



Universitat de Girona

**DETECCIÓ DE LA RIBONUCLEASA I
ANÒMALAMENT GLICOSILADA EN SÈRUMS
HUMANS: POSSIBLE ÚS COM A MARCADOR
TURMORAL DEL CÀNCER DE PÀNCREAS**

Sílvia BARRABÉS VERA

**ISBN: 978-84-690-9826-4
Dipòsit legal: GI-I526-2007**



Universitat de Girona

**DETECCIÓ DE LA
RIBONUCLEASA 1
ANÒMALAMENT GLICOSILADA
EN SÈRUMS HUMANS:**

**Possible ús com a marcador
tumoral del càncer de pàncreas.**

Sílvia Barrabés Vera



**DEPARTAMENT DE BIOLOGIA
ÀREA DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
LABORATORI DE BIOQUÍMICA DEL CÀNCER**

**Detecció de la Ribonucleasa 1 anòmalament glicosilada en
sèrums humans: Possible ús com a marcador tumoral del
càncer de pàncreas.**

Memòria presentada per a l'obtenció del grau de Doctor Europeu per la Universitat de Girona. Dins del Programa de Doctorat de Ciències: Química i Física de les molècules i els materials, Biotecnologia i Ciències de la Salut del Departament de Química, amb el Departament EQATA, el Departament de Biologia, l'Institut de Química Computacional i l'Institut d'Ecologia Aquàtica, de la Universitat de Girona.

Sílvia Barrabés Vera

Vist-i-plau
El Director de Tesi

Vist-i-plau
La Directora de Tesi

Dr. Rafael de Llorens Duran
Catedràtic
de Bioquímica i Biologia Molecular

Dra. Rosa Peracaula Miró
Professora titular
de Bioquímica i Biologia Molecular

A mis abuelos...

Agraïments

Durant aquest temps, que ha estat llarg tot i que a vegades pasés volant i d'altres tot el contrari, heu estat molts els que m'heu donat suport, m'heu fet costat, o simplement heu format part d'aquesta aventura creant un entorn agradable al meu voltant, en el que he passat moments meravellosos, fins i tot quan la recerca era més dura.

Aquest és un bon moment per agrair a en Rafa i la Rosa que em deixessin formar part del seu grup i que m'hagin ensenyat tantes coses, tant en la part acadèmica com en la recerca. Puc dir que, en general, he tingut molta sort amb la gent que he tingut la oportunitat de conèixer i treballar-hi en aquest grup. Especialment la Glòria, que em va ajudar molt al principi i que va ser una gran companya en el camí durant cinc anys. I la Goretti, que obria davant meu un camp totalment desconegut i que encara no acabo d'entendre. Però no m'oblido dels altres, i ni molt menys de les meves noves 'nenes de bioquímica', Ariadna, Marta i Eva. Heu estat una alenada d'aire fresc en aquest grup, i heu aconseguit infiltrar-vos de ple en la meva vida, fins i tot a un nivell més privat, en el racó de l'amistat.

El millor d'una universitat petita com és la de Girona és que acabes per conèixer a tothom, i el departament de Biologia ha estat per mi un lloc molt especial. Moltes gràcies a tots els Coffee-girls, aquells de fa temps que ja heu anat marxant i fent de les vostres. També agrair tots els participants més o menys actius de l'UdG.doc, per la lluita constant que resulta una gran excusa per tenir els nostres moments. Gràcies també als nois del costat, sobretot a en Pere per l'ajut artístic. I també a tots els 'profes' que us trobo cada dia dinant al menjador i em doneu grates converses fent-me sentir totalment integrada.

I would also like to thank Dr. Raymond A. Dweek for receiving me in the Glycobiology Institute in Oxford, and Dr. Pauline M. Rudd for accepting me in her group. I could feel like at home during my stay and I met people there I could never forget. Catherine, your help with those profiles was invaluable. I would never be able to understand them completely without your and Louise's help. Umi, Yungon and Jin, the coffee break with you was always a funny moment. Thank you. Bueno, y también me acuerdo de mis gallegiños y mi cubana favorita de Oxford, por supuesto.

Sempre he cregut que els que més han patit la meva tesi han estat els meus amics i la família. No és que els hagi atabalat amb les meves històries de la RNasa 1, és

que m'han hagut d'aguantar de mal humor i deprimida quan no m'ha sortit res i, malauradament, això ha passat força sovint.

Anna, Nati, Irene, el grupet de la radio, Guillem i penya de l'Excalibur, Francesc; se'm fa un nus a la gola i no em surten les paraules. Moltíssimes gràcies. Per tot, per aguantar-me, per fer-me riure i per ensenyar-me a pensar en tot allò que no era biologia. I especialment, gràcies Jaume. Em vas escoltar i fer costat durant molts anys, sempre amb un somriure a la cara en cada nou pas que donava. Mai t'ho vaig poder dir, però sé que vas marxar sabent lo important que vas ser per tanta gent. Et trobaré a faltar.

A vosaltres, Pares, us ho mereixeu tot. No hauria arribat mai on sóc sense el vostre suport incondicional, fins i tot quan molt sovint no me'l mereixia. L'únic que us puc oferir a canvi és l'esforç que hi he posat. Espero que pugueu estar orgullosos de mi. Evidentment, també espero que ho estiguin l'Esther, l'Edu i en David. Esther, moltes gràcies per tota l'ajuda en l'edició d'aquesta tesi i amb el \LaTeX en general.

Lars, ich weiss, dass die Etappe, in der wir uns gefunden haben, schwer war, und Du mir trotzdem beigestanden hast. Vielen Dank für Deine Hilfe auf praktischem Niveau, für Deine Unterstützung und das Aushalten der Anstürme.

Índex

Presentació	v
Abreviatures	vii
Índex de figures	xiii
Índex de taules	xv
Símbols i representacions	xvii
Resum	xxi
Summary	xxv
1 Introducció	1
1.1 Glicosilació	1
1.1.1 Els monosacàrids: la base per estructures més complexes	1
1.1.2 Les glicoproteïnes	4
1.1.3 Importància de la glicosilació en els processos de mobilitat cel·lular i en els processos tumorals	7
1.2 El Càncer	10

1.2.1	Els marcadors tumorals	13
1.2.2	El Càncer de pàncreas	15
1.2.3	Marcadors tumorals pel càncer de pàncreas	17
1.3	Ribonucleases	19
1.3.1	Característiques principals	19
1.3.2	Les ribonucleases humanes	20
1.3.3	Estudis previs de la Ribonucleasa 1 com a marcador del càncer de pàncreas	22
1.3.4	La glicosilació de la Ribonucleasa 1	26
2	Objectius / Objectives	29
	Objectius	29
	Objectives	31
3	Material i mètodes	33
3.1	Material bàsic	33
3.2	Obtenció de les mostres	34
3.2.1	Extracció de ribonucleasa pancreàtica humana a partir de pàncreas de donants sans d'autòpsia	34
3.2.2	Obtenció de ribonucleasa pancreàtica humana de les línies cel·lulars Capan-1 i EA.hy926	36
3.2.3	Obtenció de les mostres de sèrum humà de pacients de neoplàsia pancreàtica i individus control	37
3.3	Fraccionament cromatogràfic	37
3.3.1	Cromatografia en columna Cibacron blue	37
3.3.2	Cromatografia en columna d'heparina en sistema FPLC	39

3.3.3	Cromatografia d'intercanvi catiònic MONO-S en sistema FPLC	41
3.3.4	Cromatografia de fase reversa Vydac-C4 en sistema FPLC	42
3.4	Electroforesi	44
3.4.1	Electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS	44
3.4.2	Electroforesi bidimensional	45
3.4.3	Tinció amb nitrat de plata	50
3.4.4	Zimograma	51
3.4.5	Transferència tipus Western	52
3.5	Detecció de ribonucleasa per assaig immunològic	55
3.5.1	ELISA directe	55
3.5.2	ELISA sandvitx	56
3.6	Determinació de la quantitat de proteïna total	58
3.6.1	Mètode de Bradford	58
3.7	Tècniques d'anàlisi de la Glicosilació	59
3.7.1	Digestió amb enzims glicolítics	59
3.7.2	Seqüenciació glucídica	60
4	Results	69
4.1	RNase 1 purification	69
4.1.1	Extraction and purification of RNase 1 from healthy pancreas .	69
4.1.2	Serum RNase 1 purification	74
4.1.3	EA.hy926 cell line culture and RNase 1 purification	79
4.2	Glycan analysis of serum ribonuclease 1	81
4.3	Sialic acid analysis by 2-DE	109

5	Discussió general / General discussion	131
	Discussió general	131
	General discussion	147
6	Conclusions	163
	Conclusions (català)	163
	Conclusions (english)	167

Presentació

Aquesta tesi està estructurada en set apartats: introducció, objectius, material i mètodes, resultats, discussió general, conclusions i bibliografia. L'apartat de resultats es subdivideix en tres apartats, dos dels quals es presenten en forma d'articles científics. Les metodologies incloses en aquests articles de forma reduïda, poden trobar-se en l'apartat de material i mètodes descrites detingudament.

D'acord amb la normativa vigent per tal d'obtenir el doctorat europeu en la Universitat de Girona, s'ha inclòs un resum i s'han exposat els objectius i les conclusions en un idioma diferent al de la nació (en anglès) en la que es presenta aquesta tesi. A més, també es presenta en anglès l'apartat de discussió general per facilitar la comprensió de les implicacions del present treball.

This thesis has been divided into seven chapters: introduction, objectives, materials and methods, results, general discussion, conclusions and bibliography. The results chapter is divided into three subsections, two of which are presented as a scientific articles. Methodologies summarized in them can be found in the material and methods chapter in a more detailed way.

According to the present regulation for the European PhD degree acquisition in the University of Girona, a summary has been included and the objectives and conclusions has been exposed in a different language of that of the nation where this thesis is presented (in english). The general discussion chapter is also included in english to facilitate the understanding of the implications of this work.

Abreviatures

2AB: 2-Aminobenzamida

2-DE: Two-dimensional electrophoresis

ABS: *Arthrobacter urefaciens sialidase*

Abs: Absorbància

AcNa: Acetat sòdic

AMF: *Almond meal α -fucosidase*

Asn: Asparagina

Asp: Àcid Aspàrtic

BKF: *Bovine kidney α -fucosidase*

BMS: Suplement de medi basal

BSA: Albúmina sèrica bovina

BTG: *Bovine testes β -galactosidase*

CA: Antigen carbohidrat

CEA: Antigen carcinoembrionari

Da/kDa: Daltons/kilo-daltons

ddH₂O: aigua bidestil·lada

DHB: Àcid 2,5-dihidrobenzoic

DMEM: *Dubecco's Modified Eagle Medium*

DTT: Ditiotreitòl

ECP: Proteïna catiònica d'eosinòfil (RNasa 3)

EDN: Proteïna derivada d'eosinòfil (RNasa 2)

EDTA: Àcid etilendiaminotetraacètic

ELISA: Assaig immunològic lligat a enzim (*Enzyme linked immunosorbent assay*)

ESI: *Electrospray Ionisation*

FBS: Sèrum fetal boví

Fc: Fucosa core

FPLC: *Fast Protein Liquid Chromatography*

Fuc: Fucosa

Gal: Galactosa

GalNAc: *N*-acetilgalactosamina

Glc: Glucosa

GlcA: Àcid glucorònic	MS: <i>Mass spectrometry</i>
GlcNAc: <i>N</i> -Acetilglucosamina	MT: Marcador tumoral
GnT-V: Glucosaminil transferasa V	Mw: Massa molecular
GU: Unitats de glucosa (<i>Glucose units</i>)	NANI: <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Neuraminidase</i>
GuH: β - <i>N</i> -acetilglucosaminidasa	NeuAc: Àcid neuramínic
HPLC: <i>High performance liquid chromatography</i>	NP-HPLC: HPLC de fase normal
HSA: Albúmina sèrica humana	PaC: Càncer de pàncreas
HuLEC: <i>Human Lung Endothelial Cells</i>	PAGE: Gel d'electroforesi de poliacrilamida
HuMMEC: <i>Human Mammary microvessel endothelial cells</i>	PBS: Tampó fosfat salí
HUVEC: <i>Human Umbelical Vein endothelial cells</i>	pI: Punt isoelèctric
IdA: Àcid Idurònic	pL: Poly- <i>N</i> -lactosamines
IPG Buffer: <i>Immobilized pH Gradient Buffer</i> (tampó d'amfolines)	PMSF: Fluorur de Fenil Metil Sulfonil
LC: <i>Liquid chromatography</i>	PNGasa F: <i>N</i> -glicosidasa F
Le ^a : Antigen glucídic Lewis a	poliC: Àcid policitidílic
Le ^b : Antigen glucídic Lewis b	poliU: Àcid poliuridílic
Le ^x : Antigen glucídic Lewis x	PRI: Inhibidor específic per ribonucleases
Le ^y : Antigen glucídic Lewis y	PS: Persulfat amònic
MALDI: <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>	PSA: Antígen prostàtic específic
Man: Manosa	PVDF: Fluorur de polivinilidè
MPa: Megapascals	Q-Tof: <i>Quadrupole time of flight</i>
	RIA: Radioimmunoassaig
	RNA: Àcid ribonucleic

RNasa: Ribonucleasa	TEMED: N,N,N',N'- Tetrametiletilendiamina
RNasa 1: Ribonucleasa pancreàtica humana	TFA: Àcid trifluoracètic
RNasa A: Ribonucleasa pancreàtica bovina	Thr: Treonina
rpm: Revolucions per minut	TOF: <i>Time of flight</i>
rRNase 1: Ribonucleasa 1 recombinant	Tris: Tris(hidroximetil)aminoetà
SDS: Dodecil sulfat sòdic	tRNA: RNA de transferència
Ser: Serina	U _L : RNasa de tipus secretori d'orina
SiaAc: Àcid siàlic	U _S : RNasa de tipus no secretori d'orina
SLe ^a : Antigen glucídic Sialil Lewis a	v/v: Proporció volum/volum
SLe ^x : Antigen glucídic Sialil Lewis x	w/v: Proporció pes/volum
SPG: <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Galactosidase</i>	×g: Força centrífuga relativa
TBST: Tampó Tris salí amb Tween-20	XMF: <i>Xanthomonas manihotis</i> <i>Fucosidase</i>
	Xyl: Xilosa

Índex de figures

1.1	Monosacàrids més habituals als glicoconjugats	3
1.2	L'enllaç glicosídic	4
1.3	Síntesi dels N-glicans	5
1.4	Tipus de N-glicans	6
1.5	Antígens glucídics tipus 1 i 2	7
1.6	Procés d'extravasació leucocitària	9
1.7	Disseminació i metàstasi del càncer	11
1.8	Localització de la glàndula pancreàtica	15
1.9	Incidència i mortalitat per càncer a la Unió Europea	17
1.10	Família de la RNasa A bovina	21
1.11	Estructura tridimensional de la RNasa 1	22
1.12	Quantificació dels nivells de RNasa 1 sèrica en diferents situacions patològiques	25
1.13	Estructures glucídiques principals de la RNasa 1 de pàncreas, Capan-1 i MDAPanc-3	27
3.1	Estructura de la reïna Cibacron blue 3GA	38
3.2	Gradient de pH dels gels d'isoelectroenfoc	47

4.1	Extraction protocols of RNase 1 from pancreas	71
4.2	Heparin chromatography of RNase 1 from healthy pancreas	72
4.3	Reverse phase chromatography Vydac C4 of RNase 1 from healthy pancreas	73
4.4	Extraction protocols of RNase 1 from pancreas	74
4.5	Different strategies used for serum depletion and RNase 1 purification.	75
4.6	Purification of serum RNase 1 from Pancreatic cancer B.	85
4.7	Electrophoresis of RNase 1 pure fractions.	86
4.8	NP-HPLC profiles of N-linked oligosaccharides of RNase 1 from Pancreatic cancer serum B.	88
4.9	Sequential exoglycosidase digestions of N-linked oligosaccharides of the high glycosylated RNase 1 from Pancreatic cancer A.	89
4.10	NP-HPLC profiles of N-linked oligosaccharides of RNase 1 from control serum A and EA.hy926.	93
4.11	2-DE of RNase 1 from healthy pancreas, control B, Pancreatic cancer A and endothelial cell lines conditioned media	94
4.12	NP-HPLC profiles of N-linked oligosaccharides of RNase 1 from control A and B, Pancreatic cancer A and B and EA.hy926.	96
4.13	Immunoblot analysis of RNase 1 from different origins before and after neuraminidase and N-glycosidase F treatment	115
4.14	Immunoblot detection of RNase 1 from human pancreas homogenate and Capan-1-conditioned media separated by 2-DE	116
4.15	Predominant glycan structures in RNase 1 serum according to Barrabés et al. (2007)	117
4.16	2-DE of high glycosylated, medium glycosylated and low glycosylated pure RNase 1 from Pancreatic cancer A	119
4.17	2-DE of a healthy donor's and two pancreatic cancer patients' sera . . .	121

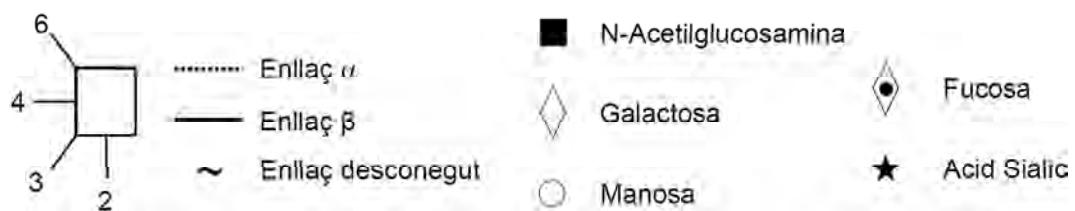
4.18	Immunoblot analysis of recombinant RNase 1 and unglycosylated RNase 1 from Pancreatic cancer A	123
4.19	Correlation between pI and neuraminic acid content for RNase 1	124
5.1	Resultats de la seqüenciació glucídica de la RNasa 1 sèrica de pacients sans i amb càncer de pàncreas	135
5.2	Electroforesi bidimensional de la RNasa 1 sèrica de pacients sans i amb càncer de pàncreas	137
5.3	Electroforesi bidimensional de la RNasa 1 de línies cel·lulars endotelials	139
5.4	Resultats de la seqüenciació glucídica de la RNasa 1 de la línia cel·lular endotelial EA.hy926	141
5.5	Contingut teòric d'àcid siàlic en la RNasa 1 en funció del nombre de dianes ocupades	145
5.6	Glycan sequencing results of RNase 1 from healthy controls and Pancreatic cancer patients	151
5.7	Two-dimensional electrophoresis of serum RNase 1 from healthy controls and PaC patients	153
5.8	Two-dimensional electrophoresis of RNase 1 from endothelial cell lines .	155
5.9	Glycan sequencing results of RNase 1 from EA.hy926 endothelial cell line	156
5.10	Sialic acid content in RNase 1 according to its site occupancy	160

Índex de taules

1.1	Els marcadors tumorals més utilitzats	14
1.2	Efecte del nivell de tall en la sensibilitat i especificitat del marcador tumoral CA 19-9	18
4.1	Summary of serum RNase 1 purification by Heparin chromatography. .	76
4.2	Summary of serum RNase 1 purification by Cibacron blue chromatography	77
4.3	Summary of serum RNase 1 purification by Mono-S and Heparin chromatography after Cibacron blue chromatography.	78
4.4	Glycans from RNase 1 from Pancreatic cancer B.	91
4.5	Correspondence between pI and NeuAc content in pure RNase 1 fractions from Pancreatic cancer A serum	119
4.6	Correspondence between pI and NeuAc content in RNase 1 fractions from healthy pancreas, Capan-1-conditioned media, control patients' sera, Pancreatic cancer patients' sera and endothelial cell lines conditioned media	122

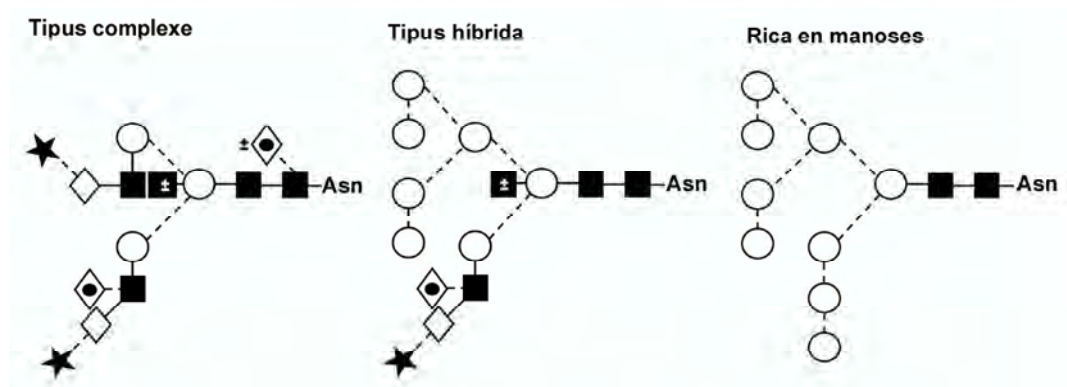
Símbols i representacions

Taula de símbols

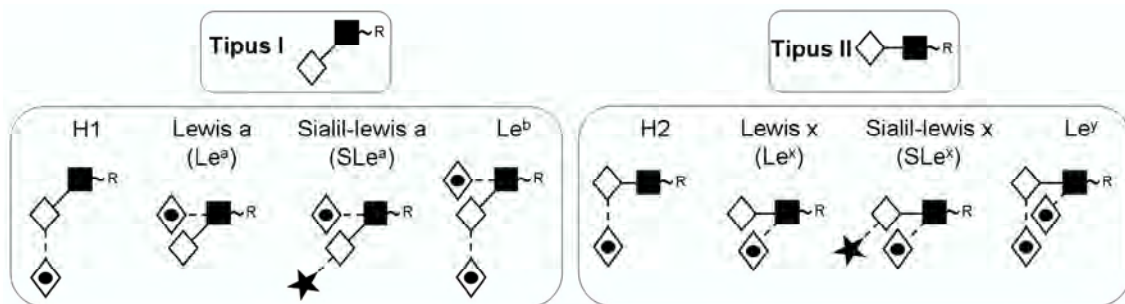


Símbols dels enllaços i monosacàrids que s'utilitzaran en les representacions posteriors.

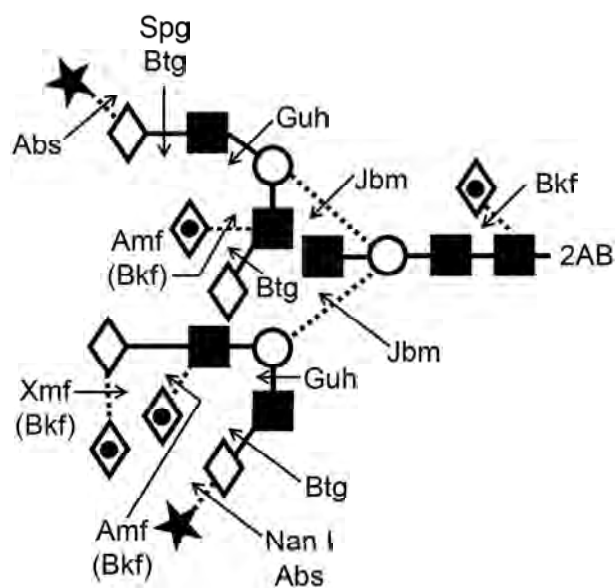
Tipus de N-glicans



Estructures tipus I i II, i antígenens Lewis



Enzims glicolítics



Principals estructures glucídiques de la RNasa 1 sèrica i endotelial



Resum

L'adenocarcinoma pancreàtic és una de les neoplàsies amb major taxa de mortalitat. El seu diagnòstic resulta difícil i no existeixen marcadors específics per aquest tipus de neoplàsia. Durant el procés de transformació tumoral que experimenten les cèl·lules canceroses, es produeix una alteració de la glicosilació dels diferents glicoconjugats de la cèl·lula. En aquest sentit, en aquesta tesi s'han estudiat possibles alteracions de les estructures glucídiques de la ribonucleasa pancreàtica humana (RNasa 1) present en sèrum amb l'objectiu de determinar el seu ús diagnòstic.

La RNasa 1 és una glicoproteïna amb tres dianes de N-glicosilació, expressada i produïda majoritàriament al pàncreas però que també és present a sèrum. Anteriorment a aquest treball s'havien descrit les estructures glucídiques de la RNasa 1 de pàncreas de donant sa i la RNasa 1 secretada per línies cel·lulars d'adenocarcinoma pancreàtic, i s'havien trobat diferències en el tipus d'estructures glucídiques presents en aquesta proteïna. Aquestes diferències són principalment la presència d'estructures neutres altament fucosilades en la RNasa 1 de pàncreas sa respecte estructures amb àcid siàlic (monosacàrid amb càrrega negativa) en les estructures de la RNasa 1 de línies de càncer de pàncreas.

Donats aquests precedents i tenint en compte que manca un marcador tumoral específic pel càncer de pàncreas, en aquest treball s'ha avaluat la glicosilació de la RNasa 1 sèrica de donants sans i pacients amb adenocarcinoma pancreàtic, per tal de determinar si les diferències a nivell glucídic abans esmentades són detectables també en la proteïna en sang, i si són de valor diagnòstic.

La RNasa 1 de dos individus sans i dos pacients amb adenocarcinoma pancreàtic es va purificar i els seus sucres es van caracteritzar mitjançant la combinació de cromatografia de fase normal i digestió amb enzims glicolítics específics, i per espec-

trometria de masses. Les principals estructures trobades van ser, tant per la RNasa 1 d'individus sans com de pacients, estructures biantenàries, mono- o di-sialidades amb presència o absència de fucosa α 1-6 en el *core* pentasacàrid (Fc). Malgrat la similitud en el tipus d'estructures, es va determinar que hi ha un increment del 40% d'estructures biantenàries amb Fc respecte estructures biantenàries sense Fc en la RNasa 1 de pacients amb adenocarcinoma pancreàtic. Aquest increment podria resultar ser d'ús diagnòstic, fet que es vol estudiar properament.

Les estructures trobades a la RNasa 1 sèrica difereixen de les prèviament descrites a la RNasa 1 de pàncreas sa. Donat que el patró de glicosilació és òrgan-específic, sembla que la RNasa 1 sèrica no tindria un origen majoritàriament pancreàtic. Per aquest motiu, en aquest treball s'ha determinat quin podria ser l'origen de la RNasa 1 sèrica.

Recentment s'havia descrit que les cèl·lules endotelials secretaven RNasa 1, la qual podria ser una font important de RNasa 1 sèrica. Per aquest motiu es va decidir avaluar la RNasa 1 de diferents línies cel·lulars endotelials per electroforesi bidimensional i comparar-la amb la RNasa 1 sèrica. Totes les línies cel·lulars endotelials van mostrar un patró bidimensional similar entre elles i també amb el patró que s'obté per la RNasa 1 sèrica. La RNasa 1 secretada per la línia cel·lular endotelial EA.hy926 va ser purificada i els seus glicans caracteritzats. Les principals estructures descrites van ser estructures biantenàries, mono- o di-sialidades amb presència o absència de Fc, i la proporció d'estructures biantenàries amb Fc respecte les mateixes estructures sense Fc corresponia a la trobada en la RNasa 1 sèrica de donants sans. Per aquest motiu, es conclou que l'endoteli és possiblement el màxim productor de RNasa 1 sèrica, encara que no es descarten altres orígens.

La descripció de l'efecte que tenen les modificacions post-traduccionals sobre una proteïna pot ser molt útil en estudis proteòmics, molt estesos actualment en la recerca de nous marcadors tumorals. Per aquest motiu, es va avaluar per electroforesi bidimensional la RNasa 1 procedent de mostres de diversos orígens que difereixen fonamentalment en el patró de glicosilació, en quan a la presència i absència d'àcid siàlic, per tal de determinar la influència del contingut en àcid siàlic de les seves estructures glucídiques sobre el pI de la RNasa 1. El coneixement de les estructures glucídiques de la RNasa 1 d'aquests diversos orígens va permetre correlacionar el contingut d'àcid

siàlic present a la RNasa 1 amb la disminució del pI que s'observa, i es va establir que aquesta disminució és d'aproximadament 0.25 unitats de pH per àcid siàlic addicionat. Aquesta informació pot ser útil per a la interpretació de mapes bidimensionals de la RNasa 1.

En el present treball s'han descrit les estructures glucídiques de la RNasa 1 sèrica i de línies cel·lulars endotelials. Això ha permès, d'una banda, determinar que hi ha un increment en la proporció d'estructures biantenàries amb Fc respecte les mateixes estructures sense Fc en la RNasa 1 sèrica de pacients amb càncer de pàncreas, fet que podria ser d'utilitat diagnòstica. D'altra banda, també s'ha determinat que l'origen de la RNasa 1 sèrica sembla ser principalment endotelial donada la gran similitud entre les estructures glucídiques descrites per la RNasa 1 sèrica i per l'endotelial. La RNasa 1 de diversos orígens també s'ha avaluat per electroforesi bidimensional i s'ha establert una correlació entre el contingut d'àcid siàlic i el seu pI, fet que pot ajudar en el futur a una millor comprensió i interpretació dels mapes bidimensionals d'altres glicoproteïnes.

Summary

Pancreatic adenocarcinoma has one of the highest mortality rates of all neoplasias. The diagnosis of this cancer is difficult and it has no specific markers. One of its features is that in the tumoral transformation process sustained by the cancer cells, there is an alteration in the glycosylation pattern of the different cell glycoconjugates. In this work, possible alterations in the glycan structures of human pancreatic ribonuclease (RNase 1) present in serum are investigated with the aim of determining its diagnostic utility.

RNase 1 is a glycoprotein with three N-glycosylation sites, expressed and produced mainly by the pancreas and also present in serum. Prior to this work, glycan structures of RNase 1 from a healthy donor pancreas and RNase 1 from pancreatic cancer cell lines had already been described. Differences in the type of glycan structures of this protein were found. These differences consisted mainly of the presence of highly fucosylated neutral structures in RNase 1 from a healthy pancreas and sialic acid (negatively charged monosaccharide) in the structures present in RNase 1 from pancreatic cancer cell lines.

Taking these results into account, together with the lack of a specific tumor marker for pancreatic cancer, this work consists in part of the evaluation of the glycosylation of serum RNase 1 from healthy donors and pancreatic cancer patients to determine whether the glycan differences previously observed can also be detected in the serum protein, and whether they are of a diagnostic value.

Serum RNase 1 from two healthy donors and two pancreatic cancer patients was purified and its glycans were characterized by a combination of normal phase chromatography and digestion with specific glycolytic enzymes, and by mass spectrometry. The main structures found were biantennary structures, mono- or di-sialylated with

or without fucose α 1-6 in the pentasaccharide core (Fc) for the RNase 1 from both healthy donors and pancreatic cancer patients. Although the structures found were very similar, there was a 40% increase in biantennary structures with Fc with respect to biantennary structures without Fc in the RNase 1 from pancreatic cancer patients. This increase might be of diagnostic utility, and will be further studied in the near future.

The structures found in serum RNase 1 were different from those previously described for RNase 1 from a healthy pancreas. Since the glycosylation pattern is organ specific, it seems that serum RNase 1's origins are not mainly pancreatic. Therefore, determination of the possible origin of serum RNase 1 is another aim of this work.

RNase 1 secretion by endothelial cells has been described recently, suggesting that endothelium might be the main producer of serum RNase 1. RNase 1 secreted by several endothelial cell lines was evaluated by two-dimensional electrophoresis and compared to serum RNase 1. RNase 1 from all the endothelial cell lines showed a similar two-dimensional pattern among themselves and also to that of serum RNase 1. RNase 1 secreted by the endothelial cell line EA.hy926 was purified and its glycans were characterized. The main glycan structures described were biantennary structures, mono- or bi-sialylated with or without Fc, and the proportion of biantennary structures with Fc with respect to those without Fc proved to be the same as found in serum RNase 1 from healthy donors. For this reason, it was concluded that endothelium is the main producer of RNase 1, although other origins cannot be ruled out.

The description of the effect of post-translational modifications in a protein can be of great utility in proteomic studies, which are widely used in the research of new tumor markers. For this reason, RNase 1 from several origins, differing in its glycosylation pattern (mainly in terms of the presence or absence of sialic acid) was evaluated by two-dimensional electrophoresis to determine the influence of the glycan structures' sialic acid content in the pI of RNase 1. The knowledge of the glycan structures of the RNase 1 from these different origins allowed us to correlate the sialic acid content present in RNase 1 with the observed pI decrease, and a decrease of approximately 0.25 pH units per molecule of sialic acid added was established. This information may be useful in the interpretation of RNase 1 two-dimensional maps.

This work describes the glycan structures of serum RNase 1 and RNase 1 from endothelial cell lines. This information allowed us to determine the increase in the proportion of biantennary structures with Fc with respect to those structures without Fc in serum RNase 1 from pancreatic cancer patients, which might be of diagnostic relevance. It was also possible to determine that endothelium is the main origin of serum RNase 1, based on the marked similarity between the glycan structures described for serum RNase 1 and those for endothelial RNase 1. RNase 1 from several origins was also evaluated by two-dimensional electrophoresis and a correlation between its sialic acid content and its pI established. This may be very significant for understanding and interpreting two-dimensional maps from other glycoproteins.

Capítol 1

Introducció

1.1 Glicosilació

La glicobiologia (estudi de l'estructura, la química, la biosíntesi i les funcions biològiques dels glicans i els seus derivats) ha estat, històricament, una de les grans desconegudes en les ciències naturals. En part, un dels motius pels quals havia estat poc considerada durant molt temps era la dificultat d'anàlisi de les seves estructures. La importància dels glicoconjugats (glicolípid i glicoproteïnes) en processos claus com la mobilitat cel·lular o les interaccions cèl·lula-cèl·lula o cèl·lula-matriu s'ha fet cada cop més evident, i ha impulsat aquest camp d'estudi. Actualment, ja s'inverteixen molts esforços econòmics i humans destinats a l'estudi de les característiques i funcions dels glicoconjugats, unes molècules amb un paper molt important en el funcionament dels organismes vius.

1.1.1 Els monosacàrids: la base per estructures més complexes

Els monosacàrids corresponen a les molècules de glúcids més simples, i poden arribar a tenir fins a 6 carbonis. Els monosacàrids de 5 i 6 carbonis formen una estructura cíclica per mitjà d'un enllaç hemiacetal intern, en condicions fisiològiques en solució. Els anells de 5 membres es coneixen com estructures furanosa, i els de 6 elements, com

estructures piranosa (Figura 1.1). Per cada monosacàrid, l'estructura que es forma depèn del pH, temperatura i dissolvent.

Els monosacàrids poden presentar diferents tipus de modificacions, algunes d'elles sovint també en aquells que formen part d'oligosacàrids i polisacàrids més complexes. És el cas dels aminosucres o dels monosacàrids amb grups carboxils.

Els monosacàrids més habituals en glicoconjugats animals són (Figura 1.1):

- Hexoses: Sucres de 6 carbonis com la Glucosa (Glc), Galactosa (Gal) o Manosa (Man).
- Hexosamines: Derivats de sucres simples amb un grup amino al carboni 2, com per exemple la glucosamina i la galactosamina (aminosucres presents en els polisacàrids naturals), i que poden estar també acetilats, com en el cas de la β -D-N-Acetilglucosamina (GlcNAc) o la β -D-N-Acetilgalactosamina (GalNAc).
- Desoxihexoses: Sucres de 6 carbonis neutres sense grup hidroxil en posició 6. Fucosa (Fuc).
- Pentoses: Sucres de 5 carbonis com la Xilosa (Xyl).
- Àcids siàlics: Família de sucres àcids de 9 carbonis, formada per més de 30 diferents variacions d'una estructura bàsica amb un grup carboxil al carboni 1. Sovint també presenten un grup N-Acetil en el carboni 5, però s'han descrit molts altres substituents que poden estar presents en altres carbonis i donar lloc als diferents membres de la família. El més comú és l'àcid N-Acetilneuramínic (NeuAc), que sovint s'anomena àcid siàlic de forma genèrica ja que és molt comú en els glicoconjugats de mamífers.
- Àcids Urònics: Hexoses amb un grup carboxílic en posició 6. Àcid glucorònic (GlcA) i àcid Idurònic (IdA).

Els monosacàrids s'uneixen entre ells per enllaç glicosídic (Figura 1.2), amb eliminació d'una molècula d'aigua. D'aquesta manera constitueixen, per combinació de més o menys unitats, la resta de glúcids complexes: polímers estructurals, polímers de reserva i glicoconjugats, aquests últims en combinació amb algun altre tipus de biomolècula tal com lípids (glicolípid) o proteïnes (glicoproteïnes).

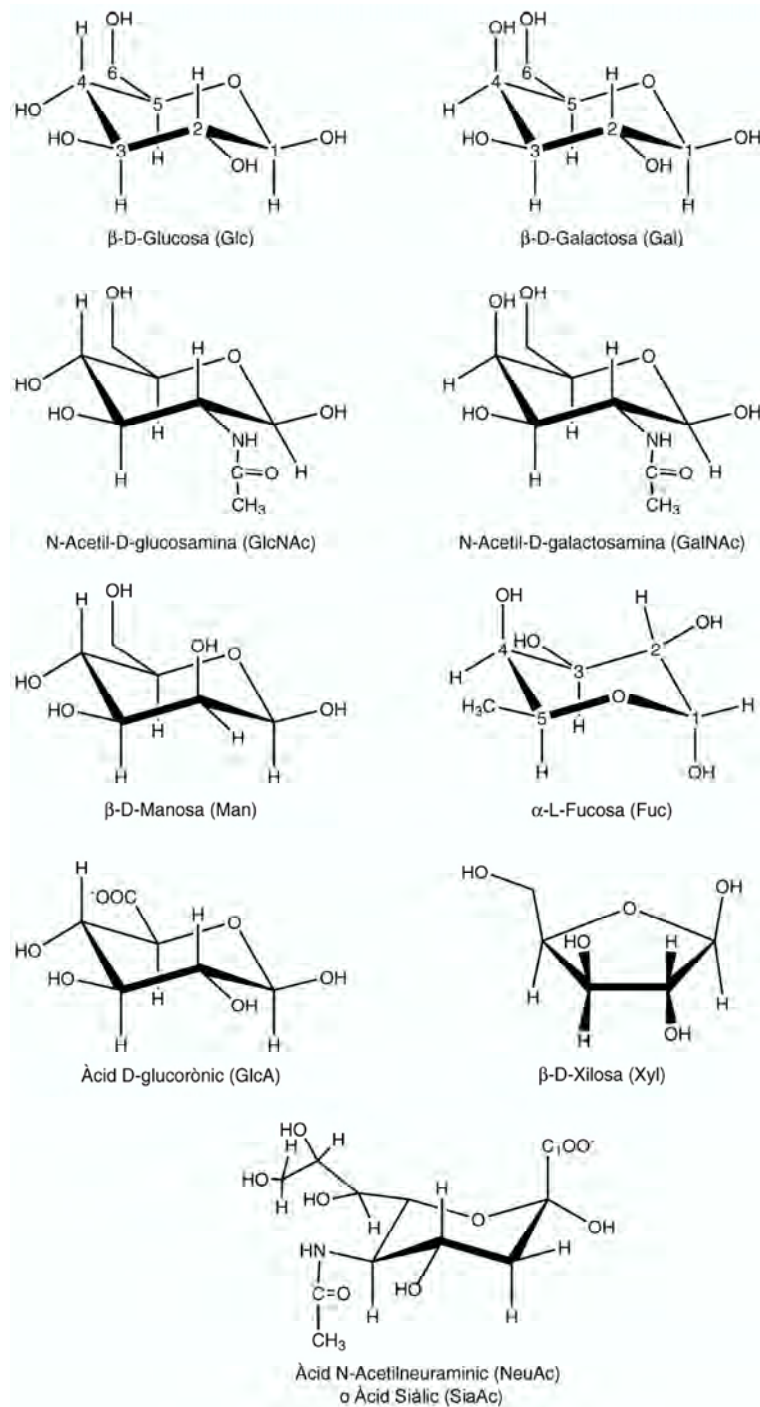


Figura 1.1: Estructura dels monosacàrids més habituals en glicoconjugats.

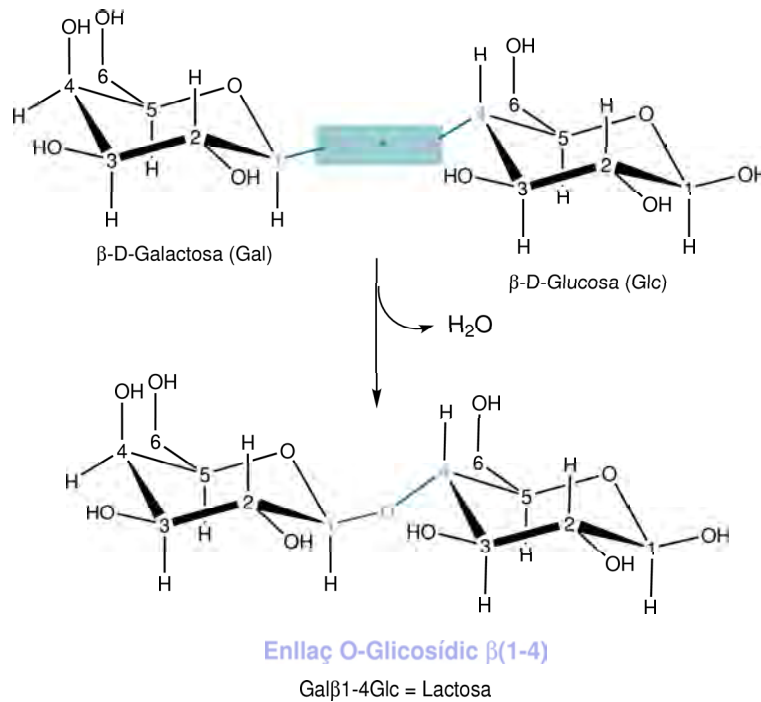


Figura 1.2: Formació d'un enllaç glicosídic entre dos monosacàrids.

1.1.2 Les glicoproteïnes

Moltes proteïnes de membrana i de secreció estan glicosilades. Les glicoproteïnes són elements de particular importància que inclouen proteïnes estructurals, molècules actives biològicament o lligands d'adhesió cel·lular (Brockhausen et al., 1998).

Existeixen dos tipus majoritaris d'estructures glucídiques en proteïnes eucariotes en funció del punt d'ancoratge de la cadena glucídica amb la cadena aminoacídica: N-glicans i O-glicans. Els N-glicans corresponen a glicoproteïnes amb un oligosacàrid unit a una Asparagina, en la seqüència Asn-X-Ser/Thr on X pot ser qualsevol aminoàcid excepte prolina. En els cas dels O-glicans, la unió és a una Serina o una Treonina, encara que en aquest cas no s'ha trobat cap seqüència o diana consens com a punt d'unió (Varki et al., 1999).

Els N-glicans

Les cadenes de N-glicans en les cèl·lules eucariòtes es sintetitzen al reticle endoplasmàtic i a l'aparell de Golgi (Figura 1.3), on es poden diversificar en estructures riques en manoses, híbrides o complexes (Figura 1.4). Totes aquestes estructures tenen una part comuna: un pentasacàrid (*core*) format per dos *N*-Acetilglucosamines i tres manoses. La unió a l'asparagina és a través de la *N*-Acetilglucosamina.

