controls negatius, no trobem reacció amb l'albumina sèrica bovina (BSA), però en canvi el lisozim d'ou dona una reacció molt forta, fins i tot més gran que la de l'antigen original r-NP121.

El fet que hi hagi una reacció molt forta amb el lisozim podria ser degut a una reacció inespecífica del nostre anticòs o bé podria ser degut a altres anticossos presents al rovell de l'ou que tinguessin afinitat pel lisozim i fossin posteriorment reconeguts per l'anticòs secundari antigallina. Per intentar obtenir fraccions d'anticossos més pures i que no tinguessin reaccions encreuades amb el lisozim, es van provar dues estratègies: la precipitació amb sulfat amònic i la purificació mitjançant columna d'afinitat.

Precipitació d'anticossos amb sulfat amònic

Es va utilitzar la precipitació amb sulfat amònic com a estratègia de purificació, a partir d'extractes crus de rovells d'ous de gallina, per separar la fracció total d'IgY de la resta de proteïnes contaminants del rovell. En el cas dels anticossos provinents de sèrum de conill, amb el 40-50% de saturació de sulfat amònic s'aconsegueix precipitar els anticossos i separar-los de la resta de proteïnes sèriques. La fracció d'anticossos no queda totalment pura, sinó que en el precipitat també hi romanen algunes proteïnes d'elevat pes molecular que hi queden atrapades (Harlow i Lane, 1988).

Es van fer proves de precipitació al 25%, 33%, 40% i 50% de saturació amb sulfat amònic. A la figura III.19 es mostren els resultats de la precipitació amb sulfat amònic.

Els anticossos de gallina tenen un pes aproximat de 164 kDa (Polson i von Wechmar, 1980). Quan es desnaturalitzen els anticossos i se'n separen els components, s'observen les cadenes pesants amb un pes molecular aproximat de 66 kDa i les cadenes lleugeres amb un pes aproximat de 21 kDa (v. fig. III.19A).

Mitjançant la precipitació amb sulfat amònic (SA), s'observa que la majoria de proteïnes de l'extracte cru són solubles al 25% de saturació però precipiten al 33% de saturació (o superior) (v. fig. III.19A). A la fracció del precipitat al 25% (p25) hi queda majoritàriament una banda de pes molecular molt semblant al de les IgYs (v. fig. III.19B). Anàlisis posteriors per transferència Western van demostrar que la fracció p25 era immunoreactiva amb la nucleoplasmina (per tant, contenia anticossos antinucleoplasmina) però també presentava reacció encreuada amb el lisozim d'ou. Malgrat que en el precipitat al 25% de saturació amb sulfat amònic s'obtenia una fracció força pura d'IgY, aquesta continuava tenint reaccions encreuades.

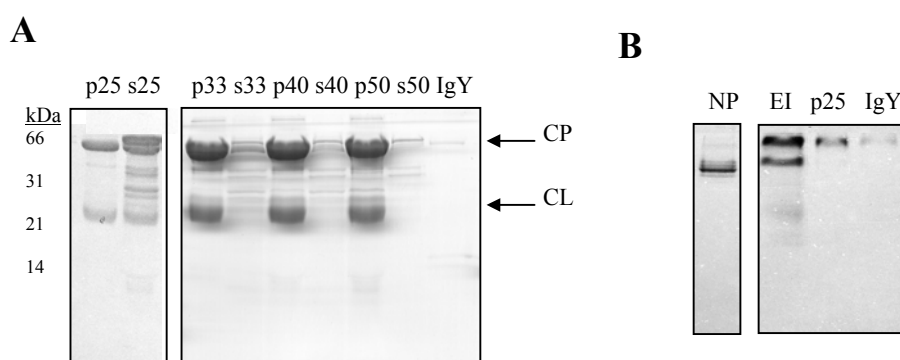


Fig. III.19 Precipitació d'anticossos amb sulfat amònic. **A)** SDS-PAGE 15% on: (p) fracció que precipita, (s) fracció soluble al 25%, 33%, 40% i 50% de saturació amb sulfat amònic (SA), (IgY) control d'anticossos de gallina, (CP) cadenes pesants, (CL) cadenes lleugeres. **B)** PAGE 10% nativa on: (NP) control de pentàmer de NP (110 kDa), (EI) extracte inicial d'anticossos de gallina, (p25) precipitat al 25% de saturació amb SA, (IgY) control d'anticossos de gallina.

Purificació d'anticossos per columna d'afinitat

Per minimitzar l'existència de reaccions encreuades dels anticossos de gallina amb altres proteïnes (per exemple el lisozim), es van voler purificar els anticossos específics contra la nucleoplasmina, mitjançant cromatografia d'afinitat (v. protocols 30 i 31). La preparació d'aquest tipus de matriu comporta el requeriment d'una quantitat important d'antigen que no sempre és possible d'aconseguir. Els anticossos específics quedaran units a l'antigen, enganxat covalentment a la reïna, i seran eluïts per variacions de pH. S'ha utilitzat únicament l'elució en condicions àcides (100 mM glicina pH 2,5), perquè l'elució en condicions bàsiques (100 mM trietilamina pH 11,5) provocava una pèrdua d'antigen de la columna que s'eluía conjuntament amb els anticossos. Les diferents fraccions obtingudes es mostren a la figura III.20.

Mitjançant aquesta tècnica s'han obtingut fraccions d'anticossos a una concentració aproximada de 0,03 mg/ml (segons la relació DO 280 nm 1 = 0,75 mg/ml). Un dels inconvenients de la tècnica és el baix rendiment que s'obté, ja que es va perdent anticòs en els diferents passos de la purificació.

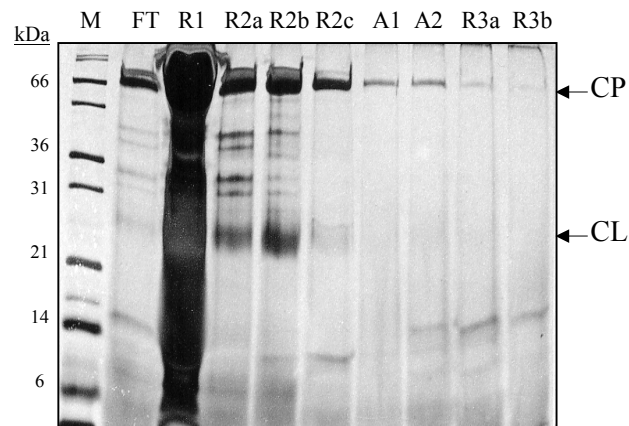


Fig. III.20 Purificació d'anticossos per columna d'afinitat. Gel SDS-PAGE 15% tenyit amb plata on: (M) marcador de pes molecular, (FT) *flow through*, (R1) rentat amb 10 mM Tris pH 7,5, (R2a-R2c) rentat amb 0,5 M NaCl, 10 mM Tris pH 7,5, (A1-A2) elució d'anticossos amb 100 mM glicina pH 2,5, (R3a-R3b) rentat amb 10 mM Tris pH 8,8, (CP i CL) indiquen la posició de les cadenes pesants i lleugeres de l'anticòs respectivament (v. protocol 31 per a més detalls).

Els anticossos purificats per afinitat no eren totalment específics. Tot i que reaccionaven amb diferents formes de nucleoplasmina, continuaven tenint reaccions encreuades amb el lisozim d'ou i també amb algunes proteïnes presents als extractes bacterians d'*E. coli*. D'altra banda, també es va voler determinar l'activitat de l'anticòs secundari antigallina per tal de controlar-ne l'especificitat a l'hora de reconèixer exclusivament els anticossos de gallina i no altres proteïnes.

Anticòs secundari antigallina

En els experiments inicials s'utilitzava un anticòs secundari sencer (Donkey anti-chicken IgG), que ja feia uns anys que funcionava. Vam decidir adquirir un nou anticòs (F(ab')₂ Donkey anti-chicken) que només contenia la regió variable, per tal

d'intentar aconseguir una reacció més específica. Es va provar l'especificitat d'aquest anticòs secundari fent-lo reaccionar amb diverses proteïnes control, tal com es mostra a la figura III.21.

Si l'anticòs secundari fos totalment específic per a les IgY, en el control d'IgY hauríem de veure únicament dues bandes corresponents a les cadenes pesants i lleugeres de les immunoglobulines. Contràriament hem vist que aquest anticòs no només reacciona amb les IgY sinó també amb altres proteïnes presents a l'extracte cru dels anticossos de gallina, cosa que posa de manifest que no és específic únicament contra els anticossos de gallina, sinó que té reacció encreuada amb algunes proteïnes de l'ou.

L'anticòs secundari, però, no reacciona amb cap de les proteïnes control: lisozim, albúmina i nucleoplasmina. Per tant, és adequat com a anticòs secundari per treballar amb la nucleoplasmina.

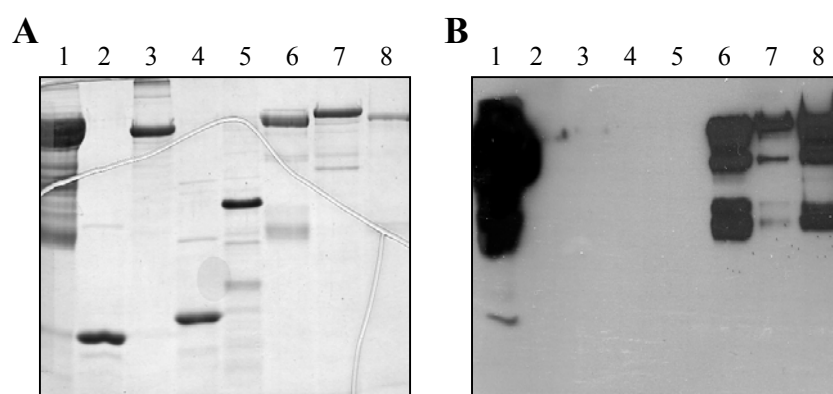


Fig. III.21 Anticòs secundari antigallina. **A)** Gel SDS-PAGE 15% on: (1) extracte cru d'anticossos de gallina, (2) lisozim d'ou, (3) BSA, (4) r-NP121, (5) r-NP, (6) fracció precipitada al 25% de SA, (7) fracció soluble al 50% de SA, (8) IgY purificada per afinitat. **B)** Transferència Western corresponent al gel anterior (s'ha utilitzat $F(ab')_2$ Donkey anti-chicken dilució 1:40.000)

4.2 Immunodetecció de proteïnes *nucleoplasmin-like*

Per a les diferents proves que es presenten en aquest apartat s'han utilitzat anticossos antinucleoplasmina obtinguts en ous de gallina i purificats mitjançant columna d'afinitat.

Els anticossos obtinguts poden reconèixer les diferents formes de nucleoplasmina recombinant, r-NP, r-NP142 i r-NP121, i també la NP nativa de *X. laevis* (v. fig. III.22).

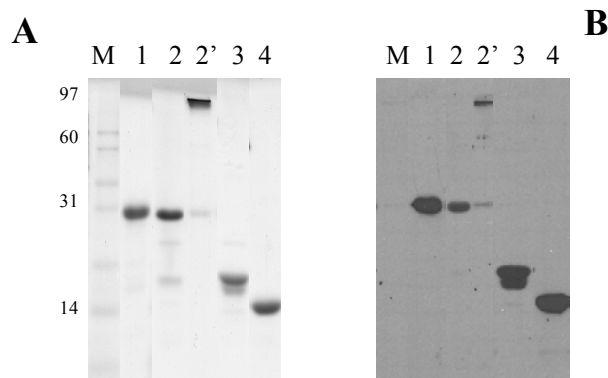


Fig. III.22 Transferència Western (variants de NP). **A)** SDS-PAGE 15% on: (M) marcador de pesos moleculars (en kDa), (1) NP de *X. laevis* bullida abans de carregar al gel, (2) r-NP bullida, (2') r-NP sense bullir, (3) r-NP142 bullida, (4) r-NP121 bullida. **B)** Transferència Western corresponent.

S'han fet una sèrie d'assajos per aportar proves sobre la possible naturalesa *NP-like* de determinades proteïnes procedents dels extractes d'oòcits de diferents espècies. Aquest treball s'ha fet en col·laboració amb el Dr. Manel Chiva i M. José Zamora (Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Bellvitge).

Les espècies escollides van ser la granota *Rana perezi*, l'estrella de mar *Echinaster sepositus* i el peix *Dicentrarchus labrax*:

- S'ha trobat nucleoplasmina a diferents espècies d'amfibis (Khrone i Franke, 1980a i b). Les espècies del gènere *Rana* es caracteritzen pel fet de tenir histones al nucli espermàtic. Katagiri i col·laboradors (Itoh et al., 1997) en estudis amb la granota *R. catesbeiana*, van demostrar que la NP no extreia histones espermàtiques però promovia l'extracció parcial de variants específiques de la histona espaiadora H1. Concretament, la granota *R. perezi* no ha estat examinada fins avui i vam creure interessant determinar si existia, en els extractes d'oòcits d'aquesta espècie, una proteïna immunològicament reactiva amb els anticossos antinucleoplasmina.

- També vam considerar d'interès examinar la presència de possibles proteïnes *NP-like* als extractes d'oòcits del peix *D. labrax*. Hi ha diferents estudis en els quals es mostra que la nucleoplasmina de *X. laevis* és capaç de descondensar nuclis espermàtics de *D. labrax* i extreure'n la protamina que empaqueta la cromatina (Prieto et al., 2002) i, per tant, seria probable l'existència d'alguna proteïna amb funcions similars a les de la nucleoplasmina en els oòcits d'aquesta espècie.

- D'altra banda, vam estudiar la proteïna majoritària trobada als oòcits de l'estrella de mar *E. sepositus*. Es tracta d'una proteïna àcida, termoestable i parcialment resistent al sulfat amònic (v. III-3.2). Vam voler esbrinar si aquesta proteïna estava immunològicament relacionada amb la nucleoplasmina.

A la figura III.23 es mostren algunes de les transferències Western obtingudes tant a partir d'extractes termoestables d'òocits de les diferents espècies estudiades.

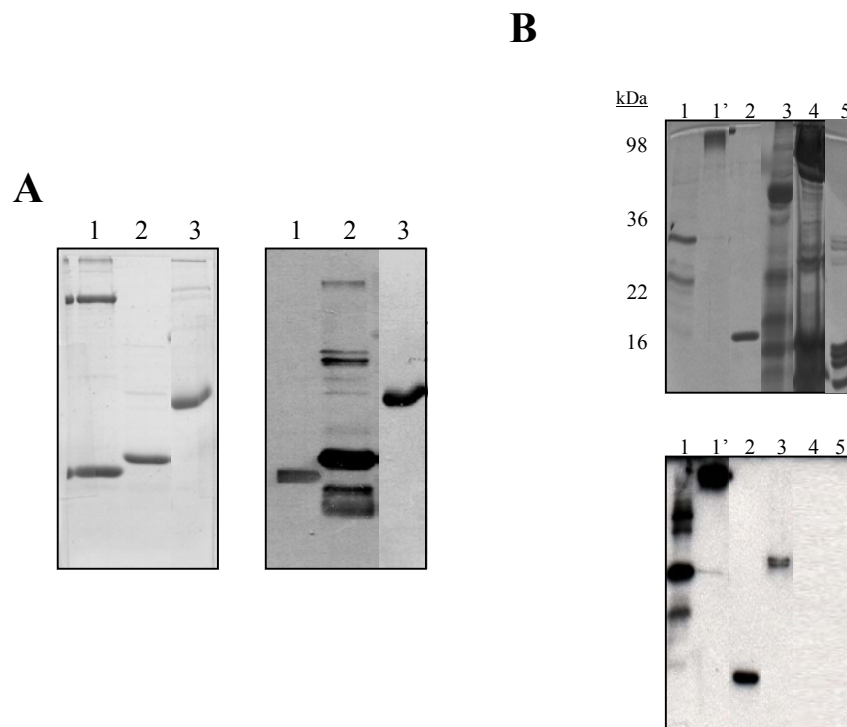


Fig. III.23 Transferència Western de diferents extractes termoestables d'òocits. A) (esquerra) SDS-PAGE 15% on: (1) control negatiu amb BSA i lisozim, (2) r-NP121, (3) extracte d'òocits d'*Echinaster sepositus*; (dreta) transferència Western corresponent. **B)** (superior) SDS-PAGE 15% on: (1) r-NP de Dingwall, (1') mostra anterior no bullida abans de carregar al gel, (2) r-NP121, (3) extracte d'òocits de *Rana perezi* (4) extracte d'òocits de *Dicentrarchus labrax*, (5) control d'histones d'eritròcit de pollastre; (inferior) transferència Western corresponent.

Als extractes de *R. perezi* es va trobar reacció amb una banda majoritària de pes molecular al voltant de 36 kDa quan s'incubaven amb anticossos anti-r-NP121 obtinguts en ous de gallina. Un experiment en paral·lel realitzat mitjançant anticossos obtinguts en conill (cedits pel Dr. Joan Ausió, Universitat de Victoria, Canadà) va donar reactivitat amb una banda d'aproximadament 100 kDa molt semblant a la del pentàmer de nucleoplasmina. La discrepància en la detecció de proteïnes de *R. perezi* mitjançant dos anticossos diferents, podria ser deguda al fet que aquests anticossos són capaços de reconèixer dues regions diferents de la mateixa proteïna. Així, podríem pensar que l'anticòs obtingut en gallina (que va ser immunitzada amb proteïna r-NP121 desnaturalitzada i en forma de monòmer) seria més específic per al monòmer

de la nucleoplasmina. D'altra banda, l'anticòs obtingut en conill (que va ser immunitzat amb proteïna r-NP pentamèrica) reconeixeria millor algun domini present en el pentàmer de nucleoplasmina. S'han de fer més estudis fisicoquímics i funcionals per caracteritzar millor les proteïnes immunodetectades a *R. perezi*.

D'altra banda, als extractes provinents d'oòcits de *D. labrax* en cap cas no s'ha trobat reacció amb els anticossos antinucleoplasmina. Per tant, podem dir que a *D. labrax* no existeix cap proteïna immunològicament relacionada amb la nucleoplasmina.

Quant a l'estrella de mar *E. sepositus*, quan s'han utilitzat anticossos anti-r-NP121 obtinguts en gallina s'ha trobat reacció amb la banda majoritària de proteïna present als oòcits. En canvi, quan s'han utilitzat els anticossos obtinguts en conill (descrits anteriorment) no s'observa cap reacció. Per tant, no podem afirmar que la reacció de l'anticòs obtingut en gallina sigui específica contra la proteïna de l'estrella.

Treballs previs amb l'equinoderm *Holothuria tubulosa* realitzats al nostre laboratori van permetre detectar la proteïna PR ϕ_0 , capaç de remoure la proteïna específica ϕ_0 i descondensar la cromatina espermàtica d'*H. tubulosa* (del Valle, 1999; del Valle et al., 2003). La proteïna PR ϕ_0 no és funcional en la descondensació de nuclis espermàtics de *Dicentrarchus labrax*, com tampoc ho és la NP a l'hora de descondensar nuclis espermàtics d'*H. tubulosa*. El model de remodelació de la cromatina espermàtica a *H. tubulosa* (nucleohistona) seguiria mecanismes diferents dels de *X. laevis*.

5. ESTUDI DE LES CISTEÏNES DE LA NUCLEOPLASMINA

A l'interior d'*E. coli* hi ha un ambient reductor. Així doncs, les proteïnes sintetitzades pel bacteri no tindran ponts disofre en la seva estructura ja que es necessita un ambient oxidant perquè es puguin formar. Una vegada alliberades les proteïnes al medi, la presència d'oxigen pot facilitar la formació de ponts disofre entre residus de cisteïna.

5.1 Mutagènesi dirigida de les cisteïnes

En una primera aproximació per determinar la presència de ponts disofre en la nucleoplasmina, es van obtenir mutants per a les cisteïnes de la forma r-NP142 i de les seves variants amb presència d'etiquetes d'histidines. Es van mutar de manera independent les tres cisteïnes de la molècula, situades en les posicions 15, 35 i 45, es van substituir per serines i es van obtenir els mutants C15S, C35S i C45S. Es va analitzar la capacitat de pentamerització dels diferents mutants mitjançant PAGE nativa (v. fig. III.24) i es va observar que la mutació de la Cys en posició 45 afectava

la pentamerització de les diferents variants de r-NP142. Aquest resultat va fer pensar en la possible existència d'un pont disofre entre monòmers implicat en la pentamerització.

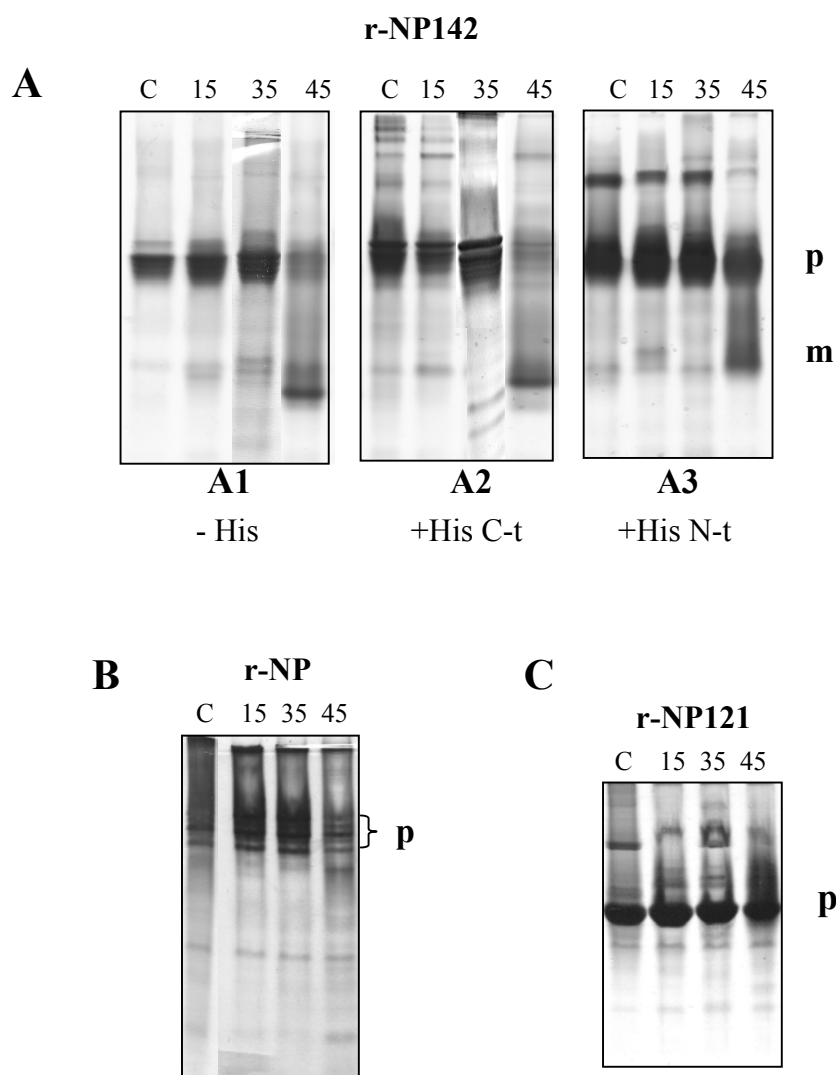


Fig. III.24 Mutagènesi dirigida de Cys. PAGE 10% nativa on: **A)** r-NP142 (A1) sense histidines, (A2) +His C-t, (A3) +His N-t, **B)** r-NP, **C)** r-NP121; (C) control no mutat, (15, 35, 45) posició de la Cys mutada a Ser, (p) pentàmer, (m) monòmer.

Seguidament es va decidir estudiar l'efecte de la mutació de les diferents cisteïnes a les formes r-NP i r-NP121. Com es pot observar a la figura III.24, la capacitat de pentamerització d'aquestes formes no va quedar afectada per cap de les mutacions descrites anteriorment. Aquests resultats indiquen que no hi hauria ponts disofre implicats en la pentamerització de la nucleoplasmina.

El fet que la forma r-NP142 es mostri extremadament sensible a la mutació C45S podria ser degut a la gran inestabilitat d'aquesta molècula. Cal tenir en compte que la Cys 45 es troba en una regió de contacte entre monòmers, segons l'estructura cristal·logràfica publicada per Dutta et al. (2001) (v. fig. III.25). El fet de mutar aquesta cisteïna en una forma de nucleoplasmina ja de per si inestable podria dificultar la formació de pentàmers.

