

## INTRODUCCIO.

La RNAasa A és el principal component del pàncreas boví amb activitat ribonucleàsica. És una proteïna de forma globular amb una sola cadena polipeptídica de 124 aminoàcids i un pes molecular de 13.680. És relativament senzilla de purificar i bastant estable.

És una enconucleasa que catalitza la hidròlisi del seu substrat natural, l'àcid ribonucleic (RNA) de cadena senzilla, en dues etapes. A la primera etapa es produeix la hidròlisi d'un enllaç fosfodiester i es forma un ester fosfat 2',3' cíclic que a la segona etapa és hidrolitzat donant el corresponent nucleòsid 3'-fosfat.

L'enzim només trenca l'enllaç internucleotídic quan la base del ribonucleòtid en posició 3' és una pirimidina. Aquesta especificitat de l'enzim és tant sols explicable per la presència en la ribonucleasa d'un seti específic fixador dels nucleòtids pirimidínics.

### PROVES DE L'EXISTÈNCIA D'UN SETI FIXADOR DE PURINES.

Els experiments fets per WITZEL & BARNARD (1962 a i b), emprant dinucleòsids monofosfat com a substrat, indicaren que la velocitat de la reacció catalitzada per la Ribonucleasa A es funció del nucleòsid en 5' de l'enllaç fosfodiester, essent més elevada quan la base és una purina. Això permetria deduir que la ribonucleasa poseeix un seti secundari de fixació del substrat (essent el primari el que reconeix les pirimidines en 3') amb el que possiblement interaccionarien tots els nucleòtids en posició 5', però que seria extraordinàriament específic pels nucleòtids amb base purínica. La difracció de raigs X també demostra que a la Ribonucleasa A existeix un seti específic per als 5'-nucleòtids purínics (RICHARDS & WYCKOFF 1971).

Les figures de difracció de raigs X no arriben a precisar quins son els grups responsables de la col·locació favorable de la base purínica. Un intent de localització d'aquest seti fixador de purines va ésser realitzat pel grup de MATHIAS & RABIN (RABIN et al., 1970; CUCHILLO, 1974) fent servir la tècnica de "marcat per afinitat". L'objectiu principal de la reacció entre la Ribonucleasa A i el marcador, la 6-Cloropurina, era l'obtenir un derivat marcat en el seti fixador de purines. Donat que el nombre de derivats que s'obtenia era elevat i el rendiment era baix no van poder localitzar aquest seti.

Aquests treballs han estat continuats en el nostre laboratori fent servir marcadors molt més específics: la 6-cloropurina ribosa i la 6-cloropurina ribosa 5'-monofosfat --- (Cl6-RMP). Aquesta major especificitat del marcador emprat en la direcció base <nucleòsid <nucleòtid queda reflectida en el fet de la reducció del nombre de derivats obtinguts a l'augmentar la complexitat del marcador i anar-se fent més semblant el substrat natural de l'enzim (Figura 1: a,b,c).

Així, la presència de la ribosa incrementa apreciablement la direccionalitat de la reacció, però és el grup fosfat el que restringeix la reacció majoritàriament a un punt de la molècula, doncs s'obtenen diversos derivats minoritaris i un de majoritari anomenat Derivat II, que al ésser caracteritzat es va comprovar que el marcador s'ha unit en l' $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de la Lys-1.

#### OBJECTIUS DE LA TESI.

L'objectiu primordial d'aquest treball ha estat el d'estudiar més a fons el marcat per afinitat de la Ribonucleasa A emprant 6-Cloropurina ribosa i Cl6-RMP per tractar d'assolir un millor coneixement del seti de fixació de purines de la Ribonucleasa A. En primer lloc es va decidir de portar a terme dos controls, estudiar la reacció de marcatge en pre-

sència d'AMP i l'efecte del marcador sobre l'activitat de la RNAasa en solució. Apart d'aquests controls es va creure convenient: estudiar el efecte del pH en la reacció de marcatge, efectuant-la a pH's més bàsics, procedir a la caracterització d'altres derivats; i, per tal de poder relacionar i intentar explicar les dades, portar a terme l'elaboració d'una gràfica tridimensional de la Ribonucleasa A amb ordinador.