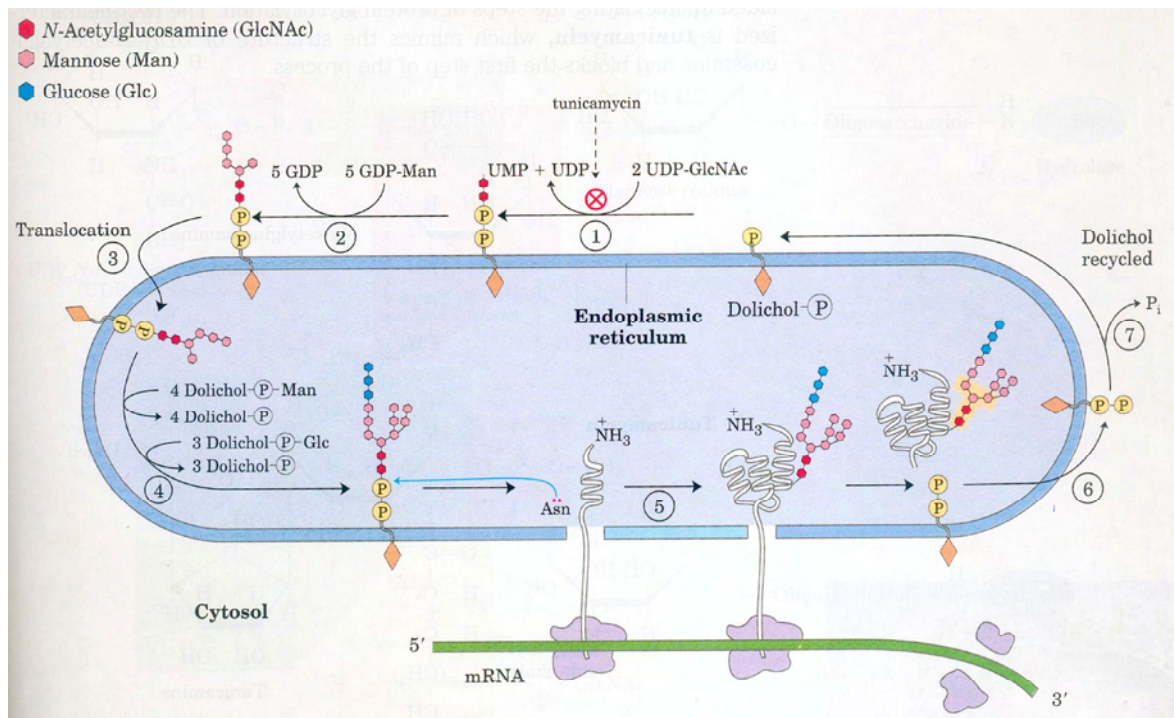


Figura 1.3: Inici de la síntesi dels N-glicans al Reticle Endoplasmàtic amb la incorporació del precursor oligosacàrid a la cadena polipeptídica naixent. 1 i 2. Formació del *core* oligosacàrid unit al dolicol a la cara citosòlica, 3. Translocació cap a l'interior del Reticle endoplasmàtic, 4. Continua la síntesi del *core* oligosacàrid unit al dolicol, 5. Transferència del *core* oligosacàrid cap a una Asparagina de la proteïna que s'està traduint, 6. El dolicol es transloca un altre cop cap al costat citosòlic i 7. es recicla el dolicol per tal d'acceptar una nova cadena naixent. Extret de Nelson and Cox, 2000.

La primera etapa de la síntesi dels N-glicans (Figura 1.3) és la formació d'un precursor dolicol unit a una cadena oligosacàrida. Es tracta d'un lípid de la membrana del reticle endoplasmàtic (dolicol) que porta unit un oligosacàrid de 14 residus. La síntesi d'aquest precursor s'inicia a la cara citoplasmàtica de la membrana del reticle endoplasmàtic amb l'addició d'una GlcNAc al dolicol activat (amb un grup fosfat). A a partir d'aquí, s'allarga per unió amb enllaç glicosídic amb una altra GlcNAc, una

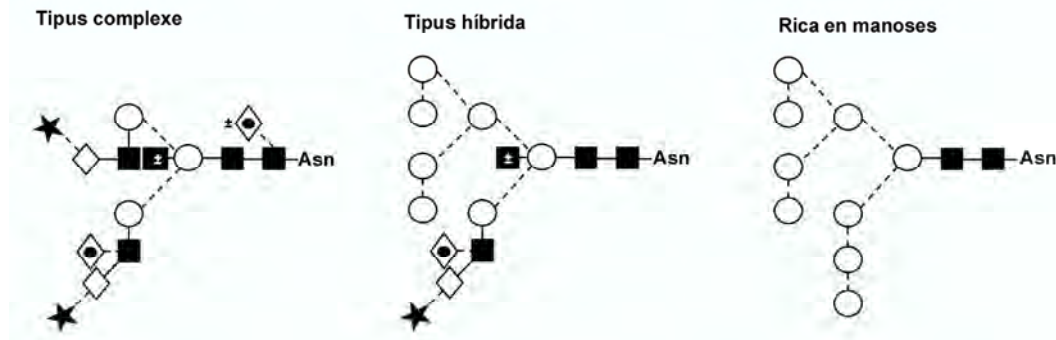


Figura 1.4: Esquema dels diferents tipus de cadenes de N-glicans (Asn: Asparagina). Els símbols i tipus d'enllaç es descriuen a la taula de símbols.

manosa i cinc manoses més, dues d'elles unides a l'anterior formant la primera ramificació que correspon al *core* pentasacàrid ($\text{Man}\alpha 1-3$ i $\text{Man}\alpha 1-6$), i les altres 3 unides a una de les branques formades (a la $\text{Man}\alpha 1-3$). La biosíntesi del precursor de la cadena oligosacàrida prossegueix amb el canvi d'orientació del precursor des de la cara citoplasmàtica cap a la cara interna (lúmen) de la membrana del reticle endoplasmàtic, i l'addició de quatre manoses més sobre el *core* pentasacàrid ($\text{Man}\alpha 1-6$, formant dues antenes). Posteriorment, s'addicionen tres glucoses sobre la branca que ja tenia les tres manoses ($\text{Man}\alpha 1-3$). L'estructura d'aquest precursor (el *core* pentasacàrid com a mínim) es mantindrà, en part, en les estructures glucídiques finals.

Un cop finalitzada la síntesi del precursor, la cadena oligosacàrida es transfereix des del precursor dolícol a una Asn de la cadena polipeptídica naixent, i el dolícol es recicla. Aquest oligosacàrid inicial unit a la proteïna plegada, perd les tres glucoses per acció de glucosidases específiques (aquest punt serveix de control de plegament proteic de les glicoproteïnes) i una manosa. La proteïna plegada i amb aquest oligosacàrid parcialment processat, passarà a l'aparell de Golgi on es pot marcar per ser enviada als lisosomes o, com a resultat de l'activitat de glicosiltransferases i glicosidases específiques, es diversificarà en els diferents tipus de N-glicans (Figura 1.4), el que explica l'elevat grau d'heterogeneïtat glucídica de les glicoproteïnes.

Les estructures N-glucídiques de tipus híbrid i complex sovint presenten la unió de residus de galactosa i *N*-Acetilglucosamina amb unió $\beta(1\rightarrow3)$ o $\beta(1\rightarrow4)$, que generen les estructures tipus 1 i tipus 2 respectivament (Figura 1.5). Aquesta estructura és un substrat que accepta múltiples modificacions posteriors que inclouen l'addició de fucoses i

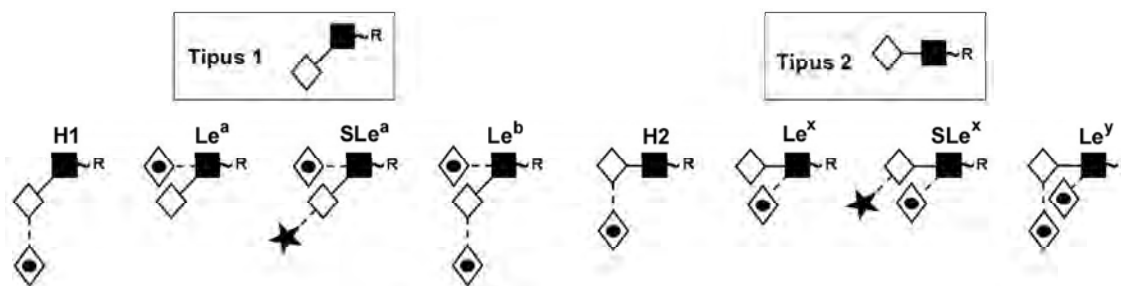


Figura 1.5: Antígens glucídics tipus 1 i 2. R fa referència a la cadena oligosacàrida. Els símbols i tipus d'enllaç es descriuen a la taula de símbols.

àcid siàlic donant lloc a antígens tipus Lewis que, segons la posició d'aquests residus, reben el nom de Lewis a (Le^a) i la seva forma sialidada (SLe^a), Lewis b (Le^b), Lewis x (Le^x) i la seva forma sialidada (SLe^x), i Lewis y (Le^y) (Figura 1.5). Aquestes estructures estan generades per l'acció de gens que codifiquen glicosiltransferases responsables de la glicosilació terminal de les cadenes de carbohidrats dels diferents glicoconjugats.

1.1.3 Importància de la glicosilació en els processos de mobilitat cel·lular i en els processos tumorals

L'alteració de la glicosilació dels glicoconjugats de membrana i de secreció en situació tumoral, és un fenomen àmpliament observat. En general, els N-glicans es troben més ramificats i sialidats en l'estat tumoral, com en el cas del càncer de colon i el de mama (Brockhausen et al., 1998). L'increment de les ramificacions implica un augment dels punts sialidables en el glicoconjugat, fet que es pot associar directament amb un fenotip metastàtic (Ørntoft and Vestergaard, 1999). La presència d'antígens sialidats sembla proporcionar major capacitat de migració a les cèl·lules tumorals per mimetització del procés d'extravasació leucocitària en processos infecciosos (Ørntoft and Vestergaard, 1999; Kaltner and Stierstorfer, 1998; Kim and Varki, 1997; Fukuda, 1996).

La migració dels limfòcits a un teixit particular (extravasació leucocitària o *homing*) es produeix gràcies a la presència de certes molècules d'adhesió en els limfòcits, i de lligands d'aquestes molècules en les cèl·lules endotelials dels llits vasculars (Figura 1.6). Aquestes molècules pertanyen a la família de les selectines (receptors i els seus lligands), integrines i la superfamília de les immunoglobulines. La família de les selectines juga

un paper en l'ancoratge inicial feble del leucòcit l'endoteli activat, mentre que les integrines i les molècules d'adhesió de la superfamília de les immunoglobulines són les responsables de l'adhesió forta i la transducció del senyal que permet que el leucòcit travessi l'endoteli i es dirigeixi al teixit diana (Geng, 2003).

En molts leucòcits s'expressa constitutivament la L-selectina, que reconeix lligands sialidats en les cèl·lules endotelials. En canvi, en l'endoteli vascular no s'expressen constitutivament molècules d'adhesió de la família de les selectines. El procés de migració dels limfòcits s'inicia per l'expressió en la superfície de les cèl·lules endotelials, de E- i P-selectines i de lligands per integrines induïda per les quimioquines produïdes als nòduls limfàtics i les zones d'inflamació (Kannagi et al., 2004; Abbas and Lichtman, 2003).

Paral·lelament, els limfòcits també pateixen una sèrie de canvis que inclouen l'expressió de lligands de E- i P-selectines. Els tres tipus de selectines requereixen com a lligand la presència d'un àcid siàlic i una $Fuc\alpha 1-3(4)$ propera. Aquesta estructura correspon a l'antigen carbohidrat SLe^x (i a l'antigen SLe^a , que és reconegut menys específicament). La presència d'aquests antigens, però, no és suficient per una interacció òptima de la selectina amb el seus lligands. La E-selectina s'uneix principalment a glicoproteïnes del leucòcit que continguin antigens SLe^x en un cert ordre, mentre que les L- i P-selectines requereixen ésters sulfat addicionals. La presència d'aquestes estructures sialidades i sulfatades permet al limfòcit unir-se a l'endoteli i migrar per entre les cèl·lules endotelials per introduir-se a l'àrea d'infecció (Abbas and Lichtman, 2003; Varki, 2007).

Les cèl·lules tumorals presenten sovint una sobreexpressió dels antigens Lewis ($\text{\O}rntoft$ and \Vestergaard , 1999). Concretament els antigens SLe^a i SLe^x (Figura 1.5) han estat identificats com a antigens tumorals ($\text{\O}rntoft$ and \Vestergaard , 1999; Varki et al., 1999; Dennis et al., 1999). La seva presència en la superfície de les cèl·lules tumorals els permet adherir-se també a l'endoteli per mitjà de la unió a selectines i, consegüentment, metastatitzar (\Brockhausen et al., 1998; \Gorelik et al., 2001). És per això que aquests antigens es correlacionen amb la progressió tumoral, la metastasi i una pobre prognosi en humans (Varki et al., 1999; Dennis et al., 1999). Les cèl·lules tumorals proporcionen els factors adequats a les cèl·lules endotelials per tal que puguin

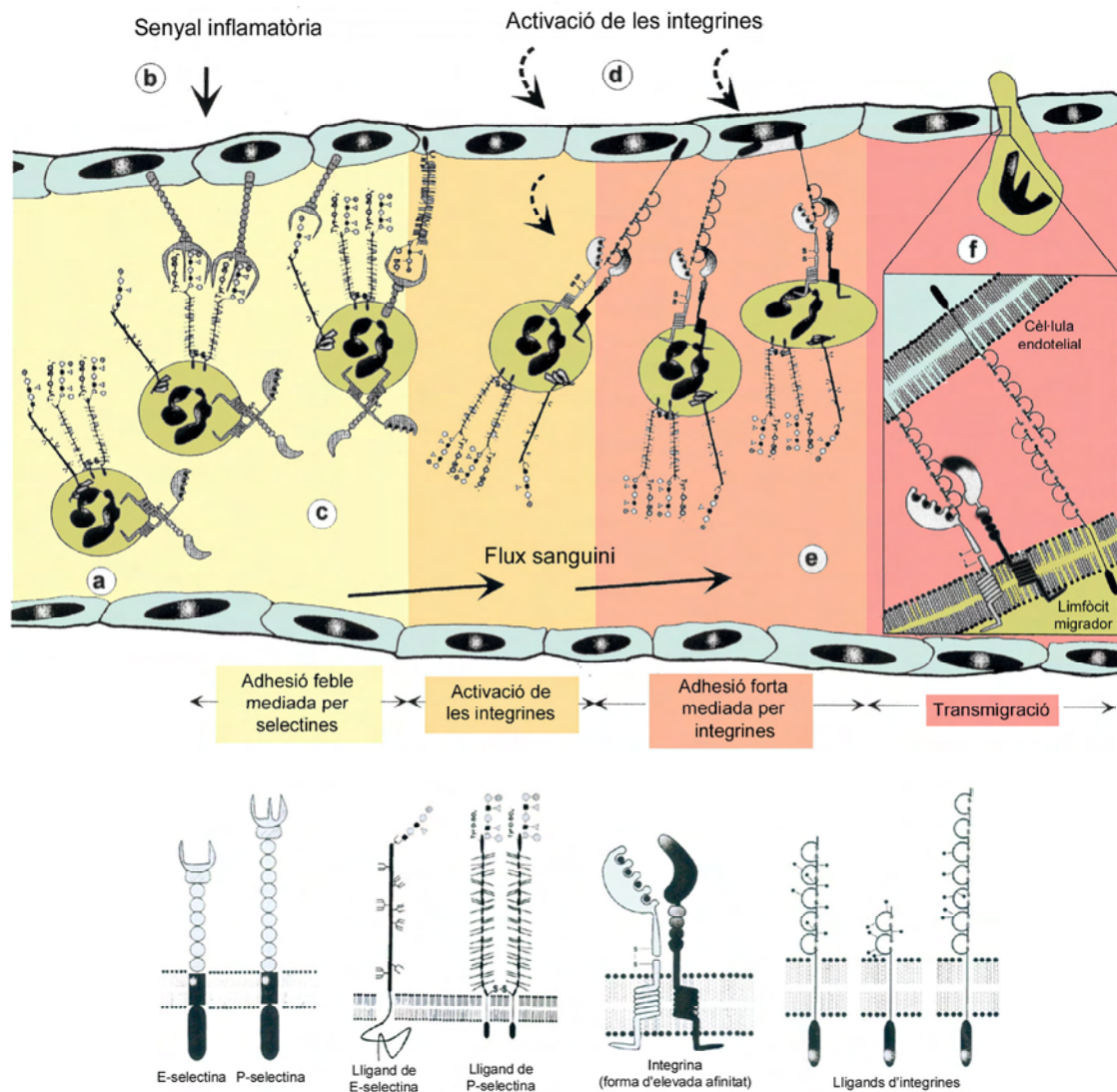


Figura 1.6: Esquema del procés d'extravasació leucocitària. Només es representa la interacció entre leucòcits i l'endoteli. a. Els leucòcits estan lliures en el torrent circulatori, i presenten lligands de selectines i integrines de baixa afinitat en la seva superfície. b. S'inicia la cascada d'adhesió. L'estímul inflamatori alliberat en el teixit afectat disminueix la velocitat del flux sanguini i incrementa l'expressió de E- i P-selectines en la superfície de les cèl·lules endotelials. c. Adhesió feble dels leucòcits a l'endoteli per interacció de les estructures oligosacàrides (tipus mucina i N-glicans) en la superfície del leucòcit amb les selectines de l'endoteli vascular. Això provoca que els leucòcits quedin frenats en la superfície de l'endoteli (*rolling circle*). d. Activació de les integrines del leucòcit. Les citocines inflamatòries provoquen un augment de l'afinitat de les integrines dels leucòcits per els seus lligands tipus immunoglobulina presents a la superfície de l'endoteli. e. Adhesió ferma de les cèl·lules gràcies a la interacció entre integrines del leucòcit i els seus corresponents lligands presents en les cèl·lules endotelials. f. Extravasació a través de les unions entre cèl·lules endotelials. Extret i modificat de Kaltner and Stierstorfer (1998).

sobreviure, proliferar i madurar, així com induir-hi la presència de E-selectines per mitjà de la secreció de certs factors humorals (Kannagi et al., 2004)

Aquests canvis a nivell de glicoconjugats de membrana són resultat d'un canvi en les glicosiltransferases tant a nivell de la seva expressió com de la seva activitat (Mas et al., 1998; Singhal and Hakomori, 1990).

1.2 El Càncer

El càncer és una de les principals causes de mort en els països occidentals juntament amb les malalties cardio-respiratòries. Aquesta malaltia, de gran incidència social, és cada cop més present en el nostre món cotidià i s'estima que arribarà a afectar un de cada dos homes i una de cada tres dones en un futur no molt llunyà (Hayat et al., 2007).

El càncer és un grup de malalties caracteritzades pel creixement excessiu i descontrolat de cèl·lules (neoplàsia o tumor benigne) que, en adquirir la capacitat invasiva, es desplacen cap a altres teixits i òrgans (metàstasi) i proliferen en ells (tumor maligne o càncer) provocant finalment la mort de l'individu (Figura 1.7). Els tumors originats per cèl·lules epitelials (carcinomes) representen el 90% dels càncers humans. Els adenocarcinomes (carcinomes d'organització glandular) són les neoplàsies amb major incidència social als països desenvolupats.

Els tumors provenen de la divisió descontrolada d'una única cèl·lula que, en aquestes successives divisions, pot adquirir millors característiques proliferatives a través de l'acumulació de mutacions. Així doncs, l'evolució tumoral a partir d'una sola cèl·lula fa que el tumor tingui característiques monoclonals. Les contínues divisions i l'acumulació de mutacions que modifiquen el fenotip cel·lular desemboquen en una competència entre les cèl·lules i una selecció favorable cap a aquelles capaces d'adaptar-se millor al seu entorn així com aprofitar-ne millor els recursos (factors de creixement, nutrients, etc). Successius cicles de divisió i supervivència dirigeixen la selecció cel·lular cap a un fenotip capaç de colonitzar altres teixits (metàstasi) i expandir-se formant altres nous focus de creixement descontrolat (tumors secundaris).

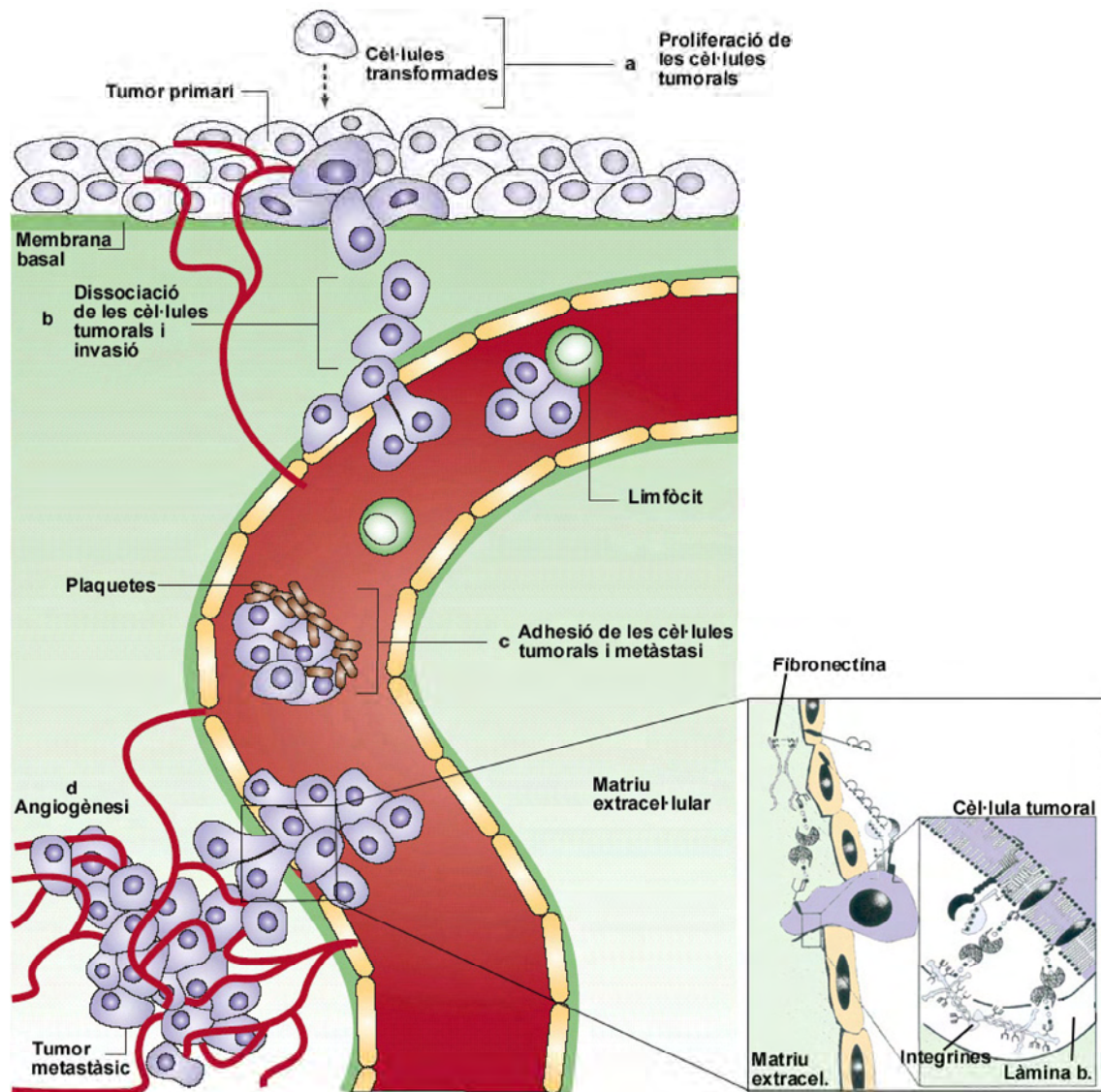


Figura 1.7: Esquema del procés de disseminació i metàstasi en un procés cancerós. a. La proliferació tumoral és un procés clau en els estadis inicials de la progressió. b. Durant la invasió tumoral, la cèl·lula adquireix la capacitat de degradar la membrana basal i la matriu extracel·lular, i migrar al seu través. c. Durant la disseminació de les cèl·lules tumorals en el torrent circulatori, aquestes agreguen tant amb leucòcits com amb plaquetes fins quedar atrapades en petits vasos i capil·lars d'altres òrgans. d. És necessària l'angiogènesi per al creixement patològic dels tumors primaris i les metàstasis. Extret i modificat de Fuster and Esko (2005) i Kaltner and Stierstorfer (1998).

La invasió de nous òrgans és un procés que implica moviment cel·lular però que no està regulat en les cèl·lules tumorals (en tumors sòlids) a diferència del que passa en altres tipus cel·lulars típicament mòbils (per exemple els leucòcits). Per tal de poder-se desplaçar, les cèl·lules tumorals necessiten abandonar una massa compacte cel·lular,

arribar al torrent circulatori i abandonar-lo per colonitzar un nou teixit. Aquest procés comprèn varies etapes: reducció de l'adhesivitat, degradació de la matriu extracel·lular i mobilitat cel·lular. Les cèl·lules tumorals amb gran capacitat invasiva tenen un elevat grau de mobilitat que les permet arribar a la circulació i disseminar-se, però per fer-ho cal que adquireixin la capacitat de vascularitzar el tumor. L'allargament dels capil·lars sanguinis per tal de formar nous vasos s'anomena angiogènesi i es produeix en resposta a certs senyals que poden venir de la pròpia cèl·lula tumoral. Un capil·lar existent pot emetre un pseudopodi que formarà un tub que s'anirà allargant per divisió de les cèl·lules endotelials fins trobar un altre capil·lar amb el que connectar i permetre el flux de sang.

En tots aquests processos, com ja ha estat esmentat, la glicosilació juga un paper molt important ja que és clau en la inducció de la invasió i la metastasi. Per exemple, la disminució de l'adhesivitat cel·lular mediada per integrines és deguda a l'alteració de la seva glicosilació (Gorelik et al., 2001).

També és una alteració comuna en la transformació tumoral l'increment de la branca β 6GlcNAc en les cadenes de N-glicans complexes, de la qual és responsable l'enzim GnT-V (Glucosaminil Transferasa V). La família d'oncogens Ets activen l'expressió d'aquest enzim i el fenotip resultant promou la metastasi (Hakomori, 2006; Gorelik et al., 2001).

Un altre canvi en la glicosilació cel·lular és, com ja ha estat esmentat, l'expressió dels antígens glucídics SLe^x i SLe^a. Aquests són epítops d'unió a E-selectines i són considerats antígens associats a tumors. La presència d'aquests epítops promou l'adhesió de les cèl·lules tumorals a les cèl·lules endotelials (cèl·lules que presenten les proteïnes E-selectines en la seva membrana cel·lular) (Hakomori, 2006) i juguen un paper important en processos de *homing* i metastasi en alguns teixits i òrgans (Gorelik et al., 2001).

També es creu que les cèl·lules tumorals podrien incrementar l'expressió d'E-selectines en les cèl·lules endotelials i augmentar així el potencial metastàtic de les cèl·lules tumorals (Gorelik et al., 2001).

1.2.1 Els marcadors tumorals

Els marcadors tumorals (MT) són molècules de característiques molt variables que són secretades per la pròpia cèl·lula tumoral o per altres cèl·lules en resposta al tumor (molècules produïdes pel teixit o pel sistema immunitari en resposta a la presència del tumor); i que es troben presents en quantitats més elevades del normal en la sang, l'orina o en els teixits. Reflecteixen el creixement i/o l'activitat del càncer, i permetrien determinar la presència, evolució o resposta terapèutica del tumor maligne.

Cal tenir en compte, en relació a la facilitat de detecció d'un MT, que idealment aquest serà produït en major quantitat com més gran sigui la massa tumoral, i que arribarà a la circulació en major proporció com més vascularitzat estigui el tumor. També serà més o menys fàcilment detectable en funció del tipus de procés d'eliminació que pateixi. Per exemple, alteracions de la funció biliar o urinària podrien produir falsos positius en MT que s'eliminen mitjançant aquesta via.

Els MT són útils per diagnosi (detecció de la presència d'un tumor), prognosi i/o resposta a un tractament (determinació de la malignitat o invasivitat d'un tumor, monitoratge d'un tractament o determinació de la presència de focus residuals després d'un tractament), *screening* (detecció inicial de la presència d'un tumor per anàlisi rutinari en la població) o teràpia (ús d'agents citotòxics biològicament actius capaços d'alterar el comportament de les cèl·lules neoplàsiques "in vivo").

El que determina si un marcador tumoral és útil o no és la seva sensibilitat i la seva especificitat. La sensibilitat és la capacitat del marcador de detectar la malaltia. D'altra banda, l'especificitat és la capacitat de diferenciar entre la situació patològica que s'està avaluant i qualsevol altra. Segons els valors d'especificitat i sensibilitat, els marcadors tumorals es classifiquen en:

1. MT d'elevada sensibilitat i elevada especificitat: Sempre indiquen la presència d'un tumor.
2. MT de sensibilitat i especificitat variable: La sensibilitat i especificitat són baixes en estadis inicials del tumor, però augmenta en estadis avançats indicant clarament la presència del tumor.

Marcador	Propietats	Valors ref.	Falsos positius	Indicacions
AFP α -fetoproteïna	Glicoproteïna amb gran homologia a l'albumina.	<10 ng /mL	Hepatopaties. Tirozinèmia hereditària.	Carcinoma hepatocel·lular i tumors germinals de testicle i ovari
HCG Hormona gonadotrofina coriònica	Fracció β de la Hormona gonadotrofina coriònica.	<2 U/mL	Gestació.	Tumors trofoblàstics i neoplàsies germinals de testicle i ovari (no seminomes)
B2 microglobulina	Cadena lleugera dels antigens d'histocompatibilitat tipus I.	2,3 mg/mL	Insuficiència renal.	Mieloma, limfoma
Antigen carbohidrat CA 15-3	Mucina identificada per anticossos monoclonals.	<35 U/mL	Hepatopaties cròniques. Insuficiència renal.	Carcinomes de mama i ovari
Antigen carbohidrat CA 19-9	Glicolipid que inclou el determinant antigènic del grup sanguini Lewis a.	<37 U/mL	Colèstasi. Insuficiència renal. Quists mucinosos	Neoplàsies digestives en especial pàncreas, carcinomes mucinosos i indiferenciats d'ovari
Antigen carbohidrat CA 125	Mucina identificada per anticossos monoclonals.	<35 U/mL	Endometriosi. Vessaments serosos. Insuficiència renal.	Carcinomes ovàrics, pulmonars i d'endometri
Antigen carbohidrat CA 549	Mucina identificada per anticossos monoclonals.	<13 U/mL	Hepatopaties cròniques. Insuficiència renal.	Carcinomes de mama i ovari.
Calcitonina	Hormona proteica (3.6 KDa) sintetitzada per les cèl·lules parafol·liculars del tiroides.	Homes <27 ng/mL Dones <17 ng/mL	Insuficiència renal.	Càncer medul·lar tiroides. Càncer de pulmó. Síndrome Zollinger-Ellison
CEA. Antigen Carcinoembrionari	Família de glicoproteïnes.	<5 ng/mL	Hepatopaties. Insuficiència renal. EPOC. Colitis ulcerosa.	Neoplàsies epitelials.
Cromogranina A CgA	Glicoproteïna àcida de 49 KDa present en les grànuls cromafins de les cèl·lules neuroendocrines.	<500 ng/mL	Insuficiència renal.	Tumors neuroendocrins.
CIFRA 21-1	Fragment de la citoqueratina 19.	<3.3 ng/mL	Hepatopaties. Insuficiència renal.	Neoplàsies epitelials.
C-erb B-2-neu	Oncoproteïna de 185 KDa induïda per l'oncògen del mateix nom.	<15 U/mL	Cirrosi hepàtica.	Càncer de mama.
5 HIA. 5 hidroxiindol acètic.	Metabolit de la Serotonina.	1-5 mg/24 hores	Factors alimentaris: café, alcohol, pinya, fruits secs, plàtans.	Tumors carcinoïdes, feocromocitoma.
MCA. Antigen associat a mucines	Mucina identificada per anticossos monoclonals.	<13 U/mL	Hepatopaties cròniques. Insuficiència renal.	Carcinoma de mama i ovari.
NSE. Enolasa específica de neurones	Dimer (gamma, gamma) de l'enolasa.	<14 /L	Neuropaties. Insuficiència renal. Hemòlisi.	Carcinoma microcític de pulmó. Tumor carcinoide. Neuroblastomes. Tumors de Wilms.
PLAP. Fosfatasa alcalina termostable.	Isoenzim termostable de la Fosfatasa alcalina.	>100 U/L	Fumadors	Seminomes testiculars. Carcinomes d'ovari.
PSA. Antigen prostàtic específic	Glicoproteïna amb activitat proteasa.	<4 ng/mL >70 anys, fins a 6.9 ng/mL	Hiperplàsia prostàtica. Prostatitis.	Càncer de pròstata.
SCC. Antigen associat als carcinomes escamosos.	Subfracció glicoproteica de l'antigen T4.	<2.5 ng/mL	Insuficiència renal. Psoriasis. Eczemes.	Carcinomes epidermoides
S-100.	Proteïna àcida nuclear dimèrica (BB) fixadora de calci.	<0.2 ng/mL	Insuficiència renal. Cirrosi hepàtica. Lesions cerebrals amb necrosi.	Melanoma maligne.
Mucina TAG 72	Glicoproteïna identificada per anticossos monoclonals	<6 U/mL	Insuficiència renal. Hepatopaties cròniques. Quists ovàrics.	Carcinomes digestius, ovàrics i pulmonars.
Glicoproteïna tiroïdal TG	Hormona glicoproteïna sintetitzada per la cèl·lula fol·licular del tiroides.	<27 ng/mL	Gestants (en l'últim trimestre). Tiroïditis subaguda. Adenoma tòxic tiroïdal. Síndrome de Goïtier.	Neoplàsies fol·liculars i papil·lars de tiroides.
TPA. Antigen polipeptídic tissular	Fragments de la citoqueratina 8, 18 y 19.	<75 U/mL	Hepatopaties. Insuficiència renal. Malalties infeccioses.	Neoplàsies epitelials.
TPS. Antigen polipeptídic tissular específic.	Fragment de la citoqueratina 18.	<75 U/mL	Hepatopaties. Insuficiència renal. Malalties infeccioses.	Neoplàsies epitelials.

Taula 1.1: Marcadors tumorals més utilitzats i principals característiques. Els valors de referència indicats són els valors normals (situació benigne). Extret i modificat de Molina and Filella (2003).

3. MT de sensibilitat variable i especificitat baixa: La sensibilitat varia segons l'estadi però l'especificitat és sempre baixa (pot ser present en diverses situacions fisiològiques), fins i tot en estadis avançats.

Els principals MT es descriuen a la taula 1.1.

1.2.2 El Càncer de pàncreas

El pàncreas és una glàndula aficrina (amb secreció exocrina i endocrina alhora) pròpia de la majoria dels vertebrats, que en l'home es troba situada en la cavitat abdominal (retroperitoneu). Està en contacte íntim amb l'estómac per la seva part superior, es troba unit al duodè, és proper a la melsa per la zona de la cua, al colon transvers per la zona de davant, i al ronyó i glàndula suprarenal esquerres (Figura 1.8). D'aspecte lobular i groguenc, es divideix en quatre regions: cap, coll, cos i cua; pot medir de 15 a 25 cm i pesar entre 70 i 150 g en l'individu adult. Descarrega a l'intestí prim el suc que segrega (suc pancreàtic). A nivell histològic es poden distingir conductes, acins, illots de Langerhans i els components vasculars i nerviosos.

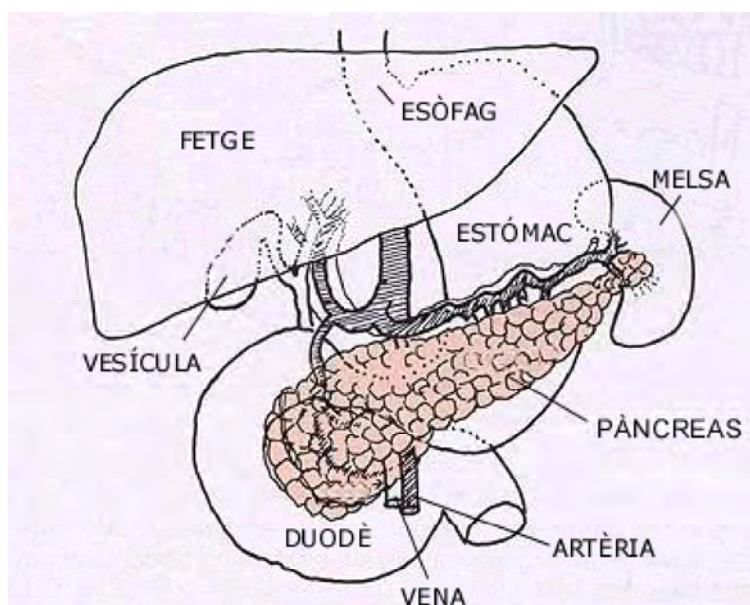


Figura 1.8: Localització de la glàndula pancreàtica a l'interior de la cavitat abdominal. Extret de la pàgina <http://www.diabetic.com/children/chapter3page3.htm>

Els seus tres compartiments cel·lulars principals (cèl·lules ductals, cèl·lules acinars i cèl·lules endocrines) tenen un origen embriològic comú tot i tenir estructures i funcions clarament diferents. Aquest fet és important ja que sovint es troben cèl·lules de diferent tipus dins un mateix tumor.

Les variants histològiques del pàncreas, com inflamacions, hiperplàsies o hipertròfies, poden tenir orígens diversos tot i que algunes d'aquestes formes són portadores de les mateixes alteracions genètiques que s'associen a carcinomes, com la mutació de l'oncogen K-ras (Uehara et al., 1996; Lüttges et al., 1999). Aquest fet fa pensar que aquests són estadis preneoplàsics més que processos reactius inocus (Yanagisawa et al., 1993; Cavestro et al., 2003).

Els càncers de pàncreas poden ser de tipus exocrí, endocrí o limfomes del pàncreas (extremadament inusuals) en funció del tipus cel·lular que origina el tumor. Els càncer endocrí (o neuroendocrí) està originat per les cèl·lules productores d'hormones, i els limfomes corresponen a tumors del sistema limfàtic en el pàncreas. Els càncers més habituals són els de tipus exocrí (originats en el pàncreas exocrí), dels quals la gran majoria són adenocarcinomes i, dins d'aquests, la majoria són d'origen ductal. La localització més habitual de l'adenocarcinoma pancreàtic és al cap del pàncreas, obstructint fàcilment el conducte biliar i pancreàtic. A més, les cèl·lules pancreàtiques tumorals poden envair fàcilment altres teixits, però la localització abdominal profunda d'aquesta glàndula fa difícil l'accés quirúrgic i l'obtenció de biòpsies, fet que dificulta la seva diagnosi.

Tot i que no existeixen dades recents d'incidència i mortalitat dels diferents tipus de càncer en la Unió Europea (les últimes dades són de la dècada dels 90), existeixen estudis d'estimació en funció de la projecció de les poblacions i taxes d'incidència i mortalitat estimades segons es descriu al projecte GLOBOCAN 2002 (Ferlay et al., 2004). La incidència estimada pel 2004 per al càncer de pàncreas (Boyle and Ferlay, 2005) és de 58.700 casos a la Unió Europea, ocupant el 12è lloc. La mortalitat s'estima en 61.100 casos, la 6a causa de mortalitat per càncer (Figura 1.9). Es tracta del càncer que presenta una pitjor prognosi donada la dificultat de diagnosi i l'extrema agressivitat. La simptomatologia del càncer de pàncreas és escassa en els estadis inicials de la malaltia i es pot confondre fàcilment amb altres tipus de patologies. Sovint es detecta la presència del càncer de pàncreas quan aquest ja està disseminat fet que limita molt la possibilitat de curació (Navarro et al., 2002). Per tot això, la taxa d'incidència és pràcticament idèntica a la de mortalitat, amb una supervivència als cinc anys que es situa entre el 1% i el 4% (García Sáenz, 1999).

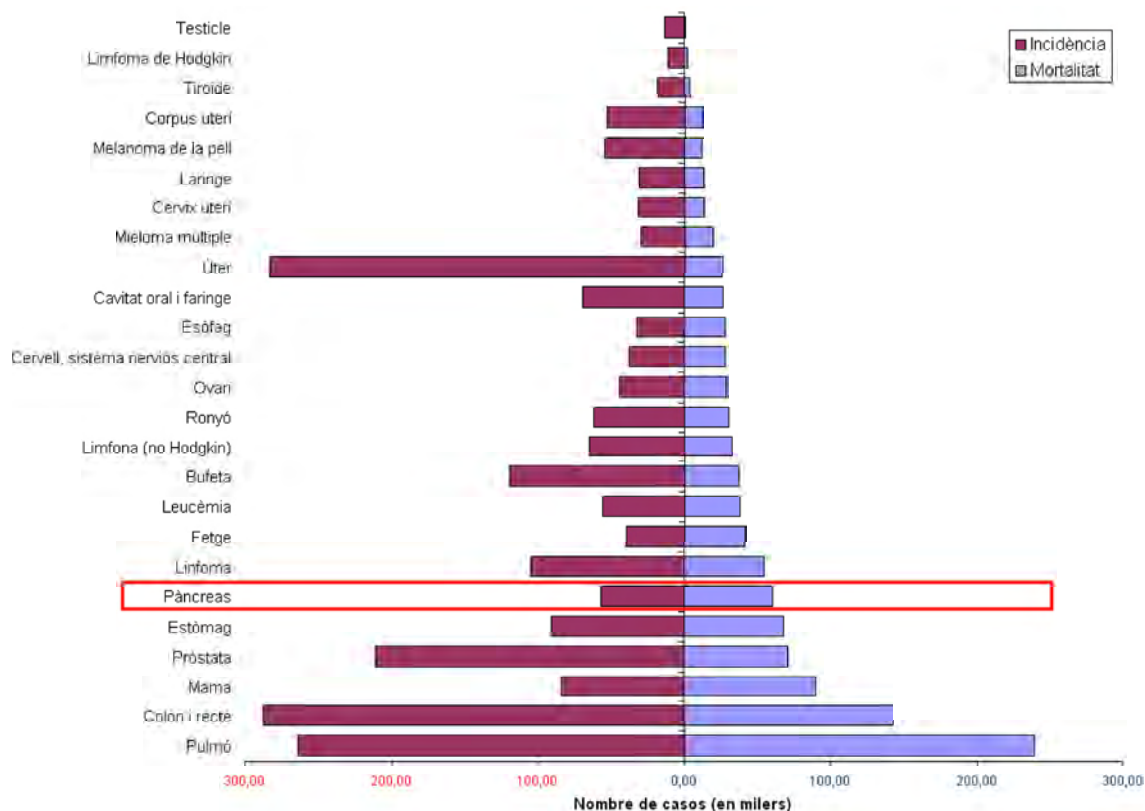


Figura 1.9: Incidència i mortalitat del càncer estimades en la Unió Europea (i incloent Islàndia, Liechtenstein i Noruega) pel 2004. Extret i modificat de Ferlay et al. (2004).

El grau de disseminació del tumor afecta directament al resultat en el tractament, de manera que la supervivència als cinc anys després de la resecció quirúrgica d'un tumor localitzat és del 20 % (amb una recurrència del 85% en casos només tractats amb cirurgia). No existeix cap tipus de teràpia curativa en càncer de pàncreas avançat. Per aquesta raó, és important trobar un sistema que permeti el diagnòstic precoç de la malaltia i incrementi les possibilitats d'èxit en el tractament (García Sáenz, 1999).

1.2.3 Marcadors tumorals pel càncer de pàncreas

Actualment s'utilitzen mètodes d'imatge complementats amb mètodes citològics per a diagnosticar el càncer de pàncreas. No existeixen MT precisos en aquest cas però també se n'utilitzen ja que tenen certa relació amb el pronòstic i resectabilitat del tumor (Navarro et al., 2002).

Un dels MT més utilitzats en el diagnòstic del càncer de pàncreas és l'antígen carbohidrat CA 19-9. Aquest antígen rep el nom de l'anticòs monoclonal que permet detectar-lo i es va obtenir per primer cop del medi de cultiu d'una línia cel·lular de carcinoma colorectal.

CA 19-9 (U/ml)	Sensibilitat (%)	Especificitat (%)
15	92	60
37	85	81
75	80	90
250	70	95
500	60	98
1000	40	99

Taula 1.2: Efecte del nivell de tall de les concentracions de CA 19-9 sèric en la sensibilitat i especificitat del diagnòstic del càncer de pàncreas. Extret de Navarro et al. (2002).

El CA 19-9 és una estructura carbohidrat (que es pot trobar tant en gangliòsids com en mucines) amb l'epítot SLe^a, pel qual d'un 5% a 10% de la població en són carents (no poden sintetitzar-lo per absència de la fucosiltransferasa codificada en el gen Le^a). Això fa que la seva sensibilitat màxima estigui fixada en el 90%–95%. Té una especificitat baixa ja que també es troba en altres malalties malignes així com en cèl·lules normals (teixits epitelials). També es troba augmentada en casos d'icterícia obstructiva, provocant un augment dels falsos positius (Ni et al., 2005). A més, cal tenir en compte que els valors de sensibilitat i especificitat depenen del nivell de tall (a partir de quina concentració de CA 19-9 es considera un valor fora del normal). El punt de tall utilitzat actualment en el diagnòstic del càncer de pàncreas és de 37 U/ml, que, com es pot comprovar en la taula 1.1, correspon a una situació de compromís entre els valors de sensibilitat i especificitat (taula 1.2).