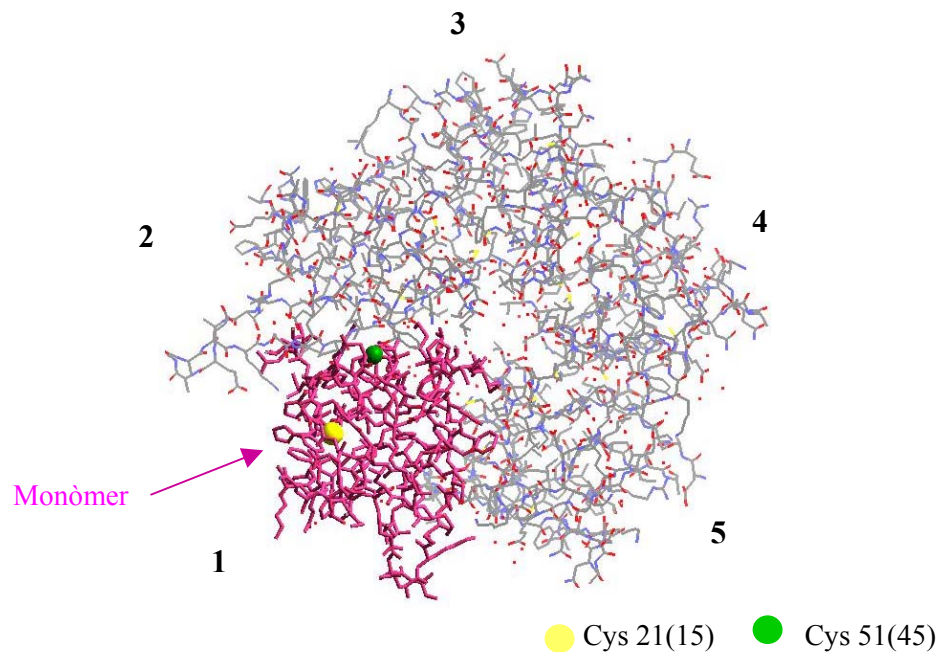


Fig. III. 25 Posició de les Cys en l'estructura cristal·logràfica de la NP. Estructura del pentàmer del nucli *core* de la nucleoplasmina segons Dutta et al. (2001). (1-5) indica la posició dels cinc monòmers de la molècula. En un dels monòmers s'indica la posició de la Cys 21 i 51 del clon de Dingwall (1987), corresponents a les Cys 15 i 45, respectivament, en el clon de Bürglin (1987) (v. fig. I.9). La Cys 31(35) no es mostra en l'estructura cristal·logràfica ja que es troba en una regió desordenada que no es va poder visualitzar en el cristall. La imatge s'ha obtingut amb el programa CERIU.S.

L'obtenció de dobles mutants C15,35S no va tenir efectes en la pentamerització de cap de les formes de nucleoplasmina recombinant estudiades (resultats no mostrats). Aquests resultats indiquen que les Cys 15 i 35 no tindrien cap paper important en l'estructura pentamèrica de la molècula.

5.2 Estudis del mutant r-NP142 C45S

Es van fer una sèrie d'estudis amb el mutant r-NP142 C45S per intentar esbrinar l'origen de la seva inestabilitat i estudiar-ne el comportament en diferents condicions.

5.2.1 Estudis d'estabilitat tèrmica en diferents tampons

S'han fet proves de tractament dels extractes bacterians a diferents temperatures: 65 °C, 75 °C i 80 °C i utilitzant diferents solucions com aigua, Tris 20 mM pH 7,5 i Hepes 20 mM pH 7,5.

No s'han vist diferències apreciables en el grau de monomerització de la proteïna en augmentar la temperatura; per tant, la presència de la mutació C45S no provoca canvis en la termoestabilitat de la proteïna. Tampoc el canvi de tampó no ha afectat de manera notable el grau de pentamerització de la forma r-NP142 C45S, tot i que algun cop les mostres en presència d'Hepes 20 mM pH 7,5 veuen lleugerament afavorida la capacitat de pentamerització. Cal destacar que els cristalls de nucleoplasmina s'han obtingut en presència de tampó Hepes (v. III-9.1).

5.2.2 Proves de reducció

Es va voler determinar la influència dels agents reductors en la pentamerització. Estudis previs fets amb la forma r-NP142+His C-t mostraven que aquesta podia recuperar la capacitat de pentamerització quan s'afegia al medi una certa quantitat d'agent reductor (20 mM DTT) (v. fig. III.26A). Per comprovar si aquest efecte es repetia en el mutant C45S, aquest es va incubar amb 20 mM DTT i es va analitzar mitjançant PAGE nativa (v. fig. III.26B). La figura mostra que també en aquest cas la presència de l'agent reductor afavoreix la transició cap a la forma pentamèrica de la molècula.

Aquests resultats indicarien que en les mostres de r-NP142 que es troben lleugerament desestructurades i en forma de monòmer podrien donar-se ponts disofre inespecífics que impedirien la correcta pentamerització. La presència de 20 mM DTT trencaria els enllaços inespecífics formats i es tornaria a la conformació habitual per a la nucleoplasmina, cosa que li permetria la pentamerització.

Les mostres de r-NP sovint presenten agregats de pes molecular superior al pentàmer. Un efecte anàleg del DTT seria el que s'ha observat sobre aquests agregats de pes molecular més gran que el pentàmer (v. asteriscs fig. III.27). La incubació amb 20 mM DTT fa desaparèixer aquests agregats i permet obtenir les mostres íntegrament en forma de pentàmer. Els agregats de pes molecular superior al pentàmer estarien constituïts per la presència de ponts disofre inespecífics entre diferents pentàmers de

nucleoplasmina. En el cas del mutant r-NP142 C45S, que es troba majoritàriament com a monòmer, tornem a observar que la incubació amb DTT n'afavoreix la pentamerització (v. fig. III.27).

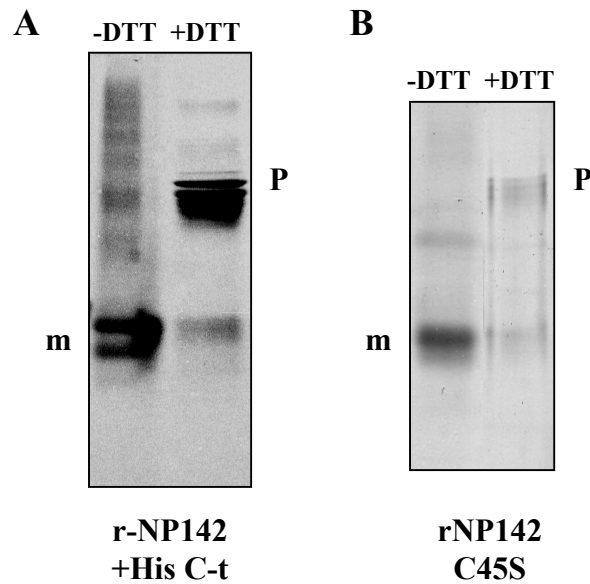


Fig. III.26 Influència del DTT en la pentamerització. PAGE 10% nativa **A)** r-NP142+His C-t. **B)** r-NP142 C45S, (m) monòmer, (p) pentàmer, (+DTT) 20 mM DTT.

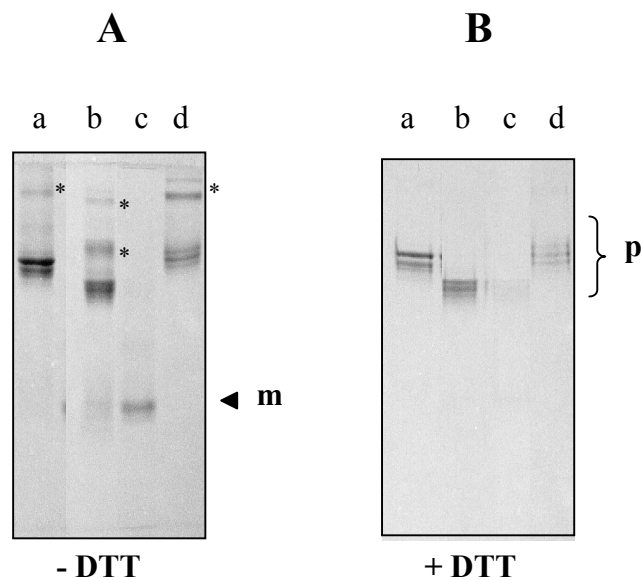


Fig. III.27 Influència del DTT en els agregats de NP. PAGE 10% nativa. **(A)** mostres control. **(B)** mostres tractades amb 20 mM DTT; a) r-NP142+His C-t, (b) r-NP142, (c) r-NP142 C45S, (d) r-NP, (p) pentàmers, (m) monòmer, (*) agregats.

5.2.3 Estudis conformationals

Per determinar si la mutació en la Cys 45 per Ser té algun efecte en l'estructura secundària de la forma r-NP142 C45S s'han fet estudis mitjançant dicroisme circular, els quals han mostrat que aquesta forma es troba majoritàriament plegada a l'atzar (*random coil*). (v. III-6.1.2)

5.2.4 Estudis funcionals

Es van incubar nuclis espermàtics de *Dicentrarchus labrax* amb mostres de r-NP142 C45S, tal com es descriu a l'apartat III-3.3.3. Les mostres de nucleoplasmina es van preparar a una concentració $5,8 \cdot 10^{-5}$ M en tampó EM (que correspon a una concentració aproximada de 0,9 mg/ml).

Com es reflecteix a la figura III.28, la forma mutant per a la Cys 45 es va mostrar inactiva en la descondensació de nuclis espermàtics de *D. labrax* en comparació amb la mostra de r-NP142 control no mutada. Aquests resultats indiquen que la conformació de la molècula de nucleoplasmina és un factor important a l'hora de determinar la seva funció.

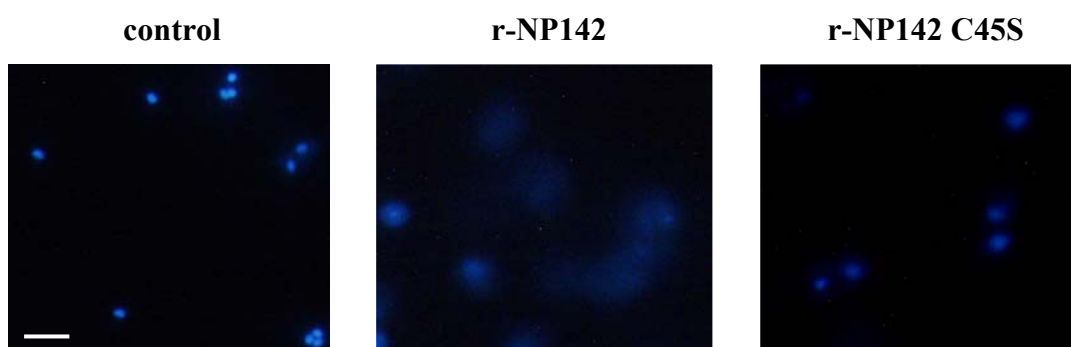


Fig. III.28 Incubacions de r-NP142 C45S amb nuclis espermàtics de *D. labrax*. Micrografies obtingudes al microscopi de fluorescència, on (A) nuclis espermàtics control incubats en tampó EM, (B) nuclis incubats amb r-NP142, (C) nuclis incubats amb r-NP142 C45S. La quantitat de nuclis espermàtics utilitzada va ser $3,6 \cdot 10^5$. La proteïna es va preparar aproximadament a 0,9 mg/ml en tampó EM. La barra correspon a una mida aproximada de 10 μm .

5.3 Quantificació dels grups sulfhidril lliures

S'ha utilitzat una modificació del mètode d'Ellman per determinar la quantitat de cisteïnes exposades de la nucleoplasmina i intentar identificar-les amb l'ajut dels diferents mutants de què disposem: r-NP C15S, r-NP C35S i r-NP C45S. Dels protocols presentats als materials i mètodes, el protocol 27 és el que ha donat resultats més reproduïbles.

La quantificació de les cisteïnes exposades en el control de r-NP donen un valor al voltant de 4-5 mols de Cys per mol de pentàmer de nucleoplasmina, cosa que indicaria que cada monòmer tindria una cisteïna exposada i dues d'enterrades a l'interior de la molècula. Aquests resultats estan d'acord amb el que s'havia descrit anteriorment per a la r-NP del clon de Dingwall (Hierro, 2002).

Quan s'han utilitzat els diferents mutants, s'ha vist que el que donava menys reactivitat amb el reactiu d'Ellman era la forma r-NP C35S. Això indicaria que la Cys en posició 35 estaria habitualment exposada i seria la que tindria més reactivitat amb el DTNB. Aquests resultats estan d'acord amb l'estructura cristal·logràfica (Dutta et al., 2001), on la Cys equivalent a la que es troba en posició 35 del clon de Bürglin es troba en un llaç desordenat de la molècula i, per tant, sembla que estaria exposada i, per tant, en contacte amb el medi.

Cal dir que els resultats obtinguts amb aquest mètode han portat molts problemes de reproductibilitat. Un factor clau quan es treballa amb el reactiu d'Ellman (DTNB) és l'absència d'oxigen en les mostres i tampons (Riddles et al., 1983). La presència d'oxigen pot provocar una reoxidació de l'ió TNB^{2-} que podria tornar a formar DTNB i emascarar els resultats de la quantificació. És convenient bombollear amb N_2 el tampó abans de preparar les mostres, i idealment tot el procés de preparació de mostres i anàlisi a l'espectrofotòmetre s'hauria de fer en atmosfera de nitrogen.

6. ESTUDIS CONFORMACIONALS

6.1 Anàlisi de l'estructura secundària per dicromisme circular

6.1.1 Dicromisme circular de diferents formes de nucleoplasmina recombinant

S'ha utilitzat la tècnica de dicromisme circular per determinar l'estructura secundària de diferents variants de nucleoplasmina. Per a tots els experiments de dicromisme circular s'han utilitzat les condicions que es mostren a la taula III.5, totes les mostres s'han dialitzat enfront del tampó EM (100 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 10 mM

Tris pH 7,4) i s'ha utilitzat el tampó del darrer pas de diàlisi com a tampó de referència. Tots els experiments de dicromisme circular presentats a l'apartat III-6.1 es van fer al laboratori del Dr. Joan Ausió (Universitat de Victoria, Canadà).

Els resultats de dicromisme circular s'han expressat en el·lipticitat molar per residu, valor que s'obté introduint els paràmetres: longitud de la cubeta i concentració molar per residu (cMr), que es calcula a partir del quocient $c / (M/nr)$, on (c) és la concentració (g/L), (M) és el pes molecular i (nr) és el nombre d'aminoàcids. Els diferents valors per M/nr es troben a la taula III.5 i els diferents espectres obtinguts es mostren a la figura III.29.

Taula III.5 Paràmetres utilitzats per als assajos de dicromisme circular.

M/nr indica el pes molecular per residu (quocient entre el pes molecular i el nombre de residus) (v. taula III.1).

Dicromisme circular		
Condicions	Relació M / nr	
aparell: Jasco J-720	<u>mostra</u>	<u>M/nr</u>
temperatura: 20 °C	r-NP	111,3
amplada de banda: 1 nm	r-NP+His N-t	112,2
longitud d'ona: 190-260 nm	r-NP+His C-t	112,2
temps de resposta: 8 segons	r-NP142	112,5
velocitat d'escaneig: 2 nm/min	r-NP142+His N-t	113,5
sensibilitat: 5 mdeg	r-NP142+His C-t	113,6
resolució: 0,1 nm	r-NP121	111,6
nre. acumulacions: 1	r-NP121+His N-t	112,8
cubeta: 1 mm (circular)	r-NP121+His C-t	112,9

S'han comparat els diferents espectres de dicromisme circular (DC) obtinguts amb l'espectre model de la polilisina (Townend et al., 1966) (fig. III.29A). L'espectre de DC de la forma r-NP mostra un pic amb un mínim d'el·lipticitat molar situat a 198 nm. Les formes r-NP142 i r-NP121 tenen el pic d'el·lipticitat molar desplaçat cap a 215 nm, característic de la làmina beta (fig. III.29B, C i D). El desplaçament del mínim d'el·lipticitat molar cap a longituds d'ona més elevades en els mutants per deleció C-terminal reflecteix una major contribució de la làmina beta a la regió N-terminal de la nucleoplasmina, resultat que està d'acord amb les dades cristal·logràfiques (Dutta et al., 2001) i amb els resultats publicats per altres autors (Hierro et al., 2001).

S'han utilitzat diferents programes per descompondre els espectres obtinguts en els diferents components d'estructura secundària: hèlix alfa, làmina beta, girs i estructures plegades a l'atzar (*random coil*). A la taula III.6 es mostren alguns dels resultats obtinguts amb el programa CDPro (Sreerama i Woody, 2000) (v. II-7.1).

La descomposició dels espectres de DC mostra només un lleuger augment en l'estructura beta i una lleugera disminució de l'hèlix alfa i les formes a l'atzar en els mutants per deleció C-terminal respecte a la forma sencera de la nucleoplasmina. Sembla que aquests resultats indiquen una subestimació de la quantitat de làmina beta per part del programa utilitzat, ja que, segons l'estructura cristal·logràfica de la nucleoplasmina (Dutta et al., 2001), la forma r-NP121 hauria de presentar al voltant del 50% de làmina beta. Cal tenir en compte, però, que els diferents assajos s'han fet amb formes de NP provinents del clon de Bürglin, les quals podrien tenir una estructura secundària lleugerament diferent de la NP de Dingwall. Està descrit que la majoria de mètodes per estimar el contingut dels diferents tipus d'estructura secundària són força acurats en les prediccions d'hèlix alfa, però donen més errors en la determinació de làmina beta i girs (Greenfield, 1996).

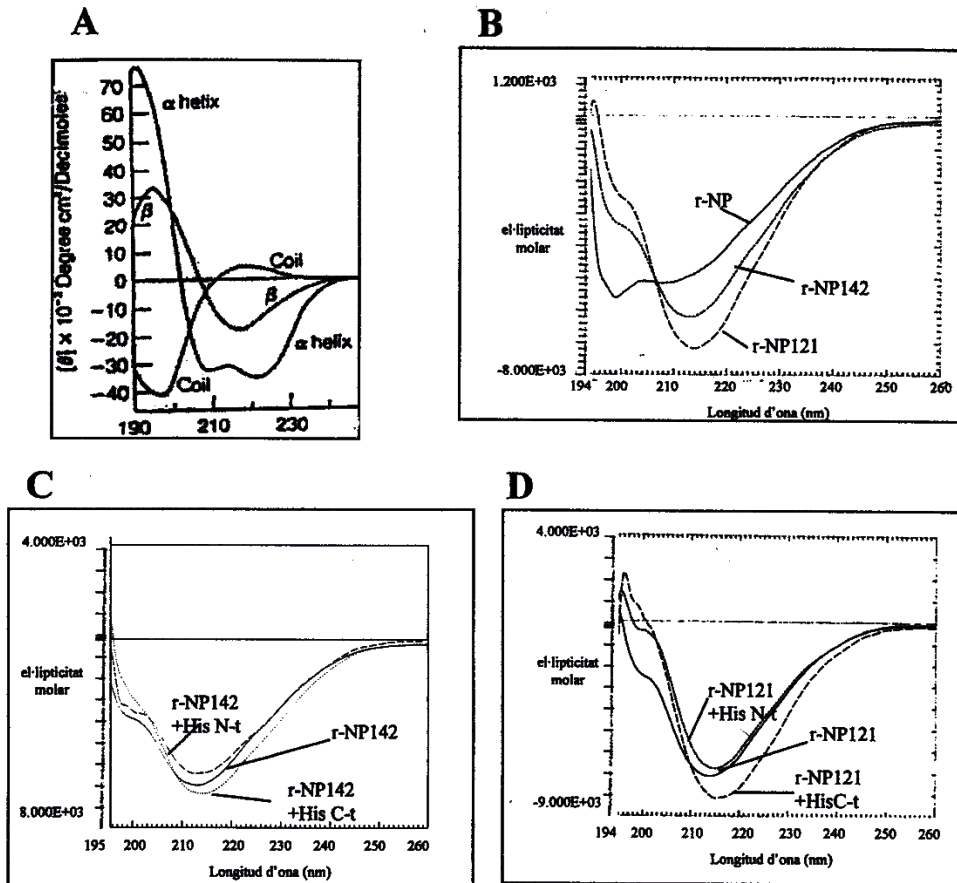


Fig. III.29 Espectres de dicroisme circular. **A)** Espectre de DC model per a la polilisina (Townend et al., 1966). **B)** Espectres de DC per a la r-NP (continu), r-NP142 (puntejat), r-NP121 (ratllat). **C)** Espectres de DC per a r-NP142 (continu), r-NP142+His C-t (puntejat), r-NP142+His N-t (ratllat). **D)** Espectres de DC per a r-NP121 (continu), r-NP121+His C-t (ratllat) i r-NP+His N-t (puntejat). L'el·lipticitat molar s'expressa en $\text{deg}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$ i s'ha corregit pel nombre de residus.

Taula III.6 Descomposició d'espectres de DC. Es mostren els resultats obtinguts amb el programa CDPro per la descomposició dels espectres de DC que es mostren a la fig. III.29B.

Descomposició d'espectres de DC				
	% hèlix α	% làmina β	% girs	% a l'atzar
r-NP	9,53	30	22,13	39,4
r-NP142	9,2	33,4	23,1	33,7
r-NP121	8,7	33,1	23,25	34,4

Pel que fa a les formes amb etiquetes d'histidines, en la forma r-NP142+His C-t s'observa un lleuger increment (1,6%) en la proporció d'hèlix alfa respecte a la forma sense histidines (v. fig. III.29 i III.30). Aquesta diferència no s'observa quan les histidines se situen a l'extrem N-terminal. Pel que fa a la forma r-NP121, la presència d'histidines a l'extrem C-terminal també provoca un lleuger increment en la quantitat d'hèlix alfa (1%), alhora que es dona una disminució en la quantitat de làmina beta (3%) respecte a la forma sense histidines. Si les histidines es troben a l'extrem N-terminal, es registra un augment del 2%, respectivament, tant d'hèlix alfa com de làmina beta respecte a la forma sense histidines.

Aquests resultats indiquen que la presència d'etiquetes d'histidines pot provocar canvis en l'estructura secundària de la nucleoplasmina.

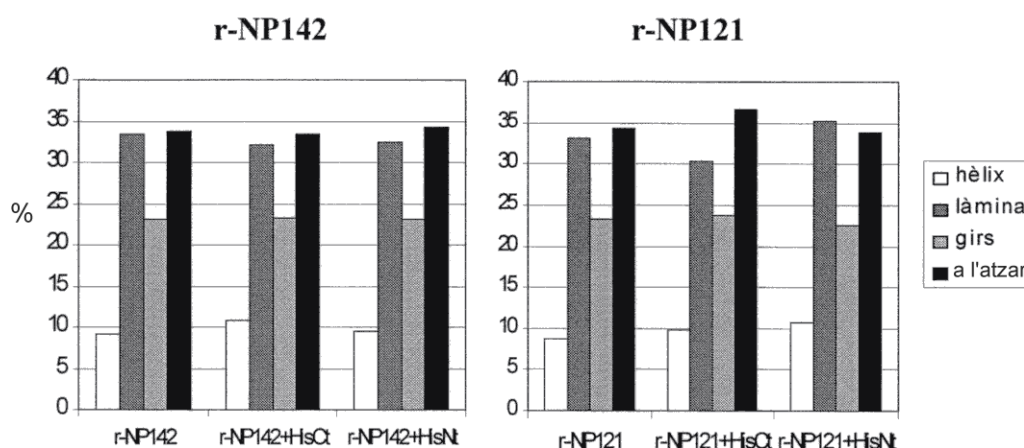


Fig. III.30 Descomposició d'espectres de DC de r-NP142 i r-NP121 amb presència d'etiquetes d'histidines. Es mostren els resultats obtinguts amb el programa CDPro per la descomposició dels espectres de DC que es mostren a les figures II.29C i D.

6.1.2 Dicroisme circular de r-NP142 C45S

A l'apartat III-5.1 es descriu que la mutació de la Cys en posició 45 per una serina provoca la monomerització de la forma r-NP142. Es va voler estudiar aquest mutant mitjançant dicroisme circular per veure si mantenia la seva estructura secundària. A la figura III.31 es mostren els espectres de DC del mutant obtinguts en diferents condicions i a la figura III.32 es mostren gràficament els resultats de la descomposició d'aquests espectres.

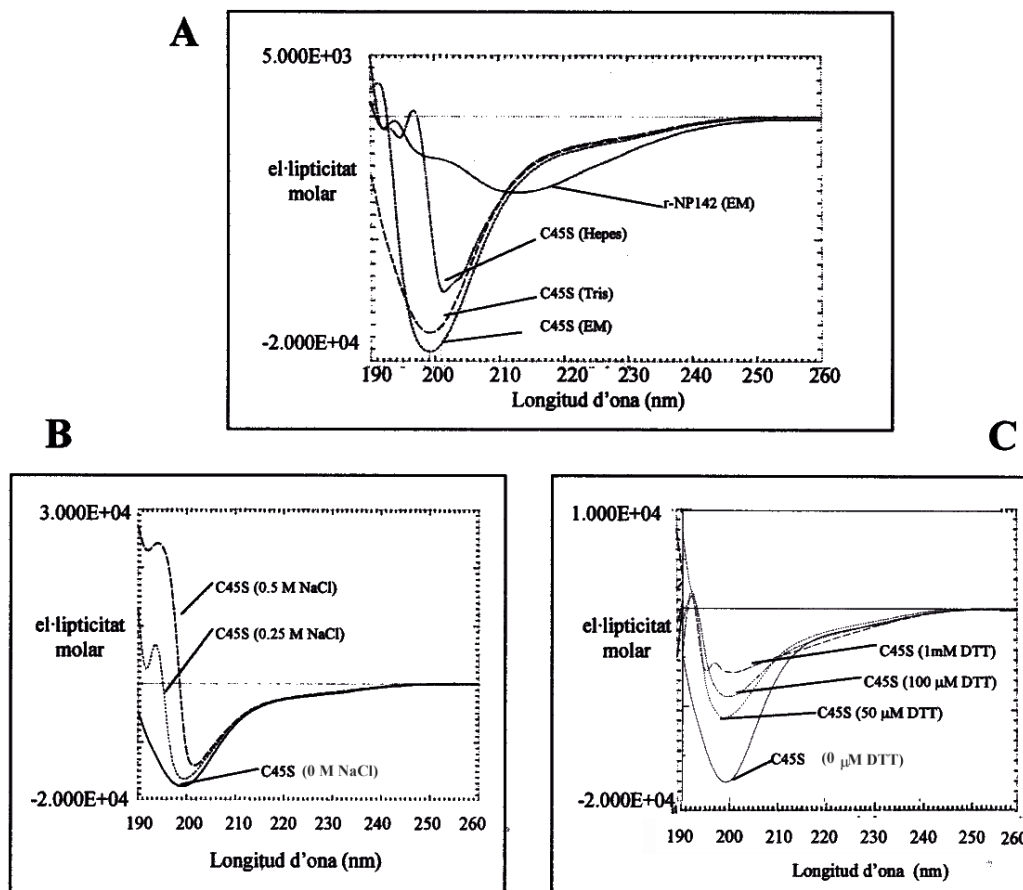


Fig. III.31 Dicroisme circular de r-NP142 C45S. A) Espectres de DC en diferents tampons: r-NP142 en tampó EM (continú) i r-NP142 C45S en tampó EM (puntejat), en Tris 20 mM pH 7,5 (ratllat) i en Hepes 20 mM pH 7,5 (semicontinu). B) Espectres de DC de r-NP142 C45S a diferent força iònica: Tris 20 mM pH 7,5 que conté 0 M NaCl (continú), 0,25 M NaCl (puntejat) i 0,5 M NaCl (ratllat). C) Espectres de DC de r-NP142 C45S a diferents concentracions de l'agent reductor DTT: Tris 20 mM pH 7,5 que conté 0 μ M DTT (continú), 50 μ M DTT (puntejat), 100 μ M DTT (ratllat) i 1 mM DTT (semicontinu). L'el·lipticitat molar s'expressa en $\text{deg}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$ i s'ha corregit pel nombre de residus.

