

BIOLOGIA MOLECULAR

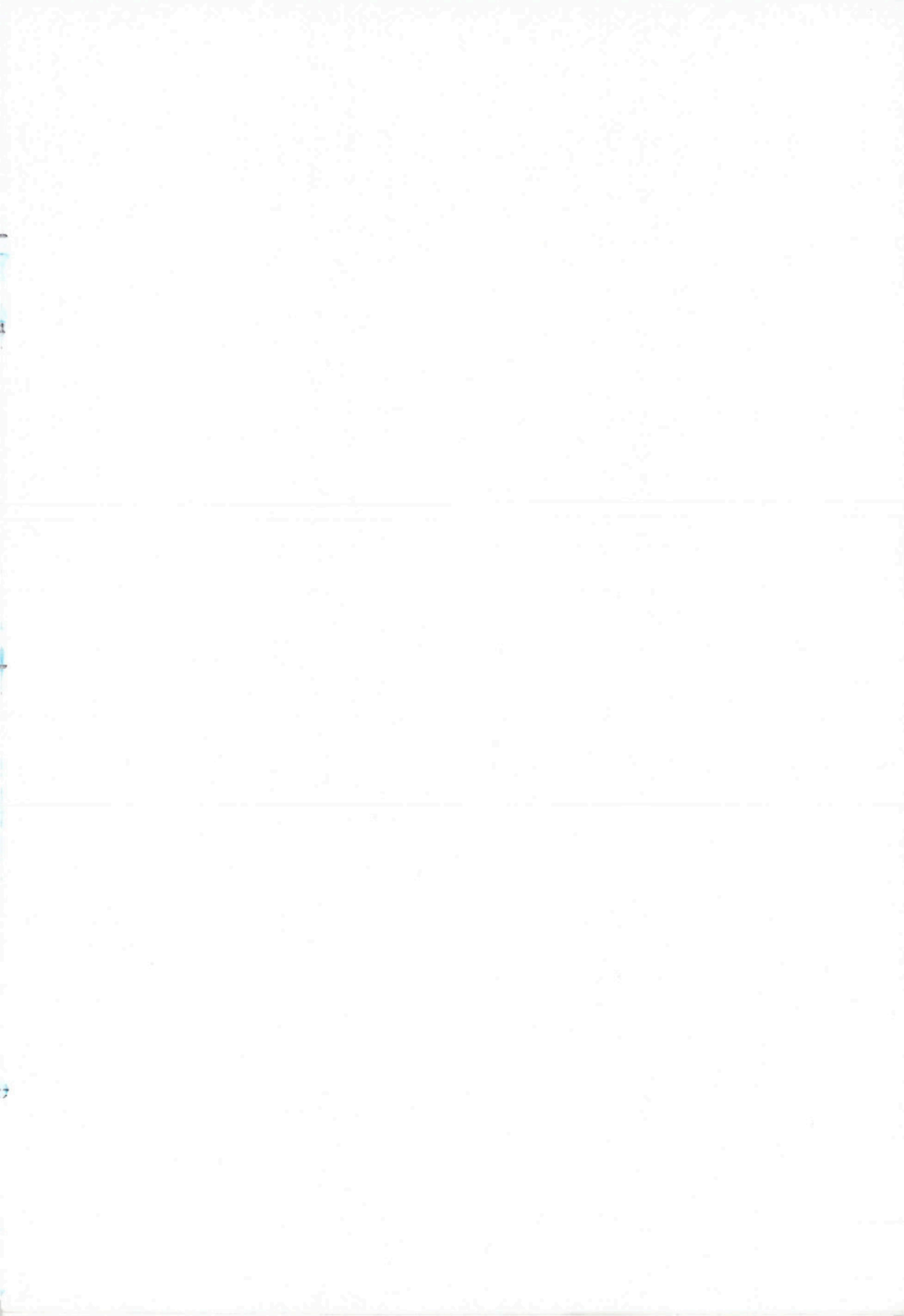
Novenes Jornades

PROGRAMA I RESUMS DE LES COMUNICACIONS



SECCIÓ DE BIOLOGIA MOLECULAR
DE LA SOCIETAT CATALANA DE BIOLOGIA

Cabrera de Mar: 8-9 de maig de 1992



NOVENES JORNADES DE BIOLOGIA MOLECULAR

Cabrera de Mar (Maresme) 8 i 9 de maig 1992

Organitzades per la Secció de **BIOLOGIA MOLECULAR**
de la **SOCIETAT CATALANA de BIOLOGIA**

Coordinadors: Jaume FARRÉS
Jordi GARCIA-MAS
Gemma MARFANY

Amb el suport de:

- Direcció General d'Ensenyament Universitari de la Generalitat de Catalunya
- Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica

TAULA-PROGRAMA

Divendres, 8 de maig

10:00 Arribada

Sessió 1: CARACTERITZACIÓ GÈNICA

Moderador: Gemma MARFANY

11:00-11:15	A. CASAMAYOR Clonació d'un nou tipus de proteïna fosfatasa en llevat	2
11:15-11:30	M ^a . ENJUTO Caracterització molecular dels gens de la HMG-CoA reductasa en <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
11:30-11:45	M. JOSÉ-ESTANYOL Aïllament d'un gen específic de l'embriogènesi del blat de moro que codifica per una HyPRP	7
11:45-12:00	J. GARCIA-MAS Caracterització de clons de cDNA de llavor immadura d'ametller (<i>Prunus amygdalus</i>)	8
12:00-12:15	Descans	
12:15-12:30	F. BURGAYA Detecció, aïllament i caracterització de productes gènics homòlegs als de tirosina-kinases a Planària	9
12:30-12:45	A.M. MUÑOZ-MÀRMOL Amplificació de seqüències "POU-BOX" a Planària	10
12:45-13:00	J.M. CANALS Caracterització molecular d'un possible receptor proteic per la toxina botulínica present a l'òrgan elèctric del peix <i>Torpedo marmorata</i>	11
13:00-13:15	R. QUERALT Amplificació, seqüenciació, evolució i funció de regions promotores dels gens de Protamina P1 de mamífers	12

13:15-13:30	R. ADROER Seqüenciació directa de l'exò 17 del gen de la proteïna amiloide implicat en la malaltia d'Alzheimer familiar	16
14:00	Dinar	
Sessió 2: REGULACIÓ GÈNICA		
<i>Moderador: Jordi GARCIA-MAS</i>		
15:30-15:45	M.A. TORRES Estudi de l'expressió del promotor del gen α -1 de la tubulina del blat de moro	21
15:45-16:00	M.F. NIOGRET Regulation of the Maize ABA responsive gene <i>Rab-28</i> in the plant development and water stress	22
16:00-16:15	V. NOÉ Implicació del calci en la resistència al Metotrexat	23
16:15-16:30	I. MARTIN Estudi dels elements responsables de la regulació transcripcional en el promotor del gen de la β -FoF1 ATP sintetasa mitocondrial	27
16:30-16:45	G. GIL-GÓMEZ Regulació multihormonal de la transcripció del gen de la HMG-CoA Sintasa mitocondrial en experiments de transfecció transitòria en cèl.lules d'hepatoma	28
16:45-17:00	C. MARTÍNEZ Regulació de l'expressió del gen <i>Achaete</i> de <i>D. melanogaster</i>	29
17:00-17:15	A. GÓMEZ-CUADRADO Repressió del gen de la histona H5 per un factor d'eritròcits que s'uneix a la regió d'inici de la transcripció	30
17:15-17:30	N. ROCAMORA Efecte de les convulsions límbiques sobre l'expressió de tres factors neurotròfics: NGF, BDNF i NT3, a l'hipocamp de rata. Comparació entre diferents models experimentals d'epilèpsia	31
17:30-18:00	Descans	

Sessió 3: ANÀLISI i DIAGNOSI GENÈTICS

Moderador: Lluïsa VILAGELIU

18:00-18:15	J.M. SORIA Anàlisi genètica del dèficit congènit de Proteïna-C associat a patologia trombòtica	33
18:15-18:30	M.T. MONTAÑÉS Contribució del polimorfisme genètic de l'Apo A-I en les malalties cardiovasculars	34
18:30-18:45	M.I. BANCHS Utilització de microsatèl.lits per a diagnòstics de paternitat	37
18:45-19:00	F.X. LÓPEZ-LABRADOR Detecció del DNA de virus de la Hepatitis B per reacció en cadena de la polimerasa (PCR): Comparació amb la hibridació molecular.....	38
19:00-19:15	J.J. FUENTES Mapatge i localització del gen de la malaltia de Norrie	42
19:15-19:30	S. BALCELLS Estudi genètic i molecular de la distròfia miotònica en poblacions de l'estat espanyol	43
19:30-19:45	M. CHILLÓN Aplicació del mètode del <i>Single Strand Conformation polymorphism</i> (SSCP) a la diagnosi gènica i la identificació de noves mutacions en el gen de la Fibrosi Quística	44
19:45-20:00	M. BAYÈS De YACs a Còsmids: Nova estratègia aplicada al mapatge de la regió centromèrica del cromosoma Y humà	47
20:00	Sopar	

Dissabte, 9 de maig

Sessió 4: ANÀLISI de MACROMOLÈCULES — (I)

Moderador: Jaume FARRÉS

9:30- 9:45	M. FERNÁNDEZ Caracterització de dos anticossos monoclonals contra la lipoproteïna lipasa bovina	49
9:45-10:00	M.C. VEGA Purificació preparativa de l'Arginina-quinasa pel seu estudi cristal·logràfic..	50
10:00-10:15	M. DABAN Seqüenciació de la protamina P2 de <i>Monodonta turbinata</i> : Estratègia i resultats	51
10:15-10:30	B. OLIVA Dinàmica molecular com a eina per al disseny de mutants de proteïnes: Aplicació a l'estudi comparatiu de l'inhibidor proteic de la carboxi-peptidasa A de la patata i dels seus mutants <i>Pro36Gly</i> i <i>Tyr37Phe</i>	52
10:30-10:45	I. GARCIA Anàlisi cristal·logràfica de l'enzim Glutation S Transferasa	56
10:45-11:15	Descans	

Sessió 4: ANÀLISI de MACROMOLÈCULES — (II)

Moderador: Miquel COLL

11:15-11:30	Ll. BOQUÉ Estudis cristal·logràfics de derivats químics de Ribonucleasa A	58
11:30-11:45	M.C. VEGA Estudi per dinàmica molecular de la zona central del <i>loop</i> antigènic del virus de la febre aftosa (serot. C—soca Santa Pau): Influència del model de solvatació	59
11:45-12:00	E. JIMÈNEZ-GARCIA L'elsamicina i la forma Z del DNA	63
12:00-12:15	D. HUERTAS Estructura <i>in vitro</i> de seqüències telomèriques en DNA superhelicoidal ...	64

12:15-12:30	X. FERNÁNDEZ-BUSQUETS Clonatge de DNA nucleosòmic: reaccions de les histones amb el DNA monocatenari	65
12:30-12:45	Descans	
12:45-13:45	Conferència a càrrec del Dr. Rafael SENTANDREU . Secció de Microbiologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València. <i>Morfogènesi en Llevats</i>	
14:00	Dinar	
15:45-16:45	Conferència a càrrec de la Dra. Salomé PRAT . Institut für Genbiologische. Forschung Berlin GmbH. Berlin, Alemanya. <i>Mecanismes de defensa a plantes: Funció de les hormones àcid Abscísic i Jasmònic com a senyals intermediàries</i>	
Sessió 6: EXPRESSIÓ GÈNICA		
<i>Moderador: Pere PUIGDOMÈNECH</i>		
17:00-17:15	M.A. MOLINA Construcció, clonació i expressió d'un gen sintètic per l'inhibidor de Carboxipeptidasa de patata.....	69
17:15-17:30	J. BERTRAN Clonatge d'un cDNA que indueix, en oòcits de <i>Xenopus</i> , el sistema b ⁰⁺ de transport d'aminoàcids. Una nova família de transportadors d'aminoàcids a mamífers.....	73
17:30-17:45	V. VILLEGAS Obtenció de mutants de la Procarboxipeptidasa B de pàncreas porcí en el seu segment d'activació	74
17:45-18:00	I. PONTE Activació transcripcional del gen de la histona H1 ¹ al <i>snc</i> de ratolins transgènics	77

18:00-18:15	Descans	
18:15-18:30	E. ROSELL	
	Utilització de vectors d'expressió en <i>E. coli</i> pel clonatge de regions variables d'anticossos	78
18:30-18:45	S. BARRÓN	
	Canvis a l'expressió dels gens I i II de la calmodulina en el cervell de rata, produïts pel neurotòxic <i>Lindane</i>	82
18:45-19:00	J. GARCIA-FERNÁNDEZ	
	Expressió espacial i organització genòmica dels gens amb "homeobox" <i>Dth-1</i> i <i>Dth-2</i>	86
19:00-19:15	M. FURRIOLS	
	Expressió gènica del sistema b^{0+} de transport d'aminoàcids (<i>rBAT</i>): ontogènia, diabetis i dejuni	87
19:30	Cloenda de les Jornades	

Sessió 1

CARACTERITZACIÓ GÈNICA

CLONACIÓ D'UN NOU TIPUS DE PROTEÏNA FOSFATASA EN LLEVAT

Antonio Casamayor, Francesc Posas i Joaquim Ariño
Dept. de Bioquímica i Biologia Molecular. Fac. Veterinària,
Universitat Autònoma Barcelona

RESUM

Hem amplificat per PCR (Polymerase Chain Reaction) fragments de DNA genòmic de llevat amb característiques estructurals de Ser/Thr fosfatases, fent servir oligonucleòtids que codifiquen seqüències conservades entre les fosfatases tipus 1, 2A i 2B. Un fragment amplificat de 215 pb va ser utilitzat per analitzar una biblioteca de DNA genòmic. La seqüència d'un clon positiu obtingut revela un ORF de 2.076 pb que codifica per una proteïna de 692 aminoàcids. L'extrem carboxi-terminal de la proteïna es troba estructuralment relacionat amb les fosfatases tipus 1, mentre que la meitat NH₂-terminal no es relaciona amb cap seqüència de fosfatasa. Aquesta regió és molt rica en residus serina i en aminoàcids bàsics. Així, el producte del gen pot representar un nou tipus de proteïna fosfatasa. El gen corresponent, que anomenem *PPZ1*, es troba en el cromosoma XIII i s'expressa com un mRNA de 2,7 kbp. La seva disrupció no dona com a resultat cap fenotip evident. La presència en extractes de llevat d'una proteïna de 75 kDa que es reconeguda per anticossos desenvolupats contra el gen expressat en bacteris va ser detectada mitjançant experiments d'immunoblot.

INTRODUCCIÓ

El creixement cel·lular, el control del metabolisme, la resposta a estímuls externs i la biosíntesi de proteïnes, entre d'altres processos cel·lulars, estan controlats per reaccions de fosforilació de les proteïnes en residus de serina i treonina [1,2]. L'estat de fosforilació d'una proteïna és el resultat de la integració de les activitats proteïna quinasa i proteïna fosfatasa (PP).

Les tècniques enzimològiques i de química de proteïnes van permetre identificar 4 tipus majoritaris d'activitats Ser/Thr PP: tipus 1 i tipus 2A, 2B i 2C [3]. Els cDNA que codifiquen les seves subunitats catalítiques han estat clonats i això ha fet evident que les PP tipus 1, 2A i 2B estan molt relacionades estructuralment. A més a més, l'anàlisi de diverses biblioteques de cDNA de mamífers i de *Drosophila* ha permès identificar nous tipus de PP (PP-V, PP-X, etc.), la funció de les quals encara no es coneix.

La presència d'activitats PP en llevat és coneguda des de fa anys [4]. Evidències obtingudes recentment van suggerir que aquests enzims eren molt semblants als dels mamífers. Així, el gen *DIS2S1* de *S. cerevisiae* codifica una PP que és 81% idèntica a la PP-1 de conill, mentre que s'ha identificat dos gens que són un 73% idèntics a la subunitat catalítica de la PP-2A d'humans [5,6]. Alguns d'aquests gens són essencials per a la cèl·lula perquè estant involucrats en el control del cicle cel·lular [7,8].

Tenint en compte aquests antecedents, decidírem esbrinar si en llevat podien existir nous tipus de Ser/Thr fosfatases, tot i aprofitant les tècniques de PCR.

MATERIALS I METODES

Les seqüències dels oligonucleòtids utilitzats, MP-1s i MP-3as, són respectivament: 5'-GGGAATTCGA(CT)(CAT)(GC)(CT)(AGC)TGGTC(ATG)GA(TC)CC-3', i 5'-CCAAGCTT(CT)(CA)(GA)(CA)(GA)TA(GA)TT(GT)GG(CAGT)GC 3' on les seqüències subratllades corresponen a llocs de restricció EcoRI i HindIII afegits per facilitar el clonatge.

La soca de *S. cerevisiae* M5 (*MAT α /MAT α* , homozigòtica per *leu2-3/112 ura 3-53 trp1*) va ser utilitzada per a la preparació de DNA genòmic i experiments de disrupció gènica. La seqüència nucleotídica del DNA clonat s'esbrinà pel mètode dels dideoxinucleòtids, mitjançant l'ús de "primers" fluorescents, a un seqüenciador automàtic Applied Biosystem 373A.

El DNA genòmic de la soca M5 va ser preparat com es descriu en [9], i per l'amplificació vàrem fer servir 0,2 µg. Les condicions utilitzades van ser: 94°C durant 2 min, 50°C durant 2 min, i 72°C durant 2 min. Després de 30 cicles, el DNA amplificat es va digerir amb una mescla de EcoRI i HindIII i va ser separat en gel d'agarosa. Els fragments d'una mida apropiada (200-250 pb) es van purificar i lligar al vector Bluescript SK(+) prèviament digerit amb EcoRI i HindIII.

Els experiments de Southern blot es van realitzar amb 10 µg de DNA genòmic. L'hibridització es va portar a terme a 65°C en 5xSSC, 0,1%SDS, i els filtres van ser rentats a 55°C en 0,1xSSC, 0,1%SDS. El sistema emprat fou el de detecció de DNA mitjançant marcatge amb digoxigenina (Boehringer Mannheim).

El RNA total va ser preparat com es descriu en [9]. Les sondes de DNA utilitzades pels experiments de Northern blot van ser marcades amb ³²P pel mètode de "random priming". Les hibriditzacions es van fer a 42°C en 5xSSC i amb formamida al 50%. Els rentats es realitzaven a 55°C en 0,1xSSC i 0,1% SDS.

La disruptió del gen *PPZ1* es va fer mitjançant la tècnica de "one-step gene disruption" [10]. Els anticossos contra la proteïna PPZ1 es van obtenir prèvia expressió en *E. coli* d'una part substancial d'aquesta (aa 118-692) fent servir el vector pT7-7.

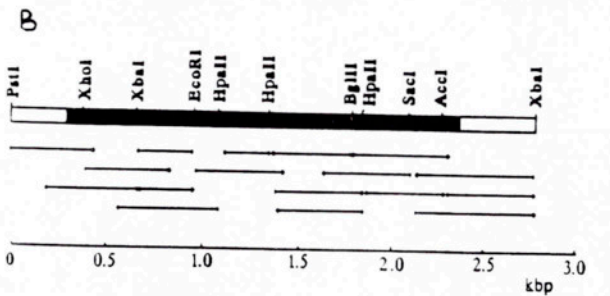
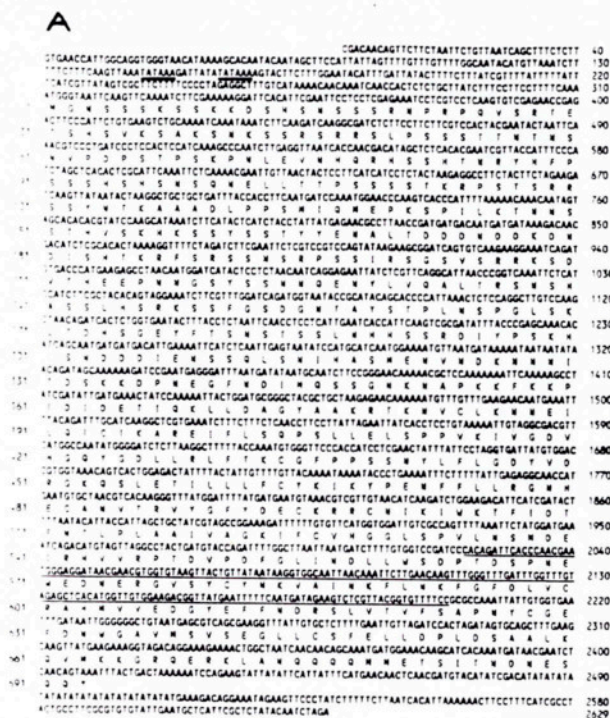


Figura 1.- A) Seqüència de nucleòtids i seqüència deduida d'aminoàcids del gen *PPZ1*. La seqüència que correspon al fragment ST4-2 es troba subratllada i les presumptes caixes TATA ho estan doblement. B) Estratègia de seqüenciació del gen *PPZ1*. Només s'indiquen els centres de restricció rellevants en el procés de subclonació.

posseeix gran quantitat d'aminoàcids bàsics ($pl=10.3$) en contraposició amb la meitat C-terminal ($pl=5.6$).

La funció de la meitat amino-terminal d'aquesta proteïna es desconeguda. Es coneix, però, que en cèl·lules de mamífer i en llevat, l'activitat Ser/Thr fosfatasa pot ser regulada mitjançant la interacció de la subunitat catalítica amb proteïnes reguladores. No podem excloure la possibilitat de que una mateixa molècula contingui les dues funcions. De fet, les subunitats catalítiques de les fosfatases tipus 2B es

RESULTATS I DISCUSIÓ

Aïllament del gen que codifica

PP-Z1. Una de les seqüències amplificades per PCR del DNA genòmic de llevat és l'anomenada ST13-2, de 215 pb. Els experiments de Southern blot, utilitzant ST13-2 com a sonda, van indicar que hibriditzava amb un fragment PstI-PstI d'unes 4.5 Kpb.

Aquesta informació va ésser utilitzada pel clonatge del gen sencer. Es va construir en pUC19 una biblioteca de DNA genòmic digerit amb PstI d'entre 4 i 5 kpb i el seu anàlisi es va dur a terme fent servir la sonda ST13-2. El DNA de l'únic clon positiu obtingut va ser mapejat i subclonat en M13. El fragment clonat conté un ORF de 2.076 pb, codificant un polipèptid de 692 residus amb una massa molecular de 77,418 kDa i $pl=8.4$, que anomenem PPZ1. Trobem dos elements TATA situats a les posicions -151 i -164 (Fig 1).

La proteïna codificada per aquest gen presenta interessants característiques: a) Té un tamany major que la de les subunitats catalítiques de les Ser/Thr fosfatases de llevat, *Drosophila*, mamífers i plantes. b) La meitat carboxi-terminal de la proteïna mostra una identitat del 64% amb la proteïna fosfatasa tipus 1 trobada en *S. cerevisiae*, *DIS2S1* (74% si es consideren els carvis conservatius). c) La regió compresa entre els aminoàcid 1 i 319, que no mostra similituts amb cap de les PP, és molt rica en residus Ser (26% dels aminoàcids i 80% del total de serines). Moltes d'aquestes serines es troben en seqüències adients per fosforilació per la proteïna quinasa dependent d'AMPc de llevat. A més a més, aquesta regió

caracteritzen per una extensió C-terminal d'uns 200 aminoàcids que conté el domini d'unió a la calmodulina, i que serveix com a element regulador. Una possible funció de la primera meitat de PPZ1 podria ser la de reguladora de l'activitat del domini catalític, mitjançant la fosforilació reversible de residus de serina.

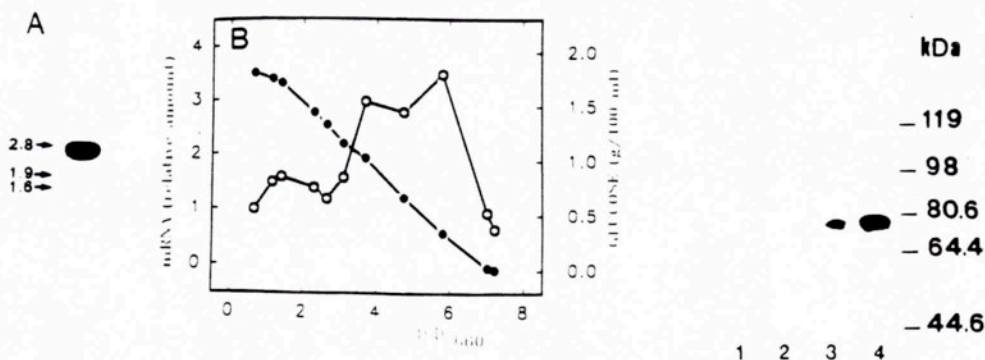


Figura 2.- Expressió del mRNA de PPZ1. A) Northern blot fent servir 5 µ de RNA poli(A)⁺. B) Variació dels nivells de RNAm de la PPZ1 durant el cultiu (○—○) Quantitat relativa de RNAm estimada mitjançant densitometria d'experiments de Northern blot. (●—●) Concentració de glucosa en el medi de cultiu.

Figura 3.- Identificació de la proteïna PPZ1 mitjançant Western blot en extractes de llevat. 1 i 2) Serum preimmune 3 i 4) Serum anti-PPZ1. Les mostres 2 i 4 corresponen a una soca que conté el gen PPZ1 en multicòpia.

Expressió de PP-Z1. El tamany del mRNA de PP-Z1 és de 2,7 kb, segons els experiments de Northern blot (Fig. 2a). La quantitat d'aquests mRNA varia al llarg del cultiu, augmentant 3-4 vegades quan s'ha consumit la meitat de la glucosa del medi de cultiu i retornant als nivells inicials quan aquesta s'ha consumit totalment (Fig. 2b). La proteïna va poder ser detectada mitjançant anticossos en experiments d'immunoblot i apareix amb un pes molecular de 75 kDa, en estreta concordància amb el valor previst. La identitat d'aquesta proteïna va ser corroborada pel fet que es pot detectar un increment en la seva quantitat quan es fan servir extractes cel·lulars d'una soca que conté el gen PPZ1 en un plasmídic multicòpia (Fig. 3)

Disrupció del gen PP-Z1. Per a poder estudiar la funció del producte del gen, vàrem eliminar fragments de la regió codificant, insertant en el seu lloc els gens de *S. cerevisiae* TRP1 o URA3 (Fig. 5). Les cèl·lules diploides de M5 van ésser transformades i seleccionades en els medis adients. Posteriorment es va induir l'esperulació i les espores foren separades per micromanipulació. Les quatre espores de cada tetrada resultaren ser viables, indicant que el producte del gen no és essencial pel creixement de *S. cerevisiae*. Les cèl·lules haploides mutades no es distingeixen de les isogèniques quan comparem la capacitat de

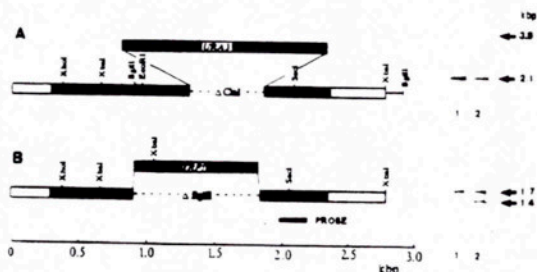


Figura 4.- Disrupció del gen PPZ1. Parts substancials del gen PPZ1 varen ser eliminades i substituïdes pels gens URA3 (A) o TRP1 (B). Una vegada transformada la soca diploide adient, es va preparar DNA genòmic dels transformants estables *trp1⁻* o *ura3⁻* i es va procedir a l'anàlisi per Southern blot. 1) Soca salvatge 2) Diploide heterozigòtic amb una còpia de PPZ1 interrompuda.

creixement en un medi amb font de carbó no fermentable, ni en la sensibilitat al factor- α o al shock tèrmic. A més a més, les cèl·lules diploides homozigòtiques per la disrupció són capaç d'esporejar normalment. Una de les explicacions per la manca d'un fenotip evident podria ser la existència d'un segon gen capaç de complementar funcionalment les funcions de *PPZ1*. De fet, existeixen evidències [11] que suggereixen que aquest segon gen existeix i que la seva seqüència pot ésser força semblant. El nostre laboratori esta adreçant els seus esforços a la clonació i identificació d'aquest segon gen.

REFERENCIES

- 1.- Walsh, D.A.; Newsholme, P.; Cawley, K.C.; Van Patten, S.M. i Angelos, K.L. (1991) *Physiological Reviews* 71, 285-304.
- 2.- Cohen, P. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58, 453-508.
- 3.- Ingebritsen, T.S. i Cohen, P. (1983) *Science* 221, 331-338.
- 4.- Holzer, H. (1987) *Adv. Prot. Phosphatases* 4, 153-164.
- 5.- Ohkura, H.; Kinoshita, N.; Miyatani, S.; Toda, T. i Yanagida, M. (1989) *Cell* 57, 997-1007.
- 6.- Sneddon, A.A.; Cohen, P.T.W. i Stark, M.J.R. (1990) *EMBO J.* 9, 4339-4346.
- 7.- Sneddon, A.A. i Stark, M.J.R. (1991) *Adv. Prot. Phosphatases* 6, 307-330.
- 8.- Clotet, J.; Posas, F.; Casamayor, A.; Schaaff-Gerstenlager, I. i Arino, J. (1991) *Curr. Genet.* 19, 339-342.
- 9.- Sherman, F.; Fink, G.R. and Hicks, J.B. (1986) in "Methods in Yeast Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- 10.- Rothstein, R.J. (1983) *Methods Enzymol.* 101, 212-211.
- 11.- Da Cruz e Silva, E.F.; Hughes, V.; Mc. Donald, P.; Stark, M.J.R. i Cohen, P.T.W. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1089, 269-272.

Agraïments: Aquest treball a tingut el suport de la D.G.I.C.Y.T. (Projecte PB-0313) i d'una "Acción Integrada Hispano-Alemana". F.P. gaudeix d'una beca F.P.I. del M.E.C. Els autors agraeixen la col·laboració de M. Camps, A. Vlalta, N. Morral i X. Estivill.

CARACTERITZACIÓ MOLECULAR DELS GENS DE L'HMG-CoA REDUCTASA EN *Arabidopsis thaliana*

Enjoto M.^a, Lumbreras V.^a, Campos N.^a, Arró M.^b, Rodríguez J.C.^b, Ferrer A.^b i Boronat A.^a.

a Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular A, Facultat de Química, Universitat de Barcelona.

b Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona.

L'enzim 3-hidroxy-3-metilglutaril coenzim-A (HMG-CoA) reductasa catalitza la síntesi de mevalonat a partir d'HMG-CoA, reacció que es considera un dels punts principals de regulació de la biosíntesi d'isoprenoides en plantes, (1 i 2). L'HMG-CoA reductasa és un enzim de membrana associat al reticle endoplàsmic, si bé s'ha descrit també en els cloroplasts i les mitocondries.

A *Arabidopsis thaliana* existeixen dos gens diferents de l'HMG-CoA reductasa, HMG1 i HMG2, que presenten un patró d'organització estructural molt similar, format per quatre exons separats per tres introns de petita longitud, (3 i 4). Les regions 5' flanquejants són molt divergides entre elles. És possible l'existència de un doble inici de transcripció en el gen HMG1 que donaria lloc a dos transcrits que codificarien per dos formes de la proteïna. Els dos inicis estan en fase de manera que el primer inici donaria lloc a una proteïna 50 aminoàcids més llarga.

Els dos gens presenten un patró d'expressió diferencial a la planta. Mentre que el gen HMG1 s'expressa en nivells relativament alts a totes les parts de la planta estudiades, el transcrit de l'HMG2 i el transcrit més llarg de l'HMG1 són presents en nivells molt més baixos i de manera restringida a diferents parts de la planta.