També s'ha utilitzat l'antigen carcinoembrionari (CEA) per al diagnòstic del càncer de pàncreas però presenta gran variabilitat entre individus (Ørntoft and Vestergaard, 1999; Audisio et al., 1996). Es tracta d'una glicoproteïna d'elevada massa molecular que pot estar incrementada en diverses malalties benignes i diferents tumors epitelials (Molina and Filella, 2003), tot i que alguns estudis mostren una elevada especificitat pel càncer de pàncreas (94%) quan es situa el nivell de tall en 2.5 ng/ml (Yamaguchi et al., 2005).

En els últims anys, i a nivell experimental, s'han provat altres MT per al càncer de pàncreas. L'antigen carbohidrat CA 242 és un antigen expressat en la mateixa fracció

mucínica que el CA 19-9. No se n'ha establert encara la utilitat clínica encara que és més específic que el CA 19-9. En contraposició, sembla ser menys sensible (Navarro et al., 2002). S'ha suggerit el seu ús combinat amb l'antígen CEA per tal de millorar l'especificitat fins a un 92% (Ni et al., 2005).

L'antígen carbohidrat CA 494, glicoproteïna d'elevat pes molecular, té una sensibilitat elevada com el CA 19-9 però és més específic (Friess et al., 1993). Tot i que se n'han de realitzar més estudis, sembla que podria jugar un paper important en immunoteràpia (Eissa, 1995).

Més recentment s'ha avaluat l'ús del marcador RCAS1 (*Receptor-binding Cancer Antigen* expressat en les cèl·lules d'adenocarcinoma uterí SiSo). Ha estat identificat per immunohistoquímica en diferents teixits malignes de úter, endometri, ovari, pell, mama, fetge, vesícula, estómac, limfòcits, pulmó i pàncreas. S'ha determinat que es poden obtenir bons nivells de sensibilitat en combinació amb l'antígen CA 19-9 (95%) i d'especificitat en combinació amb l'antígen CEA (86%) (Yamaguchi et al., 2005).

1.3 Ribonucleases

1.3.1 Característiques principals

Les ribonucleases són enzims que catalitzen la degradació dels àcids ribonucleics i es troben àmpliament distribuïts en tots els éssers vius, ja que la seva funció és indispensable per al desenvolupament dels organismes (Beintema et al., 1988).

Concretament, es classifiquen els membres de la superfamília de la ribonucleasa A en base a l'actuació de la ribonucleasa A bovina (molt estudiada degut a la seva gran estabilitat i facilitat d'obtenció en grans quantitats). Es tracta d'una família d'enzims que degraden el RNA de manera específica per pirimidines, per l'extrem 3' de l'enllaç fosfodiéster escindit, amb una catàlisi àcid-base general que té lloc gràcies a dues histidines del centre actiu (Roberts et al., 1969).

Hi ha ribonucleases que poden actuar de manera general i d'altres que són més específiques, depenent de si necessiten reconèixer una seqüència nucleotídica determinada abans de començar la catàlisi enzimàtica (Deutscher, 1993).

1.3.2 Les ribonucleases humanes

L'interès per les ribonucleases humanes s'ha estimulat en els últims anys com a resultat d'un major coneixement de les seves activitats biològiques i possibles aplicacions terapèutiques (Schein, 1997). La família de les ribonucleases humanes es compon, fins al moment, de 13 membres que pertanyen a la mateixa superfamília donada l'elevada semblança en les seves seqüències aminoacídiques (en la figura 1.10 apareix la seqüència de les ribonucleases 2 a 13 comparada amb la seqüència de la RNasa 1) (Zhou and Strydom, 1993; Seno et al., 1995). Aquests membres són: la ribonucleasa 1 (RNasa 1), anomenada de tipus secretori o pancreàtic; la ribonucleasa 2, de tipus no secretori o neurotoxina derivada d'eosinòfil (EDN); la ribonucleasa 3 o proteïna catiónica d'eosinòfil (ECP); la ribonucleasa 4; la ribonucleasa 5 o angiogenina; la ribonucleasa 6 (k6), descoberta per Rosenberg and Dyer (1996), la ribonucleasa 7, amb activitat citotòxica; la ribonucleasa 8, específica de placenta; la ribonucleasa 9; i les ribonucleases 10 a 13, només descrites en humans a nivell de seqüència gènica.

Aquestes proteïnes amb activitat ribonucleolítica són inhibides fortament ($K_i 10^{-14}M$) per un inhibidor específic per a ribonucleases (PRI), que es troba en les cèl·lules, i que forma complexos de relació 1:1 amb totes les ribonucleases humanes (Hofsteenge, 1997).

La ribonucleasa 1, objecte d'aquest estudi (Figura 1.11), va ser seqüenciada per Beintema et al. (1984). Es tracta d'una proteïna formada per 128 aminoàcids, amb 4 ponts disulfur, i que difereix en 37 posicions de la ribonucleasa A de pàncreas boví. El seu pes molecular, per electroforesi en gel de poliacrilamida, és d'aproximadament 15000 Da. Pel que fa a l'activitat, aquesta ribonucleasa té major preferència pel substrat àcid policitidílic (poliC), que per el RNA o l'àcid poliuridílic (poliU) (Sorrentino and Libonati, 1997), i el seu pI teòric (calculat en base a la seqüència aminoacídica, en la base de dades Swiss-Prot) és 8.98.

Aquesta ribonucleasa humana de tipus secretori s'ha aïllat, principalment, de pàncreas (Weickmann et al., 1981), però també se'n troba a sèrum, ronyó, cervell (Weickmann and Glitz, 1982), a orina (Kurokawa et al., 1983), a saliva (Ruiz, 1997) i és secretada per cèl·lules endotelials (Landré et al., 2002; Moenner et al., 1997) entre d'altres òrgans, encara que en menor proporció. No està clar que la seva funció biològica sigui com a enzim digestiu, ni si en podria fer d'altres. Recentment s'ha des-

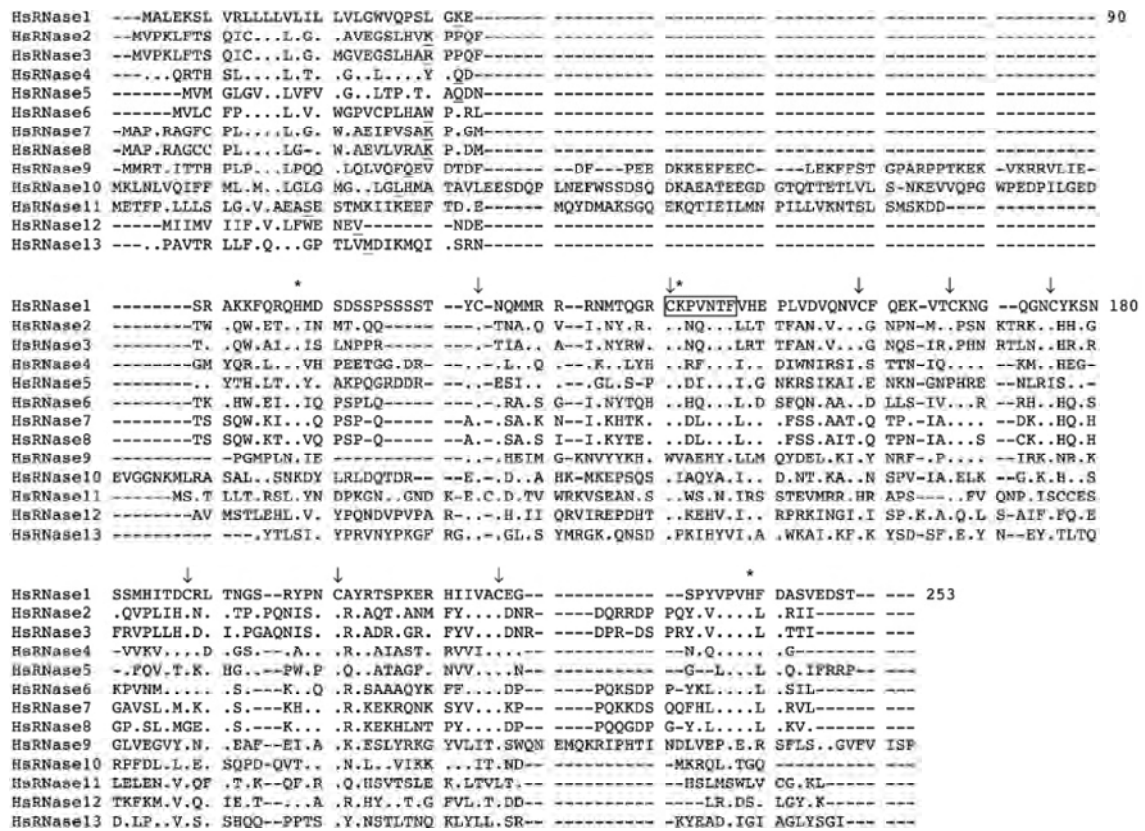


Figura 1.10: Alineació de la seqüència d'aminoàcids de les 13 ribonucleases humanes conegudes. Els guions indiquen un espai buit en l'alineament, i els punts indiquen la presència del mateix aminoàcid que en la RNasa 1. S'ha requadrat el motiu conservat CKXXNTF, les fletxes marquen les cisteïnes i els asteriscs marquen els residus catalítics. La numeració superior correspon a l'ordre dels residus aminoacídics de la ribonucleasa 1. Extret de Soochin et al. (2005).

crit l'acció de la RNasa 1 sobre la maduració de les cèl·lules dendrítiques del sistema immunitari i la seva inducció a produir citoquines i quimioquines inflamatòries. Per aquest fet, sembla que la RNasa 1 podria tenir un paper biològic diferent al digestiu relacionat amb el procés inflamatori (Yang et al., 2004).

Futami et al. (1997) i Fernández-Salas et al. (2000), van determinar, per transferència tipus Northern, els teixits humans on s'expressava ribonucleasa 1 i observaren la seva expressió a la majoria de teixits examinats (cor, cervell, placenta, pulmó, fetge, múscul esquelètic, ronyó, pàncreas, melsa, timus, pròstata, testicle, ovari, intestí prim i còlon) tot i que en diferents quantitats (s'expressa majoritàriament a pàncreas i no s'expressa als leucòcits circulants).

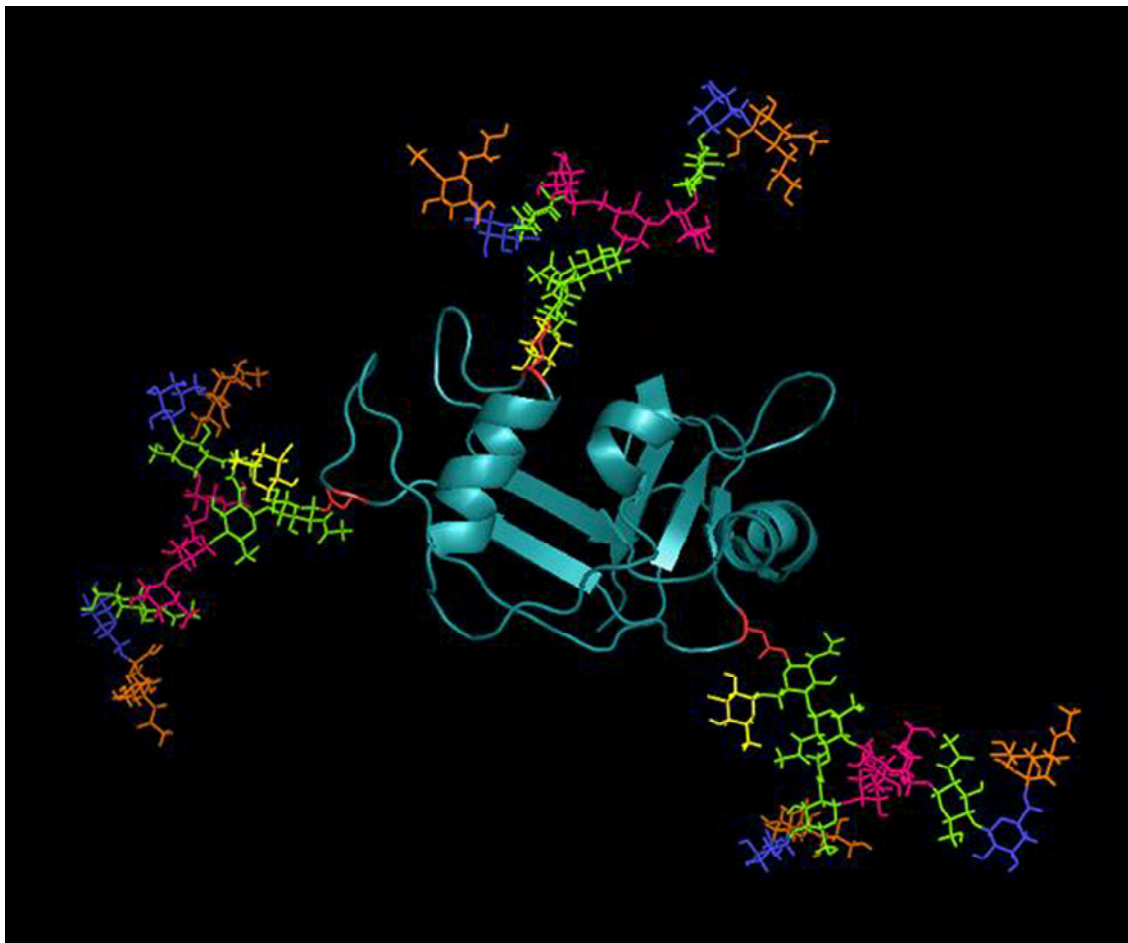


Figura 1.11: Estructura de la Ribonucleasa 1 humana sense els set primer aminoàcids (RNase1ΔN7) descrita per Pous et al. (2001). Unida a les tres dianes de N-glicosilació de la RNasa 1 s'ha modelat l'estructura glucídica FcA2G(4)2S(6)2, una de les predominants en la RNasa 1 sèrica, mitjançant l'eina de modelatge GlyProt accessible a la pàgina web <http://www.glycosciences.de>

1.3.3 Estudis previs de la Ribonucleasa 1 com a marcador del càncer de pàncreas

Des de que Zittle and Reading (1945) van detectar la presència de ribonucleasa en sang, molts autors han intentat determinar l'origen d'aquesta ribonucleasa i s'ha estudiat la seva utilitat diagnòstica pel càncer de pàncreas.

Migliarese (1958) va proposar que l'increment de l'activitat de la RNasa 1 en sèrum podria ser útil per al diagnòstic de processos tumorals.

Els estudis de Reddi and Holland (1976) mostraven que els nivells d'activitat ribonucleasa sèrica en front de poli-C com a substrat eren superiors en els pacients amb càncer de pàncreas que en individus sans o pacients amb pancreatitis o altres tipus de càncers. Aquest resultat els va portar a proposar el pàncreas com a font principal de ribonucleasa en el sèrum, en contraposició d'altres autors que indicaven els leucòcits com a possibles productors (Houck and Berman, 1958).

Al mateix temps, Akagi et al. (1976) van determinar que existien diferents formes de ribonucleasa bàsica en el sèrum que diferien en la seva massa molecular. Concretament, es van descriure 5 formes de massa molecular entre 8500 i 45000 Da.

La massa molecular no és l'únic punt de variabilitat en la ribonucleasa com van determinar Tournut et al. (1978) avaluant les formes de la ribonucleasa present en el suc pancreàtic mitjançant isoelectroenfoc. Amb aquesta tècnica es van poder determinar 4 formes de diferent punt isoelectríc (pI), corresponent a pI 7.87, 7.52 (majoritàries), 7.25 i 6.90 (minoritàries).

Posteriorment, Peterson (1979) va avaluar els resultats de Reddi i Holland amb el mateix assaig enzimàtic. En aquest cas els grups d'estudi incloïen pacients afectats de pancreatitis, càncer de pàncreas, malalties no pancreàtiques i insuficiència renal, així com individus control. En aquest estudi els resultats van mostrar que són els pacients amb insuficiència renal els que presenten majors nivells de RNasa 1 en sèrum, i que en el cas de les altres patologies no existia un increment significatiu de RNasa 1 sèrica respecte els individus control. Peterson també va avaluar els nivells de RNasa 1 en sèrum després de la pancreatòctomia total (resecció quirúrgica de la totalitat del pàncreas) i va comprovar que no existien diferències en els nivells de RNasa 1 després de 1 o 2 setmanes de l'operació. D'aquesta manera es posava en dubte l'origen pancreàtic de la RNasa 1 sèrica.

Al 1981, Isaacs va comparar la RNasa 1 de pàncreas d'autòpsia, de suc pancreàtic i de sèrum a nivell d'activitat. La RNasa 1 dels diferents orígens presentava lleugeres diferències en front de diferents condicions de l'assaig de manera que la RNasa 1 de pàncreas era més sensible al pH i la temperatura que la de sèrum, tot i que això semblava ser degut a la presència de proteases. Alhora, la ingesta i conseqüent secreció de suc pancreàtic no provocava un increment dels nivells de RNasa 1 en sèrum, de

manera que no semblava possible que la RNasa 1 de sèrum provingués de la secreció pancreàtica d'enzims digestius.

Altres estudis duts a terme com el de Corbishley et al. (1982), mesurant l'activitat de la RNasa 1 en sèrum, també indicaven poques diferències entre pacients de càncer de pàncreas i individus controls o altres malalties (pancreàtiques o no). Tampoc es van observar canvis en el nivell de RNasa 1 sèrica associats al tractament quimioterapèutic dels pacients amb adenocarcinoma pancreàtic.

Paral·lelament, es va determinar la presència de dos tipus de ribonucleases diferents a l'orina (Kurokawa et al., 1983). Aquests dos tipus de RNases es van diferenciar com a RNasa de tipus pancreàtic (U_L) o de tipus hepàtic (U_S) mitjançant anticossos específics contra aquests dos tipus de ribonucleases. Es van determinar 4 formes de RNasa U_L i una única forma de RNasa U_S . Aquestes formes corresponien a 4 de les 5 RNases alcalines o bàsiques i la RNasa àcida descrites en sèrum per Akagi et al. (1976).

Els anàlisis de RNasa 1 en sèrum fets fins al moment havien estat sempre assajos d'activitat. Posteriorment es van determinar els nivells de RNasa 1 sèrica per mètodes immunològics. Així, Weickmann et al. (1984) van establir un protocol de quantificació per radioimmunoassaig (RIA) amb el que es va determinar la quantitat total d'enzim en el sèrum d'individus sans i pacients amb diferents tipus de càncer o insuficiència renal (Figura 1.12). Aquest estudi demostrava que els nivells de RNasa 1 en sang augmenten amb l'edat i que la determinació de la quantitat de RNasa 1 total, no era un bon marcador per al càncer de pàncreas, alhora que es suggeria que la raó per la qual s'acumula RNasa 1 en sèrum en els pacients és deguda a un mal funcionament del ronyó en estat patològic, i que la RNasa 1 sèrica podria provenir de diversos òrgans donat que és present en molts teixits diferents.

Kurihara et al. (1984) també van desenvolupar un mètode de quantificació de la RNasa 1 sèrica per RIA arribant a conclusions similars a les de Weickmann et al. (1984).

Finalment, Kemmer et al. (1991) va comparar els nivells de RNasa 1 sèrica per activitat contra tRNA i poli-C, tenint en compte els factors edat, sexe i insuficiència renal, en pacients de pancreatitis aguda intersticial, pancreatitis aguda necròtica, pancreatitis crònica i càncer de pàncreas. Es van observar nivells superiors al normal (individus sans) en la pancreatitis aguda amb necrosi, la pancreatitis crònica i el càncer

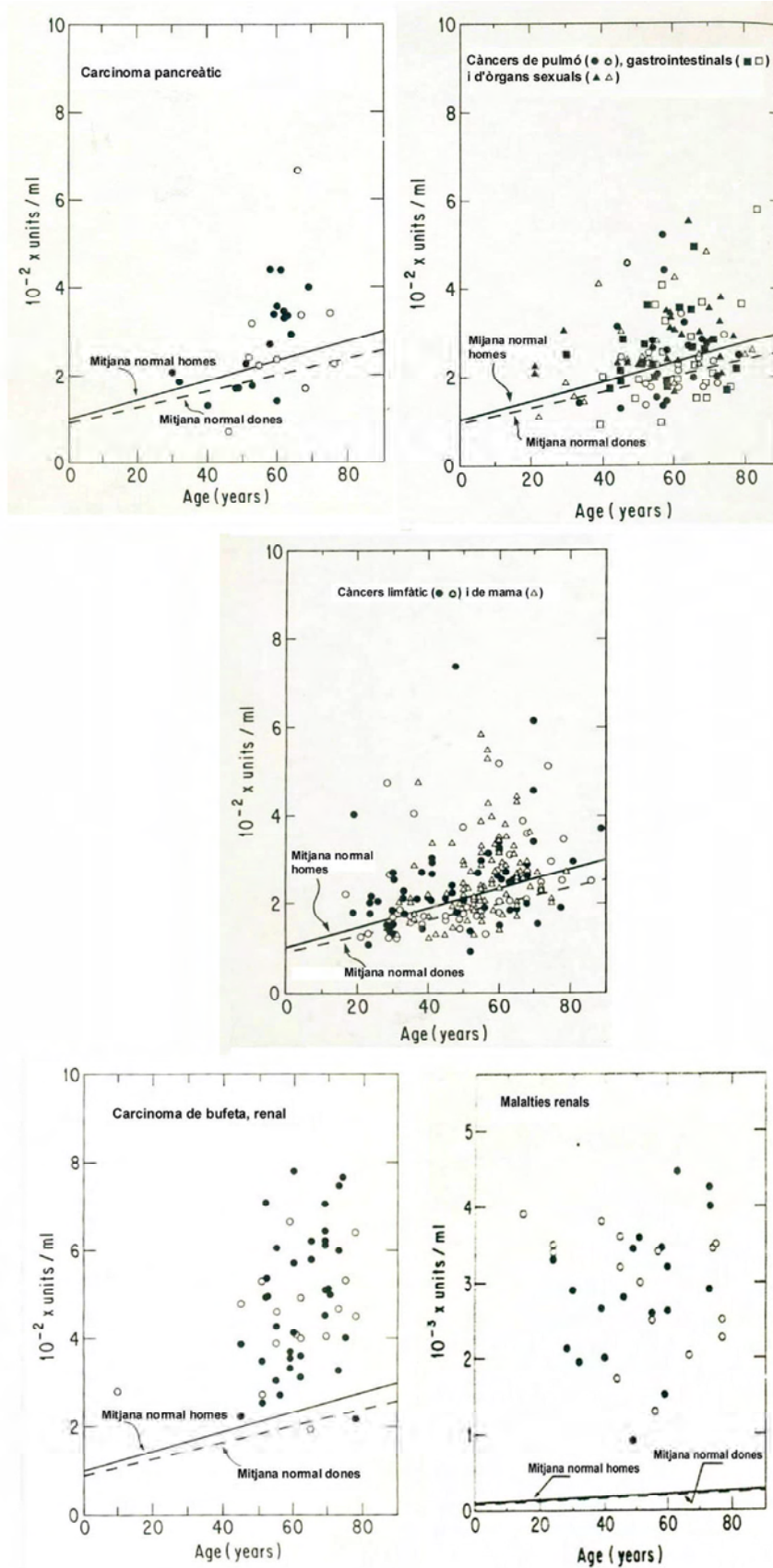


Figura 1.12: Assaig radioimmunitàtic (RIA) dels nivells de RNasa 1 en sèrum de pacients amb diferents tipus de afeccions. Extret de Weickmann et al. (1984).

de pàncreas, tot i que hi havia un elevat grau de solapament en els valors obtinguts per les tres malalties, de manera que els feia poc útils pel diagnòstic.

Així doncs, després de molts estudis per avaluar els nivells de RNasa 1 en sèrum tant per activitat com per tècniques immunològiques, la conclusió clara és que els nivells de RNasa 1 en sèrum augmenten amb l'edat, estan incrementats en diverses malalties (entre elles el càncer de pàncreas) però la seva determinació no és prou sensible ni específica per poder-se utilitzar com a marcador tumoral. Alhora, cap dels estudis citats aportava alguna dada clara sobre l'origen de la RNasa 1 sèrica, encara que s'apuntava a diferents possibles orígens com el pancreàtic. Aquesta hipòtesi, però, era rebatuda al comprovar que la RNasa 1 es manté present en sèrum després d'una pancreatectomia total (Peterson, 1979).

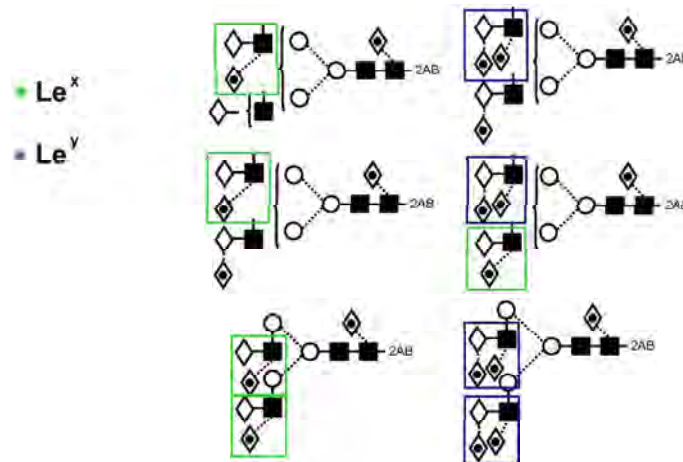
1.3.4 La glicosilació de la Ribonucleasa 1

La ribonucleasa 1 present als diferents òrgans i fluids humans és una glicoproteïna amb tres dianes de N-glicosilació (Asn-34, Asn-76, Asn-88), que poden presentar diferents cadenes glucídiques en funció del teixit de procedència. Thomas et al. (1984) van determinar que la RNasa 1 de sèrum d'individus sans donava un patró de bandes complexe en ser separades per isoelectroenfoc. Aquesta complexitat es reduïa fins a una banda majoritària de pI 9.5 després del tractament amb neuraminidasa, fet que indicava que aquesta proteïna està sialidada en diferents graus.

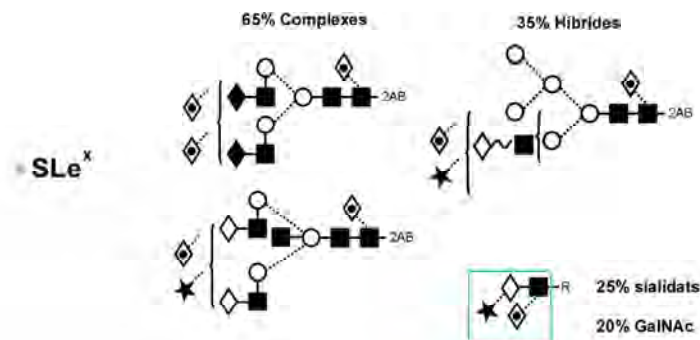
Estudis previs duts a terme sobre la ribonucleasa 1 de pàncreas mostren que està glicosilada en el 93% de les molècules (Yamashita et al., 1986). La taxa d'ocupació de cada una de les dianes de glicosilació de la RNasa 1 és diferent. L'Asn-34 es troba gairebé sempre ocupada, l'Asn-76 ho està aproximadament en el 50 % de les molècules i l'Asn-88 ho està en molt baixa proporció (Ribó et al., 1994). Yamashita et al. (1986) van determinar, mitjançant cromatografia d'afinitat a lectines, que la RNasa present en els diferents òrgans i teixits humans presenta diferents cadenes glucídiques, i que aquestes diferències són organo-específiques.

Mitjançant estudis d'anàlisi de carbohidrats de la RNasa 1 (Ribó et al., 1994) així com per seqüenciació glucídica i espectrometria de masses (Peracaula et al., 2003a), s'ha determinat que la RNasa 1 de pàncreas no conté àcid siàlic i presenta estructures

Estructures majoritàries de la RNasa 1 de pàncreas sa



Estructures majoritàries de la RNasa 1 de Capan-1



Antígen majoritari a la RNasa 1 de MDA-Panc3



Figura 1.13: Estructures glucídiques majoritàries de la RNasa 1 purificada de pàncreas sa i de les línies d'adenocarcinoma pancreàtic Capan-1 i MDAPanc3 (Peracaula et al., 2003a).

tipus complex amb elevat grau de fucosilació. Estudis emprant tècniques d'ELISA i *Western blot* amb anticossos contra diferents antígens sanguinis del tipus Lewis (tipus a, b, y, x, SLe^a i SLe^x) han determinat la presència d'estructures Le^y en la RNasa 1 procedent de teixit pancreàtic sa (Figura 1.13) (Fernández-Salas et al., 2000; Peracaula et al., 2003a).

La glicosilació descrita en la RNasa 1 procedent de les línies tumorals d'adenocarcinoma pancreàtic Capan-1 i MDA-Panc-3 és significativament diferent a la descrita

per la RNasa 1 procedent de pàncreas sa. Per seqüenciació glucídica i espectrometria de masses s'ha descrit la presència d'estructures híbrides i d'àcid siàlic donant lloc als antigens SLe^x i SLe^a en la RNasa 1 secretada per les línies d'adenocarcinoma pancreàtic Capan-1 i MDA-Panc-3 respectivament. Aquest extrem s'ha confirmat mitjançant ELISA i *Western blot*. Mitjançant ELISA sobre cèl·lules fixades (mètode immunològic de detecció d'un antigen determinat sobre la superfície de cèl·lules en cultiu amb l'ús d'anticossos) es comprovà que els antigens SLe^x i SLe^a presents en la RNasa 1 d'origen tumoral, també es troben en els glicoconjugats de la superfície cel·lular de les corresponents cèl·lules tumorals Capan-1 i MDA-Panc-3 (Peracaula et al., 2003a).

La diferència entre la RNasa aïllada de situació normal i la procedent de línies tumorals, rau bàsicament en la presència d'una sèrie d'antigens glucídics fucosilats i sialidats, on aquests últims aporten càrrega negativa. La presència de la càrrega negativa fa que el punt isoelèctric de la proteïna en situació tumoral sigui inferior al de la proteïna glicosilada en situació normal, aspecte que es pot avaluar per isoelèctroenfoc o per electroforesi bidimensional. S'han separat per isoelectroenfoc les ribonucleases de suc pancreàtic en situació normal i tumoral, i s'obtenen formes minoritàries de punt isoelèctric menor en situació tumoral (Tournut et al., 1978).

Les diferències observades en la glicosilació de la RNasa 1 de línies de carcinoma pancreàtic i de pàncreas sa, obre la possibilitat d'utilitzar aquestes variacions per diferenciar la situació tumoral de la normal. Els estudis de Nan et al. (1998) ja mostraven, mitjançant cromatografia d'afinitat per lectines, una RNasa 1 amb glicosilació alterada en sèrum de pacients d'adenocarcinoma pancreàtic, no present en el sèrum d'individus sans. Aquesta glicosilació aberrant corresponia a una disminució en el contingut de manoses i un increment en el nombre d'antenes i de la branca β 4GlcNAC (*bisecting*).

El coneixement exacte de les estructures glucídiques de la RNasa 1 de sèrums de pacients amb càncer de pàncreas i d'individus control permetrà avaluar si existeixen diferències significatives entre elles que puguin ser útils per identificar la situació tumoral. D'altra banda, també aportarà informació sobre l'origen o principals òrgans d'origen de la RNasa 1 sèrica.

Capítol 2

Objectius

S'estudia la glicosilació de la ribonucleasa pancreàtica humana (RNasa 1) de sèrums humans i la presència d'estructures carbohidrat alterades en càncer de pàncreas.

Per tal de poder aconseguir aquest objectiu, l'estudi s'ha centrat en diversos apartats cadascú dels quals es presenta com a un capítol de resultats:

- Purificació de la RNasa 1 de diferents orígens per al seu posterior anàlisi per electroforesi bidimensional o seqüenciació glucídica.
- Determinació de l'origen de la RNasa 1 sèrica i avaluació de la seva idoneïtat com a marcador tumoral del càncer de pàncreas.
 - Anàlisi glucídic de les estructures glucídiques de la RNasa 1 de sèrum d'individus sans i pacients amb càncer de pàncreas per tal de determinar possibles diferències entre les seves estructures carbohidrat.
 - Anàlisi glucídic de les estructures glucídiques de la RNasa 1 de medi condicionat de cèl·lules endotelial EA.hy926 per tal d'establir l'origen de la RNasa 1 sèrica per mitjà de l'organoespecificitat de les estructures carbohidrat.
- Anàlisi de la ribonucleasa sèrica parcialment purificada de sèrum d'individus sans i pacients amb adenocarcinoma pancreàtic per electroforesi bidimensional per tal de:
 - Detectar diferències entre les isoformes de la RNasa 1.

- Establir l'efecte en el patró bidimensional de la càrrega negativa aportada per el monosacàrid àcid siàlic al global de la glicoproteïna.

Objectives

The glycosylation of human pancreatic ribonuclease (RNase 1) from human sera and the presence of altered carbohydrate structures in pancreatic cancer have been studied.

With this aim, the study has been focused on different sections, each presented as a results chapter:

- Purification of RNase 1 from different origins in order to analyze it by two-dimensional electrophoresis and glycan sequencing.
- Serum RNase 1 origin determination and evaluation of its usefulness as a tumor marker for pancreatic cancer.
 - Purification of serum RNase 1 from healthy controls and pancreatic cancer patients. Glycan analysis of serum RNase 1 glycan structures to determine whether there are differences between their carbohydrate structures.
 - Purification of endothelial cell line EA.hy926 conditioned media. Glycan analysis of endothelial RNase 1 glycan structures to establish the origin of serum RNase 1 due to the organ specificity of carbohydrate structures.
- Analysis of partially purified serum RNase 1 from healthy controls and pancreatic cancer patients by two dimensional electrophoresis.
 - Detection of differences between RNase 1 glycoforms.
 - Establishment of the effect of the sialic acid content on the two dimensional pattern of RNase1.

Capítol 3

Material i mètodes

3.1 Material bàsic

Durant la realització d'aquest treball s'han utilitzat els següents aparells:

Aparell: model	Marca i país
Agitadors magnètics: Agimàtic-NM/A-163	Selecta, Espanya/SBS Instrument, Espanya
Agitador orbital: Movil-Rod	Selecta, Espanya
Agitador horitzontal: Rotamax	Heidolf, Alemanya
Agitador vòrtex: GENIE-2	Scientific Industries, E.E.U.U.
Aparells d'ultrafiltració d'aigua: Milli-RO/ Milli-Q	Millipore, E.E.U.U.
Autoclau: AE-75	Raypa, Espanya
Balances: FY-300/ ER-120A	Salter, Japó
Bany refrigerador/termòstat: RB-5A/TE-8A	Techne, Canadà
Bany termostàtic: Precistern	Selecta, Espanya
Bomba de buit	Dinko Instruments, Espanya
Campana de flux laminar vertical: BIO 48M	Cultek, Espanya
Centrífuga d'ependorfs: Mikro12-24	Sigma, Espanya
Centrífuga de tubs refrigerada: Digicen-R	Alresa, Espanya
Congelador -80°C: Ultralow freezer	Nuaire, Japó
Congeladors -20°C / nevera 4°C: Greenfresh / ART866G	Balay, Espanya/ Whirpol, Alemanya/ Aspes, Espanya
Equip de nitrogen líquid	Abelló Oxigen Linde, Espanya

Continua a la pàgina següent

Aparell: model	Marca i país
Espectrofotòmetre: CE6602	Cecil, Anglaterra
Estufa d'assecat	Selecta, Espanya
Fonts d'alimentació per electroforesi: PowerPac300/ EPS200/ EPS 3500XL	BioRad, E.E.U.U./ Pharmacia Biotech, Suècia
Hemocitòmetre: Neubauer improve	Afora, Espanya
Homogeneïtzador de pistó	Afora, Espanya
Homogeneïtzador mecànic	Schott, Alemanya
Impressora per lector de plaques: Stylus Color 200	Epson Ibérica SA, Espanya
Incubador amb camisa d'aigua: Hotcold-S	Selecta, Espanya
Incubador de cultius de CO ₂ : FunctionLine	Heraeus, Alemanya
Lector de microplaques de 96 pouets: ELX800	Biotek, E.E.U.U.
Liofilitzador: Cryodos	Telstar, Espanya
Micropipetes i multicanals: Pipetman	Gilson, França/ Finnpiquette, Finlàndia
Microscopi invertit contrast de fases	Zeiss, Alemanya
pH-metre: micropH2000	Crisón, Espanya
Sistema de captació de imatges: FluorChem SP	Alpha Innotech, E.E.U.U.
Sistema d'electroforesi: Mini Protean2	BioRad, E.E.U.U.
Sistema d'electroforesi bidimensional: Multiphor II PROTEAN IEF cell	Amersham Pharmacia Biotech, Suècia BioRad, E.E.U.U.
Sistema d'electrotransferència: Mini Trans-Blot/ Trans Blot	BioRad, E.E.U.U.
Sistema FPLC: ÄKTAbasic	Amersham Pharmacia Biotech, Suècia
Sonicador: Ultrasons	Selecta, Espanya
Ultracentrífuga refrigerada: RC5B Sorvall	Heareus, Alemanya

Tot l'equipament de la casa *Amersham Pharmacia Biotech*, pertany actualment (en el moment de finalització d'aquest treball de recerca) a la casa *GE Healthcare*.

3.2 Obtenció de les mostres

3.2.1 Extracció de ribonucleasa pancreàtica humana a partir de pàncreas de donants sans d'autòpsia

Per extreure la Ribonucleasa (RNasa 1) de pàncreas humà de donants sans s'utilitza el mètode de Weickmann et al. (1981) amb algunes modificacions. Les mostres s'obtenen a partir d'autòpsies realitzades durant les primeres 6 hores (preferentment) a 24 hores que segueixen a la defunció. Immediatament són congelades i guardades a -80°. Durant

tota l'extracció la mostra es manté a 4°C. Breument, es basa en l'homogeneïtzació del teixit en medi àcid, neutralització amb NH₃ concentrat i precipitació de la RNasa 1 amb acetona. Tot el procés es realitza amb inhibidors de proteases.

Protocol

1. Preparació de les solucions:
 - Preparació del PMSF: Dissoldre la quantitat necessària per a una concentració final en la solució proteica de 5 mM en etanol al 50% i escalfar 5 min a 55°C. Caldrà filtrar a través de membrana de 0.22 μm de diàmetre de porus mentre s'addiciona a la solució proteica.
2. Esmicolar el pàncreas alhora que es descarta el teixit adipós i vascular. Mantenir a 4°C.
3. Homogeneïtzar el pàncreas amb 0.25 M H₂SO₄, amb l'ajuda d'un homogeneïtzador mecànic a 24000 min⁻¹ fins obtenir una solució líquida. Posteriorment, homogeneïtzar amb un homogeneïtzador de pistó per acabar de disgregar el teixit. Mantenir a 4°C.
4. Centrifugar a 18000 rpm durant 20 minuts a 4°C.
5. Ajustar el pH del sobrenedant a 8 amb NH₃ concentrat.
6. Addicionar inhibidors de proteases fins una concentració final de 10 μg/mL leupeptina, 5 mM PMSF, 1% aprotinina, 5mM EDTA.
7. Centrifugar a 18000 rpm durant 20 minuts a 4°C.
8. Addicionar acetona al sobrenedant fins a una concentració final del 33% (v/v) gota a gota i amb agitació suau durant 20–30 minuts a 4°C. Deixar reposar sense agitació 30 minuts a 4°C.
9. Centrifugar a 18000 rpm durant 20 minuts a 4°C.
10. Addicionar acetona al sobrenedant fins a una concentració final del 66% (v/v) gota a gota i amb agitació suau durant 30–40 minuts a 4°C. Deixar reposar 1 hora a 4°C. La RNasa 1 precipita.

11. Centrifugar a 2000 rpm durant 15 minuts a 4°C.
12. Descartar el sobrenedant i deixar assecar el precipitat fins que s'evapori tota l'acetona. Resuspendre en 50 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 7. Addicionar inhibidors de proteases fins a una concentració final de 5 µg/mL Leupeptina, 5 mM PMSF.

La ribonucleasa de pàncreas es purifica mitjançant una cromatografia d'afinitat a Heparina (secció 3.3.2) i una cromatografia de fase reversa Vydac-C4 (secció 3.3.4).

3.2.2 Obtenció de ribonucleasa pancreàtica humana de les línies cel·lulars Capan-1 i EA.hy926

Capan-1 és una línia d'adenocarcinoma pancreàtic humà. Va ser establerta per Fogh et al. (1977) a partir d'una metàstasi a fetge caracteritzada histopatològicament com a adenocarcinoma pancreàtic ben diferenciat d'origen ductal.

Les cèl·lules EA.hy926 són un híbrid format per la fusió de cèl·lules endotelials humanes de vena de cordó umbilical (HUVEC) i les cèl·lules de carcinoma de pulmó A549/8, per tal d'immortalitzar-les (Edgell et al., 1983). Ha estat demostrat que aquestes cèl·lules secreten RNasa 1 provinent de la seva parental HUVEC i no de les cèl·lules de carcinoma de pulmó (Landré et al., 2002).

Protocol

La línia Capan-1 és cultivada durant uns 3 mesos aproximadament i es reserva el medi de cultiu cada cop que es canvia segons el protocol descrit per Fernández et al. (1994). El cultiu de la línia és en medi DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementat amb un 10% de BMS (*Basal Medium Supplement; Seromed/Biochrom KG, Alemanya*). El BMS és un medi basal que conté el mínim pel creixement cel·lular. D'aquesta manera s'evita l'ús de sèrum fetal boví (FBS) que conté ribonucleasa bovina que podria interferir en l'estudi. El medi condicionat recollit es guarda a -20 °C.

Les cèl·lules EA.hy926 ens van ser cedides pel Dr. M. Moenner de la Universitat de Bordeaux, França. Es van fer créixer en flascons de 150 cm² (*Nunc, Denmark*) fins al

90-95% de confluència en medi DMEM suplementat amb 10% de FBS (*Foetal Bovine Serum*) i una solució antibiòtica i antimicòtica a una concentració final de 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomina i 0.25 µg/mL amfotericina B (*Gibco, USA*) en un incubador humidificador (*Heraeus, Germany*) al 5% de CO₂ i 95% d'humitat a 37 °C. Un cop confluents, les cèl·lules es renten tres cops amb PBS per eliminar el FBS, que conté RNasa A. A continuació, es deixen créixer de 48 a 72 hores en DMEM sense FBS. El medi condicionat sense FBS es va guardar a -20 °C.

El medi condicionat recollit en tots els casos es descongela a 4°C, es centrifuga a 12000 × g a 4° C durant 30 minuts per eliminar les restes cel·lulars, i el sobrenedant es filtra a través d'una membrana de 0.22 µm de diàmetre de porus (*Millipore, USA*). El medi es concentra per tal de reduir el volum abans de la purificació mitjançant una membrana de filtració tangencial de 5 kDa de *cut-off* (*Millipore, USA*).

3.2.3 Obtenció de les mostres de sèrum humà de pacients de neoplàsia pancreàtica i individus control

Els sèrums són de pacients de l'Hospital Universitari Dr. Josep Trueta de Girona i el Comitè Ètic de l'hospital ha aprovat el seu ús en aquest estudi. Els pacients, seleccionats per la Dra. Esther Fort de la Unitat de Digestiu, són homes i dones majors de 45 anys sense cap malaltia pancreàtica diagnosticada ni ingesta severa d'alcohol (controls) o pacients diagnosticats d'adenocarcinoma pancreàtic. Els sèrums han estat recollits, per part del personal hospitalari, en dejú entre les 8 i les 10 del matí. S'han deixat coagular de 10 a 30 min a temperatura ambient i s'han centrifugat a 3500 rpm en tubs que permeten la separació estricta del sèrum i de les cèl·lules sanguínies. S'aliquoten i congelen a -20°C, i posteriorment es guarden a -80°C.

3.3 Fraccionament cromatogràfic

3.3.1 Cromatografia en columna Cibacron blue

La columna utilitzada és una Cibacron blue 3GA (*Sigma, USA*). Aquesta reïna està formada per la molècula Cibacron blue unida a una matriu d'agarosa (Figura 3.1).

És indicada per la unió d'albumina i interferó, així com per enzims amb lloc d'unió a cofactors tipus nucleòtid (deshidrogenases, quinases o endonucleases).

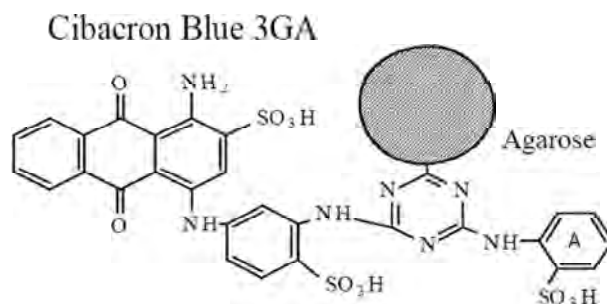


Figura 3.1: Estructura de la reïna Cibacron blue 3GA amb un grup sulfònic en l'anell A

La ribonucleasa també és afí al lligand d'aquesta reïna de manera que queda moderadament unida i pot ser eluïda incrementant la força iònica. La cromatografia es desenvolupa a pressió atmosfèrica.