L'espectre de dicroisme circular del mutant r-NP142 C45S mostra que aquesta forma està desestructurada (en plegament a l'atzar o *random coil*), amb un pic d'el·lipticitat negativa al voltant de 199 nm (compareu la fig. III.31A amb el model que es mostra a la fig. III.29A), el qual es desplaça cap a 201 nm en presència d'Hepes. La descomposició d'espectres mostra que, en presència d'Hepes 20 mM pH 7,5, es dona una disminució del 6% en la quantitat d'hèlix alfa i del 7% de les formes a l'atzar respecte a la mostra que es troba en tampó EM (100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris pH 7,5). En presència de tampó Tris 20 mM pH 7,5, la mostra presenta un 8% d'estructures a l'atzar respecte a la mostra amb Hepes. Aquests resultats indiquen que les mostres en tampó Hepes 20 mM pH 7,5 són les que tenen una proporció menor de plegament a l'atzar (*random coil*); per tant, sembla que l'Hepes afavoriria lleugerament el plegament de la proteïna.

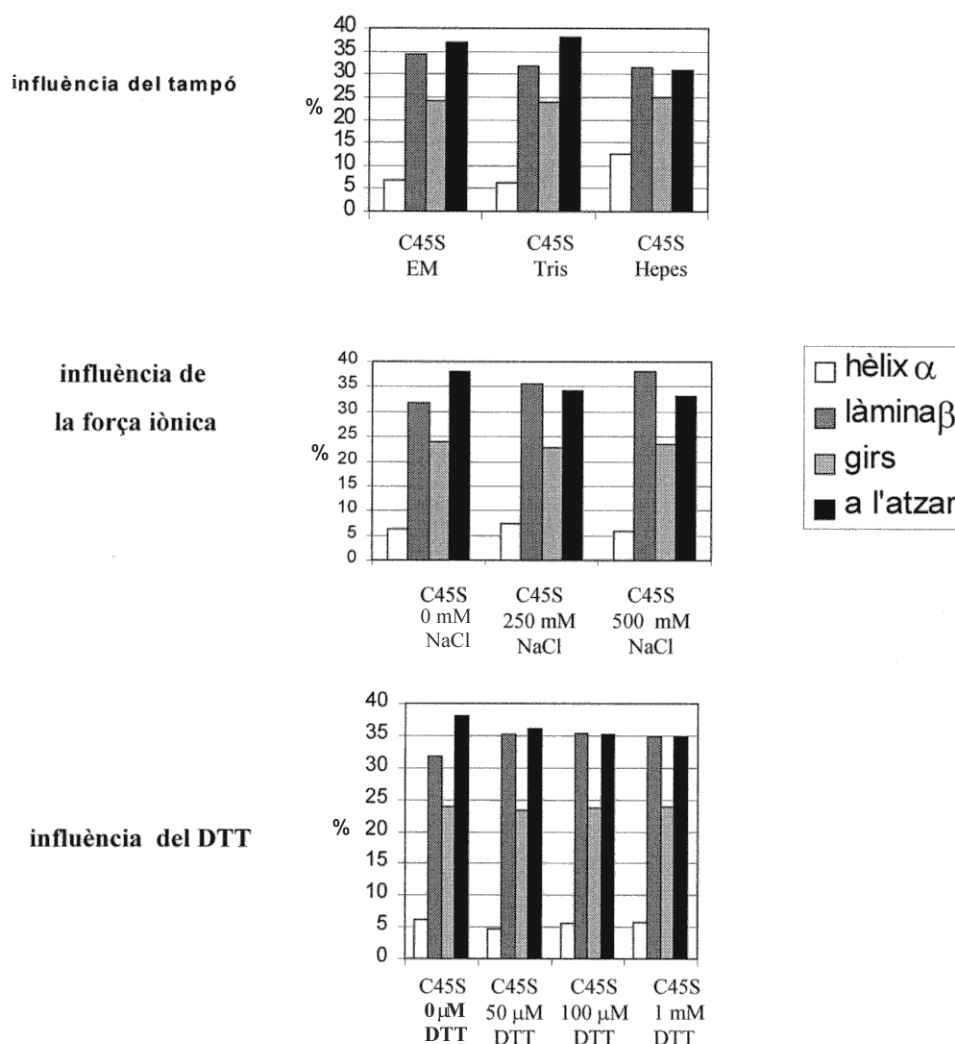


Fig. III.32 Dicroisme circular de r-NP142 C45S (descomposició d'espectres). Els resultats provenen de la descomposició dels diferents espectres mostrats a la figura III.31 mitjançant el programa CDPro. Les mostres amb 0 mM, 250 mM i 500 mM de NaCl i les mostres amb 0 μ M, 50 μ M, 100 μ M i 1 mM de DTT estan en tampó Tris 20 mM pH 7,5.

En augmentar la força iònica es produeix un lleuger desplaçament del pic d'el·lipticitat negativa cap a longituds d'ona lleugerament més grans. La descomposició d'espectres indica una disminució de les formes a l'atzar en un 3% i un increment en la quantitat de làmina beta en un 4% en presència de 250 mM de NaCl en Tris 20 mM pH 7,5 i fins a un 8% en presència de 500 mM de NaCl. Així doncs, l'augment de força iònica afavoriria lleugerament el plegament de la proteïna.

Es va voler determinar també la influència dels agents reductors en la reestructuració de la proteïna. Es van incubar diferents mostres en presència de 50 µM, 100 µM i 1 mM DTT en Tris 20 mM pH 7,5. A partir de la descomposició dels espectres de DC es va determinar que la presència d'agents reductors afavoria en tots els casos un increment en un 3% de làmina beta amb el respectiu decrement de formes a l'atzar.

6.1.3 Dicroisme circular de complexos de nucleoplasmina amb protamina

6.1.3.1 Dicroisme circular de r-NP+protamina

La nucleoplasmina s'uneix a proteïnes espermàtiques bàsiques (PEB) i les substitueix per histones durant la fecundació. Un tipus de PEB són les protamines. Hi ha diferents treballs en què s'estudia la interacció de la nucleoplasmina amb protamines de peixos (Iwata et al., 1999; Prieto et al., 2002).

En aquest treball es va voler estudiar la interacció de diferents formes de nucleoplasmina recombinant amb la protamina del peix *Dicentrarchus labrax* mitjançant dicroisme circular, per poder determinar possibles canvis en l'estructura secundària de la nucleoplasmina fruit de la interacció d'ambdues molècules. Les condicions experimentals utilitzades pel dicroisme circular són les mateixes que s'han descrit a l'apartat III-6.1 (v. taula III.5).

En els experiments de dicroisme circular se solen utilitzar cubetes de forma circular. Un dels inconvenients d'aquest tipus de cubetes és la dificultat de recuperar el 100% de la mostra una vegada realitzat l'experiment. Per als experiments amb la nucleoplasmina s'han utilitzat cubetes d'1 mm en les quals, una vegada recuperada la mostra, se solen perdre aproximadament 100 µl (d'un volum total de 1100 µl). Aquesta característica es va tenir en compte a l'hora de dissenyar l'experiment. A la taula III.7 es detallen les quantitats de mostra utilitzades i els resultats obtinguts es presenten a la figura III.33.

Les protamines són proteïnes molt bàsiques i tenen una estructura que presenta plegament a l'atzar (*random coil*), tal com es mostra a l'espectre de dicroisme circular de la figura III.33C. Però quan les protamines s'uneixen al DNA o a altres proteïnes, podrien adoptar una estructura en hèlix alfa (Verdaguer et al., 1993).

Taula III.7 Dicroisme circular r-NP/protamina. Totes les mostres s'han dialitzat enfront de tampó EM (100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris pH 7,4); el tampó provinent del darrer pas de diàlisi s'utilitza com a blanc. La protamina es prepara a 1 mg/ml segons la relació DO₂₃₀ = 2,12 → 1 mg/ml i la r-NP a 0,16 mg/ml segons la relació DO₂₇₆ = 0,62 → 1 mg/ml. El pentàmer de r-NP té un pes molecular de 110229 Da i la protamina de *D. labrax* té un pes molecular de 4547,66 Da.

DC r-NP/protamina			
mols protamina/r-NP	ml r-NP	µg r-NP	µl de protamina (= µg)
0	2,1	332	0
0,36	2,0	316	4,7
0,72	1,9	300	4,47
1,08	1,8	284	4,23
1,44	1,7	267	4
1,8	1,6	253	3,76
2,16	1,5	237	3,52

Els espectres de dicroisme circular dels complexos r-NP/protamina mostren una disminució progressiva de l'el·lipticitat molar, que es va fent més negativa a mesura que augmenta la quantitat de protamina (v. fig. 33A). Aquesta disminució es reflecteix gràficament en la representació dels valors d'el·lipticitat a 198 nm (v. fig. III.33B).

La descomposició d'espectres va posar de manifest un lleuger increment en la quantitat d'hèlix alfa (aproximadament un 1,5%) i una disminució del 3% de làmina beta en el complex format per 2,16 mols de protamina per pentàmer de nucleoplasmina.

No va ser possible continuar l'experiment a concentracions més elevades de protamina per comprovar si la disminució d'el·lipticitat molar s'estabilitzava o bé es produïa algun altre canvi en l'espectre de la nucleoplasmina. D'altra banda, cal tenir en compte que l'espectre de la protamina presenta un pic d'el·lipticitat negativa a 202 nm, molt pròxim al pic característic de la r-NP a 198 nm, i en aquesta regió hi podria haver un solapament dels espectres de les dues proteïnes que complicaria la interpretació dels resultats. Malauradament, no es disposava dels espectres individuals per a la protamina a cada una de les concentracions de treball per restar-los de l'espectre obtingut a partir dels complexos.

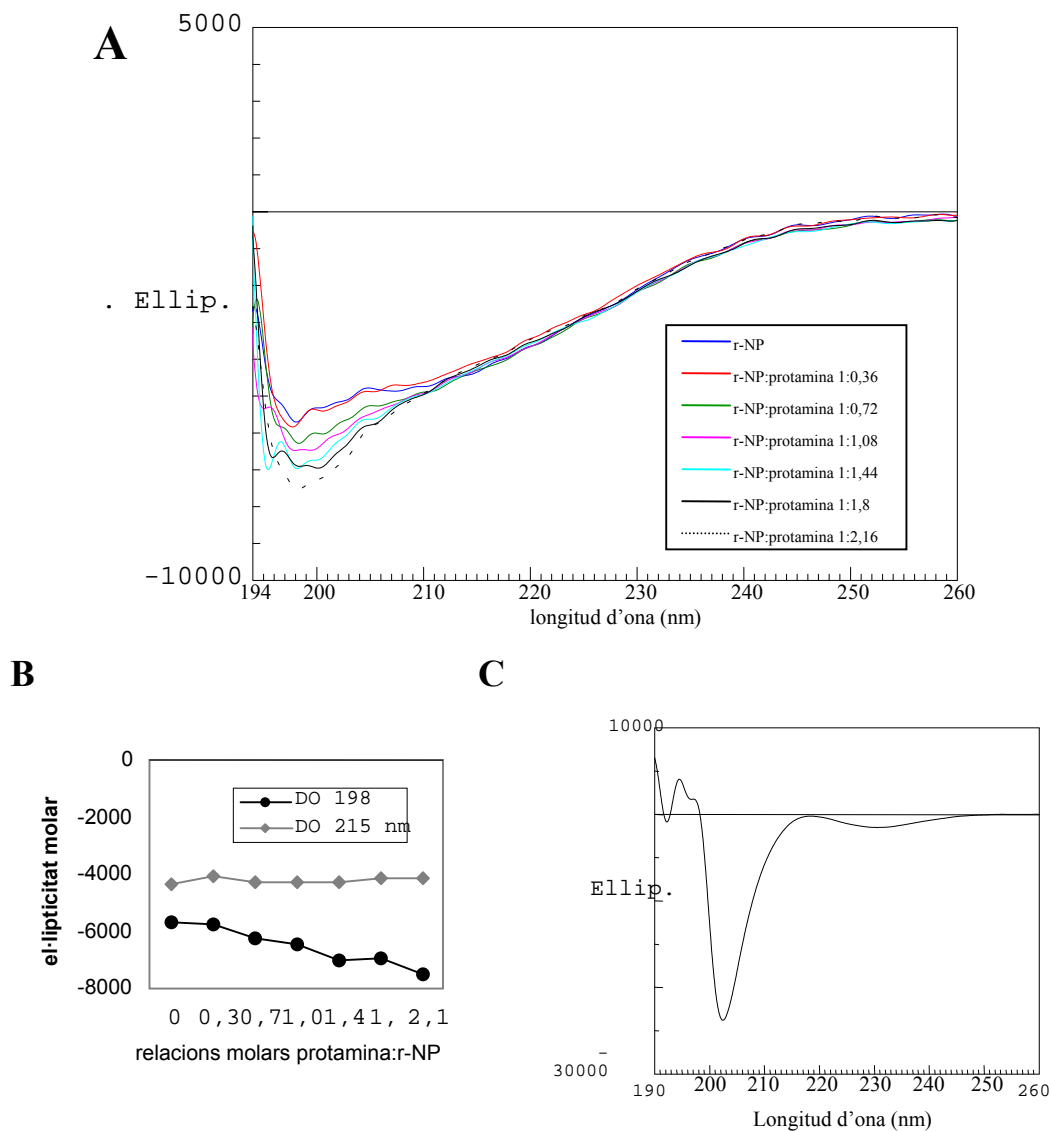


Fig. III.33 Dicroisme circular de complexos r-NP/protamina. A) Espectres de dicroisme circular de r-NP (pentàmer) a diferents relacions molars de protamina. Els valors d'el·lipticitat molar s'expressen en $\text{deg}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$ i estan corregits pel nombre de residus. B) Representació gràfica dels valors puntuals d'el·lipticitat molar a 198 nm i 215 nm. C) Espectre de dicroisme circular de la protamina de *D. labrax*.

6.1.3.2 Dicroisme circular de r-NP121+protamina

La forma r-NP121, a la qual manca el tram acídic principal A2, és capaç d'unir protamina de *D. labrax* a la mateixa relació estequiomètrica que la r-NP sencera (2,5 mols de protamina per pentàmer de nucleoplasmina) (Prieto et al., 2002).

Es va voler determinar mitjançant dicroisme circular si la unió de la r-NP121 i la protamina provocava algun canvi en l'estructura secundària de la r-NP121. Les condicions utilitzades per a l'experiment han estat les mateixes que ja s'han explicat a l'apartat anterior. A la taula III.8 es detallen les quantitats de mostra utilitzades i els resultats obtinguts es presenten a la figura III.34.

Taula III.8 Dicroisme circular r-NP121/protamina. Totes les mostres s'han dialitzat enfront de tampó EM (100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris pH 7,4); el tampó emprat en el darrer canvi de la diàlisi s'utilitza com a blanc. La protamina es prepara a 1 mg/ml segons la relació DO₂₃₀ = 2,12 → 1 mg/ml, i la r-NP121, a 0,13 mg/ml segons la relació DO₂₇₆ = 1,01 → 1 mg/ml. El pentàmer de r-NP121 té un pes molecular de 67502 Da i la protamina de *D. labrax* té un pes molecular de 4547,66 Da.

DC r-NP121/protamina			
mols protamina/r-NP121	ml r-NP12	µg r-NP121	µl de protamina (= µg)
0	2,2	286	0
0,46	2,1	273	8,4
0,92	2	260	8
1,38	1,9	247	7,6
1,84	1,8	234	7,2
2,3	1,7	221	6,8
2,76	1,6	208	6,4

L'espectre de dicroisme circular de la forma r-NP121 presenta un pic d'el·lipticitat negativa a 215 nm, característic de la làmina beta. En anar augmentant la concentració de protamina s'observa un augment en l'el·lipticitat a 215 nm i una disminució progressiva de l'el·lipticitat a 198 nm. Cal destacar que la disminució d'el·lipticitat molar a 198 nm és més marcada que la que es va observar per a la r-NP sencera.

Mitjançant la descomposició dels espectres de dicroisme, es va determinar un increment de fins al 6% en la quantitat d'hèlix alfa en el complex amb relació molar protamina: r-NP121 (2,76:1) respecte a la r-NP121 en absència de protamina, i una disminució de fins al 3% en la quantitat de làmina beta. Aquest resultat es podria interpretar com un canvi estructural tant de la molècula de nucleoplasmina com de la protamina amb tendència a adoptar una estructura helicoïdal, fruit de la interacció d'ambdues molècules.

Cal tenir en compte que els espectres de dicroisme circular de complexos de proteïnes són difícils d'interpretar sobretot si les proteïnes estudiades tenen pics d'el·lipticitat característics que es poden solapar, ja que es troben en regions de longituds d'ona properes, com és el cas de la r-NP i la protamina.

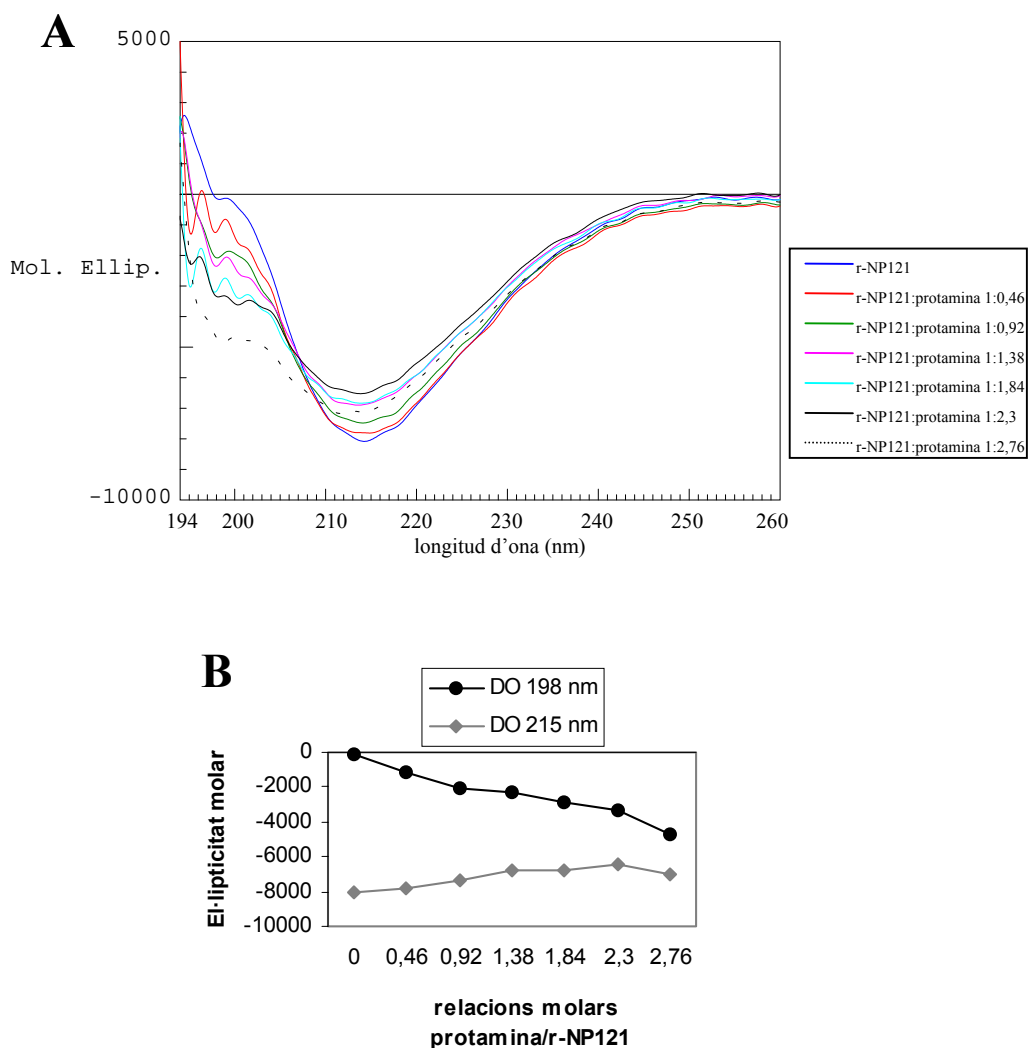


Fig. III.34 Dicroisme circular de complexos r-NP121/protamina. A) Espectres de dicroisme circular de r-NP121 (pentàmer) a diferents relacions molars de protamina. Els valors d'el·lipticitat molar s'expressen en $\text{deg}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$ i estan corregits pel nombre de residus. B) Representació gràfica dels valors puntuals d'el·lipticitat molar a 198 nm i 215 nm.

6.2 Anàlisi de la capacitat de pentamerització

S'ha estudiat la capacitat de pentamerització de les diferents variants de la nucleoplasmina mitjançant dues tècniques: PAGE nativa i velocitat de sedimentació a la ultracentrifuga analítica.

6.2.1 PAGE nativa

Mitjançant gels de poliacrilamida natius, s'ha determinat la capacitat de pentamerització i formació d'oligòmers de les diferents formes de nucleoplasmina recombinant, tal com es mostra a la figura III.35.

En general, totes les mostres de nucleoplasmina tenen una certa proporció d'agregats de més pes molecular que el pentàmer. La presència d'una etiqueta d'histidines a l'extrem amino terminal de la nucleoplasmina augmenta la formació d'agregats. Aquest fenomen es pot observar sobretot a la mostra r-NP121+His N-t. La pentamerització de la nucleoplasmina es dona per l'extrem amino terminal (Dingwall et al., 1987); per tant, la presència d'una etiqueta d'histidines en aquesta regió pot alterar la pentamerització de la molècula.

Per estudiar la capacitat de pentamerització d'una manera més quantitativa, es van fer assajos de velocitat de sedimentació a la ultracentrífuga analítica.

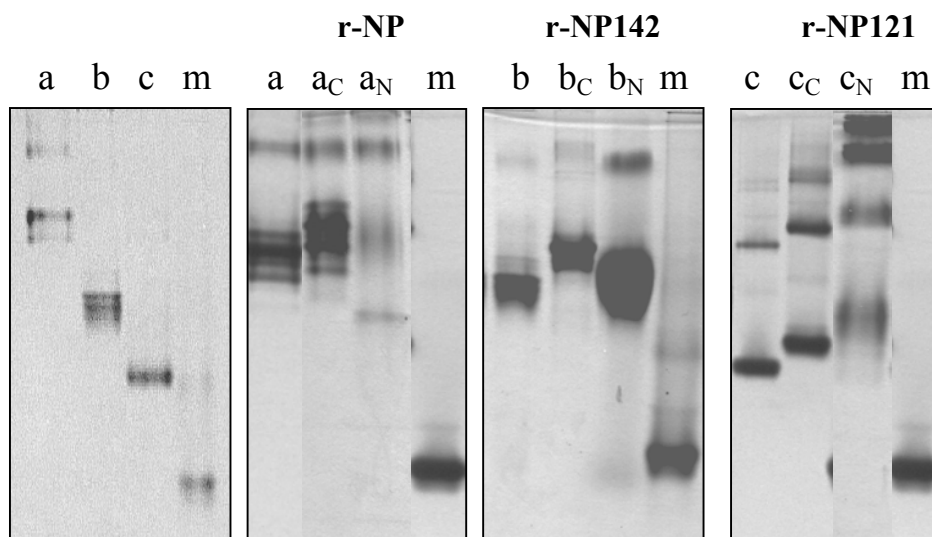


Fig. III.35 Pentamerització (PAGE nativa). PAGE 10% nativa: (a) r-NP, (b) r-NP142, (c) r-NP121, (m) control monòmer r-NP142 C45S, (subíndex C) etiqueta d'His carboxil terminal, (subíndex N) etiqueta d'His amino terminal.

6.2.2 Velocitat de sedimentació (ultracentrifugació analítica)

S'ha utilitzat la tècnica de velocitat de sedimentació a la ultracentrífuga analítica per determinar el coeficient de sedimentació de diferents variants de nucleoplasmina. S'han utilitzat les condicions que es mostren a la taula III.9. Els volums específics parcials (V_{ep}) s'han calculat tal com es descriu a l'apartat II-7.2. Totes les mostres s'han dialitzat enfront del tampó EM (100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris pH 7,4) i s'ha utilitzat el dialitzat com a tampó de referència.