L'estudi de la regulació de l'expressió dels gens HMG1 i HMG2 s'ha abordat mitjançant la utilització de plantes transgèniques que contenen construccions quimèriques en les que la regió 5' flanquejant d'aquests gens s'han fusionat amb el marcador GUS.

També s'han fet construccions de proteïnes de fusió dels dominis de membrana dels dos gens per estudiar la possible compartimentalització cel·lular a nivell de plantes transgèniques.

Actualment s'han iniciat estudis de topologia e inserció a membrana de les formes isoenzimàtiques mitjançant tècniques de transcripció i traducció *in vitro* en presència de membranes microsomals.

1.- Bach, T.J. (1987) Synthesis and metabolism of mevalonic acid in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 25, 163-178.

2.- Gray, J. (1987) Control of isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Adv. Botan. Res.* 14, 25-91.

3.- Caelles, C., Ferrer, A., Balcells, L., Hegardt, F.G. i Boronat, A. (1990). Isolation and structural characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Mol. Biol.* 13, 253-258.

4.- Monfar, M., Caelles, C., Balcells, L., Ferrer, A., Hegardt, F.G. i Boronat, A. (1990). Molecular cloning and characterization of plant 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Recent. Adv. Phytochem.*, H. Stafford ed., vol. 24, pp 83-89. Plenum Press, N.Y.

AILLAMENT D'UN GEN ESPECIFIC DE L'EMBRIOGENESI DEL BLAT DE MORO QUE CODIFICA PER UNA HyPRP.

M. Josè-Estanyol, L. Ruiz, P. Puigdomènech.
Dpt. Genètica Molecular. C.I.D.-CSIC. Barcelona.

Diferents classes de proteïnes molt riques en residus de prolina han estat descrites en plantes. Les millor estudiades d'aquestes proteïnes tant a nivell de la proteïna com del DNA són les glicoproteïnes riques en hidroxiprolina (HRGPs) i les proteïnes riques en prolina (PRPs). Famílies multigèniques codifiquen per aquestes proteïnes de paret cel·lular en plantes dicotiledònies, mentre que en cereals constitueixen un sistema molt més senzill. En el blat de moro les HRGP podrien estar representades per un sol gen.

En crivellar una llibreria genòmica de *Zea mays* (W64A) amb una sonda de la regió codificant de la HRGP de blat de moro s'aïllat un clo que codifica per una proteïna amb dos dominis molt ben definits, el primer ric amb prolina i el segon hidrofòbic. El domini ric en prolina està constituït per els elements PPYV i PPTPRPS, similars als descrits per les PRPs de soja. El domini hidrofòbic és ric en Cys i similar a proteïnes de llavor, concretament a la proteïna hidrofòbica de llavor de soja.

En el blat de moro, la HyPRP està codificada per un gen únic i el seu RNAm s'acumula en embrions zigòtics immadurs entre els dies 12 i 18 després de la polinització. El RNAm corresponent a la HyPRP pot ser també detectat en l'ovari abans de la polinització. L'expressió del gen de la HyPRP ha estat també estudiada en el mutant *vivipar-2* (*vp2*) del blat de moro. Aquest mutant es caracteritza per ser deficient en ABA i tenir alterat el procés de dessecació. En aquests mutants l'expressió de la HyPRP es veu prolongada fins quasi al final de l'embriogènesi. Finalment en embrions somàtics de la varietat *Cat100-1*, emprada per regenerar plantes fèrtils a partir de protoplastes transformats, l'expressió del gen no ha estat mai detectada ni abans ni després de induir llur diferenciació en les formes globulars, cor o torpedo quan l'auxina s'elimina progressivament de les suspensions cel·lulars.

Estudis d'hibridització in situ amb seccions d'embrions de 18 dies després de la polinització indiquen que el gen de la HyPRP s'expressa en l'escutel i en cèl·lules no vasculars de l'eix embrionari mentre que el de la HRGP de blat de moro ho fa de manera complementària a la que hem descrit per la HyPRP.

La seqüència aquí descrita per la HyPRP del blat de moro suggereix un paper bifuncional per aquesta proteïna en l'embrió. Primer com a proteïna estructural de paret cel·lular donada la seva similitud amb les PRPs. En segon lloc com proteïna d'emmagatzemament o defensa donada la similitud entre aquestes proteïnes i l'extrem C-terminal de la HyPRP de blat de moro. De manera temporal la HyPRP podria per tant contribuir a l'estabilitat i defensa de l'embrió en desenvolupament.

CARACTERITZACIO DE CLONS DE cDNA DE LLAVOR
IMMADURA D'AMETLLER (*Prunus amygdalus*)

Jordi Garcia-Mas¹, Michael Stöcker¹, Marian Viruel², Ramon Messeguer², Pere Arús² i Pere Puigdomènech¹. Unitat Mixta IRTA-CSIC: Departament de Genètica Molecular, Centre d'Investigació i Desenvolupament (CSIC) i ²Departament de Genètica Vegetal, IRTA (Cabrils).

L'objectiu d'aquest treball és la identificació i caracterització de clons de cDNA de proteïnes de reserva abundants a la llavor immadura d'ametller. Partim del fet que quan es forma el cotiledó comencen a expressar-se els gens codificants de proteïnes de reserva.

Amb aquest propòsit vàrem construir un banc de cDNA en lambda-ZAP a partir de mRNA poliA⁺ de llavor immadura de 4 mesos, quan el cotiledó està formant-se. Vàrem prendre uns 5000 clons independents i els hi produïrem una excissió "in vivo" per tenir-los clonats en plàsmid, éssent així més fàcilment manipulables. Vàrem aïllar 400 clons independents, els vàrem créixer en plaques de microtitulació, i després els vàrem glicerinar. Les rèpliques en filtres de nylon obtingudes de cada placa de microtiter vàren ser hibridades amb sonda de cDNA primera cadena obtinguda a partir de RNA total del mateix teixit que l'utilitzat per a la síntesi del banc de cDNA. Vàrem aïllar alguns dels clons que donaren una hibridació més forta, i el clon 3BH10, després de ser seqüenciat per 5', va resultar tenir homologia amb varies famílies de gens de proteïnes de reserva d'altres espècies de dicotiledònies, entre elles les β -globulines de cotó i les leguminoses.

Per tractar-se d'un clon amb un insert de 900pb, massa curt per encloure el marc de lectura sencer, s'utilitzà com a sonda per hibridar sobre el banc de cDNA, obtenint-se així un nombre elevat de clons positius, dels quals vàrem analitzar-ne dos, els clons 3BF1 i 1BC7. El primer conté un insert de 2.0 Kb amb un ORF que comença a 50pb de l'extrem 5' terminal, el qual estem seqüenciant actualment, i presenta una elevada homologia amb la β -globulina de cotó. El clon 1BC7, presenta homologia elevada amb les glicinines de soja, entre d'altres, i conté un insert de 1.3 Kb, el qual utilitzarem com a sonda per buscar un possible clon sencer.

Aquests clons, juntament amb altres clons que hem caracteritzat en un banc de cDNA d'arrel jove d'ametller (extensina, α -tubulina i fosfoglicerat mutasa), s'utilitzaran en propers estudis com a marcadors del desenvolupament de la llavor de l'ametller, així com a sondes pel mapatge genètic de *Prunus*.

DETECCIÓ, AILLAMENT I CARACTERITZACIÓ DE PRODUCTES GENÈCS HOMÒLEGS ALS DE TIROSINA-KINASES A PLANÀRIA.

F BURGAYA, J GARCIA-FERNANDEZ, M RIUTORT, J BAGUÑA & E SALO. Dpt de Genètica, Fac Biologia; Diagonal, 645. 08028 Barcelona.

La gran diversitat d'organitzacions que admeten els éssers vius sembla regulada per un programa coordinat de mecanismes i senyals altament conservats. D'entre ells, els receptors de membrana amb activitat citoplasmàtica tipus tirosina-kinasa semblen actuar en processos diversos, com ara proliferació i diferenciació cel·lulars.

L'activitat tirosina-kinasa sembla associada a l'adquisició de multi-cel·lularitat (1, 2) malgrat recentment ha estat detectada també en llevats (3); productes genècs homòlegs a tirosina-kinases han estat detectats a *Hydra* (2) i a plantes (4). Hi ha evidències d'activitat tirosina-kinasa en esponges (2) i procariotes (4), no forçosament homòloga. Hom distingeix avui diferents sub-famílies de tirosina-kinases (1, 5) que (als sistemes aparentment més primitius) poden respondre a enzims ancorats a la membrana per l'*N-terminus*. Aquests enzims actuarien com a transductors de receptors de membrana als quals estarien acoblats; així s'esdevé en el cas de reconeixement d'antígens pels limfòcits (6). D'altres sistemes presenten enzim i receptor com a dominis d'una mateixa molècula que reconeix un lligand extern i transmet el corresponent senyal a l'interior de la cèl·lula, com s'esdevé per als receptors de factors de creixement.

La prèvia detecció d'immuno-reactivitat EGF-like en preparacions histològiques de planària, així com l'activitat mitogènica que provoquen EGF i FGF, ens ha empès a buscar possibles productes genècs codificant per a receptors amb catalisi tirosina-kinasa acoblada. Seguint l'estratègia del Dr. R. Steele per a *Hydra* (2), hem intentat amplificar per PCR -a partir de cDNA procedent d'extractes d'RNA polyA⁺ pertanyent a individus intactes- el fragment més conservat del domini catalític mitjançant nucleòtids degenerats específics.

Aquest sistema ens ha permès l'isolament -a la planària *Dugesia (G) tigrina*- d'una seqüència codificant per a 67 aminoàcids, molt homòloga amb la seqüència *consensus* coberta pels esmentats oligonucleòtids i que representa part dels sub-dominis VI-VII-VIII-IX del domini catalític. El marcatge per *random primed* i posterior utilització com a sonda d'aquesta seqüència en llibreries amplificades de cDNA, ens ha permès isolat un producte genèc incomplet (K2) que hem seqüenciat a hores d'ara i representa la meitat C-terminal d'un mRNA. La seqüència nucleotídica ofereix una pauta oberta d'on hem deduït una seqüència de 286 aminoàcids abastant tot el domini catalític i la cua C-terminal del producte. La comparació de les posicions clau ens indica homologia amb tirosina-kinases i no pas amb serina-treonina kinases; les sub-famílies més properes semblen les dels oncogens *src* i *abl/arg* (1, 4); això fa suposar que no es tracti d'un receptor sino d'un enzim citoplasmàtic ancorat a la membrana, però cal conèixer la seqüència N-terminal per saber-ho.

L'estudi en curs de l'expressió del gen corresponent ens ha permès veure, en *Northern blots*, que codifica un producte genèc de poc més de dues kilobases que s'expressa en animals intactes i al llarg de tota la regeneració. Està també en curs la localització de l'expressió en l'espai mitjançant hibridació *in situ*. La comparació exhaustiva d'aquest producte amb els detectats en diferents models ens permetrà establir una anàlisi evolutiva de les tirosina-kinases respecte dels triblàstics més primitius.

Referències:

- (1) HANKS, S K i cols; *Science*, **241**; 42-52 (1988).
- (2) BOSCH, T C G i cols; *Mol Cell Biol*, **9** (10); 4141-4151 (1989).
- (3) HUNTER, T; *Curr Op Cell Biol*, **1**; 1168-1181 (1989).
- (4) HANKS, S K; *Curr Op Str Biology*, **1**; 369-383 (1991).
- (5) ULLRICH, A & SCHLESSINGER, J; *Cell*, **61**; 203-212 (1990).
- (6) VEILLETTE, A & DAVIDSON, D; *Trends in Genetics*, **8** (2); 61-66 (1992).

AMPLIFICACIÓ DE SEQÜÈNCIES "POU-BOX" A PLANÀRIA.

A.M. MUÑOZ-MÁRMOL, J.GARCIA-FERNÁNDEZ, J. BAGUÑA & E. SALÓ.

Dept. de Genètica, Fac. de Biologia, Diagonal, 645. 08028, Barcelona.

La formació del patró durant el desenvolupament ve determinada per l'activació seqüencial d'una xarxa de gens reguladors. Aquests gens dirigeixen la transformació d'informació genètica en estructures morfològiques mitjançant el control de l'expressió espacial i temporal de gens efectors, els quals, per la seva banda, determinen especificitats de tipus cel·lular.

Les proteïnes de molts d'aquests gens reguladors comparteixen dominis estructurals comuns, molt conservats al llarg de tota l'escala filogenètica, que els hi confereixen la capacitat d'unió al DNA. Un d'aquests dominis és el domini homeòtic (1), el qual adopta una conformació d'hèlix-volta-hèlix amb capacitat d'unió específica al DNA.

El domini homeòtic es troba amb freqüència associat amb altres dominis conservats, com el "LIM repeat", o els dominis Paired i POU. Els dominis POU-específic i POU-homeòtic tenen 81 i 60 aminoàcids respectivament, i estan separats per 14 a 26 aminoàcids variables, rebent tot el conjunt el nom de domini POU (2). Tant el subdomini POU-específic com el POU-homeòtic semblen ser necessaris per la unió a seqüències específiques de DNA amb alta afinitat. Molts gens amb POU-box han estat correlacionats amb diversos fenòmens de proliferació cel·lular i la majoria s'expressen durant el desenvolupament al sistema nerviós, encara que alguns també són expressats en teixits específics no neuronals i/o en organismes adults.

Planària és un organisme que es caracteritza per tenir una extrema plasticitat morfològica, essent capaç de créixer i decreixer segons la freqüència d'ingestió d'aliments i de regenerar organismes complets a partir de petits fragments de l'inicial. Aquesta gran plasticitat ve donada per la presència d'una població de cèl·lules indiferenciades i totipotents anomenades neoblasts, presents àdhuc en organismes adults, que mantenen una proliferació, determinació i diferenciació cel·lular continua, la qual s'incrementa durant la regeneració traumàtica (3).

La identificació de gens amb "homeobox" a planària (4-5) ha permès l'aproximació molecular a l'estudi de la plasticitat morfològica d'aquest organisme.

Mitjançant la tècnica de PCR utilitzant com a "primers" barreges d'oligonucleòtids degenerats basats en les regions més conservades dels dominis POU-específic i POU-homeòtic (6-7), hem detectat al genoma de planària dos nous gens que codifiquen per dominis POU, Dtp-2 i Dtp-3 (*Dugesia* (G) *tigrina* POU-box). L'anàlisi de la seva seqüència parcial mostra la conservació en posició de la majoria dels aminoàcids "consensus" d'ambdós subdominis i permet agrupar els gens Dtp-2 i Dtp-3 dins les classes POU III i POU IV respectivament.

L'estudi de l'expressió d'aquests gens en organismes intactes i regenerants, mitjançant "Northern-blots", hibridacions "in situ" i immunohistoquímica, ens permetrà confirmar el seu possible paper regulador durant la formació del patró de l'organisme i establir, donada la baixa posició filogenètica de les planàries, l'evolució d'aquest domini.

Referències:

- (1) Affolter, M.; Schier, A. & Gehring, W.J. *Current Opinion in Cell Biology* 2, 485-495 (1990).
- (2) Rosenfeld, M.G. *Genes & Development* 5, 897-907 (1991).
- (3) Baguña, J. & Romero, R. *Hydrobiology* 84, 181-194 (1981).
- (4) Garcia-Fernández, J.; Baguña, J. & Saló, E. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 8, 7338-7342 (1991).
- (5) Miralles, A.; Muñoz, A.M.; Garcia-Fernández, J.; Baguña, J. & Saló, E. *S.C.B.* 9, 215-224 (1991).
- (6) Billin, A.N.; Cockerill, K.A.; Poole, S.J. *Mechanisms of Development* 34, 75-84 (1991).
- (7) Bürglin, T.R.; Finney, M.; Coulson, A. & Ruvkun, G. *Nature* 341, 239-243 (1989).

Caracterització molecular d'un possible receptor proteic per la toxina botulínica present a l'òrgan elèctric del peix Torpedo marmorata.

J.M. Canals, L. Ruiz-Avila, M. Arribas, J. Herreros, J. Blasi i J. Marsal

Laboratori de Neurobiologia Cel·lular i Molecular, Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

La neurotoxina botulínica de tipus A, sintetitzada pel bacteri anaeròbic Clostridium botulinum, és la toxina més potent que es coneix. La seva acció és la inhibició de l'alliberament d'acetilcolina a les sinapsis neuromusculars, bloquejant així, de forma dramàtica, la funció muscular esquelètica i provocant paràlisi flàccida i mort. Per tal d'estudiar els fenòmens de transmissió sinàptica als sistemes colinèrgics nosaltres hem triat com a model experimental l'òrgan elèctric del peix Torpedo marmorata. Aquest òrgan està relacionat ontogenèticament amb el sistema neuromuscular, i està format per cèl·lules planes (electròcits), les quals reben un gran nombre de terminacions nervioses colinèrgiques. En treballs previs realitzats en el nostre laboratori s'ha demostrat que els sinaptosomes aïllats d'aquest òrgan són sensibles a l'acció de la neurotoxina botulínica, resultant inhibit l'alliberament del neurotransmissor al voltant d'un 70 per cent.

S'ha suggerit que l'acció de la toxina segueix una via d'intoxicació que consisteix en la seva unió a la membrana, internalització de la toxina i l'efecte tòxic. Actualment es discuteix sobre la naturalesa molecular del receptor de membrana per a la toxina botulínica de tipus A. El nostre grup ha identificat un possible receptor proteic fent servir tècniques d'"overlay" amb neurotoxina botulínica-¹²⁵I (1, 2). Els anticossos obtinguts contra aquesta proteïna immunoprecipiten un producte de traducció "in vitro" d'mRNA de òrgan elèctric. Aquests anticossos són capaços de precipitar ¹²⁵I-BoNTx després d'un breu pols de "cross-linker" en presència d'una barreja de productes de traducció "in vitro" d'RNA missatger d'òrgan elèctric. El mateix resultat s'obté si s'utilitzen anticossos obtinguts contra una extracció de proteïnes de membrana presinàptica. Experiments paral·lels realitzats amb proteïnes natives de sinaptosomes confirmen els mateixos resultats. Totes aquestes evidències suggereixen que existeix almenys una proteïna que és capaç d'interactuar estretament amb la BoNTx, la qual podria intervenir en el mecanisme d'unió. Fent servir mètodes immunològics hem aïllat dos clons que codifiquen per a la mateixa proteïna. Els experiments en curs van dirigits a determinar la seva estructura primària així com a establir la seva possible implicació en el mecanisme d'intoxicació de la neurotoxina botulínica de tipus A. Aquest treball està finançat per un ajut de la DGICYT a J.M. i per una CIRIT de J.M.C.

REFERENCIES

- (1) Solsona C., Egea G., Blasi J., Casanova C. and Marsal J. The action of Botulinum Toxin on cholinergic nerve terminals isolated from the electric organ of Torpedo marmorata. Detection of a putative toxin receptor. *J. Physiol* 84, 174-179 (1990).
- (2) Blasi J., Egea G., Castiella M.J., Arribas M., Solsona C., Richardson P. and Marsal J. Binding of Botulinum Neurotoxin Type A to Torpedo electric organ subfractions. Evidence for putative receptor(s) and internalization process. Submitted

AMPLIFICACIO, SEQUENCIACIO, EVOLUCIO I FUNCIO DE REGIONS PROMOTORES DELS GENS DE PROTAMINA P1 DE MAMIFERS.

Rosa Queralt i Rafael Oliva

Grup de Genètica Molecular, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

Resum.

Fent servir oligonucleòtids complementaris de regions conservades de la regió 5' del gen de la protamina humana, de brau i de ratolí, hem aconseguit amplificar el promotor corresponent de 6 espècies addicionals de mamífers (*Cercopithecus ascanius*, *Gorilla gorilla*, *Papio doguera*, *Pongo pygmaeis*, *Cavia porcellus* i *Rattus norvegicus*). La seqüència nucleotídica del promotor d'aquestes espècies demostra una marcada divergència entre la seqüència del conill porquí i la seqüència de la rata i del ratolí la qual cosa podria contribuir a clarificar la polèmica sobre si el conill porquí és o no és un rosegador (Graur et al., 1991). Entre les regions conservades destaquen la regió de la TATA-box i la regió corresponent a l'element Tet-1 proposat recentment com a responsable de l'expressió específica testicular d'aquests gens.

Introducció.

Els gens de protamina proveeixen un dels exemples més clars de gens específicament expressats a la línia germinal (Oliva and Dixon 1991). Malgrat això no es coneix en detall els mecanismes que determinen la seva especificitat de teixit. Per tal d'esbrinar quines són les regions promotores responsables d'aquesta especificitat d'expressió hem adoptat l'estratègia de seqüenciar i comparar les regions homòlogues corresponents a diverses espècies (Queralt and Oliva 1991; Adroer et al. 1992).

D'aquesta manera és possible detectar regions conservades en l'evolució i per tant candidates a desenvolupar una funció important potencialment reguladora.

En aquest treball demostrem que oligonucleòtids dissenyats a partir de regions conservades predites a partir d'un nombre molt petit d'espècies ha permès l'amplificació i seqüenciació de la regió homòloga corresponent a moltes altres espècies. Aquests resultats aporten un nou consens de la regió promotora del gens de protamina P1 de mamífers.

Materials i mètodes.

S'han amplificat els ADN amb les condicions de PCR següents 200 ng d'ADN genòmic, 50 mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂ i 200µM de cada dNTP. 5 pmols de cada "primer" OP19 o OP11 i OP14 o OP112 (Queralt i Oliva, manuscrit en preparació) i una unitat de Taq I DNA polymerasa (Perkin- Elmer), una desnaturalització inicial a 94 °C durant 10 minuts, dos minuts a 94 °C, "Touchdown" de 60 °C a 45 °C durant dos minuts, tres minuts a 72 °C i 10 cicles a 45 °C. Els productes de PCR es varen

clonar en el vector Bluescript KS+ (Statagene) tallat amb Eco RV, utilitzant el mètode del "double Geneclean" (Bio 101) i *E. coli* JM 109. Es varen aïllar ssDNA i seqüenciar pel mètode de la Sequenase (USB).

Resultats.

L'amplificació de la regió promotora dels gens de protamina P1 de *Cercopithecus ascanius*, *Gorilla gorilla*, *Papio doguera*, *Pongo pygmaeis*, *Cavia porcellus* i *Rattus norvergicus* ha donat lloc a un producte únic d'amplificació del tamany esperat predit a partir de la seqüència dels gens de protamina P1 existents (Fig 1). La seqüenciació de diversos clons ha revelat la seqüència nucleotídica de la regió promotora corresponent a les diverses espècies (Fig 2).

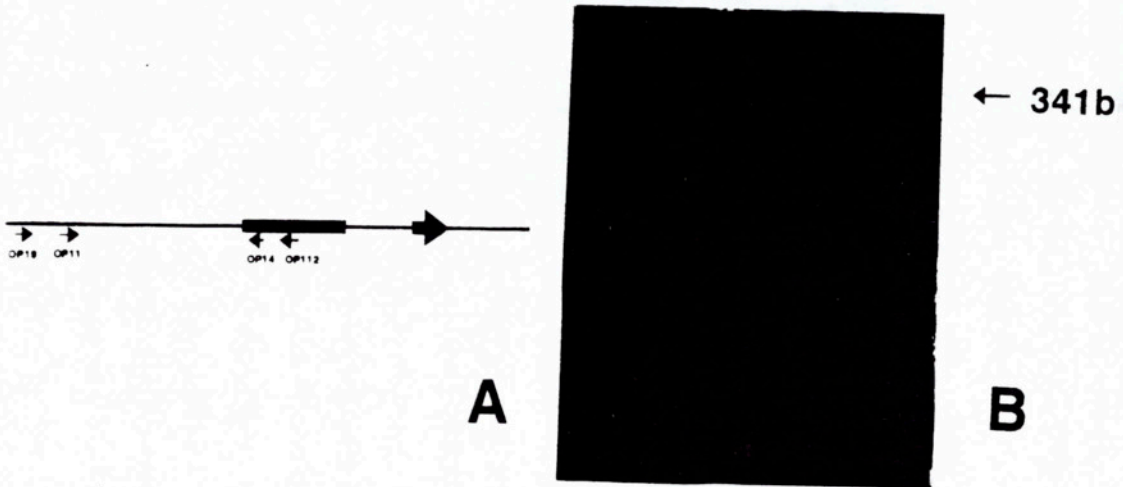


Figura 1: A: estructura del gen de protamina P1 amb un intró i el lloc d'hibridació dels oligonucleòtids. B: Producte amplificat de 341 bp 1: orangutà, 2: papió, 3-8: humans, 9: control negatiu.

PRHP1	CTTTGCCCTCACAATGACCAACGG CC--CCCTGGCATCTATAACAGGCCGCAGA
PRCER	CTTTGCCCTCACAATGACCAACGGCC--TCCTGGCATCTATAAGAACCCTGCAGA
PRGOR	CTTTGCCCTCACAATGACCAACGGCC--CCCTGGCATCTATAAGAGGCCGCAGA
PRORANGUTA	CTTAGCCCTCACAATGACCAACGGCC--CCCTGGCGTCTATAAGAGGCCGCAGA
PRPAPIO	CTTTGCCCTCACAATGACCAACAGCC--TCCTGGCATCTATAAGAGGCTGCACA
PRBP1	CTGTGACCTCACAATGACCAGGACCCTGCCCGGGTCTATATAAGAGGCCGGGAA
PRMP1	CTTGACTTCATAATTCCTAGGGG CCA---CTAGTATCTATAAGAGGAAGAGGG
PRRATA	CTTTGACTTCATAATTCAGGGG CCA---CTAGTATCTATAAGAGGAAGAGGG
PRCOBAYO	---TCACCTCACAATGTC-----CTGGGTTCTATAAGAGGCCAAGAG

<p>Tet-1</p>	<p>TATA</p>
---------------------	--------------------

Figura 2: Comparació de les seqüències amb el CRE i la TATA box. PRHP1: Humà, PRCER: *Cercopithecus*, PRGOR: Goril.la, PRORANGUTA: Orangutà, PRPAPIO: Papió, PRBP1: Brau, PRMP1: Ratolí, PRRATA: Rata, PRCOBAYO: Conill porquí.

Discussió.

En aquest treball hem seqüenciat la regió promotora del gen de protamina P1 de diversos mamífers per tal de trobar regions conservades en l'evolució i per tant potencialment reguladores o determinants de l'expressió específica d'aquests gens. L'estratègia que hem seguit ha consistit en la comparació del limitat nombre de seqüències promotores de gens P1 conegudes per tal de dissenyar oligonucleòtids corresponents a les regions conservades i l'amplificació de l'ADN d'espècies addicionals fent servir aquests oligonucleòtids. Tal com es pot apreciar en la figura 1 l'amplificació ha sigut molt eficient generant-se únicament una banda del tamany esperat. L'enfoc que hem seguit no és pas trivial ja que la marcada variabilitat dels gens de protamina feia dubtar en un principi si l'estratègia seguida funcionaria o no. Així doncs disposem ara d'una nova estratègia per l'estudi dels gens de protamina en la filogènia. A més els resultats obtinguts són rellevants en l'estudi de la regulació de l'expressió d'aquests gens ja que demostren l'existència de regions conservades i per tant potencialment reguladores de l'expressió genètica (Fig. 2). Estudis previs comparant la seqüència d'un nombre limitat de gens de protamina P1 de vertebrats ja va demostrar l'existència d'algunes regions conservades a nivell del promotor (Oliva and Dixon, 1990). Una d'aquestes regions corresponia a la TATA-box mentre que l'altra demostrava similitat a l'element CRE (cAMP Response Element) però a més, immediatament després d'aquest element, es detectava el dinucleòtid CA en la majoria d'espècies. El fet que aquest dinucleòtid es trobés absent en la majoria d'elements CRE de gens constitutius va ésser un dels primers indicis de que si bé l'element CRE no era exclusiu i determinant d'expressió de gens en l'espermatogènesi, la variant que contenia l'extensió CA sí que ho podia ser. Per altra banda, ratolins transgènics obtinguts amb construccions formades pel promotor del gen de protamina de ratolí acoplats a un gen marcador demostren que les seqüències promotores contingudes en una regió d'aproximadament 500 nucleòtids 5' desde l'inici de transcripció són suficients per determinar l'especificitat d'expressió. Aquesta variant de l'element CRE estaria precisament inclosa dintre d'aquesta regió.

L'inclusió de 6 espècies addicionals de mamífers en la comparació dels promotors ha permès la determinació de les regions conservades d'una forma molt més precisa. Aquí demostrem que la regió conservada descrita prèviament amb homologia al CRE va seguida per una seqüència altament conservada (C/T A A T). La seqüència nucleotídica CA descrita prèviament correspondria a les primeres dos bases d'aquest nou consensus. Per altra banda demostrem que cap dels mamífers seqüenciats conté estrictament en el promotor de protamina P1 la seqüència canònica CRE (T G A C G T C A) i que en el seu lloc es trobaria el consensus T G C/A C T/C T C A. Tot en conjunt suggereix d'una forma molt més precisa que aquesta seqüència variant que conté el motiu addicional conservat (T G C/A C T/C T C A C/T A A T; un 12mer) podria correspondre a un element específic que conferís expressió en testicle. Aquesta hipòtesi ve fortament recolzada per la recent descripció d'un factor específic de testicle (Tet-1) que s'uneix *in vitro* a la regió corresponent al gen de protamina P1 de ratolí (Tamura et al., 1992). La concordància entre la regió

protegida amb DNAsaI pel factor Tet-1 en el ratolí la seqüència conservada determinada mitjançant la comparació de la seqüència nucleotídica en les diverses espècies de mamífers es gairebé perfecta (Fig 2: Comparar la regió subrayada en doble línia en la regió delimitada per les dues sajetes. Es interessant notar que el nostre estudi comparatiu demostra la presència d'una T en el 3' d'aquest element altament conservada i present sense excepció en tots els mamífers estudiats. Aquesta T final no és evident a partir dels estudis de protecció amb DNAsaI possiblement perquè es tracta d'una regió que en absència de qualsevol factor és refractària a la digestió amb DNAsa I. Així doncs serà interessant determinar per altres tipus d'enzims o agents (per exemple dimetil-sulfat) el grau d'accessibilitat d'aquesta base en presència del factor Tet-1. Per altra banda, cal recordar que aquests estudis de protecció amb DNAsaI estan realitzats *in vitro* en absència de l'estructura nucleosòmica la qual cosa pot canviar d'una forma molt notable el grau d'unió d'aquests factors. Un avantatge dels estudis comparatius a nivell de seqüència d'ADN és que el seu resultat no ve limitat per les sondes moleculars existents al ésser determinada exclusivament per les característiques biològiques *in vivo*. La potencialitat de determinació d'expressió testicular d'aquest element que hem detectat és recolzada pel fet que el gen de la proteïna de transició TP1 de ratolí específicament expressada en testicle concorda també a la perfecció amb l'element Tet-1. Cal notar que la seqüència del conill porquí demostra una delecció de 10-12 nucleòtids després de la seqüència Tet-1. 10 nucleòtids correspon a una volta completa de l'hèlix en l'ADN i en el suposat que aquesta regió es trobés ensamblada formant un nucleosoma *in vivo*, el fet que la variació sigui d'una volta completa de l'hèlix de l'ADN, podria indicar la necessitat de situar aquesta seqüència accessible des de l'exterior del nucleosoma per tal de ser biològicament activa. Per altra banda, l'absència d'aquests 10-12 nucleòtids en el conill porquí correspon a una regió molt poc conservada en la resta de mamífers seqüenciats. Tot en conjunt suggereix una funció irrelevant per aquesta regió deleccionada en el conill porquí. Ara, serà interessant realitzar un estudi sistemàtic entre totes les seqüències del "Gen Bank" per buscar l'element altament conservat Tet-1, descrit en aquest article.

Agraïments.

Treball subvencionat per l'ajut d'inici a la Recerca de la Universitat de Barcelona, (1991) i, en part, pel projecte CICYT SAL90-0334 a R.O. S'agraeix la col.laboració de Justo Garasa, M^a José Noto i resta de personal del parc zoològic de Barcelona per haver subministrat les mostres de les diferents espècies estudiades.