Protocol

La mostra es descongela i s'afegeix tampó concentrat $\times 10$ fins a la concentració de treball. Seguidament es centrifuga a $9000 \times g$ durant 10 minuts. Es reserva el precipitat per anàlisis posteriors i es prossegueix amb la cromatografia amb el sobrenedant.

Es determina quines fraccions contenen ribonucleasa per zimograma (secció 3.4.4 a la pàg. 51) o per ELISA sandvitx (secció 3.5.2 a la pàg. 56), es recullen i dialitzen contra el tampó A de la cromatografia en columna d'heparina (secció 3.3.2 a la pàg. 39).

Tampons:

A: 25 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 7.5

B: 25 mM Tris-HCl, 2 M NaCl, pH 7.5

C: 25 mM Tris-HCl, 1 M NaSCN, pH 7.5

Volum de columna: 60 mL

Gradient:

Pas	Volum (mL)	Flux (mL/min)
1. Tampó A	300	0.3
2. Càrrega de la mostra	-	0.5
3. Tampó A	300	0.3
4. Gradient salí		
Tampó A + Tampó B	150+150	0.5
5. Tampó B	180	0.2
6. Tampó C	180	0.2

Per regenerar i guardar la columna es renta amb 5-10 volums de columna de cada solució:

- 0.1 M Borat, 1 M NaCl pH 9.8 (es prepara a temperatura ambient amb àcid bòric i hidròxid sòdic).
- 0.1 M Borat pH 9.8.
- Aigua destil·lada.
- 2 M NaCl (per guardar). Es poden utilitzar antimicrobians com timerosal o azida sòdica per guardar llargs períodes de temps. Es guarda a 2-8 °C, no es pot congelar.

3.3.2 Cromatografia en columna d'heparina en sistema FPLC

La columna utilitzada és una HiTrap Heparin (*Amersham Pharmacia Biotech, Suècia*). Està formada per un llit d'agarosa que porta unida covalentment heparina (glicosaminoglicà altament sulfatat de la mucosa intestinal de porc); i és indicada per la separació d'enzims d'unió a àcids nucleics així com la d'altres proteïnes (factors de creixement o proteïnes de coagulació, per exemple).

La ribonucleasa és afí al lligand d'aquesta reïna, queda moderadament unida i pot ser eluïda incrementant la força iònica. La cromatografia es desenvolupa en un sistema FPLC automatitzat que permet controlar el gradient a aplicar així com l'absorbància a 280 nm.

Protocol

Cromatografia en heparina (5 mL) per FPLC

Aquest mètode s'ha utilitzat per a la purificació de RNasa 1 de pàncreas sa d'autòpsia. La mostra es dialitza contra 50 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 7. Els sacs de diàlisi que s'utilitzen són Spectra/Por (*Spectrum, US & Canadà*) de 3500 Da de grandària de porus. Abans de carregar la mostra a la columna, es centrifuga 15 min a 2500 rpm, i es recull el sobrenedant que s'injecta a la columna d'heparina.

Tots els tampons per les cromatografies es filtren a través de membrana de 0.22 μm de diàmetre de porus, i es soniquen durant 15 min amb ultrasons per degasificar-los.

Es determina quines fraccions contenen ribonucleasa per zimograma (secció 3.4.4 a la pàg. 51) o per ELISA sandvitx (secció 3.5.2 a la pàg. 56). Aquestes fraccions s'uneixen i dialitzen contra aigua milli-Q. La mostra dialitzada es congela a -80°C i es liofilitza. Liofilitzada es guarda a -20°C .

Tampons:

A: 50 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 7

B: 50 mM Tris-HCl, 1.5 M NaCl, pH 7

Pressió màxima: 0.5 MPa

Flux: 1 mL/min.

Volum de columna: 5mL

Gradient:

Pas	% B	Volum Columna
1. Equilibrat	0	10
2. Càrrega de la mostra	-	-
3. Rentat	0	1
4. Elució: 1r gradient	40	20
5. Elució: 2n gradient	100	10
6. Elució	100	2
7. Rentat i reequilibrat	0	5

Cromatografia en heparina (5 mL) per FPLC, 2n mètode

Aquest mètode s'ha utilitzat per a la purificació de RNasa 1 de sèrum i la RNasa 1 de la línia cel·lular EA.hy926, que han estat processats prèviament mitjançant una cromatografia en columna Cibacron Blue. El gradient i flux utilitzats, així com l'anàlisi posterior de les fraccions, són els mateixos als descrits en el mètode anterior però els tampons de la cromatografia són els següents:

Tampons:

A: 25 mM Fosfat sòdic, 10 mM NaCl, pH 6

B: 25 mM Fosfat sòdic, 1.5 M NaCl, pH 6

3.3.3 Cromatografia d'intercanvi catiónic MONO-S en sistema FPLC

S'utilitza una columna MONO-S HR 5/5 (*Amersham Pharmacia Biotech, Suècia*). En aquesta columna queden retingudes aquelles proteïnes de pI superior al pH del tampó d'equilibrat (carregades positivament), ja que poden interaccionar amb els grups $-\text{SO}_3^-$ de la reïna. S'utilitza un tampó d'equilibrat a pH de 5.5; de manera que la ribonucleasa (de pI elevat, està carregada positivament en aquestes condicions) queda retinguda a la columna. Posteriorment és eluïda amb un gradient salí creixent.

Protocol

S'afegeix tampó a la mostra per tal que quedi a una concentració final de 25 mM Acetat Sòdic pH 5.5. Abans de carregar la mostra a la columna, es centrifuga 15 min a 2500 rpm, i es recull el sobrenedant que s'injecta a la columna MONO-S amb *superloop*. Els tampons es filtren i es soniquen.

Es determina quines fraccions contenen ribonucleasa per zimograma (secció 3.4.4 a la pàg. 51) o per ELISA sandvitx (secció 3.5.2 a la pàg. 56), s'uneixen i dialitzen contra aigua milli-Q. La mostra dialitzada es lioflitza.

Tampons:

A: 25 mM Acetat sòdic, pH 5.5

B: 25 mM Acetat sòdic, 1 M NaCl, pH 5.5

Pressió màxima: 5 MPa

Flux: 1 mL/min.

Volum de columna: 1mL

Gradient:

Pas	% B	Volum Columna
1. Equilibrat	0	15
2. Càrrega de la mostra	-	-
3. Rentat	0	15
4. Elució: 1r gradient	40	75
5. Elució: 2n gradient	100	15
6. Elució: 3r gradient	100	10
7. Rentat i reequilibrat	0	10

3.3.4 Cromatografia de fase reversa Vydac-C4 en sistema FPLC

La cromatografia es porta a terme amb una columna analítica Vydac 214 TP-RP C4 (*Waters, EEUU*) en un sistema d'elevada resolució i pressió. La separació de les proteïnes en la columna Vydac-C4 per fase reversa es basa en el caràcter hidrofòbic d'aquestes.

En introduir la mostra a la columna, les proteïnes perden la seva estructura terciària quedant exposats els seus residus interns que interaccionen amb les cadenes alifàtiques unides covalentment a la matriu de la reïna. Per tal de poder eluir les proteïnes retingudes a la columna, es crea un gradient amb aigua i solvent no polar. Aquest gradient s'inicia amb una major proporció d'aigua i es va augmentant progressivament la proporció de solvent apolar de manera que les proteïnes eluiran segons el seu caràcter

hidrofòbic (es produeix un desplaçament de la proteïna), eluint-se primer de la columna les de menor hidrofobicitat i, per últim, les més hidrofòbiques.

Protocol

La mostra liofilitzada es resuspèn amb aigua milliQ, 0.1% TFA. Abans de carregar la mostra es centrifuga a 10000 rpm durant 10 min. Es recupera el sobrenedant i s'injecta a la columna en un volum de 0.5 mL i una quantitat màxima de proteïna de 0.5 mg per punxada. L'aigua milliQ i l'acetonitril es desgasifiquen amb un sonicador durant 15 min. Posteriorment s'addiciona l'àcid trifluoracètic (TFA).

Per determinar les fraccions que contenen ribonucleasa es realitza un zimograma (secció 3.4.4 a la pàg. 51) de les fraccions corresponents a la zona del gradient on s'elueix aquesta proteïna. Les fraccions amb ribonucleasa es congelen i es liofilitzen.

Tampons:

A: H₂O milliQ, 0.1% TFA

B: Acetonitril, 0.1% TFA

Pressió màxima: 12 MPa

Flux: 0.5 mL/min.

Capacitat d'unió: 0.5 mg Proteïna

Volum de columna: 2.5 mL

Gradient:

Pas	% B	Volum Columna
1. Equilibrat	10	4
2. Càrrega de la mostra	-	-
3. Rentat	10	2
4. Elució: 1r gradient	22	4
5. Elució: 2n gradient	33	15
6. Elució: 3r gradient	100	1
7. Rentat i reequilibrat	10	4

3.4 Electroforesi

3.4.1 Electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS

La separació electroforètica que s'utilitza en aquest treball és una electroforesi discontinua en poliacrilamida en condicions desnaturalitzants amb dodecilsulfat sòdic (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Segons aquest mètode, primer es polimeritza un gel inferior o separador amb el percentatge d'acrilamida adient per a la separació de proteïnes d'una determinada massa molecular (en el cas de la RNasa 1, el percentatge més adient és el 15%). En segon lloc es polimeritza un gel apilador amb un baix percentatge d'acrilamida (gel al 3%) que permet apilar les proteïnes a l'inici del gel separador i millorar d'aquesta manera la resolució en la separació de les proteïnes al llarg del gel inferior.

L'SDS confereix càrrega negativa a totes les proteïnes i les desplega (sovint parcialment), de manera que totes migren cap a l'ànode.

Protocol

Tot el material específic utilitzat per realitzar les electroforesis d'una dimensió pertany a la casa comercial *BioRad (E.E.U.U.)*.

1. Preparació de les solucions:

- Solució d'acrilamida: 30% acrilamida, 0.8% N-N'-bismetilèn acrilamida (preservada de la llum).
- Tampó del gel separador ($\times 4$): 1.5 M Tris-HCl pH 8.6-8.8, 0.4% SDS.
- Tampó del gel apilador ($\times 4$): 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.4% SDS.
- Tampó de càrrega de mostres ($\times 4$): 120 mM Tris-HCl pH 6.8, 40% (v/v) glicerol, 8% (w/v) SDS, 0.05% (w/v) blau de bromfenol.
- Tampó d'elució ($\times 10$): 1.92 M Glicina, 0.25 M Tris-HCl pH 8.3-8.5, 1% SDS.
- 15% Persulfat amònic (PS). Preparar fresc cada cop.

2. Polimeritzar el gel separador. Les quantitats indicades a continuació són les adequades per un gel de 0.75 mm de gruix al 15% d'acrilamida:

Acrilamida/Bisacrilamida	1 mL
Tampó del gel separador ($\times 4$)	1 mL
H ₂ O milliQ	2 mL
15% PS	16 μ L
TEMED	2 μ L

3. Cobrir la solució de gel amb isopropanol per evitar la difusió d'oxigen al gel (inhibeix la polimerització) i minimitzar l'efecte del menisc en la forma del gel. Deixar polimeritzar durant uns 15 min.
4. Un cop el gel està polimeritzat, retirar l'isopropanol i rentar abundantament amb H₂O destil·lada.
5. Preparar el gel apilador:

Acrilamida/Bisacrilamida	0.15 mL
Tampó del gel apilador ($\times 4$)	0.375 mL
H ₂ O milliQ	0.975 mL
15% PS	16 μ L
TEMED	1.5 μ L

6. Dipositar la solució d'acrilamida i la pinta formadora de butxaques.
7. Carregar les mostres, preparades amb tampó de càrrega, a les butxaques amb xeringa Hamilton (*Hamilton, E.E.U.U.*) o amb micropipeta. Aplicar un corrent fix de 15 mA per gel de 0.75 mm de gruix.
8. Un cop finalitzada l'electroforesi, procedir amb el sistema de revelat més adequat.

3.4.2 Electroforesi bidimensional

El mètode clàssic d'electroforesi bidimensional descrit per O'Farrell (1975) i Klose (1975) permet separar proteïnes en funció de dues característiques diferencials: el punt isoelèctric i la massa molecular.

S'obté un patró de punts o *spots* en el que es distribueixen les proteïnes seguint el sistema de coordenades següent: s'incrementa el punt isoelectric d'esquerra a dreta i s'incrementa la massa molecular de baix a dalt. Així s'obté una informació visual (mapa) de les diferents proteïnes presents en un teixit o cèl·lula.

La primera etapa és un isoelectroenfoc. Es tracta d'una separació electroforètica gràcies al fet que les proteïnes en solució tenen càrrega i, per tant, mobilitat sota un camp elèctric. S'utilitzen gels amb un gradient d'amfolines immobilitzades que creen un gradient de pH fix. Les proteïnes avançaran en el gel fins a la zona de pH que es correspongui al seu pI. En aquest punt les proteïnes ja no poden desplaçar-se donat que en aquest punt la càrrega neta global de la proteïna es zero. Durant la primera dimensió s'utilitzen condicions desnaturalitzants a elevades concentracions d'urea, la presència d'un detergent no iònic i d'un agent reductor. Aquestes condicions són necessàries per evitar les interaccions intermoleculars, per mantenir les proteïnes hidrofòbiques en solució i per evitar la presència de diferents conformacions d'una mateixa proteïna.

Per a la segona dimensió es transfereixen les proteïnes des del gel d'isoelectroenfoc (separades per pI) a un gel d'electroforesi de poliacrilamida en presència de SDS (SDS-PAGE). En aplicar un camp elèctric, les proteïnes avançaran cap a l'ànode i quedaran separades en funció de la seva grandària (massa molecular).

Finalment, mitjançant un revelat específic per proteïnes, s'obté un mapa de les proteïnes que constituïen la mostra en funció del pI i la massa molecular: un patró característic del teixit i estat fisiològic d'aquest en el moment d'obtenir la mostra.

Protocol

Els *strips* (gels de primera dimensió) utilitzats corresponen a un gradient lineal de pH 3 a pH 10 de 18 cm (Figura 3.2), de la casa comercial *Amersham Pharmacia Biotech* (Alemanya). La primera dimensió es porta a terme en l'aparell *PROTEAN IEF cell* (BioRad, E.E.U.U.) mentre que la segona dimensió es porta a terme en l'aparell *Multiphor II* (*Amersham Pharmacia Biotech*, Alemanya).

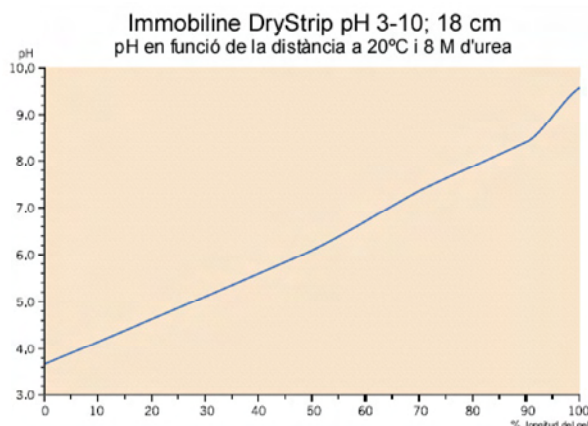


Figura 3.2: Gradient de pH dels *strips* (gels de primera dimensió o isoelectroenfoc) en funció de la longitud. Les condicions de 20°C i 8M urea són les habituals en la primera dimensió de l'electroforesi. Extret del full tècnic de Amersham Pharmacia Biotech (Alemanya).

Rehidratació del gel de primera dimensió (Strip)

1. Preparar el tampó de rehidratació: 8 M urea, 0.5% (v/v) Triton X-100, 65 mM DTT, 1% (v/v) *Pharmalite 3-10* (Amersham Pharmacia Biotech, Alemanya), 0.008% (v/v) Blau de Bromfenol.
2. Posar 750 μL – 1 mL de tampó de rehidratació a la safata de rehidratació per cada *strip* a rehidratar.
3. Col·locar a cada carril un *strip* amb el costat de gel cara avall i cobrir-los amb 2–3 mL d'oli mineral per cada tira per evitar l'evaporació del tampó de rehidratació.
4. Deixar rehidratar durant un mínim de 6–10 hores o tota la nit.

Preparació de mostres

1. Tampó de mostres: 8 M Urea, 0.5% (v/v) Tritó X-100, 65 mM DTT, 1% (v/v) *Pharmalite3-10*, 0.008% (v/v) Blau de Bromfenol.
2. Preparar la mostra en 100 μL de volum final màxim. És molt important que les mostres que es facin córrer de forma simultània tinguin la mateixa quantitat de proteïnes i sal per assegurar un pas de corrent equivalent per cada *strip*. Deixar

1 h a temperatura ambient en agitació suau per afavorir la desnaturalització de les proteïnes.

Primera dimensió: isoelectroenfoc

1. Treure els *strips* del *Reswelling tray* i eliminar l'excés d'oli mineral entre dos papers de filtre humits amb aigua destil·lada.
2. Preparar tres paperets per cada un dels *strips* (aproximadament 3×3 mm). Mullar-ne dos en aigua destil·lada (i retirar-ne l'excès), i un amb 13 mM DTT.
3. Col·locar els *strips* en la safata (permet disposar fins a 12 *strips* paral·lels i separats) amb el costat de pH més àcid a l'ànode i el de pH bàsic al càtode (per orientar el gradient de pH).
4. Posar els papers molls amb aigua a les puntes dels *strips* en contacte amb el gel. Posar els corresponents electrodes a sobre. El paper moll amb DTT s'ha de posicionar al càtode com a font contínua de DTT ja que aquest té càrrega negativa i es desplaça cap a l'ànode al llarg de l'electroforesi.
5. Carregar la mostra (50 – 100 μ L) amb les *sample cups* i cobrir-ho tot amb oli mineral.
6. Engegar el programa que es descriu a continuació (la temperatura establerta és de 20°C).

Pas	V	Temps (h)	Volts×hora
1	300	2	300
2	300	4	1200
3	4000	5	9250
4	4000	3	12000
5	8000	5	10000
6	8000	3	24000
7	500	∞	-

7. Un cop acabat el programa, eixugar els *strips* com al punt 5 per eliminar l'excés d'oli mineral i fer la segona dimensió.

Segona dimensió: SDS-PAGE

1. Preparar les solucions:
 - Tampó d'equilibrat: 6 M Urea, 30% (v/v) glicerol, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) *Tris stock solution* (0.5 M Tris pH 8.8).
 - 1 M DTT (es guarda a -20°C).
2. Retallar els *strips* a la mida desitjada per tal de treballar en una zona de gradient determinada.
3. Incubar els *strips* 15 minuts en 14 mL de tampó d'equilibrat al qual s'ha afegit 910 μL de 1 M DTT amb agitació suau, i posteriorment, 15 minuts en 14 mL de tampó d'equilibrat al qual s'ha afegit 350 mg de iodoacetamida.
4. Deixar els *strips* de costat sobre un paper secant per eliminar els excessos de tampó d'equilibrat.
5. Preparar el *Multiphor II*: triar la temperatura adequada de la placa refrigeradora (15°C) i col·locar 2 – 3 mL de querosè sobre la placa refrigeradora del *Multiphor II*. Treure el *ExcelGel SDS 8-18* (gel de segona dimensió) del plàstic protector i col·locar-lo sobre la placa refrigeradora evitant al màxim la formació de bombolles.
6. Col·locar els *Buffer strips* (*Amersham Pharmacia Biotech, Alemanya*) als extrems del gel.
7. Col·locar els *strips* amb la cara del gel en contacte amb l'*Excel Gel* i posar paperets absorbents (0.3×0.4 cm) a les puntes per eliminar l'excés de líquid en els *strips* de la primera dimensió. Entre els dos *strips* es carreguen 7.5 – 10 μL de marcadors de pes molecular.
8. Muntar i engegar el programa. Després dels primers 45 minuts, parar el sistema i treure els *strip* de primera dimensió i els paperets aplicadors, i moure el *cathodic buffer* fins on eren els *strips*. Continuar el programa i revelar el gel segons el que interressi detectar.

Pas	V	mA	W	Temps (min)
1	100	20	50	45
2	800	40	50	70

3.4.3 Tinció amb nitrat de plata

Aquest és un mètode no quantitatiu que permet detectar entre 2 i 5 ng per banda de proteïna separada electroforèticament en un gel de poliacrilamida.

S'utilitza el protocol de tinció descrit per Blum et al. (1987).

Protocol

1. Preparar les solucions:
 - Solució de fixació: 50% metanol, 12% acètic, 0.5 mL/L formaldehid 37%. El formaldehid s'afegeix a l'últim moment.
 - 50% etanol.
 - Solució oxidant: 0.2 g/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$.
 - Solució d'impregnació: 2 g/L AgNO_3 , 0.75 mL/L formaldehid 37%. El formaldehid s'afegeix a l'últim moment.
 - Solució de revelat: 60 g/L Na_2CO_3 , 0.5 mL/L Formaldehid 37%, 4 mg/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$. El formaldehid s'afegeix a l'últim moment.
 - 50% metanol, 12% acètic.
 - 50% metanol.
2. Fixació de les proteïnes amb una solució de fixació durant aproximadament 1 hora en agitació suau.
3. Rentar tres vegades durant 20 minuts amb 50% etanol en agitació suau.
4. Pretractament oxidant durant 1 minut.
5. Rentar tres vegades durant 20 segons amb H_2O milliQ.
6. Impregnació durant 20 minuts protegit de la llum i en agitació suau.

7. Rentar dues vegades durant 20 segons amb H₂O milliQ.
8. Revelar amb la solució de revelat fins que s'apreciïn bé les bandes de proteïnes i fins a un màxim de 10 minuts.
9. Rentar dues vegades durant dos minuts amb H₂O milliQ. Durant aquest rentat no s'atura el procés de revelat i s'incrementa la intensitat de les bandes.
10. Aturada amb 50% metanol, 12% acètic durant 10 minuts en agitació suau.
11. Rentat amb 50% metanol durant 20 minuts en agitació suau.

Els gels SDS-PAGE d'una sola dimensió es poden conservar en H₂O milliQ. Els gels de dues dimensions es conserven en 20% glicerol.

3.4.4 Zimograma

S'utilitza el protocol descrit per Bravo i col. (1994) que consisteix en separar electroforèticament les proteïnes d'una mostra determinada i detectar la presència de la ribonucleasa per activitat. Aquest mètode és molt sensible i permet detectar fins a 1 pg de ribonucleasa A bovina.

La separació electroforètica es fa segons el protocol de Laemmli (1970), descrit en l'apartat 3.4.1 a la pàgina 44.

Per poder detectar la ribonucleasa per activitat, s'inclou en el gel separador el substrat de la ribonucleasa: àcid policitidílic (poliC) (*Amersham Pharmacia Biotech, Suècia*), fins a una concentració de 0.3 mg/mL.

Els gels es revelen afavorint la degradació del substrat per acció de la ribonucleasa.

Protocol

1. Preparar les solucions:
 - Solució 10 mM Tris-HCl pH 8, 20% (v/v) isopropanol.
 - Solució 10 mM Tris-HCl pH 8.

- Solució 0.1 M Tris-HCl pH 8.
 - Solució colorant: 0.1% (w/v) Blau de Toluïdina en solució 0.1 M Tris-HCl pH 8.
2. Incubar el gel d'electroforesi amb una solució 10 mM Tris-HCl pH 8, 20% isopropanol, en agitació suau a temperatura ambient, per afavorir l'eliminació del SDS. Fer dos canvis de 15 minuts.
 3. Incubar el gel en agitació suau a temperatura ambient amb una solució 10 mM Tris-HCl pH 8, per afavorir l'eliminació del isopropanol. Fer dos canvis de 15 minuts.
 4. Incubar el gel en agitació suau a temperatura ambient amb una solució 0.1 M Tris-HCl pH 8 fins que les bandes de digestió es vegin definides. El seguiment de la digestió es realitza amb llum ultraviolada ($\lambda=254$ nm) sobre una placa de silicagel amb l'indicador fluorescent F254, coberta amb un plàstic que no absorbeixi la llum incident ni la reemesa per l'indicador. El poliC absorbeix la llum a 254 nm, de manera que es pot distingir clarament allí on el poliC ha estat degradat per la RNasa 1 i l'indicador fluorescent pot absorbir la llum de 254 nm i reemetre-la.
 5. Tinció durant 5 minuts en agitació suau a temperatura ambient amb la solució colorant.
 6. Rentar l'excès de colorant amb aigua destil·lada fins destenyir totalment les bandes.

3.4.5 Transferència tipus Western

La transferència tipus Western combina la resolució del gel d'electroforesi amb l'especificitat de la detecció immunològica (Harlow and Lane, 1988).

Aquest mètode es basa en la separació electroforètica d'una barreja de proteïnes mitjançant una electroforesi discontinua amb presència de SDS (Laemmli, 1970) i la transferència d'aquestes sobre una membrana de fluorur de polivinilidè (PVDF) (*Millipore, E.E.U.U.*), que uneix proteïnes de manera inespecífica per interaccions hidrofòbiques.

La transferència es porta a terme posant en contacte directament la membrana amb el gel i aplicant un corrent elèctric perpendicular que mobilitza les proteïnes des del gel cap a la membrana. Cal tenir en compte que el pH del tampó de transferència ha de ser superior al pI de la proteïna d'interès per assegurar que la càrrega neta d'aquesta sigui negativa i es desplaça des del gel fins a la membrana (situada a l'ànode). Per aquesta raó, en el cas de la RNasa s'utilitza el tampó Carbonat-Bicarbonat de pH més bàsic (9.4 – 9.5) al tampó de transferència habitual Tris-Glicina (pH 8.3).

Les zones buides de la membrana es bloquegen per evitar reaccions inespecífiques posteriors. Seguidament s'afegeixen els anticossos que s'uneixen a l'antígen desitjat. Amb un anticòs secundari (conjugat amb un enzim) que reconegui el primer anticòs es pot detectar la presència de l'antígen (l'activitat de l'enzim només serà present on hi hagi l'antígen d'interès).

Protocol

1. Preparació de tampons:

- Tampó de transferència Carbonat-Bicarbonat: Barrejar 15 mL de solució A (2.75 g Na_2CO_3 en 130 mL d'aigua destil·lada), 50 mL de solució B (6.22 g NaHCO_3 en 370 mL d'aigua destil·lada), 200 mL de Metanol i enrasar a 1L amb aigua destil·lada. S'ha de deixar refredar a 4 °C abans d'utilitzar-lo.
- Tampó TBST (pH 7.5): 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 % (v/v) Tween-20.
- Tampó de bloqueig: Tampó TBST al que s'afegeix un 3% (w/v) de llet en pols.

2. Activació de la membrana de PVDF (*Millipore, E.E.U.U.*): Es submergeix durant 15 segons en metanol, es renta amb aigua milliQ durant 2–5 minuts i finalment es deixa en tampó de transferència durant 10 minuts.

3. Es submergeixen en tampó de transferència els altres components per muntar l'electrotransferència: 4 papers de filtre Whatman per gel i 2 esponges per gel.

4. Equilibrat del gel d'electroforesi en tampó de transferència durant 10 min. És recomanable fer 3 canvis de tampó per assegurar que el gel està ben equilibrat.

5. Es munta l'electrotransferència amb el següent ordre: des de la part catòdica es col·loquen una esponja, dos papers Whatman, el gel, la membrana, dos papers Whatman i una esponja. Les proteïnes es desplaçaran des del càtode cap a l'ànode i, per tant, sortiran del gel per transferir-se sobre la membrana.
6. Es connecta a una font d'electroforesi i es deixa transferir 4h a 100V o tota la nit a 30V.
7. Un cop acabada la transferència, la membrana es renta 3 vegades durant 15 minuts en tampó TBST.
8. Incubació de la membrana en tampó de bloqueig a temperatura ambient en agitació durant un mínim de 1 hora fins a tota la nit.
9. Incubació de la membrana a temperatura ambient durant 1 hora en agitació suau en una dilució 1/10000 (*batch* 1) o 1/1000 (*batch* 2) de l'anticòs policlonal de conill anti-RNase 1 en tampó de bloqueig.
10. Rentar 3 vegades durant 15 minuts amb tampó TBST.
11. Incubació de la membrana a temperatura ambient durant 1 hora en agitació suau en una dilució 1/40000 de l'anticòs de cabra contra anticossos de conill conjugat amb peroxidasa (*Pierce, E.E.U.U.*), en tampó de bloqueig.
12. Rentar 4 vegades durant 15 minuts amb tampó TBST.
13. Revelat amb el reactiu quimiluminiscent *ECL-Plus* (*Amersham Biosciences, Suècia*).
14. S'exposa la membrana sobre film fotogràfic (*Fujifilm, Bèlgica*) el temps necessari. El film es submergeix en solució de revelat fins que s'observin les bandes o *spots* i finalment es deixen en solució de fixació de 2 a 5 minuts (ambdues solucions de *Fujifilm, Bèlgica*). Alternativament, també s'ha fet servir el sistema de captació de imatge *FluorChem SP* (*Alpha Innotech, E.E.U.U.*)

3.5 Detecció de ribonucleasa per assaig immunològic

3.5.1 ELISA directe

La tècnica d'ELISA directe es basa en la detecció mitjançant anticossos específics, d'un antígen fixat per unions hidrofòbiques a la superfície d'un suport plàstic tractat per a la unió de proteïnes (pouet d'una microplaca de poliestirè). L'anticòs de reconeixement és detectat per un altre anticòs específic que li reconeix la fracció constant i que porta unit químicament l'enzim peroxidasa. En afegir el substrat de l'enzim, rendeix un producte colorejat que pot quantificar-se espectrofotomètricament. L'absorbància mesurada serà proporcional a la quantitat d'antígen adsorbit sobre la superfície del pouet en l'inici del procés (Harlow i Lane, 1988).

Protocol

1. Preparació dels tampons:

- Solució Saline-Tween: Diluir 1/10 la solució $\times 10$ (90 g/L NaCl) i afegir un 0.05% (v/v) de Tween 20.
- Tampó PBS-Tween (pH 7.2): Diluir 1/5 la solució $\times 5$ (40.9 g/L NaCl, 6.7 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ i 1.7 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ i ajustat a pH 7.2 amb àcid fosfòric o NaOH) i afegir un 0.05% (v/v) de Tween 20.
- Tampó Carbonat-Bicarbonat (pH 9.6): Barrejar 26 mL de solució A (2.75 g Na_2CO_3 en 130 mL d'aigua destil·lada), 74 mL de solució B (6.22 g NaHCO_3 en 370 mL d'aigua destil·lada) i 100 mL d'aigua destil·lada.
- *Coating buffer*: Diluir 1/10 la solució comercial (*Scil Diagnostics GmbH, Alemanya*).

- #### 2. Es preparen les dilucions de l'antígen amb tampó Carbonat-Bicarbonat o *Coating buffer*. L'antígen és la mostra a assajar/quantificar i/o la recta patró (per la RNasa, entre 0 i 50 ng/pouet). Es col·loquen 100 μL de cada dilució en un pouet d'una microplaca de 96 pouets, pretractada per a la unió de proteïnes (*NUNC, Dinamarca*), i s'incuba 1h a 37°C en una cambra humida.

3. Es renten els pouets amb Saline-Tween tres vegades. Buidar la placa cada vegada per decantació i assecar bé.
4. Es bloquegen els llocs lliures de la placa, que no han quedat recoberts d'antígen, amb 100 μL d'una solució de llet en pols a l'1% (w/v) en tampó PBS-Tween i s'incuba 1h a 37°C en una cambra humida.
5. Es decanta la solució bloquejant i es fan tres rentats igual que al punt 3.
6. S'afegeixen a cada pouet 100 μL d'una dilució 1/15000 (*batch* 1) de l'anticòs policlonal de conill anti-RNase 1 en tampó PBS-Tween i s'incuba 1h a 37°C en una cambra humida.
7. Es decanta la solució d'anticòs i es fan tres rentats igual que al punt 3.
8. S'afegeixen a cada pouet 100 μL d'una dilució 1/4000, en PBS-Tween, de l'anticòs de cabra contra anticossos de conill conjugat amb peroxidasa (*Pierce, E.E.U.U.*). S'incuba 1h a 37°C en una cambra humida.
9. Es decanta la solució i es renta igual que al punt 3.
10. Es revela afegint 100 μL de la solució reveladora *BM-peroxidase substrate soluble* (3',3'-5',5'-tetrametilbenzadina, TMB; *Roche, Alemanya*) i s'agita lleugerament fins que comenci a aparèixer color blau (de 10 seg a 5 min).
11. S'atura la reacció de revelat afegint a cada pouet 100 μL d'una solució de 0.25 M H_2SO_4 .
12. Es mesura l'absorbància a 450 nm de cada pouet amb una absorbància de referència de 620 nm, utilitzant un lector de microplaques.

S'inclouen alguns pouets de control negatiu: un sense antígen, un amb un antígen diferent (com BSA o Lisozim) i un sense anticòs de detecció.

3.5.2 ELISA sandvitx

Aquest mètode permet determinar la concentració d'una proteïna específica per mètodes immunològics (Harlow and Lane, 1988). Per a la quantificació de la Ribonucleasa s'utilitza un anticòs de captura policlonal de conill que capta la Ribonucleasa

1. Posteriorment s'utilitza un altre anticòs policlonal de gallina contra la RNasa 1. Finalment, un anticòs conjugat amb peroxidasa contra anticossos de gallina permet detectar el complex Ab captura–RNasa 1–Ab detecció. Aquest doble reconeixement incrementa molt la sensibilitat del mètode respecte el mètode d'Elisa directe.

Protocol

1. Preparació dels tampons (veure el punt 1 del protocol de la secció 3.5.1 a la pàgina 55).
2. Col·locar 100 μL d'una dilució 1/2000 (*batch* 1) o 1/1000 (*batch* 2) de l'anticòs policlonal de conill anti-RNasa 1 dissolt en tampó Carbonat-Bicarbonat o *Coating buffer* en un pouet d'una microplaca de 96 pouets (*NUNC, Dinamarca*), i incubar 1 hora a 37°C en cambra humida.
3. Decantar el contingut de la placa i rentar tres cops amb Saline-Tween.
4. Bloquejar els llocs lliures amb 100 μL per pouet d'una solució de llet en pols a l'1% (w/v) en tampó PBS-Tween i incubar 1 hora a 37°C en una cambra humida.
5. Decantar la solució de bloqueig i rentar com en el punt 3.
6. Afegir a cada pouet 100 μL d'una dilució en PBS-Tween dels antígens, i incubar 1 hora a 37°C. Els antígens són les mostres a quantificar i la RNasa 1 recombinant pura per a la recta patró (entre 0 i 1 ng/pouet).
7. Decantar el contingut de la placa i rentar com en el punt 3.
8. Afegir a cada pouet 100 μL de la dilució 1/400 d'anticòs policlonal de gallina anti-RNasa 1 en tampó PBS-Tween i incubar 1 hora a 37°C en una cambra humida.
9. Decantar el contingut de la placa i rentar com en el punt 3.
10. Afegir a cada pouet 100 μL de la dilució 1/4000 de l'anticòs d'ase contra anticossos de gallina conjugat amb l'enzim peroxidasa (*ImmunoResearch Laboratories, Inc, USA*), i incubar 1 hora a 37°C en una cambra humida.
11. Decantar la solució de la placa i rentar com en el punt 3.

12. Revelar la placa (veure secció 3.5.1, punts 10, 11 i 12 del protocol).

Cal incloure alguns pouets de control negatiu: un sense anticòs de captura, un sense antígen (0 ng de RNasa 1), un amb un antígen diferent (5 ng/pouet de lisozim), un amb anticossos de gallina preimmunes i un sense anticòs de reconeixement (de gallina).

3.6 Determinació de la quantitat de proteïna total

3.6.1 Mètode de Bradford

Aquest mètode de determinació de la quantitat de proteïna total descrit per Bradford (1976) es basa en el canvi en el màxim d'absorció de 465 a 595 nm que experimenta el colorant Comassie Brilliant Blue G-250 en solució àcida en resposta a diferents concentracions de proteïna. El colorant s'uneix principalment a aminoàcids bàsics i aromàtics (especialment arginina) i és un assaig útil per a determinar concentracions de proteïnes i de polipèptids amb pesos moleculars de més de 3000-5000 Da, depenent dels seus grups carregats. La quantificació de proteïna d'una mostra problema es determina interpolant el valor de l'absorbància en una recta patró construïda amb concentracions conegudes de proteïna (en aquest cas s'utilitza un estàndard d'albúmina de sèrum boví, BSA, de la casa BioRad (*E.E.U.U.*)).

Protocol

1. Posar 40 μL de reactiu de *Quick StartTM* Bradford (*BioRad, E.E.U.U.*) per pouet.
2. Posar 40 μL de mostra per pouet. S'utilitza BSA per a la recta patró a concentracions entre 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cal assajar diferents dilucions de la mostra problema. Les dilucions es fan en H_2O milli-Q.
3. Agitar el contingut de cada pouet amb l'ajut d'una punta de micropipeta.
4. Llegir l'absorbància a 570 nm amb un lector de microplaques dins dels 5 a 55 minuts següents.

3.7 Tècniques d'anàlisi de la Glicosilació

3.7.1 Digestió amb enzims glicolítics

S'utilitza l'enzim neuraminidasa (sialidasa) d'*Arthrobacter urefaciens* (Roche, Alemanya). Es tracta d'una exoglicosidasa amb una àmplia especificitat de substrat que digereix els àcids siàlics terminals units $\alpha(2-3)$, $\alpha(2-6)$ o $\alpha(2-8)$ a una cadena de O- o N-glicosilació en glicoproteïnes i glicolípid.

També s'utilitza l'enzim N-Glicosidasa F (PNGasa F) recombinant. Es tracta d'una endoglicosidasa de *Flavobacterium meningosepticum* clonada en *Escherichia coli*. Aquesta endoglicosidasa digereix l'enllaç N-glicosídic entre la cadena oligosacàrida (que correspongui com a mínim al core pentasacàrid) i la corresponent Asn (no lliure, que formi part d'una cadena polipeptídica) i dóna com a resultat un residu d'àcid aspàrtic que modifica el pI de la proteïna.

Protocol

1. La mostra a digerir (entre 20 i 200 μg de proteïna total per tenir 50–100 μg de RNasa 1) s'incuba a 70 °C durant 10 minuts en 0.1% (w/v) SDS per desnaturalitzar parcialment les proteïnes i facilitar l'acció posterior dels enzims.
2. La mostra pretractada es separa en dues alíquotes iguals que serviran per fer el tractament i el control de la digestió.
3. Segons el tractament, s'afegeix a cada alíquota:
 - Neuraminidasa d'*Arthrobacter urefaciens* (per 10 μL de mostra): afegir 2 μL de 10% (v/v) Triton X-100, 4 μL de 0.5 M Acetat sòdic pH 5, 4 μL d' H_2O milliQ i 2 μL (20 mU) de neuraminidasa.
 - Tractament combinat amb Neuraminidasa d'*Arthrobacter urefaciens* i PNGasa F (per 10 μL de mostra): afegir 2 μL de 10% (v/v) Triton X-100, 2 μL de 0.2 M Fosfat sòdic pH 7.2, 2 μL (20 mU) de neuraminidasa i 4 μL (4 U) de PNGasa F.

Els enzims es substitueixen pel mateix volum d'aigua milliQ en el control.

4. S'incuba a 37 °C durant tota la nit (de 16 a 18 h) en un bany.
5. En el moment abans de fer l'electroforesi s'afegeix el volum corresponent de tampó de càrrega ($\times 4$) i s'incuba a 70 °C durant 10 minuts per inactivar la neuraminidasa. Per fer la electroforesi bidimensional s'afegeix el tampó de mostra corresponent (secció 3.4.2 a la pàgina 45).

3.7.2 Seqüenciació glucídica

Aquesta tècnica es basa en la separació enzimàtica de les cadenes oligosacàrides de N-glicans unides a les proteïnes i el posterior anàlisi d'aquests mitjançant una cromatografia de fase normal en sistema HPLC combinada amb l'ús seqüencial de diversos enzims específics que permeten eliminar els diferents monosacàrids de les cadenes glucídiques.

Protocol

Cal utilitzar sempre ddH₂O (bidestil·lada).

Preparació de mostres a partir de proteïna parcialment pura

1. Preparació de les solucions:
 - 0.5 M DTT.
 - 100 mM iodoacetamida.
2. Afegir a 14 μ L de mostra (5-10 μ g de proteïna), 4 μ L de tampó de càrrega de mostres (secció 3.4 a la pàgina 44) i 2 μ L de 0.5 M DTT.
3. Incubar a 70°C durant 10 minuts.
4. Afegir la solució de 100 mM de iodoacetamida fins a un 10% del volum final.
5. Incubar a temperatura ambient durant 30 minuts protegit de la llum.
6. Aplicar la mostra al gel d'electroforesi.

Condicions de l'electroforesi

1. Preparació de les solucions:
 - Solucions per realitzar l'electroforesi SDS-PAGE (secció 3.4 a la pàgina 44).
 - Solucions de tinció de Coomassie:
 - Tinció de Coomassie: 1.25g Coomassie R-250 (Brilliant Blue), 250 mL de metanol, 50 mL d'àcid acètic concentrat i 200 mL d'aigua.
 - Solució per destenyir 1: 50% metanol, 7% àcid acètic concentrat, 43% aigua.
 - Solució per destenyir 2: 5% metanol, 7% àcid acètic concentrat, 88% aigua.
2. Polimeritzar els gels al % d'acrilamida desitjat segons la proteïna d'interès (secció 3.4 a la pàgina 44).
3. Muntar el sistema per desenvolupar l'electroforesi i cobrir de tampó d'elució.
4. Carregar la mostra i aplicar un corrent fix de 25 mA per gel (1 mm de gruix).
5. Un cop finalitzada l'electroforesi, submergir el gel en solució de tinció durant 2 o 3 hores (es pot arribar a deixar tota la nit).
6. Decantar la solució de tinció i col·locar la solució de destenyir 1 durant 5 minuts màxim.
7. Decantar la solució de destenyir 1 i col·locar la solució de destenyir 2 durant varies hores o tota la nit.
8. Fotografiar el gel un cop destenyit.

Processament dels gels que contenen les glicoproteïnes d'interès prèvi a la digestió amb PNGasa F

1. Preparació de les solucions:
 - 20 mM NaHCO₃: 0.168 g en 100 mL d'aigua. Ajustar el pH a 7 amb 1 M HCl.

2. Retallar les bandes de gel corresponents a la proteïna d'interès i trossejar-les en petites porcions de gel de 1 mm³. Col·locar les porcions de gel en un tup eppendorf de 1.5 mL. Cal tallar una banda sense proteïna (d'uns 3 mm d'amplada) com a control negatiu.
3. Congelar els trossets a -20°C durant un mínim de dues hores.
4. Afegir 1 mL d'acetonitril als trossets de gel, vortejar i deixar en agitació (agitador horitzontal) durant 30 min a temperatura ambient.
5. Descartar l'acetonitril i afegir 1 mL de 20 mM NaHCO₃.
6. Repetir els rentats amb acetonitril, NaHCO₃ i acabar amb acetonitril, per tal d'eliminar completament els tampons de l'electroforesi dels trossets de gel.
7. Assecar els gels en la centrífuga de buit i prosseguir amb la digestió amb PNGasa F.

Digestió amb PNGasa F

1. Preparar la solució de PNGasa F segons la quantitat final necessària: 3 µL PNGasa F (*Roche, Alemanya*) i 27 µL 20 mM NaHCO₃ per cada banda de proteïna de 2-3 mm de gruix.
2. Afegir la solució de PNGasa F als trossets de gel i deixar rehidratar (de 5 a 15 minuts).
3. Afegir tampó 20 mM NaHCO₃ fins a cobrir totalment els trossets de gel i sobrepassar-los amb un excés de tampó d'aproximadament 1 mm.
4. Incubar a 37°C durant 12-16 hores.

Extracció dels glicans

1. Centrifugar la mostra a 13000 rpm durant 5 min.
2. Recuperar el sobrenedant en un tub net. Afegir 200 µL d'aigua al gel i sonicar durant 30 min.