Taula III.9 Paràmetres utilitzats en els experiments de velocitat de sedimentació. V_{ep} (volum específic parcial), expressat en cm³/g.

Velocitat de sedimentació		
Condicions	Mostres	V_{ep}
aparell: Beckman XL-A rotor: d'alumini temperatura: 20 °C velocitat: 40.000 rpm nre. escanejos: 12 longitud d'ona: 230 nm	r-NP	0,734
	r-NP+His N-t	0,733
	r-NP+His C-t	0,732
	r-NP142	0,731
	r-NP142+His N-t	0,729
	r-NP142+His C-t	0,729
	r-NP121	0,742
	r-NP121+His N-t	0,734
	r-NP121+His C-t	0,739

A la figura III.36 es mostren els gràfics de sedimentació obtinguts amb les diferents variants de nucleoplasmina i a la figura III.37 es mostren els gràfics que provenen del càlcul del valor mitjà del coeficient de sedimentació (gràfics en ventall o *fan plots*). Els coeficients de sedimentació es recullen a la taula III.10.

En els gràfics de sedimentació es pot observar que les mostres r-NP+His N-t i r-NP121+His N-t tenen una sedimentació molt més ràpida que la resta de mostres, fet que indica la presència de molècules de grans dimensions.

Els resultats obtinguts mitjançant la ultracentrífuga analítica indiquen que totes les mostres de què disposem són capaces de formar pentàmers en solució, llevat del mutant r-NP142 C45S, que es troba majoritàriament com a monòmer (vegeu també l'apartat III-5.2). Hem pogut observar que les formes r-NP+His N-t, r-NP121+His C-t i sobretot la mostra r-NP121+His N-t formen agregats de pes molecular superior al pentàmer, tal com ja s'observava en les PAGE natives. La variant r-NP142+His N-t no forma aquest tipus d'agregats, contràriament al que s'esperava per a totes les formes amb histidines a l'extrem amino terminal.

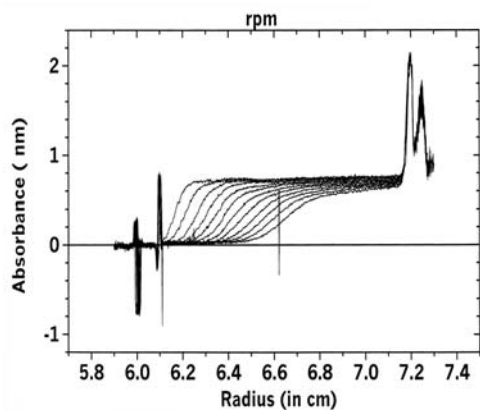
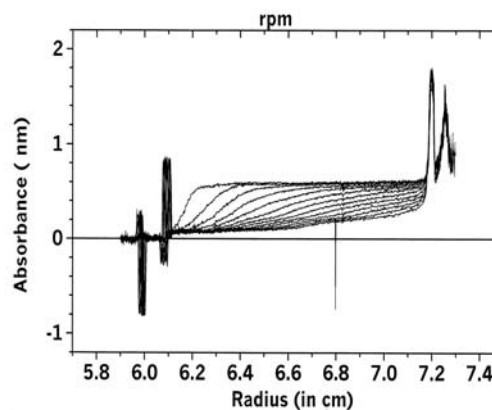
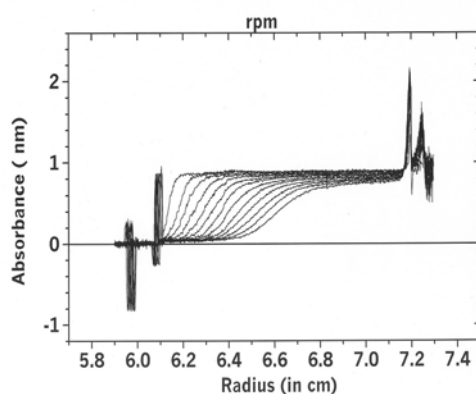
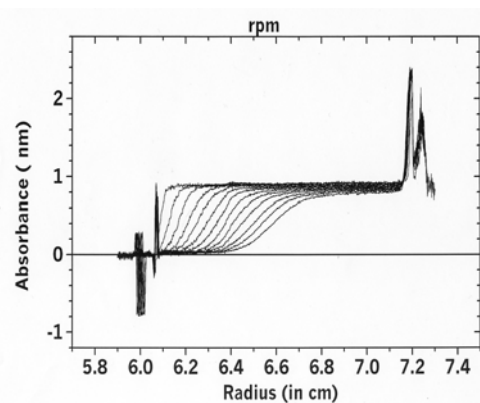
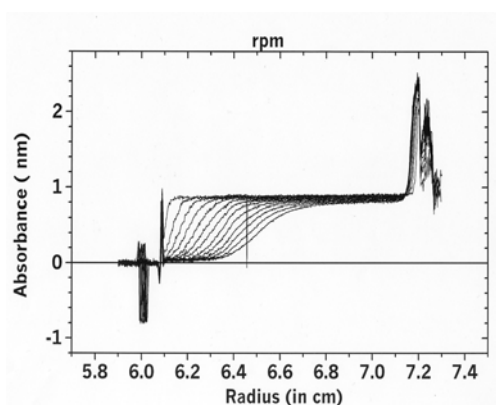
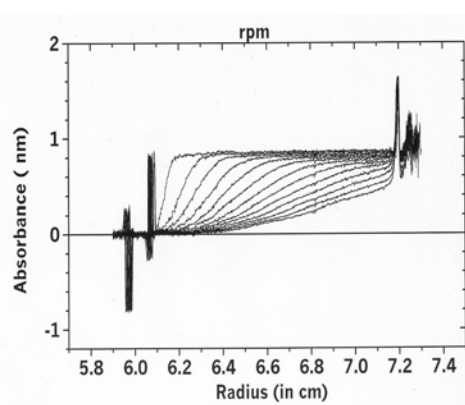
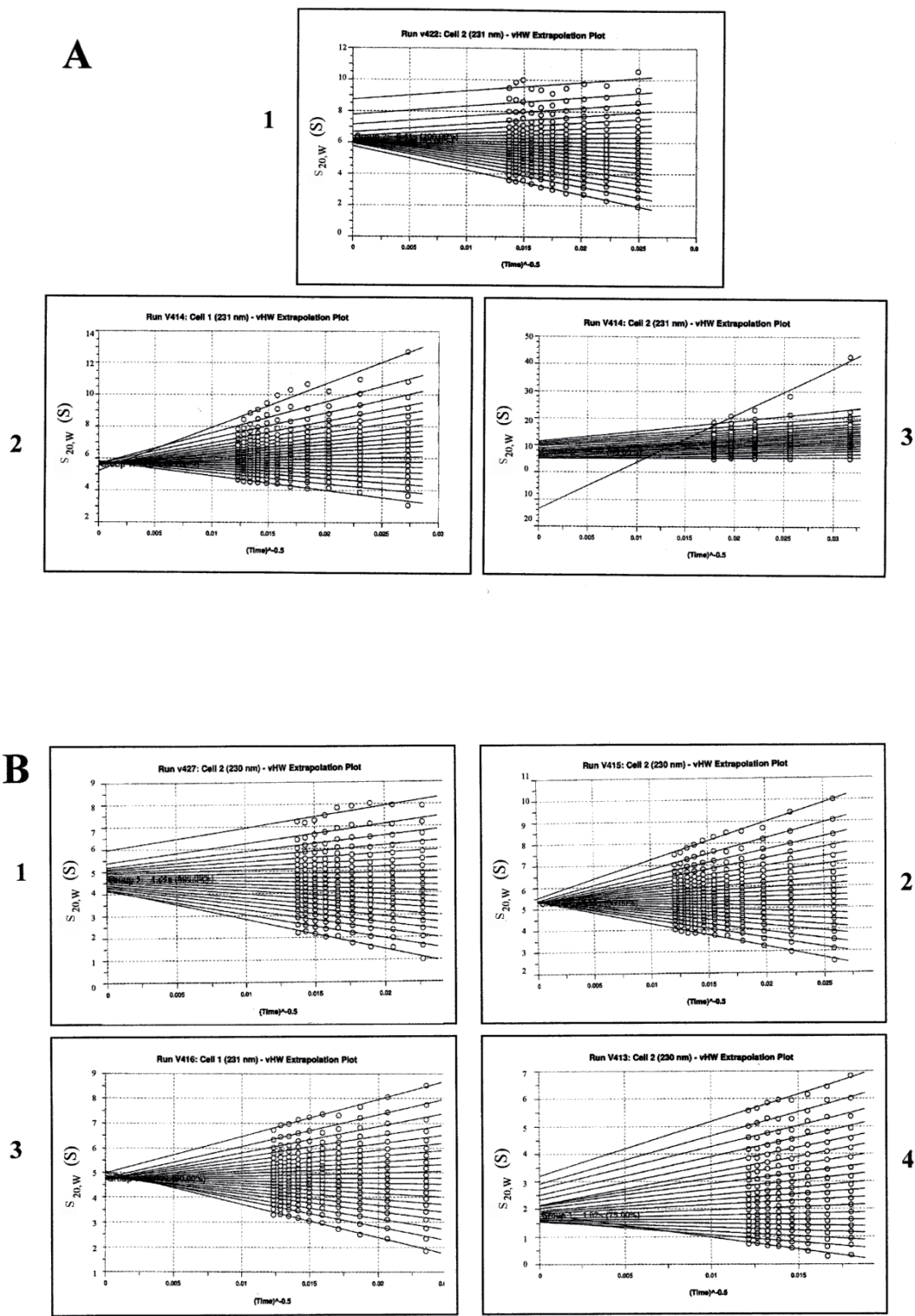
A r-NP+His C-tr-NP+His N-t **B****C** r-NP142+His C-tr-NP142+His N-t **D****E** r-NP121r-NP121+His N-t **F**

Fig. III.36 Velocitat de sedimentació (ultracentrifugació analítica). Corbes de velocitat de sedimentació. **A)** r-NP+His C-t. **B)** r-NP+His N-t. **C)** r-NP142+His C-t. **D)** r-NP142+His N-t. **E)** r-NP121. **F)** r-NP121+His N-t.



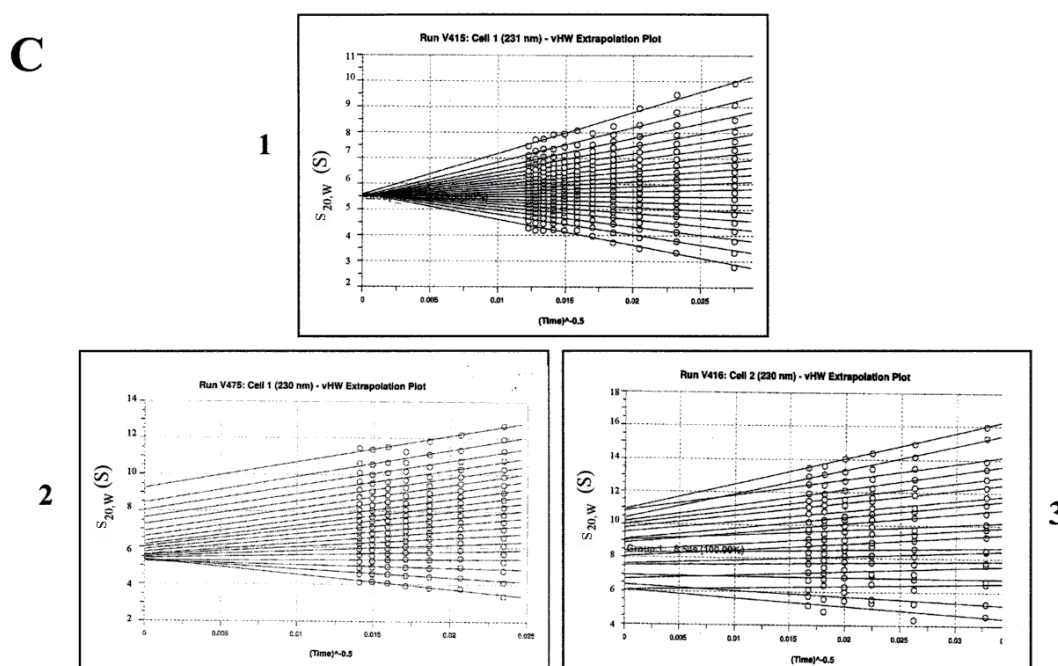


Fig. III.37 Pentamerització (velocitat de sedimentació). Gràfics en forma de ventall (*fan plots*) obtinguts amb el programa Ultrascan-Origin (Borries Demeler), on el nombre de línies que convergeixen cap a un valor comú de s és proporcional a la fracció de mostra representada. El coeficient de sedimentació s'ha determinat segons van Holde i Weischet (1978). **A) r-NP** (1) -His, (2) +His C-t, (3) +His N-t. **B) r-NP142** (1) -His, (2) +His C-t, (3) +His N-t, (4) mutant C45S. **C) r-NP121** (1) -His, (2) +His C-t, (3) +His N-t.

Taula III.10 Coeficients de sedimentació. s (mitjana) indica el valor mitjà del coeficient de sedimentació, Δs indica el valor màxim i mínim del coeficient de sedimentació de les mostres que presenten heterogeneïtat.

Coeficients de sedimentació	
mostra	s (mitjana)
r-NP	6,41
r-NP+His C-t	5,67
r-NP+His N-t	7,62, Δs (11,5-5)
r-NP142	4,74, Δs (5,4-4,2)
r-NP142+His C-t	5,34
r-NP142+His N-t	5,52
r-NP142 C45S	1,82, Δs (3,2-1,6)
r-NP121	4,79
r-NP121+His C-t	6,37, Δs (8,5-5,3)
r-NP121+His N-t	8,54, Δs (10,9-6,1)

Mitjançant la combinació dels pesos moleculars de les diferents formes de nucleoplasmina i els resultats de la velocitat de sedimentació, és possible determinar els paràmetres conformacionals per a les diferents formes recombinants. Es van calcular uns models conformacionals tal com es descriu a Ausió et al. (1992) i Prieto et al. (2002), assumint que la nucleoplasmina tindria forma d'el·lipsoide oblat. A la figura III.38 es mostren els diferents models obtinguts a partir dels quals la r-NP presenta un diàmetre de 108 Å i una alçada de 27,2 Å. La forma r-NP142 presenta una disminució del diàmetre (95 Å) mantenint l'alçada, mentre que la forma r-NP121 presenta un diàmetre de 83,6 Å i una alçada de 29,8 Å.

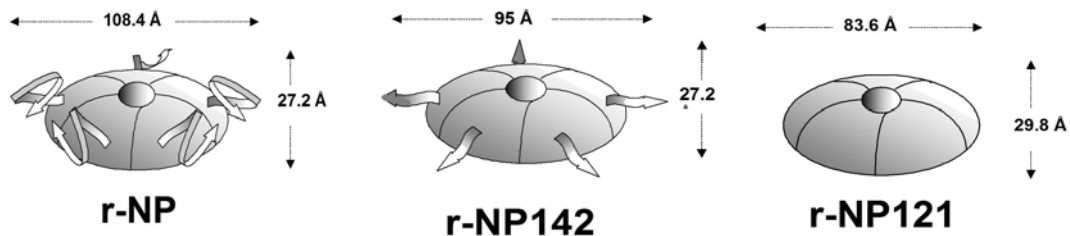


Fig. III.38. Models conformacionals. Els models conformacionals es calculen en funció dels pesos moleculars i dels coeficients de sedimentació (s) obtinguts a la ultracentrifuga analítica. La nucleoplasmina s'ha modelat com un el·lipsoide oblat. Les cintes representen la part C-terminal de la molècula amb càrrega abundant. Figura cedida pel Dr. Ausió (Universitat de Victoria, Canadà).

7. INTERACCIÓ DE LA NUCLEOPLASMINA AMB HISTONES

7.1 Interacció de r-NP amb histones natives

Una de les funcions principals de la nucleoplasmina és la seva unió a histones per mediatitzar l'acoblament de nucleosomes (Laskey et al., 1978; Dilworth et al., 1987). Els següents experiments estan enfocats a la determinació de l'estequiometria d'unió del pentàmer de nucleoplasmina amb l'octàmer d'histones nucleosòmiques natives (HN).

7.1.1 Velocitat de sedimentació r-NP/histones natives

Mitjançant estudis de velocitat de sedimentació a la ultracentrífuga analítica, es van determinar els coeficients de sedimentació de complexos d'octàmers d'histones units amb r-NP a diferents relacions molars.

Per a aquest tipus d'estudis, les mostres de nucleoplasmina es van dialitzar enfront del tampó 2 mM MgCl₂ i 10 mM Tris pH 7,4 i es van ajustar a una DO a 230 nm de 0,6. Es van utilitzar histones d'eritròcits de pollastre obtingudes tal com es descriu als protocols 6 i 7. Les mostres d'octàmers d'histones estaven a una concentració elevada (3,5 mg/ml) en tampó 2 M NaCl, 0,1 M tampó fosfat potàssic pH 6,8, condicions de força iònica elevada en què les histones es troben formant octàmers (Philip et al., 1979; Arents et al., 1991). En barrejar la nucleoplasmina i les histones, el tampó resultant té la composició següent: 240 mM NaCl, 1,8 mM MgCl₂, 8,8 mM Tris pH 7,5, 12 mM tampó fosfat potàssic pH 6,8.

El pes molecular del pentàmer de nucleoplasmina és 110,2 kDa i el de l'octàmer d'histones natives és 108 kDa (Wang et al., 2000) i, per tant, vam establir que la relació en pes octàmer d'histones/pentàmer de nucleoplasmina era aproximadament 1. Per a la ultracentrífuga s'han utilitzat les mateixes condicions que s'indiquen a la taula III.9 i els valors de $V_{ep} = 0,734 \text{ cm}^3/\text{g}$ per als complexos HN/NP i $V_{ep} = 0,753 \text{ cm}^3/\text{g}$ per als octàmers d'histones control (Eickbush i Moudrianakis, 1978).

Quan es barreja la nucleoplasmina amb 0,5 mols d'octàmer d'histones natives per mol de pentàmer de nucleoplasmina s'observa una distribució del coeficient de sedimentació d'entre 6,5 i 12,5 S. (v. fig. III.39). En augmentar la quantitat d'octàmer d'histones fins a una relació d'1 mol d'octàmer per mol de pentàmer de nucleoplasmina, es pot observar una distribució bimodal del coeficient de sedimentació en la qual el 85% de la mostra sedimenta amb un valor al voltant de 9,5 S i la resta sedimenta amb un coeficient molt semblant al de l'octàmer d'histones natives (v. fig. III.39B). Si es continua afegint histones fins a una relació molar 3:1 respecte al pentàmer de nucleoplasmina, es continua obtenint una distribució bimodal en què la fracció que correspon a les histones representa el 60% de la mostra (v. fig. III.39B). Aquests resultats indiquen que cada pentàmer de nucleoplasmina és capaç d'unir aproximadament un octàmer d'histones.

Se sap que l'estructura de l'octàmer és estable a elevada força iònica i que presenta un coeficient de sedimentació al voltant de 4 S (Thomas i Butler, 1977; Philip et al., 1979), però tendeix a dissociar-se en complexos més petits a força iònica fisiològica (Ruiz-Carrillo i Jorcano, 1979). En solució i en absència de DNA, l'octàmer d'histones existeix en un equilibri entre els dímers d'histones H2A-H2B ($M_r = 27.700 \text{ Da} \times 2$) i els tetràmers d'histones H3 i H4 ($M_r = 53.200$) (Eickbush i Moudrianakis, 1978). Aquesta barreja heterogènia presenta un coeficient de sedimentació d'entre 1,5-2 S (v. fig. III.40).

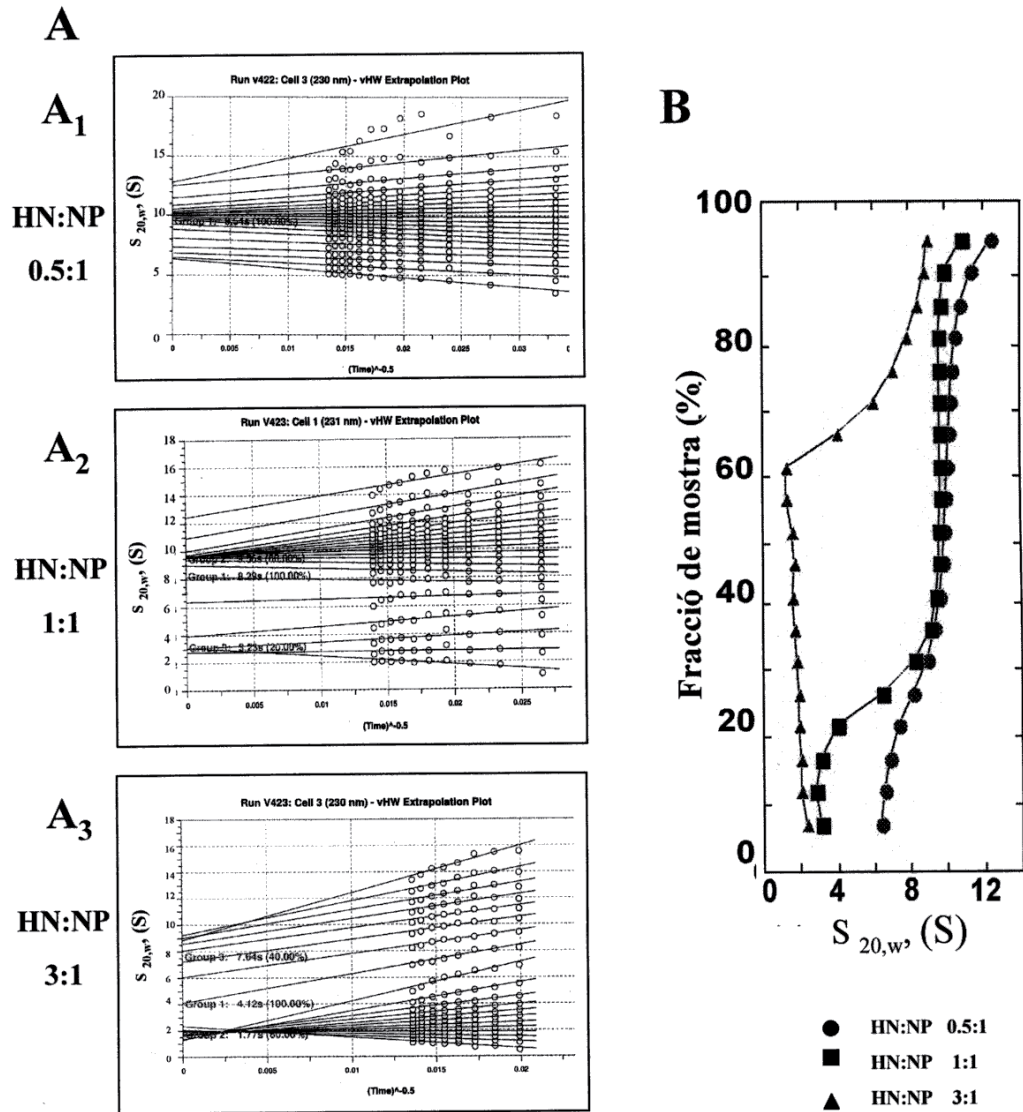


Fig. III.39 Estequiometria d'histones natives/nucleoplasmina. Diagrames obtinguts mitjançant anàlisi de la velocitat de sedimentació a la ultracentrífuga analítica, segons el mètode de van Holde i Weischet (1978). **A)** Gràfic en ventall (*fan plot*) de diferents relacions molars d'octàmer d'histones natives respecte al pentàmer de nucleoplasmina. **B)** Gràfics de les distribucions integrals dels coeficients de sedimentació (es corresponen amb els gràfics de la part A).

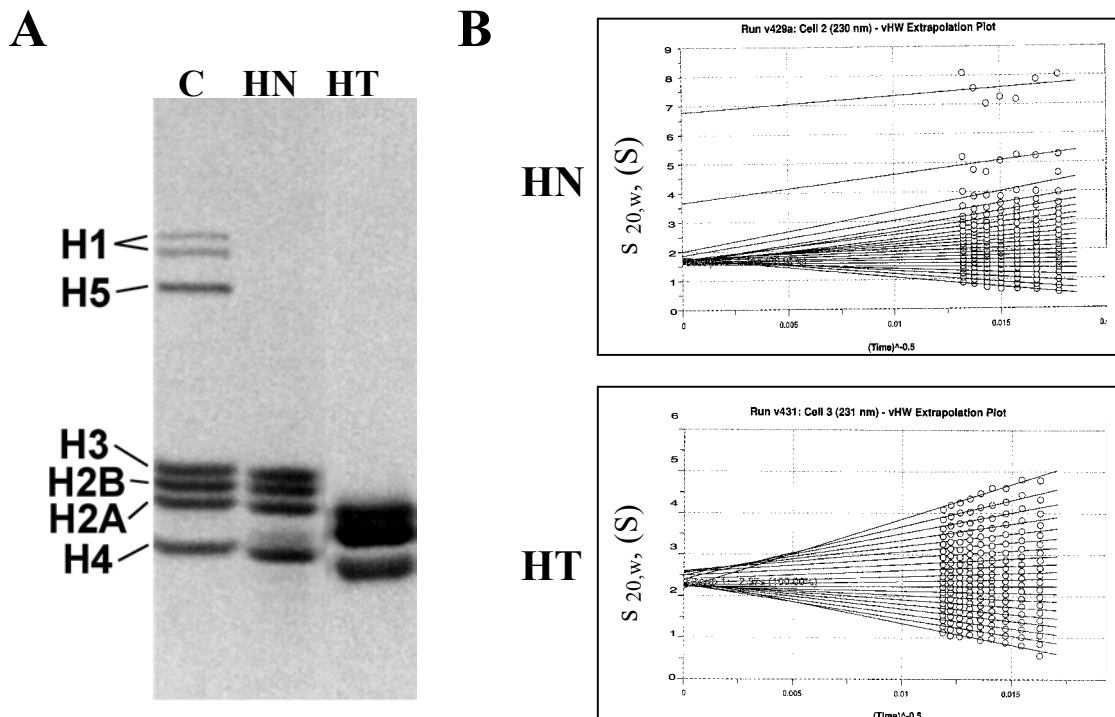


Fig. III.40 Velocitat de sedimentació d'histones natives i tripsinitzades. **A)** SDS-PAGE 15%, on (C) control d'histones de pollastre, (HN) histones natives, (HT) histones tripsinitzades. **B)** Gràfic en ventall de les histones natives. **C)** Gràfic en ventall de les histones tripsinitzades. Les mostres d'histones es troben en el mateix tampó utilitzat per als assajos dels complexos d'histones amb nucleoplasmina.