Referències.

- Adroer, R., Queralt, R., Ballabriga, J. and Oliva, R. (1992) *Nucleic Acids Res.*, 20, 609.
Glaur et al., (1991) *Nature*, 351, 649-652.
Oliva, R. and Dixon, G.H. (1990) *J. Mol. Evol.*, 30, 333-346.
Oliva, R. and Dixon, G.H. (1991) *Progress in Nucleic Acid. Res. and Mol. Biol.*, 40, 25-94.
Queralt, R. and Oliva, R. (1991) *Nucleic Acids Res.*, 19, 5786.
Tamura et al., (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 4327-4332.

SEQUENCIACIÓ DIRECTA DE L'EXO 17 DEL GEN DE LA PROTEINA AMILOIDE IMPLICAT EN LA MALALTIA D'ALZHEIMER FAMILIAR.

Rosa Adroer, Cristina López-Acedo i Rafael Oliva. Grup de Genètica Molecular, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona.

RESUM

La seqüenciació directa de l'exó 17 del gen del precursor de la proteïna amiloide (APP: "Amyloid Protein Precursor"), ha permès identificar 3 tipus diferents de mutacions patogèniques relacionades amb la malaltia d'Alzheimer familiar (FAD: "Familial Alzheimer's Disease"). Aquestes mutacions es troben amb una freqüència molt baixa la qual cosa implica haver d'estudiar nombroses mostres per tal d'identificar noves famílies afectades i això és laboriós i llarg. Per poder identificar aquestes mutacions en altres països i buscar noves mutacions en el gen APP, hem optimitzat el procediment i hem reduït el temps necessari per a la preparació de les mostres d'11 hores a 3 hores i mitja.

INTRODUCCIÓ

El 1907 Alois Alzheimer va descriure el primer cas de la malaltia que porta el seu nom (Alzheimer) com una alteració del sistema nerviós que resultava en una pèrdua de la memòria i de les funcions intel·lectuals. Aquesta malaltia es correlaciona amb l'aparició d'un acúmul de proteïna en el sistema nerviós en forma de plaques extracel·lulars o plaques senils, i amb la presència de cadenes neurofibrilars i amiloide cerebrovascular (Glennner, 1991; Selkoe, 1991; Katzman and Saitoh, 1991; Holtzman and Mobley, 1991). La malaltia apareix típicament a partir dels 60 anys d'edat tot i que també poden aparèixer alguns casos a partir dels 40 anys. Aquests últims serien els casos pre-senils. És en malalts pre-senils i familiars (on la malaltia s'hereda amb un patró autosòmic dominant) que es va detectar la primera mutació (Goate et al., 1991). Aquesta consisteix en una substitució d'una Valina per una Isoleucina a nivell del codó 717, i per aquest motiu s'anomena mutació APP717 Val-Ile. Fins el dia d'avui s'ha detectat la mutació en 5 famílies: 1 a Anglaterra (Goate et al., 1991), 1 als E.E.U.U. (Goate et al., 1991), i 3 al Japó (Naruse et al., 1991; Yoshioka et al., 1991). Posteriorment s'han descobert dues mutacions més localitzades a nivell del codó 717: en un cas la Valina és substituïda per Glicina (Chartier-Harlin et al., 1991), i en l'altre és substituïda per Fenilalanina (Murrell et al., 1991). Nosaltres hem optimitzat el mètode de preparació de les mostres per seqüenciar descrit per Goate et al. (1991) i l'hem reduït d'11 hores a 3 i mitja. Aquest mètode ens permet buscar de forma senzilla la mutació APP717 en malalts pertanyents a l'Estat Espanyol.

MATERIALS I METODES

La reducció de temps en el processat de les mostres abans de la seva seqüenciació ha estat possible realitzant una sola reacció de PCR ("Polymerase Chain Reaction") en comptes de dues (la primera per amplificar l'ADN, i la segona per obtenir ADN de

cadena senzilla), i estandaritzant el mètode de purificació de cadena senzilla basat en l'afinitat amb esferes magnètiques recobertes d'estreptavidina i la subseqüent seqüenciació directa.

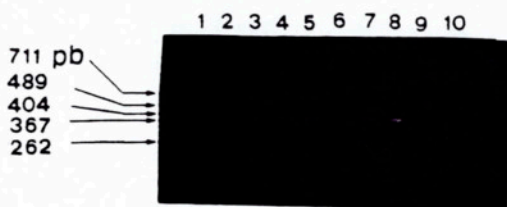


Fig. 1.- Amplificació d'ADN de leucòcits de diferents malalts d'Alzheimer (carrils 1 al 10).

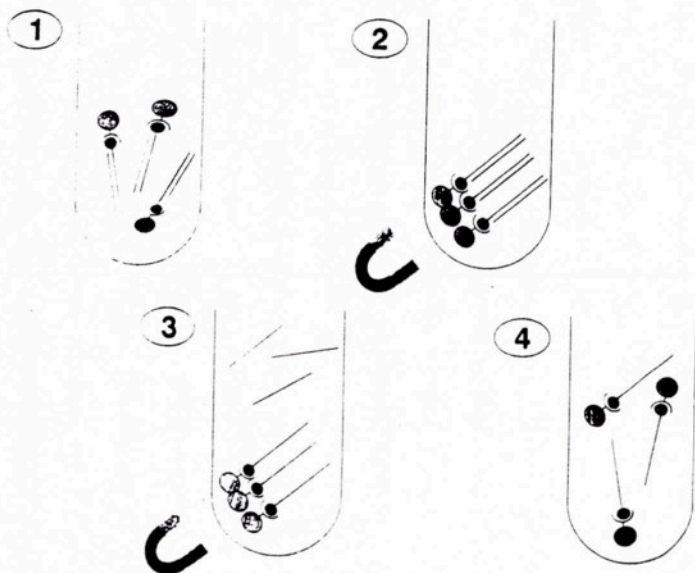


Fig. 2.- (1) Producte de PCR + esferes magnètiques recobertes d'estreptavidina. (2) Captura de l'ADN amb MPC. (3) Desnaturalització de l'ADN. (4) Elució de la cadena no biotinilada.

Les reaccions d'amplificació es realitzen amb 20 ng d'ADN, 10 pmols de cada encebador (1: biotina-GCCTAATTCTCTCATAGTCTTAATT CCCAC-3' i 2: 5'-GTTGGGCAGAGAATATACTGA-3'), 200 µM de dNTP's, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl i 1 unitat de Taq polimerasa en un volum final de reacció de 25 µl. Les condicions de PCR són: una desnaturalització inicial de 5 min. a 94 °C, seguida de 35 cicles consistents en 1 min. a 60 °C, 1 min. a 72 °C i 1 min. a 94 °C, amb una elongació final de 5 min. a 72 °C (Fig. 1). Per purificar cadena senzilla mitjançant esferes magnètiques recobertes d'estreptavidina es va utilitzar el protocol del fabricant amb algunes modificacions: 20 µl de la reacció de PCR es barregen amb Dynabeads M-280 pre-rentats (10 µl de Dynabeads rentats 3 vegades amb 200 µl de TWS: 0.17% Triton-x-100, 500 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA pH 8.0, i resuspès en 80 µl de TWS) a temperatura ambient en una plataforma rotatòria durant 30 min. Els Dynabeads són separats amb un imán (MPC: "Magnetic Particle Concentrator") i rentats dues vegades amb 20 µl de TWS. Segudament es resuspèn amb 32 µl de TE i s'afegeix 8 µl de NaOH 1M / EDTA 4 mM per desnaturalitzar les dues cadenes del producte de PCR. En aquest punt la cadena d'ADN que conté biotina al seu extrem 5' queda fortament lligada a les esferes magnètiques recobertes d'estreptavidina, mentre que l'altra cadena que no té biotina queda lliure en solució. Eliminem aquesta cadena lliure amb l'ajuda del MPC quedant-nos només amb la cadena unida a les esferes que es renten dues vegades amb 200 µl de TWS i es resuspenen amb 7 µl d'aigua (Fig. 2). La mostra és a punt per ser seqüenciada amb l'encebador 2, seguint el protocol de la Sequenase 2.0 (USB).

RESULTATS

En la figura 3 es pot observar una seqüència obtinguda per aquest mètode. S'obté una seqüència clara del fragment corresponent a l'exó 17 del gen de l'APP on podem buscar si existeix el nucleòtid mutat a nivell del codó 717.

Fig. 3.- Seqüència no mutada de l'exó 17 del gen APP d'un individu afectat d'Alzheimer. ★ Lloc de la mutació APP717 Val-Ile. O Lloc de la mutació de l'Hemorràgia Cerebral tipus Dutch (HCHWA-D: "Human Cerebral Hemorrhage With amyloidosis Dutch type").



Fins ara hem estudiat 54 mostres per aquest procediment i en cap d'elles hem trobat la mutació APP717 Val-Ile, tampoc hem trobat les substitucions Val-Gly ni Val-Phe. Una altra mutació relacionada amb l'exó 17 és la de l'Hemorràgia Cerebral tipus Dutch situada al codó 693, que tampoc hem trobat en cap de les mostres.

Les 54 mostres estudiades corresponen a:

- 19 malalts familiars i pre-senils.
- 18 malalts esporàdics i pre-senils.
- 10 malalts familiars i senils.
- 1 malalt esporàdic i senil.
- 6 controls normals.

Aquests resultats situen el percentatge de malalts d'Alzheimer afectats per les mutacions APP717 a nivell mundial en un 2.8 %.

DISCUSSIO

Aquest mètode és de gran utilitat per a fer un "screening" ràpid de la mutació 717 en un nombre elevat de mostres, i per buscar altres possibles mutacions de l'APP a nivell d'altres exons. És un procediment més ràpid i eficient que altres mètodes alternatius com ara la subclonació del producte de PCR, seqüenciar cadena doble o fer PCR asimètric seguit de purificació de l'ADN.

La digestió del producte de PCR de l'exó 17 amb *Bcl I* produeix dues bandes extres si existeix la mutació APP717 Val-Ile, però no pot detectar altres possibles mutacions. Una altra alternativa a la seqüenciació de l'ADN és la tècnica del SSCA ("Single Stranded Conformation Analysis") (Orita et al., 1989), però aquesta tècnica no és més ràpida que la seqüenciació directa i no pot identificar tots els canvis a nivell de nucleòtids.

La disponibilitat d'aquest mètode permetrà buscar de forma molt més ràpida i eficient les mutacions de l'exó 17 del gen de l'APP en els diferents malalts.

Aquest treball ha estat subvencionat per l'ajuda d'investigació de la "Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología" (CICYT) SAL90-0334, 1990-1993 i pel III Premi Upjohn d'ajuda a la investigació a R.O., i per les beques F.P.I. del "Ministerio de Educación y Ciencia" a R.A. i F.P.I. de la Generalitat de Catalunya a C.L.-A.

BIBLIOGRAFIA

- Adroer, R., Chartier-Harlin, M.-C., Crawford, F. and Oliva, R. (1992) *Neurosci. Lett.* (in press).
- Chartier-Harlin et al., (1991) *Nature*, 353, 844-846.
- Glenner, G.G. (1991) *Encyclopedia of Human Biology*, 1, 209-216.
- Goate et al., (1991) *Nature*, 349: 704-706.
- Holtzman, D.M. and Mobley, W.C., (1991) *TIBS*, 16, 140-144.
- Katzman, R. and Saitoh, T., (1991) *FASEB*, 5, 278-286.
- Murrell et al., (1991) *Science*, 254, 97-99.
- Naruse, S., Igarashi, S. et al. (1991) *Lancet*, 337, 978-979.
- Orita et al., (1989) *Genomics*, 5, 874-879.
- Selkoe, D.J. (1991) *Neuron*, 6, 487-498.
- Yoshioka et al., (1991) *BBRC*, 178, 1141-1146.

Sessió 2

REGULACIÓ GÈNICA

ESTUDIO DE LA EXPRESION DEL PROMOTOR DEL GEN α -1 DE LA TUBULINA
DEL MAIZ

M.A. Torres, M. Capellades, P. Puigdoménech, J. Rigau; Departament de Genètica Molecular, C.I.D., C.S.I.C., C/ Jordi Girona 18-26, Barcelona-08034

Se ha abordado el estudio de la expresión del gen α -1 de la α -tubulina del maíz tanto mediante estudios "in vivo", de expresión transitoria en protoplastos y expresión estable en tabaco, como "in vitro", a través de análisis de la interacción DNA-proteína.

Se han realizado construcciones fusionando diversos fragmentos del citado promotor al gen marcador GUS y al "nos term" con la señal de poliadenilación. En ensayos de transformación estable de tabaco las construcciones que contienen los fragmentos mayores del promotor han mostrado un patron de expresión similar al encontrado en maíz. Se han llevado a cabo también experimentos de expresión transitoria en protoplastos de tabaco electroporados con el propósito de acotar aquellas secuencias del promotor que pudieran ser importantes en la regulación de la expresión del gen.

Respecto a los estudios de interacción DNA-proteína se han obtenido fragmentos de DNA no superiores a 300-400 pares de bases con los que realizar estudios de retardo en geles de acrilamida en presencia de extractos nucleares. Se ha constatado la presencia de bandas retardadas en un fragmento -564/-342 respecto del ATG.

REGULATION OF THE MAIZE ABA-RESPONSIVE GENE RAB 28 IN THE PLANT
DEVELOPMENT AND WATER STRESS

Marie Françoise Niogret, Maria Pla and Montserrat Pagès.
Departamento de Genética Molecular, CID-CSIC, Jorge Girona 18-26, 08034
Barcelona.

The plant hormone abscisic acid (ABA) mediates a number of important developmental and physiological processes in plants, such as embryo maturation and response of vegetative tissues to osmotic stress. A number of genes (*rab*) which are normally expressed during late embryogenesis are also precociously induced in young embryo on ABA treatment or in vegetative tissues submitted to desiccation. Among these ABA responsive genes, the maize *rab 28* gene has been isolated and characterized. It encodes a protein of predicted mol. wt 27.7. Transcription levels of the *rab 28* gene have been followed by Northern analysis during embryogenesis, seed germination, and in the wild type seedlings submitted to ABA treatment or water stress. The *rab 28* gene expression has also been studied in two viviparous mutants of maize: the ABA-deficient *vp2* and the ABA-insensitive *vp1* mutant.

The proximal promoter region of the maize *rab 28* gene contains the conserved ABA responsive element (ABRE), CACGTGG, reported in other plant genes as responsible for ABA induction. Transient expression assays in rice protoplasts indicate that a 134 base pair fragment of the maize promoter (-194 to -60, containing the ABRE) fused to a truncated cauliflower mosaic virus promoter (35S) is sufficient to confer ABA-responsiveness upon the *GUS* reporter gene. Gel retardation experiments show specific interactions of nuclear proteins from tissues in which the *rab 28* gene is expressed, with this 134 DNA fragment. Nuclear extracts from embryo and water stressed leaves generate specific and highly stable complexes of different electrophoretic mobility. However, analysis of these protein-DNA complexes by methylation interference footprinting show the same guanine-specific contact to the ABRE sequence. These results suggest that distinct regulatory factors with apparent similar affinity for the ABRE sequence may be involved in the hormone action during embryo maturation and vegetative tissues submitted to water stress.

RESUM

L'ester de forbol TPA, l'ionòfor A23187, i el 2,4-dinitrofenol incrementen la resistència al MTX en línies cel·lulars de CHO. Donat que aquests tres efectors tenen en comú un mecanisme d'actuació *via* calci, suggerim que aquest catió està implicat, molt probablement a través de canvis en l'activitat de la PKC, en el desenvolupament de la resistència al MTX per ampliació de la *dhfr*.

INTRODUCCIO

La resistència a la quimioteràpia cancerosa és un problema seriós per a l'efectivitat clínica d'aquest tractament. La resistència pot ésser provocada per una reducció en l'acumulació de la droga administrada com a conseqüència d'un efluxe actiu incrementat (1); per l'aparició de clons mutants que transporten menys eficientment la droga cap a l'interior cel·lular (2) o que contenen una forma alterada, més resistent, de la molècula objecte d'inhibició (3); i finalment, per ampliació gènica en què el número de còpies per un gen determinat pot estar incrementat de gran manera (fins 1000 còpies)(4). Aquest és el cas en la gran majoria de les cèl·lules que esdevenen resistents per tractament amb metotrexat (MTX), un inhibidor de l'enzim dihidrofolat reductasa (5). El mecanisme de l'ampliació gènica i la transducció dels senyals que condueixen a la mateixa estan actualment sota investigació. Recentment, hem començat a estudiar les vies bioquímiques que poden desenvolupar aquest tipus de resistència. Com a punt de partida vam prendre els resultats originals del grup de Varshavsky (6,7) que observaren que els esters de forbol i hormones mitogèniques (insulina, vasopresina i EGF) són capaços d'incrementar la incidència de resistència davant el MTX en cèl·lules 3T6 mitjançant un mecanisme d'ampliació. Fins l'actualitat, hem demostrat que en cèl·lules d'ovari d'hamster (CHO), s'incrementa la resistència al MTX pels esters de forbol i per agents que mobilitzen el calci com ara l'ionòfor A23187 i inhibidors metabòlics com el 2,4-dinitrofenol (DNP) la qual cosa demostra un paper d'aquest catió en el procés d'ampliació gènica.

MATERIALS I METODES

Les línies cel·lulars utilitzades (UA21 i K1 de CHO, i rat-1) es van créixer regularment en medi de cultiu MEM amb penicil·lina i estreptomicina suplementat amb un 7% de serum fetal. En els experiments destinats a quantificar la resistència al MTX, el medi selectiu era F12 (HAM) amb doble contingut d'aminoàcids i vitamines i sense glicina, hipoxantina i timidina. El contingut de serum d'aquest medi era del 5% després de diàlisi en front de PBS (6 canvis) per un espai de temps de tres dies, per eliminar compostos de baix pes molecular (com ara purines). A més aquest medi era addicionat de concentracions variables de metotrexat, dissolt en el propi medi -GHT. Els efectors (TPA, A23187 i DNP) eren dissolts en DMSO i afegits al medi a la concentració desitjada sense superar el 1% de DMSO. El medi es canviava cada 7 dies, mantenint el MTX i sense els efectors per un total de tres setmanes. En aquest punt es realitzava el comptage de les colònies després de la seva tinció amb Violeta de genciana.

El TPA i l'A23187 es van obtenir de Sigma, el DNP de Merck i el MTX dels Laboratoris Almirall.

RESULTATS

Es coneguda la capacitat d'amplificació de línies cel·lulars sotmeses a selecció gradual amb concentracions creixents de MTX. Per aquesta raó, vam realitzar uns experiments previs amb la fi de determinar les concentracions mínimes de MTX capaces de produir la mort cel·lular de diferents línies de CHO i de conduir a una també mínima producció de colònies resistents. Aquestes concentracions van variar depenent del número de còpies de *dhfr* de les cèl·lules; així per a la línia UA21 (1 còpia) la concentració de MTX que complia els requeriments esmentats va ésser de 2×10^{-8} M i per a la línia K1 (2 còpies) 3×10^{-7} M. A continuació vam intentar reproduir l'efecte del TPA, trobat en cèl·lules 3T6, en línies cel·lulars de CHO. L'interès en utilitzar aquestes línies és la disponibilitat de nombrosos mutants en el locus *dhfr* amb característiques ja conegudes (8,9). Com es pot observar a la Figura 1, el 12-O-tetradecanoil forbol-13-acetat (TPA) a la concentració de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ causà un increment en el número de colònies resistents al MTX. L'efecte més clar es va obtenir amb la línia K1 i per aquesta raó vam continuar l'experimentació amb aquesta. La resistència assolida sembla ser relativament estable car el número de colònies resistents és el mateix tant si la selecció en MTX després de la primera setmana es fa en presència com en absència de TPA. Per comprovar la generalitat d'aquest efecte vam assajar l'acció del TPA en cèl·lules rat-1 en les que també es va observar l'increment en el número de colònies resistents. L'efecte del TPA sobre cèl·lules K1 és dependent de la concentració com hom pot observar a la Fig. 2, que a la vegada és incrementat si les cèl·lules són pretractades amb TPA (0.1 $\mu\text{g/ml}$) abans de realitzar la selecció amb MTX en presència de una segona dosi de TPA.

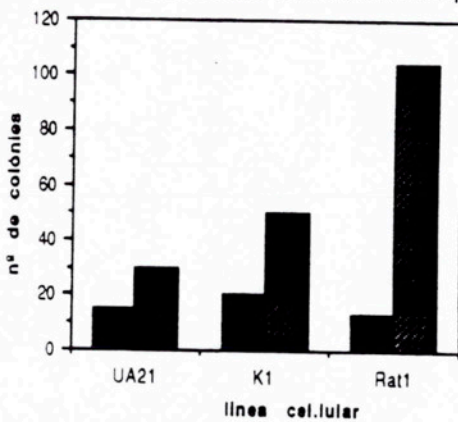


FIG.1: Resistència a MTX en diferents línies cel·lulars en absència (barres sòlides) o en presència de 0.1 μg de TPA/ml. (barres ratllades).

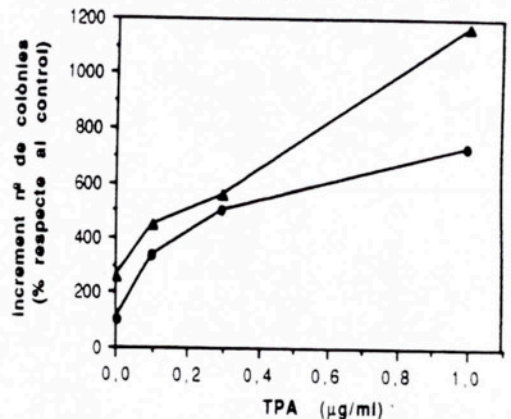


FIG.2: Resistència de cèl·lules K1 davant MTX (3×10^{-7} M) en presència de concentracions creixents de TPA. (●) TPA i MTX afegits alhora. (▲) cèl·lules pretractades amb TPA durant 48 h

A continuació, per assajar una implicació directa del calci sobre la resistència al MTX, vam incubar les cèl·lules amb concentracions creixents de l'ionòfor de calci A23187 i una fixa de MTX. Com hom pot observar a la Figura 3, aquest ionòfor va causar un increment dependent de la concentració en el número de colònies resistents al MTX. L'efecte màxim es produí a 1 nM d'A23187.

Finalment, vam incubar les cèl·lules CHO K1 amb diferents concentracions de DNP, que causa la mobilització del calci com a conseqüència del decrement en la concentració d'ATP cel·lular (10). L'acció d'aquest inhibidor metabòlic va produir també un increment en el número de colònies resistents al MTX d'una manera dependent de la concentració, amb un efecte màxim a 10 μM (Figura 4).

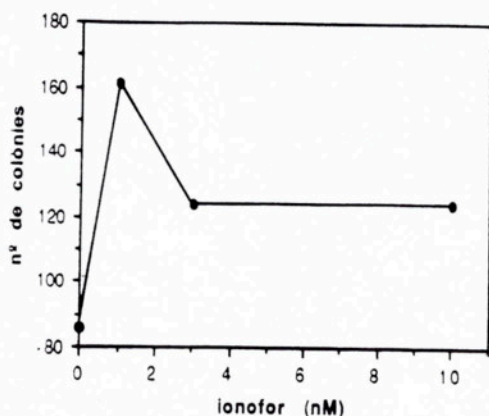


FIG. 3: Resistència de cèl·lules K1 davant MTX ($3 \times 10^{-7} \text{M}$) en presència de concentracions creixents d'ionòfor A23187

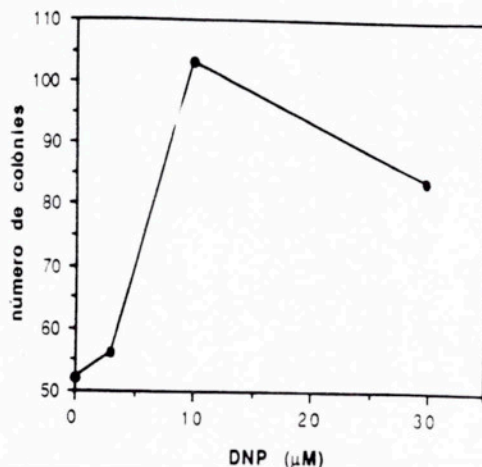


FIG.4: Resistència de cèl·lules K1 davant MTX ($3 \times 10^{-7} \text{M}$) en presència de concentracions creixents de 2,4-Dinitrofenol

Les colònies primàries resistents formades per la presència del DNP van ser clonades i resembrades en medi que contenia la mateixa concentració de MTX emprada en la selecció original ($3 \times 10^{-7} \text{M}$). Aquestes cèl·lules aïllades van ser capaces en el 100% dels casos de tornar a formar colònies cosa que descartava la formació de pseudocolònies en el primer pas de selecció.

DISCUSSIO

L'observació principal que descrivim és la capacitat de l'ester de forbol TPA, l'ionòfor A23187 i el DNP d'incrementar, d'una manera dependent de la concentració, el número de colònies resistents al MTX en cèl·lules CHO. Tot i que l'efecte del TPA s'havia descrit en cèl·lules 3T6, sorprenentment, no s'havia fet cap referència al possible involucrament de la PKC en aquest procés ni s'havia assajat l'efecte d'ionòfors de calci.

Un comú denominador d'aquests tres agents és el d'activar la PKC via calci: El TPA per un increment del DAG que disminueix la K_m de la PKC pel calci; l'ionòfor per un augment de la concentració de calci intracel·lular i el DNP per una mobilització del calci des del reticle endoplàsmic.

Els experiments realitzats fins ara s'han fet amb cèl·lules en presència de TPA durant un mínim d'una setmana. Tanmateix, és conegut que la incubació cel·lular amb TPA per un espai de temps entre 24 i 48h transloca, proteolítza i finalment esgota la PKC. Això planteja la possibilitat que l'increment en la resistència sigui conseqüència de l'activació a curt termini de la PKC o de l'absència d'aquesta activitat quan és esgotada d'ambdues localitzacions cel·lulars: citosol i membranes. Per

tal de discernir entre les dues possibilitats, estem realitzant incubacions de curta durada (de l'ordre d'hores) amb TPA en què hi ha translocació i activació de la PKC però encara no està esgotada del citoplasma, i amb inhibidors de la PKC. Tant si és degut a una activació com a una inactivació de la PKC, sembla clar que el calci seria el senyal que desencadenaria el procés de resistència. El calci també està implicat en la resistència a altres drogues com els alcalòids de la vinca i aquesta resistència és revertida per inhibidors de canals de calci com el verapamil (11). En aquests casos, la resistència és deguda a la glicoproteïna-P, que actua com una bomba expulsora de droga i així aquesta s'acumula menys. En el cas del MTX, però, la resistència és principalment deguda a l'amplificació del gen *dhfr* tal com succeeix amb el TPA en cèl.lules 3T6. Estem en el procés de mesurar el número de còpies en les nostres línies resistents. Tanmateix, hi ha probes que indiquen que la resistència que observem és deguda a amplificació: 1) Que les colònies de cèl.lules resistents creixen i s'acaben de formar a les tres setmanes de selecció en presència de MTX encara que els efectors estiguin presents amb les cèl.lules només durant la primera setmana; 2) Que el TPA té un efecte acumulatiu sobre la resistència si les cèl.lules són pretractades amb l'ester de forbol; 3) Que totes les colònies primàries obtingudes mantenen la seva resistència al MTX després de clonació. Tot això suggereix uns canvis genòmics estables molt probablement degut a un increment en el número de còpies en comptes d'un increment transitori de l'extrusió de la droga emprada. En sumari, proposem que, almenys en part, la resistència al MTX en cèl.lules CHO causada pel TPA, ionòfor A23187 i DNP està mediatitzada per canvis en l'activitat PKC mitjançant un mecanisme dependent de calci.

REFERENCIES

- 1.- Rogan, A.M., Hamilton, T.C., Young, R.C., Klecker, R.W. & Ozols, R.F. (1984) *Science* 224,994-996
- 2.- Flintoff, W.F., Davidson, S.V., & Siminovitch, L. (1976) *Somatic Cell Genet.* 2, 245-262
- 3.- Albrecht, A.M., Biedler, J.L. & Hitchinson, D.J. (1972) *Cancer Res.* 32, 1539-1546
- 4.- Looney, J.E. & Hamlin, J. L. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7, 569-577
- 5.- Alt, F.W., Kellens, R.E.; Bertino, J.R. & Schimke, R.T. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 1357-1370
- 6.- Varshavsky, A. (1981) *Cell* 25, 561-572
- 7.- Barsoum, J. & Varshavsky, A. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 5330-5334
- 8.- Ciudad, C.J., Urlaub, G. & Chasin, L.A. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 16274-16282
- 9.- Ciudad, C.J., Morris, A.E., Jeng, C. & Chasin, L.A. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 3650-3656
- 10.- Blackmore, P.F., Hugues, B.P., Shuman, E.A. & Exton, J.H. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 190-197
- 11.- Tsuruo, T., Iida, H., Nojiri, M., Tsukagoshi, S. & Sakurai, Y. (1983) *Cancer Res.* 43, 2905-2910

AGRAIMENTS

V. Noé gaudeix d'un ajut a projectes d'iniciació a la recerca per part de la C.I.R.I.T. i és becaria del Plan de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.

ESTUDI DELS ELEMENTS RESPONSABLES DE LA REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL EN EL PROMOTOR DEL GEN DE LA β -FoF1 ATP SINTETASA MITOCONDRIAL.

I. Martín, M. Giralt, R. Iglesias, O. Viñas, T. Mampel i F. Villarroya.
Dept. Bioquímica i Fisiologia. Unitat Bioquímica i Biologia Molecular B. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.

L'obtenció d'ATP per via aeròbica en els mamífers es produeix gràcies a un conjunt de complexos proteics presents a la membrana mitocondrial interna i que constitueixen el sistema cadena respiratòria/fosforilació oxidativa (OXFOS). Cadascun d'aquests complexos proteics conté subunitats codificades per gens nuclears i al menys una, codificada pel genoma mitocondrial. La regulació de l'expressió dels gens nuclears que codifiquen per proteïnes del sistema OXFOS es produeix en bona part per mecanismes transcripcionals i en funció de la diferenciació cel·lular, de la seva coordinació amb l'expressió del genoma mitocondrial, dels requeriments energètics de la cèl·lula i sota l'acció hormonal, principalment de les hormones tiroïdals. Els mecanismes precisos de regulació transcripcional de l'expressió d'aquests gens i els factors de transcripció implicats es desconeixen. Per avançar en aquest coneixement hem triat com a model el gen de la subunitat β del complex FoF1 ATP sintetasa mitocondrial humana. Un primer pas fou obtenir la regió promotora del gen (-684/+91) mitjançant la tècnica PCR a partir de la seqüència publicada per S.Ohta i col·laboradors (J. Biol. Chem. 263:11257,1988). El fragment obtingut fou clonat en pUC18 i en pBLCAT. La seqüència de nucleòtids d'aquest fragment té menys d'un 5% de divergència respecte a la publicada prèviament i indica l'absència de caixa TATA, la presència de quatre caixes CCAAT en la regió proximal i una única caixa GC. Hem realitzat assaigs de transfecció transitoria de la construcció -684/+91-pBLCAT en cèl·lules HeLa els quals han indicat que aquesta regió dirigeix efectivament l'expressió del gen "reporter" CAT. Així mateix hem obtingut mitjançant PCR el mutant per delecció -271/+91-pBLCAT, la qual cosa suposa l'eliminació de la caixa GC, i hem observat que no dona lloc a una disminució significativa en l'expressió de CAT, la qual cosa sembla indicar que el lloc putatiu d'unió al factor Sp1 no seria essencial per a l'expressió basal del gen. Paral·lelament hem realitzat un estudi sistemàtic de la interacció física entre proteïnes nuclears i la regió proximal esmentada, mitjançant anàlisis de protecció a la DNasa I ("footprint") i de retard en gel. Aquests estudis han indicat la presència de diferents factors que interactuen amb regions del promotor, entre elles les corresponents a les caixes CCAAT. Així mateix s'ha detectat la presència d'un factor en els extractes nuclears que s'uneix amb alta afinitat a una regió del promotor amb seqüència homòloga al lloc d'unió de factors de transcripció codificats per la família c-ets de protooncogens. També hem detectat la unió específica del receptor nuclear d'hormones tiroïdals a seqüències del promotor. Estudis en curs utilitzant mutans del promotor lligats a CAT i dissenyats en funció de respectar o eliminar les regions esmentades ens donaran la informació sobre la importància funcional dels diferents elements del promotor per a dirigir l'expressió del gen β -FoF1 ATP sintetasa.