3. Recuperar l'aigua i ajuntar-la amb el primer sobrenedant. Aquesta mostra es pot començar a assecar a la centrifuga de buit. Repetir la sonicació amb 200 μL d'aigua dues vegades, retenint el sobrenedant cada cop i ajuntant-lo amb el previ. Continuar assecant el sobrenedant.
4. Repetir la sonicació amb 200 μL d'acetonitril, guardant sempre el sobrenedant i assecant a la centrifuga de buit.
5. Repetir la sonicació amb 200 μL d'aigua i 200 μL d'acetonitril.
6. Recuperar l'últim sobrenedant. En aquest punt cal tenir uns 400-500 μL de sobrenedant pel següent pas.
7. Filtrar el sobrenedant a través d'un filtre de 0.45 μm (LH Millipore, *Millipore, E.E.U.U.*) a un tub nou. Netejar les restes de sobrenedant de l'anterior tub i la xeringa amb 50-100 μL d'aigua.
8. Si no es vol marcar tota la mostra amb 2-aminobenzamida (2AB) (veure el següent apartat) per poder fer espectrometria de masses, es pot assecar completament la mostra, resuspendre-la en un volum conegut i reservar-ne una part.
9. Assecar en part la mostra i transvasar a un tub de 200 μL . Continuar fins assecar completament la mostra.

Marcatge amb 2-Aminobenzamida (2AB)

1. Afegir 5 μL de 2AB (*Oxford GlycoSciences Signal labelling kit, Oxon, UK*) al tub amb l'extracte sec de glicans. Vortejar i fer una centrifugació breu.
2. Incubar a 65°C durant dues hores. 30 min després d'iniciar la incubació, vortejar i fer una centrifugació breu.
3. Després de la incubació, refredar la mostra al congelador durant 5 min.

Neteja de l'excés de 2AB

1. Preparar els papers per la cromatografia i els tubs de rotoevaporació:

Paper per la cromatografia :

- Tallar els papers Whatman 3MM a 10×2.5 cm.
- Rentar durant 15 min amb H_2O milliQ ($\times 2$) i 15 min amb dd H_2O .
- Deixar assecar completament.

Tubs de rotoevaporació :

- Deixar els tubs submergits en Àcid Nítric 4 M durant tota la nit.
- Rentar ($\times 10$) amb H_2O milliQ.
- Deixar assecar completament (es pot fer a l'estufa a $65^\circ C$).

2. Dipositar els $5 \mu L$ de glicans marcats a 1 cm de la base del paper Whatman.
3. Deixar assecar completament (20–30 min).
4. Desenvolupar la cromatografia amb acetonitril durant 1h–1h 30 min.
5. Inspeccionar el paper Whatman sota la llum UV i retallar la gota corresponent als glicans marcats. L'excés de 2AB haurà pujat per capil·laritat fins a l'extrem superior del paper, arrossegat pel solvent apolar.
6. Introduir el tall de paper en una xeringa de 2.5 mL amb un filtre de $0.45 \mu m$ (LH Millipore, *Millipore, E.E.U.U.*), afegir 0.5 mL d'aigua i deixar 10 min.
7. Filtrar a un tub de rotoevaporació prèviament netejat amb àcid.
8. Repetir el rentat de 10 min 3 vegades més.

Assecat de les mostres

1. Evaporar els 2 mL del tub de rotoevaporació, afegir 1 mL d'aigua, vortejar i fer una centrifugació breu.
2. Repetir l'evaporació i la resuspensió dues vegades més amb 0.5 mL i 0.2 mL d'aigua en cada cas (per tal d'anar concentrant la mostra).
3. Evaporar els 0.2 mL del tub de rotoevaporació i resuspendre l'extracte de glicans en 0.1 mL d'aigua. Transvasar a un tub net. Netejar el tub de rotoevaporació amb 0.1 mL d'aigua i ajuntar aquest volum al tub net.

Cromatografia de fase normal en sistema HPLC

La cromatografia es porta a terme en una columna TSK-Gel Amide-80 4.6 mm×250 mm (*Tosoh Biosep LLC, E.E.U.U.*) en un mòdul 2690 Alliance (*Waters, E.E.U.U.*) equipat amb un mòdul de control de temperatura i un detector de fluorescència 474 també de la casa *Waters*.

La cromatografia en fase normal es basa en una fase estacionària polar i una fase mòbil apolar (la mostra s'injecta a la columna disolta en una elevada proporció de solvent orgànic). Les molècules més apolars no interaccionaran amb la columna, i les que si ho facin, seran eluïdes gradualment de menor a major polaritat per un increment de la polaritat de la fase mòbil.

Protocol:

Preparació de la mostra: S'utilitza el % de mostra desitjat fins a un màxim de 20 μL i s'hi afegeixen 80 μL d'acetonitril. El sistema injecta de forma automatitzada 95 μL de la mostra preparada.

Tampons:

A: 50 mM Format amònic, ajustat a pH 4.4 amb amoníac.

B: Acetonitril

Flux: 0.4 mL/min.

Dimensions de la columna: 4.6 × 250 mm

Gradient: de 20% a 58% de tampó A.

S'excita la mostra a 330 nm i es mesura la fluorescència a 420 nm. El sistema es calibra amb un oligòmer de glucoses hidrolitzat i marcat amb 2AB com a estàndard extern.

Digestió amb exoglicosidases dels N-glicans marcats amb 2AB

1. Les exoglicosidases utilitzades són de la casa Prozyme (San Leandro, USA), excepte l'enzim XMF que és de la casa New England Biolabs (Regne Unit):

ABS (*Arthrobacter urefaciens sialidase*), EC 3.2.1.18: Escindeix l'àcid siàlic unit a terminals no reductors amb unió α 2-6, 3 o 8.

AMF (*Almond meal α -fucosidase*), EC 3.2.1.111: Escindeix les fucoses unides a terminals no reductors amb unió α 1-3 o 4 (digereix fucoses externes).

BKF (*Bovine kidney α -fucosidase*), EC 3.2.1.51: Escindeix les fucoses unides a terminals no reductors amb unió α 1-6 molt més eficientment que les fucoses amb unió α 1-2, 3 o 4.

BTG (*Bovine testes β -galactosidase*), EC 3.2.1.23: Escindeix les galactoses unides a terminals no reductors amb unió β 1-3 o 4.

GuH (*β -N-acetylglucosaminidase*), EC 3.2.1.30: Clonada de *Streptococcus pneumoniae*, i expressada en *Escherichia coli*. Escindeix terminals N-acetilglucosamina.

NANI (*Streptococcus pneumoniae neuraminidase*), EC 3.2.1.18: Escindeix específicament l'àcid siàlic unit a terminals no reductors amb unió α 2-3.

SPG (*Streptococcus pneumoniae galactosidase*), EC 3.2.1.23: Escindeix específicament les galactoses unides a terminals no reductors amb unió β 1-4.

XMF (*Xanthomonas manihotis fucosidase*), EC 3.2.1.51: Escindeix específicament les fucoses unides a terminals no reductors amb unió α 1-2.

2. El tampó d'activitat utilitzat és 50 mM Acetat sòdic pH 5.5 (es prepara $\times 10$ i es dilueix amb la mostra i l'enzim).
3. Aliquotar la quantitat necessària de mostra per fer la digestió i evaporar.
4. Afegir 1 μ L de tampó, l'enzim o combinació d'enzims desitjada (veure taula a continuació) i ddH₂O fins a 10 μ L.

Enzim	Concentració de treball	% volum final
ABS	1U/mL	10%
AMF	2mU/mL	10%
BKF	1U/mL	10%
BTG	1U/mL	20%
GuH	80U/mL	20%
NANI	1 U/mL	20%
SPG	0.1 U/mL	20%
XMF	1000 U/mL	10%

5. Incubar 16 hores a 37°C.
6. Eliminar els enzims utilitzats per fer les digestions amb els filtres Millipore Micropure-EZ (*Millipore, E.E.U.U.*):
 - Rentar el filtre amb 200 μ L d'aigua, centrifugant a 7000 rpm 10 min. Descartar el rentat.
 - Aplicar la mostra al centre del filtre i centrifugar a 13000 rpm 2 min.
 - Rentar el tub de la digestió amb 20 μ L d'aigua i aplicar al filtre. Tornar a centrifugar a 13000 rpm 2 min.
 - Rentar la membrana amb 100 μ L d'aigua i centrifugar a 13000 rpm 2 min.
 - Assecar la mostra a la centrífuga de buit i resuspendre en 20 μ L d'aigua.
 - Transferir a un vial d'HPLP i afegir 80 μ L d'acetonitril.

En aquest punt la mostra està llesta per ser injectada a l'HPLC.

Capítol 4

Results

4.1 RNase 1 purification

4.1.1 Extraction and purification of RNase 1 from healthy pancreas

Partially purified RNase 1 from pancreas was analysed by two-dimensional electrophoresis (2-DE) in the following result sections. The protein was obtained from a healthy donor pancreas at autopsy through the Hospital Josep Trueta (Girona). The protocol used for RNase 1 extraction from the pancreas was based on that described by Weickmann et al. (1981) with some modifications, and RNase 1 was detected using either SDS-PAGE (zymography) or sandwich ELISA. Both detection methodologies allow the detection of up to 1 ng of RNase 1.

The Weickmann protocol is based on the acid extraction of RNase 1 using H_2SO_4 , and precipitation with acetone. Specifically, the pancreas is cut into small pieces and homogenised in 0.25 M H_2SO_4 with both a laboratory mixer and a manual mechanical homogenizer in order to completely disrupt the tissue and pancreatic cells. After centrifugation, the supernatant is neutralized with NH_3 , and RNase 1 is precipitated with acetone. A precipitation from 0 to 33% acetone is carried out first and then a second precipitation to 66% acetone is performed to obtain a sample enriched with

RNase 1. The precipitate is dried out and dissolved in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 buffer. The protocol is described in Figure 4.1 (protocol 1).

This protocol was first used to obtain the RNase 1 from a healthy pancreas from an autopsy donor. However, no significant amount of RNase 1 could be detected in the final extract when it was dissolved in Tris-HCl buffer at pH 7.5 (Figure 4.1, zymography a, lane Tris). This result was corroborated several times, and it was significantly more dramatic when the sample that had been left for several days at 4°C (checked after one week and two weeks) was analysed again.

The decrease in RNase 1 could be attributed to losses during the extraction process, but no RNase 1 could be detected in the discarded fractions. RNase 1 seemed to remain in the final extract when quantifying the protein right after the extraction procedure by sandwich ELISA. Thus, degradation by pancreatic proteases released during homogenisation was assumed to be the cause of those dramatic losses and therefore the extraction protocol was modified to include proteases inhibitors, as described in Figure 4.1, protocol 2. Leupeptin (a serine and cysteine proteases inhibitor), Aprotinin (which inhibits numerous serine proteases), PMSF (a serine protease inhibitor) and EDTA (a divalent metal chelator used to inactivate metal-dependent enzymes) were added after the supernatant neutralization, and Leupeptin and PMSF were added again at the end of the extraction, to avoid further protein degradation. These modifications greatly improved the recovery of RNase 1 which could then be detected by zymography (Figure 4.1, zymography b).

Pancreatic RNase 1 was further purified in two chromatographic steps: Heparin affinity chromatography and reverse phase chromatography on a Vydac C4 column. Heparin affinity chromatography is useful for nucleic acids binding proteins and has been described for RNase 1 purification (Yasuda et al., 1990; Leimoni et al. 2003). Reverse phase chromatography on a Vydac C4 column is used as a final purification step and has also been described for RNase 1 purification (Ribó et al., 1994).

Prior to Heparin chromatography, the sample is centrifuged at 9000 rpm for 10 minutes and 12000 rpm for 10 more minutes. The resuspended pancreas pellet after the acetone precipitation is usually very sticky and does not dissolve completely, which causes a protein loss of up to 40%.

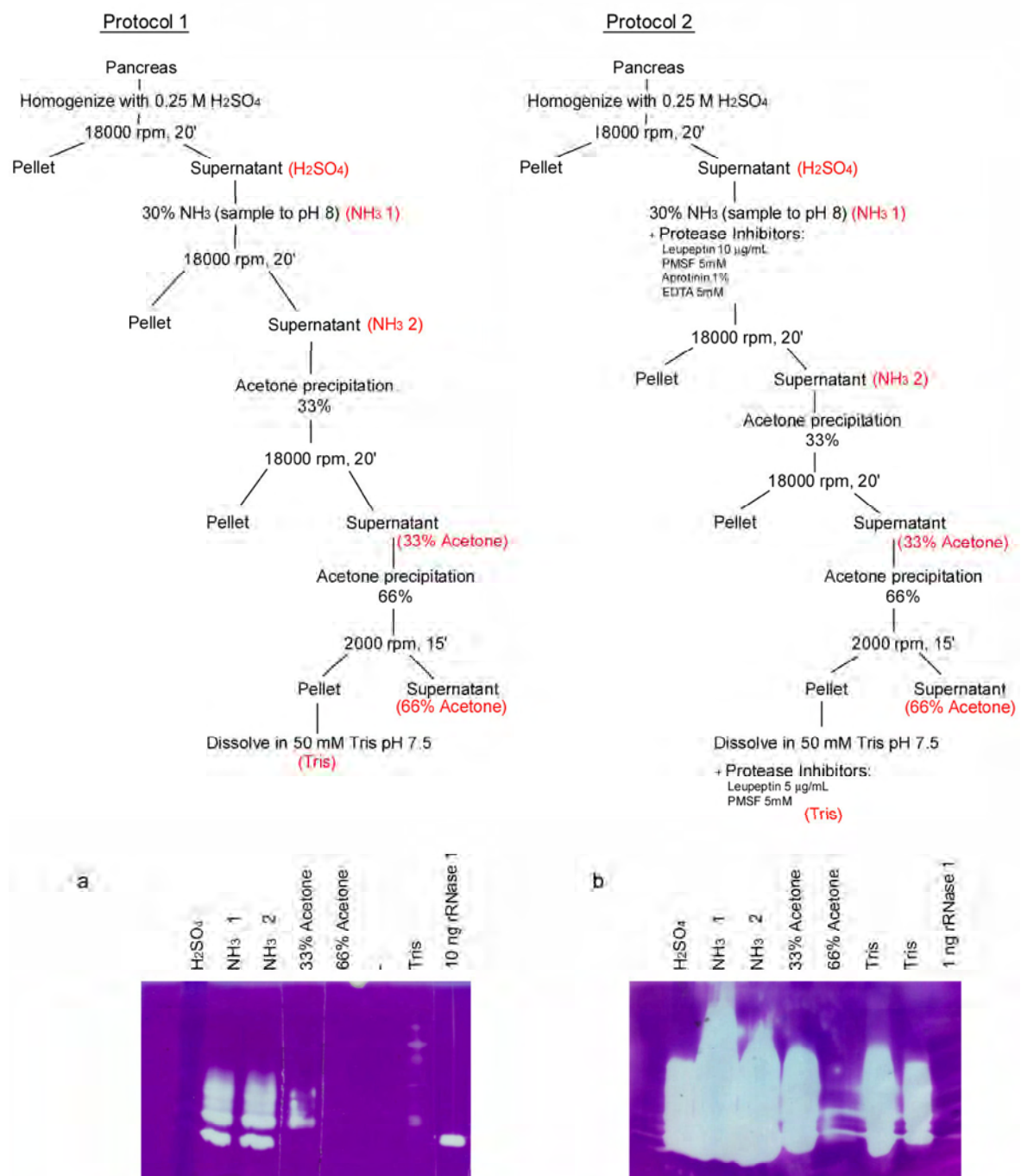


Figure 4.1: Top, RNase 1 extraction protocols. Protocol 1 is the protocol described by Weickmann et al. (1981) and Protocol 2 contains the modifications introduced to improve the recovery of RNase 1. Bottom, zymographies presenting the RNase 1 activity in several fractions during the extraction procedure (marked in the protocols in red). a. Zymography of the samples obtained during protocol 1 development. b. Zymography of the samples obtained applying protocol 2.

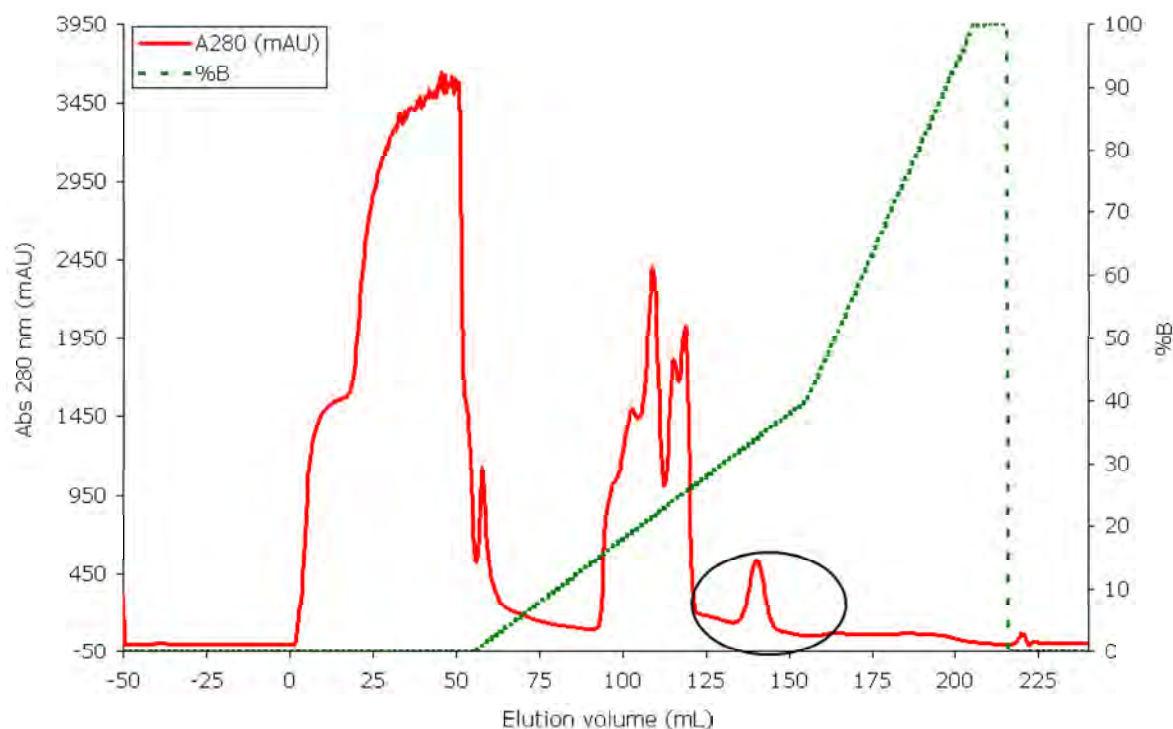


Figure 4.2: Purification of pancreatic RNase 1. Chromatogram of heparin affinity chromatography of pancreas homogenate. RNase eluted between 20 % - 60 % of buffer B (50mM Tris/HCl, 1.5M NaCl, pH 7). Absorbance at 280 nm was indicative of the total protein content. The circle indicates the RNase 1 positive fractions.

Heparin affinity chromatography was carried out in a fast protein liquid chromatography (FPLC) system using Tris-HCl, pH 7 as a mobile phase (Figure 4.2). Sodium phosphate is a commercially recommended buffer but inhibition of RNase 1 by phosphate has been previously described (Winstead and Wold, 1965). In order to avoid this inhibition, Tris buffer was chosen instead of sodium phosphate. The heparin column was equilibrated with 50 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 7. The sample was injected after being equilibrated with the dialyzing buffer. The column was eluted with a linear gradient of up to 0.6 M NaCl, followed by a second linear NaCl gradient (up to 1.5 M). Ribonuclease fractions were eluted between 0.35 and 0.75 M NaCl, dialyzed against MilliQ water, and freeze dried.

Vydac C4 Reverse-phase chromatography was carried out as previously described (Ribó et al., 1994). Shortly, the column is equilibrated with H₂O:Acetonitrile (9:1), 0.1% TFA. Samples are injected into the column in H₂O, 0, 0.1% TFA and elution takes

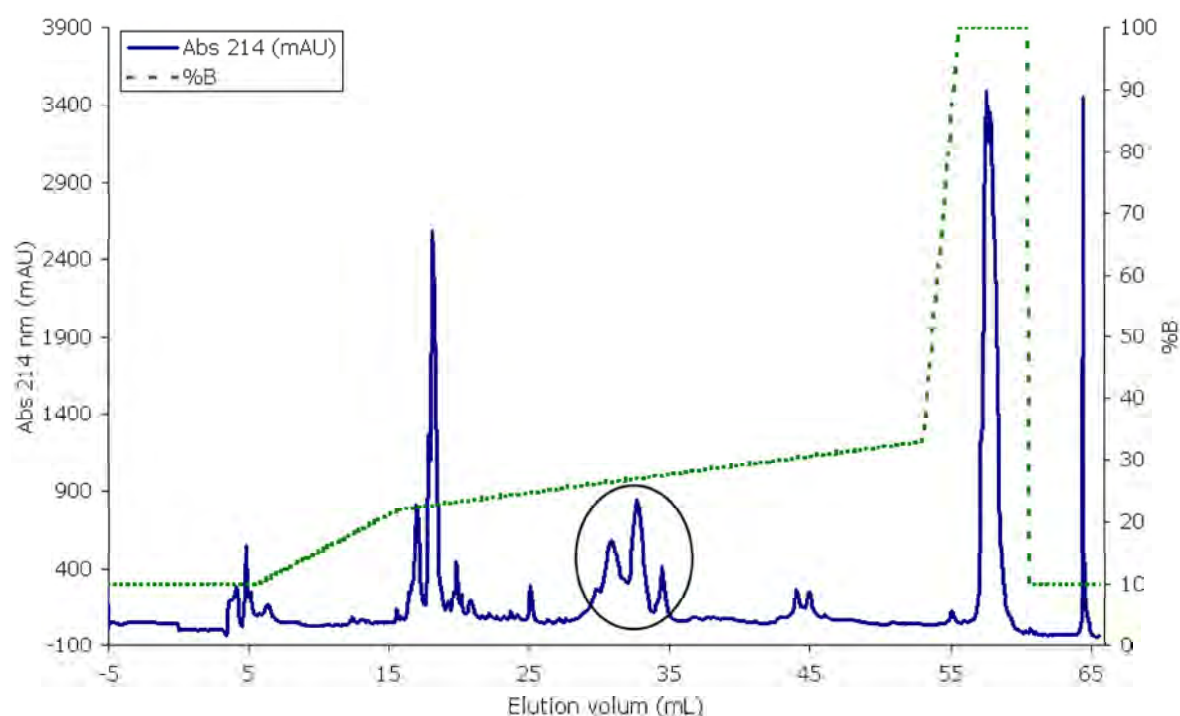


Figure 4.3: Purification of pancreatic RNase 1. Chromatogram of reverse phase chromatography Vydac C4 of RNase 1 positive fractions of the heparin affinity chromatography. RNase 1 elutes between 28 % - 30 % of buffer B (Acetonitrile, 0.1% TFA). Absorbance at 214 nm was indicative of the total protein content. The circle indicates the RNase 1 positive fractions.

place with an acetonitrile gradient of up to 100%. RNase 1 elutes between 22% and 33% acetonitrile (Figure 4.3).

RNase 1 elutes from the reverse phase chromatography in forms ranging from highly glycosylated to unglycosylated (Figure 4.4).

Pure RNase 1 from pancreas was used for N-glycan sequencing. The results showed that the glycans from RNase 1 from healthy pancreas are mainly fucosylated complex biantennary structures. Tri- and tetraantennary glycans were also present, both of them fucosylated, in the highly glycosylated RNase 1. Poly-*N*-acetyllactosamines could be detected by MALDI MS, as could some probable high-mannose structures. RNase 1 from healthy pancreas showed a high content of fucose and no sialic acid, and some of the N-glycans from this RNase 1 contained the Le^y epitope (Peracaula et al., 2003a).

4.1.2 Serum RNase 1 purification

In the following result sections (sections 4.2 and 4.3), serum RNase 1 was analysed by two-dimensional electrophoresis, and its glycans characterized. In order to completely purify the serum RNase 1, several strategies combining different chromatographic steps were tested. Thus, affinity chromatography to Cibacron blue is recommended for nucleic acids binding proteins, which would be the case for RNase 1. In addition, the interaction between human serum albumin (HSA) and Cibacron-blue has also been described, making this chromatography very useful for serum depletion. Cationic exchange chromatography on a Mono-S column has been widely used for RNase 1 purification (Ribó et al., 1994; Fernández-Salas et al., 2000). Heparin affinity chromatography is also recommended for proteins that can bind nucleic acids as described above.

A combination of these chromatographies has been tested for purifying serum RNase 1. To begin with, the different strategies focused on choosing the best chromatography to carry out first in order to deplete most of the serum proteins. For that purpose two affinity chromatographies were checked: heparin chromatography and Cibacron Blue chromatography (Figure 4.5).

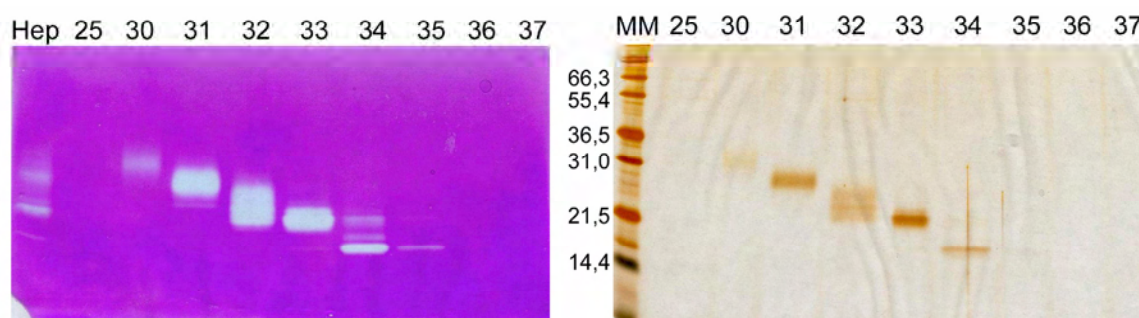


Figure 4.4: Zymography (left) and Silver stained-gel (right) of the different RNase 1 fractions eluted from reversed-phase chromatography. Lane 1 corresponds to a pool of RNase 1 positive fractions after the Heparin chromatography (Hep, zymography) or molecular markers (MM, silver stain). The other lanes contain RNase 1 fractions according to the elution volume of Vydac C4. MM: molecular weight markers in kDa.

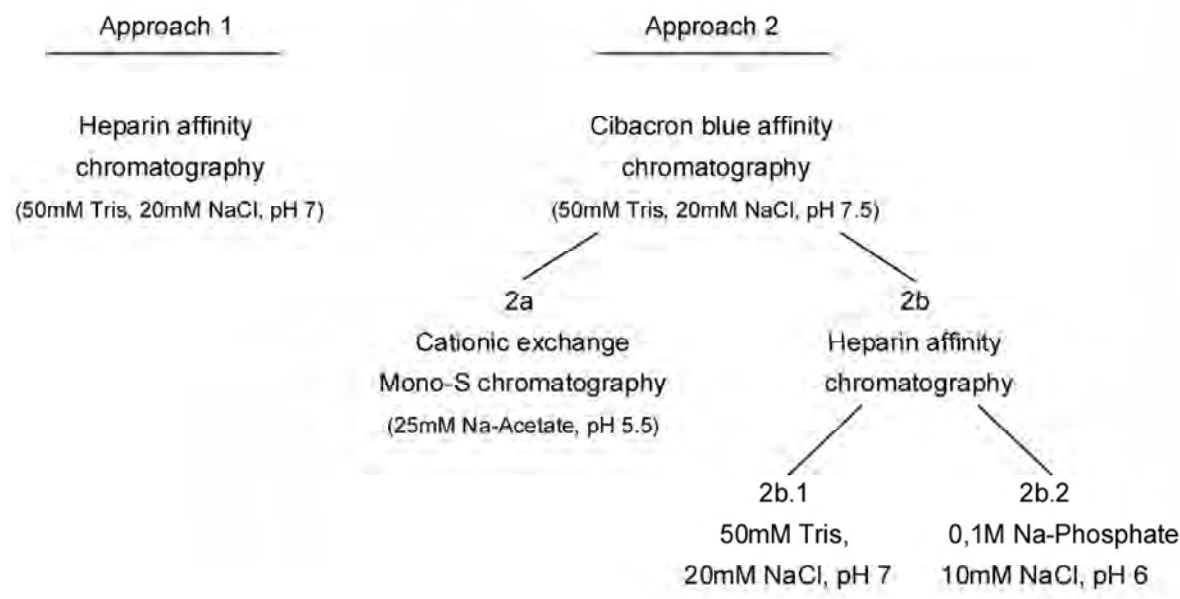


Figure 4.5: Different strategies used for serum depletion and RNase 1 purification.

Approach 1: Heparin chromatography.

Different sera were pre-purified to increase the proportion of RNase 1 in the samples using heparin affinity chromatography with 50mM Tris-HCl buffer, pH 7. These conditions were the ones under which the RNase 1 from healthy pancreas was purified with satisfactory results.

Protein levels in all the sera analysed were between 60 and 80 mg/mL. RNase 1 concentration by sandwich ELISA ranged from 500ng/mL to 3500 ng/mL. After heparin chromatography, the efficiency in RNase 1 recovery varied depending on the sample (table 4.1), being very high in some cases (more than 90%) but very low in others (below 20%).

Heparin consists of a sulphated glucosaminoglycan formed by alternating units of uronic acid and D-glucosamine, most of which are substituted with one or two sulphate groups. Heparin is covalently coupled to agarose beads to form the stationary phase, which is a heavily negatively charged matrix. RNase 1 is a basic protein (theoretical pI=8.98) and, under the experimental conditions used in this chromatography (Tris-buffer pH 7), it is probably slightly positively charged and probably binds weakly to

	Sample	Protein (mg)	RNase1 (ng)	Efficiency
Serum 1	Unprocessed	60-80	742±101	92,2
	RNase 1 fractions	5.32	684±184	
Serum 2	Unprocessed	60-80	1975±1060	55,2
	RNase 1 fractions	5.32	1090±35	
Serum 3	Unprocessed	60-80	2037±124	31,8
	RNase 1 fractions	0.19	648±3	
Serum 4	Unprocessed	60-80	3430±421	19,4
	RNase 1 fractions	0.2	666±143	
Serum 5	Unprocessed	60-80	3077±447	55,6
	RNase 1 fractions	0.29	1710±225	

Table 4.1: Summary of serum RNase 1 purification by Heparin chromatography.

the heparin. Negative charged oligosaccharide chains in serum RNase 1 weaken the interaction with the matrix even more and decrease the serum RNase 1 recovery efficiency. RNase 1 from healthy pancreas contains only neutral glycans, which probably do not interfere in the interaction between RNase 1 and heparin, which would explain the results obtained previously using Tris buffer solution at pH 7 for pancreatic RNase 1 purification and heparin affinity chromatography.

Approach 2: Cibacron blue chromatography.

Cibacron blue chromatography is widely used for serum depletion since HSA binds to the stationary phase. HSA is the main protein in the serum, being more than 50% of the protein content, which causes interference in some analytical techniques such as two-dimensional electrophoresis when trying to detect minor proteins. Therefore, removal of HSA from the serum is of great importance for conducting two-dimensional electrophoresis experiments and is also a challenge in serum RNase 1 purification.

Due to the extensive use of this chromatography for serum depletion, Cibacron blue affinity chromatography was tested as a first step in serum RNase 1 purification, and it was observed that RNase 1 binds to Cibacron blue even more strongly than HSA. RNase 1 positive fractions detected by sandwich ELISA were pooled for further analysis and RNase 1 recovery percentage for Cibacron blue was about 81%.

Sample	Initial protein (mg)	Final protein (mg)	Protein Recovery	Initial RNase 1 (ng)	Final RNase 1 (ng)	Recovery Recovery	RNase 1/Protein (ng/ μ g)*
Serum 6	88,5	30,6	35%	2438	1374	56%	1/22,3
Serum 7	68,5	30,6	45%	839	529	63%	1/57,8
Serum 8	49,5	16,5	33%	1801	1151	64%	1/14,3
Serum 9	52,9	27,3	52%	1401	917	65%	1/29,8
Serum 10	84,7	18,3	22%	1054	783	74%	1/23,4
Serum 11	78,4	24,8	32%	984	768	78%	1/32,3
Serum 12	1,1 \cdot 10 ³	395	36%	28,7 \cdot 10 ³	26,3 \cdot 10 ³	92%	1/15,0
Serum 13	1,7 \cdot 10 ³	282	17%	29,5 \cdot 10 ³	22,9 \cdot 10 ³	78%	1/12,3
Serum 14	1,4 \cdot 10 ³	856	61%	58,0 \cdot 10 ³	58,0 \cdot 10 ³	100%	1/14,8
Serum 15	1,15 \cdot 10 ³	326	28%	16,6 \cdot 10 ³	16,5 \cdot 10 ³	99%	1/19,8
Serum 16	1,45 \cdot 10 ³	209	14%	125,6 \cdot 10 ³	106,7 \cdot 10 ³	85%	1/2,0
Serum 17	332,9	24,4	9%	1,26 \cdot 10 ³	1,00 \cdot 10 ³	79%	1/24,4

Table 4.2: Summary of serum RNase 1 purification by Cibacron blue chromatography and percentage of protein and RNase 1 recovery. *50 ng of RNase 1 are required for detection by immunoblot analysis after two-dimensional electrophoresis. Maximum protein quantity allowed in the two-dimensional electrophoresis is 500 μ g. Relations lower than 1/10 cannot be run under the two-dimensional electrophoresis conditions.

The proportion of RNase 1 to total protein was still too small since part of the HSA eluted with RNase 1 in the chromatography (table 4.2). Another chromatographic step was required, therefore, to increase the RNase 1 proportion in the sample for two-dimensional electrophoresis analysis.

Affinity to Heparin chromatography versus cationic exchange chromatography (Mono-S) as a second step for RNase 1 purification after Cibacron blue chromatography.

After serum depletion with affinity to Cibacron blue chromatography, it was necessary to further purify the RNase 1. With this aim, two different chromatographies were assayed: cationic exchange Mono-S chromatography (2a) and heparin chromatography (2b), and two different buffer compositions were tested for heparin affinity chromatography. The first was 50 mM Tris pH 7 and the second was 25 mM sodium phosphate, pH 6. The lower pI in this second condition would make the RNase 1 more positively charged, which would increase its potential for binding to the negatively charged heparin molecule and would thus reduce the potential repulsion between heparin and the negative oligosaccharides present in RNase 1 glycans.

Mono-S				Heparin (sodium phosphate buffer)			
Sample	Initial (ng)	Final (ng)	Recovery	Sample	Initial (μg)	Final (μg)	Recovery
Serum 6	2438	962	39%	Serum 12	28,7	16,9	59%
Serum 7	834	337	40%	Serum 13	29,5	24,4	83%
Serum 8	1801	780	43%	Serum 14	58,0	29,0	50%
Serum 9	1401	507	36%	Serum 15	16,6	15,7	95%
Serum 10	1054	536	51%	Serum 16	125,6	97,4	77%
Serum 11	984	445	45%	Serum 17	1,26	0,66	52%

Table 4.3: Summary of serum RNase 1 purification by Mono-S and Heparin chromatography after Cibacron blue chromatography.

2a. Cationic exchange chromatography contains SO_3^- groups to which proteins with a pI higher than the buffer pH, and thus positively charged, can bind. RNase 1 is a basic protein with a theoretical pI of 8.98 and cationic exchange is a good option since RNase 1 is positively charged at neutral pI. Chromatographic conditions were 25 mM sodium acetate pH 5.5 to ensure the positive charge of RNase 1 and elution was carried out increasing the ionic strength up to 1 M NaCl. The recovery percentage of RNase 1 was between 55% and 70% for the several samples processed, with a final percentage including the first Cibacron blue chromatographic step of 40%-50% of RNase 1 (table 4.3).

2b. Heparin affinity chromatography (using Tris-HCl buffer solution as a mobile phase) had already been tested as a first chromatographic step (approach 1). The same chromatography under the same conditions was tried once again but the recovery percentage was about 40%-50% and this option was dismissed. Next, the heparin affinity chromatography buffer was modified to improve RNase 1 interaction and recovery. The buffer recommended by the manufacturer is sodium phosphate and this was used instead of Tris-HCl. Chromatographic conditions were 25mM sodium phosphate, 10mM NaCl, pH 6; elution was carried out gradually, increasing the NaCl concentration up to 1.5M. These conditions improved the recovery percentage from 50% to 90%, with a final percentage including the first Cibacron blue chromatographic step of 50%-90% (table 4.3).

In the light of the results obtained from the different approaches to RNase 1 purification, the combination of affinity chromatography to Cibacron blue followed by affinity chromatography to heparin (using sodium phosphate buffer as a mobile phase) was the one chosen (see chromatograms and zymography in page 85 and 86 of the result section).

Complete purification of RNase 1.

For further purification of RNase 1, reverse phase chromatography on a Vydac C4 column in a high performance liquid chromatography system was carried out as described previously (Ribó et al., 1994).

Vydac C4 possesses an interesting feature in relation to RNase 1 purification. Glycosylated proteins are less retained in the column than the corresponding unglycosylated proteins. RNase 1 has three N-glycosylation sites occupied at different levels. RNase 1 is gradually eluted from Vydac C4 reverse phase chromatography in forms ranging from highly glycosylated, with the three N-glycosylation sites occupied, to unglycosylated, which have been very useful for further characterization of RNase 1 glycans.

4.1.3 EA.hy926 cell line culture and RNase 1 purification

EA.hy926 is a hybrid cell line obtained from the fusion of a human umbilical vein endothelial cell line (HUVEC) and a lung adenocarcinoma cell line (A549/8) that behaves like a permanent line (Edgell et al., 1983). This cell line has been chosen to characterize RNase 1 glycans since it has been demonstrated that RNase 1 secretion by these cells is due to parental endothelial cells (HUVEC) (Landré et al., 2002). RNase 1 secreted by EA.hy926 presents the same molecular heterogeneity and activity as RNase 1 from other endothelial cell lines (Landré et al., 2002) and its 2-DE pattern is also very similar to other endothelial cell lines (see results chapter 2).

In order to purify the RNase 1 secreted by the EA.hy926 cell line, cells were grown to confluence in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 10% of Foetal Bovine Serum (FBS). Cells were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) and incubated in DMEM, without FBS, for 72 hours, in accordance with the protocol described by (Landré et al., 2002). This strategy was very useful in preventing the presence of RNase A (the bovine counterpart of RNase 1) in the conditioned media. RNase A is present in FBS and makes the purification of RNase 1 very difficult due to the high similarity of biochemical features in RNase A and RNase 1. Thus, the FBS-free EA.hy926-conditioned media contains RNase 1 with very low amounts of other proteins.

More than two litres of conditioned media were collected, centrifuged twice at 10000 \times g for 30 min and the cell-free supernatant concentrated with a tangential filtration membrane of 5 kDa cut-off (Millipore) to increase RNase 1 concentration. RNase 1 was then purified (Pagès-Pons, 2006) following the protocol previously optimized for the serum samples.

4.2 Glycosylation of serum ribonuclease 1 indicates its endothelial origin and reveals an increase in core fucosylation in pancreatic cancer

Sílvia Barrabés,¹ Lluís Pagès-Pons,¹ Catherine M. Radcliffe,^{2,5} Glòria Tabarés,¹ Esther Fort,³ Louise Royle,² David J. Harvey,² Michel Moenner,⁴ Raymond A. Dwek,² Pauline M. Rudd,^{2,5*} Rafael de Llorens¹, Rosa Peracaula,^{1*}

¹Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Biologia, Universitat de Girona, Campus de Montilivi s/n. 17071, Girona, Spain.

²Glycobiology Institute, Department of Biochemistry, Oxford University, Oxford OX1 3QU, United Kingdom.

³Unitat de Digestiu, Hospital Universitari Dr. Josep Trueta, Avinguda de França s/n. 17007, Girona, Spain.

⁴INSERM, E113; Université Bordeaux 1, Avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex, France.

⁵Current address: Dublin-Oxford Glycobiology Laboratory, NIBRT, Conway Institute, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland.

*Address correspondence to these authors at: Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Biologia, Universitat de Girona, Campus de Montilivi s/n. 17071, Girona, Spain. Phone 34 972418370 Fax 34 972418370; e-mail: rosa.peracaula@udg.es. Or Dublin-Oxford Glycobiology Laboratory, NIBRT, Conway Institute, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland. Phone 353 1 7166728 Fax 353 1 7166713 e-mail: pauline.rudd@nibrt.ie.

Running Title: Glycosylation analysis of serum ribonuclease 1.

Abstract

Human pancreatic ribonuclease 1 (RNase 1) is a glycoprotein expressed mainly by the pancreas and also found in endothelial cells. The diagnosis of pancreatic cancer (PaC) remains difficult and therefore the search for sensitive and specific markers is required.

Previous studies showed that RNase 1 from human healthy pancreas contained only neutral glycans, while RNase 1 from PaC cell lines contained sialylated structures. To determine whether these glycan tumour-cell associated changes were also characteristic of serum RNase 1 and could be used as a marker of PaC, we have analysed the glycosylation of serum RNase 1. The origin of serum RNase 1 was also investigated.

Serum RNase 1 from two PaC patients and two controls were purified and the glycans analysed by HPLC-based sequencing and mass spectrometry. Although normal and tumour serum RNase 1 contained the same glycan structures, there was an increase of 40% in core fucosylation in the main sialylated bi-antennary glycans in the PaC serum RNase 1. This change in proportion would be indicative of a subset of tumour-associated glycoforms of RNase 1 which may provide a biomarker for PaC.

Two-dimensional electrophoresis of the RNase 1 from several endothelial cell lines, EA.hy926, HUVEC, HuMMEC and HuLEC, showed basically the same pattern and was also very similar to that of serum RNase 1. RNase 1 from EA.hy926 was then purified and presented a glycosylation profile very similar to that from serum RNase 1, suggesting that endothelial cells are the main source of this enzyme.

Introduction

Human ribonucleases have been widely studied in recent years because of their biological activity and possible therapeutic applications (Schein, 1997). Our studies have focused on human pancreatic ribonuclease 1 (RNase 1), which is an enzyme that belongs to the RNase A superfamily and is the human counterpart of bovine RNase A (Sorrentino and Libonati, 1997). RNase 1 has been isolated mainly from pancreas (Weickmann et al., 1981), which is the tissue with highest expression (Futami et al., 1997; Fernández-Salas et al., 2000), but it is also present in many different tissues and

fluids such as serum, kidney, brain (Weickmann and Glitz, 1982) and urine (Kurokawa et al., 1983). Recently, RNase 1 secretion by endothelial cells from different blood vessels including veins, arteries and capillaries has been reported (Moenner et al., 1997; Landré et al., 2002).

In the 1970's, serum ribonuclease 1 levels were proposed by many authors as a possible tumour marker of pancreatic cancer (PaC) (Reddi and Holland, 1976; Maor and Mardiney, 1978). However, further studies revealed that serum RNase 1 activity and concentration were neither sensitive nor specific enough for this purpose (Weickmann et al., 1984; Kurihara et al., 1984). In addition, increased levels of serum RNase 1 can be associated with age and different diseases such as pancreatitis and renal insufficiency (Weickmann et al., 1984).

The incidence of PaC in 2004 was estimated to be 58,700 cases in the European Union (the 12th incidence rank). Its mortality for the same year was estimated as 61,000 cases and it was 6th in the list of mortalities caused by cancer (Boyle and Ferlay, 2005). PaC symptomatology is not clear and can be easily misinterpreted. Diagnosis is therefore difficult and PaC is usually diagnosed late when it is already disseminated, making treatment difficult and contributing to the low survival rate (Saif, 2006). The improvement of PaC diagnosis and, consequently, the implementation of more successful treatments, require the identification of a sensitive and specific tumour marker.

One of the general features of tumour cells is the change in the glycosylation pattern of their cell surface glycoconjugates, which can also be reflected in the glycosylation of their secreted glycoproteins (Peracaula et al., 2003a). Generally, N-glycans are more branched and more sialylated in tumours (Dennis et al., 1999; Gorelik et al., 2001). Lewis structures have been found to be overexpressed in carcinomas and SLe^x and SLe^a have been identified as tumour antigens (Ørntoft and Vestergaard, 1999; Dennis et al., 1999).

RNase 1 has three potential N-glycosylation sites at Asn-34, Asn-76 and Asn-88. Taking into account the well established finding that glycosylation is altered in tumour cells and could also be tissue-specific, we investigated whether the glycosylation of pancreatic RNase 1 could be altered in tumour situations and if these changes could be used to identify the tumour state. Previous results from our group showed significant

differences in glycan structures of RNase 1 from healthy pancreatic tissues and RNase 1 from pancreatic adenocarcinoma cell lines (Peracaula et al., 2003a). The main differences were a decrease in fucosylation and an increased sialylation in the RNase 1 of tumour origin, resulting in the presence of SLe^x and SLe^a detected only in the RNase 1 secreted from the tumour cell lines.