En barrejar els octàmers d'histones i la nucleoplasmina, el tampó resultant té una força iònica molt menor a la requerida perquè hi pugui haver octàmers per si mateixos. En aquestes condicions s'afavoriria la dissociació de l'octàmer en dímers d'histones H2A i H2B i tetràmers d'histones H3 i H4. Per tant, en les condicions en què s'ha fet l'experiment, la nucleoplasmina no podria unir l'octàmer sencer com a tal sinó els seus equivalents: 2 dímers H2A-H2B i 1 tetràmer (H3-H4)₂.

Els resultats anteriors no permeten determinar si els quatre tipus d'histones es poden unir a la nucleoplasmina amb la mateixa eficiència o si es dona una preferència especial per alguna de les histones quan hi ha un excés d'octàmers. Per analitzar aquests punts i confirmar els resultats previs obtinguts mitjançant velocitat de sedimentació a la ultracentrífuga analítica, es van dur a terme gradients de sacarosa.

7.1.2 Gradients de sacarosa r-NP/histones natives

Es van utilitzar gradients de sacarosa del 20% al 5% (v. II-3.4.4) per aïllar els complexos de nucleoplasmina i histones i poder estudiar-ne la composició i estequiometria. Els gradients de sacarosa es van preparar en el mateix tampó utilitzat

per als assajos de velocitat de sedimentació: 240 mM NaCl, 1,8 mM MgCl₂, 8,8 mM Tris pH 7,5, 12 mM tampó fosfat potàssic pH 6,8. A la taula III.11 es mostren els paràmetres utilitzats per als gradients de sacarosa i a la figura III.41 es mostren les diferents fraccions aïllades.

Taula III.11. Condicions utilitzades en els gradients de sacarosa.

Gradients de sacarosa
ultracentrífuga: Beckman L8-70M
rotor: SW 41
velocitat: 29.000 rpm
temperatura: 4 °C
desacceleració: 0 (sense fre)
temps: 21 hores i 30 minuts

Les anàlisis de les fraccions obtingudes a partir dels gradients de sacarosa de la r-NP i els octàmers d'histones a una relació molar 1:1 donen un únic pic simètric (v. fig. III.41A). Aquest pic té una sedimentació molt similar a la de les partícules nucleosòmiques, les quals s'han descrit amb un coeficient de sedimentació d'aproximadament 11 S i un pes molecular de 204.800 Da (Ausió et al., 1989). Aquests resultats confirmen que el complex de la nucleoplasmina i les histones té el pes molecular esperat per una estequiometria d'1 mol d'octàmer d'histones per mol de pentàmer de nucleoplasmina. L'anàlisi d'aquest pic en gels de poliacrilamida mostra que està constituït per nucleoplasmina i els quatre tipus d'histones que formen l'octàmer nucleosòmic: H2A, H2B, H3 i H4 en proporcions estequiomètricament equivalents (v. fig. III.41A).

Quan el mateix experiment es porta a terme amb un excés d'histones (2 mols d'octàmer d'histones per mol de pentàmer de nucleoplasmina), s'observen dos pics simètrics a partir dels gradients de sacarosa (v. fig. III.41B). La posterior anàlisi de les fraccions obtingudes, mitjançant gels de poliacrilamida, mostra que el pic amb una sedimentació més ràpida correspon al complex de r-NP/octàmer d'histones, mentre que al pic de sedimentació més lenta hi ha les histones sobreres que no han pogut formar complex. Aquests resultats confirmen que l'estequiometria d'unió entre la nucleoplasmina i les histones es dona en la relació molar d'1 mol de pentàmer de nucleoplasmina per cada mol d'octàmer d'histones natives.

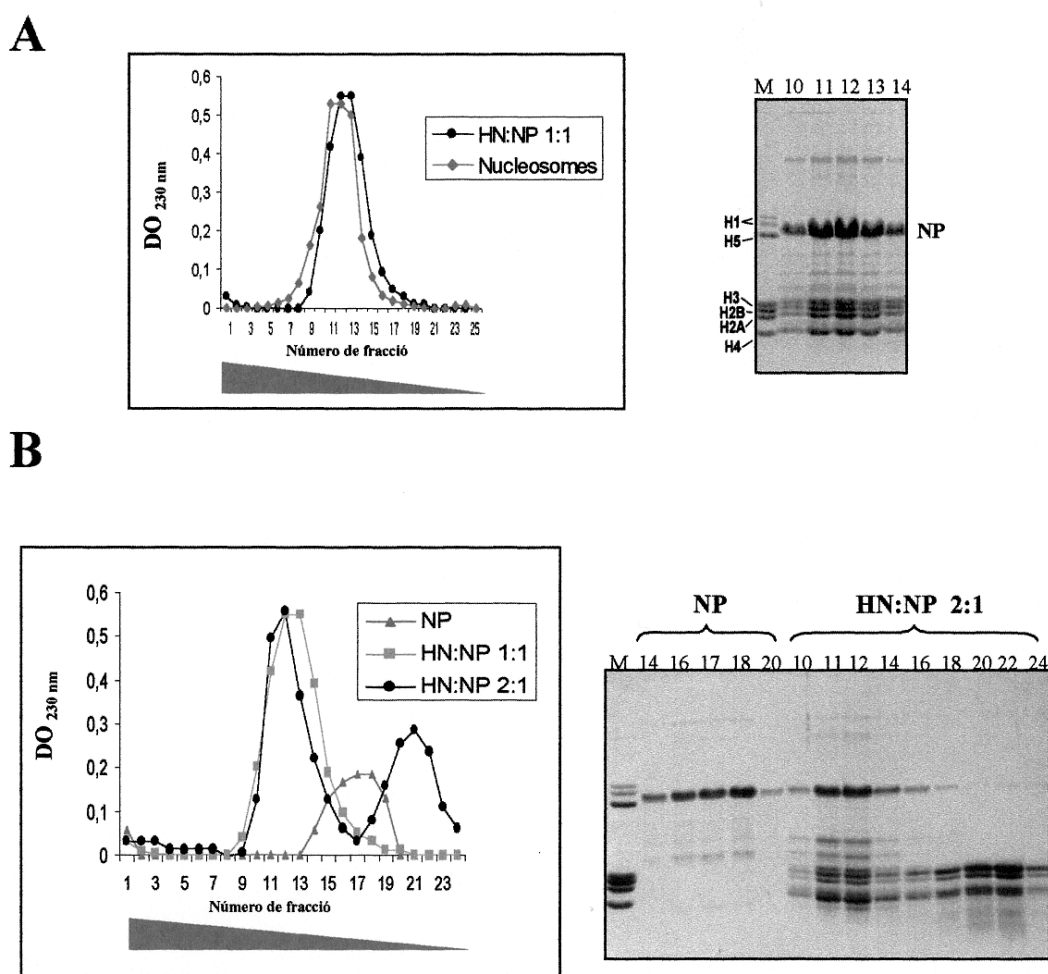


Fig. III.41 Gradients de sacarosa d'histones natives (HN) + r-NP. (esquerra) perfil de distribució (el triangle indica el gradient del 20% al 5% de sacarosa) i (dreta) SDS-PAGE 15% fraccions corresponents al gradient (precipitades amb TCA). **A)** HN/r-NP (1:1) on: (M) control d'histones de pollastre, (10-14) complex nucleoplasmina+histones. **B)** HN/r-NP (2:1), HN/r-NP (1:1) i r-NP: (14-20) control r-NP, (10-24) HN:NP 2:1. Els números de les fraccions en les SDS-PAGE es corresponen amb els dels gràfics de sedimentació.

Per quantificar d'una manera més acurada el pes molecular del complex de la nucleoplasmina amb les histones, es van fer assajos d'equilibri de sedimentació.

7.1.3 Equilibri de sedimentació r-NP/histones natives

Es va voler determinar el pes molecular de complexos de nucleoplasmina i histones natives, mitjançant equilibri de sedimentació a la ultracentrífuga analítica.

Idealment, es va voler treballar amb mostres que procedien directament dels gradients de sacarosa però que havien estat dialitzades per treure l'excés de sucre. Les primeres proves d'equilibri de sedimentació es van fer a 20 °C, però es va veure que la mostra es degradava pel fet d'estar més de 48 hores a temperatura ambient.

Finalment, vam decidir treballar amb mostres de nucleoplasmina i octàmers d'histones no provinents dels gradients de sacarosa, sinó ajuntades just abans de fer l'experiment per evitar possibles problemes de dissociació de la nucleoplasmina i les histones durant la diàlisi de la mostra. Per minimitzar la degradació es va treballar a 4 °C. Les condicions de treball es mostren a la taula III.12.

Taula III.12 Condicions d'equilibri de sedimentació.

Equilibri de sedimentació
aparell: Beckman XL-A
rotor: de titani
temperatura: 4 °C
velocitat: 16.000 rpm
longitud d'ona: 230 nm
temps: 38 hores i 30 minuts

Una vegada s'arriba a l'equilibri, cal centrifugar a màxima velocitat (40.000 rpm) per obtenir la línia de base. Per calcular el pes molecular del complex mitjançant les dades d'equilibri de sedimentació, es va utilitzar el programa Ultrascan-Origin (Borries Demeler). Els resultats mostraven un sistema no ideal, amb heterogeneïtat i presència de diferents espècies moleculars (barreja del complex r-NP+HN i molècules lliures). Finalment es va haver de calcular el pes molecular de manera manual.

Mitjançant la superposició del gràfic d'equilibri amb el de la línia de base (v. fig. III.42) i sostracció dels valors basals, es van obtenir els valors d'absorbància en funció del radi. Posteriorment es va representar gràficament el logaritme neperià de l'absorbància en funció del radi elevat al quadrat i es va calcular el pendent màxim de la recta (correspondrà a l'espècie amb un pes molecular més gran). Finalment, es va calcular el pes molecular (M) aplicant directament l'equació:

$$M = (d \ln A / dr^2) \times 2RT / (1 - v\rho) \omega^2$$

on A = absorbància (a 230 nm), r = radi (en cm), R = constant dels gasos (8.313×10^7 erg/mol.K), ω^2 = velocitat angular (en rad/seg), ρ = densitat (en g/cm³), v = volum específic parcial (en cm³/g), T = temperatura (en °K), $(d \ln A / dr^2)$ és el pendent de la recta.

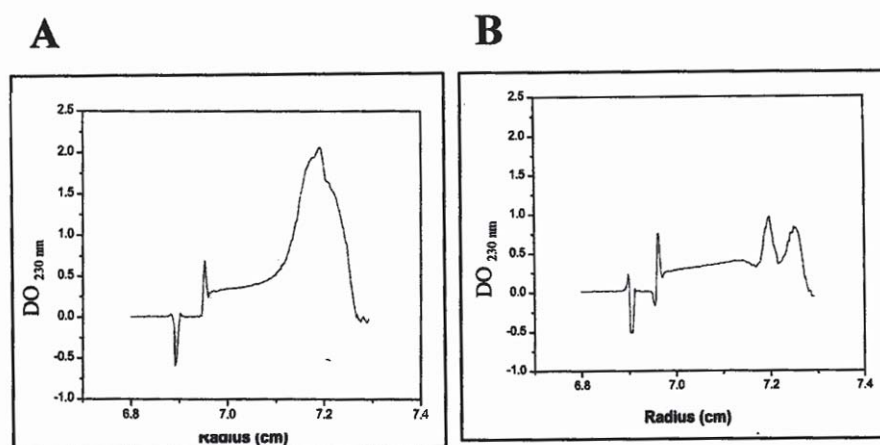


Fig. III.42 Equilibri de sedimentació. **A)** Gràfic d'equilibri de sedimentació del complex r-NP+histones natives. **B)** Gràfic de la línia de base (obtinguda en centrifugar a 40.000 rpm). L'absorbància s'ha mesurat a 230 nm.

El pes molecular del complex de r-NP+histones natives, calculat amb el mètode descrit anteriorment, va resultar ser de 201.698 Da. Aquest valor és molt proper a l'esperat per un complex format per 1 pentàmer de r-NP i 1 octàmer d'histones (219.030 Da).

7.2 Interacció de r-NP amb histones tripsinitzades

Mitjançant digestió amb tripsina es van obtenir histones tripsinitzades sense les cues bàsiques (v. protocol 8) amb l'objectiu d'estudiar la importància d'aquesta part de la molècula en la interacció amb la nucleoplasmina.

7.2.1 Velocitat de sedimentació r-NP/histones tripsinitzades

Es van obtenir octàmers d'histones tripsinitzades, sense les cues amino terminals amb elevada càrrega positiva, mitjançant un tractament amb tripsina immobilitzada seguit d'una purificació amb hidroxipatita per extreure el DNA (Ausió et al., 1989) (v. II-1.6.3 i Fig. III.40). Aquest tractament no afecta de manera important l'estabilitat de l'octàmer d'histones.

L'assaig de velocitat de sedimentació per a les histones tripsinitzades, en les mateixes condicions ja descrites anteriorment per a les histones natives, va donar un coeficient de sedimentació en el rang 2,2-2,6 S (v. fig. III.43). El lleuger increment en el coeficient de sedimentació de les histones tripsinitzades, tot i tenir un pes molecular més petit, seria determinat per una conformació estesa de les cues de les histones que provocaria una sedimentació més lenta de les histones natives respecte a les tripsinitzades (sense les cues).

Mitjançant estudis de velocitat de sedimentació a la ultracentrífuga analítica, es van determinar els coeficients de sedimentació de complexos d'octàmers d'histones tripsinitzades (HT) amb r-NP a diferents relacions molars. Els tampons utilitzats tant per a la nucleoplasmina com per a les histones són els mateixos que es descriuen a l'apartat III-7.1.1.

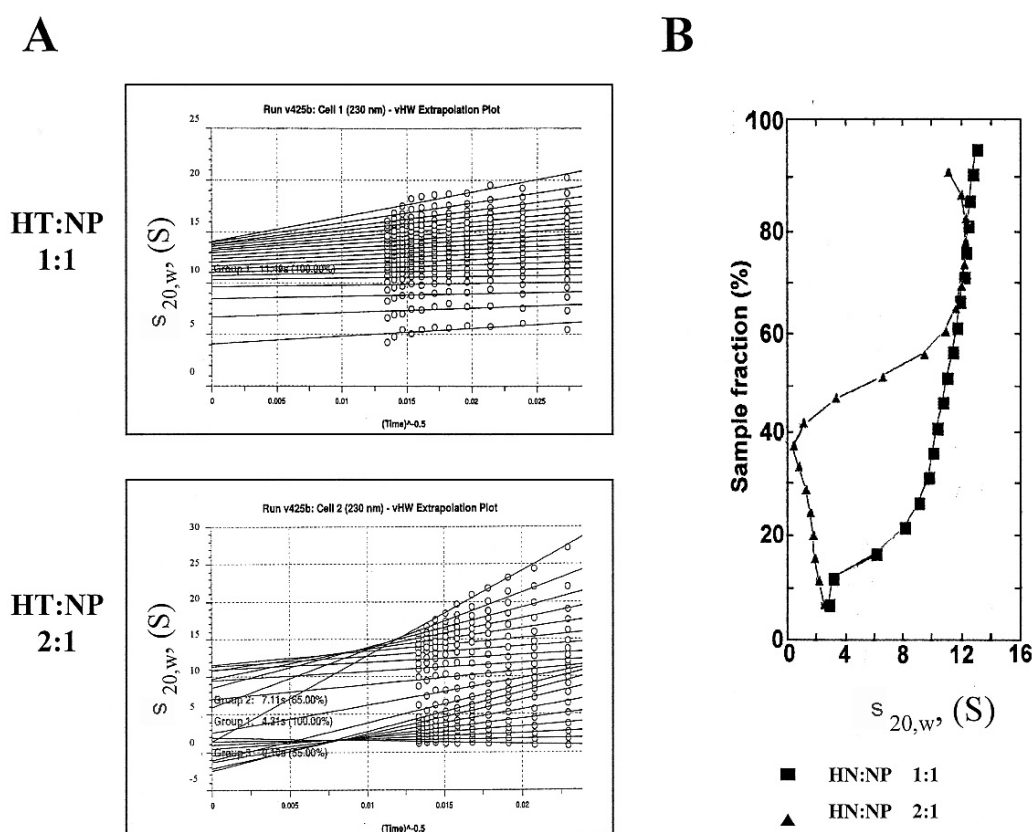


Fig. III.43 Estequiometria d'histones tripsinitzades/nucleoplasmina. Diagrames obtinguts mitjançant anàlisi de la velocitat de sedimentació a la ultracentrífuga analítica, segons el mètode de van Holde i Weischet (1978). **A)** Gràfic en ventall (*fan plot*) de diferents relacions molars d'octàmer d'histones tripsinitzades respecte al pentàmer de nucleoplasmina. **B)** Gràfics de les distribucions integrals dels coeficients de sedimentació (es corresponen amb els gràfics de la part A).

El pes molecular del pentàmer de nucleoplasmina és de 110,2 kDa i el de l'octàmer d'histones tripsinitzades és de 88 kDa (Wang et al., 2000) i per tant vam establir que la relació en pes octàmer d'histones tripsinitzades/pentàmer de nucleoplasmina era aproximadament 0,8. Per a la ultracentrífuga s'han utilitzat les mateixes condicions que s'indiquen a la taula III.10 i els valors de $V_{ep} = 0,734 \text{ cm}^3/\text{g}$ per als complexos HT/NP i $V_{ep} = 0,753 \text{ cm}^3/\text{g}$ per als octàmers d'histones tripsinitzades control.

Quan la nucleoplasmina es barreja amb un mol d'octàmer d'histones tripsinitzades per mol de pentàmer de nucleoplasmina, s'observa la presència d'una població de molècules amb un coeficient de sedimentació al voltant de 9,6 S i 14 S. A mesura que es va augmentant la quantitat d'octàmer d'histones tripsinitzades a relacions molars superiors a 1, s'observa la presència majoritària d'una població de molècules amb un baix coeficient de sedimentació que corresponen a les histones tripsinitzades sobreres (v. fig. III.43), de manera similar al que s'observava en presència d'histones natives.

Els resultats de sedimentació indiquen la formació d'un complex entre la r-NP i les histones tripsinitzades, cosa que posa de manifest que les cues de les histones no són imprescindibles per a la unió a la nucleoplasmina. L'estequiometria d'unió entre el pentàmer de nucleoplasmina i l'octàmer d'histones tripsinitzades estaria al voltant d'1 mol de pentàmer de nucleoplasmina per mol d'octàmer d'histones tripsinitzades, que coincideix amb el valor obtingut per a les histones natives.

Per confirmar aquests resultats i determinar la naturalesa del complex entre la nucleoplasmina i les histones tripsinitzades es van utilitzar gradients de sacarosa.

7.2.2 Gradients de sacarosa r-NP/histones tripsinitzades

Es van utilitzar gradients de sacarosa del 20% al 5% (v. II-3.4.4) per aïllar els complexos de nucleoplasmina i histones tripsinitzades. Les condicions utilitzades pels gradients de sacarosa són les mateixes que s'han explicat a l'apartat III-7.1.2 i a la taula III.11.

Les anàlisis de les fraccions obtingudes a partir dels gradients de sacarosa de la r-NP i els octàmers d'histones tripsinitzades a una relació molar 1:1 donen un únic pic simètric. L'anàlisi de les fraccions en gels de poliacrilamida permet observar la formació del complex entre la nucleoplasmina i les histones tripsinitzades (v. fig. III.44 A).

En barrejar el doble de molècules d'octàmer d'histones respecte al pentàmer de nucleoplasmina s'observen dos pics simètrics en els gradients de sacarosa, de manera equivalent al que ja s'havia observat en el cas de les histones natives.

L'anàlisi de les fraccions aïllades i precipitades amb TCA mostra que en el pic de sedimentació més ràpida hi ha el complex entre la nucleoplasmina i les histones, i en el segon pic hi trobem les histones tripsinitzades sobreres que no han pogut formar complex amb la nucleoplasmina (v. fig. III.44B).

Aquests resultats confirmen que l'estequiometria d'unió entre la nucleoplasmina i les histones tripsinitzades correspon aproximadament a 1 mol de pentàmer de nucleoplasmina per cada mol d'octàmer d'histones tripsinitzades. Per quantificar d'una manera acurada el pes molecular del complex de la nucleoplasmina amb les histones tripsinitzades es van fer assajos d'equilibri de sedimentació.

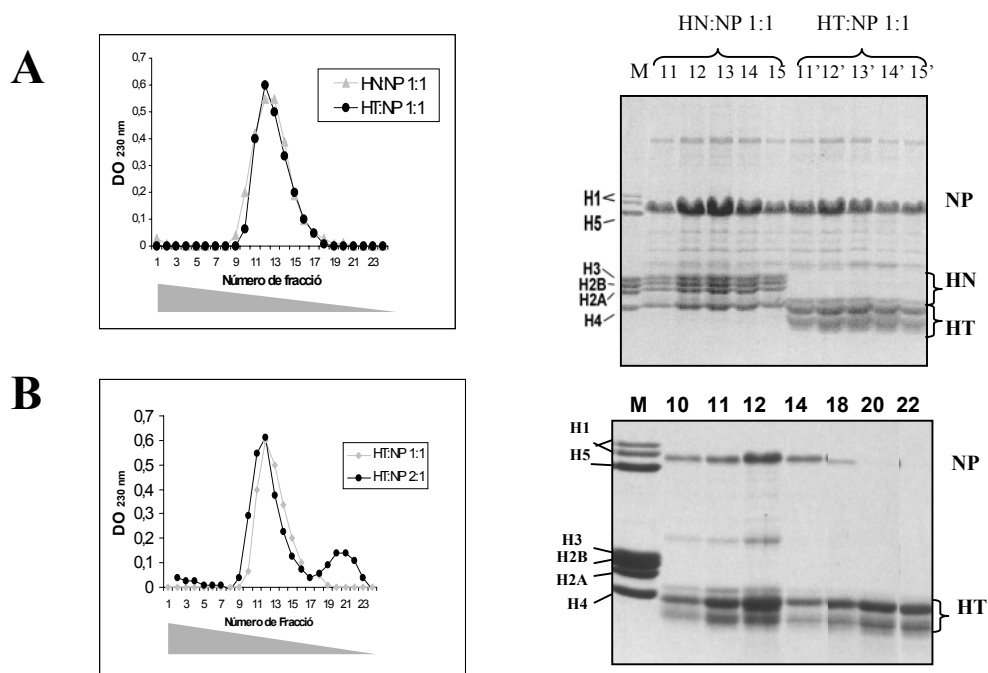


Fig. III.44 Gradients de sacarosa d'histones tripsinitzades (HT) + r-NP. **A)** HN/NP (1:1) i HT/NP (1:1); perfil de distribució (el triangle indica el gradient del 20% al 5% de sacarosa) i SDS-PAGE 15% de fraccions precipitades amb TCA, on: (M) marcador d'histones de pollastre, (11-15) complex HN/NP i (11'-15') complex HT/NP. **B)** HT/NP (2:1) i control HT/NP (1:1), perfil de distribució i SDS-PAGE 15% de fraccions precipitades amb TCA, on: (M) control d'histones de pollastre, (10-22) HT/NP en relació molar 2:1. Els números de les fraccions en les SDS-PAGE es corresponen amb els dels gràfics de sedimentació.

7.2.3 Equilibri de sedimentació r-NP/histones tripsinitzades

Es va voler determinar el pes molecular de complexos de nucleoplasmina i histones tripsinitzades mitjançant equilibri de sedimentació a la ultracentrífuga analítica. Els experiments s'han fet de la mateixa manera que per als complexos de r-NP i histones natives, tal com es descriu a l'apartat III-7.1.3.

El pes molecular del complex r-NP+histones tripsinitzades, en relació molar 1 mol de pentàmer de nucleoplasmina per mol d'octàmer d'histones, obtingut a partir de les dades d'equilibri de sedimentació, va ser de 149.795 Da. Aquest valor té aproximadament un 24% d'error respecte al pes molecular esperat per al complex d'histones tripsinitzades i nucleoplasmina (198.230 Da).

7.3 Interacció de r-NP121 amb histones natives

S'ha vist que tant les histones natives com les tripsinitzades (sense les cues bàsiques) són capaces d'unir-se a la r-NP. Es va voler determinar el paper del tram poliglutàmic principal C-terminal de la nucleoplasmina en la formació de complexos de nucleoplasmina amb histones mitjançant assajos amb la variant r-NP121 (sense el tram acídic principal A2). Aquesta regió té elevada càrrega negativa i s'esperaria que tingués un paper important per a la formació de complexos amb histones, les quals tenen una elevada càrrega positiva.