REGULACIO MULTIHORMONAL DE LA TRANSCRIPCIO DEL GEN DE
L'HMG-CoA SINTASA MITOCONDRIAL EN EXPERIMENTS DE
TRANSFECCIO TRANSITORIA EN CEL.LULES DE HEPATOMA

Gabriel Gil-Gómez, José Ayté, José A. Ortiz, Diego Haro
i Fausto G. Hegardt.

Unitat de Bioquímica. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona
Diagonal 643 08028 Barcelona.

L'enzim 3-hydroxi-3-metilglutaril Coenzim A (HMG-CoA) sintasa mitocondrial es una de les etapes limitants de la ruta biosintètica de cossos cetònics. El gen és expressat al fetge y els nivells del seu mRNA són modulats per cAMP, insulina, glucocorticoids i àcids grassos. A més, un mecanisme postraduccionnal de succinilació/desuccinilació sembla també contribuir a manternir els nivells d'enzim actiu.

Un fragment de 1.149 bp de la regió 5' flanquejant del gen és capaç de promoure la transcripció *in vitro* i guiar l'expressió d'un gen quimèric amb CAT quan és transfectat a cel.lules HepG2, derivades d'un hepatoma humà, però no en línies cel.lulars d'orige no hepàtic tal com les NIH-3T3, el que demostra la presència de d'elements *cis* involucrats en l'especificitat de teixit. El mateix fragment de zona 5' confereix regulació per cAMP, insulina, dexametasona, àcid oleic, T3 i TPA al gen marcador en experiments de transfecció transitòria, correlacionant amb els resultats obtinguts *in vivo*. Mitjançant la transfecció de diferents derivats delectacionats de la construcció de 1.149 bp de zona 5', estem acotant l'exacta localització dels esmentats elements a la zona 5' reguladora del gen.

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *achaete*
DE *D. melanogaster*
Carmen Martínez y Juan Modolell Centro de
Biología Molecular CSIC-UAM Madrid.

El desarrollo de los sistemas nerviosos central y periférico de *D. melanogaster* depende de la actividad de los genes del Complejo *achaete-scute* (C-AS). En los discos imaginales *achaete* (*ac*) y *scute* (*sc*) se expresan en grupos de células entre las cuales una se determinará como órgano sensorial. Para analizar como se regula la expresión de estos genes, hemos analizado en líneas transformantes la expresión de *lacZ* dirigida por diferentes fragmentos de los promotores *ac* o *sc*. En el caso del gen *ac*, la mayoría de las secuencias necesarias para una expresión silvestre están contenidas en 0.8 kb. situadas 5' a la unidad de transcripción. Esta región contiene secuencias necesarias para la activación de *ac* por *sc* y para la autoestimulación de *ac*. Puesto que los genes *ac* y *sc* codifican proteínas que contienen el dominio hélice-lazo-hélice (HLH), propio de una clase de reguladores de la transcripción, esta regulación puede ser mediada directamente por sus productos. En la región de 0.8 kb del promotor *ac* estudiada hay varios sitios que cumplen con el consenso para la unión de proteínas HLH. Para analizar el papel de estas secuencias en la regulación del gen *ac* hemos obtenido líneas transformantes en las que la expresión del gen *lacZ* está dirigida por el fragmento de 0.8 kb del promotor *ac* en el que uno o varios de los sitios de unión de proteínas HLH han sido eliminados. Los resultados obtenidos indican que estas secuencias son fundamentales para la correcta expresión del gen *ac* y que su regulación estaría mediada directamente por los productos Ac y Sc.

REPRESSIO DEL GEN DE LA HISTONA H5 PER UN FACTOR D'ERITROCITS QUE S'UNEIX A LA REGIO D'INICI DE LA TRANSCRIPCIÓ

A Gómez-Cuadrado, S Rousseau, J Renaud i A Ruiz-Carrillo - Departament de Bioquímica, Centre de Recherche de la Universitat de Laval, Québec; Departament de Biologia Molecular i Cel·lular, CID-CSIC, Barcelona.

La H5 és una histona de tipus *linker* específica de la línia eritroide de pollastre, l'expressió de la qual és regulada durant el procés de maduració dels eritròcits. El gen de la H5 es transcriu ja, encara que a nivells baixos, a l'estadi CFU(E), quan la transcripció dels gens de la globina és encara inactiva. El nivell de transcripció augmenta dràsticament durant la transició CFU(E) a eritroblast, parcialment degut a l'activació dels tres *enhancers* del gen. Durant aquest període, la H5 s'acumula a la cromatina, participant probablement en la inactivació de les cèl·lules madures.

Els estudis de mutàgenesi per deleció realitzats per tal de caracteritzar els elements funcionals *upstream* de la *TATA box* han indicat que els principals factors activadors del promotor són l'Spl i l'H4TFII. Una anàlisi dels *footprints* del promotor del gen amb proteïnes nuclears d'eritròcits madurs, transcripcionalment inactius, ha revelat la presència d'una activitat nova que interacciona amb seqüències del lloc d'inici de la transcripció. Aquesta activitat ha estat purificada a homogeneïtat, esdevinguent una glicoproteïna de 75 kDa, que s'ha anomenat cIBR (per *chicken initiation binding repressor*).

Mitjançant assajos de transcripció *in vitro* amb extractes nuclears de cèl·lules HeLa, s'ha trobat que cIBR funciona com un repressor de la transcripció del promotor del gen H5. L'efecte és altament específic ja que cIBR no afecta la transcripció de promotors que no contenen la seva seqüència de reconeixement o de promotors de la H5 mutats en el lloc d'unió de la proteïna. cIBR inhibeix la transcripció interferint amb la formació del complex d'iniciació, però no afecta la transcripció de complexos preformats. D'acord amb això, la unió del factor TFIID a la *TATA box* impideix la unió posterior de cIBR, però no al revés. Això, i el fet que cIBR no té efecte quan s'uneix a un lloc *upstream* del promotor, suggereix que la unió de cIBR a la regió d'iniciació causa repressió per interferència directa amb factors de transcripció generals diferents de TFIID, possiblement TFIIB. cIBR s'ha trobat només en eritròcits madurs i tardans, però no en cèl·lules eritroides primàries que transcriuen activament el gen H5. Les cèl·lules transcripcionalment actives (pre-eritroblasts i eritroblasts), així com altres tipus cel·lulars no eritroides, contenen cIBF (per *chicken initiation binding factor*). cIBF purificat és una proteïna no glicosilada de 68-70 kDa que també reconeix la regió d'iniciació de la transcripció del gen H5.

EFFECTE DE LES CONVULSIONS LIMBIQUES SOBRE L'EXPRESSIO DE TRES FACTORS NEUROTROFICS: NGF, BDNF I NT3, A L'HIPOCAMP DE RATA. COMPARACIO ENTRE DIFERENTS MODELS EXPERIMENTALS D'EPILEPSIA.

N. Rocamora¹, J.M.Palacios², G. Mengod²

¹Biologia Cel.lular. Facultat Biologia. Universitat de Barcelona

²Dept. Neuroquímica. CID-CSIC.

El desenvolupament i manteniment de les cèl.lules neuronals i les seves xarxes depèn de la presència de factors neurotròfics, molècules que sintetitzades en quantitat limitant per les cèl.lules diana o "target" (postsinàptiques) són transportades de forma retrògrada als cossos neuronals (presinàptics). Si bé el "nerve growth factor" (NGF) ha estat durant més de tres dècades la única molècula aïllada amb capacitats neurotròfiques, el descobriment, en els darrers tres anys, d'altres molècules; "brain-derived neurotrophic factor" (BDNF), "neurotrophin-3, 4 i 5" (NT3, NT4 i NT5) que comparteixen característiques estructurals i funcionals amb l'NGF ha portat a la inclusió de totes elles a l'anomenada família de les neurotrofines (NTF). Malgrat la seva elevada homologia, les diferents NTF s'ha demostrat que actuen sobre poblacions neuronals específiques (si bé solapades), així com en diferents moments al llarg del desenvolupament. El fet de que, en el SNC, les NTF es concentrin majoritàriament a l'hipocamp, juntament amb la seva ubicació preferent a les neurones, fa suposar que les alteracions en l'activitat neuronal del sistema límbic puguin afectar la regulació de l'expressió d'aquestes molècules.

Hem produït dos models d'alteració experimental de l'activitat neuronal del sistema límbic: (a) la introducció de petites lesions electrolítiques en el hilus del gir dentat de l'hipocamp i (b) la injecció intrahipocampal (a nivell del stratum radiatum de la CA1) d'àcid quinolínic. En ambdós models es provoquen alteracions tant de l'activitat elèctrica (canvis en el EEG) com del comportament (estereotípies, "wet dog shakes", convulsions...). Seguidament, hem analitzat els nivells de mRNA de tres NTF; NGF, BDNF i NT3, mitjançant la hibridació in situ d'oligonucleòtids (48mer) específics per a cada una d'elles, sobre talls de criostat (20µ) obtinguts a partir de cervells d'animals sacrificats a diferents temps (entre 1 i 24-48 hores) després de la injúria (lesió electrolítica o injecció d'àcid quinolínic). Els resultats obtinguts demostren, en ambdós models, un increment important del nivell de mRNA per l'NGF (entre 8-10 cops respecte al valor basal) i el BDNF (entre 20-30 cops), a la capa de cèl.lules granulars del gir dentat de l'hipocamp. A més a més, aquest increment és ràpid (màxim a les dues-tres hores després de l'inici de les convulsions), bilateral i transitori (torna a valors basals a les 12 hores per l'NGF i entre 24-48 hores pel BDNF). Contràriament, pel que fa al nivell de mRNA del NT3 observem, en ambdós models, una clara, bilateral i també transitòria disminució a la mateixa capa cel.lular. Els nivells mínims s'assoleixen a les 10-12 hores després de la injúria, recuperant-se posteriorment els valors basals, entre les 24-48 hores.

La comparació dels resultats presentats amb els obtinguts per altres autors en d'altres models d'epilepsia; injeccions sistèmiques o locals d'àcid kaínic (Zafra et al. 1990, EMBO J. 9, 3545; Dugich-Djordjevic et al. 1992, Neuroscienc 47, 303; Ballarín et al. 1991, Exp. Neurol. 114, 35; Gall et al. 1991, Mol. Brain Res. 9, 113), inducció de kindling (Enfors et al. 1991, Neuron 7, 165), demostra un total acord pel que fa a la sobreexpressió de l'NGF i el BDNF, en tots ells, fet que per l'NGF s'havia postulat que podia tenir rel.lació amb els fenòmens de "plasticitat" (reorganitzacions sinàptiques) associats als canvis d'activitat funcional. Contràriament, pel que fa al NT3, en cap d'aquests models es descriu la disminució trobada per nosaltres, en principi en la lesió del hilus (Rocamora et al. 1992, Mol. Brain Res. 13, 27) i posteriorment confirmada també pel cas de l'injecció d'àcid quinolínic.

Sessió 3

ANÀLISI i DIAGNOSI GENÈTICS

ANALISIS GENETICO DEL DEFICIT CONGENITO DE PROTEINA C ASOCIADO A PATOLOGIA TROMBOTICA.

Soria JM, Fontcuberta J*, Estivill X, Sala N.
 Departament de Genética Molecular del Institut de Recerca Oncològica (IRO). Hosp. Duran i Reynals. Barcelona.
 * Departament d'Hematologia. Hosp. Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

La Proteína C (PC) es una glicoproteína plasmática con propiedades anticoagulantes y profibrinolíticas, que ejerce su actividad a través de la inactivación de los factores Va y VIIIa de la coagulación. Su importancia fisiológica como inhibidor de la coagulación sanguínea queda demostrada por la relación existente entre su defecto y enfermedad tromboembólica.

El déficit hereditario de PC se comporta como una enfermedad autosómica dominante con penetrancia parcial y expresividad clínica variable. La prevalencia de heterocigotos se estima en 1 de cada 200-300 donantes de sangre sanos, si bien en solo 1 de cada 16.000-30.000 individuos, el déficit de PC se asocia a enfermedad tromboembólica.

Para intentar establecer relaciones directas entre la causa molecular del déficit y la severidad de la patología trombotica, nuestro grupo ha iniciado el análisis del gen para la PC en familias con déficit hereditario de esta proteína.

La estrategia seguida ha sido la siguiente: A partir del ADN genómico de pacientes y controles, se amplifican los exones del gen de la PC mediante PCR radioactiva, para aplicar la técnica de análisis de los "Single Strand Conformation Polymorphisms" (SSCP) y posterior secuenciación de los exones que presentaban bandas anormales en el análisis anterior.

Los resultados obtenidos para el análisis de los exones 3, 7 y 9 se muestran en la tabla I.

Tabla I: Mutaciones identificadas en el gen de la PC de familias españolas con déficit congénito de PC.

PEDIGREE	EXON	MUTACION	E.RESTR.	COMENTARIOS
PC-34-3	Exón 3	1380,C del.7pb Arg-3	BamHI(-)	"Frameshift", stop en codón 16
PC-34-6	Exón 3	CGT->TGT 9,Arg->Cys	No	Déficit tipo II
PC-34-9	Exón 7	6139,G inserción TT 143,Arg->Leu	MnlI(-)	"Frameshift", stop en codón 156
PC-34-1	Exón 7	CGG->TGG 178,Arg->Trp	No	
PC-34-4 6 y 15	Exón 7	CGG->CAG 178,Arg->Gln	No	
PC-63-21	Exón 7	CAG->CAC 184,Gln->His	BspMI	Destruye 3' "splicing" con stop en codón 225
PC-34-19	IntrónG	6274,C->T ins Val,Gly 185-6	HphI	Crea nuevo 3' "splicing" con stop en codón 217
PC-34-5	Exón 9	CGG->TGG 229,Arg->Trp	Fnu4HI	Déficit tipo II
PC-34-2	Exón 9	1877,T delección 3pb 321Ile,322Cys->Met	BspHI	

CONTRIBUCIÓ DEL POLIMORFISME GENÈTIC DE L'APO A-I EN LES MALALTIES CARDIOVASCULARS

M.T. Montañés¹, A. Castells¹, I. Hurtado¹, V. Gracia¹, C. Fiol¹, X. Pintó², M.J. Castañeras³.

¹ Unitat de Recerca Experimental. Hospital Prínceps d'Espanya.

² Servei de Medicina Interna. Hospital Prínceps d'Espanya.

³ Servei de Bioquímica. Hospital Prínceps d'Espanya.

INTRODUCCIÓ

L'arteriosclerosi és un dels principals problemes sanitaris del món occidental. Si bé els factors ambientals són parcialment responsables de l'aparició d'aquesta malaltia, hi ha considerables diferències en els nivells de risc individual. Tant és així, que podem considerar l'arteriosclerosi com el resultat de la interacció entre factors ambientals i un component genètic important (1).

Estudis epidemiològics realitzats en els últims anys han demostrat una associació entre els nivells del colesterol HDL en plasma i el desenvolupament de la malaltia cardiovascular. L'apo A-I és el component proteïc majoritari de les HDL, i s'ha vist que la disminució de les concentracions de c-HDL i apo A-I ha estat associada amb malaltia coronària prematura (2,3,4).

El gen de l'apo A-I ha estat trobat i caracteritzat adjacent als gens de les apo C-III i A-IV. Aquests tres gens formen una família multigènica al llarg del cromosoma 11. Per altra banda, s'ha identificat una diana de restricció polimòrfica per l'enzim Pst-I en l'extrem 3' del gen de l'apo A-I. La presència o absència d'aquesta diana, que s'ha determinat mitjançant la digestió de l'ADN genòmic amb l'enzim Pst-I i la hibridació d'una sonda marcada pel gen de l'apo A-I, es visualitza en bandes de 3.3 kb i 2.2 kb (5).

MATERIAL I MÈTODES

a) Obtenció de mostres de ADN.

Les mostres s'han obtingut de l'hospital Prínceps d'Espanya de Bellvitge. S'han fet dos grups d'estudi: un grup d'individus escollits a l'atzar i un grup d'individus que pateixen algun tipus de malaltia cardiovascular. En els dos grups s'ha separat el "buffy-coat" a partir de sang. S'ha procedit a la lisi cel·lular i nuclear dels leucòcits i tractament amb proteïnasa K (200 ul). Extracció amb fenol/cloroform/isoamilalcohol i quantificació del ADN per espectrofotometria a 260 nm.

b) Digestió de l'ADN amb l'enzim de restricció Pst-I.

L'ADN s'incuba a 37°C un cop s'ha afegit l'enzim Pst-I. La separació dels fragments d'ADN es fa per electroforesi sumergida en gel d'agarosa al 1%.

c) Transferència de l'ADN a una membrana de Nylon.

Prèviament es tracta el gel amb una solució desnaturalitzant per tal de separar les dues cadenes de l'ADN per preparar-lo per a la hibridació. La transferència es fa per capilaritat segons la tècnica de Southern (6). Posteriorment l'ADN es fixa a la membrana amb llum UV.

d) Hibridació i marcatge de la sonda.

Un cop tenim l'ADN fixat a la membrana procedim a la pre-hibridació per tal de bloquejar les unions inespecífiques. La hibridació es fa amb una sonda del gen de l'apo A-I, de 2.2 Kb, obtinguda a partir del plàsmid pUC 8 i clonat en E.Coli, i prèviament marcada amb 32P per Random priming. La hibridació es deixa incubar tota la nit a 65°C. Després d'uns rentats per eliminar l'excés de 32P, s'exposa la membrana a una pel·lícula de raigs X i amb dues pantalles amplificadores i s'incuba a -70°C. Per últim es duu a terme el revelat de la placa fotogràfica.

RESULTATS i DISCUSSIÓ

Després de la digestió amb Pst-I de l'ADN genòmic i la hibridació amb una sonda de 2.2 Kb corresponent al gen de l'apo A-I, s'observa l'aparició de dues bandes en els individus que són heterocigots per l'al·lel de la malaltia, una de 2.2 Kb corresponent a l'al·lel normal i una de 3.3 Kb corresponent a l'al·lel alterat (fig. 1).

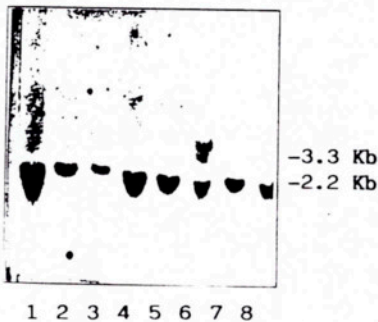


Figura 1. Resultat de la hibridació de la sonda marcada del gen de l'apo A-I en una electroforesi en gel d'agarosa al 1% d'ADN genòmic digerit amb Pst-I.

Es detecten 7 individus homocigots per l'al·lel normal (banda de 2.2 kb) i un individu heterocigot pel gen alterat (bandes de 2.2 3.3 kb) en el carril 6.

En l'estudi realitzat fins ara, s'ha pogut detectar 4 individus heterocigots en el grup de 31 pacients de malalties cardiovasculars estudiats, suposant un 12,9%. En la població control, s'ha trobat 3 individus heterocigots d'un total de 91 mostres estudiades. Això suposa un 3,2%. Podem dir doncs que la freqüència al·lèlica resultant en la població control és de 1,6% , mentre que a la població de pacients és de 6,45%.

Paral·lelament s'ha estudiat els nivells de colesterol HDL plasmàtic, i s'ha trobat que de tots els heterocigots detectats en la població de pacients, el 50% tenen nivells baixos de HDL (<0.9 mmol/l) considerats hipoal·falipoproteinèmics. Altrament, en la població control no s'han trobat nivells baixos de HDL en els individus heterocigots.

En els resultats obtinguts es pot veure com a la població de pacients hi ha un percentatge més elevat de l'al·lel alterat que en la població control, la qual cosa ens indica d'una contribució dels factors genètics en l'aparició de malalties cardiovasculars.

Donat que un 50% dels malalts heterocigots són hipoal·falipoproteinèmics, és veu un marcat efecte del polimorfisme genètic associat a aquest tipus de malaltia.

D'altra banda s'ha vist que no tots els individus que presenten el polimorfisme tenen nivells baixos de HDL, del que podem deduir que els nivells de colesterol HDL, a part d'una contribució genètica important estàn influenciats per molts altres factors (tabaquisme, dieta, sexe, diabetes, obesitat...)

BIBLIOGRAFIA

1. J.J. Frohlich, P. Haydn. 1989. The clinical significance of serum high density lipoproteins. *Clin Biochem.* 22: 417-423.
2. G. Assmann and H. Funke. 1990. HDL metabolism and atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol*, Vol.16 (Suppl.9)
3. J. Johansson, L.A. Carlson, C. Landou, and A.Hamsten. 1991. High density lipoprotein and coronary atherosclerosis. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, Vol.11, No.1.
4. J.Frohlich, J. Westerlund, D. Sparks, and H. Pritchard. 1990. Familial hypoal·falipoproteinemias. *Clin Invest Med*, Vol.13, No.4.
5. J.M. Ordovas, E.J. Schaefer, D. Salem, R.H. Ward, C.J. Glueck, C. Vergani, P.W.F. Wilson and S.K. Karathanasis. 1985. Apolipoprotein A-I gene polymorphism associated with premature coronary artery disease and familial hypoal·falipoproteinemia. *The New Engl J Med*, Vol.314, No.11
6. E.M. Southern. 1975. Deyection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 98: 503-517.

UTILITZACIO DE MICROSATEL.LITS PER A DIAGNOSTICS DE PATERNITAT

BANCHS M.I., FUENTES J.J., VOLPINI V., ESTIVILL X.

Departament de Genètica Molecular, Hospital Duran i Reynals.
Hospitalet de Llobregat 08907 Barcelona.

Els microsatèl.lits són una subclasse de seqüències repetitives les quals es caracteritzen per tenir seqüències molt curtes de repetició, poden ser dinucleòtids, trinucleòtids ó tetranucleòtids (CA/GT, TCAT, AAC, etc.) i es troben presents cada 20 kilobases, aproximadament, del genoma. Aquests microsatèl.lits són analitzats mitjançant la tècnica de PCR, amb un " primer " ó cebador marcat radioactivament, que és flanquejant a aquesta zona que té les seqüències de repetició i els fragments són separats per electroforesi. Nosaltres hem seleccionat 5 microsatèl.lits, corresponents a 5 regions cromosòmiques diferents: Apo C2 (Cr. 19), D21S168 (Cr.21), D6S89 (Cr.6), D11S35 (Cr.11), D1S117 (Cr.1). Aquests detecten entre 15 i 24 al.lels cada un, i tenen una elevada heterozigositat. Hem estudiat les freqüències dels diferents al.lels i dels genotips en una mostra de 100 individus no relacionats. Aquesta mostra és representativa del total de la geografia espanyola. L'anàlisi múltiple de microsatèl.lits constitueix el millor mètode pel diagnòstic de paternitats i estudis de identificacions.

DETECCIÓ DEL DNA DE VIRUS DE LA HEPATITIS B PER
REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR):
COMPARACIÓ AMB LA HIBRIDACIÓ MOLECULAR.

F.X.López-Labrador, J.Costa, J.M.Sanchez-Tapias,
J.Vidal, M.T.Jimenez de Anta i J.Rodés.
Serveis d'Hepatologia i Microbiologia,
Hospital Clínic i Provincial de Barcelona.

RESUM

S'ha avaluat la detecció del DNA del virus de la hepatitis B (DNA-VHB) en 80 pacients amb hepatitis crònica causada per aquest agent mitjançant dues tècniques: hibridació molecular "dot-blot" utilitzant una sonda marcada amb ^{32}P i reacció en cadena de la polimerasa seguit de tinció amb bromur d'etidi (PCR-EB). Els resultats obtinguts per PCR concorden totalment amb els obtinguts per dot-blot. També es va estudiar la sensibilitat d'ambdues tècniques, resultant ser de l'ordre de 0,1 pg de DNA-VHB clonat pel dot-blot i de 0,01 pg per la PCR-EB. Aquests resultats indiquen que el mètode PCR-EB és adequat per a la detecció del DNA-VHB en sèrum. La PCR-EB és un procediment més senzill, ràpid i sensible que el dot-blot. Ademés te l'avantatge de que no cal la utilització d'isòtops radioactius.

INTRODUCCIÓ

L'avaluació de l'activitat replicativa del VHB a la hepatitis crònica ocasionada per aquest agent infecciós és molt important pel seguiment dels pacients, però sobretot pel control del tractament amb fàrmacs antivirals. Fins ara, el mètode més utilitzat per detectar la replicació del VHB ha estat la identificació de seqüències del seu genoma en mostres de sèrum per hibridació molecular. Aquesta tècnica és complicada i lenta de realitzar, per això la seva utilització queda restringida a un petit nombre de centres que disposen de la tecnologia i infraestructura adient. D'ençà de l'aparició de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) s'han obert noves perspectives per a la detecció d'agents infecciosos. En aquest estudi es compara un mètode d'hibridació molecular "dot-blot" amb sonda radioactiva marcada amb ^{32}P amb un procediment de PCR ràpid i senzill.

MATERIALS I MÈTODES

S'ha investigat la presència de DNA-VHB en 80 mostres de sèrum, 35 HBeAg+/Anti-HBeAg-, 39 HBeAg-/Anti-HBeAg+, 5 amb ambdos marcadors positius i 1 amb ambdos marcadors negatius.

Per a l'hibridació molecular s'ha utilitzat una modificació del mètode de Scotto et al. (1), i per a la PCR s'ha seguit el mètode de Kaneko et el. (2,3). Breument, el mètode consta d'una extracció simple del DNA-VHB tractant el sèrum amb NaOH durant

1 hora a 37°C, neutralització amb HCl i amplificació del DNA extret. Per a l'amplificació s'utilitzen "primers" corresponents a la regió Pre-C-C del genoma del VHB, una de les més conservades. La reacció es realitza en un termociclador Perkin-Elmer i consta de 30 cicles d'amplificació (1m 30s a 94°C, 1m 30s a 42°C i 3m a 72°C); els productes de la reacció es visualitzen mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa al 2% tenyit amb bromur d'etidi (PCR-EB), detectant-se el producte amplificat com una banda de 270 pb.

La sensibilitat dels dos mètodes s'ha determinat utilitzant diferents dil.lucions de DNA-VHB clonat.

RESULTATS

Es va observar una correspondència total dels resultats obtinguts per dot-blot i per PCR-EB, excepte un cas, en el qual el dot-blot era dubtós i la PCR-EB clarament positiva.

	DOT-BLOT		PCR-EB	
	+	-	+	-
HBeAg+/Anti-HBeAg-	31	4	31	4
HBeAg-/Anti-HBeAg+	1	38	1	38
HBeAg+/Anti-HBeAg+	1	4	1	4
HBeAg-/Anti-HBeAg-	1 (d)	-	1	-

En quant a la sensibilitat, amb el mètode de dot-blot es va detectar 0,4 pg de DNA-VHB clonat a les 24 hores d'autoradiografia i 0,1 pg a les 92 hores, en canvi per PCR-EB es va detectar fins 0,01 pg de DNA-VHB clonat.

DISCUSSIÓ

Els mètodes d'hibridació molecular han estat àmpliament utilitzats per a la determinació de l'activitat replicativa del VHB. No obstant, aquest procediment dura aproximadament una setmana, és complexe i, normalment, inclou la manipulació d'isòtops radioactius, la qual cosa obliga a disposar de instal·lacions adequades. Si bé als darrers anys s'han introduït mètodes de detecció amb sondes no isotòpiques, aquests no sempre proporcionen resultats satisfactoris, especialment en quant a la sensibilitat, que normalment només arriba a 1 pg de DNA-VHB clonat.

El mètode de detecció de DNA-VHB per PCR-EB utilitzat en aquest estudi presenta avantatges importants respecte a la hibridació molecular, ja que és un mètode senzill: no

s'utilitzen extraccions de DNA amb Proteïnasa K/fenol/cloroform, ni isòtops radioactius en el procés de detecció, cosa que permet el seu ús a laboratoris que no disposin de la infraestructura adequada per la manipulació de radioisòtops. Ademés, és un mètode ràpid: tot el procediment, des de l'extracció del DNA fins la detecció del producte amplificat es realitza entre 6 i 7 hores, quan l'hibridació molecular té una durada aproximada d'una setmana.

Es important destacar que el mètode de detecció del DNA del VHB per PCR-EB és equivalent al dot-blot, ja que s'ha observat una concordança total amb els resultats d'aquest mètode, i, fins i tot, més sensible, ja que per PCR-EB s'arriben a detectar 0,01 pg de DNA-VHB clonat, mentre que la hibridació molecular presenta el màxim de sensibilitat en 0,1 pg.

Degut a la major sensibilitat de la PCR-EB, aquest mètode pot ser potencialment més adequat que el dot-blot per avaluar l'activitat replicativa del VHB en pacients que presentin baixos nivells de virèmia, com, per exemple, a la fase prèvia a la seroconversió o en portadors de HBsAg, i Anti-HBeAg+, amb transaminases elevades.

Es pot concloure, doncs, que la detecció del DNA del VHB per PCR-EB és un mètode ràpid, senzill i sensible que comporta diverses avantatges importants sobre l'ús de la hibridació molecular.

BIBLIOGRAFIA

1. Scotto, J., Hadchouel, M., Hery, C., Yvart, J., Tiolais, P., Brechot, C. "Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a single spot hybridization technique: comparison with results of other viral markers." *Hepatology*, 3: 279-284 (1983).
2. Kaneko, S., Miller, R.H., Feinstone, S.M., Unoura, M., Kobayashi, K., Hattori, N., Purcell, R.H. "Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay" *PNAS*, 86: 312-316 (1989).
3. Kaneko, S., Miller, R.M., Di Bisceglie, A.M., Feinstone, S.M., Hoofnagle, J.H., Purcell, R.H. "Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction: application for clinical diagnosis." *Gastroenterology*, 99: 799-804 (1990)

UTILITAT D'UNA TÈCNICA SIMPLE DE PCR PER A LA
DETECCIÓ DE DNA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B EN LA
HEPATITIS CRÒNICA B.

F.X.López-Labrador, J. Costa, J.M. Sánchez-Tapias,
J. Vidal, M.T. Jimenez de Anta i J. Rodés.
Serveis d'Hepatologia i Microbiologia.
Hospital Clínic i Provincial de Barcelona.

Entre 1985 i 1990, 183 pacients amb hepatitis crònica B, HBeAg+ i DNA-VHB+ per hibridació molecular amb sonda marcada amb ³²p (dot-blot) van ser seguits durant almenys 6 mesos abans de decidir tractament. En aquest interval el DNA es va negativitzar espontàniament a 50 casos (27%) però les transaminases van persistir elevades i el HBeAg va seguir positiu en molt d'ells, possiblement per persistència de replicació viral no detectable per dot-blot. Per això s'ha analitzat si la determinació del DNA per amplificació de la regió Pre-C-C mitjançant 30 cicles de PCR i tinció amb bromur d'etidi (PCR-EB) és útil en el seguiment d'aquests pacients. En examinar per PCR-EB els sèrums dels 50 pacients DNA negatius per dot-blot, es va detectar DNA-VHB a 24 cassos (PCR-EB+), però no als 26 restants (PCR-EB-). No es van observar diferències entre aquests dos grups en relació a edat, sexe, diagnòstic histològic i nivells de transaminases als 6 i 3 mesos abans de la negativització del DNA per dot-blot, però a partir d'aquest moment (moment 0) la ALAT va baixar més ràpidament al grup PCR-EB negatiu (Taula 1) i també es van observar diferències significatives en relació a la negativització del HBeAg i a la reaparició de DNA-VHB per dot-blot (Taula 2).