With the aim of evaluating possible glycan modifications on serum RNase 1 that could be indicative of tumours, serum RNase 1 from two PaC patients' sera and two control donors' sera was purified and characterized by glycan sequencing. The glycosylation analysis of serum RNase 1 revealed that there is a 40% increase in glycoforms that are core fucosylated in the RNase 1 from the serum of pancreatic adenocarcinoma patients and this could be of clinical value for PaC. In addition, we have also investigated whether the serum RNase 1 comes mainly from the pancreas or from other tissues which could also supply RNase 1 to the blood system. Thus, RNase 1 from several endothelial cell lines (EA.hy926, HUVEC, HuLEC and HuMMEC) was compared by 2-dimensional electrophoresis (2-DE) and a very similar pattern was observed among all the endothelial samples. It was further compared to the serum RNase 1 and the 2-DE pattern was again very similar, in contrast to the 2-DE pattern of healthy pancreas RNase 1 that showed a completely different profile. RNase 1 from all these endothelial cell lines and from serum contains sialic acid since most of these 2-DE RNase 1 spots were digested to more basic ones after a treatment with neuraminidase. Due to the high similarity of the 2-DE pattern among the different endothelial cell lines, RNase 1 was purified from the endothelial cell line EA.hy926 and its glycans were also characterized. The comparison of the glycan structures of RNase 1 from sera and endothelial cells suggested that the main source of serum RNase 1 is the endothelium rather than the pancreas.

Results

Serum RNase 1 purification

In order to analyse the glycan structures of serum RNase 1 of tumour origin and compare them to the structures expressed in sera from healthy donors, a purification procedure to obtain pure RNase 1 from serum was established. RNase 1 from two

PaC patients' and two control donors' sera was purified using several chromatographic steps. The results for the purification of the RNase 1 of PaC A are shown in Figure 4.6 and are representative of the other sera.

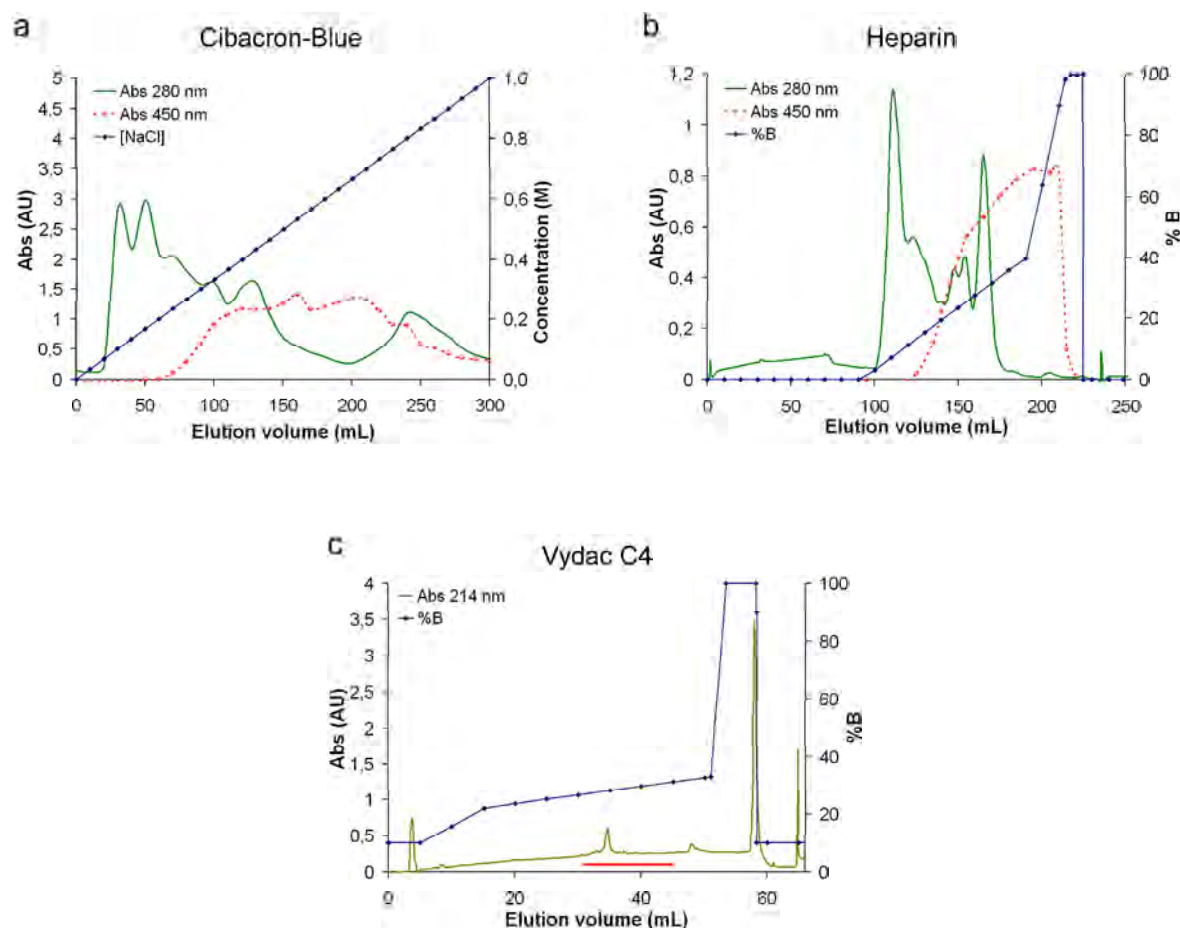


Figure 4.6: Purification of serum RNase 1 from PaC B. a. Cibacron-blue affinity chromatography: RNase 1 eluted with the saline gradient (25 mM Tris-HCl, 0.02–1 M NaCl, pH 7.5) and detected by sandwich ELISA (absorbance at 450 nm). b. Heparin affinity chromatography: RNase 1 (absorbance at 450 nm) eluted between 20%–60% of buffer B (25 mM NaPhosphate, 1.5 M NaCl pH 6). c. Reversed-phase chromatography: RNase 1 eluted between 27%–31% of buffer B (0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile). The bar indicates the RNase 1-containing fractions. Absorbance at 280 nm or 214 nm was indicative of the total protein content.

First, a Cibacron-Blue chromatography was performed since it is recommended for nucleic acids binding proteins. RNase 1 binds weakly to Cibacron-Blue and can be released from the column with low salt concentration (Figure 4.6a). The second chromatographic step was an affinity chromatography using Heparin as adsorbent. Its polyanionic structure allows the purification of several proteins that interact with DNA or RNA and is thus recommended for RNase 1 purification since it interacts weakly

with the heparin (Sorrentino et al., 1988) (Figure 4.6b). The last chromatographic step was a reversed phase chromatography (Figure 4.6c) where RNase 1 elutes gradually from highly glycosylated fractions to the unglycosylated form as shown by zymography (Bravo et al., 1994) (Figure 4.7a). In SDS PAGE, highly glycosylated ribonuclease fractions have a higher apparent molecular mass than the low glycosylated fractions, and the unglycosylated form migrates at 15 kDa. Earlier studies have shown that the more highly glycosylated RNase 1 fractions purified from pancreas correspond to the protein with three and two glycosylation sites occupied while low glycosylated fractions correspond to the protein with only one glycosylation site occupied (Ribó et al., 1994). The different serum RNase 1 fractions shown in the zymography (Figure 4.7a) were pooled in four fractions according to their apparent molecular mass.

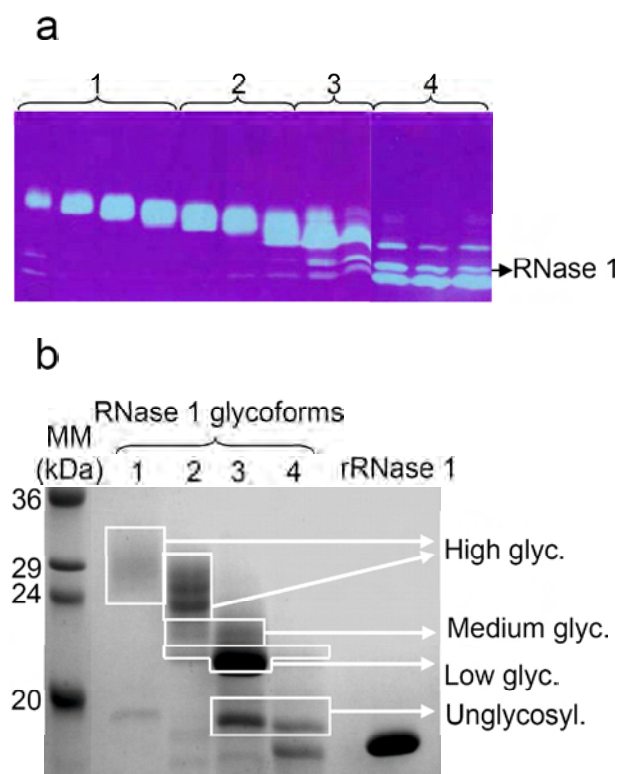


Figure 4.7: Electrophoresis of RNase 1 pure fractions. a. Zymography of the different RNase 1 fractions eluted from reversed-phase chromatography of RNase 1 from PaC B. RNase 1 fractions were pooled as indicated with numbers 1 to 4. The arrow indicates the unglycosylated RNase 1. b. Coomassie-blue stained SDS-PAGE of the pooled fractions 1 to 4 and 5 μ g of recombinant unglycosylated RNase 1 (rRNase). MM: molecular weight markers. RNase 1 bands were excised from the gel (boxed) and separated as high glycosylated, medium glycosylated, low glycosylated and unglycosylated RNase 1.

Glycan release and sequential oligosaccharide digestions of RNase 1 glycans from pancreatic cancer patients' sera

Pooled glycosylated RNase 1 fractions from the PaC sera were electrophoresed in denaturing conditions and glycans were released from gel bands, corresponding to high, medium and low glycosylated RNase 1 fractions, by in situ digestion with PNGase F (Figure 4.7b). Glycans were then fluorescently labelled with 2AB and analysed by NP-HPLC in combination with exoglycosidase digestions, and mass spectrometric analysis. In NP-HPLC, glycans were analysed on the basis of their elution positions measured in Glucose Units (GU), using a dextran ladder to calibrate.

In order to determine whether the glycan pattern was dependent on the site occupancy of RNase 1, NP-HPLC was carried out with an aliquot of each of the different RNase 1 glycosylated fractions (high, medium and low), before and after ABS digestion (enzyme with broad specificity for α -linked sialic acids) (Figure 4.8). Each fraction showed a different glycan profile. The glycans of the higher molecular mass glycoforms had GUs from 6.5 to 13 and were found to contain both the glycans from the medium (GUs from 8 to 11) and low molecular mass glycoforms (GUs from 6.5 to 8.5) and some structures with higher GU (from 11 to 13) (Figure 4.8a). After ABS digestions, glycan structures obtained from the higher molecular mass glycoforms were again a combination of the glycans contained in the medium and low glycoforms plus some structures with higher GUs (Figure 4.8b).

This pattern differs from those found in the RNase 1 glycans from healthy pancreas and from pancreatic cancer cell lines. In both pancreas and pancreatic cell lines, RNase 1 glycans contained in low molecular mass glycoforms were present in all fractions and as the number of sites occupied increased there was an increase in glycan structures of higher GU (Peracaula et al., 2003a).

Glycans from high molecular mass glycoforms of RNase 1 from PaC A, which were representative of all the glycan structures present in each of the fractions of PaC A serum, were fully analysed (Figure 4.9). Major glycans were bi-antennary complex sialylated structures A2G2S1, A2G2S2, FcA2G2S1 and FcA2G2S2 (See legend in Figure 4.9 for an explanation of these abbreviations) (Figure 4.9a). Treatment with ABS (specific enzyme for sialic acid linked α 2-3,6) and NANI (specific enzyme for sialic acid linked α 2-3) digested these major glycans and the rest of the structures to glycans

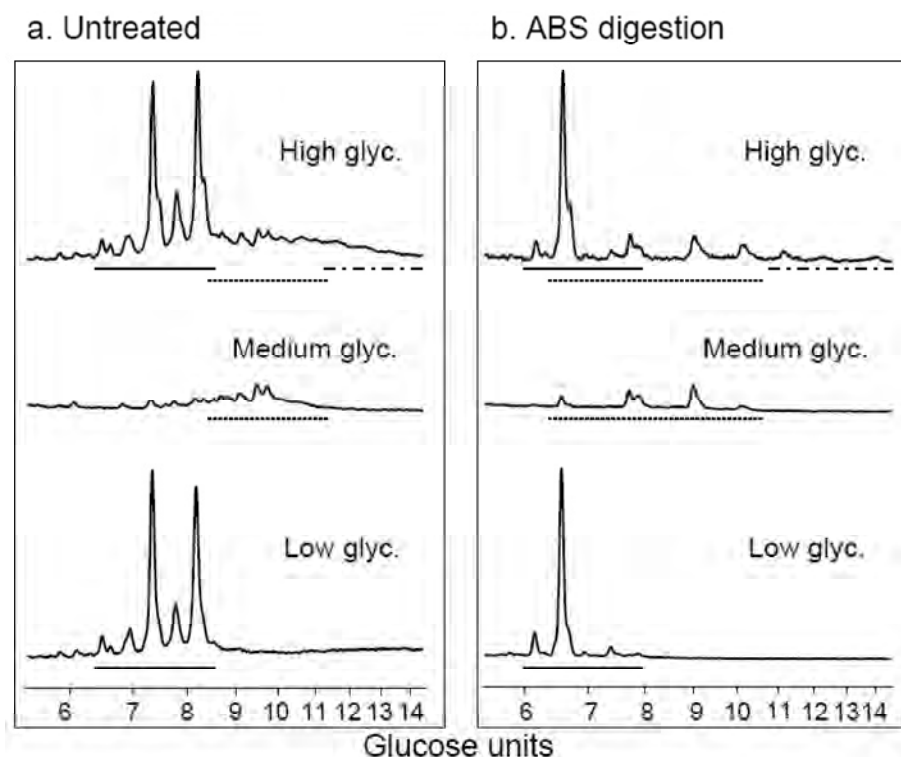


Figure 4.8: Normal phase HPLC profiles of N-linked oligosaccharides obtained by in-gel digestion of the different glycosylated fractions of RNase 1 from PaC serum B. a. NP-HPLC profiles of untreated oligosaccharides. b. NP-HPLC profiles of ABS treated oligosaccharides. Structures present in the low glycosylated fraction are marked with a solid line, fractions present in medium glycosylated fraction are marked with a dotted line and fractions present only in high glycosylated fraction are marked with a hyphen-dot line.

with lower GU, indicating that these glycans were all sialylated and presented both α 2-3 and α 2-6-linked sialic acid (Figure 4.9b, c). After complete sialic acid digestion, tri- and tetra-antennary glycans were detected in addition to the major bi-antennary structures.

The presence and linkages of galactoses and outer arm fucoses in these structures were also determined. There was no difference between the digestion with BTG (specific activity for β 1-3/4>6-linked galactose) and SPG (specific for galactose linked β 1-4) indicating that all galactoses were linked β 1-4 (data not shown). AMF (specific activity for α 1-3 and α 1-4-linked fucose) showed a bi-antennary structure with an outer arm Fuc linked α 1-3 forming the antigen Le^x (Figure 4.9d, e), which would have come from a structure containing the antigen SLe^x . XMF (specific activity for α 1-2 fucose) did not show any outer arm fucose linked α 1-2 (data not shown). The presence of poly-*N*-

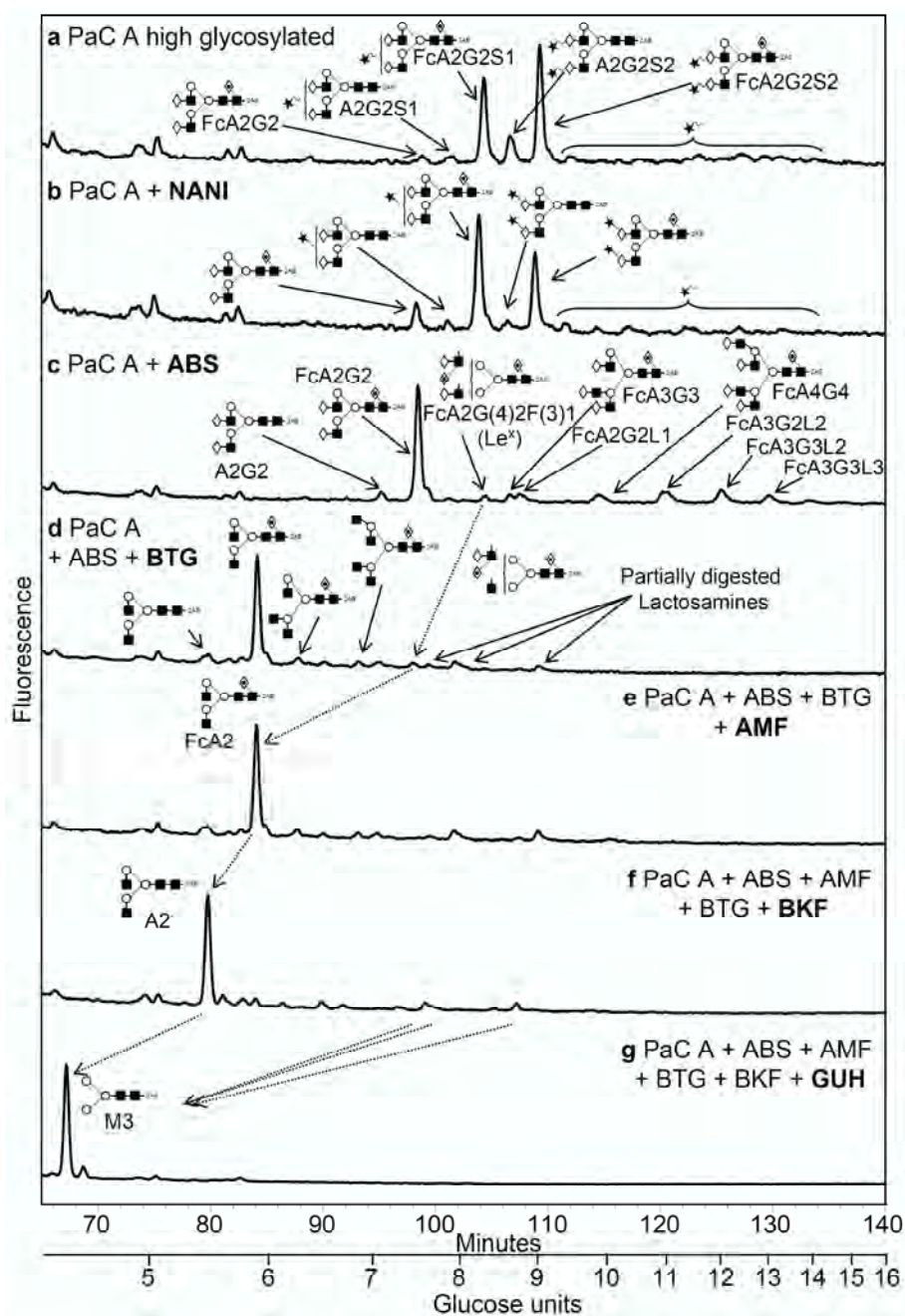


Figure 4.9: Sequential exoglycosidase digestions of N-linked oligosaccharides obtained by in-gel digestion with PNGase F of the high glycosylated RNase 1 from PaC A. One aliquot was analyzed directly by NP-HPLC (a) and the remaining were treated with arrays of exoglycosidase enzymes prior to NP-HPLC analysis as indicated in each panel (b – g). See text for enzyme abbreviations and specificities. Dotted arrows indicate the shifts of the glycans digested by the subsequent enzyme array.

Key to structure abbreviations for this and later figures and for Table 4.4: A1–4 indicates the number of antennae linked to the trimannosyl core; G1–4 indicates the number of terminal galactose residues in the structure; G(4), galactose linked 1–4 to GlcNAc; Fc, fucose linked α 1–6 to core GlcNAc; F(3), outer-arm fucose linked 1–3 to GlcNAc, M, mannose, S, sialic acid and L, Lactosamine extension with linkage Gal β 1–4GlcNAc. Symbol representation of glycans for this and later figures are: GlcNAc = filled square (■); mannose, = open circle (○); galactose = open diamond (◇); fucose = open diamond with a dot inside (◊); sialic acid = filled star (★); beta linkage = solid line; alpha linkage = dotted line; unknown linkage = ~; the linkage itself is indicated by the angle linking adjacent residues thus: 1-4-linkage = horizontal line (-); 1-3-linkage = angled line (/); 1-6-linkage = angled line (\); 1-2-linkage = vertical line (|).

acetyllactosamines was demonstrated by the combination of ABS, BTG, BKF and GuH (broad activity for N-acetylglucosamine) which digested the glycans to the trimannosyl chitobiose core (M3). (Figure 4.9f, g). No hybrid or high mannose structures were detected.

RNase 1 from the two pancreatic cancer serum samples (PaC A and PaC B) presented the same general NP-HPLC profiles and glycan structures (Table 4.4). More complex N-glycans with poly-*N*-acetyllactosamine extensions were found in PaC A after the glycans were treated with ABS (Figure 4.9c).

MALDI, ESI and MS-ESI-LC analysis of RNase 1 glycans from pancreatic cancer patient serum

MALDI and negative ion nanospray MS/MS (Harvey, 2005) analysis of the pool of high, medium and low glycosylated fractions from serum sample PaC B, was carried out after ABS treatment (Table 4.4). Structures were consistent with the HPLC data, being mainly fucosylated bi- tri- and tetra-antennary complex glycans with poly-*N*-acetyllactosamine extensions. Tri-antennary glycans were mainly branched on the 3-antenna but traces of 6-branched compounds were also detected. All fucosylated glycans contained a fucose residue at the 6-position of the reducing-terminal GlcNAc (Harvey, 2005) and three compounds were found with additional fucosylation in one of the antennae, corresponding to glycans containing the Le^x antigen. The second fucose in the difucosylated structure appears to be mainly on the 3-antenna as determined by ESI-MS/MS but there could also be a small amount on the 6-antenna. MS/MS spectra of the other difucosylated compounds were too weak to determine the location of the antenna-linked fucose.

The major ion masses found using ESI-LC/MS (PaC B pooled fractions) were 966,8; 1039,9; 1112,4 and 1185,4 with compositions Hex₅HexNAc₄Neu5Ac₁, Hex₅HexNAc₄Fuc₁Neu5Ac₁, Hex₅HexNAc₄Neu5Ac₂, Hex₅HexNAc₄Fuc₁Neu5Ac₂ corresponding to the main sialylated bi-antennary structures described above (Table 4.4).

A summary of the glycan structures of PaC B before and after ABS digestion is shown in Table 4.4.

Undigested										
GU	Structure*	ESI MS m/z			Composition [†]				Structure	
		Found	Calc.	Ions	H	N	dH	S		
7.53	FcA2G2	nd	nd		nd	nd	nd	nd		
7.96	A2G2S1	966.8	966.8	$[M+2H]^{2+}$	5	4	0	1		
8.39	FcA2G2S1	1039.9	1039.9	$[M+2H]^{2+}$	5	4	1	1		
		1050.9	1050.9	$[M+H+Na]^{2+}$						
		1061.9	1061.9	$[M+2Na]^{2+}$						
		1072.8	1072.9	Na salt $[M+2Na]^{2+}$						
8.82	A2G2S2	1112.4	1112.4	$[M+2H]^{2+}$	5	4	0	2		
9.23	FcA2G2S2	1185.4	1185.4	$[M+2H]^{2+}$	5	4	1	2		
		1196.4	1196.4	$[M+H+Na]^{2+}$						
		1207.4	1207.4	$[M+2Na]^{2+}$						
		1218.4	1218.4	Na salt $[M+2Na]^{2+}$						
		1229.4	1229.4	Na ₂ salt $[M+2Na]^{2+}$						
Digested after ABS treatment										
GU	Structure*	MALDI		ESI		Composition [†]				Structure
		$m/z([M+Na]^+)$	$m/z([M+H_2SO_4]^-)$	Found	Calc.	H	N	dH	S	
6.33	A2G1	1647.6	1647.6	1721.6	1721.6	4	4	1	-	
7.10	A2G2	1663.6	1663.6	1737.6	1737.6	5	4	0	-	
7.51	FcA2G2	1809.6	1809.6	1883.6	1883.6	5	4	1	-	
8.32	FcA2G2F(3)1	1955.7	1955.7	2029.6	2029.7	5	4	2	-	
nd	<i>FcA3G2</i> [‡]	2012.7	2012.7	2086.6	2086.6	5	5	1	-	
nd	<i>A3G3</i> [‡]	2028.7	2028.7	-	2102.7	6	5	0	-	
8.63	FcA3G3	2174.7	2174.8	2248.8	2248.8	6	5	1	-	
8.76	FcA2G2L1	2174.7	2174.8	2248.8	2248.8	6	5	1	-	
nd	<i>FcA2G2L1F(3)1</i> [‡]	2319.7	2320.8	-	2394.8	6	5	2	-	
9.98	FcA4G4	2539.6	2539.9	2613.9	2613.9	7	6	1	-	
10.00	FcA3G3L1	2539.6	2539.9	2613.9	2613.9	7	6	1	-	
10.97	FcA4G4F	2686.4	2686.0	-	2759.9	7	6	2	-	
12.02	FcA3G3L2	2904.6	2905.0	2979.0	2979.0	8	7	1	-	
nd	<i>FcA3G3L3</i> [‡]	3269.8	3270.2	3344.1	3344.1	9	8	1	-	
nd	<i>FcA3G3L3F(3)1</i> [‡]	3416.3	3416.2	-	3490.2	9	8	2	-	
nd	<i>FcA3G3L4</i> [‡]	3635.7	3635.3	-	3709.3	10	9	1	-	
nd	<i>FcA3G3L4F(3)1</i> [‡]	3779.6	3781.4	-	3855.3	10	9	2	-	

Table 4.4: Glycans from RNase 1 from PaC B.

nd: not detected by NP-HPLC, MALDI-TOF MS or ESI MS, as indicated.

*For key to structure abbreviations, see Figure 4.9. [†]Key to ionic compositions: H,hexose; N,HexNAc; dH,deoxyhexose (fucose); S,sialic acid. [‡]Example of possible structures.

Sequential oligosaccharide digestions of RNase 1 glycans from control donor serum

Serum samples from two healthy donors were also analysed (Control A and B). The amount of RNase 1 in control sera was lower than from the cancer sera. Therefore all the purified glycosylated RNase 1 fractions were pooled for the glycan analysis of each control. RNase 1 oligosaccharides from these control samples were released from band gels by in situ digestion with PNGase F and fluorescently labelled with 2AB as described above.

The glycan profiles of these controls, obtained before and after ABS and BTG digestions (Figure 4.10a, c), show the presence of the same glycan structures as in the RNase 1 from cancer patients' sera but with a significantly lower proportion (40%) of core fucosylated structures in comparison with glycans from both high and low glycosylated RNase 1 fractions from PaC sera. Sequential oligosaccharide digestions confirmed the presence of sialylated complex glycans, with A2G2S1 and A2G2S2 with and without core fucosylation as the predominant structures. The analysis after the digestion with ABS + BTG shows the poly-*N*-acetylactosamine structure with the lowest GU that was present in the glycans from RNase 1 from cancer patients' sera. Larger poly-*N*-acetylactosamines were not detectable. The structure containing the Le^x antigen and FcA3 and FcA4 structures were also detected, as for the RNase 1 glycans from PaC patient sera (Figure 4.10c).

2-DE of partially purified RNase 1 from healthy pancreas, serum samples and endothelial cell lines conditioned media

HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells), HuMMEC (Human mammary microvessel endothelial cells) and HuLEC (Human lung microvessel endothelial cells) were cultured in DMEM, 20-30% FBS (Moenner et al., 1997) and the conditioned media was enriched in RNase 1 by two affinity chromatographies to Cibacron-Blue and to Heparin as described for serum samples.

Partially purified RNase 1 from EA.hy926 conditioned media and from the serum sample PaC A sample was obtained also after Cibacron-Blue and Heparin affinity chromatographies and used for the 2-DE.

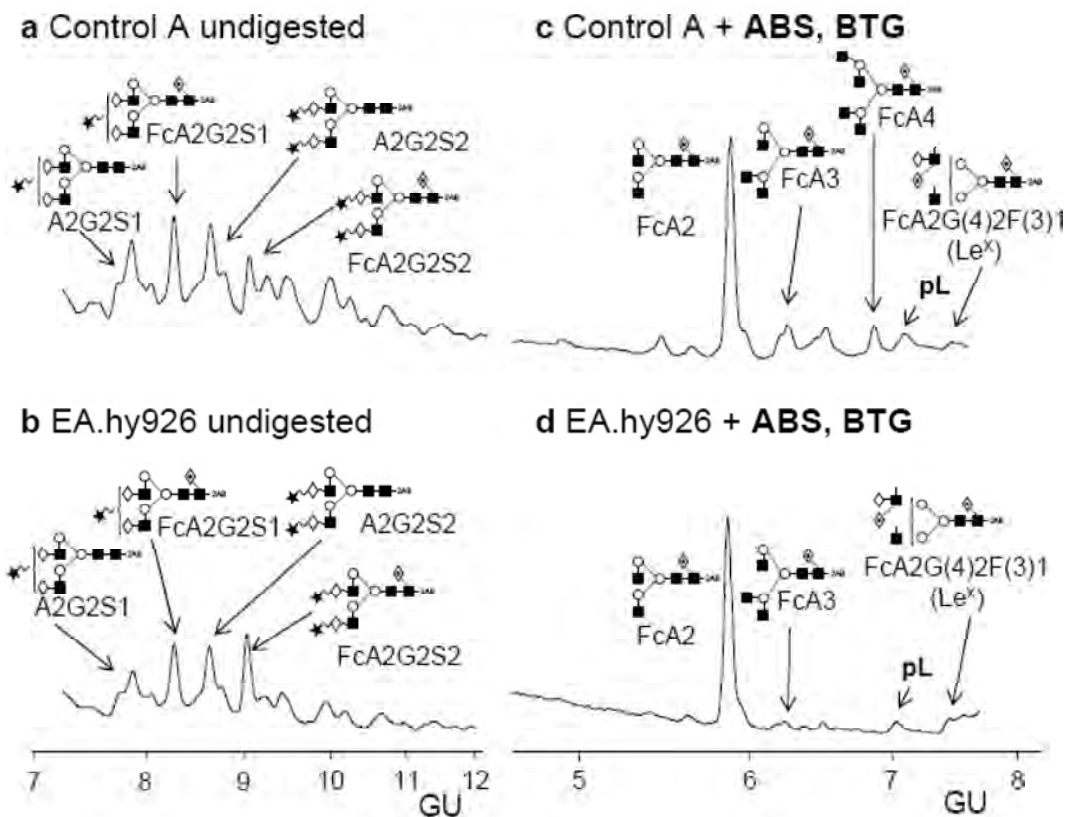


Figure 4.10: Normal phase HPLC profiles of N-linked oligosaccharides obtained by in-gel digestion of RNase 1 from control serum A (a and c) and RNase 1 from EA.hy926 (b and d). NP-HPLC profile of untreated oligosaccharides of control serum and EA.hy926 (a and b). NP-HPLC profile of ABS+BTG treated oligosaccharides of control serum and EA.hy926 (c and d). pL indicates the peaks corresponding to partially digested poly-*N*-acetylactosamines. Key to structure abbreviations is in Figure 4.9.

RNase 1 from healthy pancreas was obtained by acid extraction and acetone precipitation as described in Peracaula et al. (2003a).

After 2-DE electrophoresis, gels were transferred to PVDF membranes and RNase 1 was detected using specific antibodies. The 2-DE patterns obtained (Figure 4.11) for serum samples and endothelial cell line media were highly similar and different from the pattern obtained for healthy pancreas RNase 1. The different spots could be pooled in 7 groups according to their pIs: 7.15 ± 0.04 (group a), 7.48 ± 0.05 (group b), 7.71 ± 0.04 (group c), 7.98 ± 0.05 (group d), 8.20 ± 0.07 (group e), 8.37 ± 0.03 (group f) and 8.44 ± 0.01 (group g). Although serum and endothelial cell lines samples presented a similar pattern, in the case of endothelial cell lines, the higher Mw and low pI forms appear in higher proportion than in serum samples. The last group of spots (group

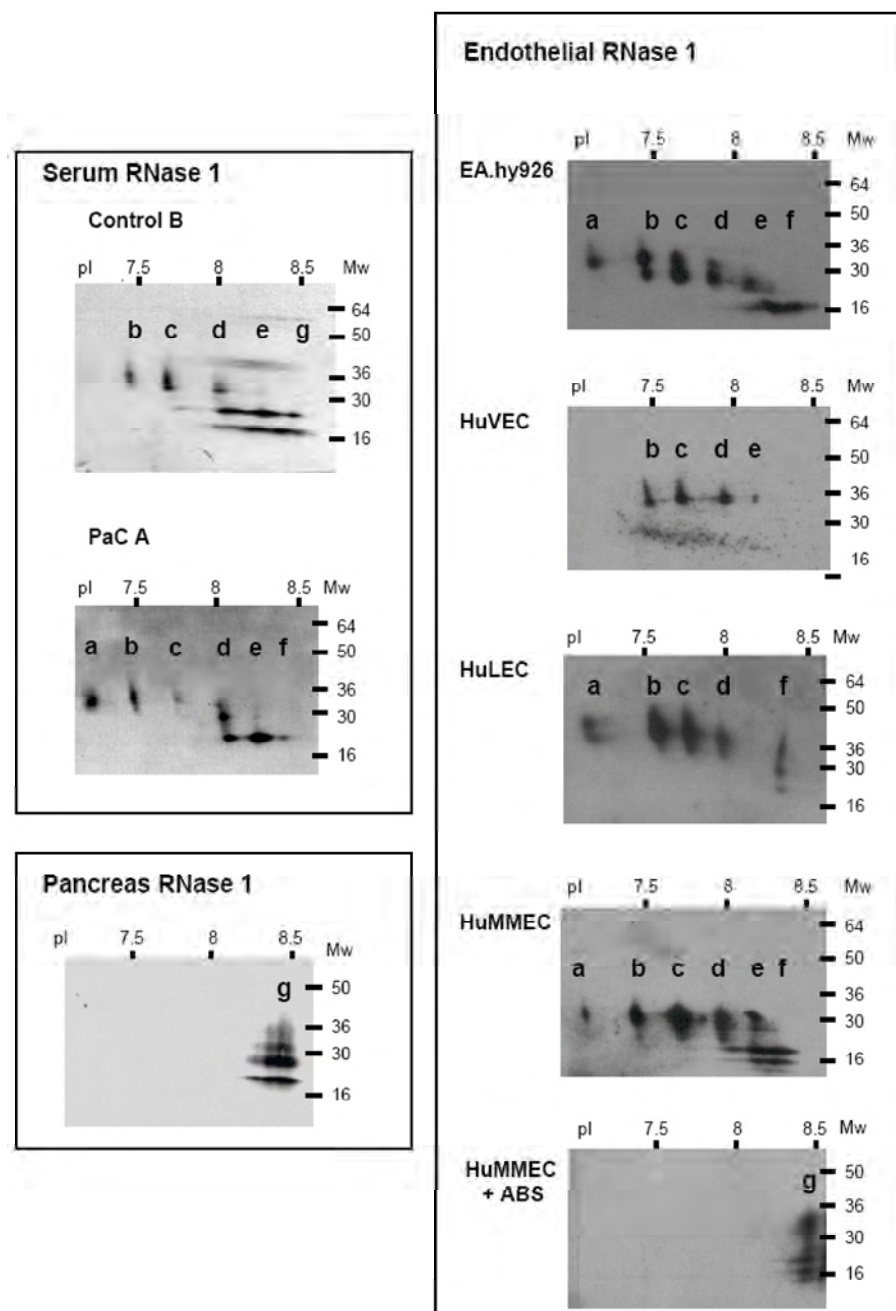


Figure 4.11: 2-DE of a partially purified RNase 1 from healthy pancreas, a control serum (Control B), a pancreatic cancer (PaC A) patient serum and four different endothelial cell line conditioned media. The neuraminidase digestion with ABS of one endothelial cell line conditioned media (HuMMEC) is also shown. The 2-DE gels were transferred to PVDF membranes and RNase 1 was detected using specific antibodies. The different RNase 1 forms detected are pooled according to their pIs (labelled from a to g).

g), which appear to be neutral forms, were not detected in endothelial cell lines media RNase 1 whereas it is the only group present in healthy pancreas RNase 1 (pI=8.43). Digestion of endothelial cell lines RNase 1 with neuraminidase (ABS) shows that, in all cases, all the spots (from a to f) contain sialic acid as they all move to the neutral forms at pI 8.44 (fig. 4.11). Digestion with PNGase F moves all the spots to pI 8.42 with a Mw of 15 KDa, which indicates that all of them contain N-linked oligosaccharides (data not shown). Thus, RNase1 glycoforms with pIs closer to 8.2-8.4 (groups e-f) represent RNase 1 glycoforms with lower sialic acid content. The higher the sialic acid content is. the lower the pI becomes. Taking into account that the higher molecular mass spots correspond to the RNase1 with more glycosylation sites occupied, the spots with lower pI and higher molecular mass (groups a-b) could be attributed to the heavily sialylated RNase glycoforms with all the N-glycosylation sites occupied.

The high similarity among the 2-DE patterns of all the endothelial cell lines suggests that they contain the same RNase 1 forms, including the sialylated N-linked glycoforms. Thus, EA.hy926 can be representative of the endothelial cell lines and can be used as a source for purifying the RNase 1 in order to characterize in detail the RNase 1 glycan structures.

RNase 1 purification and sequential oligosaccharide digestions of RNase 1 glycans from EA.hy926 conditioned media

EA.hy926 were cultured in DMEM 10% FBS to confluence and RNase 1 was purified from the conditioned media after removing the FBS in order to avoid the presence of bovine ribonuclease. RNase 1 was concentrated and purified following the same chromatographic steps as for RNase 1 from serum samples. High-, medium- and low-molecular mass glycoforms showed a similar electrophoretic pattern than those from serum RNase 1 (data not shown). Oligosaccharides from these fractions were released and labelled as before, and pooled for glycan analysis.

The glycan profile obtained was very similar to that of the serum samples (Figure 4.12). The main glycan structures were also sialylated bi-antennary complex glycans, A2G2S1 and A2G2S2 with and without core fucosylation (Figure 4.10b). The proportion of the core fucosylated biantennary glycans was the same as for the control serum samples (Figure 4.12). Digestions with ABS and BTG confirmed the presence of these

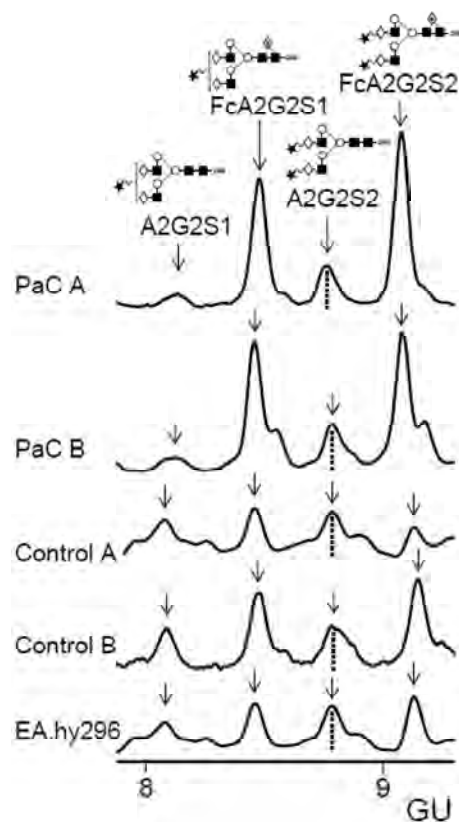


Figure 4.12: Normal phase HPLC profiles of N-linked oligosaccharides obtained by in-gel digestion of RNase 1 from PaC serum A (high glycosylated form), PaC serum B (high glycosylated form), control serum A, control serum B and endothelial cell line EA.hy926. The profiles are scaled against the peak marked with a dotted line.

structures. Again, only the lowest GU poly-*N*-acetylglucosamine structure could be detected (Figure 4.10d). Larger poly-*N*-acetylglucosamines were again not detectable probably due to the low amount of sample. Glycans containing the Le^x antigen and the FcA3 structure were also present. However, the FcA4 glycan detected in the serum RNase 1 was not detected in the EA.hy926 RNase 1 (Figure 4.10d).

The same major glycan structures were present in RNase 1 obtained from both the normal and tumour serum samples and from the conditioned medium of EA.hy926 cells, although they were detected in different proportions. Figure 4.12 shows that the proportion of core fucosylated forms (FcA2G2S1 and FcA2G2S2) was higher in the PaC serum samples than in control and in EA.hy926 samples, and that the proportions of the glycans from the control and the EA.hy926 RNase 1 were very similar.

Discussion

The study of serum RNase 1 as a possible indicator of pancreatic diseases has its basis in the fact that secreted pancreatic enzymes, such as RNase 1, can reach the blood stream through enterohepatic recirculation (Rothman et al., 2002). As the pancreas has been described as the main organ expressing RNase 1 (Futami et al., 1997), it has been assumed that serum RNase 1 originates mainly from pancreas. Alterations in glycan processing are associated with tumour phenotype and tumour progression (Hakomori, 1985). We therefore focused on the analysis of the glycosylation pattern of serum RNase 1 in normal and tumour states of the pancreas to investigate whether differences in the glycan processing of this enzyme in the tumour cells could be indicative of the disease.

In previous work we analyzed the glycans from RNase 1 secreted by pancreatic tumour cell lines and compared them to those of the RNase 1 from pancreas from healthy controls. Some of the glycans from the tumour cell lines contained the sialyl-Lewis^x (SLe^x) and sialyl-Lewis^a (SLe^a) antigens that have been shown to be involved in the process of adhesion and metastasis of the tumour cells (Kannagi et al., 2004). In contrast, RNase 1 glycans from healthy pancreas were all neutral and exhibited fucosylated structures such as the Le^y antigen. The sugars mainly consisted of bi-antennary structures, together with some tri- and tetra-antennary ones, and presented poly-*N*-acetyllactosamine extensions in the higher molecular weight RNase 1 fractions (Peracaula et al., 2003a).

These significant glycosylation differences between RNase 1 from tumour cells and from normal pancreas prompted us to compare the glycan moiety of RNase 1 obtained from the sera of pancreatic cancer patients and healthy controls. Considering first the possible pancreatic origin of the serum RNase 1, we postulated that aberrantly glycosylated RNase 1 secreted by a pancreatic tumour should be readily detectable in the circulation. From this hypothesis, our objective was to identify a new possible marker that could be useful for the detection of pancreatic cancer.

Glycan analysis of serum RNase 1

In this study, serum RNase 1 oligosaccharides from patients with pancreatic carcinoma and from healthy controls have been compared. Although the same glycans were de-

tectable in healthy and tumour sera RNase 1, there was a notable increase (40%) in core fucosylation in the sialylated biantennary glycans from the PaC serum RNase 1. The proportion of non-core fucose:core fucose was 1:1.3 for control serum RNase 1 glycans whereas it was 1:4 for PaC serum RNase 1 glycans. This increase could be explained by the tumour secreting more core fucosylated glycoforms of RNase 1, which could be detected in the serum. This difference in proportion of fucosylation could be ascribed to up-regulation of the α -1,6-fucosyltransferase (FUT8) in the tumour cells (Miyoshi et al., 1999), the substrate availability (Noda et al., 2003) and/or modifications in the Golgi apparatus organization (Kellokumpu et al., 2002).

Serum RNase 1 from both normal and tumour origin contains completely different glycan structures from those from healthy pancreas RNase 1. Glycan structures found in serum RNase 1 are all sialylated and contain very little outer arm fucose, while RNase 1 from healthy pancreas contains only neutral structures and heavily fucosylated glycans with core and outer arm fucoses (Peracaula et al., 2003a). 2-DE analysis of pancreas and serum RNase 1 also revealed a completely different pattern between serum and pancreas RNase 1. Several sialylated RNase 1 glycoforms were detected in serum RNase 1 while neutral forms were the only ones detected in healthy pancreas RNase 1, which is consistent with the sequencing results.