7.3.1 Velocitat de sedimentació r-NP121/histones natives

El pes molecular del pentàmer de r-NP121 és de 67,5 kDa i el de l'octàmer d'histones natives és de 108,8 kDa. Vam establir que la relació en pes octàmer d'histones natives / pentàmer de r-NP121 era aproximadament 1,6. Per a la ultracentrífuga s'han utilitzat les mateixes condicions que s'indiquen a la taula III.9 i el valor de $V_{ep} = 0,742 \text{ cm}^3/\text{g}$ per als complexos HN/r-NP121.

Els assajos de velocitat de sedimentació es van realitzar tal com s'ha descrit anteriorment (v. III-7.1.1) i van revelar que l'eliminació del tram acídic principal de la nucleoplasmina pràcticament no afectava la unió d'histones natives.

En els gràfics de sedimentació obtinguts, en presència de r-NP i histones natives en relacions molars 0,5:1 i 1:1, s'observa la presència d'una població de molècules força heterogènia en què aproximadament el 50% de les molècules presenten un coeficient de sedimentació d'entre 8 i 10 S corresponents al complex entre el pentàmer de r-NP121 i les histones natives (v. fig. III.45). Quan s'augmenta la quantitat d'octàmer d'histones fins a 2 mols, respecte a 1 mol de pentàmer de r-NP121, s'observa una població que sedimenta al voltant de 2 S (40% del total), que correspondria a les histones sobrees que no s'han pogut unir amb la nucleoplasmina.

El complex r-NP121 amb les histones natives presenta un coeficient de sedimentació molt similar al del complex de la forma sencera de nucleoplasmina amb les histones natives (9,5 S) tot i ser més petit. Aquesta característica es podria interpretar a partir d'una disminució de la fricció de la molècula gràcies a l'adopció d'una forma més simètrica una vegada s'han eliminat les cues C-terminals de la nucleoplasmina.

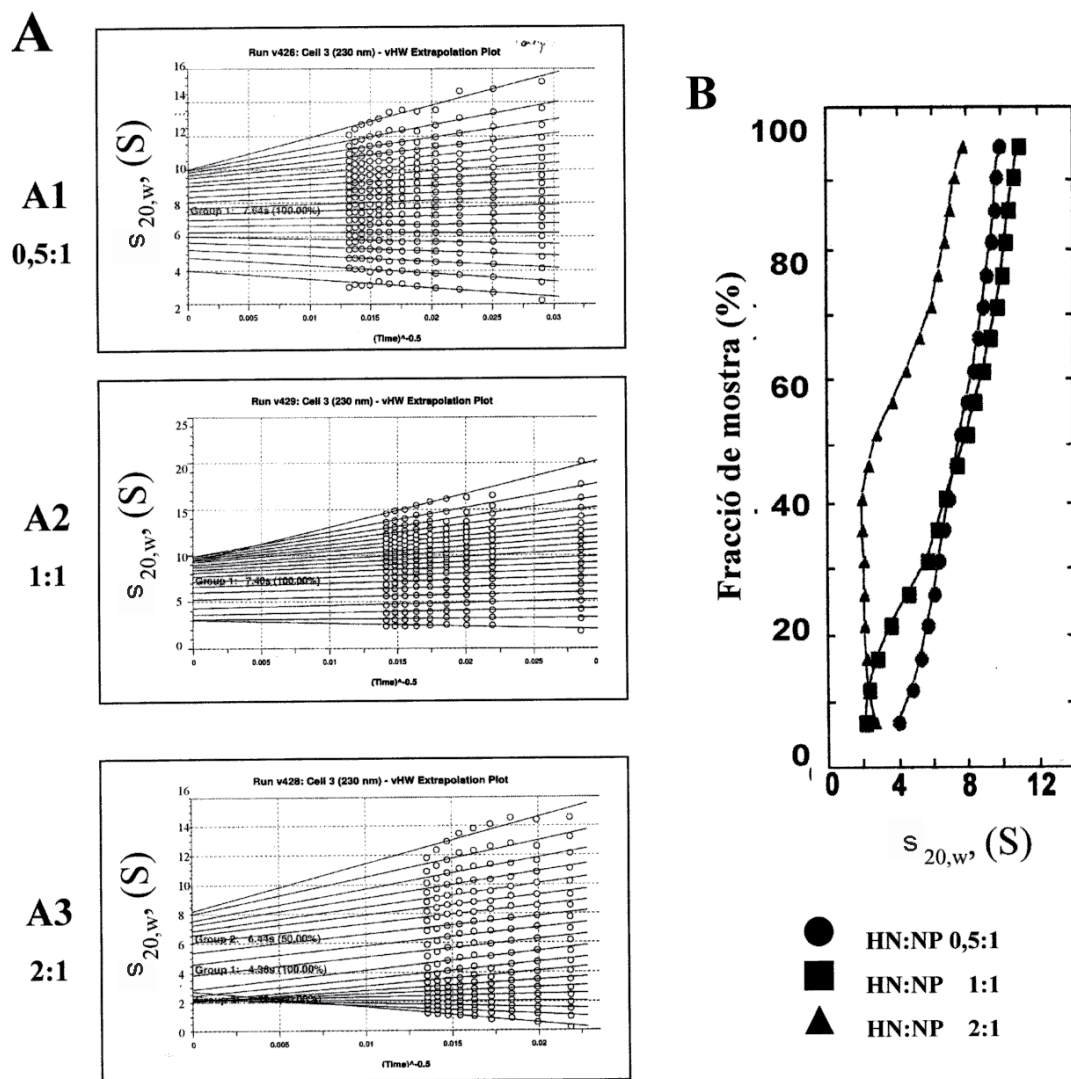


Fig. III.45 Estequiometria histones natives/r-NP121 (velocitat de sedimentació). Diagrames obtinguts mitjançant anàlisi de la velocitat de sedimentació a la ultracentrífuga analítica, segons el mètode de van Holde i Weischet (1978). (A) (A1) HN/r-NP121 0,5:1, (A2) HN/r-NP121 1:1, (A3) HN/r-NP121 2:1. (B) Distribucions integrals corresponents als gràfics que es mostren a la part A.

La gran heterogeneïtat observada en els assajos amb r-NP121 i octàmers d'histones natives es podria interpretar a partir d'una menor estabilitat d'aquests complexos probablement deguda a la manca del tram acídic A2. Aquest tram, tot i no ser imprescindible per a la unió a histones, podria ser necessari perquè la unió fos més estable. Les possibles combinacions de molècules podrien ser: complex total pentàmer r-NP121 + octàmer d'histones, complex r-NP121 + dímer H2A-H2B, complex r-NP + tetràmer (H3-H4)₂, dímers d'H2A-H2B, tetràmers (H3-H4)₂.

Podem dir que l'estequiometria d'unió de les histones natives i la r-NP121 es donaria al voltant d'1 mol d'octàmer d'histones per cada mol de pentàmer de r-NP121 perquè a concentracions superiors a 1 mol d'histones natives per mol de pentàmer de r-NP121 s'observa una població d'histones sobreres que ja no formen complex amb la nucleoplasmina. Aquest resultat coincideix amb el que s'ha obtingut amb la r-NP sencera tant amb presència d'octàmers d'histones natives com tripsinitzades. Aquests resultats apunten que la interacció de les histones i la nucleoplasmina no seria predominantment de tipus electrostàtic, sinó que es donarien altres tipus d'interaccions (per exemple, interaccions hidrofòbiques).

Han quedat pendents de fer proves mitjançant gradients de sacarosa per confirmar que el complex de la r-NP121 i les histones està constituït pels quatre tipus d'histones nucleosòmiques en proporcions estequiomètriques equivalents, i posteriorment calcular-ne el pes molecular mitjançant equilibri de sedimentació.

8. MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA

8.1 Estudis de les proteïnes en solució

8.1.1 Estudis de r-NP121 i r-NP121+His N-t

S'han fet estudis mitjançant microscòpia electrònica de transmissió (TEM) per veure els pentàmers de la nucleoplasmina en solució. Es va voler determinar si hi havia diferències apreciables en l'agregació de les diferents formes de nucleoplasmina amb presència d'histidines. Ja s'ha comentat a l'apartat III.6.2 que algunes de les formes amb presència d'histidines a l'extrem amino terminal presentaven una major tendència a formar agregats de pes molecular superior al pentàmer. Aquest fet s'observava de manera marcada per a la forma r-NP121+His N-t, tant en els experiments de velocitat de sedimentació a la ultracentrífuga analítica com en PAGE nativa.

Per a la preparació de les diferents mostres de nucleoplasmina s'han fet servir tècniques de tinció negativa, tal com es descriu a l'apartat II-9.1. La tècnica més utilitzada per a la preparació de les mostres ha estat la tècnica de la gota. Aquesta part

del treball s'ha realitzat en col·laboració amb la Dra. M. Teresa Casas (ETSEIB, Universitat Politècnica de Catalunya).

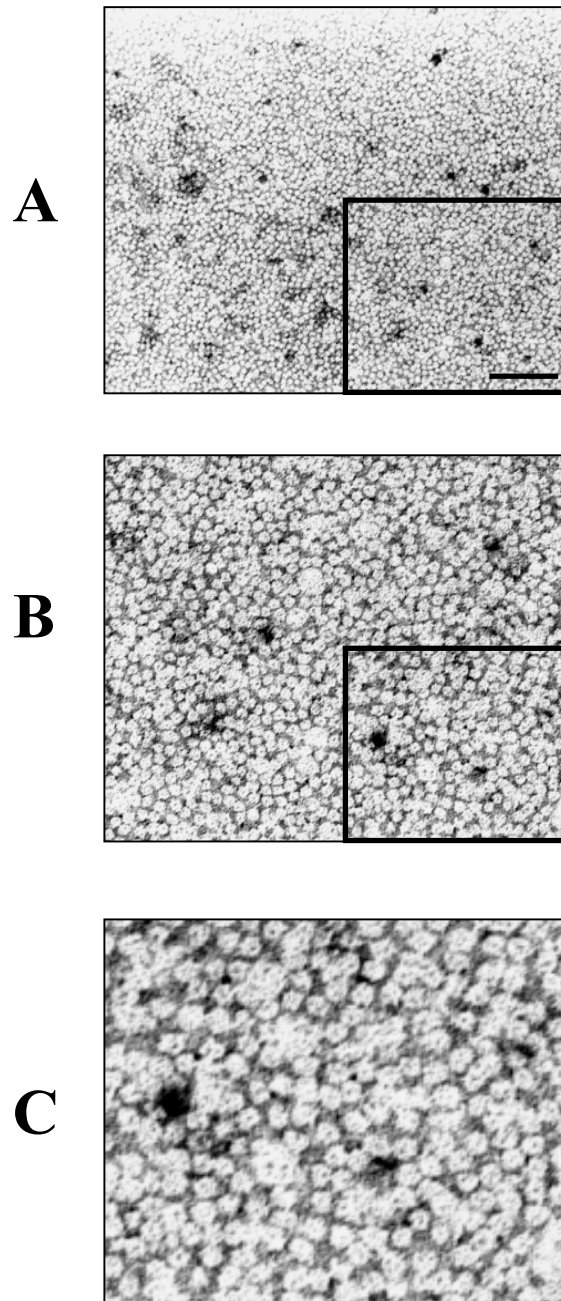


Fig. III.46 r-NP121 vista al microscopi electrònic de transmissió. La mostra a una concentració aproximada de 50 $\mu\text{g/ml}$ en tampó EM (100 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 10 mM Tris pH 7,4) s'ha tenyit amb acetat d'uranil a l'1%. La barra correspon a una mida de 100 nm. **A)** r-NP121. **B)** Ampliació del requadre de la figura A $\times 2$. **C)** Ampliació del requadre de la figura B $\times 2$.

Tal com es mostra a les micrografies electròniques de la figura III.46, les mostres de r-NP121 presenten una forma de partícula arrodonida i en moltes s'hi pot veure un punt electrodens central, que indica la presència d'una cavitat buida. Trobem partícules de mides i morfologies lleugerament diferents, a causa de les diferents orientacions espacials adoptades per les molècules durant la preparació de la mostra.

Les molècules de r-NP121 observades al microscopi electrònic tenen un diàmetre mitjà de 70 Å. Aquests resultats són molt similars als obtinguts per Earnshaw et al. (1980), els quals van descriure que les molècules de nucleoplasmina de *Xenopus* complexades amb dimetil suberimidat mitjançant entrecreuant tenien forma de disc de 75 Å de diàmetre. Que la nucleoplasmina sencera i la forma r-NP121 s'observin al microscopi electrònic com partícules d'una mida molt similar podria ser degut al fet que els dominis C-terminals, presents a la forma sencera, tinguessin una conformació estesa i estiguessin poc estructurats, característica que els podria fer invisibles al microscopi electrònic.

No s'han observat diferències significatives entre les mostres r-NP121 i r-NP121+His N-t vistes al microscopi electrònic ja que, en les condicions utilitzades, s'ha vist que les partícules de proteïna d'ambdues mostres es comporten de manera similar amb una gran tendència a agregar-se.

8.1.2 Estudis de la proteïna *NP-like* d'*Echinaster sepositus*

A l'apartat III-3.2 s'ha descrit que en els oòcits de l'estrella de mar *Echinaster sepositus* existeix una proteïna majoritària que té les característiques de ser àcida i termoestable. Aquesta proteïna forma oligòmers en PAGE nativa (v. fig. III.15B). Es va voler veure al microscopi electrònic quina morfologia presentava la proteïna de l'estrella i comparar si presentava similitud amb la de la nucleoplasmina.

A la micrografia electrònica de la proteïna majoritària de l'estrella de mar *E. sepositus* s'observen diferents partícules de proteïna molt agregades i de morfologia irregular (v. fig. III.47). Aquestes partícules són de mida més petita que les de nucleoplasmina, aproximadament entre 30 i 40 Å. En algunes partícules s'hi pot observar un punt electrodens central que és difícil de veure perquè és molt petit. Hi ha zones de la preparació on la densitat de les partícules és més gran i s'observen com taques blanques de forma més o menys arrodonida.

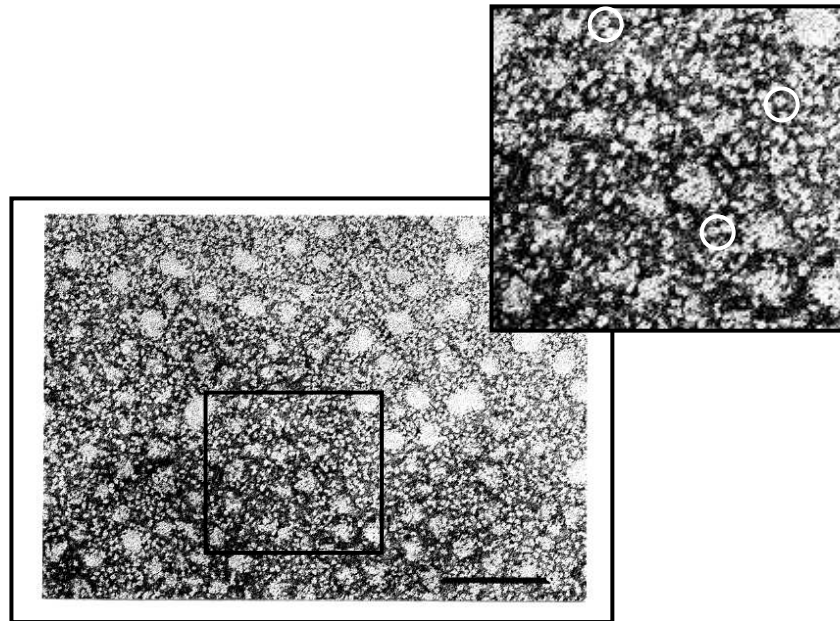


Fig. III.47 Proteïna majoritària dels oòcits d'*E. sepositus* vista al microscopi electrònic de transmissió. La proteïna es va preparar a una concentració aproximada de 250 µg/ml en tampó Tris 10 mM pH 7,5 i es va preparar mitjançant la tècnica de la gota, finalment tenyint-la amb acetat d'uranil al 2%. La barra correspon a una mida de 100 nm. A la part superior es mostra un detall de l'àrea requadrada, augmentada 2 vegades. Els cercles indiquen partícules de proteïna amb un punt electrodens central.

8.2 Obtenció de cristalls bidimensionals

Es va utilitzar la tècnica de la mica, descrita per Harris (1997) (v. II-9.2). Amb aquesta tècnica es poden obtenir cristalls bidimensionals de proteïna sobre fulles de mica, barrejant prèviament la proteïna amb solucions de polietilenglicol en presència de molibdat amònic. A la figura III.48 es mostren diferents micrografies electròniques de possibles nuclis de cristal·lització de cristalls bidimensionals de nucleoplasmina. En alguns casos s'han pogut veure unes estructures en forma d'espiral. També s'han pogut observar possibles cristalls bidimensionals de proteïna amb un creixement en forma de terrasses. No s'ha confirmat amb cap altra tècnica que les estructures obtingudes siguin autèntics cristalls bidimensionals i no artefactes.

Els estudis d'obtenció de cristalls bidimensionals de nucleoplasmina no han tingut continuïtat. Hauria sigut interessant optimitzar el procés d'obtenció de cristalls bidimensionals de proteïna i poder obtenir micrografies electròniques a més augments.

Les imatges, una vegada digitalitzades, poden ser processades per diferents programes que permeten obtenir dades estructurals de la proteïna.

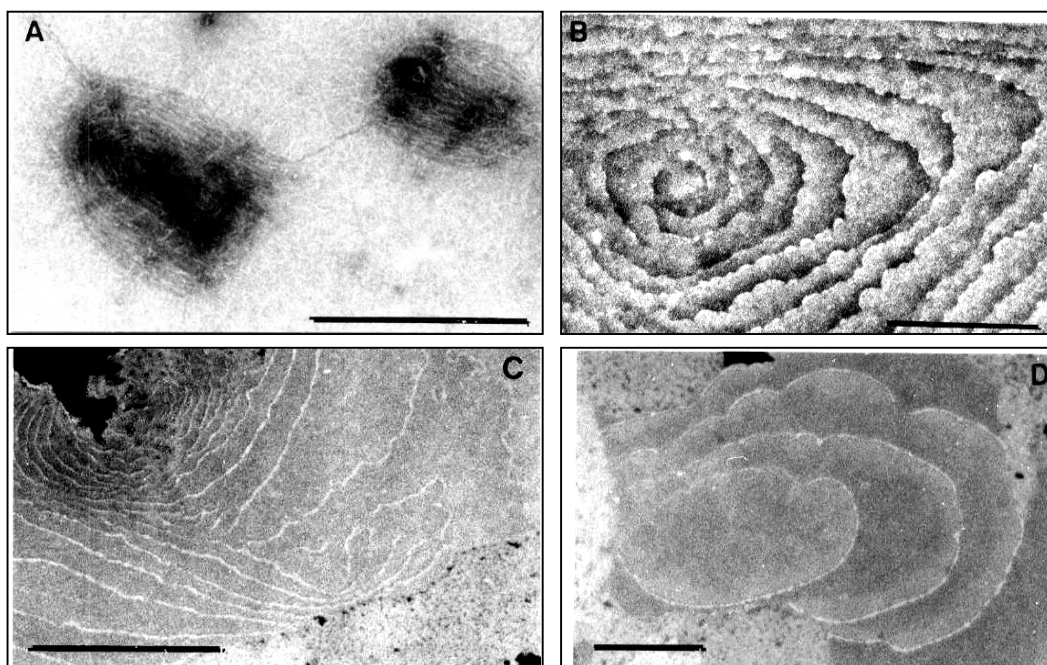


Fig. III.48 Cristalls bidimensionals. Per a tots els casos s'ha utilitzat la mostra r-NP142+His C-t. **A)** Possible nucli de cristallització, proteïna a 700 $\mu\text{g/ml}$ i preparada amb 0,1% PEG 2000. **B)** Possible creixement cristal·lí en espiral, proteïna a 50 $\mu\text{g/ml}$ i preparada amb 0,1% PEG 2000 i 2% molibdat amònic. **C)** i **D)** Possibles cristalls bidimensionals de proteïna on s'observa un creixement en terrasses, proteïna a 700 $\mu\text{g/ml}$ i preparada amb 0,1% de PEG 2000. La proteïna en A, C i D es trobava en el tampó 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM Hepes pH 7,5; la proteïna en B es trobava en aigua. Totes les mostres s'han tenyit amb acetat d'uranil al 2%. La barra correspon a una mida de 0,5 μm .

Hi ha diversos estudis sobre el mecanisme de creixement de cristalls de macromolècules. El mecanisme dominant de creixement és la formació de nuclis en dues dimensions sobre una superfície i la seva expansió lateral (Malkin et al., 1995). Diferents autors han obtingut imatges de creixement de cristalls bidimensionals i tridimensionals mitjançant microscòpia de força atòmica (McPherson, 1999). Aquestes imatges presenten una certa similitud amb les que s'han obtingut amb mostres de nucleoplasmina mitjançant microscòpia electrònica de transmissió.

D'altra banda, hi ha diferents treballs on s'obtenen cristalls tridimensionals a partir de cristalls bidimensionals òptims per difracció de raigs X (Edwards et al., 1994; Cramer et al., 2000).

9. CRISTAL·LITZACIÓ DE r-NP121

9.1 Condicions de cristal·lització

Al nostre laboratori s'havien fet una sèrie d'estudis previs de cristal·lització de la NP de *X. laevis* nativa i recombinant. En aquests estudis es van utilitzar les condicions de cristal·lització publicades per Jancarik i Kim (1991). Amb aquests estudis no es va aconseguir l'obtenció de cristalls però es va determinar que la nucleoplasmina precipitava més ràpidament en pH àcid.

Posteriorment es van continuar les proves de cristal·lització amb la forma r-NP142+His C-t, que presentava més del 80% de puresa. En la majoria de gotes es van obtenir precipitats densos de proteïna, sobretot a pH 4,6 i en presència de 30% d'isopropanol. Alguns precipitats presentaven un aspecte granular diferenciat, obtingut en les condicions següents: 20-200 mM MgCl₂, 5% PEG 400 o 10% isopropanol (amb 1/3 part de precipitant a la gota), 20 mM Hepes pH 7,5 i 10 mM DTT; o en 20 mM MgCl₂, 0,1 M tampó cacodilat pH 6-5,5, 10 mM DTT (en absència de precipitant). Els resultats obtinguts indicaven que el clorur magnèsic podria anar bé per a la cristal·lització de la nucleoplasmina.

Els assajos de cristal·lització es van continuar amb la forma r-NP121. Aquesta forma no té el tram carboxil terminal que inclou el tram àcidic principal A2 i correspon a la part més globular de la molècula, i per tant, pensàvem que podria ser més fàcilment cristal·litzable. Com a avantatge addicional, aquesta forma té un gran nivell d'expressió i es coexpressa juntament amb molt poques formes truncades, característiques que permeten obtenir més del 95% de puresa i, per tant, una mostra molt homogènia ideal per a cristal·lització.

Es van fer moltes proves de cristal·lització de la proteïna utilitzant un ampli ventall de condicions variant diferents paràmetres: sals, tampons, pH, temperatura, precipitants i additius (Prieto, 2002). Arran de la publicació de l'estructura cristal·logràfica de la part globular de la nucleoplasmina del clon de Dingwall (Dutta et al., 2001), es van provar les condicions de cristal·lització descrites per aquests autors (v. taula III.13). D'aquesta manera es van aconseguir precipitats cristal·lins en preparacions de r-NP121 a una concentració de 18 i 32 mg/ml en 0,1 M Hepes pH 7,5, 0,2 M MgCl₂, 5% PEG 400, 25% isopropanol, tant a temperatura ambient com a 13 °C. El precipitat cristal·lí s'obtenia 12-18 hores després de la preparació de la gota. Els microcristalls es trobaven a prop de la superfície del cobreobjectes i també als contorns de la gota, mentre que a la part central de la gota hi havia precipitat amorf.

Per optimitzar l'obtenció de cristalls es van variar alguns paràmetres:

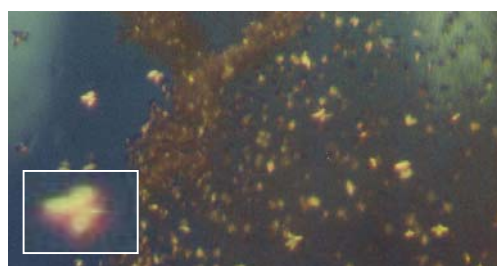
- Disminució de la quantitat de PEG 400: va permetre obtenir cristalls petits i compostos i amb morfologies irregulars, alguns en forma de papallona o cruciformes i de poc volum (v. fig. III.49A).
- Disminució de la concentració de proteïna: la disminució de la concentració de proteïna fins a 5 mg/ml va afavorir la disminució de la quantitat de precipitat amorf i l'augment de la qualitat dels cristalls, els quals presentaven una morfologia més regular.
- Disminució de la quantitat d'isopropanol a la gota: les gotes amb el 4,5% d'isopropanol inicial (mantenint 25% d'isopropanol al pou) van permetre obtenir cristalls regulars de formes romboïdals i rectangulars i de mida al voltant de 50 µm (vegeu la fig. III.49B). Si es treballava a concentracions inicials d'isopropanol (al pou) inferiors al 25%, no s'aconseguia la formació de cristalls encara que s'anés augmentant progressivament el percentatge d'isopropanol.
- Disminució de la temperatura: la disminució de la temperatura fins a 13 °C va permetre obtenir més quantitat de cristalls i disminuir la proporció de precipitat amorf. A 8 °C es van obtenir cristalls en forma de vareta rectangular, de 80 µm de llargada, però es degradaven amb facilitat i s'observaven els contorns dels cristalls de forma irregular i amb presència de petites esquerdes als extrems. A 4 °C s'obtenien cristalls de mida molt més petita i barrejats amb precipitat amorf.
- Disminució del pH: la disminució del pH fins a 5 va permetre obtenir cristalls regulars de mida més gran, fins a 80 µm. L'Hepes tampona bé en el rang de pH comprès entre 8,2 i 6,8. Per treballar a pH àcid es va provar d'utilitzar tampons més adequats com el cacodilat sòdic (pH 6,5-6), citrat sòdic (pH 6,2-4,5) i acetat sòdic (pH 5,6-4,6). La utilització de tampons diferents de l'Hepes no va afavorir la cristal·lització de la proteïna, per la qual cosa es va continuar utilitzant l'Hepes tot i saber que a pH àcid la seva capacitat tamponadora quedava limitada.