TAULA 1: VALORS DE ALAT AL SEGUIMENT (mitja ± D.E.)

	Moment 0	Als 3 m.	Als 6 m.	Als 9 m.	Als 12 m.
PCR-EB +	139 ± 143	94 ± 67	101 ± 109	76 ± 93	64 ± 65
PCR-EB -	73 ± 71	42 ± 20	41 ± 20	35 ± 21	56 ± 61
p	<0,001	<0,001	<0,005	<0,05	n. s.

TAULA 2: CASSOS AMB HBeAg+ o DNA-HBV+ PER DOT BLOT AL SEGUIMENT

	Moment 0		Als 3 m.		Als 6 m.		Als 9 m.		Als 12 m.	
	e+	DNA+	e+	DNA+	e+	DNA+	e+	DNA+	e+	DNA+
PCR-EB +	22	0	14	5	11	9	11	6	11	4
PCR-EB -	16	0	6	0	4	0	4	1	4	2
p<	.03	-	.02	.04	.03	.002	.03	.03	.03	n.s.

Es pot concloure que la PCR-EB és una tècnica simple que sembla útil per a detectar nivells baixos de replicació del VHB però associats a patologia hepàtica i no detectables per dot-blot.

MAPAGE Y LOCALIZACION DEL GEN DE LA ENFERMEDAD DE NORRIE

FUENTES J.J., BANCHS M.I., VOLPINI V., ESTIVILL X.

Departamento de Genética molecular, Institut de Recerca Oncologica (I.R.O.), Hospital Duran y Reynals. Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona.

La enfermedad de Norrie (EN) es un trastorno neurológico ligado al cromosoma X. Los pacientes presentan ceguera desde el nacimiento debido a displasia de la retina. Cerca del 30% de los pacientes presentan retraso mental progresivo y una pérdida auditiva neurosensorial a partir de la segunda década de la vida.

Se sabe que el locus de la enfermedad de Norrie se encuentra muy próximo al locus DXS7(Xp11.2-11.3) y al gen de la MAO A/B la distancia entre ambos es de 50 kilobases.

Para el clonaje del gen de la enfermedad de Norrie hemos subclonado fragmentos largos de ADN en levadura y hemos utilizado amplificación de secuencias SP1, TATA, lugares de splicing, etc., mediante PCR. El clonaje específico de estas secuencias permite su estudio en librerías de ADN complementario, pudiendo analizar la secuencia de bases y la correspondiente aminoacídica de los productos proteicos implicados en la enfermedad.

Estudi genètic i molecular de la distròfia miotònica en poblacions de l'estat espanyol.

Susana Balcells, Lluïsa Vilageliu, Daniel Grinberg i Roser González.
Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.

Ana María Cobo, Begoña Basauri i Montserrat Baiget
Unitat de Genètica Molecular, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona.

Adolfo López de Munain
Departamento de Neurología, Arantzazuko Amaren Ospitalea, San Sebastián.

La distròfia miotònica és la distròfia muscular més freqüent en la vida adulta. Presenta una gran variabilitat en la seva expressió, que va des de les formes assintomàtiques, el diagnòstic clínic de les quals és molt difícil, fins a les congènites, que són de caràcter molt sever. En els darrers anys la recerca del gen responsable ha proporcionat un gran nombre de marcadors polimòrfics molt propers a aquest locus. Aquests han estat utilitzats com a eines per al diagnòstic i per realitzar estudis de lligament. Nosaltres hem analitzat dos grups de famílies afectades de DM, un procedent del país basc, que representa un clar exemple de població aïllada, i l'altre de la resta de l'estat espanyol. Utilitzant uns quants dels marcadors polimòrfics hem estudiat associacions al·lèliques, calculat les distàncies genètiques entre aquests i la malaltia (mitjançant "LOD scores") i analitzat els diferents haplotips.

El resultat més rellevant ha sigut la observació d'un fort desequilibri de lligament entre el marcador anònim D19S63 i la distròfia miotònica tant en la població basca com en la espanyola. Amb altres marcadors els resultats en les dues poblacions han sigut discordants: si bé en la població espanyola no es detecta desequilibri de lligament entre la malaltia i APOC2 *TaqI* o CKMM *NcoI* així no és així en la població basca on es manifesta un fort desequilibri. Aquest resultat en la població basca concorda amb els obtinguts en altres poblacions aïllades.

Segons els resultats dels "LOD scores", APOC2 *TaqI* es situa a uns 3 cM del locus DM. Per altra banda, no s'ha detectat cap recombinació entre els marcadors CKMM i D19S63 i la malaltia, per la qual cosa s'obté, en ambdós casos, un màxim de "LOD score" a zero. En quant als haplotips compostos d'aquests marcadors, un d'ells és més freqüent en els cromosomes distròfics que en els normals. Si bé aquest fet és comú en les dues poblacions estudiades, és més acusat en la població basca. Aquest haplotip podria correspondre a l'haplotip ancestral de la DM assumint una taxa baixa de mutació del gen DM i l'existència d'un efecte fundador.

En els darrers mesos s'han aïllat noves sondes de DNA que detecten un polimorfisme que cosegrega amb la malaltia. En concret, els individus afectats presenten al·lèls inestables de mida superior a la dels al·lèls normals. S'ha demostrat també, que aquesta expansió de mida és deguda a l'increment de repeticions del trinucleòtid CTG en la regió 3' no traduïda del gen candidat. A més a més, s'ha observat una correlació entre la severitat de la malaltia i l'increment en la mida de l'al·lel afectat, el qual pot variar des de uns pocs nucleòtids pels casos asimptomàtics, fins a unes 5kb en els casos més severos.

Actualment estem analitzant les famílies de DM utilitzant aquestes noves sondes que ens permeten aclarir casos amb diagnòstics ambigus i confirmar el fenomen descrit en les nostres poblacions. La identificació de la mutació responsable de la DM en una regió 3' no traduïda d'un gen es un resultat sorprenent i serà interessant esbrinar quin paper juga aquest defecte molecular en la patogènesi de la distròfia miotònica.

APLICACION DEL METODO DE SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM (SSCP) EN LA DIAGNOSIS GENICA Y LA IDENTIFICACION DE NUEVAS MUTACIONES EN EL GEN DE LA FIBROSIS QUISTICA.

Miguel Chillón, Virginia Nunes y Xavier Estivill.

Unitat de Genètica Molecular, Institut de Recerca Oncològica (IRO), Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona.

Actualmente se conocen más de 150 mutaciones responsables de fibrosis quística (FQ), que permiten caracterizar el 75% de los cromosomas de la población española. Realizar un diagnóstico genético significa poder llegar hasta 150 análisis corriendo el riesgo de no llegar a conocer la mutación responsable para alguno de los cromosomas afectos. La técnica de los SSCPs permite detectar en una solo análisis cualquier cambio que se produzca en un exón o fragmento determinado de ADN, sea este cambio debido a una mutación ya descrita o bien a una nueva mutación. Esto supone un considerable ahorro de tiempo y poder realizar al mismo tiempo análisis genéticos y búsqueda de nuevas mutaciones.

Introducción La Fibrosis quística es la enfermedad autosómica recesiva grave más frecuente en la población de raza blanca con una incidencia de 1/2000 y una frecuencia de 1/25, siendo la incidencia de la enfermedad tanto en Catalunya como en el resto de España de 1/3000.

La gran cantidad de mutaciones existentes, más de 150, suponen un inconveniente para analizar un individuo determinado, ya que para cada muestra hemos de hacer un análisis para cada mutación conocida, hasta que encontremos cual es la responsable en cada caso.

La aplicación de la técnica de los SSCPs permite analizar en un solo análisis cualquier cambio que ocurra en un fragmento determinado de ADN. Esta técnica se basa en la diferente velocidad electroforética, en geles de acrilamida no denaturantes, que presentan las cadenas simples de ADN. La velocidad electroforética depende de la resistencia que sufre una cadena simple de ADN en el gel por la conformación o plegamiento que adopta, siendo el plegamiento dependiente de la secuencia de nucleótidos de la simple cadena. Cualquier cambio en la secuencia de nucleótidos, sea por substitución, delección o inserción de nucleótidos provocará un plegamiento o conformación diferente presentando una distinta movilidad electroforética que nos permitirá detectar el cambio.

Cada mutación presenta una movilidad electroforética determinada lo que nos permite, con la utilización de controles, saber que en el exón o fragmento de ADN analizado, poder identificarla.

Material y Metodos Realizamos una PCR con el fragmento a analizar utilizando un nucleótido marcado ($\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP) en la reacción. La mezcla de reacción se realiza en un volumen final de 10 μl , manteniendo las proporciones de los reactivos, así como las condiciones de amplificación que utilizamos normalmente para este fragmento.

El producto de reacción se diluye 1:50, se carga en un gel de poliacrilamida al 6%, con 10% de glicerol y se deja correr dependiendo del fragmento (300 pares de bases 24 horas) a 10 Watos. Se deja exponer durante 12-24 horas.

En caso de detectar alguna banda anómala que no presente un patrón conocido con los controles de mutaciones, se corta la banda directamente del gel de acrilamida y se amplifica por PCR de nuevo, secuenciándose el producto de la PCR directamente, bien por secuenciación manual o por secuenciación automática mediante deoxynucleótidos marcados por fluorescencia.

Resultados La utilización de este método permite realizar al mismo tiempo la búsqueda de nuevas mutaciones y analizar rápidamente los exones del gen de FQ, facilitando el trabajo y ahorrando una gran cantidad de tiempo. Así, nos ha sido posible realizar:

- Identificación de nuevas mutaciones:
 - . siete nuevas mutaciones (E92K y A120T en el exón 4, R334W en el exón 7, 1609delCA en el exón 10, 2869insG en el exón 15, y R1162X y 3667del4 en el exón 19).
 - . dos nuevos polimorfismos (1001+12 C o T en el intrón 6b y 1898+152 T o A en el intrón 12).
 - . cuatro variantes de secuencia (873 C o T en el exón 6a, 1773 A o T en el exón 11, 3030 G o A en el exón 15 y 4521 (G o A en el exón 24).
- Análisis de los exónes 4, 7, 10, 11, 12, 15, 19 y 20 del gen de la FQ lo que permite detectar cerca del 40% de las mutaciones responsables de FQ, presentes en el 70% de los cromosomas de nuestra población en sólo 8 análisis. Se logra así una mayor rapidez en la identificación de las mutaciones causantes de FQ en un individuo determinado.

Discusión La aplicación de la técnica de SSCP supone un avance en el análisis de mutaciones de fragmentos determinados de ADN, ya que permite observar cualquier cambio en la secuencia de nucleótidos sin necesidad de tener que utilizar ningún equipo especial. Existen otras técnicas que permiten analizar las posibles mutaciones o cambios en la secuencia de un fragmento de ADN, como la técnica de Electroforesis en Geles de Gradiente Desnaturalizante (DGGE), o la técnica de heteroduplex, o la del RNA-cleavage, pero necesitan de equipos especiales, o bien como la de heteroduplex, presentan una sensibilidad menor.

El siguiente paso en el análisis genético de la FQ es terminar de poner a punto las condiciones de SSCPs para el resto de los 27 exones del gen, y en una etapa posterior poder realizar el análisis de SSCP sobre el cDNA obtenido a partir del RNA de biopsia nasal de afectos para la enfermedad, lo que significaría reducir aún más el número de análisis y pasar a realizar un máximo de 5 o 6 análisis por individuo afecto. Al mismo tiempo se debe seguir con la búsqueda de nuevas mutaciones de manera que podamos llegar a conocer la totalidad de las mutaciones causantes de la enfermedad pudiendo realizar así análisis directo de la enfermedad y ofrecer detección de portadores en la población y diagnóstico prenatal con una fiabilidad del 100%.

Bibliografía

1. M. Chillón, V. Nunes y X. Estivill (1991) *Nucleic Acid Research* 19, 22, 6343.
2. P. Gasparini, V. Nunes, A. Savoia, M. Chillón et al. (1991) *Genomics* 10, 193-200.
3. M. Chillón, A. Palacio, V. Nunes, T. Casals, J. Giménez and X. Estivill (1992). *Human Mutation* (in press).
4. M. Chillón, A. Palacio, V. Nunes, X. Estivill. (1992) *Human Genetics* (in press).

DE YACs A COSMIDS: NOVA ESTRATEGIA APLICADA AL MAPATIE DE LA REGIO CENTROMERICA DEL CROMOSOMA Y HUMANA.

Mónica Bayés i Chris Tyler-Smith.

CRC Chromosome Molecular Biology Group. Department of Biochemistry. University of Oxford, U.K.

El centròmer és la part del cromosoma que interactua amb l'aparell mitòtic i garanteix la correcta segregació del cromosoma durant la divisió cel·lular. Durant els últims 10 anys s'ha analitzat en detall el DNA centromèric de molts cromosomes de *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*. Tot i així, les seqüències que funcionen com a centròmers en els cromosomes de mamífer encara no han estat identificades. En el Departament de Bioquímica de la Universitat d'Oxford s'està construint un mapa físic de la regió centromèrica del cromosoma Y humà, de gran utilitat per a realitzar després altres anàlisis de tipus funcional.

El grup disposa de diversos YACs (cromosomes artificials de llevat) amb DNA de la regió centromèrica del cromosoma Y. Però els clons de YACs poden ser difícils d'analitzar i de manipular i, per tant, la conversió d'un YAC en còsmids pot ser un pas molt útil en la caracterització de la regió clonada. Per això nosaltres hem utilitzat dos YACs d'aquesta regió (AA4 A7/11 i 13C1F), així com dues sondes convencionals (2D5 i Y190), per a escriure una genoteca en còsmids (LLOYNCO3 "M") construïda a partir d'un híbrid humà/ratolí que conté el cromosoma Y intacte. Els YACs AA4 A7/11 (290kb) i 13C1F (190kb) contenen DNA adjacent al DNA alfoïd (seqüència repetida en tàndem típica dels centròmers de primats), en el braç curt del cromosoma Y. 2D5 detecta una seqüència de còpia única present en ambdós YACs, mentre que Y190 reconeix una repetició en tàndem molt abundant en el cromosoma Y.

El principal problema en la utilització de YACs com a sondes és la presència de seqüències de DNA repetitiu en aquests. Per tal de bloquejar els llocs d'hibridació inespecífica es van prehibridar els dos YACs, un cop aïllats i marcats, amb DNA total humà (Sigma). Es van fer rèpliques de la genoteca i es van hibridar amb aquests dos YACs, així com amb les dues sondes convencionals. Es van trobar uns 500 còsmids positius que han estat classificats en els intervals definits per aquestes i altres sondes, cobrint una regió d'unes 300kb. Aquesta nova tècnica permet l'accés immediat al DNA del cromosoma Y contingut en YACs quimeres o en clons amb més d'un YAC. També simplifica l'anàlisi de YACs inestables.

Hi havia un interès particular per aïllar un còsmid que contingues un punt de ruptura fins ara només descrit en línies cel·lulars amb aberracions cromosòmiques. En el braç curt del cromosoma Y existeixen dos blocs de DNA repetitiu de diferent mida reconeguts per Y190, s'anomenen Y190 major i Y190 menor. Estudis de línies cel·lulars amb delecions en Yp revelen que hi ha un polimorfisme en quant a la localització dels dos blocs Y190, possiblement a causa d'una inversió. En l'ordenació més freqüent el bloc menor es troba en una posició proximal respecte al major. A partir dels còsmids positius per 2D5 hem realitzat un "walking" fins a trobar un còsmid que conté l'extrem proximal de Y190. La posició de les dianes de restricció en aquest còsmid indica que inclou el punt de ruptura en la inversió. Hem subclonat el còsmid en *ptz* i actualment estem tractant de trobar una sonda que permeti detectar la inversió en línies cel·lulars salvatges. Els polimorfismes fora de la regió pseudoautosòmica del cromosoma Y són força rars i, per tant, aquesta inversió polimòrfica podria ser de gran utilitat en estudis d'evolució humana (líniate patern).

Referències:

- Tyler-Smith. *Development* 101 supplement, 93-100 (1987).
- Tyler-Smith et al. *J. Mol. Biol.* 203, 837-848 (1988).
- Neil et al. *Nucleic Acids Res.* 18, 1421-1429 (1990).
- Baxendale et al. *Nucleic Acids Res.* 19, 6651 (1991).

Sessió 4

**ANÀLISI de
MACROMOLÈCULES — (I)**

CARACTERITZACIO DE DOS ANTICOSSOS MONOCLONALS CONTRA LA LIPOPROTEINA LIPASA BOVINA

Mar Fernandez, Elisabet Vilella, Senén Vilaró.
Unitat de Biologia Cel.lular. Facultat de Biologia.

La lipoproteïna lipasa (LPL) catalitza la hidròlisi dels triglicèrids de les lipoproteïnes plasmàtiques iniciant el catabolisme dels quilomicrons i de les VLDL. Aquest enzim es troba exposat al corrent circulatori ancorat a la membrana luminal de les cèl.lules endotelials mitjançant proteoglicans del tipus heparan sulfat permetent així la captació dels àcids grassos lliures, resultants de la hidròlisi dels triglicèrids, pels teixits subjacents on seran emmagatzemats o bé utilitzats com a substrat energètic. La forma activa de l'enzim és la d'un dímer format per dos polipèptids idèntics de 56 Kd. Els monòmers presenten un elevat grau de complexitat estructural amb quatre dominis diferents: Un domini responsable de la unió a lípids i per tant de caràcter hidrofòbic, un segon domini d'unió a receptor (proteogluca) i a heparina que presenta un elevat contingut de residus carregats positivament, un tercer domini responsable de la unió a cofactor (apo CII) i per últim el que correspon al centre actiu. A més, recentment s'ha comprovat que la LPL és també capaç d'unir-se al receptor LRP de les LDL (LDL receptor-related protein) facilitant possiblement la captació de romanents de quilomicrons per part del fetge.

Nosaltres vam abordar l'obtenció d'anticossos monoclonals utilitzant com antigen la LPL bovina i la seva posterior caracterització com a primera aproximació en l'estudi de l'estructura d'aquesta proteïna.

Fins el moment hem obtingut dos anticossos monoclonals, 2h10 i 1g1, els quals són dues IgG de subclasses IgG2a i IgG1 respectivament. Hem estudiat la seva especificitat així com intentat una primera aproximació al mapatge d'epítops per diferents tècniques ("site competition assay" mitjançant la tècnica d'ELISA, western blot de fragments proteolítics, etc), sempre comparant-los amb un tercer anticòs monoclonal comercial (5d2). Els resultats indiquen que l'anticòs 2h10 reconeix un epítop proper al reconegut per l'anticòs 5d2, que se sap que es localitza a l'extrem C-terminal de la proteïna, mentre que l'1g1 reconeix un epítop totalment diferent, situat probablement en un domini central de la molècula. Aquests resultats podrien permetre una caracterització més acurada del paper funcional dels diferents dominis de la LPL, ja que la gran majoria dels anticossos obtinguts contra la LPL reconeixen 8 epítops situats en l'extrem C-terminal.

PURIFICACIÓ PREPARATIVA DE L'ARGININA QUINASA PEL SEU ESTUDI CRISTAL·LOGRÀFIC

M. Cristina Vega i Miquel Coll

Unitat de Química Macromolecular, C.S.I.C.- C. i D.

E. T. S. d'Enginyers Industrials

Diagonal 647. 08028 Barcelona

Es conegut el paper regulador de les quinases en processos metabòlics de l'organisme i concretament, la participació de proteïnes quinases en processos tumorals. Aquesta faceta concedeix un interès especial a l'estudi de proteïnes amb capacitat de fosforilar aminoàcids, ja que la informació sobre la seva estructura pot servir per a conèixer el seu mecanisme d'acció i a la fi, pot ajudar a comprendre el funcionament d'altres proteïnes relacionades, com poden ser les proteïnes oncogèniques.

De forma homòloga a la funció desenvolupada per la creatina quinasa en els organismes vertebrats, l'arginina quinasa resulta imprescindible pel moviment muscular dels organismes invertebrats. La seva funció és la transferència a les mitocondries d'un grup fosfat de l'ATP a l'arginina donant lloc a la fosfoarginina, un fosfàgen muscular. A les miofibrilles és dona la reacció inversa transferint-se el grup fosfat de la fosfoarginina a l'ADP. L'ATP format serà la font energètica per a la contracció de les miofibrilles. La reacció catalitzada per l'arginina quinasa és dependent del pH, i a més és estereoespecífica. El nostre grup ha començat l'estudi estructural per difracció de raigs-X de l'arginina quinasa procedent del llobregant europeu (*Homarus vulgaris*). Aquest enzim és un monòmer d'un pes molecular aproximat de 40.000 Da.

Hem portat a terme una purificació preparativa de l'enzim en tres etapes:

- a) Fraccionament amb sulfat d'amoni.
- b) Cromatografia de bescanvi iònic de DEAE-Sephacel.
- c) Cromatografia de gel filtració amb Sephacril S100.

Amb aquest procediment s'han obtingut 30 mg de proteïna pura i hem començat a fer les primeres proves de cristal·lització

SEQÜENCIACIÓ DE LA PROTAMINA P2 DE *Monodonta turbinata*: ESTRATÈGIA I RESULTATS

Montserrat Daban¹, Manel Chiva² i Pierre Sautière³

1. *Departament de Biologia Molecular i Cel·lular, CID, CSIC, Jordi Girona 18-26, 08028, Barcelona*; 2. *Departament d'Enginyeria Química, ETSEIB, UPC, Diagonal 647, 08028 Barcelona*; 3. *Institut de Recherches sur le Cancer, Université de Lille II, URA 409 CNRS, Place de Verdun, Lille, France.*

En el present treball mostrem el procés de seqüenciació de la protamina P2 de *Monodonta turbinata* (F. Molluscs, Cl. Gastròpodes, SCl. Vetigatròpodes). La determinació de la seqüència completa ha comprés les següents etapes:

1. Anàlisi de la composició en aminoàcids
2. Identificació dels extrems amino i carboxil
3. Degradació recurrent d'Edman
4. Fragmentació enzimàtica de la proteïna
5. Separació i anàlisi dels fragments peptídics
6. Alineament dels fragments i deducció de la seqüència completa
7. Confirmació dels resultats per tècniques d'espectrometria de masses

La seqüència obtinguda ha estat la següent:

```
1                                         30
ARAVRRRRRARSRSRSRKSRRSRSRAKRSAS
RRRSRSAGRRRRRRRTASRRRRRSASRRRSV
SRRRRRSRKSRGRRRRRGRKVRRRRVKRAG
RKGRRRTRRRRRRARR(OH)
```

Els resultats mostren que és una molècula de 106 residus aminoacídics, 61 dels quals són arginines. La massa de la proteïna és de $13\,475 \pm 1.9$ Da, segons dades obtingudes per espectrometria de masses en electroesprai. Composicionalment es pot considerar una protamina típica.

DINAMICA MOLECULAR COM A EINA PER AL DISSENY DE MUTANTS DE PROTEINES. Aplicació a l'estudi comparatiu de l'inhibidor proteic de la carboxipeptidasa A de la patata i dels seus mutants Pro36Gly i Tyr37Phe.

Oliva B., Daura X., Molina M.A., Marino C., Canals F., Avilés F.X. i Querol E.

Institut de Biologia Fonamental i Dept. Bioquímica, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra (Barcelona).

S'han realitzat simulacions MD de les formes silvestre, mutant Pro36Gly i mutant Tyr37Phe, de l'inhibidor proteic (PCI) de la Carboxipeptidasa A de la patata (CPA), amb l'objecte d'estudiar els seus espais configuracionals a dos nivells: 1) el de la proteïna sencera, que ens permet determinar l'estabilitat estructural, i 2) el de la regió C-terminal, que ens permet predir les capacitats inhibidores respectives. Com a conclusió d'aquest treball, es dedueix que la capacitat d'inhibició d'ambdós mutants és sols lleugerament inferior a la del PCI nadiu.

Introducció.

L'estructura de les proteïnes, la seva estabilitat tèrmica i la seva funcionalitat, poden ser alterades mitjançant mutagènesi dirigida. Els mètodes d'Enginyeria de Proteïnes estan sent actualment emprats per al disseny de proteïnes amb propietats particulars que poden ser d'utilitat terapèutica i/o industrial. No obstant, la producció d'un mutant amb propietats i característiques predeterminables no és tan senzilla com pot semblar: mutacions puntuals poden implicar canvis deslocalitzats en l'estructura que afectin les propietats de la molècula (Bowie et al.,1990) i que difícilment siguin detectables mitjançant models moleculars estàtics. En aquest sentit, la Dinàmica Molecular (MD) comporta una ajuda fonamental en l'estudi de l'espai conformacional de la proteïna (van Gunsteren,1988), donant una visió molt més ampla que la que ens ofereix el model abans mencionat.

En el present estudi s'ha analitzat el pèptid inhibidor (PCI) de la Carboxipeptidasa A de la patata (CPA)(Hass & Ryan,1982), amb el propòsit de dissenyar nous inhibidors. El PCI, pel seu petit tamany, és un cas particular de proteïna fàcilment analitzable per MD (Oliva et al.,1991a) i, tantmateix, es coneix la seva estructura 3D tant per difracció de raigs X (formant complex amb la CPA (Rees & Lipscomb,1982)) com per RMN (Clare et al.,1987). A més, es dona el cas que el nostre grup ha clonat i expressat el corresponent gen sintètic (Molina et al.,1992).

Material i mètodes.

A partir de l'estructura del PCI (isoforma PCI-IIa, i sense els residus Glu1 i Gly39) en la conformació que presenta unit a la CPA (Rees & Lipscomb,1982), es va realitzar, prèvia optimització de 1800 passos amb Steepest Descent, una simulació per MD, de 250ps, amb acoplament a un bany tèrmic (temps de relaxació=0.1ps, temperatura constant=293K), amb l'objecte d'estudiar l'estabilitat estructural del mateix i d'analitzar les propietats de la regió C-terminal (residus 35 al 38), en particular, donada la seva importància en la inhibició de la CPA, l'orientació d'aquesta cua respecte al nucli de l'estructura (residus 8 al 34). Idèntics anàlisi s'han realitzat sobre els mutants en la regió de la cua C-terminal del PCI, Pro36Gly i Tyr37Phe, les estructures dels quals s'obtingueren per simple substitució de residus en les coordenades cristal·logràfiques del PCI nadiu.

L'optimització i la simulació es van executar mitjançant el paquet de rutines GROMOS (van Gunsteren & Berendsen, 1987) seguint el model NIS, el camp de forces del qual contempla la neutralització de les càrregues del sistema, imitant així la presència de contraions (Åqvist et al., 1986; Åqvist et al., 1985; Nilsson et al., 1990; Oliva et al., 1991a; Oliva et al., 1991b). Per a l'anàlisi es va utilitzar el paquet de subrutines NICE (Nilsson, 1990), i la visualització gràfica es va dur a terme mitjançant mdFRODO (Nilsson, 1990). Per a l'estudi de l'espai configuracional de la regió C-terminal, es va desenvolupar un programa propi en el que es van definir els angles Ψ i θ , sobre el pla π format pels residus del nucli, Phe23, Ala26 i Asn29 (figura 1). Aquest programa permet calcular la densitat de probabilitat per valors determinats dels angles Ψ i θ (Tapia et al., 1991), per a les tres formes, silvestre, mutant Pro36Gly i mutant Tyr37Phe, del PCI.

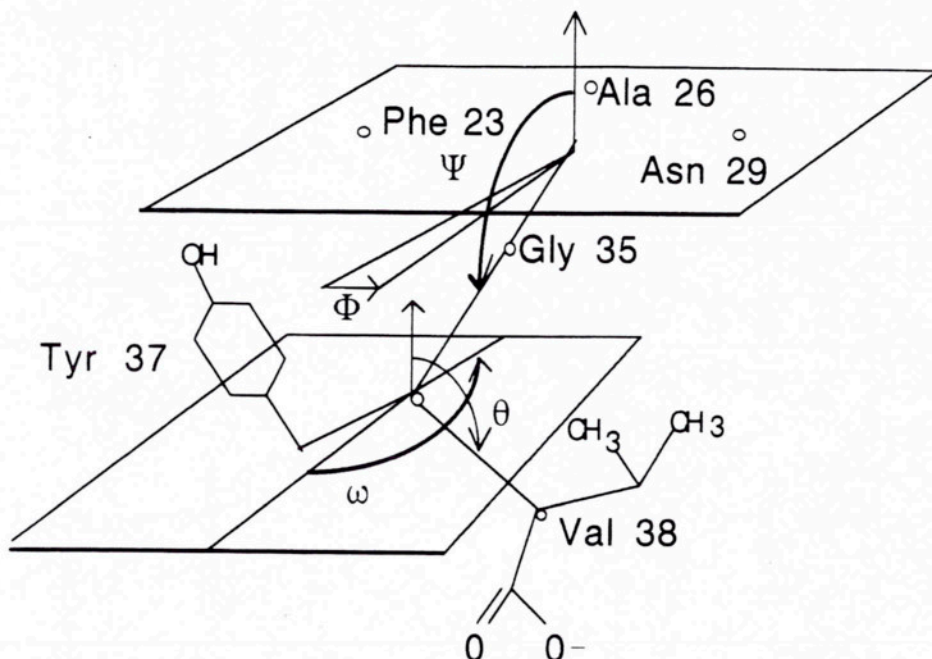


Figura 1:
Representació dels angles de la regió C-terminal i del pla π

Resultats i discussió.

L'energia potencial de la forma silvestre del PCI es va establir al cap de 40ps de començar la dinàmica, fluctuant seguidament en torn a una energia potencial promig de -1150 Kj/mol (Oliva et al., 1991a). La forma mutant Pro36Gly va trigar 50ps en establir la seva energia potencial, i aquesta va quedar també en torn als -1150 Kj/mol (Oliva et al., 1991b). En quant al mutant Tyr37Phe, es va establir energèticament al cap de 30 ps d'engegada la simulació i l'energia potencial promig dels passos següents va quedar en un valor de -1100 Kj/mol (lleugerament menys estable).

L'anàlisi dels factors B de temperatura (figura 2) demostra que els tres sistemes posseeixen propietats semblants, sent a més les seves fluctuacions comparables a les de l'estructura obtinguda per raigs-X (a excepció de la regió C-terminal, doncs el grup carboxílic no es troba unit al Zn^{2+} de la CPA en cap moment de la simulació). Així mateix, la comparació de les estructures promitjades en el període en que l'energia potencial es troba establitzada, demostra que les dues formes mutants

estudiades són molt semblants en estructura a la forma silvestre; en particular, la regió C-terminal es va trobar en ambdós casos amb una orientació favorable per a la interacció amb la CPA.

En aquest sentit, del càlcul de la probabilitat de que la conformació de la regió C-terminal de cada un dels mutants entrés dins d'uns marges conformacionals considerats com a bons per a que es produeixi la inhibició en la forma silvestre del PCI, s'ha deduït quin pot ser el percentatge relatiu d'inhibició per als mutants Pro36Gly i Tyr37Phe; prenent com a hipòtesi que la inhibició es produeix per xoc efectiu entre el PCI i la CPA.

Els resultats teòrics han demostrat que els espais conformacionals de la regió C-terminal dels mutants Pro36Gly i Tyr37Phe són molt semblants entre si i al del PCI nadiu, i que la probabilitat de que els angles abans definits prenguin valors que es trobin dins del rang dels que possibilitarien un xoc efectiu, és elevada. Amb tot això, i tal com s'ha vist per estudis experimentals realitzats també pel nostre grup (obtenció dels mutants esmentats per expressió heteròloga en *E. coli*), es comprova que la capacitat d'inhibició serà molt semblant en els tres casos.