Glycan analysis of endothelial RNase 1

Considering that the glycosylation moiety of secreted and cellular surface glycoproteins usually reflects the organ origin (Yamashita et al., 1986; Kobata, 2000), the results presented here indicate that serum RNase 1, at least in the healthy state, contains very little RNase 1 from pancreatic origin. The pancreatic origin of serum RNase 1 has always been controversial as it has been described that serum RNase 1 levels remain elevated after surgical resection of the pancreas (Peterson, 1979), suggesting that RNase 1 was predominantly released in the blood stream from other organs, a hypothesis strongly supported by our present results.

With the aim of elucidating the cellular and tissue origins of serum RNase 1, we studied the glycosylation pattern of the RNase 1 produced by endothelial cells of vascular origin. RNase 1 expressed by the immortalized endothelial cell line EA.hy926, a hybrid formed by fusing HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) with A549/8

carcinoma cells (Edgell et al., 1983), has been purified and its carbohydrate structures analyzed by glycan sequencing. The glycan structures corresponded to those of the serum RNase 1 in proportions very similar to those in the control samples (Figure 4.12).

These results suggest an endothelial origin of serum RNase 1. The easy access to the blood flow of RNase 1 secreted by the endothelial cells as well as the important surface of the blood vessel lining (about 1000 m²) in an adult human body, suggest that this tissue can significantly contribute to the serum levels of RNase 1. This possibility was previously suggested by Landré et al. (2002), who described the expression by EA.hy926 cells of three different forms of RNase 1 with molecular masses 18 kDa, 26 kDa and 28 kDa, which were due to variable site occupancy. In their study, RNase 1 expressed by EA.hy926 cells was demonstrated to come from their parental endothelial cells (HUVEC) rather than from the A549/8 carcinoma cells hybrid. Also, the molecular heterogeneity and enzymatic activity of the RNase 1 secreted by EA.hy926 was shown to be identical to the RNase 1 secreted by HUVEC and several other endothelial cell lines from different vessel and tissue origins (Landré et al., 2002). In the present study, we have also found a highly similar RNase 1 2-DE pattern among all the endothelial cell lines suggesting that they all contain the same RNase 1 forms, which corresponded to sialylated glycoforms since they all were digested with neuraminidase to neutral RNase 1. EA.hy926 is, thus, a representative cell line from which to purify and characterize in detail the RNase 1 glycans. Therefore, the high similarity of the N-glycans of EA.hy926 RNase 1 with those of serum RNase 1 strongly suggests that serum RNase 1 comes mainly from the endothelium.

The oligosaccharides found in this study for serum RNase 1 corresponded to some of the structures described by Hitoi et al. (1987) for urinary secretory RNase (U_L) from healthy donors. These were neutral and mono-sialylated complex, non-bisected, mono-, bi-, tri- and tetra-antennary glycans, with and without core fucose. Poly-*N*-acetylglucosamine structures were also observed but no outer arm fucoses or GalNAc structures (Hitoi et al., 1987). Although the amino-acid sequence of U_L RNase matched with that of pancreatic RNase 1, some authors doubted the pancreatic origin of U_L RNase, due to differences in its oligosaccharide composition compared to pancreatic RNase 1 (Yamashita et al., 1986; Hitoi et al., 1987). The data presented here, which shows a high similarity between serum RNase 1 and U_L RNase 1 glycan moieties,

supports the finding that the serum RNase 1 released to the blood stream by endothelial cells would be partially excreted through the kidney and would represent a source of urinary RNase.

Changes in glycosylation in serum RNase 1

The increase in core fucosylation described for the glycans from the PaC serum RNase 1 could be due to more than one mechanism or a combination of some of them. Our results suggest that serum RNase 1 comes mainly from the endothelium. Thus, a new hypothesis should be also considered for which endothelial cells could be responsible for the alteration of the glycans of serum RNase 1 in PaC. PaC tumour cells could be producing some factors which, once released in their surroundings or the blood stream, could alter the glycosylation machinery in the endothelial cells. It has been proposed that PaC cells could induce the production of fucosylated haptoglobin from the liver, in contrast to non fucosylated haptoglobin secreted by the liver in healthy situation (Okuyama et al., 2006).

On the other hand, although RNase 1 from pancreas would probably represent only a small percentage of serum RNase 1, the release into the circulatory system of an aberrantly glycosylated RNase 1 by tumour cells during development of pancreatic cancer could be also considered. Altered metabolic pathways in tumour cells could modify the glycosylation of RNase 1 before its release into the blood stream, and, although less likely, modification of the glycans after secretion in the blood plasma cannot be discounted either.

Sialylation and defucosylation of plasma glycoproteins during the acute phase response has been demonstrated in mice (Chavan et al., 2005). It is not clear how these modifications can occur, but an in situ modification of plasma glycoproteins could explain a change in the glycans of RNase 1 from healthy pancreas, which would become less fucosylated and more sialylated. Sialyltransferases have been found in human serum in different physiological conditions (Berge et al., 1982). Sialylation of glycoproteins increases their half-lives in serum by reducing their clearance by the asialo-proteins receptor (ASGP-R) in the liver (Pricer and Ashwell, 1971), an event which depends on the presence of terminal galactose residues that can bind the ASGP-R (Takamatsu et al., 2003). Glycoproteins containing α 2-6 linked sialic acid are eliminated from the

serum more rapidly than those glycoproteins containing sialic acid linked α 2-3 (Park et al., 2005). Thus, the possibility that the pancreatic RNase 1 becomes more sialylated after its release from the pancreas cannot be excluded and could contribute to our finding that the serum RNase 1 contains sialic acid.

Conclusion

We have demonstrated that RNase 1 from EA.hy926 has a glycosylation profile very similar to that of serum RNase 1 in healthy individuals. In addition, the 2-DE analysis of RNase 1 from several endothelial cell lines and from serum samples has shown a similar pattern among all of them, and very different from the 2-DE pattern from healthy pancreas RNase 1. All these data strongly suggest that endothelial cells are the main source of RNase 1 in serum. We also compared the glycosylation of serum RNase 1 derived from PaC patients and healthy controls. There was a remarkable increase (40%) in core fucosylated bi-antennary glycans in the PaC serum RNase 1. These data suggest that there is a subset of tumour-associated glycoforms of RNase 1.

Altered core fucosylation has also been found in tumours (Ito et al., 2003) and in their secreted serum glycoproteins (Block et al., 2005) demonstrating that alterations in glycosylation pathways would be expected to affect the processing of many secreted and cell surface glycoproteins. In addition, tumours could release factors that induce changes in the glycosylation machinery of their neighbour endothelial cells, affecting also the glycan moiety of their glycoconjugates.

These glycosylation changes could be exploited for developing new markers for disease. Therefore other methodologies are currently being developed to examine the different subforms of serum RNase 1 from more PaC patients to evaluate their usefulness as pancreatic cancer markers.

Materials and methods

RNase 1 purification from serum

Sera from two PaC patients and two healthy donors were from the Hospital Universitari Dr. J. Trueta (Girona, Spain) and its Ethics Committee approved their use. Patients were diagnosed with pancreatic adenocarcinoma with vascular invasion, by biopsy or image examination by the Digestive and Pathology Units. PaC patients staging was stage IVA (PaC A) and stage II-III (PaC B) according to TNM classification. RNase 1 concentration was quantified using a sandwich ELISA (see below). The concentrations were 2580 ng/mL for PaC A, 7370 ng/mL for PaC B, 1500 ng/mL for Control A and 4640 ng/mL for Control B. Serum was stored at -80°C until use.

Serum RNase 1 was purified by three chromatographic steps. The first chromatography was a Cibacron blue 3GA column (Sigma, St. Louis, MO) that was carried out as described previously (Peracaula et al., 2003b). Ribonuclease fractions were detected by sandwich ELISA (see below) and dialysed against the equilibration buffer of the next chromatography. HiTrap™ Heparin column (Amersham Pharmacia, Little Chalfont, UK) was performed as described previously (Peracaula et al., 2003a), but changing the chromatography buffer for 25 mM Na-phosphate pH 6. Ribonuclease fractions were dialysed against milliQ water and freeze-dried. Finally, Vydac C4 (Vydac, Hesperia, CA) reversed-phase chromatography was carried out as described previously (Ribó et al., 1994).

Ribonuclease activity and sample purity were checked by zymography (Bravo et al., 1994) and by SDS-PAGE with silver staining (Blum et al., 1987), respectively.

RNase 1 quantification by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Two different polyclonal antibodies against human recombinant RNase 1 were used: Polyclonal rabbit antibodies (Peracaula et al., 2000) and polyclonal chicken antibodies against human recombinant RNase 1 that were produced and purified from egg yolk (Gassman et al., 1990). Peroxidase-conjugated Donkey anti-Chicken IgY (IgG) was from ImmunoResearch Laboratories, Inc (West Grove, PA).

Rabbit antibodies against RNase 1 dissolved at 1.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Coating Buffer (Scil Diagnostics GmbH, Viernheim, Germany) were bound for 1 hour at 37°C to 96-well polystyrene plates. After washing three times with washing buffer (0.9% NaCl solution, 0.05% Tween), plates were blocked with 1% non-fat milk, 0.05% (v/v) Tween in phosphate-buffered saline (PBS) for 1 hr at 37°C. The wells were then washed and were incubated for one hour at 37°C with samples containing RNase 1, diluted in PBS, 0.05% Tween. Plates were washed and incubated with Chicken polyclonal antibodies against RNase 1 diluted 1:400 in PBS, 0.05% Tween for one hour at 37°C. Secondary antibody, peroxidase-conjugated Donkey anti-Chicken 1:4000 in PBS, 0.05% Tween, was added and allowed to stand for one hour at 37°C. Plates were washed and colorimetric detection was carried out using 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ of BluePeroxidase substrate soluble (Roche, Basel, Switzerland). Absorbance was read at 450 nm with a reference of 620 nm in an automated microplate reader (BIO-TEK, Winooski, VT) after stopping the reaction with 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ of 0.25 M H_2SO_4 . Negative controls were wells without antigen, without the first antibody, with pre-immunized chicken antibodies and wells with lysozyme as antigen. In order to quantify the RNase 1 amounts, a recombinant RNase 1 (kindly donated by Dr. Seno) was used to perform a curve between 0.1 and 10 ng/mL.

RNase 1 purification from conditioned cell media

EA.hy926 cells (Edgell et al., 1983) were grown in 150 cm^2 plates (Nunc, Roskilde, Denmark) to 90-95% confluence in Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM, Gibco, Paisley, Scotland, UK) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS, Gibco) and antibiotic antimycotic solution (Gibco) in a humidifier incubator (Heraeus, Hanau, Germany) with 5% $\text{CO}_2/95\%$ atmospheric air at 37 °C. Cells were rinsed three times in PBS and then, cells were grown 48-72 h in DMEM without FBS. More than two liters of conditioned media (without FBS) were collected and stored at -20°C. RNase 1 was purified from the conditioned media as described above for serum RNase 1 after concentrating the media using a tangential filtration membrane of 5 kDa cut-off (Millipore, Bedford, MA).

RNase 1 extraction from healthy pancreas

Human pancreas from a healthy donor was obtained from an autopsy through the Hospital Josep Trueta, Girona and its Ethics Committee approved its use. It was immediately frozen and stored at -80°C. Ribonuclease was extracted by the method of Weickmann et al. (1981) with some modifications (Peracaula et al., 2003a).

Release and purification of N-linked oligosaccharides

N-glycans were released from purified ribonuclease 1 fractions by in situ digestion of the protein in SDS-PAGE gel bands with N-glycosidase F (PNGase F, Roche) as described earlier (Küster et al., 1997; Radcliffe et al., 2002). Briefly, pure ribonuclease was reduced and alkylated and run on SDS-PAGE. Protein was stained by Coomassie blue and bands containing the glycoprotein were excised from the gel and treated with PNGase F to release the N-linked glycans. Wide range molecular markers were from Sigma.

Fluorescent labelling of the reducing terminus of oligosaccharides and HPLC

Oligosaccharides were fluorescently labelled with 2-aminobenzamide (2AB, Ludger Ltd, Abingdon, UK) as described previously (Bigge et al., 1995). Normal-phase (NP) HPLC was carried out as described by Peracaula et al. (2003a). Briefly, 2AB labelled glycans were injected in 80 % acetonitrile and eluted with a linear gradient of 20-58% 50 mM ammonium formate pH 4.4 in acetonitrile. Fluorescence was measured at 420 nm with excitation at 330 nm. 2AB labelled glucose oligomers were run in order to calibrate the system (Guile et al., 1996) in order to transform retention time to Glucose Units (GU) values.

Simultaneous oligosaccharide sequencing by exoglycosidase digestions

The 2AB-labelled oligosaccharides were digested in a volume of 10 μ L for 18 hours at 37°C in 50 mM sodium acetate buffer pH 5.5 using arrays of glycosidases with different specificities: *Arthrobacter ureafaciens* sialidase (ABS, EC 3.2.1.18), 1 U/mL;

Streptococcus pneumoniae neuraminidase (NANI, EC 3.2.1.18), 1 U/ml; almond meal α -fucosidase (AMF, EC 3.2.1.111), 2 mU/mL; bovine kidney fucosidase (BKF, EC 3.2.1.51), 1 U/mL; *Streptococcus pneumoniae* galactosidase (SPG, EC 3.2.1.23), 0.1 U/mL; bovine testes β -galactosidase (BTG, EC 3.2.1.23), 1 U/mL and Glucosaminidase (GuH, EC 3.2.1.30) 80 U/mL. All these enzymes were purchased from Prozyme (San Leandro, CA). *Xanthomonas manihotis* α 1-2fucosidase (XMF, EC.3.2.1.51), 1000 U/ml, from New England Biolabs (Ipswich, MA), was also used. After incubation, enzymes were removed from the samples using protein binding filters (Amicon Micropure EZ filters, Millipore) and oligosaccharides were analysed by NP-HPLC.

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)

Positive ion MALDI-TOF mass spectra were recorded with a Micromass TofSpec 2E reflectron-TOF mass spectrometer (Waters MS Technologies, Manchester, UK) fitted with delayed extraction and a nitrogen laser (337 nm). The acceleration voltage was 20 kV; the pulse voltage was 3200 V; and the delay for the delayed extraction ion source was 500 ns. Samples were prepared by adding 0.5 μ L of an aqueous solution of the sample to the matrix solution (0.3 μ L of a saturated solution of 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) in acetonitrile) on the stainless steel target plate and allowing it to dry at room temperature. The sample/matrix mixture was then recrystallised from ethanol (Harvey, 1993).

Nanospray MS and MS/MS

Nanospray MS and MS/MS spectra were recorded with a Waters-Micromass hybrid quadrupole time-of-flight (Q-Tof) Ultima global mass spectrometer fitted with a Z-spray electrospray ion source and operated in negative ion mode. Samples in water:methanol (1:1, v:v, 5 μ L) were infused with Proxeon (Proxeon Biosystems, Odense, Denmark) capillaries. Operating conditions were: capillary potential, 1.2 kV; ion source temperature, 120°C; desolvation gas, nitrogen at 50 L/h; RF-1 lens, 180 V; collision gas, argon at 0.5 bar and with a collision cell voltage appropriate to the

mass of the ions being analysed. Data acquisition and processing were conducted with Mass-Lynx 4 software (Waters).

HPLC-Electrospray mass spectrometry (LC-ESI-MS)

Positive ion electrospray (ESI) LC/MS data were obtained using an LC packings Ultimate HPLC equipped with a Famos autosampler (Dionex Ltd, Leeds, UK) interfaced with the above Q-ToF Ultima Global mass spectrometer (Waters-Micromass). Chromatographic separation was achieved using a 2×250 mm, microbore NP-HPLC TSK gel Amide-80 column (Hichrome, Victoria, Australia) with the same gradient and solvents as used with the standard NP-HPLC but at a lower flow rate of $40 \mu\text{L}/\text{min}$.

The mass spectrometer was operated in positive ion mode with 3 kV capillary voltage; RF-1 lens 60; source temp 100°C ; desolvation temp 150°C ; cone gas flow 50 L/Hr; and desolvation gas flow 450 L/Hr.

Two-dimensional electrophoresis for RNase 1 samples

The equipment required for 2-DE was a Protean IEF Cell from BioRad (Hercules, CA) and a Multiphor II from Amersham Pharmacia Biotech (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK), Immobiline DryStrips (18 cm, pH 3-10 linear), Pharmalyte pH 3-10, ExcelGel SDS 8-18, Buffer strips, Triton X-100, glycerol, DTT and iodoacetamide were from GE Healthcare, urea and mineral oil were from BioRad and SeeBlue Pre-Stained Standards were from Invitrogen (Carlsbad, CA).

First-dimension strips were reswelled over-night in rehydration buffer containing 8 M Urea, 0.5% (v/v) Triton X-100, 65 mM DTT, 2% (v/v) Pharmalyte 3-10, 0.008% (w/v) Bromophenol blue. Partially purified RNase 1 samples (between 50 and 100 ng of RNase 1, not exceeding $100 \mu\text{g}$ of total protein) were diluted in rehydration buffer to the final concentration described above and allowed to denature at room temperature for 1 hour. The strips were electrophoresed according to the following program: from 0 to 300 V in 2 h, 300 V for 4 h, raised to 4000 V in 5 h, 4000 V for 3 h, raised to 8000 in 5 h and 8000 V for 3 h. The samples were maintained at 500 V until a total run of 70 kVh. The electrofocused strip was processed immediately.

Prior to the second-dimension, electrofocused strips were equilibrated with shaking for 15 minutes in equilibration buffer (6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 50 mM Tris/HCl pH 8.8) containing 65 mM DTT, followed by 15 minutes of incubation in equilibration buffer containing 25 mg/mL iodoacetamide.

The first dimensional strips gels were placed at the cathodic side of 8-18% gradient SDS-PAGE and horizontal electrophoresis was carried out at 100 V for 45 minutes and 800 V for 70 minutes.

After electrophoresis, the separated proteins were blotted into a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane and detected with specific polyclonal antibodies against RNase 1 as described before (Peracaula et al., 2003a). The antibodies against RNase 1 (1/1000) were incubated for 1 h in blocking buffer. Secondary antibody, peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (Pierce, Rockford, IL) was added at 1/60000 and incubated for 1 h. Detection was performed using the chemiluminescence kit ECL plus (GE Healthcare).

Neuraminidase and PNGase F treatments

The glycosidases used were Neuraminidase from *Arthrobacter urefaciens* and recombinant N-glycopeptidase F (PNGase F) from *Flavobacterium meningosepticum* (Roche, Basel, Switzerland).

Between 40 and 200 ng of partially purified RNase1 was denatured at 70 °C for 10 minutes with 0.1% Sodium dodecil sulphate (SDS) to facilitate the enzymes action. Then, it was incubated for 17-18 h at 37 °C in 1% (v/v) Triton X-100, 100 mM Sodium acetate, pH 5.5, containing 40 mU of Neuraminidase. The reaction was stopped with the 2-DE sample buffer.

The combined treatment of both enzymes consisted in the same amount of glyco-protein denatured at 70 °C for 10 minutes with 0.1% SDS to and incubated for 17-18 h at 37 °C in 1% Triton X-100, 20 mM Sodim fosfate, pH 7.2, containing 40 mU of Neuraminidase and 8 U of N-glycopeptidase F. The reaction was stopped with the 2-DE sample buffer

Acknowledgments

We thank Dr. M. Seno for his kind gift of human recombinant pancreatic ribonuclease 1. We also thank Pilar Castell for her practical contribution during the purification of RNase 1 from endothelial cell line EA.hy926. S.B. gratefully thanks the University of Girona for a predoctoral short-term fellowship. L.P. is the recipient of predoctoral fellowship from the Generalitat de Catalunya. This work was supported in part by the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (BIO 2004-0438) awarded to R.P. and Generalitat de Catalunya (grant 2005SGR00065) awarded to R.L. We also thank the Higher Education Funding Council for England and the Wellcome Trust for grants to purchase the ToFSpec and Q-ToF mass spectrometers respectively.

Abbreviations

The abbreviations used are: 2AB, 2-Aminobenzamide; ABS, *Arthrobacter ureafaciens* sialidase; AMF, almond meal α -fucosidase; BKF, bovine kidney fucosidase, CE, collision energy; 2-DE, two dimensional electrophoresis; DHB, dihydroxybenzoic acid; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; BTG, bovine testes β -galactosidase; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ESI, electrospray; FBS, Foetal Bovine Serum; GU, glucose units; HPLC, high performance liquid chromatography; HuLEC, Human lung microvessel endothelial cells; HuMMEC, Human mammary microvessel endothelial cells; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; JBM, Jack bean α -mannosidase; LC, liquid chromatography; MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionization; MS, Mass spectrometry; NANI, *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase; NP, normal phase; PaC, pancreatic cancer; PaC A, pancreatic cancer patient' serum; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PBS, phosphate-buffered saline; PNGase F, N-glycosidase F from *Flavobacterium meningosepticum*; PVDF, poly(vinylidene difluoride); Q, quadrupole, RNase 1, Ribonuclease 1; SDS, sodium dodecyl sulfate, SPG, *Streptococcus pneumoniae* galactosidase; TOF (Tof), time-of-flight; U_L , urinary secretory RNase, XMF, *Xanthomonas manihotis* α 1-2 fucosidase.

4.3 Two-dimensional electrophoresis as a tool for the study of the different degree of silylation of glycoproteins

Sílvia Barrabés,¹ Esther Fort,² Rafael de Llorens¹, Rosa Peracaula,^{1*}

¹Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Biologia, Universitat de Girona, Campus de Montilivi s/n. 17071, Girona, Spain.

²Unitat de Digestiu, Hospital Universitari Dr. Josep Trueta, Avinguda de França s/n. 17007, Girona, Spain.

*Address correspondence: Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Biologia, Universitat de Girona, Campus de Montilivi s/n. 17071, Girona, Spain. Fax 34 972418370; e-mail: rosa.peracaula@udg.es.

Key Words: sialylation / human pancreatic ribonuclease / Pancreatic Cancer cell line Capan-1 / Endothelial cell line EA.hy926 / Two-dimensional electrophoresis

Abstract

Sialylation is a common feature in malignant transformation and several glycoproteins modify their sialylation pattern in tumours. Therefore, sialylation changes of specific tumour proteins can be of relevant clinical importance.

RNase 1, a glycoprotein with three N-glycosylation sites, changes its sialylation pattern depending on its origin and on the pathological conditions. The sialylation pattern of RNase 1 from several origins has been previously characterized by glycan sequencing and can be a model for studying the contribution of sialic acid to the 2-DE pattern of a protein. In order to correlate the degree of sialylation of RNase 1 with the spots in the 2-DE gels, RNase 1 glycoforms were separated according to their N-glycosylation site occupancy and were analyzed by Western Blot of the 2-DE

gels. Digestions with neuraminidase were also performed to characterize the sialylated glycoforms.

All RNase 1 glycoforms from a healthy pancreas, which are neutral, appeared at the same pI, and acid glycoforms were detected in the RNase 1 from pancreatic cancer cell line Capan-1, endothelial cell lines and sera and were consistent with the main glycan structures described previously. Sialic acid content seems to decrease the pI by approximately 0.25 units in the complex biantennary structures of RNase 1 N-glycans.

Introduction

Glycosylation is the most common post-translational modification of membrane and secreted proteins and can also reflect pathologic alterations. The glycan alterations of glycoproteins have been widely described as a common feature in tumour situation (Brockhausen et al., 1998; Dennis et al., 1999; Gorelik et al., 2001) and inflammatory processes (Chavan et al., 2005). In particular, the change in the sialic acid (SiaAc) content in the glycoconjugates has also been related to malignant transformation and pathological conditions (Brockhausen et al., 1998; Ørntoft and Vestergaard, 1999). The sialylated Lewis epitopes sialyl Lewis x (SLe^x) and sialyl Lewis a (SLe^a) have been correlated to tumour progression (Ørntoft and Vestergaard, 1999; Varki et al., 1999; Dennis et al., 1999). Therefore, determining the glycosylation changes in disease is currently a novel target in the search for new pathological markers and indicators.

One approach that is being developed is to identify the glycome, the collective identity of the entirety of carbohydrates in an organism (Hirabayashi et al., 2001) and its modifications using high throughput methodologies like glycan sequencing (Rudd et al., 2001), glycochip arrays (Drickamer and Taylor, 2002; Patwa et al., 2006) or lectins chromatographies (Comunale et al., 2004; Yang and Hancock, 2005). Another approach is the so called targeted glycoproteomics (Block et al., 2005), which focuses on the glycosylation changes that a specific glycoprotein acquires as a result of an alteration in the normal cellular functionality. AFP (Poon et al., 2002), PSA (Peracaula et al., 2003b), or RNase 1 (Peracaula et al., 2003a) are glycoproteins with an altered glycosylation pattern when they are secreted by the tumour cells of hepatocellular carcinoma, prostate cancer or pancreatic adenocarcinoma respectively. Some of

these changes can be of clinical value, so developing sensitive and effective systems for detecting them is very interesting for the scientific community.

2-DE is a powerful technique that has been broadly described for researching new tumour markers (Alaiya et al., 2005; Elrick et al., 2006). However, analyzing the whole protein content has several drawbacks, such as the lack of sensitivity due to the limitation imposed by the protein dynamic range of the fluid or tissue to be analyzed. To overcome these limitations, several approaches focus on analyzing sub-proteomes, like the phosphoproteome (Lim, 2005; Raggiaschi et al., 2005) or the glycoproteome (Zhou et al., 2006). In this work we have focused on the potential of 2-DE to analyze changes in the glycoforms of a specific protein, in particular in relation to its different SiaAc content since the negative charge of the SiaAc modifies the glycoprotein pI. Among the different types of sialic acid, 5-N-acetyl neuraminic acid (NeuAc) is the most common component of the sialic acid family in N-glycans in vertebrate cell types. Using pancreatic RNase 1, a glycoprotein with three N-glycosylation sites, as a model, we have established a correlation between the SiaAc content (in particular NeuAc) of the different glycoforms and the changes in the pI of the glycoprotein.

RNase 1 has been chosen as a model due to the detailed knowledge of its glycan structures obtained from glycan sequencing and mass spectrometry analysis (Peracaula et al., 2003a; Barrabés et al., 2007). RNase 1 is a glycoprotein produced by many different tissues and is also present in different body fluids such as serum, saliva and urine. RNase 1 glycans from a healthy pancreas, pancreatic cancer (PaC) cell lines, endothelial cell lines and PaC patients' and healthy donors' sera have been analyzed, and different glycan structures were found. RNase 1 from a healthy pancreas has non-sialylated and strongly fucosylated complex structures while RNase 1 from PaC cell lines (Capan-1 and MDAPanc-3) has some sialylated epitopes and hybrid structures. RNase 1 from the endothelial cell line EA.hy926 contains mainly mono- and disialylated bi-antennary complex structures, the same structures described for serum RNase 1. The presence and amount of NeuAc is one of the glycan differences observed in the RNase 1 from different origins.

With the aim of evaluating the contribution of NeuAc to the RNase 1 2-DE pattern, 2-DE experiments were performed to identify the pI of the different forms of RNase 1. RNase 1 from healthy pancreas that has neutral glycans had all the glycoforms

at the same pI; while RNase 1 from the PaC cell line Capan-1, serum RNase 1 from three PaC patients' sera and two control patients' sera and RNase 1 from four different endothelial cell lines, which have sialylated glycans, contained glycosylated forms with a lower pI than the neutral ones. The sialylated forms identified in the 2-DE pattern contained from one to six NeuAcs and a correlation between the number of NeuAcs present in RNase 1 and its pI indicated that every NeuAc added to each N-glycan chain decreased the RNase 1 pI by 0.25 pH units. Unglycosylated recombinant RNase 1 showed heterogeneity of forms, which could be attributed to the untouched form and deamidated forms.

Materials and Methods

RNase 1 sample preparation

A human pancreas from a healthy donor was obtained after an autopsy at the Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta (Girona, Spain) and its Ethics Committee approved its use. It was immediately frozen and stored at -80°C . Ribonuclease was extracted by the method of Weickmann et al. (1981) with some modifications (Peracaula et al., 2003a).

Capan-1 (American Type Culture Collection no HTB-79) was cultured in 10% synthetic serum basal medium supplement (Seromed/Biochrom KG, Berlin, Germany). These cells were adapted to grow in this medium following the protocol described by Fernández et al. (1994). Capan-1-conditioned medium was concentrated using a tangential filtration membrane of 5 kDa cut-off (Millipore, Bedford, MA).

Sera from two PaC patients (PaC A and PaC B) and a healthy donors were from the Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta (Girona, Spain) with approval for their use from its Ethics Committee. Patients were diagnosed with pancreatic adenocarcinoma (stage IV) with vascular invasion (PaC A) and hepatic metastasis (PaC B) by the Digestive and Pathology Units.

Serum RNase 1 was enriched by two chromatographic steps: Cibacron blue 3GA column (Sigma, St. Louis, MO) and HiTrap™ Heparin column (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) (Peracaula et al., 2003b; Barrabés et al., 2007).

Serum RNase 1 from one pancreatic cancer patient (PaC A) was fully purified in a further chromatographic step using a Vydac C4 (Vydac, Hesperia, CA) reversed-phase column as described previously (Ribó et al., 1994).

The RNase 1 pI values from the 2-DE gels presented in Table 2, from PaC patient C, the healthy control serum Control B and from the endothelial cell lines HUVEC, HuMMEC, HuLEC and EA.hy926, were reported in Barrabés et al., 2007 and are presented here only for comparison.

Recombinant RNase 1 was kindly donated by Doctors M. Vilanova and M. Ribó from the University of Girona (Spain).

Neuraminidase and PNGase F treatments

The glycosidases used were Neuraminidase from *Arthrobacter urefaciens* (ABS) and recombinant N-glycopeptidase F (PNGase F) from *Flavobacterium meningosepticum* (Roche, Basel, Switzerland). Neuraminidase is an exoglycosidase with broad specificity for α -linked NeuAcs and PNGase F is an endoglycosidase which digests asparagine-linked sugar. Digestions were carried out as described previously (Barrabés et al., 2007).

Two-dimensional electrophoresis for RNase 1 samples

The equipment for 2-DE was a Protean IEF Cell from BioRad and a Multiphor II from GE Healthcare. Immobiline DryStrips (18 cm, pH 3-10 linear), Pharmalyte pH 3-10, ExcelGel SDS 8-18, Buffer strips, Triton X-100, glycerol, DTT and iodoacetamide were from GE Healthcare, urea and mineral oil were from BioRad and SeeBlue Pre-Stained Standards were from Invitrogen (Carlsbad, CA).

2-DE was performed as described previously (Barrabés et al., 2007). First-dimension strips were reswelled overnight in 8 M Urea, 0.5 % (v/v) Triton X-100, 65 mM DTT, 2% (v/v) Pharmalite 3-10, 0.008% (w/v) Bromophenol blue. Protein samples were equilibrated in rehydration buffer at room temperature for 1 hour and loaded on the cathodic side of the strips by cup loading. Strips were electrophoresed following the program: from 0 to 300 V in 2 h, 300 V for 4 h, raised to 4000 V in 5 h,

4000 V for 3 h, raised to 8000 in 5 h and 8000 V for 3 h. Electrofocused strips were equilibrated for 15 minutes in equilibration buffer (6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 50 mM Tris/HCl pH 8.8) containing 65 mM DTT, followed by 15 minutes of incubation in equilibration buffer containing 25 mg/mL iodoacetamide.

Electrofocused strips were equilibrated by shaking for 15 minutes in equilibration buffer (6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 50 mM Tris/HCl pH 8.8) containing 65 mM DTT, followed by 15 minutes of incubation in equilibration buffer containing 25 mg/ml iodoacetamide. Strips were placed on the cathodic side of a horizontal 8-18% gradient SDS-PAGE and separated proteins were blotted into a poly(vinylidene difluoride) membrane and detected with specific polyclonal antibodies against RNase 1 as described previously (Peracaula et al., 2003a). Briefly, the antibodies against RNase 1 (1/1000) were incubated for 1 h in blocking buffer (PBS, 3% skimmed milk, 0.1% Tween). Secondary antibody, peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (Pierce, Rockford, IL) was added at 1/60000 in blocking buffer and incubated for 1 h. Detection was performed using a chemiluminescence kit (GE Healthcare).

Results

RNase 1 is a glycoprotein with three N-glycosylation sites at Asn-34, Asn-76 and Asn-88. The glycan heterogeneity can be observed in a SDS-PAGE as a pattern of different molecular weight bands between 16 and 30 kDa due to the oligosaccharide chains that increase the apparent molecular weight of RNase 1. As a result of the digestion of the protein with a combined treatment of neuraminidase (ABS) and endoglycosidase (PNGase F), the SDS-PAGE pattern shows a unique band at around 16 kDa, the molecular mass of the unglycosylated protein, which indicates that RNase 1 molecular mass heterogeneity is due to its N-glycans (Figure 4.13).

2-DE pattern of healthy pancreas RNase 1

Several 2-DE of pancreas RNase 1 showed a group of different Mw spots that focused on the same pI, which was from 8.38 to 8.77 in different runs (8.61 ± 0.19) (Figure 4.14, untreated pancreas). The low Mw form is situated at about 16 kDa and corresponds to the unglycosylated RNase 1, while the other spots correspond to RNase 1 substituted

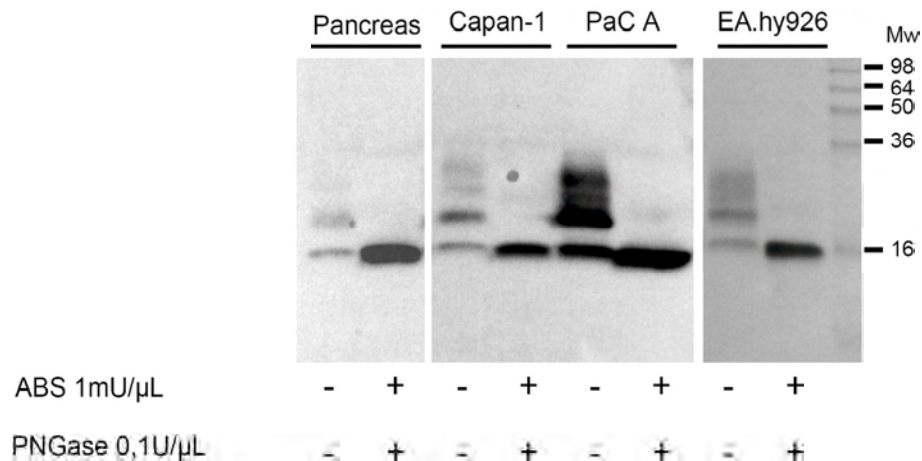


Figure 4.13: Immunoblot analysis of RNase 1 from pancreas homogenate, Capan-1-conditioned media, partially purified pancreatic cancer serum (PaC A) and partially purified EA.hy926-conditioned media, before and after a combined treatment with ABS (*Arthrobacter urefaciens* neuraminidase) and PNGase F (N-glycosidase F from *Flavobacterium meningosepticum*).

with neutral N-glycans at Asn-34, 76 and 88. According to the sequencing results reported previously (Peracaula et al., 2003a), pancreas RNase 1 glycans do not contain NeuAc. This agrees with the 2-DE results as all the glycoforms appear to have the same pI. This can be corroborated with a sialidase treatment with ABS, which digests either SiaAc linked alpha-2,3 or alpha-2,6 (Figure 4.14, pancreas with ABS). As expected, the treatment with this enzyme does not modify the spots of RNase 1 pattern due to the lack of NeuAc in pancreas RNase 1.

2-DE pattern of Capan-1 RNase 1

RNase 1 from Capan-1-conditioned media was separated by 2-DE and showed several spots at different pIs and Mws. The unglycosylated RNase 1 focuses on pI 8.40 and 16 kDa. All glycosylated forms have an Mw higher than 16 kDa and a pIs of 8.40 or lower (Figure 4.15, untreated Capan-1). The differences in pI for the glycoforms of Capan-1 RNase 1 can be attributed to their NeuAc content being more acid as the oligosaccharide linked to the protein contains more NeuAc (pIs at 7.53; 7.82; 8.29 and 8.42).

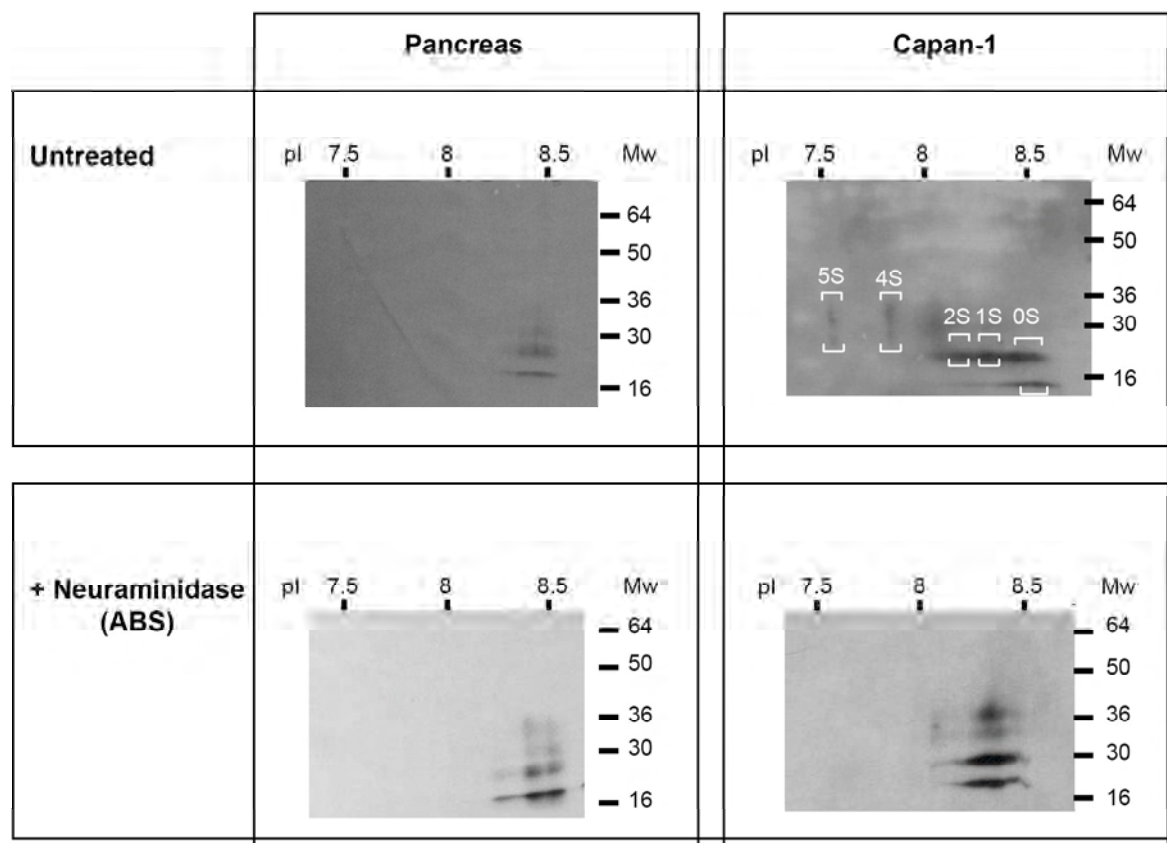


Figure 4.14: Immunoblot detection of RNase 1 from human pancreas homogenate (left) and Capan-1-conditioned media (right) separated by 2-DE. In the upper case, non-treated samples are presented. At the bottom, RNase 1 samples after neuraminidase digestion are shown. The pIs of the undigested isoforms in this figure are listed in Table 2. Spots are marked with the number of 5-N-acetyl neuraminic acids (referred to as S).

All the spots focus on the same pI (about 8.37-8.40) after treatment with ABS, showing a 2-DE pattern that is very similar to that of pancreas RNase 1, which indicates that the presence of NeuAc was responsible for their acid pI.

2-DE pattern of serum RNase 1

Serum RNase 1 glycans have been previously described (Barrabés et al., 2007) and contain NeuAc, basically found in complex biantennary structures, linked either with alpha2-3 or alpha2-6. These glycan structures are found in the N-glycans of all three potential N-glycosylation sites (Barrabés et al., 2007). In order to assign the 2-DE spots of serum RNase 1 to the number of NeuAc, purification of RNase 1 sera was

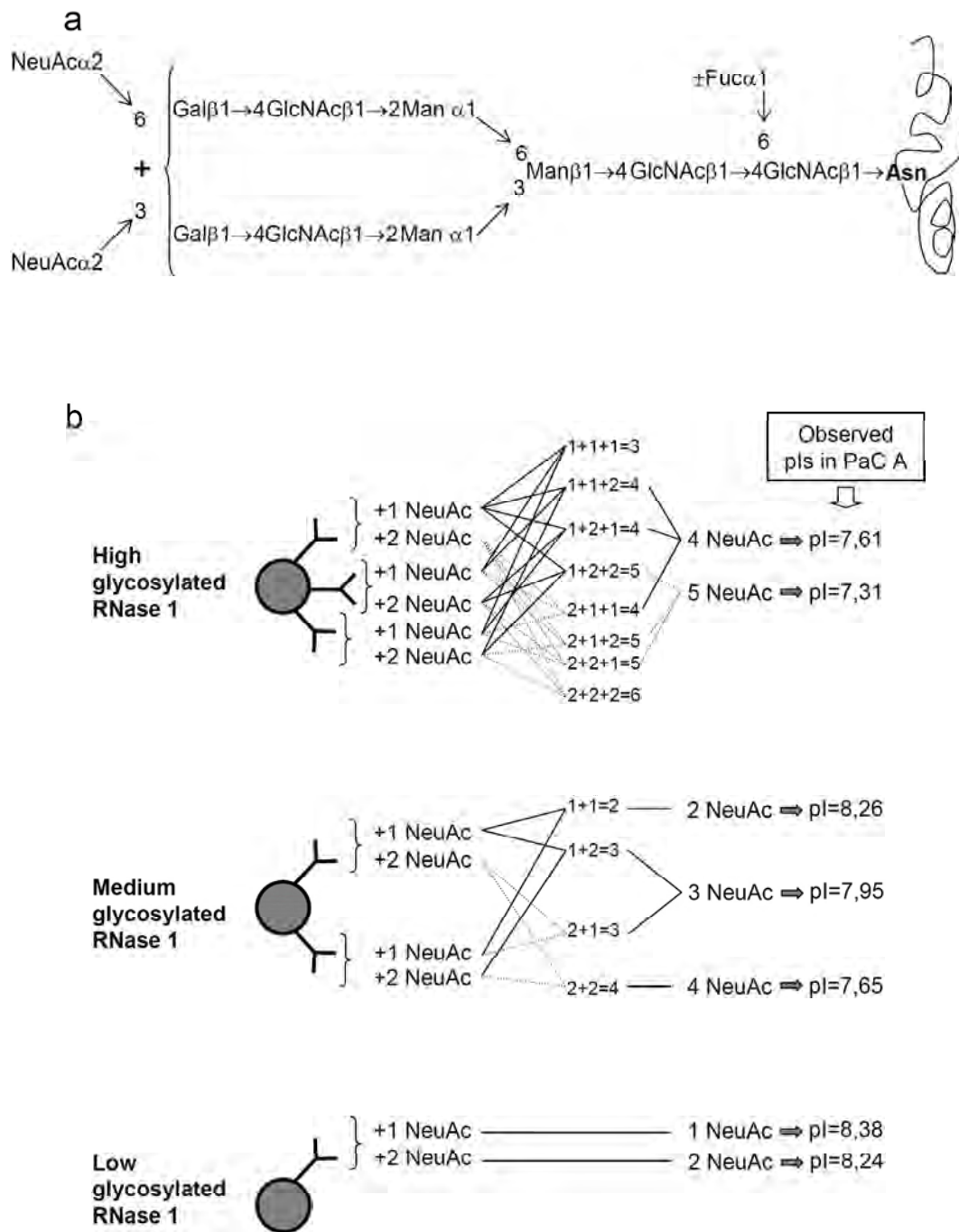


Figure 4.15: Predominant glycan structures in RNase 1 serum according to Barrabés et al. (2007). a. Bi-antennary complex type structures with either alpha2-6 or alpha2-3 neuraminic acid monosaccharides at the terminal ends of the N-glycan chain. b. Theoretical proportion of NeuAc content in RNase 1 with three, two and one (from top to bottom) N-glycosylation sites occupied with bi-antennary structures mono- or disialylated. Observed pI of the major forms of PaC A RNase 1 described in Figure 4.16 is also shown.

carried out. The last purification step consists of reverse-phase chromatography that elutes RNase 1 according to its degree of N-glycosylation site occupancy.

Pure RNase 1 from PaC A

RNase 1 from a PaC serum (PaC A) was completely purified as described previously (Barrabés et al., 2007). RNase 1 was separated from the more glycosylated forms to the unglycosylated one (Barrabés et al., 2007). These purified RNase 1 fractions were pooled according to their mobility in a SDS-PAGE, in high, medium, low glycosylated and unglycosylated RNase 1 (data not shown). It was assumed that high glycosylated forms contain basically RNase 1 with the three N-glycosylation sites occupied, medium glycosylated forms correspond to the RNase 1 with two N-glycosylation sites occupied and low glycosylation forms contain the RNase 1 forms with just one N-glycosylation site occupied.