A la figura III.49 es mostren alguns cristalls de r-NP121. Les condicions finals de cristal·lització es resumeixen a la taula III.13 i es comparen amb les condicions inicials descrites per Dutta et al. (2001).

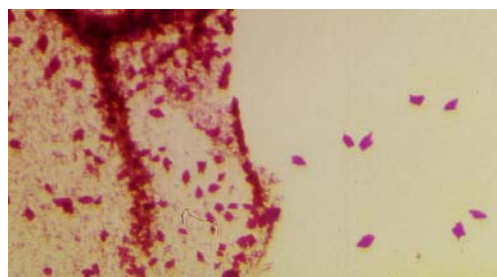
La proteïna utilitzada per a la cristal·lització va ser amablement cedida per la Dra. Cèlia Prieto (ETSEIB, Universitat Politècnica de Catalunya) i provenia d'un estoc que s'havia congelat amb nitrogen líquid i posteriorment s'havia conservat a -80 °C, tot i que durant les proves de cristal·lització s'havia mantingut a -20 °C en petites alíquotes. La utilització d'altres estocs de proteïna que s'havien congelat directament a -20 °C no va permetre obtenir cristalls. Cal tenir en compte que petites variacions tant en l'estoc de proteïna com en els tampons i reactius utilitzats poden ser crítiques a l'hora de permetre la cristal·lització de la proteïna.

Taula III.13 Condicions de cristal·lització de r-NP121. Es comparen les condicions de cristal·lització obtingudes en el present treball per a la mostra r-NP121 provinent del clon de Bürklin amb les utilitzades per a la forma equivalent del clon de Dingwall (Dutta et al., 2001). La gota té un 50% de mostra de proteïna i un 50% de la solució del reservori.

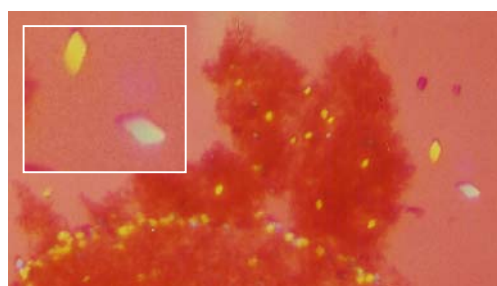
Cristal·lització de r-NP121	
r-NP121 (Bürklin)	r-NP121 (Dingwall)
<u>mostra</u> concentració: 5 mg/ml tampó: 100 mM KCl, 2 mM MgCl ₂ , 10 mM Tris pH 7,4	<u>mostra</u> concentració: 17 mg/ml tampó: 100 mM NaCl, 25 mM Tris pH 7,5.
<u>reservori</u> tampó: 0,1 M Hepes pH 6,5-5 sal: 0,2 M MgCl ₂ additiu: 4% PEG 400 precipitant: 25 % isopropanol (4,5% gota)	<u>reservori</u> tampó: 0,1 M Hepes pH 7,5 sal: 0,2 M MgCl ₂ additiu: 5% PEG 400 precipitant: 22%-27% isopropanol



A



B



C

Fig. III.49 Cristalls de r-NP121. A) Barreja de precipitat cristal·lí i amorf on s'observen cristalls en forma de papallona (vegeu-ne el detall) i cruciformes. B) Tinció de cristalls amb metil violeta (v. III-9.2); els cristalls es mostren violats respecte al fons clar; també s'hi observa una regió amb precipitat amorf. C) Cristalls regulars en forma romboïdal (vegeu-ne el detall) i regions amb precipitat amorf.

Es va observar que alguns dels cristalls es començaven a degradar, presentant contorns irregulars, quan feia unes setmanes que eren a la gota. La degradació dels cristalls podria ser deguda a les oscil·lacions de temperatura que sofreixen quan es porten de la nevera a la lupa per observar-los, tot i que es fan observacions de curta durada i es refreda prèviament la platina de la lupa amb l'ajut d'una barra refrigerant.

L'evaporació de l'isopropanol de la gota és un factor molt important que pot afectar negativament l'estabilitat dels cristalls. Tot i que la gota està segellada amb greix, l'isopropanol és molt volàtil i pot travessar el greix. Per mantenir la concentració d'isopropanol convé anar renovant periòdicament els pous amb solució que contingui 25% d'isopropanol. Es va observar que cristalls més antics tenien més resistència a l'exposició a l'aire que cristalls més nous i eren més insensibles a l'evaporació de l'isopropanol. Aquesta observació coincideix amb les observacions fetes per Dutta (2000), que comentava que cristalls més antics eren més robustos que els nous a causa de la formació d'oligòmers entrecreuats a l'interior del cristall.

S'han fet algunes proves de cristal·lització de nucleoplasmina i protamina a diferents relacions molars pentàmer de nucleoplasmina/mol de protamina 1:5, 1:2,5 i 1:1. Aquestes relacions s'han triat en funció de la relació estequiomètrica d'unió del pentàmer de la forma r-NP121 i la protamina de *Dicentrarchus labrax* descrita per Prieto et al. (2002), que correspon a 2,5 molècules de protamina per pentàmer de nucleoplasmina. Cap de les proves realitzades fins al moment no ha tingut èxit.

9.2 Determinació de l'origen proteic dels cristalls

Tinció de cristalls

Una de les tècniques per determinar si un cristall és orgànic és la tinció amb certs colorants (v. II-10.3). Els cristalls de molècules biològiques tenen canals interns que permeten absorbir el colorant i quedaran tenyits d'un color més intens que el medi.

Per optimitzar les tècniques de tinció de cristalls proteics i veure quin colorant era el més adequat per a mostres de proteïna, es van obtenir cristalls de lisozim a partir d'un mètode clàssic descrit per Ducruix i Giegé (1992). Es va utilitzar lisozim de clara d'ou (Sigma) preparat a una concentració de 50 mg/ml en 50 mM de tampó acetat sòdic pH 4,5. Les gotes es van obtenir en 50 mM de tampó acetat sòdic pH 7,5, 1 M NaCl a temperatura ambient.

Per tenyir els cristalls de lisozim es van utilitzar els colorants següents: blau de brom fenol (Merck), metil violeta (Merck) i IZIT[®] (Hampton Research), i es va utilitzar 0,5 µl de cada colorant per a gotes de 4 µl, preparat a 3 mg/ml en aigua. La tinció serà completa al cap d'unes hores i s'han d'observar els cristalls intensament tenyits sobre el fons de la gota clar. Cal tenir en compte que alguns components de la gota poden provocar una precipitació de determinats colorants. És recomanable fer una prova prèvia de tinció de la solució de la gota per comprovar que el colorant no té problemes

de solubilitat. A la figura III.50 es mostra la tinció de cristalls de lisozim amb diferents colorants.

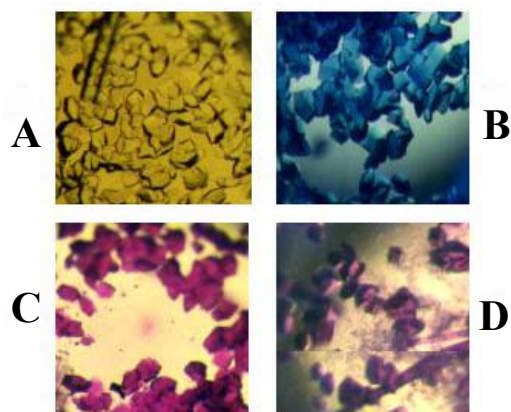


Fig. III.50 Tinció de cristalls de lisozim. Es mostren cristalls de lisozim tenyits amb diferents colorants. **A)** Cristalls no tenyits. **B)** Cristalls tenyits amb Izit (Hampton Research). **C)** Cristalls tenyits amb metil violeta. **D)** Cristalls tenyits amb blau de brom fenol. S'observa la presència de cristalls cúbics i cristalls en forma de varetes.

Tots els colorants utilitzats han resultat ser igualment efectius a l'hora de tenyir cristalls de proteïna, però el metil violeta i l'Izit han mostrat un contrast més diferenciat entre el cristall i la solució de la gota.

Es va aplicar el colorant metil violeta a les gotes amb cristalls de r-NP121 i es va deixar equilibrar la solució durant més de 24 hores. Els cristalls de r-NP121 es van tenyir intensament amb el colorant (v. fig. III.49B), cosa que confirma que eren d'origen proteic.

Difracció de cristalls

La difracció de cristalls és una prova inequívoca que permet distingir els cristalls d'origen inorgànic dels cristalls de macromolècules. La limitació de la tècnica es troba en la mida dels cristalls, que ha de ser de l'ordre de 100-200 μm per a les fonts de raigs X convencionals.

Els cristalls de r-NP121 eren massa petits per poder-ne obtenir una foto de difracció mitjançant un difractòmetre convencional. Com a alternativa, es va fer un muntatge dins un capil·lar amb un grup de cristalls juntament amb solució provinent de la gota, amb l'objectiu d'obtenir-ne una fotografia de raigs X i veure quin patró de difracció s'obtenia. La preparació de capil·lars i les fotografies van ser realitzades en

col·laboració amb la Dra. Lourdes Campos (ETSEIB, Universitat Politècnica de Catalunya).

Amb els cristalls encabits dins el capil·lar es va obtenir una fotografia de raigs X amb la càmera Warhus (vegeu la fig. III.51). S'hi van observar un seguit de cercles concèntrics que indicaven la complexitat de la mostra i descartaven que els cristalls fossin inorgànics (ja que s'haurien vist taques ben definides). També es va obtenir una fotografia al difractòmetre CAD-4 on no es va obtenir cap senyal apreciable després de 30 minuts d'exposició. Si els cristalls haguessin sigut inorgànics, s'haurien d'haver observat algunes taques característiques de les sals.

Totes les proves fetes indicaven clarament que els cristalls obtinguts per a la mostra r-NP121 corresponien a cristalls de la proteïna.

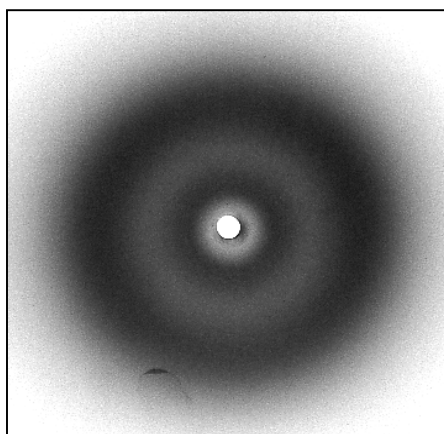


Fig. III.51 Fotografia de raigs X de cristalls de r-NP121. La foto s'ha obtingut amb la càmera Warhus a una distància de la mostra a la pel·lícula (DEF) de 3 cm i 3 hores d'exposició. La mostra correspon a un grup de cristalls de r-NP121 juntament amb solució de la gota.

9.3 Proves fetes amb els cristalls de r-NP121

9.3.1 Macrosembra de cristalls

Els cristalls obtinguts per a la r-NP121, tal com s'ha explicat anteriorment, tenien una mida petita d'entre 50 i 80 μm . Per intentar obtenir cristalls de mida més gran es va provar la tècnica de la macrosembra (v. II-10.2).

Es va utilitzar com a llavor un cristall de nucleoplasmina de mida petita i es va col·locar dins una gota que havia estat prèviament equilibrada amb el pou

corresponent durant dos dies. La gota on s'ha de fer la sembra ha de contenir molt poca quantitat de proteïna (d'1 a 0,25 mg/ml). Cal destacar la dificultat a l'hora de manipular els cristalls, ja que a la gota hi ha una barreja de cristalls i precipitat amorf, els cristalls estan situats tocant a la superfície del cobreobjectes i cal enretirar el precipitat per poder accedir als cristalls, que sovint estan enganxats a una mena de tel. La manipulació dels cristalls es fa mitjançant un fil o llaç de niló i sota la lupa. La sembra de cristalls s'ha fet amb l'ajut de la Dra. Lourdes Campos (ETSEIB, Universitat Politècnica de Catalunya). Aquestes proves no van tenir èxit, ja que les diferents gotes preparades presentaven terbolesa i la proteïna tenia tendència a precipitar de manera amorfa.

9.3.2 Congelació de cristalls

Alguns dels cristalls obtinguts es van congelar amb nitrogen líquid per tal de conservar-los i poder fer alguna prova de difracció al sincrotró. Per congelar un cristall cal utilitzar algun agent crioprotector com l'etilenglicol (v. II-10.4). Alguns cristalls es van equilibrar durant 30 segons amb una solució de la mateixa composició que la gota, que contenia 25% d'isopropanol i 20% d'etilenglicol, i van ser congelats ràpidament.

En alguns cristalls es va utilitzar una tècnica per augmentar gradualment la concentració d'etilenglicol del 3% al 20%, de manera similar al mètode descrit per Dutta et al. (2001). En la tècnica utilitzada s'aspira el contingut de la gota amb una pipeta evitant agafar el cristall, que ha de quedar a la gota juntament amb el mínim de solució perquè no s'assequi. Posteriorment s'hi afegeix solució nova, de la mateixa composició que la inicial però amb el 3% d'etilenglicol i el 25% d'isopropanol. En cada pas s'augmenta l'etilenglicol de la gota en un 3% i es deixa equilibrar la gota i el pou durant 40-60'. En el darrer pas (20% d'etilenglicol, 25% d'isopropanol) s'ha de deixar equilibrar tota la nit i l'endemà cal congelar el cristall.

Un dels inconvenients de la tècnica és que, a l'hora de manipular la gota, es dona un moviment brownià important i els cristalls estan en constant moviment, fet que en dificulta la manipulació. També cal tenir en compte que els diferents canvis de tampó i manipulació dels cristalls s'han de fer amb rapidesa per minimitzar les evaporacions de l'isopropanol. La congelació de cristalls es va fer amb l'ajut de la Dra. Lourdes Campos (ETSEIB, Universitat Politècnica de Catalunya).

9.3.3 Proves al sincrotró

Alguns dels cristalls de r-NP121 congelats amb nitrogen líquid es van portar al sincrotró de Grenoble (EMBL-ESRF). Es van obtenir fotografies ràpides a la font de raigs X BM-14 per als diferents cristalls amb la col·laboració de la Dra. Carme Càceres i Núria Valls (ETSEIB, Universitat Politècnica de Catalunya). No es van detectar diferències entre els cristalls equilibrats ràpidament amb etilenglicol respecte

als que es van equilibrar mitjançant passos graduals (v. III.9.3.2). En algunes de les fotografies obtingudes s'observen petites taques que indiquen que els cristalls difracten, sobretot els que tenen una mida mínima de 80 μm . De totes maneres, la font de raigs X utilitzada no és adequada per a aquests cristalls de nucleoplasmina, ja que són força petits i s'haurien de provar altres fonts més potents, com la ID14 (EH-4) o la ID13 (microfocus), que permet recollir dades de cristalls molt petits d'un mínim de 15 μm de gruix.

10. ESTUDIS ESTRUCTURALS DE LA PROTEÏNA ϕ_0 D'*Holothuria tubulosa*

La proteïna ϕ_0 de l'equinoderm *Holothuria tubulosa* té característiques intermèdies entre les histones i les protamines (Prats, 1989). Es tracta d'una proteïna de 77 aminoàcids i un pes molecular de 8640 Da. Té una gran proporció d'aminoàcids bàsics (44%), fonamentalment arginines i lisines (v. I-2.3.2). La proteïna ϕ_0 té un paper similar a la histona H1 i confereix una major estabilitat a la cromatina espermàtica.

10.1 Proves de cristal·lització de ϕ_0

La proteïna ϕ_0 d'*H. tubulosa*, igual que la protamina de *D. labrax*, estan poc estructurades en solució, presumiblement a causa de l'elevada repulsió entre les múltiples càrregues positives presents en aquestes molècules. Aquesta característica fa difícil cristal·litzar-les. Al nostre laboratori s'han fet prèviament múltiples intents per provar de cristal·litzar tant la proteïna ϕ_0 com altres proteïnes bàsiques, soles o complexades amb oligonucleòtids o pèptids (Taberner, 1991; Recacha, 1996; Gonzaga, 1997), sense gaire èxit, la qual cosa posa de manifest la gran dificultat de cristal·litzar aquest tipus de molècules.

En aquest treball s'han volgut continuar els intents de cristal·lització de la proteïna ϕ_0 . Si aconseguíssim trobar les condicions òptimes per a la cristal·lització d'aquesta proteïna es podrien aplicar per a la cristal·lització de protamines i posteriorment provar d'obtenir cristalls de complexos de protamines amb DNA i amb nucleoplasmina.

Se sap que determinats compostos com el perclorat sòdic, el trifluoroetanol (TFE), l'isopropanol (IP) i el cloroetanol tenen propietats de formació d'hèlix alfa. S'ha demostrat mitjançant estudis de dicromisme circular que tant la proteïna ϕ_0 com altres proteïnes relacionades, en presència d'1 M NaClO_4 , 99% de TFE o 90% d'IP, presenten una estructura secundària predominantment en hèlix alfa (Verdaguer et al., 1993). En aquesta mateixa línia, es van fer una sèrie de proves de cristal·lització amb diferents compostos amb propietats de formació d'hèlix alfa per poder tenir cristalls de la proteïna estructurada en forma d'hèlix alfa.

Es va utilitzar un estoc de proteïna ϕ_0 que havia estat liofilitzada i preservada a -20 C. La proteïna es va dissoldre en Tris 50 mM pH 8 en presència de 0,05% d'azida sòdica com a agent antimicrobià. A la figura III.52 es mostren diferents fraccions de la proteïna ϕ_0 emprada per a cristal·lografia.

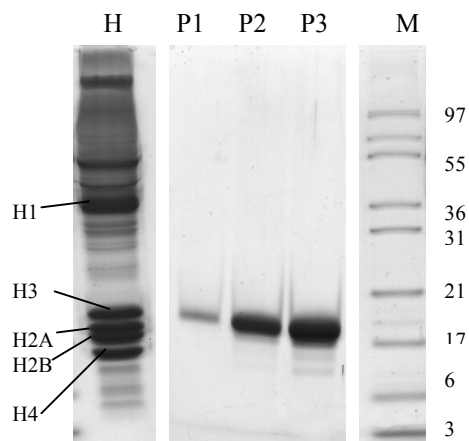


Fig. III.52 Proteïna ϕ_0 . SDS-PAGE 15% on: (H) control d'histones espermàtiques d'*E. sepositus*, (P1, P2, P3) proteïna ϕ_0 de *H. tubulosa* carregada a 5, 10 i 15 μg , respectivament, (M) marcador de pesos moleculars expressats en kDa.

Inicialment es van provar diferents condicions utilitzant el sistema en MicroBatch. Aquesta tècnica va permetre obtenir unes estructures la morfologia de les quals recordava petits embrions o mòres, que van ser denominades *gelatines* tot i tenir una consistència sòlida. Aquestes estructures tenien una mida variable d'entre 20 i 400 μm . Les condicions d'obtenció d'aquestes estructures van ser: 15-24% de PEG 4 K o PEG 6 K, 400 mM NaClO_4 , 20 mM $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ tant a temperatura ambient com a 13 °C i utilitzant 15 mg/ml de proteïna. Les proves fetes en idèntiques condicions però utilitzant diferents precipitants no van permetre obtenir les estructures descrites anteriorment. Tampoc l'addició de diferents sals no va permetre la formació de *gelatines*.

Per determinar el seu origen proteic es van introduir a l'interior d'un capil·lar i se'n va obtenir una fotografia de raigs mitjançant la càmera Warhus deixant exposar la pel·lícula durant 15 hores a una distància respecte a la mostra de 7 cm. El muntatge del capil·lar i les fotografies es van fer amb l'ajut de la Dra. Lourdes Campos (ETSEIB, Universitat Politècnica de Catalunya). Les fotografies obtingudes mostraven una sèrie de cercles en la regió propera a l'aturador del feix principal (*beam-stop*) que indicaven la presència d'alguna cosa força gran i desordenada i se'n descartava un origen inorgànic. Per confirmar l'origen proteic de les *gelatines* es van tenyir amb blau de brom fenol (v. fig. III.53). Aquesta prova va donar com a resultat la tinció de les *gelatines* de color blau fosc mentre que el fons de la gota quedava de color clar.

Posteriorment es va utilitzar la tècnica de la gota penjada, que va permetre la reproducció dels resultats obtinguts mitjançant MicroBatch. Les gotes presentaven separació de fases de manera immediata i l'aparició de *gelatines* es produïa aproximadament 6 dies després.

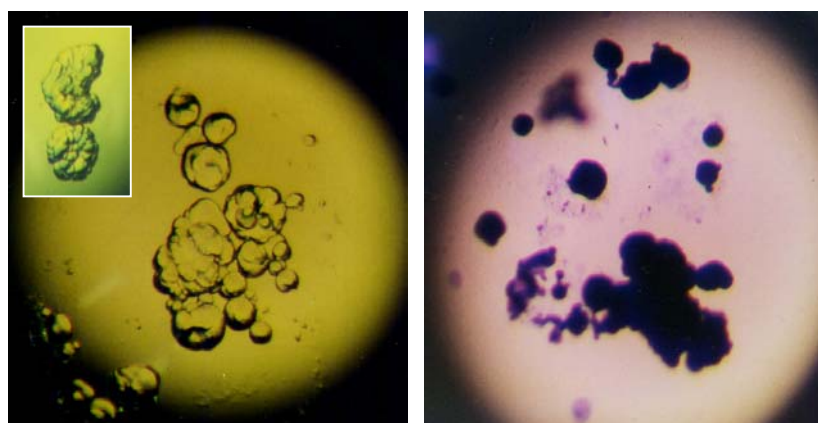


Fig. III.53 Tinció de *gelatines* de ϕ_0 . A la figura de l'esquerra es mostren les estructures denominades *gelatines* amb forma de móra o embrió (vegeu-ne el detall). A la figura de la dreta es mostren les *gelatines* tenyides amb blau de brom fenol.

A la taula III.14 es presenten els diferents reactius que han resultat interessants en les proves de cristal·lització de la proteïna ϕ_0 . Cal destacar que s'han utilitzat polifosfats com el $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (trifosfat pentasòdic), $(\text{NaPO}_3)_3$ (trimetafosfat sòdic) i $(\text{NaPO}_3)_6$ (hexametafosfat sòdic). S'han utilitzat aquest tipus de reactius com a contraions (polianions) per mimetitzar el paper que faria el DNA a l'hora de neutralitzar les càrregues positives de la proteïna ϕ_0 i permetre que aquesta adopti una estructura en hèlix alfa. El polifosfat que ha donat millors resultats ha estat el $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$.

Taula III.14 Reactius per a la cristal·lització de la proteïna ϕ_0 . Les concentracions indicades es refereixen a les condicions de partida en el pou de cristal·lització.

Reactius per a cristal·lització de ϕ_0				
dissolvents	precipitants	additius	tampons	sals
15-30% TFE 15-30% IP 15-30% cloroetanol	15-24% PEG 4 K 15-24% PEG 6 K 15-30% MPD	20 mM $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ 20 mM $(\text{NaPO}_3)_6$	50 mM Tris pH 9	0,4-1,6 M NaClO_4

Per controlar la formació de cristalls d'origen inorgànic convé fer gotes en paral·lel en absència de proteïna, sobretot si es treballa a concentracions elevades de perclorat sòdic. També convé observar la barreja de cristal·lització una vegada afegits tots els components, ja que en força combinacions s'ha observat terbolesa o separació de fases i s'han hagut de descartar. Cal destacar que moltes de les gotes amb presència de dissolvents orgànics mostraven una separació de fases que es mantenia invariable al llarg del temps. A la taula III.15 s'esquematitzen diferents condicions que han permès obtenir *gelatines*.

Taula III.15 Condicions d'obtenció de *gelatines* de proteïna ϕ_0 . Les concentracions indicades es refereixen a les condicions en el pou de cristal·lització. S'ha partit d'una solució de ϕ_0 a 15 mg/ml en 50 mM Tris pH 8, 0,05% azida sòdica. S'ha utilitzat la tècnica de gota penjada.

Condicions d'obtenció de <i>gelatines</i>	
Temperatura: 13 °C i 20 °C 10-24% PEG 6 K 267-800 mM NaClO ₄ 20 mM Na ₅ P ₃ O ₁₀ o 20 mM (NaPO ₃) ₆	Temperatura: 20 °C 15% TFE, IP o cloroetanol 20 mM Tris pH 9 4 mM Na ₅ P ₃ O ₁₀

Es va aconseguir obtenir cristalls de morfologia regular en presència de 80% TFE, 15% MPD (5% MPD a la gota) a una concentració de 20 mg/ml de ϕ_0 en 25 mM cacodilat sòdic pH 7,5 i a temperatura ambient, mitjançant la tècnica de la gota assentada. Els cristalls obtinguts (1 cristall únic per gota) tenien forma tetragonal i una mida entre 120-160 μm i eren molt resistents a l'aire; apareixien al cap de 6 dies aproximadament. Els cristalls tenien la propietat d'extingir la llum polaritzada per una de les seves cares. Es van obtenir fotografies dels cristalls a l'Image Plate que van donar com a resultat la presència de molt poques taques, la qual cosa va revelar la naturalesa presumiblement inorgànica d'aquests cristalls. Cal destacar que les gotes d'on provenien els cristalls no contenien sals i, per tant, seria la mateixa mostra la que podria contenir restes de sals, tot i que durant la preparació s'havia sotmès a diàlisi extensiva enfront d'aigua.