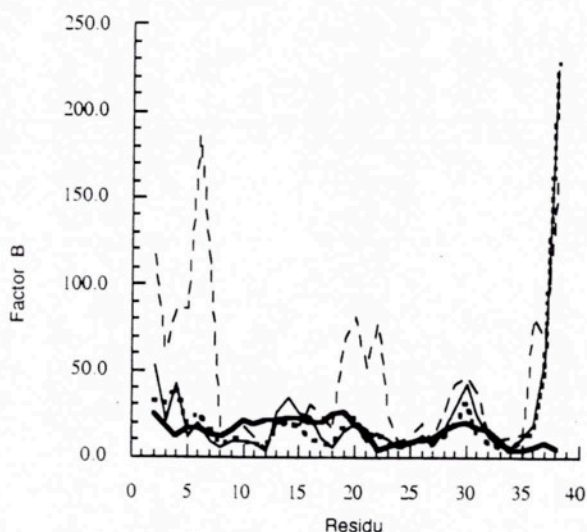


Figura 2

Representació dels factors B de temperatura. En línia continua gruixuda la del cristall, i en línia continua fina la de la forma silvestre. En línia discontinua la dels mutants del PCI Pro36/Gly (fina) i Tyr37/Phe (gruixuda).

AGRAIMENTS. Aquest treball ha estat subvencionat mitjançant ajuts de la PLANICYT, BIO88-0456, i BIO91-0477. B.O., M.M., i F.C. agraiexen la concessió de beques de recerca del MEC.

BIBLIOGRAFIA

- Bowie, J.V., Reidhar-Olson, J.F., Lim, W.A. & Sauer, T.R. (1990) *Science* **247**, 1306-1310.
- Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Nilges, M. & Ryan, C.A. (1987) *Biochemistry* **26**, 8012-8023.
- Hass, G.M. & Ryan, C.A. (1982) *Methods in Enzimology* **80**, 778-791.
- Molina, M.A., Avilés, F.X. & Querol, E. (1992) *Gene*, in press.
- Nilsson, O., Tapia, O. & van Gunsteren, W.F. (1990) *Biophys. Biochem. Res. Comm.* **171**, 581-588.
- Nilsson, O. (1990) *J. Mol. Graph.* **8**, 192-201.
- Oliva, B., Wästlund, M., Nilsson, O., Cardenas, R., Querol, E., Avilés, F.X. & Tapia, O. (1991a) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **176**, 616-621.
- Oliva, B., Nilsson, O., Wästlund, M., Cardenas, R., Querol, E., Avilés, F.X. & Tapia, O. (1991b) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **176**, 627-632.
- Rees, D.C. & Lipscomb, W.N. (1982) *J. Mol. Biol.* **160**, 475-498.
- Tapia, O., Oliva, B., Nilsson, O., Querol, E. & F.X. Avilés (1991) *Molecular Engineering* **1**, 249-266.
- van Gunsteren, W.F. & Berendsen, H.J.C. (1987) *GROMOS Lybrary Manual*. Biomos B.V. Nijenborgh 16, Groningen, The Neetherlands.
- van Gunsteren, W.F. (1988) *Protein Engineering* **2**, 5-13.
- Åqvist, J., Sandblom, P., Jones, T.A., Newcomer, M.E., van Gunsteren, W.F. & Tapia, O. (1986) *J. Mol. Biol.* **192**, 593-604.
- Åqvist, J., van Gunsteren, W.F., Leijonmark, M. & Tapia, O. (1985) *J. Mol. Biol.* **83**, 461-477.

ANALISI CRISTAL·LOGRÀFIC DE L'ENZIM GLUTATION S TRANSFERASA

Isabel Garcia i Miquel Coll
Unitat de Química Macromolecular. CSIC-CID.
ETSEIB
Av. Diagonal 647. Barcelona (08028).

Glutation_S_transferases (GST) són una família de proteïnes citosòliques, ubiqües i multifuncionals, relacionades amb processos de desintoxicació cel·lular envers substàncies xenobiòtiques com ara mutàgens, carcinògens i productes actius farmacològicament, així com composts endògens reactius (protecció contra processos oxidatius). També tenen un important paper com a transportadors intracel·lulars de nombrosos lligands de tipus hidrofòbic i anfipàtic, com són la bilirrubina, grups hemo, sals biliars i esteroides. Com a enzims actuen catalitzant l'atac nucleofílic del grup tiol (-SH) del glutatión per formar conjugats amb aquest i una ampla varietat de composts hidrofòbics. Els conjugats glutatiónil-S d'aquests compostos, són més polars, lo qual facilita la seva eliminació.

Las glutatión_S_transferases citosòliques de mamífer s'agrupen dins de 3 classes independents: α , μ i π . En els últims anys els isoenzims classe π han estat causa d'interès degut al seu potencial ús com a marcadors primers en processos de carcinogènesi (s'ha vist un elevat increment en els nivells de GST dins nòduls preneoplàsics presents en fetge de rata) i a la seva relació amb l'adquisició de resistència envers drogues anticancerígenes, pesticides i herbicides.

S'ha aconseguit cristal·litzar la GST classe π de fetge de ratolí, (un dímer de 50.000 Daltons) en dues formes cristal·lines: cristalls ròmbics i cristalls hexagonals. Es van analitzar els cristalls ròmbics, obtinguts amb tampó fosfat pH=7, mitjançant diagrames de raigs X de precessió. Aquests cristalls pertanyen al grup espacial I_{222} o I_{212121} , amb una celdilla unitaria $a= 60.86 \text{ \AA}$, $b= 128.47 \text{ \AA}$ i $c= 146.36 \text{ \AA}$; $\alpha=\beta=\gamma= 90^\circ$ i $V_m= 2.92 \text{ \AA}^3/\text{dalton}$. El càlcul de la V_m indica que la celdilla presenta un dímer per unitat asimètrica.

S'ha recollit un primer espectre de difracció de raigs X a una resolució de 3 \AA utilitzant un detector de àrea "imaging-plate".

Sessió 5

**ANÀLISI de
MACROMOLÈCULES — (II)**

ESTUDIS CRISTAL·LOGRÀFICS DE DERIVATS QUÍMICS DE RIBONUCLEASA A

Lluís Boqué¹, Maria Vilanova², Claudi Cuchillo² i Ignasi Fita¹

¹ Departament d'Enginyeria Química, U.P.C.

² Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, U.A.B.

S'han cristal·litzat tres derivats de ribonucleasa A de pàncreas boví amb fosfat de piridoxal unit covalentment, respectivament, a la lisina 1 (derivat A), la lisina 7 (derivat B) i la lisina 41 (derivat C). Aquests derivats presenten diferents graus d'activitat enzimàtica respecte a la ribonucleasa nativa.

La cristal·lització s'ha dut a terme mitjançant el mètode de difusió de vapor en gota penjada, utilitzant PEG 4000 com a precipitant.

Dels derivats A i B se n'ha obtingut l'espectre de difracció de raigs X, fins a 1.85 Å i 1.8 Å de resolució, respectivament. Els cristalls obtinguts de tots dos pertanyen al grup espacial C2 i contenen dues molècules de ribonucleasa per unitat asimètrica. Els paràmetres de cel·la són, per al derivat A, $a = 101.85 \text{ Å}$, $b = 33.43 \text{ Å}$, $c = 73.61 \text{ Å}$ i $\beta = 90.2^\circ$, i per al derivat B, $a = 101.60 \text{ Å}$, $b = 33.25 \text{ Å}$, $c = 73.56 \text{ Å}$ i $\beta = 90.0^\circ$. La resolució de les estructures s'ha abordat mitjançant tècniques de reemplaçament molecular.

**ESTUDI PER DINAMICA MOLECULAR DE LA ZONA CENTRAL DEL LOOP
ANTIGENIC DEL VIRUS DE LA FEBRE AFTOSA (SEROT. C- SOCA
SANTA PAU). INFLUENCIA DEL MODEL DE SOLVATACIO**

M. Cristina Vega, Carles Alemán i Juan J. Pérez

Dept. d'Enginyeria Química .E. T. S. d'Enginyers Industrials

Diagonal 647. 08028 Barcelona

Hem realitzat un estudi mitjançant Dinàmica Molecular de la zona central del loop antigènic del FMDV. Tambè hem estudiat la influència dels diferents medis de solvatació recomanats pels autors per estudiar molècules biològiques .

INTRODUCCIO

La família dels Picornavirus presenten un gran nombre de virus patògens tant pels animals com pels humans (virus de la hepatitis A, virus de la encefalomiocarditis (FMCV), virus del refredat comú etc). El FMDV és actualment objecte de nombrosos estudis degut a les pèrdues econòmiques que ocasiona al atacar al bestiar porcí de molts indrets. Malgrat això encara no s'ha trobat una vacuna amb aplicació extensiva a tots els serotipes (1). Relacionat amb les seves característiques biològiques cal dir que són els virus portadors de RNA de menor mida i el seu diàmetre exterior mig és de 300Å. Tots els membres de la família presenten una càpside proteica amb estructura icosaèdrica constituïda per quatre proteïnes (VP1, VP2, VP3 i VP4) .

S'han realitzat estudis cristal·logràfics de tots els gèneres de la família (3). En el més recent relacionat amb el FMDV (ser. O) s'ha observat que l'anomenat loop antigènic presenta una zona de densitat difusa en el mapa de densitats electròniques amb la qual cosa no es pot saber quina estructura pot tenir el loop, amb la possibilitat de que es tracti d'un loop multiconformacional (4). Degut al seu interès biològic és de gran interès abordar el problema de forma teòrica per tal de suplementar la informació obtinguda mitjançant la difracció de raigs-X .

Nosaltres hem estudiat el ser. C (Soca Santa Pau) que és va aïllar en la localitat gironina del mateix nòm. La seqüència seleccionada (Thr-Ala-Ser-Ala-Arg-Gly-Asp-Leu-Ala) del loop antigènic del FMDV conté els residus RGD altament conservats entre tots els serotipes del FMDV, implicats en la seva activitat infecciosa (les cèl.lules

susceptibles d'infecció (posseïen receptors per aquesta seqüència) i que durant l'atac cel·lular un àtom de Ca^{2+} interacciona amb la cadena lateral del residu d'Asp (5).

MATERIALS I METODES

Per la realització d'aquest estudi hem emprat els programes ECEPP pel "build up" i el programa AMBER 3.0 per les trajectòries de Dinàmica Molecular.

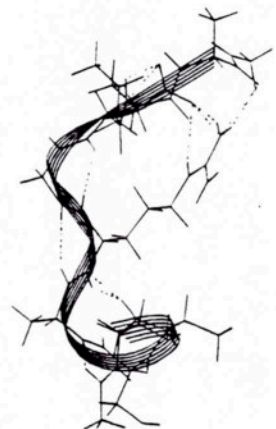
Hem utilitzat com conformacions inicials les estructures obtingudes mitjançant "build up" que consisteix en construir la seqüència utilitzant els diferents mínims conformacionals dels residus segons el mapa de Ramachandran. El rastreig conformacional s'ha realitzat emprant la tècnica anomenada "simulated annealing", la qual consisteix en refredar conformacions (310K) trobades en trajectòries de Dinàmica Molecular a altes temperatures (900K) per tal de rastregar a fons els mínims energètics locals (6).

Amés s'ha estudiat la flexibilitat de l'estructura més estable (Fig. 1) mitjançant trajectòries llargues (200ps-300ps) variant les condicions de solvatació indicades com les apropiades per simulacions amb interès biològic.

RESULTATS I DISCUSSIO

Es van obtenir com resultat del rastreig conformacional 15000 estructures de les quals representem la més estable.

Fig.1 Conformació més estable representada amb un diagrama de cintes. Aquesta estructura es caracteritza per ser una estructura rica en motius estructurals.



Es de destacar tres motius estructurals fonamentals: i) La presència d'hèlix α en el extrem N-t (fins el residu cinquè); ii) L'existència d'un γ turn entre els residus Ala(5)-Gly(7); iii) Presència de un segon γ turn entre els residus d'Arg(6)-Asp(8). Aquest últim motiu conté la seqüència RGD altament conservada entre tots els serotips del FMDV . En els conformers més estables trobats en un marge de 4 kcal/mol s'ha observat únicament petites desviacions del backbone de la conformació de menor energia.

L'estudi de la flexibilitat ha mostrat una baixa probabilitat de que l'estructura mostri grans fluctuacions respecte a la conformació més estable (Fig. 2). Al llarg de tota la trajectòria es conserva la presència del γ turn entre el residu d' Ala(5)-Gly(7).

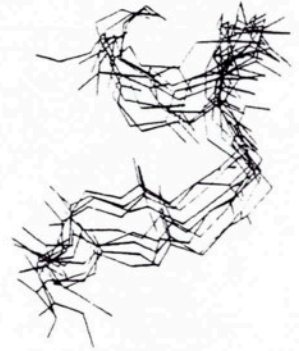


Fig. 2. - Fluctuacions mostrades respecte l'estructura més estable. Es pot observar la conservació del γ turn i les variacions respecte l'hèlix α a l'extrem N-t.

S'ha trobat una gran dependència dels perfils energètics i les geometries de les interaccions del pont d'hidrògen utilitzat per descriure la constant dielèctrica. Així la contribució electrostàtica presenta un perfil molt similar al de l'energia total quan utilitzem una constant dielèctrica independent de la distància. No obstant, quan utilitzem l'expressió dependent de la distància passa a ésser una contribució minoritària. La geometria de pont d'hidrògen obtingudes a partir d'una expressió dependent de la distància són més estabilitzades que les obtingudes a partir d'una expressió independent (Fig. 3).

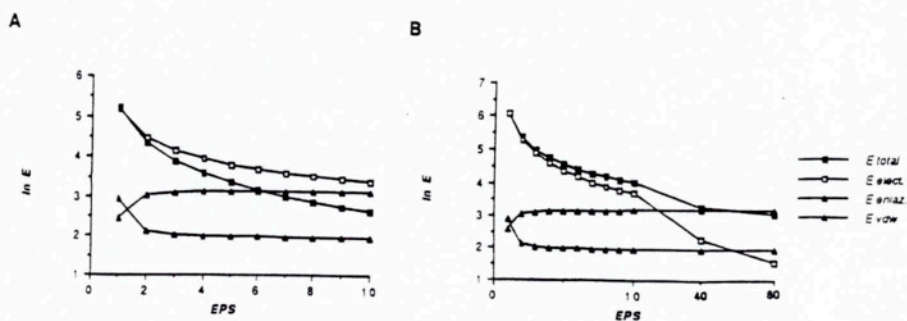


Fig. 3 Gràfic del logaritme del valor absolut de l'energia total, electrostàtica, enllaçant i de van der Waals de l'estructura objecte d'estudi, emprent: A) Una expressió de la constant dielèctrica dependent de la distància; b) Una expressió de la constant dielèctrica independent de la distància. L'energia enllaçant és desestabilitzant (positiva), i el reste dels termes són estabilitzants (negatius).

En l'actualitat estem realitzant estudis en presència explícita de molècules d'aigua. Resultats preliminars indiquen que la seqüència RGD segueix implicada en una estructura de γ turn.

BIBLIOGRAFIA

- 1) DiMarchi, R.; Brooke, G.; Galue, C.; Cracknell, V.; Doel, T. and Mowat, N. *Science* **232**, 639-641 (1986); Rouslahti, E. A. *Rev. Biochem.* **57**, 375-572 (1990).
- 2) Paul, A.V.; Schultz, A.; Pincus, S.E.; Oroszlam, S. and Wimmer, E. *Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A.* **84**, 7827-7831 (1987).
- 3) Rossmann, M.G.; Arnold, E.; Erickson, J.W.; Frankenberger, E.A.; Griffith, J.P.; Hecht, H.J.; Johnson, J.E.; Kamer, G.; Luo, M.; Mosser, A.G.; Rueckert, R.R.; Sherry, B. and Vriend, G. *Nature* **317**, 145-153 (1985); Hogle, J.M.; Chow, M. and Filman, D.J. *Science* **229**, 1358-1365 (1985); Luo, M.; Vriend, G.; Kamer, G.; Minor, I.; Arnold, E.; Rossmann, M.G.; Boegew, U.; Scraba, D.G.; Duke, G.M. and Palmenberg, A.C. *Science* **235**, 182-191 (1987).
- 4) Acharya, R.; Fry, E.; Stuart, D.; Fox, G.; Rowlands, D. and Brown, F. *Nature* **337**, 709-716 (1989).
- 5) Parry, H.; Fox, G.; Rowlands, D.; Brown, F.; Fry, E.; Acharya, R.; Logan, D. and Stuart, D. *Nature* **347**, 569-572 (1990).
- 6) Kirkpatrick, S.; Gelatt, C.D. Jr. and Vecchi, M.P. *Science* **220**, 671 (1983).

L'ELSAMICINA I LA FORMA Z DEL DNA

E. Jiménez-García^a, F. Barceló^b & J. Portugal^a

^aDepartament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Química, Universitat de Barcelona & ^bDepartament de Biologia i Ciències de la Salut, Universitat de les Illes Balears.

Recentment hem descrit, amb la tècnica de *footprinting* amb DNAsal, que la seqüència d'unió de l'antitumoral Elsamicina al DNA és un triplet que conté el parell CpG [1]. A més, l'ús d'enzims de restricció ens ha permès trobar que la unió de l'Elsamicina és afavorida quan la tercera base (en l'extrem 5') del triplet és una purina, sobretot si és una guanina [2]. Com les seqüències alternants CpG s'inclouen entre les potencialment capaces d'adoptar la conformació Z, vam considerar que la unió preferencial a aquestes regions podia ser un dels mecanismes pels quals l'Elsamicina desenvolupa la seva acció antitumoral, tot inhibint processos com ara la replicació i la transcripció, en els quals el DNA Z pot estar involucrat [3].

Així doncs, el treball ha estat centrat en el paper inhibidor de l'Elsamicina sobre la transició B-Z tant amb el poli(dG-dC) com amb el poli(dG-m⁵dC). Per estudiar-ho hem emprat diverses tècniques: canvis en l'espectre d'absorció de llum ultraviolada, digestió amb DNAsal i Dicroisme Circular. Tots els resultats porten a la mateixa conclusió: l'Elsamicina disminueix tant la velocitat de la transició B-Z com l'abast de la reacció i, a més, pot provocar un canvi d'estructura dels dos polinucleòtids des de la forma Z cap a la forma B en unes condicions que afavoreixen clarament la conformació Z. L'antibiòtic inhibeix més eficaçment la transició B-Z quan actua sobre el poli(dG-m⁵dC) que quan ho fa sobre el poli(dG-dC). El poli(dG-m⁵dC) pot adoptar la conformació Z en condicions equivalents a les trobades a l'interior de la cèl.lula; l'elevada força iònica requerida per a establir la forma Z en el poli(dG-dC) (NaCl 3.5 M) fa disminuir l'afinitat de l'antibiòtic pel DNA.

Referències:

1. Salas, X. & Portugal, J. (1991) *FEBS Lett.* **292**: 223-228
2. Párraga, A. & Portugal, J. (1992) *FEBS Lett.* **300**: 25-29.
3. Rich, A., Nordheim, A. & Wang, A.H-J. (1984) *Ann. Rev. Biochem.* **53**: 791-846

[Treball subvencionat pel FISS (92-0588)]

ESTRUCTURA "IN VITRO" DE SECUENCIAS TELOMERICAS EN DNA SUPERHELICOIDAL.

Huertas, D., y Azorín, F. Dto de Biología Molecular y celular, (CID-CSIC), Barcelona.

Los télómeros son las estructuras que se hallan al final de los cromosomas eucariotas. La función de los mismos es mantener estables los cromosomas, preservándolos de la degradación por nucleasas, y evitando la fusión entre extremos. Así mismo son los responsables de la completa replicación eucariota, evitando la pérdida de material genético en cada vuelta de replicación.

Los télómeros están constituidos por dos tipos de secuencias repetitivas: las secuencias subteloméricas y las secuencias teloméricas. Las secuencias subteloméricas son las más internas y están formadas por elementos de repetición compleja desde cientos de pares de bases hasta de kilobases. Las secuencias teloméricas son externas y están formadas por elementos de repetición simple cuya unidad de repetición comprende de 6 a 8 nucleótidos situados en tandem en una extensión que varía desde 36 pares de bases a cientos de kilobases en vertebrados. El elemento de repetición se halla muy conservado en todas las especies eucariotas con una secuencia "consensus" 5' T₁₋₃(T/A)G₃₋₄ 3'. Existe una polaridad de cadena de modo que la cadena rica en citosinas transcurre hacia el extremo 5' y la cadena rica en guaninas lo hace hacia el extremo 3'. En especies de ciliados se ha observado que la cadena rica en guaninas se prolonga en una cadena sencilla protuberante de 16-18 nucleótidos.

La caracterización estructural de oligonucleótidos de cadena sencilla ricos en guaninas ha revelado que éstas pueden establecer interacciones intra e intermoleculares estabilizadas por enlaces de tipo Hoogsteen entre el N7 de guaninas y la presencia de cationes monovalentes. A estas estructuras se les ha denominado cuartetos de Guaninas en el plegamiento intramolecular y G4-DNA en las asociaciones intermoleculares, ya que en ambos casos coexisten 4 guaninas enlazadas en un mismo plano.

En el trabajo que se presenta se ha profundizado en el análisis estructural de las secuencias teloméricas en DNA superhelicoidal. La secuencia telomérica elegida ha sido la presente en los cromosomas de todos los vertebrados, incluido el hombre, cuya unidad de repetición es **TTAGGG**.

Las secuencias teloméricas se obtuvieron a partir de oligonucleótidos sintéticos, los cuales se polimerizaron en diferentes grados de oligomerización y fueron insertados en plásmidos superhelicoidales.

El análisis estructural se desarrolló "in vitro" mediante dos tipos de ensayos: la digestión con nucleasa P1, específica de cadenas sencillas, y la utilización de reactivos químicos que modifican el DNA selectivamente.

Los resultados obtenidos en el ensayo de P1 indican que estas secuencias teloméricas adoptan una conformación alterada muy dependiente de pH, densidad superhelicoidal y tamaño, puesto que sólo se observan a pHs inferiores a 4.5, densidades superhelicoidales inferiores a -0.04 y tamaño superior a 6 unidades de repetición.

El patrón de reactividad química obtenido indica que la cadena rica en citosinas se pliega sobre sí misma con apareamientos C⁺-C, mientras que la cadena de las guaninas se estructura en diferentes dominios de conformación.

CLONATGE DE DNA NUCLEOSOMAL.

REACCIONS DE LES HISTONES AMB EL DNA MONOCADENA.

Xavier Fernández-Busquets i Joan-Ramon Daban
Departament de Biquímica i Biologia Molecular. Facultat de Ciències.
Universitat Autònoma de Barcelona.

Resum

Es presenta un mètode innovador de separació de les dues cadenes d'un fragment de DNA d'origen nucleosomal i l'ús del material obtingut en l'estudi de la dinàmica de la interacció entre les histones i el DNA monocadena.

Introducció

L'estructuració del genoma eucariòtic representa un obstacle per a la interacció del DNA amb proteïnes que intervenen en processos fonamentals com la replicació i la transcripció. Qualsevol d'aquests dos fenòmens implica el desempaquetament de la cromatina i, si més no, un canvi en la ben coneguda estructura del nucleosoma, tant a nivell de l'octàmer d'histones com pel que fa a l'estructura del DNA, la doble hèlix del qual s'ha d'obrir per exposar la cadena que ha de servir de motlle a les RNA i DNA polimerases.

Alguns treballs recents indiquen que les histones de la partícula nucli romanen associades al DNA durant la replicació (1, 2). En el procés transcripcional ha estat descrita una conformació més oberta dels nucleosomes (3) o fins i tot una desestructuració parcial amb pèrdua de H2A, H2B (4). Aquest canvi estructural pot ser degut al desplaçament que sofreix l'octàmer per part de la voluminosa RNA polimerasa, però també

a la torsió generada sobre el DNA pel pas de la maquinària transcripcional (5).

L'important paper que ha de tenir la interacció entre les histones i les regions de DNA monocatenari (curtes però nombroses) en els processos descrits i les poques dades sobre el tema (6-9) ens va dur a estudiar la dinàmica de l'associació de les histones amb el DNA monocadena (ssDNA).

Materials i mètodes

El DNA heterogeni corresponent a una preparació de nucleosomes d'eritròcits de pollastre va ser clonat en M13 i es va triar un dels clons obtinguts (NX1) en base a la seva seqüència de característiques posicionadores de nucleosomes (10). Les dues cadenes complementàries NX1(+) i NX1(-) van ser separades per un mètode que utilitza la precipitació diferencial de DNA amb polietilenglicol (veure detalls a la ref. 11). La interacció entre les histones i ssDNA i la renaturalització del DNA es va estudiar principalment mitjançant electroforesis en gels d'agarosa (1.4%) i de poliacrilamida (6%).

Resultats i discussió

Amb el DNA de NX1 (158 pb) i les cadenes (+) i (-) d'aquest fragment per separat es va estudiar la dinàmica de la interacció de les histones amb una seqüència específica de DNA d'origen nucleosomal. Els resultats van confirmar en part aquells observats amb DNA d'elevat pes molecular (12), especialment pel que fa a l'estequiometria de la interacció histona-ssDNA. Les histones s'uneixen al DNA en funció de la

longitud d'aquest expressada en nucleòtids (ssDNA) o parelles de bases (dsDNA) i no en funció de la massa de DNA. Tanmateix, ha estat observada una afinitat superior de les histones per la cadena (+) enfront de la (-). Aquest fet, en principi, podria indicar una unió preferencial de les histones a certes seqüències de ssDNA.

Per altra banda, experiments de renaturalització fets amb les cadenes (+) i (-) en presència d'histones mostren que aquestes no impedeixen la reassociació de cadenes complementàries de DNA. Aquestes propietats podrien ser útils per les funcions de la cromatina que impliquin un aparellament de bases del DNA.

Bibliografia

1. Bonne-Andrea, C., Wong, M.C. i Alberts, B.M.
Nature (1990), 343, 719-726.
2. Krude, T. i Knippers, R.
Mol. Cell. Biol. (1991), 11, 6257-6267.
3. Lee, M.-S. i Garrard, W.T.
EMBO J. (1991), 10, 607-615.
4. Jackson, V.
Biochemistry (1990), 29, 719-731.
5. Leonard, M.W. i Patient, R.K.
Mol. Cell. Biol. (1991), 11, 6128-6138.
6. Palter, K.B. i Alberts, B.M.
J. Biol. Chem. (1979), 254, 11160-11169.
7. Palter, K.B., Foe, V.E. i Alberts, B.M.
Cell (1979), 18, 451-467.
8. Caffarelli, E., De Santis, P., Leoni, L., Savino, M. i Trotta, E.
Biochim. Biophys. Acta (1983), 739, 235-243.
9. Caffarelli, E., Leoni, L. i Savino, M.
FEBS Lett. (1985), 181, 69-73.
10. Satchwell, S.C., Drew, H.R. i Travers, A.A.
J. Mol. Biol. (1986), 191, 659-675.
11. Fernández-Busquets, X. i Daban, J.-R.
BioTechniques (1992), en premsa.
12. Fernández-Busquets, X. i Daban, J.-R.
VII Jornades de Biologia Molecular, Cabrera de Mar (1990).

Treball subvencionat per la DGICYT (PB89-0305) i per una beca predoctoral a X.F.-B. del Departament d'Ensenyament de la Generalitat de Catalunya.

Sessió 6

EXPRESSIÓ GÈNICA

Construcción, clonación y expresión de un gen sintético para el inhibidor de carboxipeptidasa de patata

Miguel A. Molina, Cristina Marino, Baldomero Oliva, Xavier Daura, Francesc Canals, Enrique Querol y Francesc X. Avilés.

Institut de Biologia Fonamental i Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona)

INTRODUCCION

El ICP es una proteína de 39 residuos (Hass et al, 1979) que inhibe competitivamente a la carboxipeptidasa. Obtener ICP recombinante producido por *E. coli* es de gran interés, pues permite, una vez optimizada dicha expresión, tener grandes cantidades del mismo con el cual estudiar sus posibles aplicaciones biotecnológicas, dado el enorme interés económico e industrial de los inhibidores de proteasas (Bullock and Kristiansen, 1987). El ICP presenta el interés añadido de que recientemente se ha descubierto que inhibe la transformación tumoral inducida por radiación de células en cultivo (Billings et al, 1989). También permite aplicar al ICP técnicas de ingeniería de proteínas (Robson and Garnier, 1986) para estudiar la relación secuencia de aminoácidos-plegamiento-función.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Obtención de un gen sintético para el ICP

En primer lugar se procedió al diseño de un gen sintético para el ICP a partir de la secuencia de aminoácidos de éste. En dicho diseño se usaron los codones óptimos utilizados por *E. coli* (Sharp et al., 1988) excepto en ciertos puntos en que se usaron otros para crear puntos de corte por enzimas de restricción. Delante de la secuencia codificadora para el ICP se añadieron codones para Ile-Glu-Gly-Arg-Met. Esto se hizo para permitir que, si se decidía tal cosa, el gen pudiera expresarse como proteína de fusión (los cuatro primeros aa de la secuencia citada son el punto de corte del factor Xa, y la Met del BrCN) o en solitario (el codón Met es el de iniciación de la traducción). A ambos lados del gen se colocaron extremos cohesivos Sall.

Una vez diseñado el gen sintético, dado que tenía 150 pb, se hubieron de diseñar oligonucleótidos de menor tamaño (que pudieran ser sintetizados con los sintetizadores de oligos actuales) solapantes entre sí de forma que al reunirse pudieran hibridar entre ellos y ligarse para formar el gen completo. El diseño de los oligos se hizo de forma que los que debían hibridar presentasen la máxima complementariedad y los que no debían la mínima. También se diseñó un procedimiento para construir el gen a partir

de los oligonucleótidos en dos pasos.

A continuación se sintetizaron los oligos monohebra previamente diseñados, y se purificaron. Una vez purificados se ligaron en dos segmentos por separado según el método descrito por Frank et al. (1987). Dichos segmentos se purificaron por electroforesis en agarosa para luego ligarlos, dando lugar al gen completo, que seguidamente se purificó.

Una vez tuvimos el gen sintético purificado, se ligó al sitio Sal I del plásmido pBR322 dando lugar al vector pBR322-ICP1. A continuación se procedió a la secuenciación del gen ICP sintético. Para ello se clonó en el bacteriófago M13mp19 (Messing, 1983) y se secuenció según el método dideoxi (Sanger et al, 1977).

2. Obtención del vector pIMAM1. Expresión del ICP_r+10

Para la expresión del gen ICP sintético se eligió el vector de secreción pNIII-ompA3 (Ghrayeb et al, 1984). La razón para escoger dicho plásmido ha sido que este se ha usado para expresar un inhibidor estructuralmente similar al ICP (Maywald et al, 1988). Como dicho vector no presenta lugar de clonación Sal I y el gen ICP sintético tiene extremos Sal I, para clonarlo en el vector se tuvo previamente que convertir los extremos del gen en romos y ligarle linkers Eco RI para luego ligarlo al vector y transformar en *E. coli* HB101. Para ello, como para el resto de técnicas de DNA recombinante usadas, se siguieron los protocolos descritos en Maniatis et al (1989) y Ausubel et al (1987). Así se obtuvo un vector pNIII-ompA3 con el gen ICP colocado en el lugar de clonación EcoRI, vector bautizado como pIMAM1. De dicho vector se obtuvieron los fragmentos XbaI-HindIII y EcoRI-EcoRI y se clonaron en M13mp18. El primer fragmento contiene la secuencia codificante del péptido señal omp A y la primera parte del gen; el segundo todo el gen. Dichos fragmentos se secuenciaron y se vio que el gen ICP del vector pIMAM1 tiene la secuencia correcta y está insertado en el marco de lectura adecuado.

Se llevó a cabo a continuación un análisis sobre si la cepa HB101 (pIMAM1) expresa el gen ICP y produce ICP recombinante. Para ello se hizo crecer dicha cepa a 30°C en medio M9+0,2% casaminoácidos, se indujo la expresión del gen (por adición de IPTG 2mM) y se obtuvieron a partir de dichos cultivos tres fracciones, correspondientes a medio extracelular, espacio periplásmico y medio intracelular. Análisis inmunológicos (ELISA) usando los anticuerpos anti-ICP de conejo obtenidos y pruebas de actividad (Hass et al, 1981) nos han permitido determinar la presencia de ICP recombinante activo en los cultivos inducidos de HB101 (pIMAM 1). Dicho ICP se localiza de forma prácticamente exclusiva en el medio extracelular, a una concentración muy baja, de 30-50µg/l. Esto concuerda con lo esperado, dado que un inhibidor de tripsina estructuralmente similar al ICP fue expresado también mediante el vector pNIII-ompA3 y aparecía asimismo en el medio de cultivo (Maywald et al,1988).

El ICP recombinante, dada la secuencia del gen, del propio vector pNIII-ompA3 y el hecho de que se hubieran de añadir linkers para insertarlo en dicho vector, presentaba 10 aminoácidos extra en su extremo N-terminal respecto al inhibidor nativo, por lo que se denominó ICP_r+10.

3. Obtención del vector pIMAM3. Expresión del ICP_r

Como se describió en el apartado anterior, se había construido el vector pIMAM1 uniendo linkers EcoRI al gen sintético para el ICP y clonándolo en el sitio EcoRI del vector pNIII-ompA3 (Ghrayeb et al., 1984). De dicho vector

se obtuvieron los fragmentos Xba-Hind III (que comprende el péptido señal ompA y parte del gen) y EcoRI-EcoRI (que comprende el gen) y se clonaron en el vector M13mp18, originando los vectores M13-PCIXH12 y M13-PCIE12, respectivamente. Los fragmentos clonados en ambos vectores se

secuenciaron. Se diseñó un oligonucleótido para deleccionar el fragmento de 30 pb correspondiente a los 10 aminoácidos adicionales del ICP+10. Usando dicho oligo se realizó una mutagénesis dirigida según el método de Nakayama and Eckstein (1986) sobre el vector M13-ICPXH12, obteniendo el vector M13-ICPD2, que presentaba la delección. Dicho vector se cortó con XbaI+HindIII, el fragmento de 160 pb resultante se ligó al fragmento XbaI-HindIII de 7000 pb del vector pMAM1, originando el plásmido pMAM2. El fragmento BamHI de 7500 pb de pMAM2 se ligó al fragmento BamHI de 130 pb de pMAM1, originando el vector pMAM3. En él el primer codón del gen del ICP sigue directamente al último residuo del péptido señal de secreción ompA. El fragmento XbaI-EcoRI de pMAM3, que comprende el péptido señal ompA y el gen ICP, se clonó en M13mp18 (originando el vector M13-PCIF1) y secuenció, comprobándose que el gen tenía la secuencia correcta y estaba insertado en marco de lectura.

Para expresar el ICP recombinante sin aminoácidos adicionales (ICPr) se hizo crecer la cepa de *E. coli* MC1061 transformada con pMAM1 o pMAM3 en medio M9CAS+50 µg/ml de ampicilina, a 37°C; induciéndose la expresión del gen mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0,2 ó 2mM. 24 horas después de la inducción, los cultivos se centrifugaron y se recuperó el sobrenadante para cuantificar la cantidad de ICPr presente en él. Dichas cuantificaciones se realizaron mediante pruebas de actividad inhibitora de carboxipeptidasa (Hass and Ryan, 1981) y tests ELISA usando los anticuerpos anti-ICP de que se disponía.

La expresión del gen ICP en pMAM1 produce un ICP recombinante con 10 aminoácidos adicionales en el N-terminal (ICPr+10), mientras que en pMAM3 produce un ICP recombinante sin residuos adicionales (ICPr). Ambas formas se encuentran casi exclusivamente en el medio de cultivo. Su producción tiene lugar durante la fase exponencial del crecimiento de los cultivos de *E. coli*.

A continuación se ensayaron diversas cepas de *E. coli*, así como diferentes condiciones de cultivo para optimizar la producción de ICPr. Las cepas MC1061 y HB101 resultaron ser las más productivas, mientras que las TG1 y JM109 producen diez y tres veces menos ICPr, respectivamente. Respecto a las condiciones de cultivo, se ensayaron distintas fuentes de carbono (glicerol, glucosa, lactosa) a diferentes concentraciones, hallándose que la máxima producción de ICPr se obtenía a un 0,5% de glicerol (1,5 a 2,5 µg ICPr/ml de cultivo). La mejor temperatura para dicha producción son 37°C, y no hay diferencias significativas en la misma en cultivos inducidos con 0,2 a 2mM IPTG 0 a 4h después de iniciarse el cultivo.

4. Purificación del ICPr. Homogeneidad y caracterización del ICPr purificado

Se ha diseñado un protocolo para purificar el ICPr a partir de cultivos de *E. coli* diferente a los previamente descritos para la purificación de ICP natural a partir de patata (Hass et al., 1979; Pearce and Ryan, 1983).

Para dicha purificación se partió de un cultivo de 0,5 l de *E. coli* MC1061(pMAM3). Este se centrifugó y el sobrenadante se concentró usando cartuchos Sep-Pak C18. El material resultante se cromatografió en una columna TSK-DEAE usando un sistema de FPLC. Las fracciones con actividad inhibitora de carboxipeptidasa se concentraron usando de nuevo

un cartucho Sep-Pak y el material resultante se sometió a HPLC usando una columna C4 (fase inversa), eluyendo el ICPr en un solo pico homogéneo. En conjunto, se obtuvieron 0,5 mg de ICPr aparentemente homogéneo a partir de los 0,5 l de medio con un rendimiento del 52% y una purificación de 16 veces.

La pureza de la preparación final de ICPr se verificó sometiendo una muestra del mismo a HPLC usando una columna C4 analítica. Se obtuvo un solo pico, demostrándose que dicha preparación era pura.

Se determinó la K_i del ICPr de acuerdo con el método de Henderson (Henderson, 1972), que resultó ser de 1,8 nM; valor que está dentro del rango de K_i previamente descrito para el ICP-II salvaje (1,5 a 2,7 nM; Hass and Ryan, 1981). Asimismo se ha hallado la masa molecular del ICPr mediante espectrometría de masas, y ha resultado ser de 4295, exactamente igual a la masa molecular esperada a partir de la secuencia de aminoácidos del ICPr.

5. Producción del ICPr en fermentador

Actualmente se ha puesto a punto en nuestro laboratorio un sistema de producción del ICPr a gran escala mediante el uso de fermentador (LH serie 210 modelo direct drive sistem), obteniéndose una producción de 10 a 15 mg ICPr/l. Para su purificación se usa el protocolo descrito con el correspondiente escalado.

BIBLIOGRAFIA

- Ausubel, F.M. et al (1987) "Current Protocols in Molecular Biology". John Wiley and sons, New York
- Billings, P.C. et al. Carcinogenesis 10 (1989) 687
- Bullock, J. and Kristiansen, P. In "Basic Biotechnology" (1987). Academic, London.
- Ghrayeb, J. et al. EMBO J. 3 (1984) 2437
- Frank, R. et al. Methods in Enzimology, 154(1987):221-249
- Hass, G. H. et al. Plant Physiol 64 (1979) 1022
- Hass, G. H. and Ryan, C. A. Meth Enzimol 80 (1981) 778
- Henderson, P.J.F. Biochem. J. 127(1972) 321-333
- Maywald, F. et al (1988) Gene 68:357-369
- Messing, J. (1983). Meth Enzimol 101:20-78
- Nakamaye, K. L. and Eckstein, F. Nucl Acid Res 14 (1986) 9679
- Pearce, G. and Ryan, C. A. Analyt Biochem 130 (1983) 223
- Robson, B. and Garnier, J. "Introduction to Proteins and Protein Engineering". Elsevier.
- Sanger, F. et al. Proc Natl Acad Sci USA 74 (1977) 5463
- Sharp, P.M. et al. Nucleic Acid Res 16(1988):8207-8211 Maniatis, T. et al (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Second Edition. Cold Spring Harbor, New York.
- Taylor, J.W. et al (1985). Nucl Acids Res 13:8749-8785

CLONATGE D'UN cDNA DE RONYO QUE INDUEIX, EN OOCITS DE XENOPUS, EL SISTEMA $b^{0,+}$ DE TRANSPORT D'AMINOACIDS. UNA NOVA FAMÍLIA DE TRANSPORTADORS D'AMINOACIDS A MAMÍFERS.

Joan Bertran*, Josep Chillarón*, Andreas Werner#, Simona Magagnin#, Jürg Biber#, Xavier Testar*, Antonio Zorzano*, Heini Murer# i Manuel Palacín*.

* Departament de Bioquímica i Fisiologia, Universitat de Barcelona.

Physiologisches Institut der Universität Zürich.

Hem aïllat un clon de cDNA d'una llibreria d'expressió de ronyó de conill per expressió funcional de transport de L-alanina i L-arginina en oòcits de Xenopus laevis. El RNA sintetitzat a partir d'aquest clon indueix un únic component de transport per aminoàcids dibàsics i neutres. Aquesta activitat de transport correspon al sistema $b^{0,+}$ descrit funcionalment en blastocists de ratolí. El mRNA de rBAT (related to $b^{0,+}$ amino acid transporter) es troba fonamentalment a escorça renal i mucosa intestinal. Així, mRNA de mucosa intestinal indueix activitat de transport del sistema $b^{0,+}$ a oòcits que és sensible a la deplecció per hibridació amb un oligonucleòtid "anti-sense" de rBAT. rBAT codifica per una proteïna de 77.8 kD que sembla una glicoproteïna de membrana de tipus II amb un sol segment transmembrana i 7 llocs putatius de glicosilació cap a l'extrem C-terminal després del segment putatiu de transmembrana. Traducció *in vitro* del RNA de rBAT en presència de microssomes pancreàtics ha donat lloc a una proteïna glicosilada sensible a endoglicosidasa H. El marcatge de la proteïna (^{35}S metionina) a l'oòcit evidencia diferents estats de maduració sensibles a incubació amb tunicamicina i interacció per ponts disulfur amb una altra subunitat de la mateixa o una altra proteïna. La proteïna codificada per rBAT presenta una homologia significativa amb una altra glicoproteïna de membrana de tipus II, la cadena pesada de l'antigen de superfície 4F2 (4F2hc). Quan hem injectat RNA corresponent al 4F2hc hem observat que també indueix transport d'aminoàcids bàsics i neutres però mitjançant un altre sistema de transport que s'ha definit funcionalment com a y^+ . Els nostres resultats ens permeten proposar que una nova família de glicoproteïnes de membrana de tipus II (formada per rBAT i 4F2hc) està involucrada en el transport d'aminoàcids, ja sigui com a activadors molt específics, o com a components dels sistemes de transport d'aminoàcids.

Obtención de Mutantes de la Procarboxipeptidasa B de Pancreas Porcino en su Segmento de Activación

Villegas V.¹, Vendrell J.¹, Catasús LI.¹ y Avilés F.X.^{1,2}

¹ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular Fac. Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona
² Instituto de Biología Fundamental. Universidad Autónoma de Barcelona

Resumen

Mediante la utilización de fragmentos obtenidos por PCR y oligonucleótidos sintéticos, se ha construido una batería de mutantes en la región del segmento de activación de la procarboxipeptidasa B. Ello permitirá contrastar las hipótesis sobre la relación estructura-función, obtenidas a partir de datos estructurales y del mecanismo de activación de este proenzima.

Introducción

La procarboxipeptidasa B (PCPB) es la forma inactiva en la que se sintetiza y secreta la carboxipeptidasa B (CPB) en el páncreas. Su estructura tridimensional es conocida, tanto en el proenzima [1], como en su segmento de activación (SaB) aislado [2]. Así mismo, se conoce su proceso de activación triptico [3] que muestra la particularidad de que el SaB liberado no mantiene la capacidad inhibitoria mostrada por su forma homóloga Sa A, liberado en el proceso de activación de la procarboxipeptidasa A (PCPA) [4]. Entre ambos procesos se observan una serie de diferencias que pueden ser explicadas en base a motivos estructurales diferenciales entre ambos proenzimas [5]. Las hipótesis derivadas para la relación estructura-función, serán contrastadas gracias a la obtención de los siete mutantes aquí descritos.

Materiales y métodos

Materiales

- cDNA de PCPB obtenido mediante amplificación por PCR.
- *E. coli* MM294 (R⁻ M⁺)
- Oligonucleótidos sintetizados en un sintetizador de DNA ABI 380B (Applied Biosystems)
- PCR "termocicler" PEKIN ELMER CETUS
- "GeneAmp PCR Reagen Kit"
- Secuenciador de DNA automático por fluorescencia (Applied Biosystems)
- Enzimas de restricción, T4 ligasa, T4 polinucleótido kinasa y fosfatasa alcalina (Boheringer Mannheim).
- Kit de purificación de DNA Plasmídico (Qiagen)
- "Oligonucleotide purification columns" (Applied Biosystem)
- "PD10 Columns" (Pharmacia)
- Geles de acrilamida con gradiente 4-20 % en presencia de TBE (Schleicher & Schuell)

Purificación de los oligonucleótidos

El tamaño de los oligonucleótidos a utilizar como "primer" en PCR rondaba los 40 nucleótidos, por lo que se purificó en columna utilizando el kit "Oligonucleotide purification Columns" (OPC, Applied Biosystems). Sin embargo, los oligonucleótidos diseñados para mutageneizar por cassette contenían 73 nucleótidos, por lo que fue necesario purificar mediante geles de acrilamida al 12 % en condiciones disociantes (7 M urea), seguido de cromatografía en columna PD10 (Pharmacia).

Hibridación y fosforilación de los oligonucleótidos sintéticos

El oligonucleótido disuelto a 0.1 µg/µl en TE se calentó a 70 °C durante 30 min., se combinaron 50 µl de cada par de homólogos y se repitió el tratamiento de desnaturalización. El atemperamiento a 37 °C se realizó en 2 h, momento en el que se trató con Kinasa durante 30 min. Con ello se consiguieron fragmentos de dsDNA codificantes para cinco mutantes: Gln 89 / Glu, Gln 89 / Ile, Gln 89 - Val 94 / secuencia homóloga en PCPA, Val94 / Ser y el doble mutante Arg 93 & 95 / Gln.

"Polymerase Chain Reaction"

Esta técnica ha sido utilizada para la obtención de los mutantes que no permitían la introducción de oligonucleótidos sintéticos por falta de dianas de restricción flanqueantes suficientemente cercanas.

La primera mutación realizada fue silenciosa e introdujo dos dianas de restricción (Xho I y Pvu I) que facilitaron la clonación posterior de oligonucleótidos sintéticos portadores de mutaciones específicas.

La segunda mutación realizada fue la delección de una región de cuatro residuos (presentes en la forma B pero no en la A) mediante el diseño de "primers" carentes de esta región. Una vez comprobado la introducción correcta de la mutación por secuenciación, se utilizó este DNA como molde para obtener una tercera mutación que incluía la sustitución de residuos laterales.

La concentración del cDNA-PCPB molde utilizada en la reacción de amplificación fue de 10 pg/µl, mientras que la de los "primers" fue de 1 µM. Las temperaturas de hibridación fueron calculadas con el programa "University of Wisconsin, genetics computer group" y en todos los casos se utilizaron 100 µl de reacción y 30 ciclos.

Purificación de los productos de PCR

Para productos menores de 200 pb se utilizaron geles de acrilamida con gradiente 4-20 % en presencia de TBE (S&S) para poder resolver la banda producto correspondiente al "primer-dimer". Para productos mayores se utilizó la purificación en agarosa al 1 %.

Concatamerización de los productos de PCR

Se hizo un tratamiento con T4 polimerasa durante 15 min para obtener extremos romos, seguido de la fosforilación y ligación a 14 °C durante toda una noche. Una vez comprobada la eficiencia de la reacción mediante agarosa al 1 %, se eliminaron los enzimas contenidos en el medio mediante extracción fenólica y se restringió con los enzimas adecuados.

Clonación y secuenciación

Los fragmentos de DNA portadores de mutaciones se clonaron en el vector de expresión pHDM 208 conteniendo el cDNA-PCPB completo. Se realizaron análisis de restricción previamente a la secuenciación en un "ABI syntetizer". Todos los mutantes han sido comprobados por secuenciación.

Resultados y Discusión

Purificación de los oligonucleótidos

Aunque la técnica de OPC sea más rápida que la purificación en gel, muestra el inconveniente de que no resuelve oligonucleótidos de longitud mayor de 50 mer. En el diseño de los oligonucleótidos sintéticos para las mutaciones cassette se minimizó la longitud de los mismos introduciendo las dianas de restricción Xho I y Pvu I flanqueantes de la región Gln89-Arg95 que permitieron la mutagénesis mediante oligonucleótidos sintéticos de 73 pb.

Clonación de los mutantes

La clonación de los oligonucleótidos sintéticos fue sencilla gracias a la síntesis simultánea de adaptadores para dos enzimas de restricción distintos que permitieran un único posicionamiento del fragmento a clonar.

En cambio, la clonación de los fragmentos obtenidos por PCR, requirió de la concatamerización de los mismos previamente a la digestión doble que originaría un fragmento posicionable. Con ello se consiguió aumentar la eficiencia de restricciones realizadas en el extremo del producto de PCR.

Mutantes delección

En la PCPB existe una región, Pro 40 - Lys 47, que no guarda homología con la zona correspondiente a la PCPA y en la que además se encuentran cuatro residuos, Val 43 - Ile 46, no presentes en PCPA. Esta región de la PCPB es conocida como lazo inhibitorio por que se piensa que está implicada en la inhibición en el proenzima. La delección y sustitución simultánea de esta región no pudo ser realizada directamente por PCR sobre el cDNA-PCPB salvaje que se usó como molde debido a que el número de desapareamientos no permitió la hibridación de los "primers". Por ello se construyó el mutante delección y se usó este como molde en la mutagénesis por PCR del mutante delección con sustituciones laterales.

Mutantes Gln 89

La Gln 89 de la PCPB, está implicado en un puente de hidrógeno establecido con el centro activo del enzima. Se han construido tres mutantes de este residuo:

- Gln 89 / Glu: Se espera la formación de un puente salino.
- Gln 89 / Ile: Destrucción de la interacción.
- Gln 89 - Val 94 / secuencia homóloga en PCPA: Además de la formación del un puente salino, se insertan cuatro residuos, Gln 89-Phe 90, que no se encuentran en la forma B pero si en la A. Esta región que se pliega en hélice α de mayor longitud en la PCPA, parece ser la responsable del mantenimiento de la interacción SaA-CPA después de la acción triptica.

Mutantes en el C-terminal del SaB

El SaB una vez liberado por acción triptica, sufre proteólisis C-terminal por la CPB recién generada. Se han construido dos mutantes en esta región:

- Arg 93 & 95 / Gln: La Arg 95 es la diana de la acción triptica, mientras que la Arg 93 puede ser una diana secundaria. Con este mutante se pretende ensayar la capacidad de la tripsina para activar por acción sobre una tercera diana, Arg 83, que no parece ser accesible en el proenzima aunque si que lo es en el SaB liberado.
- Val 94 / Ser: Este residuo es liberado por acción carboxipeptidásica. Con este mutante se pretende parar la proteólisis C-terminal y demostrar la incapacidad del SaB para mantenerse unido al enzima.

Expresión de los mutantes

Se pretende expresar estas PCPB mutantes en *Saccharomyces cervisiae*, mediante el sistema del factor α [6].

Bibliografía

- [1] Coll M., Guasch A., Avilés F.X. & Huber R. (1991) EMBO J. 10, 1-9.
- [2] Vendrell J., Billeter M., Wider G., Avilés F.X. & Wüthrich K. (1991) EMBO J. 10, 11-15.
- [3] Burgos F.J., Salvà M., Villegas V., Soriano F., Méndez E. & Avilés F.X. (1991) Biochemistry 30, 4282-4089.
- [4] Vendrell J., Cuchillo C.M. & Avilés F.X. (1990) J.Biol.Chem. 265, 6949-6953.
- [5] Vendrell J., Guasch A., Coll M., Villegas V., Billeter M., Wider G., Huber R., Wüthrich K. & Avilés F.X. (1992) Biological chemistry Hoppe Seyler (En prensa)
- [6] Brake et al. (1984) Proc. Nat. Aca. Sci. USA 81, 4642-4646.

ACTIVACIO TRANSCRIPCIONAL DEL GEN DE LA HISTONA H1°
AL SNC DE RATOLINS TRANSGENICS

L. Ponte, M. Monzó*, J. L. Jorcano#, A. Alonso+ and P. Suau.
Dpt. de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Ciències UAB (Barcelona). *Dpt. de Anatomia de la Facultat de Medicina UB (Barcelona). #CIEMAT (Madrid) +Institute of Cell and Tumor Biology, German Cancer Research Center (Heidelberg) Germany.

Per tal de poder estudiar l'expressió espacial i temporal del gen de la histona H1° en el sistema nerviós central, s'han obtingut línies de ratolins transgènics. En aquest ratolins s'ha introduït una construcció gènica formada per la regió 5' flanquejant (3.141pb) del gen de la histona H1° de ratolí i la zona codificant del gen Lac Z d'E. coli. El cervell i el cervellet han estat examinats mitjançant la tinció de la β -gal a diferents moments després del naixement. El dia 9 després del naixement ha estat el primer dia que s'observa tinció, sobretot a la capa granular externa i interna del cervellet, a la formació hipocampal (gyrus dentatus i stratum-granulosum) i a les primeres capes de l'escorça cerebral. El nivell d'expressió s'incrementa fortament a partir d'aquest dia. En el dia 12, després del naixement s'observa fortament tenyit un nucli hipotalàmic. Des del dia 15, l'expressió s'extén a les altres capes de l'escorça cerebral. En cap dels dies estudiats s'observa tinció a les cèl.lules de Purkinje. L'activació postnatal del promotor de la histona H1° en el SNC coincideix amb la diferenciació terminal de les neurones, i no està relacionat amb la determinació neuronal, la qual té lloc fonamentalment abans del naixement. La coincidència de l'acumulació de la histona H1° a les neurones d'escorça cerebral amb l'activació transcripcional dels transgens indique que l'acumulació en neurones diferenciades té un component transcripcional.

UTILITZACIÓ DE VECTORS D'EXPRESSION EN *E.coli* PEL CLONATGE DE REGIONS VARIABLES D'ANTICOSSOS

E. Rosell, A. Gòmez, J. Piulats
Laboratori de Bioinvestigació, Merck-Igoda.

Resum

La humanització d'anticossos monoclonals murins mitjançant la creació d'anticossos quimèrics murins-humans, millora la possibilitat de que aquests puguin ser utilitzats com agents terapèutics efectius en la teràpia del càncer.

S'han clonat, després d'una amplificació per la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), les regions variables corresponents a les cadenes pesants i lleugeres d'un anticòs monoclonal murí amb activitat anti-gangliòsid GD3 en vectors d'expressió en *E.coli*. Aquests vectors contenen les regions constants humanes gamma 1 i kappa 1, per tant, els bacteris produiran el fragment Fab de l'anticòs quimèric.

Introducció

Els anticossos monoclonals produïts contra determinats antigens poden ser utilitzats en teràpia contra el càncer. Els anticossos monoclonals murins presenten però alguns inconvenients com són la seva immunogenicitat (resposta anti-globulina contra l'anticòs subministrat) en humans i la seva poca capacitat, en molts casos, d'activar convenientment les funcions efectores (citotoxicitat) (1).

La producció d'anticossos humanitzats, on la part variable prové de l'anticòs murí i la part constant correspon a una immunoglobulina humana, solventa aquests problemes. A més a més, molts dels híbrids produeixen anticossos específics, però són de l'isotip menys interessant: l'IgM. La tecnologia molecular permet produir anticossos monoclonals de l'isotip que més interressi. L'IgG1 humana s'ha demostrat (2) com l'isotip més efectiu com a mitjançer de la citotoxicitat (cel.lular o activant el complement).

Les regions variables de la cadena pesant i lleugera de l'anticòs 136 2A10 han estat amplificades per PCR utilitzant "primers" específics que introdueixen llocs de restricció adients per a dur a terme el posterior clonatge en els vectors d'expressió.

Material i mètodes

Es treballà amb l'anticòs monoclonal murí anomenat 136 2A10 produït en el nostre laboratori després d'una fusió de cèl.lules de melsa de ratolí immunitzat amb les cèl.lules de

melanoma WM-164 amb la línia de mieloma murí HLI-Friendly . Aquest anticòs monoclonal, de l'isotip IgM, presentà una alta afinitat pel GD3 i una gran reactivitat contra cèl.lules de melanoma humanes.

Es preparà l'ARN (3) i l'ADnc de primera cadena (4) utilitzant un oligonucleòtid dT₁₃ com a "primer".

Es van dissenyar un conjunt de "primers" per amplificar les regions variables murines de les cadenes pesants i lleugeres. Aquests "primers" (Taula 1) van ser dissenyats per tal de que hibridessin en les regions estructurals 1 i 4 (FR1 i FR4) d'ambdues cadenes (5 i 6). Aquests oligonucleòtids van ser sintetitzats en un sintetitzador Applied Biosystems 391 i purificats mitjançant una cromatografia en fase reversa utilitzant un C₁₈.

Per a l'amplificació mitjançant la PCR, es va utilitzar una barreja de reacció de 100 µl que contenia: 0,5 o 1 µl de l'híbrid ARN-ADnc, 50 pmol de cadascun dels "primers" 3' i 5', 200 µM de cada dNTP, 10 mM Tris -HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ i 2 U de Taq polimerasa (Cetus). Les mostres es sotmeteren a 25 cicles (94°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min) després d'una desnaturalització inicial a 98°C durant 5-10 min utilitzant un bloc tèrmic programable. Una desena part del producte de la PCR va ser analitzada en un gel al 2% d'agarosa.

<u>"primers" cadena pesant</u>	
VH1BACK (22-mer) Pall:	
5'- AGGT(C/G)(A/C)A(A/G)CTGCAG(C/T)	
AGTC(A/T)GG-3'	
VH1FOR2 (32-mer) Bat EII:	
5'-TGAGGACGGTGCACCGTGGTCCCTTGGCCCC-3'	
<u>"primers" cadena lleugera</u>	
VK2BACK (24-mer) Sao I:	
5'-GACATTGAGCTGACCCAGTCTCCA-3'	
VKFOR (24-mer) Xho I:	
5'-CCGTTTCAGCTCGAGCTTGGTCCC-3'	

taula 1

Es van utilitzar dos vectors capaços d'expressar el fragment Fab en *E.coli* basats en el pUC 18 (7). El vector FVHD1.3II va ser dissenyat per a clonar les regions variables de les cadenes pesants, mentre que el FVKD1.3II ho va ser per a rebre les regions variables de les cadenes lleugeres (Figura 2). Els vectors contenen la seqüència pel pèptid senyal Pel B (8), un lloc de clonatge múltiple i la seqüència codificant pel fragment Fd de l'anticòs D1.3 (9 i 10). El vector per a les cadenes pesants contenia la regió constant CH1 de la gamma 1 humana (11). El vector per a les cadenes lleugeres contenia la regió constant kappa humana íntegra (12).

Els productes resultants de la PCR foren purificats i digerits exhaustivament amb els enzims adients (PstI i BstEII per als productes de la cadena pesant i SacI i XhoI per els productes de la cadena lleugera). Els productes de la PCR digerits i purificats foren clonats en els vectors que també

havien estat digerits i purificats. Els productes de la lligasa, cadenes pesants i lleugeres, van ser introduïts en cèl·lules *E. coli* TG1 per electroporació. Les dues genoteques (FVH i FvL) es van crivellar utilitzant la PCR (13). De diversos clons recombinants es va preparar el DNA plasmídic de doble cadena (14) i es va seqüenciar utilitzant el mètode de la terminació per dideoxi-nucleòtids (15).

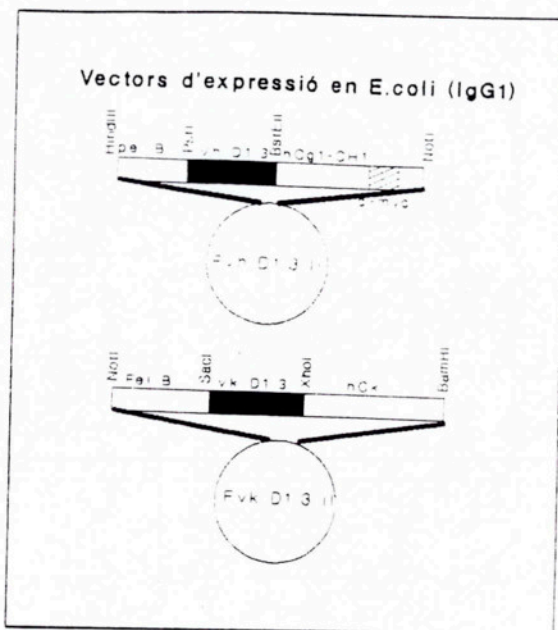


Figura 2

Resultats i discussió

La figura 4 mostra el resultat d'una amplificació mitjançant la PCR. Els productes corresponents a les regions variables van ser al voltant de 300 pb, mentre que en amplificar el fragment Fd es van obtenir bandes de 700 pb.

Figura 3: Anàlisi electroforètica dels productes de la PCR en gel d'agarosa al 2%. Carrers 1 i 11: marcador 1Kb. Carrer 2 control positiu (500 pb). Carrils 3 a 5 amplificació del fragment Fd: blanc i cadena pesant respectivament. Carrers 7 a 9 amplificació de les regions variables: blanc, cadena pesant i cadena lleugera. Carrer 10: marcador X174-HaeIII.

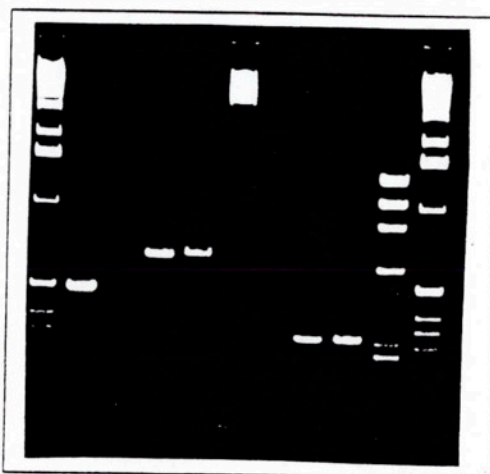


Figura 3

En la PCR, la rampa de temperatura entre els passos d'hibridació i extensió de la cadena va ser allargada fins a 2,5

seg/°C, mentre que en els altres passos del cicle el canvi de temperatura per a passar d'una a altre fou de 0.5 seg/°C. Aquest fet, juntament amb una temperatura d'hibridació elevada (60°C), millorà la fidelitat de la unió dels "primers" i disminuï els errors de la polimerasa.

Després de l'amplificació els fragments resultants van ser purificats, ja que l'exces de "primers" dificulta enormement l'activitat de les endonucleases de restricció i disminueix l'eficiència del clonatge. Així mateix, fou necessari després de les digestions tornar a purificar els productes d'interès.

L'eficiència de transformació utilitzant cèl.lules TG1 i electroporació fou de 5×10^8 . Es preparà el DNA plasmídic de diversos clons positius, seqüenciant-ne uns quants per a poder detectar possibles errors introduïts per la Taq polimerasa. Per a la cadena pesant no s'obtingué cap clon amb la seqüència completa de la regió variable, indicant la presència de dianes internes per als enzims PstI o BstEII. Per tal de clonar tota la seqüència corresponent al fragment variable de la cadena pesant, el producte de la PCR amb extrems roms fou clonat en pUC18-SmaI.