10.2 Proves de cristal·lització de complexos de ϕ_0 i oligonucleòtids

Es va provar la cristal·lització de la proteïna ϕ_0 en presència de diferents oligonucleòtids. La formació de complexos ϕ_0 + oligo permetria la neutralització de les càrregues de la proteïna i possibilitaria l'estructuració de la mateixa proteïna en

hèlix alfa. Cal tenir en compte que cada nucleòtid té una càrrega negativa lliure corresponent al grup fosfat i que els oligos utilitzats són de doble cadena (dúplex). A la taula III.16 es detalla la seqüència dels diferents oligos provats. Els oligos es van preparar dissolts en 25 mM de tampó cacodilat sòdic pH 6.

Taula III.16. Oligonucleòtids utilitzats per als complexos amb ϕ_0 .

Oligonucleòtids
dodecàmer de Dickerson $(CG)_2AATT(CG)_2$
decàmer $CG(TA)_3CG$
hexàmer $CGATCG$

Per als diferents experiments amb oligonucleòtids, la proteïna ϕ_0 es va preparar en 25 mM de tampó cacodilat sòdic pH 7,5. Es van provar diferents relacions molars d'oligonucleòtid respecte a proteïna ϕ_0 .

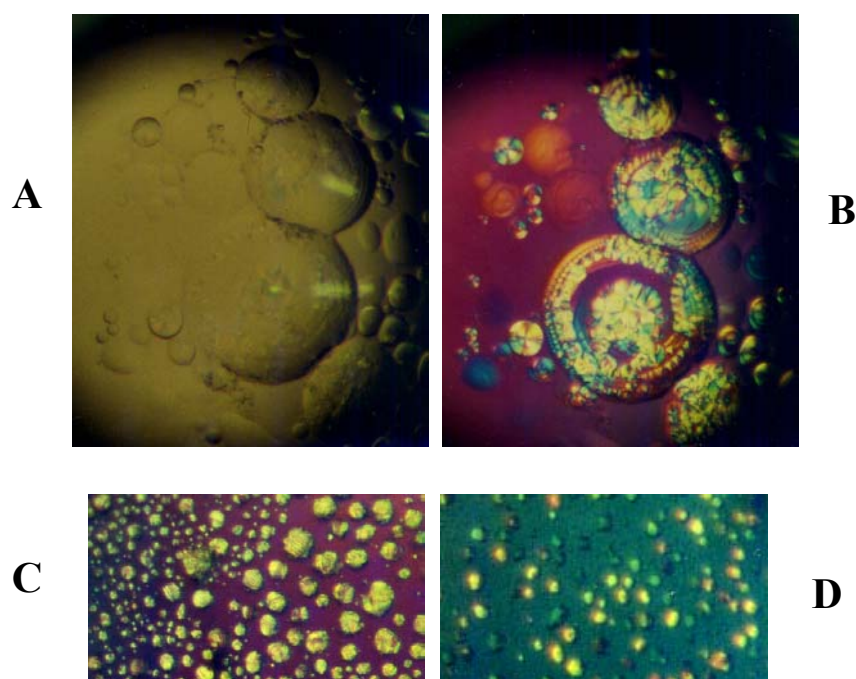


Fig. III.54 Complexos de ϕ_0 i oligonucleòtids. **A)** Separació de fases en presència de 15% PEG 6 K, 400 mM NaClO_4 , 0,9 mM decàmer i 0,3 mM ϕ_0 . **B)** La gota anterior vista amb llum polaritzada mostra una separació de fases birefringent. **C)** Precipitat cristal·lí obtingut en 60% TFE, 15% MPD (5% a la gota), 3 mM dodecàmer i 0,5 mM ϕ_0 . **D)** Precipitat microcristal·lí obtingut en 50% TFE, 15% MPD (5% a la gota), 1,2 mM decàmer i 0,15 mM ϕ_0 .

En algunes de les gotes on hi havia un excés d'oligonucleòtid es van obtenir separacions de fase birefringents en presència de 15% PEG 6 K, 400 mM NaClO₄, 0,9 mM decàmer i 0,3 mM ϕ_0 (v. fig. III.54). En altres proves es van obtenir precipitats cristal·lins i altres estructures de forma arrodonida sempre amb un excés d'oligonucleòtids. En algunes gotes es va observar la presència d'estructures de morfologia i mida diferenciada. Al centre de la gota hi trobàvem microcristalls presumiblement d'oligonucleòtid i a la perifèria apareixien boles irregulars de mida més gran que recordaven les *gelatines* explicades a l'apartat anterior, i podrien contenir proteïna ϕ_0 o fins i tot complexos de ϕ_0 i oligo però de forma desordenada.

10.3 Dicroisme circular de ϕ_0 en presència de TFE

Hi ha diferents estudis en què es relaciona la presència de trifluoroetanol i la inducció d'hèlix alfa en proteïnes i pèptids (Lehrman et al., 1990; Sönnichsen et al., 1992; revisats a Buck, 1998).

A partir de mètodes de predicció d'estructures i per dicroisme circular, es va verificar que la proteïna ϕ_0 podria trobar-se en forma d'hèlix alfa en presència de trifluoroetanol (Verdaguer et al., 1993). Aquests estudis indicaven que la proteïna ϕ_0 tindria quatre regions helicoidals separades per voltes.

Es va voler confirmar mitjançant dicroisme circular la inducció d'hèlix alfa a diferents concentracions de trifluoroetanol i determinar quina tendència tenien els canvis en l'espectre de dicroisme mitjançant una corba de titulació. Les anàlisis de dicroisme circular amb la proteïna ϕ_0 es van fer als Serveis Científicotècnics (UB) mitjançant un espectropolarímetre Jasco J-720. Es van utilitzar cubetes circulars d'1 mm de pas de llum i els espectres van ser recollits a temperatura ambient. La proteïna ϕ_0 es va preparar a una concentració de 0,1 mg/ml en 10 mM d'acetat sòdic pH 4 i presència de 0%, 25%, 50% i 75% TFE. A la figura III.55 es mostren les corbes de dicroisme circular obtingudes.

L'espectre de dicroisme circular obtingut per a la proteïna ϕ_0 presenta un pic d'el·lipticitat negativa a 198 nm. A mesura que s'augmenta la quantitat de trifluoroetanol s'observa una disminució de l'el·lipticitat molar i un desplaçament del pic cap a 205 nm i 207 nm en presència de 50% i 75% de TFE, respectivament.

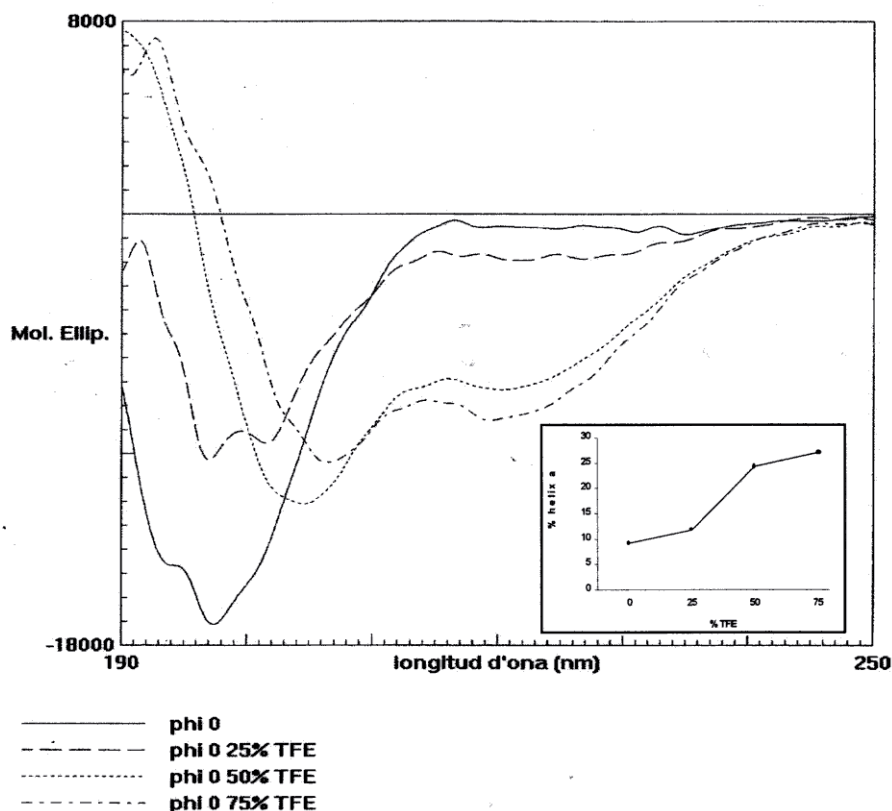


Fig. III.55 Dicroisme circular de ϕ_0 en TFE. Espectres de dicroisme circular obtinguts en 0%, 25%, 50% i 75% de TFE en 10 mM tampó acetat sòdic pH 4. L'el·lipticitat molar s'expressa en $\text{deg}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$ i està corregida pel nombre de residus. En el requadre interior es mostren els percentatges d'hèlix alfa calculats a partir de l'el·lipticitat molar a 220 nm segons Verdaguer et al. (1993).

Els càlculs del percentatge d'hèlix alfa s'han fet a partir del valor de l'el·lipticitat molar a 220 nm i utilitzant els valors de referència donats per Yang et al. (1986), tal com es descriu a Verdaguer et al. (1993). La corba de titulació amb trifluoroetanol mostra un aspecte sigmoïdal i es pot observar que a concentracions superiors al 50% de TFE l'augment del percentatge d'hèlix alfa és molt més suau i s'arriba a una fase estabilitzada (*plateau*). Aquesta característica seria un indicatiu que la proteïna podria tenir estructura terciària.

10.4 Ressonància magnètica nuclear de ϕ_0

Es va voler determinar mitjançant tècniques de ressonància magnètica nuclear si la proteïna ϕ_0 tenia estructura terciària en solució. Per a aquest objectiu es van utilitzar preparacions de proteïna en presència de TFE, ja que en els estudis previs de diroisme circular (v. III-10.3) es va determinar que el TFE permetia una estructuració de la proteïna en forma d'hèlix alfa. Es va triar la concentració de 50% de TFE perquè en aquest punt la proteïna ja presenta estructura i a concentracions superiors l'augment d'hèlix alfa ja no és lineal respecte a l'augment de TFE.

Els espectres de RMN es van recollir en presència de 10 mM tampó acetat sòdic pH 4. La raó de treballar a pH àcid és que afavoreix l'observació dels protons NH amídics, els quals no es podrien observar a pH superior a 7. A la proteïna ϕ_0 la majoria d'aminoàcids tenen càrrega positiva i a pH àcid no hauria de quedar afectada l'estructura de la proteïna.

La proteïna ϕ_0 es va preparar a una concentració 1 mM en 10 mM de tampó acetat deuterat a pH 4 (preparat a partir d'un estoc d'àcid acètic deuterat en el qual es va ajustar el pH amb sosa deuterada) i 50% de TFE deuterat per a un volum final de 0,5 ml. Es van afegir a la barreja aproximadament 2 μ l de 3-trimetilsililpropionat (TSP) com a marcador intern. La recollida d'espectres va ser realitzada per la Dra. M. Ángeles Jiménez (*Instituto de Estructura de la Materia*, CSIC, Madrid). Els espectres van ser recollits amb l'aparell Bruker (Avance) 600 MHz.

Els espectres monodimensionals (v. fig. III.56) mostren poca dispersió de senyals (els pics estan molt junts) i això és un indicatiu que la proteïna tindria poca estructura. Els resultats apunten que la proteïna ϕ_0 no tindria estructura terciària però en tindria de secundària, tot i que es preveu difícil d'analitzar ja que la proteïna és petita i amb molts aminoàcids repetitius.

Es van recollir dades tant a 20 °C com a 5 °C per determinar possibles diferències en els espectres. La disminució de la temperatura podria afavorir una millor estructuració de la proteïna. No es van observar diferències significatives entre els espectres recollits a diferent temperatura. El desplaçament del senyal de ressonància dels grups NH a baixa temperatura és una característica que es dona de manera normal. En la mateixa regió s'observa un increment en els pics de lisines i arginines a causa d'un alentiment en l'intercanvi de protons entre els grups NH d'aquests aminoàcids i les molècules d'aigua, característica que fa augmentar la intensitat d'aquests pics.

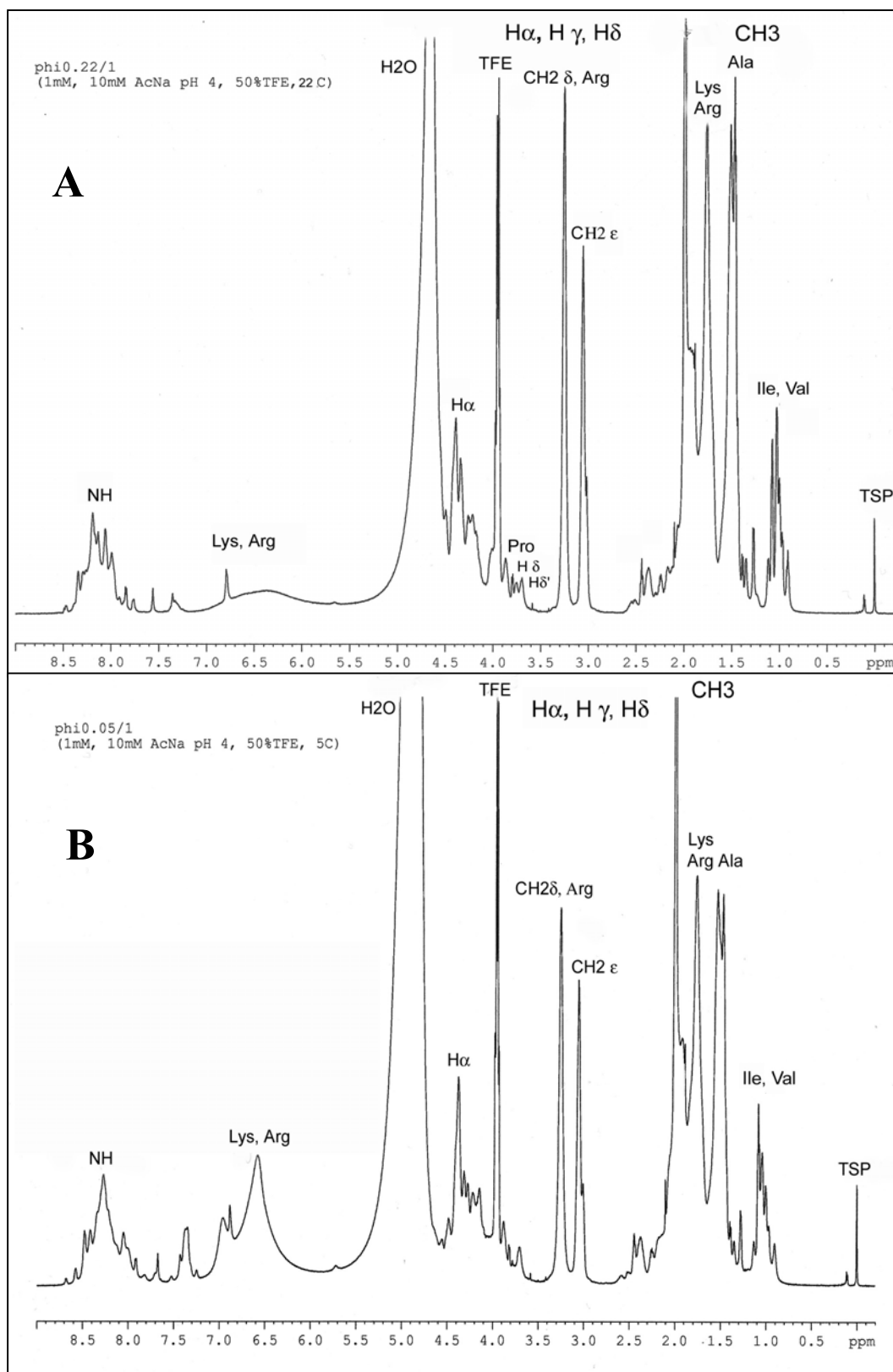


Fig. III.56 RMN de ϕ_0 (espectres monodimensionals). A) Espectre recollit a 22 °C. B) Espectre recollit a 5 °C. A l'eix horitzontal es mostra el desplaçament químic en parts per milió (ppm).

També es van recollir una sèrie d'espectres bidimensionals (NOESY, TOCSY i COSY) tant a 20 °C com a 5 °C i en paral·lel es van fer controls d'estabilitat de la proteïna mitjançant la recollida d'espectres monodimensionals per comprovar que no hi havia cap canvi respecte als espectres recollits al principi de l'experiment.

Els espectres COSY permeten assignar els grups NH de la molècula. Per a la ϕ_0 s'haurien de veure 71 senyals diferents corresponents al total d'aminoàcids excepte les 6 prolines, que no tenen grup NH, i la valina (N-terminal), on no es possible detectar-lo. No vam poder detectar la majoria de senyals a causa dels elevats solapaments entre els diferents aminoàcids. Mitjançant els espectres NOESY i TOCSY es poden estudiar els senyals provinents dels protons alfa, els quals presenten un desplaçament químic característic al voltant de 4,6-2,4 ppm. A la figura III.57 es mostren alguns dels espectres bidimensionals obtinguts.

Existeixen taules on es reflecteixen els valors de desplaçament químic típics per a cada tipus de protó pels diferents aminoàcids en estat de plegament a l'atzar o *random coil* (Bundi i Wüthrich, 1979). Es pot calcular de manera aproximada si un determinat protó es troba en estructura d'hèlix alfa o en làmina beta aplicant la fórmula:

$$\Delta\delta H\alpha = \delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{RC}}$$

on δ_{obs} és el desplaçament químic observat per cada protó alfa i δ_{RC} és el desplaçament químic característic del protó alfa per a l'aminoàcid corresponent en estat de plegament a l'atzar (v. taula A.5). Valors de $\Delta\delta H\alpha$ propers a $-0,39$ serien indicatius d'estructura en hèlix alfa, mentre que valors propers a $+0,4$ indicarien la presència de làmina beta. Es van poder assignar alguns dels senyals de protó alfa lligat a carboni per a alguns dels aminoàcids de la ϕ_0 que es recullen a la taula III.17.

A partir de l'anàlisi dels espectres de RMN es van poder assignar molt pocs senyals a causa de l'elevat solapament entre els diferents aminoàcids. Cal remarcar que la proteïna ϕ_0 té un elevat nombre d'aminoàcids repetitius (principalment 21 Ala, 20 Arg i 14 Lys) que compliquen l'assignació de senyals.

Una opció per millorar les anàlisis de RMN seria enriquir la proteïna amb heteronuclis de ^{15}N , els quals s'haurien d'incorporar a la proteïna mitjançant expressió en *E. coli* utilitzant medis de cultiu enriquits amb aquest isòtop. Posteriorment s'haurien de recollir espectres mixtos de ^1H i ^{15}N tant bidimensionals com tridimensionals. Amb aquesta metodologia es podria millorar l'assignació de senyals, però presumiblement no s'arribaria a resoldre els problemes de solapament de senyals, a causa de l'elevat nombre d'aminoàcids del mateix tipus repetits.

La proteïna ϕ_0 va ser clonada per Prats et al. (1989) (núm. de seq. X16364, Genbank) i es disposa del seu cDNA inserit en el plasmidi de llevat pYES. S'han fet intents preliminars per poder expressar la proteïna en *E. coli*, però fins al moment no han tingut èxit.

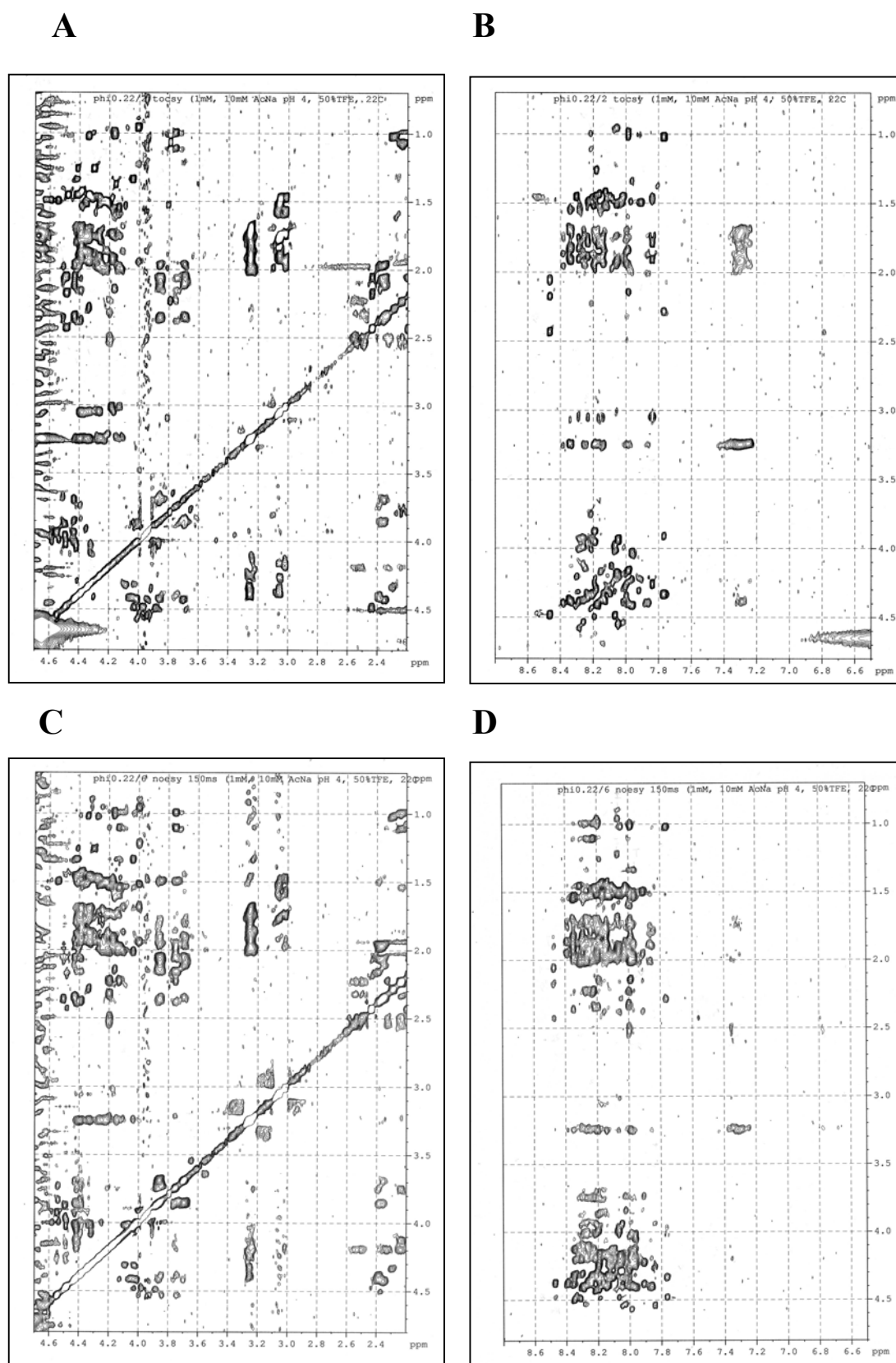


Fig. III.57 RMN de ϕ_0 (espectres bidimensionals). **A)** TOCSY (regió CH). **B)** TOCSY (regió NH). **C)** NOESY (regió CH). **D)** NOESY (regió NH). CH i NH indiquen els protons lligats a carboni i nitrogen, respectivament.

Taula III.17 Desplaçaments químics per alguns dels protons lligats a carboni alfa de la ϕ_0 . (α) protons que estarien associats a estructura en hèlix alfa, (?) valors no significatius.

NMR ϕ_0		
<u>aminoàcid</u>	<u>δ_{obs}</u>	<u>$\Delta\delta H\alpha$</u>
Gln	4,48	+0,11
Gln	4,20	-0,17 (α)
Val	4,33	+0,15
Val	4,17	-0,01 (?)
Val	3,79	-0,39 (α)
Val	3,76	-0,42 (α)
Ile	4,01	-0,22 (α)
Thr	4,04	-0,31 (α)
Thr	4,41	+0,06
Pro	4,51	+0,07
Pro	4,43	-0,01 (?)
Pro	4,39	-0,05 (?)
Ser	4,32	-0,18 (?)

Una altra alternativa seria l'obtenció de pèptids sintètics de diferents fragments de la proteïna. Es podrien obtenir 4 pèptids diferents d'aproximadament 20 aminoàcids de llarg que englobessin les 4 regions on hi hauria hèlix alfa, segons la predicció de l'estructura feta per Verdaguer et al. (1993). Teòricament els pèptids mantindrien la mateixa estructura que tenen les regions equivalents en la proteïna sencera. Aquest mètode seria ideal per permetre resoldre l'estructura secundària de la ϕ_0 , ja que reduint el nombre d'aminoàcids se simplificaria el problema de l'assignació de senyals. El principal inconvenient de la tècnica és l'elevat cost que suposa la síntesi de pèptids.