La seqüència codificant pels aminoàcids de les regions variables de les cadenes pesants i lleugeres de l'anticòs 1362A10, fou comparada amb altres regions variables murines i classificades segons Kabat (16). La regió variable de la cadena pesant correspon al grup murí IIA, presentant en les regions estructurals una elevada homologia amb les seqüències consensus. La regió variable de la cadena lleugera té l'estructura d'una cadena kappa murina del grup VI.

Bibliografia

- (1) Shawler et al., J.Immunol.,135:1530-1535, 1985
- (2) Bruggemann et al., J.Exp.Med., 166:1351-1361,1987
- (3) Chirgwin et al., Biochemistry, 18:5294-5299, 1979
- (4) Gubler and Hoffman, Gene, 25:263-265, 1983
- (5) Clackson et al., Nature, 352:624-628, 1991
- (6) Orlandi et al., PNAS.USA, 86:3833-3837,1989
- (7) Ward et al., Nature 341:544-546, 1989
- (8) Better et al., Science, 240:1041-1043,1988
- (9) Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536, 1988
- (10) Amit et al., Science, 233:747-754, 1986
- (11) Takahashi et al., Cell, 29:671-679, 1982
- (12) Rabbitts et al, Curr.Top.Microbiol.Immunol., 113:166-171, 1984
- (13) Güssow and Clackson, Nucl.Acids Res., 17:4000, 1989
- (14) Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989
- (15) Sanger et al., PNAS. USA, 74:5463-5467,1977
- (16) Kabat et al., Sequences of immunological interes, 4st edition, US Governement Printing Offices, 1987

CANVIS A L'EXPRESSIONI DELS GENS I I II DE LA CALMODULINA EN EL CERVELL DE RATA, PRODUITS PEL NEUROTÒXIC LINDANE.

Sònia Barrón, Josep M^a Tusell[†] i Joan Serratosa

Dept. Farmacologia i Toxicologia; [†]Dept. Neuroquímica. CID-CSIC. Jordi Girona 18-26. 08034 Barcelona.

RESUM

Hem estudiat, en el cervell de rata, l'expressió de dos gens diferents que codifiquen exactament per la mateixa seqüència d'aminoàcids de la calmodulina. Hem amplificat les sondes de cDNA per aquests gens i mitjançant Northern blots hem detectat canvis en la seva expressió en escorça cerebral, després d'administrar l'agent neurotòxic convulsivant lindane (γ -hexaclorciclehexà). Aquests canvis es produeixen a les poques hores d'ésser administrat el lindane. Es manifesten com una disminució de l'activitat transcripcional i sembla que hi hagi una relació dosi-resposta.

INTRODUCCIÓ

El lindane, isòmer γ del hexaclorciclehexà, és un potent plaguicida ampliament emprat i que també té aplicacions en veterinària i medicina. S'ha demostrat que aquest compost és neurotòxic a totes les espècies animals estudiades; concretament en humans i altres mamífers provoca hiperexcitabilitat, tremolors i convulsions (Joy, 1982; Wooley et al., 1985; Tusell et al., 1987). Diversos autors han proposat el canal de clor lligat al receptor GABA_A com a lloc d'acció del tòxic (Lawrence i Casida, 1984; Abalis et al., 1985). Nogensmenys diferents estudis suggereixen que també poden haver-hi altres mecanismes d'acció (Bloomquist et al., 1986). En diversos treballs hem demostrat que el lindane és l'únic isòmer del hexaclorciclehexà que activa l'expressió del c-fos. En un recent treball hem demostrat que tant el lindane com el BAY K provoquen un augment de la calmodulina al nucli de les neurones al cap d'una hora de la seva administració (Vendrell et al., 1992). En condicions normals molts processos cel·lulars són regulats pels nivells de Ca²⁺ presents al citosol, el qual no actua amb la seva forma iònica lliure, sino lligat a determinades proteïnes. La calmodulina (CaM) és la principal proteïna acceptora de Ca²⁺ en cèl·lules no musculars (Means et al., 1982). Fins ara s'han clonat del genoma de rata tres gens diferents que codifiquen per la mateixa proteïna (Nojima 1989): CaM I que s'expressa en dos mRNAs provinents de senyals de poliadenilació alternatives (1,7 i 4 kb), CaM II (1,4kb) i CaM III, igualment amb dos mRNAs (0,8 i 2,3 kb). En aquest treball presentem un estudi de l'expressió dels gens CaM I i CaM II com a resposta a l'administració del lindane.

MATERIAL I MÈTODES

A) Obtenció de sondes

Les sondes específiques dels gens CaM I i CaM II emprades en aquest treball, han estat amplificades a partir dels cDNAs insertats en un plàsmid pUC. Posteriorment s'han purificat digerint-les amb l'enzim de restricció Bam HI.

B) Tractament dels animals

El lindane ha estat dissolt en oli d'oliva i administrat oralment mitjançant sonda intragàstrica. Les rates control han estat administrades amb oli d'oliva. Els animals s'han decapitat a diferents temps post-administració. Les escorçes han estat disseccionades ràpidament i congelades a -80°C per la posterior purificació del RNA.

C) Aïllament del RNA i Northern blots.

L'obtenció del RNA s'ha fet segons el mètode de LiCl-urea (Gubits, et al., 1989). Les diferents mostres de RNA s'han fet correr en un gel d'agarosa al 1,2% i s'han transferit a una membrana de nylon. La hibridació s'ha fet tota la nit amb sondes marcades amb $[^{32}\text{P}]\alpha\text{-dCTP}$ (Amersham) seguint el mètode Oligo-labeling (Pharmacia). Les membranes han estat rentades amb diferents condicions d'astringència segons la sonda emprada i exposades dos dies a -80°C .

C) Anàlisi dels resultats

Com a control tots els northern han estat hibridats amb una sonda del gen de l'actina. L'anàlisi de les bandes ha estat feta amb un Densitòmetre Laser (LKB). S'han comparat els quocients dels valors d'absorbància de les bandes corresponents a la CaM partits pels valors d'absorbància de les bandes de l'actina.

RESULTATS

Per poder caracteritzar l'acció del lindane sobre l'expressió dels gens de la calmodulina hem dut a terme una corba de temps, així com un estudi dosi-resposta. A la figura 1 (B,C) es presenten els Northern de CaM II i de la actina corresponent que procedeixen del mateix gel després de tractar als animals amb una dosi convulsiva de lindane (30 mg/Kg pes corporal). A la Figura 2 es mostren els resultats

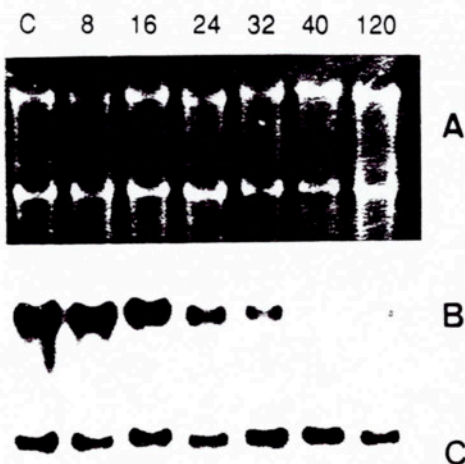


Figura 1. Expressió de CaM II. Els números indiquen les hores després de l'administració de lindane (30 mg/kg pes corporal). A: càrrega del gel; B: CaM II; C: Actina.

de les diferents dosis estudiades al llarg del temps. A dosis no convulsives ens trobem en dues situacions: a 10 mg/kg de pes corporal, dona un increment significatiu de l'expressió del gen CaM II a partir de les 24 hores de l'administració del lindane. Aquest increment es manté a les 40 hores de l'administració: a 20 mg/kg, no hi ha canvis significatius de l'expressió. A dosi convulsiva (30 mg/Kg) hi ha una forta disminució dels valors basals de transcripció que es comença a detectar a les 24 hores i es manté fins a les 40.

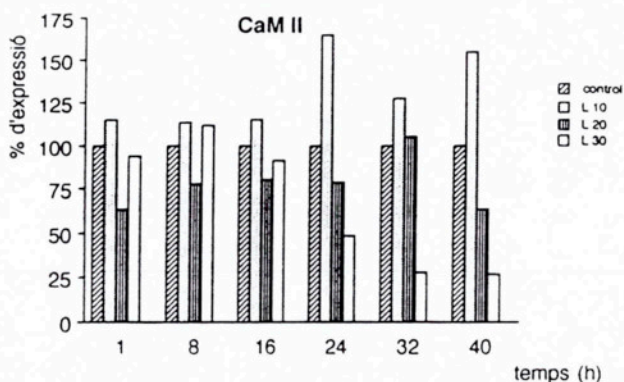


Figura 2. Expressió de CaM II. L 10, L 20, L 30 indiquen les dosis de lindane (mg/kg) a diferents temps (hores) després de l'administració. L'ordenanda indica el % respecte els valors control.

A la figura 3 es veu un Northern del gen CaM I corresponent als animals tractats a dosi convulsiva. Es poden observar les dues bandes descrites (1,7 i 4 kb). En aquest cas, la disminució d'expressió la tenim principalment a la banda de 4 kb, tot i que , tal com mostra la figura 4, els valors relatius de densitat òptica de les dues bandes varien poc.

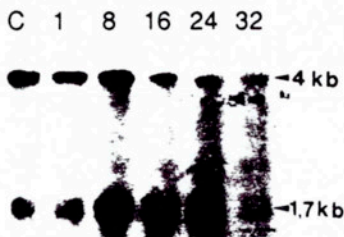


Figura 3. Northern de CaM I. Els números indiquen el temps després de l'administració de lindane a dosi convulsiva.

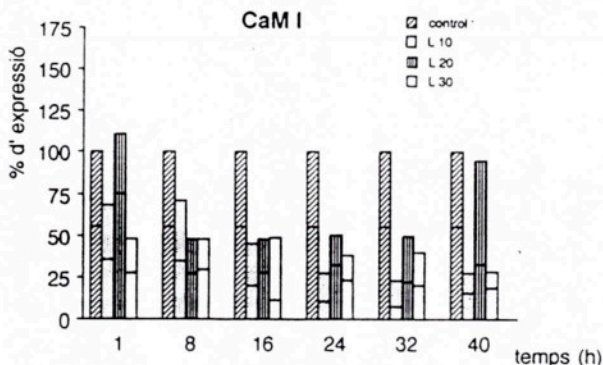


Figura 4. Expressió de CaM I en les mateixes condicions que a la Figura 2. La part superior de les barres representa la banda de 4 kb i la part inferior la de 1,7.

DISCUSSION

El treball que presentem és un estudi preliminar sobre la possible afectació diferencial de dos gens que codifiquen per la calmodulina. Els nivells d'expressió basal d'aquests gens que hem trobat a l'escorça de cervell, coincideixen amb els d'altres estudis referits a la distribució cerebral de l'activitat de la calmodulina (Zhou et al., 1985) i a la localització per hibridació *in situ* dels mRNA del gen CaM I. D'altra banda, hi ha treballs que presenten modificacions de l'expressió d'aquests gens durant el desenvolupament i a cel·lules transformades (MacManus et al., 1989). Aquestes modificacions a vegades són increments de l'expressió i d'altres, decrements. Els nostres resultats indiquen que a dosis baixes de lindane (10 mg/kg) hi ha un increment de l'expressió del gen CaM II mentre que a dosis convulsives (30 mg/kg) hi ha una forta disminució tant de CaM I com de CaM II i que es manté després de bastantes hores de l'administració de l'agent neurotòxic. No sabem quines són les conseqüències ni el per què d'aquests canvis. No obstant, cal dir que donada la diversitat de funcions de la calmodulina al cervell, un canvi en els nivells de transcripció podria significar una variació dels nivells de calmodulina i això podria repercutir en l'activitat d'enzims calmodulina dependents com la proteïna quinasa II, la calcineurina, MLCK, etc. De fet hi ha estudis en que els efectes tòxics de metalls com el zenc es tradueixen en una inhibició de la fosforilació en general i de l'activitat de la proteïna quinasa II calmodulina dependent. El nostre treball encara no permet aportar res en aquest sentit però el fet de que un agent com el lindane, que modifica els fluxes neuronals de calci, provoqui canvis a l'expressió dels gens de la calmodulina, permetrà aportar coneixements sobre els mecanismes d'acció dels agents convulsivants així com sobre els esdeveniments que són conseqüència de la seva acció.

AGRAÏMENTS

Sònia Barrón és becària P.F.P.I. del Ministeri d'Educació i Ciència. Aquest treball ha estat possible gràcies als ajuts SAL-89-0926 de la CICYT i AR91-118 de la CIRIT.

BIBLIOGRAFIA

- Abalis, I.M., Eldefrawi, M.E. i Eldefrawi, A.T. (1985) *Biochem. Pharmacol.*, 34: 579-2582.
Bloomquist, J.R., Adams, P.M. i Soderlund, D.M. (1986) *Neurotoxicol.*, 7:11-20.
Gubits, R.M., Smith, T.M., Fairhurst, J.L. i Yu, H. (1989) *Mol. Brain Res.*, 6, 39-45.
Joy, R.M. (1982) *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 4: 813-823.
Lawrence, L.J. i Casida, J.E. (1984) *Life Sci.*, 35: 175-178.
MacManus, J.P., Gillen, M.F., Korczak, B. i Nojima, H. (1989) *BBRC.*, 159: 278-282.
Means, A.R., Tash, J.S., Chafouleas i J.G. (1982) *Physiol. Rev.*, 62: 1-39.
Nojima, H., (1989) *J. Mol. Biol.*, 208: 269-282.
Tusell, J.M., Suñol, C., Gelpí, E. i Rodríguez-Farré, E. (1987) *Arch. Toxicol.*, 60: 432-437.
Vendrell, M., Pujol, M.J., Tusell, J.M. i Serratosa J. (1992) *Mol. Brain Res.*, En premsa.
Wooley, D., Zimmer, L., Dodge, D. i Swanson, K. (1985) *Neurotoxicology*, 6: 165-192.
Zhou, L-W., Moyer, E.A., Muth, E.A., Clark, B, Palkovits, M. i Weiss, B. (1985) *J. Neurochem.*, 44: 1657-1662.

EXPRESSIONI ESPACIAL I ORGANITZACIÓ GENÒMICA DELS GENS AMB "HOMEBOX" Dth-1 i Dth-2

Jordi Garcia-Fernàndez, Jaume Baguà i Emili Saló
Departament de Genètica, Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona

Alguns dels processos d'organització espacial durant el desenvolupament embrionari i la regeneració estan conservats en diferents organismes, suggerint que espècies divergents poden emprar estratègies comunes en la formació del patró i la determinació i diferenciació cel·lulars. Un element genètic que recolça aquesta estratègia comuna és l'"homeobox" (1), domini regulador conservat de 60 aminoàcids que conté un motiu de hèlix-volta-hèlix que l'hi confereix capacitat d'unió al DNA.

Amb la intenció d'identificar gens reguladors que controlèssin aspectes de la formació del patró i regeneració a planària vàrem aïllar i seqüenciar 2 gens amb "homeobox": Dth-1 i Dth-2 (2). A més, recentment, el nostre grup ha aïllat tres gens que contenen seqüències "POU-homeobox" (3 i Muñoz, A.M. et al, aquest volum)

La primera aproximació a l'estudi de les funcions d'aquests gens ha sigut l'anàlisi de la seva expressió tant en diferents estadis de regeneració com en diferents parts de l'organisme intacte: en aquest sentit, les hibridacions de "Northern-blots" d'ARN polyA+ amb sondes específiques dels gens Dth-1 i Dth-2 han mostrat que ambdós gens s'expressen en uns nivells molt baixos, i tant en organismes intactes com en regenerants.

Per caracteritzar el patró espacial d'expressió hem utilitzat la tècnica d'hibridacions *in situ* amb ribosondes antisentit de Dth-1 i Dth-2 marcades amb ³⁵S-UTP. L'expressió del gen Dth-1 està restringida a cèl·lules de l'epiteli intestinal de la gastrodermis, mentre que el gen Dth-2 s'expressa només en cèl·lules del parènquima perifèric, més abundantment en les regions dorsals que en les ventrals.

A més, per detectar els productes proteics hem obtingut serums policlonals de conill a partir de proteïnes de fusió β-Gal/Dth-1 i Dth-2. Inmunohistocincions preliminars confirmen les mateixes localitzacions que les hibridacions *in situ*: El serum anti-Dth-1 marca nuclis de l'epiteli intestinal, mentre que la proteïna Dth-2 es detecta en nuclis de cèl·lules parenquimàtiques subepidèrmiques.

Els patrons d'expressió, tant de missatger com de proteïna, mostren que ambdós gens no estan implicats directament en el procés de la regeneració, més aviat semblen jugar el seu paper de factors reguladors en la determinació i/o diferenciació cel·lulars (sigui cap a teixit intestinal, sigui cap a tipus cel·lulars concrets(?) parenquimàtics), processos que es donen continuament a planària

Per un altre cantó hem endegat l'estudi de la organització gènica i la regulació d'aquests gens. Hem construït una genoteca genòmica en el fag λCharon35 i hem aïllat clons genòmics corresponents als gens Dth-1 i Dth-2. El gen Dth-1 està organitzat en tres exons (0.4, 0.3 i 1Kb.) i dos grans introns, de 8 i 12 Kb. El gen Dth-2 és molt més discret en extensió: també té dos introns, però de sols 42 i 45 pb. En l'actualitat estem acabant de seqüenciar les regions 5' d'aquests gens i identificant els inicis de transcripció per extensió d'iniciadors o PCR-RACE. Aquesta anàlisi prèvia ens permetrà planificar futurs estudis de regulació d'aquests dos gens amb "homeobox".

1- GEHRING, W.J. (1987). *Science* 236, 1245-1252.

2- GARCIA-FERNANDEZ, J.; BAGUÀ, J. & SALO, E. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7338-7342.

3- MIRALLES, A.; MUÑOZ, A.; GARCIA-FERNANDEZ, J.; BAGUÀ, J. & SALO, E. (1991). *Biol. Desenv.* 9, 215-224.

EXPRESSIO GENICA DEL SISTEMA $b^{0,+}$ DE TRANSPORT D'AMINOACIDS (rBAT) : ONTOGENIA, DIABETIS I DEJUNI

Marc Furriols, Anna Castelló, Joan Bertran, Xavier Testar, Antonio Zorzano i Manuel Palacín

Departament de Bioquímica i Fisiologia. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.

Recentment, s'ha aïllat un cDNA de ronyó de conill (rBAT) que indueix en oòcits de Xenopus el sistema $b^{0,+}$ de transport sodi-independent d'aminoàcids bàsics i neutres (p.e. leucina, cistina) (Bertran i col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 1992, en premsa). A la rata, l'expressió de rBAT és específica de ronyó i mucosa intestinal (trànscrip d'aprox. 2.4 kb).

L'expressió de rBAT s'ha estudiat durant el desenvolupament del ronyó i l'intestí de la rata. L'expressió del mRNA de rBAT és detectable al ronyó ja a l'últim dia de vida fetal (dia 21) i augmenta progressivament després del naixement: al dia 12 de vida (lactància) els nivells de mRNA de rBAT són <15% dels de l'adult i, coincidint amb el canvi a la dieta sòlida, s'incrementa l'expressió de rBAT fins assolir nivells propers (75%) als dels ronyons adults (al dia 26 de vida). A l'intestí, l'expressió de rBAT mostra una ontogènia similar, però al final de la gestació (dia 21) els nivells de mRNA de rBAT són ja el 40% dels nivells del teixit de l'adult, i als dies 21-26 de vida aquests nivells són similars o superiors (130-170%) als dels adults.

La diabetis experimental (7 dies després de l'administració de 70 mg de estreptozotocina /kg de pes corporal) redueix notablement (85%) l'expressió del mRNA de rBAT al ronyó. Contràriament, a l'intestí, la diabetis incrementa (aproximadament 60-70%) els nivells del mRNA de rBAT. El dejuni de 48 hores augmenta l'expressió del mRNA de rBAT a ronyó (aproximadament 70%) i no s'afecta la seva expressió a intestí. Tant a ronyó com a intestí, la diabetis i el dejuni no modifiquen significativament els nivells de mRNA de β -actina.

Els nostres resultats demostren que l'expressió del mRNA de rBAT (sistema $b^{0,+}$ de transport d'aminoàcids) es regula de forma teixit específica pel desenvolupament, la diabetis i el dejuni. En el futur, l'aïllament del promotor de rBAT permetrà estudiar els mecanismes de regulació de l'expressió del gen rBAT.

PARTICIPANTS a les JORNADES de BIOLOGIA MOLECULAR. Edició-92

ADAN LIÈBANA, Cristina	Bioquímica	Biologia	UB
ADROER MARTORI, Rosa	Ciències Fisiol.	Medicina	UB
ALEDO ZAMORA, Rosa	CID		CSIC
ALEMAN LLANSÓ, Carles	DEQ	ETSEIB	UPC
ALBALAT, Ricard	Genètica	Biologia	UB
ALEDO, Rosa	CID		CSIC
ÁLVAREZ ECHEVESTE, Iñaki	CID		CSIC
AMADOR CATALAN, Amaia	Genètica	Biologia	UB
ÀNGEL, Eduard	Fisio. Vegetal	Farmàcia	UB
ARIÑO, Joaquín	Biol. Mol.	Veterinària	UAB
ATRIAN VENTURA, Sílvia	Genètica	Biologia	UB
BACH ELIAS, Montserrat	CID		CSIC
BALCELLS COMAS, Susanna	Genètica	Biologia	UB
BARRON, Sònia	CID		CSIC
BANCHS, M ^a . Isabel	Genètica Mol.	IRO	HDR
BAYES, Mònica	Genètica	Biologia	UB
BERTRÁN COMULADA, Joan	Bioquímica	Biologia	UB
BOQUÉ LLORDÉS, Lluís	DEQ	ETSEIB	UPC
BORONAT LLOP, Susanna	CID		CSIC
BORONAT MARGOSA, Albert	Bioquímica	Química	UB
BURGAYA, Ferran	Genètica	Biologia	UB
CAMPS CAMPRUBÍ, Marta	Bioquímica	Biologia	UB
CANALS SURÍS, Francesc	Biol. Mol.	IBF	UAB
CARRANZA GIL, Salvador		Biologia	UB
CASADO MEREDIZ, F. Xavier	Bioquímica	Biologia	UB
CASALS FERRER, Núria	Bioquímica	Farmàcia	UB
CASAMAYOR GRACIA, Antoni	Bioquímica	Veterinària	UAB
CASANOVA ROCA, Jordi	CID		CSIC
CASTELLÓ FARRÉ, Anna	Bioquímica	Biologia	UB
CASTELLS GASULLA, Albert	Recerca Exp.		HBV
CHILLARAS CHAVEZ, Josep	Bioquímica	Biologia	UB
CHILLON, Manuel	Genètica Mol.	IRO	HDR
CIRERA, Susanna	Genètica	Biologia	UB
CIUDAD, Carles	Bioquímica	Farmàcia	UB
CLOTET, Josep	Bioquímica	Veterin.	UAB
COLL CAPELLA, Miquel	CID		CSIC
COMERON, Josep	Genètica	Biologia	UB
CORDERO GÜIZA, Maria Josep	CID		CSIC
CORNUDELLA MIR, Lluís	CID		CSIC

COROMINAS, Montserrat	Genètica	Biologia	UB
COROMINAS COLILLAS, Josep	Bioquímica	Veterinària	UAB
COSTA CAMPS, Josep	Hepatologia		HCPB
CUSIDÓ PÈREZ, Lidia	Biol. Cel. Físio.	Medicina	UAB
DABAN, Joan Ramon	Bioquímica	Ciències	UAB
DABAN MARIN, Montserrat	CID		CSIC
Di-IORIO RIVERO, Lluïsa			
ENJUTO, Montserrat	Bioquímica	Química	UB
ESCOLA GIL, Joan Carles	Físio. Animal	Biologia	UB
FARRÉS VICÉN, Jaume	Bioquímica	Ciències	UAB
FERNÁNDEZ-BORJA, M ^a Mar	Biol. Cel.lular	Biologia	UB
FERNÁNDEZ-BUSQUETS, Xavier	Bioquímica	Ciències	UAB
FERRER MARTÍNEZ, Andreu	Bioquímica	Biologia	UB
FIBLÀ PALAZON, Joan	Genètica	Biologia	UB
FUENTES, Joan Josep	Genètica Mol.	IRO	HDR
FURRIOLS ESPONA, Marc	Bioquímica	Biologia	UB
GALLEGO, Francesca	Bioquímica	Ciències	UAB
GARCIA-FERNÁNDEZ, Jordi	Genètica	Biologia	UB
GARCIA-MAS, Jordi	CID		CSIC
GARCIA-SÀEZ, Isabel	DEQ	ETSEIB	UPC
GIL-GÓMEZ, Gabriel	Bioquímica	Farmàcia	UB
GÓMEZ, Manel	Bioquímica	Ciències	UAB
GÓMEZ ANGELATS, Mireia	Bioquímica	BIOLOGIA	UB
GÓMEZ CUADRADO, Alicia	CID		CSIC
GÓMEZ ROIG, Alicia		IGODA	
GONZÁLEZ-DUARTE, Roser	Genètica	Biologia	UB
GRADO, Àngels	Bioquímica	Biologia	UB
GRINBERG, Daniel	Genètica	Biologia	UB
HERNÁNDEZ MARTIN, Joaquim	Físio. Animal	Ciències	UAB
HERNÁNDEZ POUS, Lluís	Bioquímica	Farmàcia	UB
HUERTAS RUZ, Dori	CID		CSIC
IBORRA OBIOLS, Antoni	Biol. Mol.	IBF	UAB
JIMÉNEZ GARCIA, Emili	Bioquímica	Química	UB
JOAQUIN CAUDET, Manel	Bioquímica	Farmàcia	UB
JOSE ESTANYOL, Matilde	CID		CSIC
LIMON CARRERA, Anna	Bioquímica	Farmàcia	UB
LÓPEZ-LABRADOR, Francesc	Hepatologia		HCPB
LÓPEZ-RIBERA, Ignasi	CID		CSIC
LUDEVID, M ^a Dolors	CID		CSIC
MARFANY NADAL, Gemma	Genètica	Biologia	UB
MARINO BUSLJE, Cristina	Biol. Mol.	IBF	UAB
MARTÍ GAUDÉS, Mercè	Biol. Cel. Físio.	Medicina	UAB
MARTIN, Imma	Bioquímica	Biologia	UB
MARTIN-CAMPOS, Jesús Maria	Genètica	Biologia	UB
MARTÍNEZ, Carme	CBM (Madrid)	CSIC	UAM
MARTÍNEZ FLORES, Ivan	Citogenètica	IBF	UAB
MARTÍNEZ-MAS, Joan Vicenç	Bioquímica	Biologia	UB

MARTÍNEZ PÈREZ, Irene	Bioquímica	Ciències	UAB
MARTÍNEZ-RUBIO, Gemma	Metabolopaties		IBC
MARTORELL RIERA, M ^a . Rosa	Biol. Cel. Físio.	Medicina	UAB
METON TEJEIRO, Isidre	Bioquímica	Farmàcia	UB
MIRALLES ACOSTA, Agustí	Immunologia		HCPB
MOLINA, Miquel A.	Biol. Mol.	IBF	UAB
MONFORT VIVES, Amparo	CID		CSIC
MONSALVES JEREZ, Claudi	Bioquímica	Ciències	UAB
MONTAÑÉS VIDAL, M ^a . Teresa	Recerca Exp.		HBV
MORALEJO ALMENDRAL, Pilar	Bioquímica	Farmàcia	UB
MORENO PARRA, Albert	Bioquímica	Ciències	UAB
MUÑOZ, Gemma	Enzimologia	IBF	UAB
MUÑOZ-MÀRMOL, Anna	Genètica	Biologia	UB
MUÑOZ-MORUNO, Purificació	Bioquímica	Biologia	UB
NIOGRET, Marie-Françoise	CID		CSIC
NOÈ MATA, Verònica	Bioquímica	Farmàcia	UB
NOGALES FERNÁNDEZ, Balbina	Microbiologia	IBF	UAB
OLIVA, Rafael	Ciències Fisiol.	Medicina	UB
OLIVA MIQUEL, Baldomero	Biol. Mol.	IBF	UAB
OLMEDO CASAS, Eva	Hepatologia		HCPB
ORTIZ, Miquel	CID		CSIC
PAGÈS, Montserrat	CID		CSIC
PASTOR ANGLADA, Marçal	Bioquímica	Biologia	UB
PÈREZ, Joan J.	DEQ	ETSEIB	UPC
PONTE MARULL, Imma	Bioquímica	Ciències	UAB
POSAS GARRIGA, Francesc	Bioquímica	Veterinària	UAB
PUIGDOMÈNECH ROSELL, Pere	CID		CSIC
QUERALT MUNTANYOLA, Rosa	Ciències Fisiol.	Medicina	UB
QUINTANA, Itziar	Bioquímica	Biologia	UB
RAMOS ONSINS, Sebastià	Genètica	Biologia	UB
RAVENTÓS SEGURA, Dora	CID		CSIC
RECASENS GUINJUAN, M ^a . Àngels	Hematologia		CQSA
RIERA PRENAFETA, Rosa	Físio. Vegetal	Farmàcia	UB
ROCA PUIG, Ramon	CID		CSIC
ROCAMORA, Natí	Biol. Cel.lular	Biologia	UB
RODÉS GUBERN, Blanca		IGODA	
RODRÍGUEZ RUBIO, Joan Carles	Bioquímica	Farmàcia	UB
ROMERA BARRIOS, Carme	CID		CSIC
ROSELL VIVES, Elisabet		IGODA	
RUIZ-MONTASELL, Bonaventura	Bioquímica	Biologia	UB
SALÓ BOIX, Emili	Genètica	Biologia	UB
SALVADÓ MORELLO, Cristina	Bioquímica	Farmàcia	UB
SANTALUCIA ALBÍ, Tomás	Bioquímica	Biologia	UB
SOLANES GARCIA, Gemma	Bioquímica	Veterinària	UAB
SORIA, Josep Manel	Genètica Mol.	IRO	HDR
SUAU LEON, Pere	Bioquímica	Ciències	UAB
TARRASON ENCUESTRA, Gemma		IGODA	
TAULER GIRONA, Albert	Bioquímica	Farmàcia	UB
TORRES LACRUZ, Miquel Àngel	CID		CSIC

TUCA, Alexandre	Bioquímica	Biologia	UB
URIBE ESTEFANIA, Xavier	CID		CSIC
VAQUERIZO MONTILLA, Joan	Bioquímica	Ciències	UAB
VEGA FERNÁNDEZ, M ^a . Cristina	DEQ	ETSEIB	UPC
VIAPLANA FLORENSA, Elisenda	Microbiologia	IBF	UAB
VILAGELIU ARQUÉS, M ^a . Llúisa	Genètica	Biologia	UB
VILLEGAS, Virtuts	Bioquímica	Ciències	UAB
VILLENA GARCIA, Joan	Bioquímica	Veterinària	UAB
VIÑALS CANALS, Francesc	Bioquímica	Biologia	UB
YUBERO, Pilar	Bioquímica	Biologia	UB

SIGLES

CBM	Centre de Biologia Molecular del CSIC a la UAM
CID	Centre d'Investigació i Desenvolupament del CSIC a Barcelona
CSIC	Consell Superior d'Investigacions Científiques
CQSA	Clínica Quinta de Salut l'Alianza
DEQ	Departament de Enginyeria Química. ETSEIB-UPC
ETSEIB	Escola Tècnica Superior d'Enginyers Industrials de Barcelona
HBV	Hospital Prínceps d'Espanya, Bellvitge
HCPB	Hospital Clínic i Provincial de Barcelona
HDR	Hospital Duran i Reynals
IBC	Institut de Bioquímica Clínica <i>Flor de maig</i>
IRO	Institut de Recerca Oncològica
UAB	Universitat Autònoma de Barcelona
UAM	Universitat Autònoma de Madrid
UB	Universitat de Barcelona
UPC	Universitat Politècnica de Catalunya