The major glycan structures described for serum RNase 1 are mono- and disialylated bi-antennary glycans (Figure 4.15a). Each N-glycosylation site can contain one or two NeuAc linked to the terminal end of the complex biantennary structure (Figure 4.15b). Thus, the major RNase 1 forms with 3 N-glycosylation sites occupied could have four and five NeuAc residues, that could be assigned to two spots at pIs 7.61 and 7.31 detected in the 2-DE of the high glycosylated RNase 1 from PaC A serum (Figure 4.16a). Similarly, the major forms for the RNase 1 with two N-glycosylation sites occupied could have two, three and four NeuAc that were assigned to the three most intense spots at pIs 8.26, 7.95 and 7.65 for medium glycosylated RNase 1 from PaC A serum (Figure 4.16b). Finally, the low glycosylated RNase 1 can only contain one or two NeuAc and the corresponding spots were detected at pIs 8.38 and 8.24 (Figure 4.16c). In this case, it was also possible to detect a neutral form (pI 8.49) and a more acid form (pI 7.98) probably due to a mixture of medium and low glycosylated RNase 1 in the sample. A summary of the pI of all the spots detected in this sample is presented in Table 4.5.

	pI						
	6 NeuAc	5 NeuAc	4 NeuAc	3 NeuAc	2 NeuAc	1 NeuAc	Neutral
High glyc. frac.		7.31	7.61				
Medium glyc. frac.		7.34	7.65	7.95	8.26		8.45
Low glyc. frac.				7.98	8.24	8.38	8.49
X^a		7.33	7.63	7.97	8.25	8.38	8.47
SD		0.02	0.03	0.02	0.01	0.00	0.03

Table 4.5: Correspondence between pI and neuraminic acid (NeuAc) content in pure RNase 1 fractions from PaC A serum. Median (X) and standard deviation (SD) are also shown. Mathematical correlation of pIs corresponding to sialylated forms is depicted in Figure 4.19 (solid line).

a) X : media of values. SD : standard deviation. $SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$

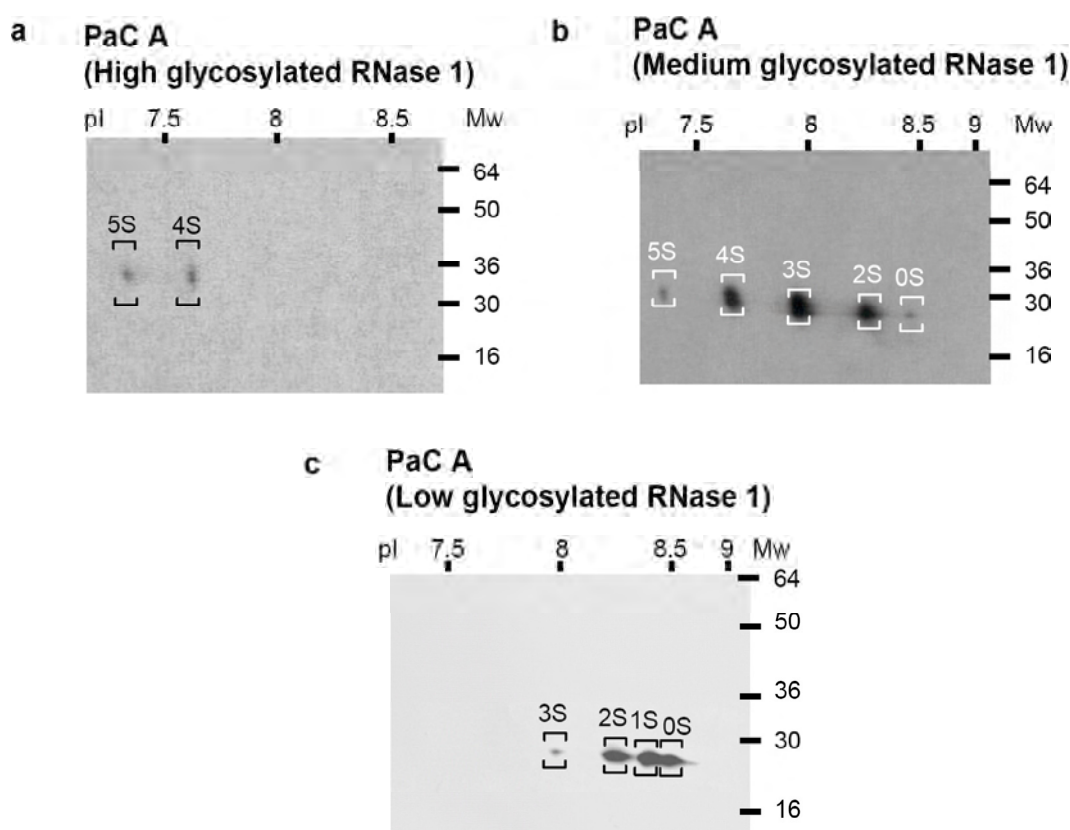


Figure 4.16: 2-DE of high glycosylated (a), medium glycosylated (b) and low glycosylated (c) pure RNase 1 purified from a pancreatic cancer (PaC A) patient's serum. RNase 1 was detected with specific antibodies. The pI of each isoform is listed in Table 4.5 and correlated with the theoretical number of NeuAc per RNase 1 molecule in Figure 4.15. Spots are marked with the number of sialic acids (5-N-acetyl neuraminic acid), referred to as S.

PaC patients' and healthy donors' serum RNase 1

In order to analyze the 2-DE pattern of more serum RNase 1 samples, it was necessary to deplete the serum by two chromatographic steps in order to load enough RNase 1 without exceeding the maximum amount of protein in the 2-DE strips (500 μg). An affinity chromatography to Cibacron-Blue followed by a Heparin affinity chromatography were carried out for this purpose. After these steps, the sample was dialyzed, lyophilized and dissolved in distilled water.

The RNase 1 2-DE pattern obtained was similar for all the samples from both healthy donors' and PaC patients' sera (Figure 4.17). The unglycosylated RNase 1 appears to be in a very low proportion or even absent in some cases (PaC B). There are several spots with higher Mw and lower pI than the unglycosylated RNase 1. The major forms are glycosylated with NeuAc (glycoforms with different pIs ranging from 7.26 to 8.37) (Table 4.6). Some of these spots (the ones at 7.49 ± 0.05 , 7.72 ± 0.03 , 8.21 ± 0.07 and 8.37 ± 0.04) coincide with the ones observed for Capan-1-RNase 1 in pI and Mw, but other glycoforms at 7.26 ± 0.08 and 7.97 ± 0.07 were also detected.

A summary of all the spots and their pIs is listed in Table 4.6. The correlation between pI and NeuAc content has been done according to the results obtained from the separation of PaC A serum RNase 1 in high, medium and low glycosylated fractions.

2-DE pattern of endothelial cell lines RNase 1

Serum RNase 1 is mainly produced by endothelial cells and the 2-DE pattern of different endothelial cell lines has been previously obtained (Barrabés et al., 2007). The endothelial RNase 1 2-DE patterns are very similar among the endothelial cell lines analyzed and also to those from serum RNase 1. Their heterogeneity is due to the presence of NeuAc (Barrabés et al., 2007). Mw and pIs were obtained from the 2-DE gels and were found to coincide with the spots observed in serum samples (Table 4.6) but, in this case, the higher Mw and lower pI glycoforms appear in a higher proportion.

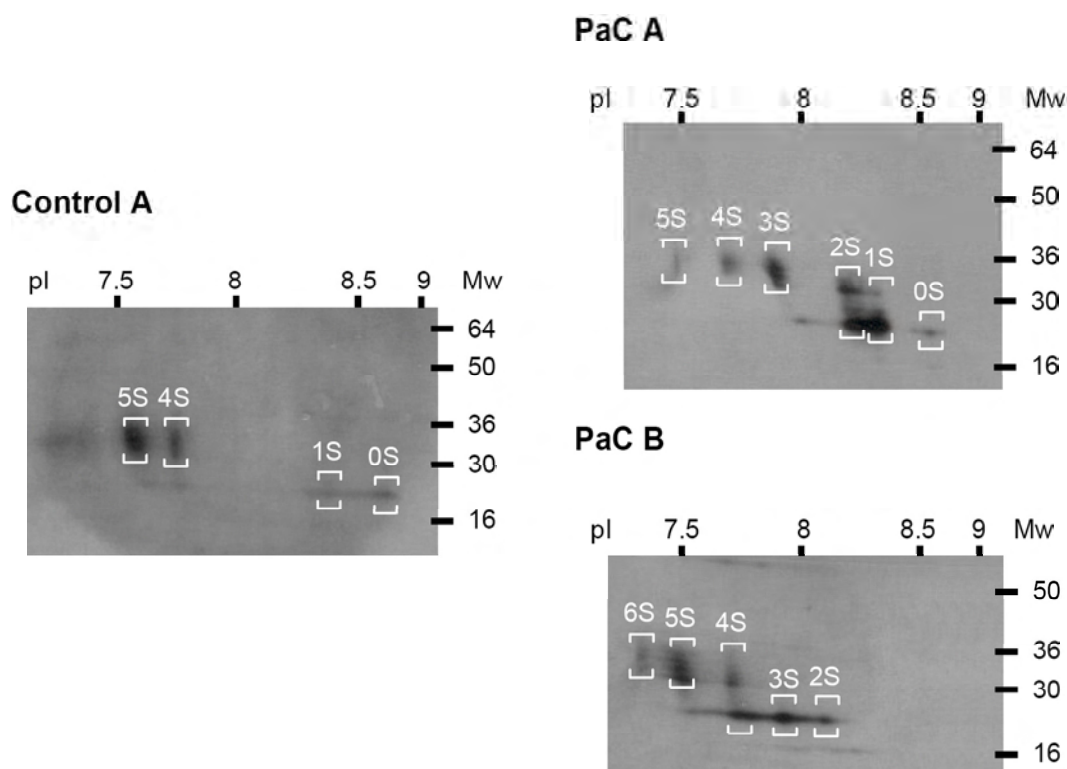


Figure 4.17: 2-DE of a healthy donor's and two pancreatic cancer (PaC) patients' sera after two chromatographic steps (Cibacron-Blue and Heparin affinity column). RNase 1 was detected with specific antibodies. The pI of each isoform is listed in Table 4.6. Spots are marked with the number of sialic acids (5-N-acetyl neuraminic acid), referred to as S.

2-DE pattern of recombinant RNase

There is little variation in the pI of the sialylated forms of RNase 1 in the different samples analyzed, but the unglycosylated RNase 1 is more variable in its focalization. In order to establish the isoelectric point of the unglycosylated RNase 1, the 2-DE of recombinant RNase 1 (rRNase 1) was performed.

The 2-DE pattern of rRNase 1 showed up to three forms with different pIs at 16 kDa molecular weight. The spot at $pI\ 8.52 \pm 0.13$ was the most intense, and two more spots could be detected at $pIs\ 8.40 \pm 0.11$ and 9.12 ± 0.10 (Figure 4.18a). The spot at $pI\ 9.12$ approaches the theoretical pI calculated for the protein.

rRNase 1 was not supposed to contain any post-translational modifications since it was produced in a prokaryotic system and its purity was checked by M/S. However, it has been previously described that proteins can be partially deamidated after periods of

	pI						Neutral
	6 NeuAc	5 NeuAc	4 NeuAc	3 NeuAc	2 NeuAc	1 NeuAc	
Pancreas							8.61±0.19 ^a
Capan-1		7.53	7.82		8.29	8.42	8.56
Control A		7.58	7.74			8.37	8.72
Control B ^b		7.44	7.68	8.02	8.27		8.44
PaC A		7.48	7.70	7.90	8.21	8.33	8.60
PaC B	7.32	7.49	7.71	7.93	8.11		
PaC C ^b	7.20	7.47	7.75	8.04	8.26	8.40	
X ^c	7.26	7.49	7.72	7.97	8.21	8.37	8.59
SD	0.08	0.05	0.03	0.07	0.07	0.04	0.14
HuLEC ^b	7.13	7.57	7.76	7.97		8.34	
HuMMEC ^b	7.12	7.45	7.72	7.98	8.20	8.35	
HUVEC ^b		7.47	7.68	7.95	8.14		
EA.hy926 ^b	7.14	7.46	7.67	7.89	8.12	8.39	
X ^c	7.13	7.49	7.71	7.95	8.15	8.36	
SD	0.01	0.06	0.04	0.04	0.04	0.03	
X ^c	7.18	7.49	7.72	7.96	8.20	8.37	8.59
SD	0.08	0.05	0.05	0.05	0.07	0.03	0.15

Table 4.6: Correspondence between pI and neuraminic acid (NeuAc) content in RNase 1 from a healthy pancreas, Capan-1-conditioned media, control patients' sera, PaC patients' sera and endothelial cell lines conditioned media. Median (X) and standard deviation (SD) of serum RNase 1 pIs, endothelial RNase 1 pIs are also shown, as well as the median and standard deviation of all samples. Mathematical correlation of median pIs corresponding to sialylated forms from all samples is depicted in Figure 4.19 (dotted line).

a) Correspond to media \pm standard deviation (SD, see Table 4.5).

b) Only for comparison, data from sera samples and endothelial cell lines media from a recent study (Barrabés et al., 2007) were included to show the homogeneity in the RNase 1 2-DE pattern obtained.

c) X: media of values. SD: standard deviation (see Table 4.5).

storage (Sarioglu et al., 2000), which causes a decrease in the protein pI. The decrease in 0.60 and 0.72 pH units of the spot at pI 9.12, which would result in the spots at 8.52 and 8.40, could be correlated approximately with the theoretical decrease resulting from the deamidation of three and four Gln or Asn computed using the ExpASY Compute pI/Mw tool (website: http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html). Thus, spots at pI 8.52 and 8.40 could correspond to deamidated forms of RNase 1 (Figure 4.18a).

Pure unglycosylated RNase 1 from PaC A serum was also analyzed by 2-DE. In this case, four different isoforms were detected at pIs 9.15, 8.94, 8.71 and 8.53. Isoforms at pI 9.15 and 8.53 coincide with two of the isoforms observed for the rRNase 1, and the spots at 8.94 and 8.71 could correspond to forms with one or two deamidations respectively. Deamidation is a process that also occurs 'in vivo' in biological conditions, as described previously (Flatmarks, 1967).

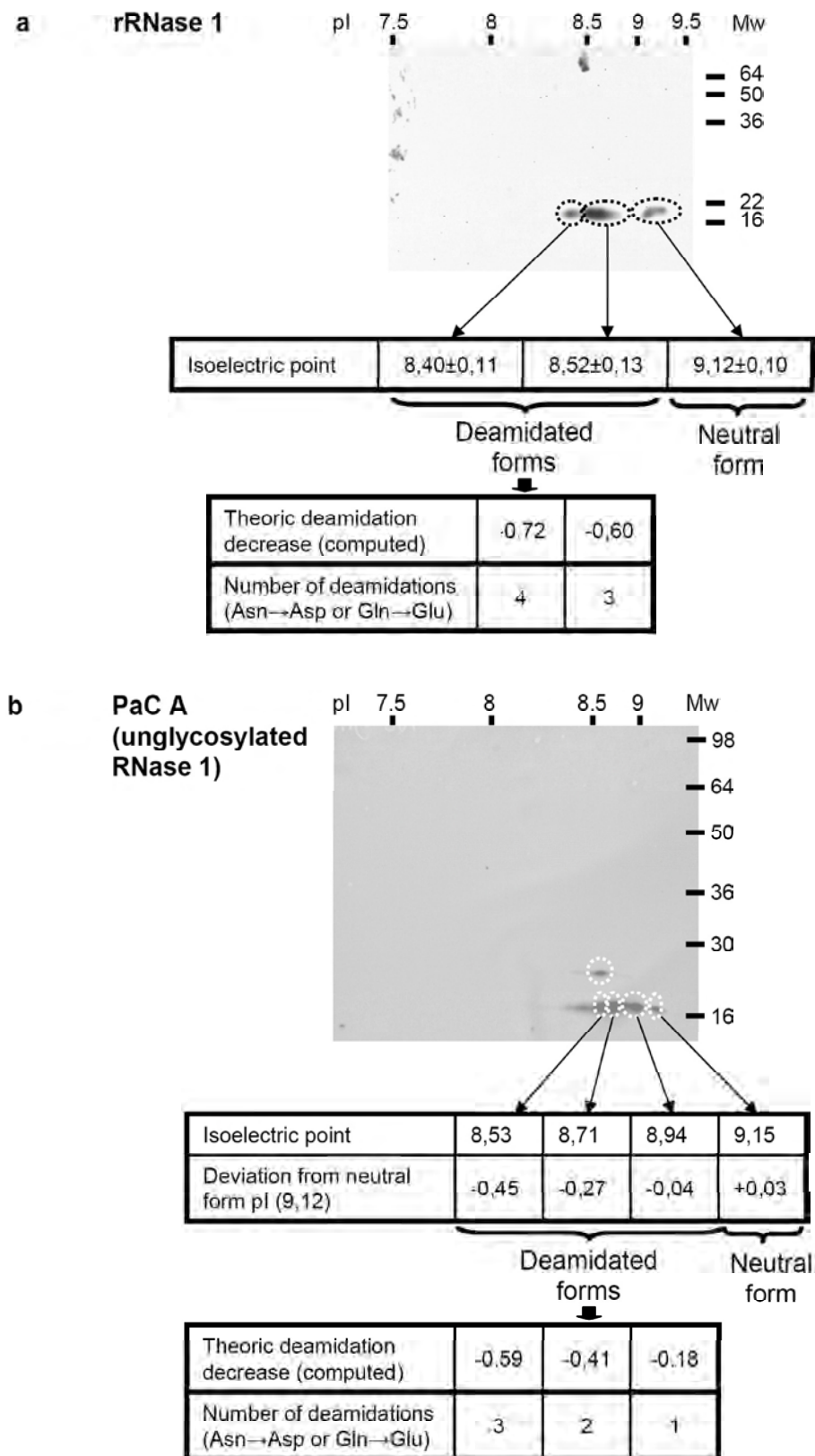


Figure 4.18: Immunoblot analysis of recombinant RNase 1 (a) and unglycosylated RNase 1 from PaC A (b). Spots are circled and the pI of each one is identified as well as the decrease in pI among them, which is attributed to deamidated forms. The hypothetical number of deamidated Asn and Gln residues in both cases is also presented.

Correlation between NeuAc content and pI

The spots obtained for RNase 1 from different origins like serum and cell lines, which have the same glycan structures in common, coincide in their pI, which indicates that the contribution of a NeuAc always has the same effect on RNase 1. Thus, a correlation between NeuAc content and pI of the protein could be established (Figure 4.19). The increase in NeuAc residues causes a decrease of approximately 0.25 units in the pI of the glycoprotein with bi-antennary N-type glycan structures. This correlation predicts a non-glycosylated RNase 1 with pI of approximately 8.7. This value is lower than the pI of unglycosylated or recombinant RNase 1 without deamidations described above (9.12). The fact that the RNase 1 used to establish the correlation is already deamidated explains why the predicted pI (8.7) for the unglycosylated form corresponds to a deamidated protein.

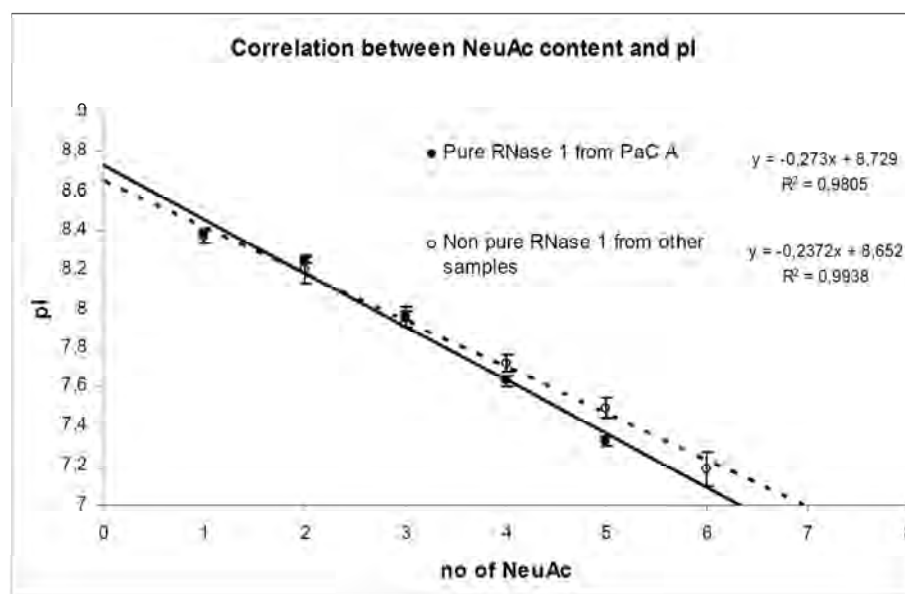


Figure 4.19: Correlation between pI and neuraminic acid (NeuAc) content for RNase 1 according to the observed pIs of the pure RNase 1 fractions from PaC A serum (solid line, pIs listed in Table 4.5). Dotted line corresponds to the correlation taking into account the median pI values of all RNase 1 samples from Capan-1-conditioned media, healthy donors' and PaC patients' serum and endothelial cell lines-conditioned media (pIs listed in 4.6).

Discussion

Determining changes in SiaAc content of cell or serum glycoproteins could add important information for assessing physiological or pathological changes that affect organisms. In order to analyze these changes we evaluated how 2-DE could provide enough information to characterize the SiaAc content of glycoproteins that change their SiaAc composition depending on their tissue of origin or on the pathological state of the cell.

The effect of SiaAc on pI has not been fully studied in 2-DE experiments although its influence on some glycoproteins has already been reported (Schlags et al., 2002; Kremser et al., 2003). So far, only a few studies have tried to search for the direct influence of sialic acid on the pI shift of the protein.

Antithrombin (ATIII), which acts as a potent inhibitor of blood coagulation, is a glycoprotein with four N-glycosylation sites that presents two isoforms (ATIII α and ATIII β) differing in one carbohydrate side chain on Asn-135 that is present in ATIII α but not in ATIII β . ATIII α isoform contains four carbohydrate side chains, one more than isoform β , which consists in a biantennary di-sialylated complex type chain. Both isoforms have pIs lower than 6, at 5.18 and 5.315 (Kremser et al., 2003). The pI difference between the isoforms is about 0.14 pH units and is due to this extra glycan chain with two SiaAc in isoform α . Thus, each SiaAc implies a decrease in pI of 0.07 pH units (Kremser et al., 2003).

SiaAc content on erythropoietin (EPO) has also been studied (Takeuchi et al., 1988; Schlags et al., 2002). EPO is a glycoprotein with three N-glycosylation sites and one O-glycosylation site. N-glycan structures of human EPO are mainly tetra-antennary complex type and some tri- and bi-antennary complex type structures with SiaAc linked either α 2-3 or α 2-6 (Takeuchi et al., 1988). Non-sialylated EPO has a pI of 6.6-8.6 while highly sialylated EPO (13 or 14 mol SiaAc/mol) has a pI of 3.5-4.5 (Schlags et al., 2002). This shift is due to the presence of SiaAc and the effect can be calculated to be -0.13 to -0.38 pH units per SiaAc.

Our group has also analyzed the different isoforms of seminal plasma PSA and has reported that some of them could be attributed to SiaAc. Seminal plasma PSA has one N-glycosylation chain composed of mono and di-sialylated complex biantennary glycans that contain either sialic acid linked α 2-6 or α 2-3. Digestion with sialidase shifted some

acid spots to the more basic ones, with a shift of around 0.2 units between the acid spots (Tabarés et al., 2006; Tabarés et al., 2007).

These previous results seem to indicate that the decrease in pI of a protein due to SiaAc is not necessarily the same for all the glycoproteins. It could depend on the glycan structure on which the SiaAc is attached or it could be more remarkable in more basic glycoproteins than in acid ones (unglycosylated EPO has a theoretical pI of 8.75 while the theoretic pI of unglycosylated ATIII is 5.95).

RNase 1 has been chosen as a model for studying the influence of the SiaAc content in the pI of a glycoprotein, because it contains three N-glycosylation sites with N-glycan structures that have been fully characterized before (Peracaula et al., 2003a; Barrabés et al., 2007). Knowledge of the glycan structures attached to RNase 1 purified from different origins (pancreas, pancreatic adenocarcinoma cell lines, endothelial cell lines and serum) is essential for the correlation between each isoform and the number of SiaAc residues it has.

2-DE of RNase 1 samples, followed by Western Blot using specific antibodies, showed clear variations in the pI distribution of the different RNase 1 forms in the samples analyzed. The isoforms of RNase 1 from a healthy pancreas, which are all neutral, have the same pI at around 8.61. Some RNase 1 acid forms were detected in Capan-1-conditioned media, which could be assigned to the RNase 1 glycans containing NeuAc. The most acid RNase 1 isoforms were detected in serum and endothelial cell lines-conditioned media, where most of the RNase 1 glycans are sialylated. Digestion of RNase 1 with sialidase shifted all acid spots to neutral spots (at about pI of 8.35-8.44), which indicates that NeuAc was responsible for all the acid spots. The greater heterogeneity found in the neutral forms (from 8.38 to 8.77, median 8.59 ± 0.15) could be attributed to the different degree of deamidation in the samples and also to the intrinsic difficulty of 2-DE to focus proteins of basic pIs as a consequence of the electroosmotic flow at the basic end of the IEF (Görg et al., 2000; Pennington et al., 2004).

Assigning the different acid spots to glycoforms with a determined number of NeuAcs was performed by analyzing the 2-DE of the three purified serum RNase 1 fractions with 1, 2 and 3 N-glycosylation sites occupied. The detailed knowledge of the N-glycans of each fraction allowed us to establish a correspondence between the pI of

a glycoform and its NeuAc content. From this correspondence, the NeuAc content of different RNase 1 samples was analysed and a clear coincidence in the pI of different groups of isoforms could be observed among the samples. Seven different RNase 1 forms, at pIs 7.18 ± 0.08 , 7.49 ± 0.05 , 7.72 ± 0.05 , 7.96 ± 0.05 , 8.20 ± 0.07 , 8.37 ± 0.03 and 8.59 ± 0.15 , could be detected in the analyzed RNase 1 samples, which would contain from six to zero NeuAc per RNase 1 molecule. The pI of the sialylated forms was used to establish a mathematical correlation between the NeuAc content and the glycoform pI. According to these results, adding one NeuAc monosaccharide to a biantennary complex N-glycan causes a decrease of 0.25 pH units in RNase 1.

The information provided by the 2-DE pattern of RNase 1 from different origins has been decisive for explaining the origin of serum RNase 1. The origin of serum RNase 1 has been historically associated with the pancreas since this organ has the highest expression of this enzyme (Futami et al., 1997; Fernández-Salas et al., 2000). However, the different 2-DE patterns of serum RNase 1 and pancreas RNase 1, and the high similitude of the 2-DE pattern between the RNase 1 from serum and from endothelial cell lines conditioned media, was one of the key factors suggesting the major endothelial origin of serum RNase 1, which was later confirmed by glycan sequencing of serum and a endothelial cell line RNase 1 (Barrabés et al., 2007). 2-DE has thus proven to be a valuable tool for indicating that serum RNase 1 comes mostly from the endothelium rather than from the pancreas.

Adding SiaAc to a glycoprotein is not the only modification that can cause a decrease in the glycoprotein pI. Deamidation, for example, is a common modification causing a decrease in pI due to the transition of Asn and Gln into Asp and Glu residues respectively (Righetti, 2006). This is a common feature of long sample storage periods that takes place spontaneously within a few hours to several years (Robinson et al., 2006), and cannot be attributed to the manipulation of the sample for 2-DE separation (Sarioglu et al., 2000; Righetti, 2006). Other post-translational modifications can also cause modifications in pI such as glycan sulphatation (Malette and Bleau, 1993), phosphorylation, reactions with NH_2 groups and also modifications during 2-DE sample treatment such as carbamylation (Gianazza, 1995).

The analysis of the 2-DE pattern of unglycosylated recombinant RNase 1 showed several spots. The most basic one at pI 9.12 ± 0.10 is consistent with the one cal-

culated from the amino acid sequence (8.98). Two more spots at pIs 8.52 and 8.40 were detected and attributed to deamidated forms of the enzyme, with three and four deamidations respectively. Deamidation rates of several proteins have been previously calculated (Robinson and Robinson, 2001), and the coefficient of deamidation (CD) for RNase 1 indicates that Asn-67 and Asn-88 are likely to be deamidated at significant rates (Robinson, personal communication). Asn-88 residue corresponds to an N-glycosylation site and it can only be deamidated when it is not occupied by an oligosaccharide chain, which is the case for recombinant RNase 1. The other asparagine residues that are more likely to be deamidated are Asn-76, Asn-44 and Asn-71, but with CDs 100 times higher than those of Asn-67 and Asn-88.

The deamidated forms were also detected in the unglycosylated RNase 1 purified from a pancreatic cancer patient's serum (PaC A). In this case, four different spots were detected at pI 9.15, 8.94, 8.71 and 8.53 that could correspond to a non-modified RNase 1 and RNase 1 with one, two and three deamidations (decrease in pI of 0.11, 0.44 and 0.62). We cannot rule out that some of the glycosylated forms could also be affected by deamidation. However, the sialic acid effect on the decrease of protein pI did not seem to be affected by potential deamidations of the protein.

In conclusion, the combination of 2-DE and sialidase digestion has revealed to be a relatively simple but powerful technique for correlating the degree of SiaAc of a particular protein with the pI of that protein. Taking into account that changes in glycosylation, and in particular the level of sialylation, are associated with pathological processes like cancer or with different cell states, evaluation of these alterations provides the basis for discerning the origin of the protein and therefore could be remarkably useful for diagnosis or follow-up purposes.

Acknowledgments

We thank Dr. M. Vilanova and Dr. M. Ribó for the kind gift of human recombinant pancreatic ribonuclease 1 and also thank Dr. N. Robinson for providing us with the information about RNase 1 deamidation coefficients. This work was supported by the Department of Science and Technology from the *Ministerio de Educación y Ciencia* (BIO 2004-0438) and by the Foundation *La Marató de TV3* (grant 050932 awarded to R.P.) and the Government of Catalonia (grant 2005SGR00065 awarded to R.L.).

Abbreviations

2-DE, two-dimensional electrophoresis; ABS, *Arthrobacter urefaciens* neuraminidase; AFP, Alpha fetoprotein; ATIII, Antithrombin III; CD, coefficient of deamidation; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; DTT, Dithiothreitol, EPO, Erythropoietin; ExPASy, Expert Protein Analysis System; FBS, Foetal Bovine Serum; M/S, Mass Spectrometry; Mw, molecular weight; NeuAc, 5-N-acetyl neuraminic acid; PaC, pancreatic cancer; PBS, phosphate buffer saline; pI, Isoelectric point; PNGase F, *Flavobacterium meningosepticum* N-glycopeptidase F; PSA, prostate specific antigen; RNase 1, human pancreatic ribonuclease; rRNase 1, recombinant human pancreatic ribonuclease; SD, standard deviation; SDS, sodium dodecyl sulphate; SiaAc, sialic acid; SLe^a, sialyl Lewis a antigen; SLe^x, sialyl Lewis x antigen; X, median.

Capítol 5

Discussió general

L'adenocarcinoma pancreàtic és un dels tumors que presenta pitjor pronòstic ja que la seva taxa d'incidència i la de mortalitat són molt similars (García Sáenz, 1999). La incidència del càncer de pàncreas al 2004 ha estat estimada en 58.700 casos en la Unió Europea, ocupant la 12a posició en la classificació de la taxa d'incidència de càncer. La seva mortalitat en el mateix any ha estat estimada en 61.000 casos, en la 6a posició en la llista de mortalitat causada pels càncers (Boyle and Ferlay, 2005). Un dels causants d'aquesta situació és que la simptomatologia del càncer de pàncreas no és clara i es pot malinterpretar amb facilitat dificultant la seva detecció. És per això que el càncer de pàncreas es diagnostica habitualment quan ja és massa tard i està disseminat, de forma que el tractament aplicable en molts casos és només paliatiu i la taxa de supervivència es manté en valors baixos (Saif, 2006). És necessari millorar el sistema de diagnòstic del càncer de pàncreas per tal que els tractaments puguin aplicar-se en estadis primerencs de la malaltia i així ser més efectius. Aquesta millora requereix, al seu torn, la identificació de marcadors tumorals sensibles i específics.

Les ribonucleases han estat objecte d'estudi durant molts anys donades les seves característiques bioquímiques, la seva activitat biològica i les seves possibles aplicacions terapèutiques (Schein, 1997). El present treball està enfocat a l'estudi de la ribonucleasa pancreàtica humana o RNasa 1. Aquest enzim pertany a la superfamília de la RNasa A (Sorrentino and Libonati, 1997), en la que es troben incloses fins al moment 13 ribonucleases humanes (Soochin et al., 2005). La RNasa 1 es produeix principalment al pàncreas (Weickmann et al., 1981), teixit en el qual també s'expressa

majoritàriament (Futami et al., 1997; Fernández-Salas et al., 2000), però és present en diversos teixits i fluids com són el sèrum, ronyons, cervell (Weickmann and Glitz, 1982) o orina (Kurokawa et al., 1983). També és secretada per les cèl·lules de l'endoteli vascular de diferents vasos sanguinis (venes, artèries i capil·lars) com ha estat descrit més recentment (Moenner et al., 1997; Landré et al., 2002).

L'increment de la secreció de RNasa 1 per part del pàncreas en l'adenocarcinoma pancreàtic ha portat a molts autors a pensar que la RNasa 1 podria ser un possible indicador del tumor. Partint de la hipòtesi que la RNasa 1 sèrica és d'origen pancreàtic, al llarg dels anys 70, molts autors van proposar l'ús dels nivells de ribonucleasa 1 sèrica com a possible marcador del càncer de pàncreas (Reddi and Holland, 1976; Maor and Mardiney, 1978). Estudis posteriors, però, van revelar que ni els nivells sèrics de RNasa 1 ni els nivells d'activitat d'aquest enzim en sèrum eren suficientment sensibles ni específics com a marcadors d'aquest càncer (Weickmann et al., 1984; Kurihara et al., 1984). De fet, es va veure que els nivells de RNasa 1 en sèrum es veuen alterats en certes situacions patològiques com la pancreatitis i la insuficiència renal, i que, a més a més, augmenten amb l'edat (Weickmann et al., 1984).

Cal destacar la controvèrsia sobre l'origen de la RNasa 1 present en sèrum. Els estudis esmentats prèviament es basen en la presumpció que la RNasa 1 sèrica prové del pàncreas. En aquest sentit s'ha descrit 'in vitro' i 'in vivo' en conills el transport d'alguns enzims digestius dels intestins cap al torrent circulatori per ser reciclats en el pàncreas, fet que es coneix com a circulació enteropancreàtica (Rothman et al., 2002). La RNasa pancreàtica s'eliminaria de la circulació principalment a nivell dels ronyons ja que es tracta d'una proteïna de baixa massa molecular, com descriuen Baynes and Wold (1976) per la RNasa A bovina. La circulació enteropancreàtica recolza la teoria del pàncreas com a òrgan productor de RNasa 1 sèrica. En contra d'aquesta hipòtesi, hi ha estudis que demostren que es pot detectar RNasa 1 en sèrum després d'una pancreatectomia total (Peterson, 1979), fet que suggereix un origen de la RNasa 1 sèrica diferent al pancreàtic.

Anàlisi de la glicosilació de la RNasa 1 sèrica per seqüenciació glucídica i electroforesi bidimensional

La glicosilació de les proteïnes de membrana i de secreció són un reflex de la maquinària de glicosilació activa en el reticle endoplasmàtic i aparell de Golgi de la cèl·lula, i no només és òrgan-específica (Yamashita et al., 1986; Kobata, 2004; Fujihara et al., 2006), sinó que també es veu alterada en situació patològica (Naitoh et al., 1999; Ørntoft and Vestergaard, 1999). El canvi en el patró de glicosilació dels glicoconjugats de les cèl·lules canceroses és un dels canvis associats a la transformació tumoral. Aquests canvis en els glicoconjugats de la superfície cel·lular també queden reflectits en les glicoproteïnes de secreció (Peracaula et al., 2003a) i corresponen, principalment, a un increment de la ramificació i de la sialilació dels N-glicans en situació tumoral (Dennis et al., 1999; Gorelik et al., 2001). També es produeix de forma generalitzada la sobreexpressió de les estructures Lewis en carcinomes i, concretament, els antígens SLe^x i SLe^a s'han identificat com antígens tumorals (Ørntoft and Vestergaard, 1999; Dennis et al., 1999). Per tot això, el canvi de glicosilació associat a la transformació tumoral pot ser d'ús diagnòstic com a marcador tumoral. A més d'específic i sensible, un bon marcador tumoral ha de poder ser detectable en fluids biològics de fàcil obtenció i per això els marcadors sèrics presenten més avantatges. Tenint en compte aquest aspecte, les glicoproteïnes sèriques són una diana clara en la recerca de nous marcadors tumorals.

Davant aquests precedents, en aquest treball s'ha volgut esclarir la utilitat de la ribonucleasa pancreàtica humana com a possible marcador del càncer de pàncreas. La RNasa 1 té tres dianes de N-glicosilació en els residus Asn-34, Asn-76 i Asn-88. Considerant que l'alteració de la glicosilació en el cèl·lules tumorals és un fet establert i que el patró de glicosilació és específic de teixit, en el present treball s'estudia si la glicosilació de la RNasa 1 pancreàtica està alterada en situació tumoral i si aquests canvis són útils per identificar el càncer. Els estudis previs del grup demostren diferències significatives entre les estructures glucídiques de la RNasa 1 obtinguda de pàncreas sà i de la RNasa 1 de línies cel·lulars d'adenocarcinoma pancreàtic (Peracaula et al., 2003a). Mentre la RNasa 1 d'origen sa presenta només estructures glucídiques neutres i altament fucosilades com l'antigen glucídic Le^y; les estructures presents en la RNasa 1 de línies d'adenocarcinoma pancreàtic contenen àcid siàlic i els antígens sialidats SLe^a i SLe^x. Cal determinar si aquestes diferències o altres són detectables en la RNasa 1 sèrica de pacients amb càncer de pàncreas respecte individus sans.

En el present treball s'han descrit les estructures glucídiques de la RNasa 1 sèrica d'individus control i pacients amb càncer de pàncreas per tal d'establir la seva utilitat diagnòstica. Amb aquest objectiu, s'ha purificat la RNasa 1 de sèrum de dos individus sans i de dos pacients amb adenocarcinoma pancreàtic diagnosticats en estadi III i IV. La purificació de la RNasa 1 sèrica es veu dificultada per la baixa concentració de RNasa 1 en la mostra (aproximadament $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ en sèrums de pacients sans, que pot augmentar en pacients amb càncer de pàncreas o altres patologies). Per aquest motiu, i tenint en compte les pèrdues de proteïna intrínseques a qualsevol procés de purificació, ha estat necessari partir d'un elevat volum de sèrum (20 mL) a partir del qual s'ha purificat la RNasa 1 en tres etapes cromatogràfiques. Inicialment s'utilitza una cromatografia d'afinitat a Cibacron-blue que permet eliminar gran part de l'albumina continguda en el sèrum. Seguidament es realitza una cromatografia d'afinitat a heparina i, finalment, una cromatografia de fase reversa Vydac-C4. En aquest últim pas, la RNasa 1 s'elueix de la cromatografia en funció de la seva polaritat. El contingut de sucres de la RNasa 1 fa que les formes més glicosilades elueixin de la cromatografia abans de les no glicosilades i fa possible la seva separació en funció del grau de glicosilació (del nombre de dianes ocupades) des de la més glicosilada (amb tres dianes de glicosilació ocupades) a la no glicosilada. Així, és possible obtenir la RNasa 1 pura i separada en funció del seu grau de glicosilació.

La RNasa 1 pura ha estat tractada amb endoglicosidasa F per obtenir totes les cadenes oligosacàrides, que s'han seqüenciat mitjançant la combinació de cromatografia de fase normal, per HPLC, i la digestió combinada amb exoglicosidases específiques (Guile et al., 1996). Les cadenes glucídiques també s'han caracteritzat per espectrometria de masses.

La seqüenciació glucídica de la RNasa 1 sèrica mostra unes estructures molt similars entre les diferents mostres assajades. La RNasa 1 sèrica tant d'individus sans com de pacients amb càncer de pàncreas presenta principalment estructures complexes biantenàries, mono- o di-sialidades amb presència i absència de fucosa α 1-6 unida al core pentasacàrid (Fc, fucosa en el 'core' pentasacàrid dels N-glicans) (Figura 5.1). Tot i la similitud de les estructures glucídiques, s'ha observat un increment d'un 40% de les estructures biantenàries amb Fc respecte les mateixes estructures amb absència de Fc, en la RNasa 1 de pacients amb càncer de pàncreas.

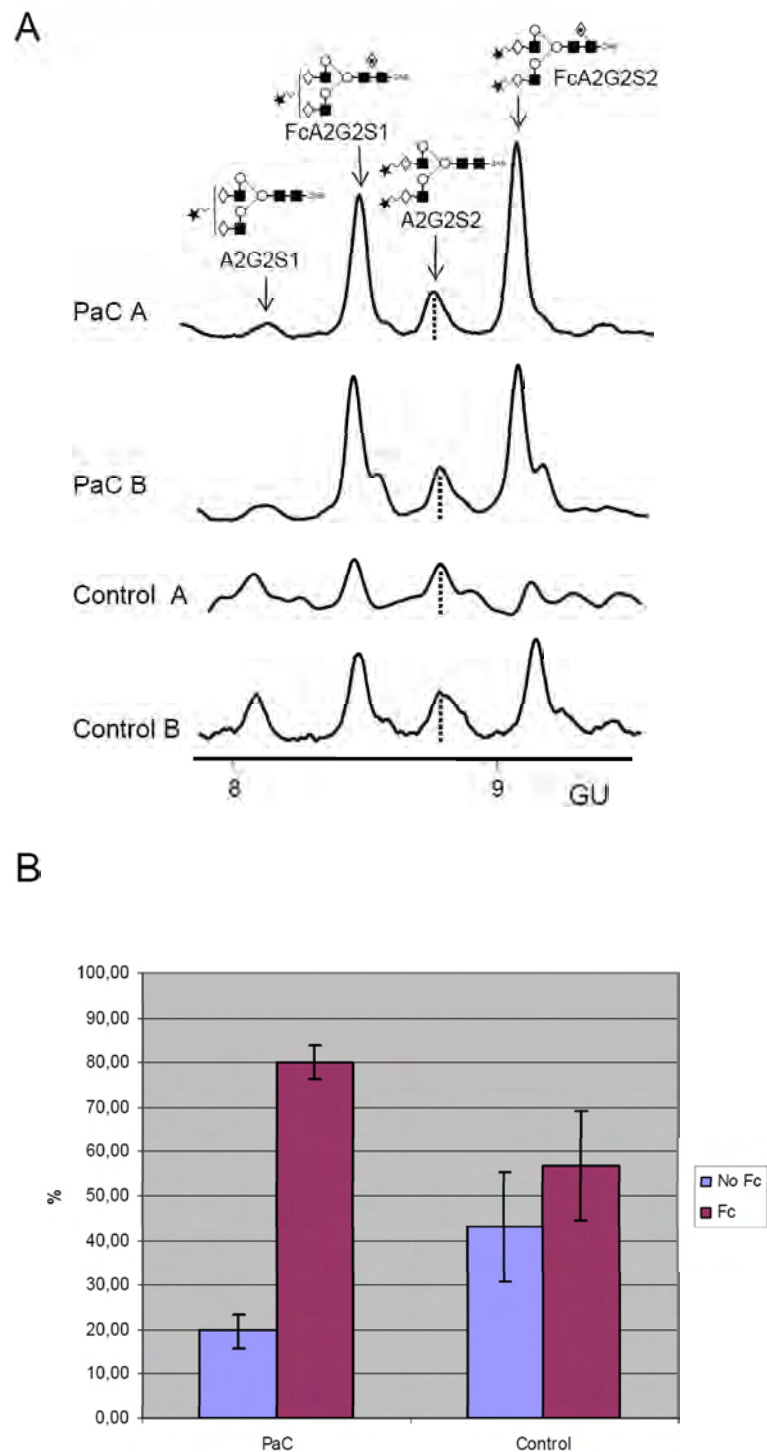
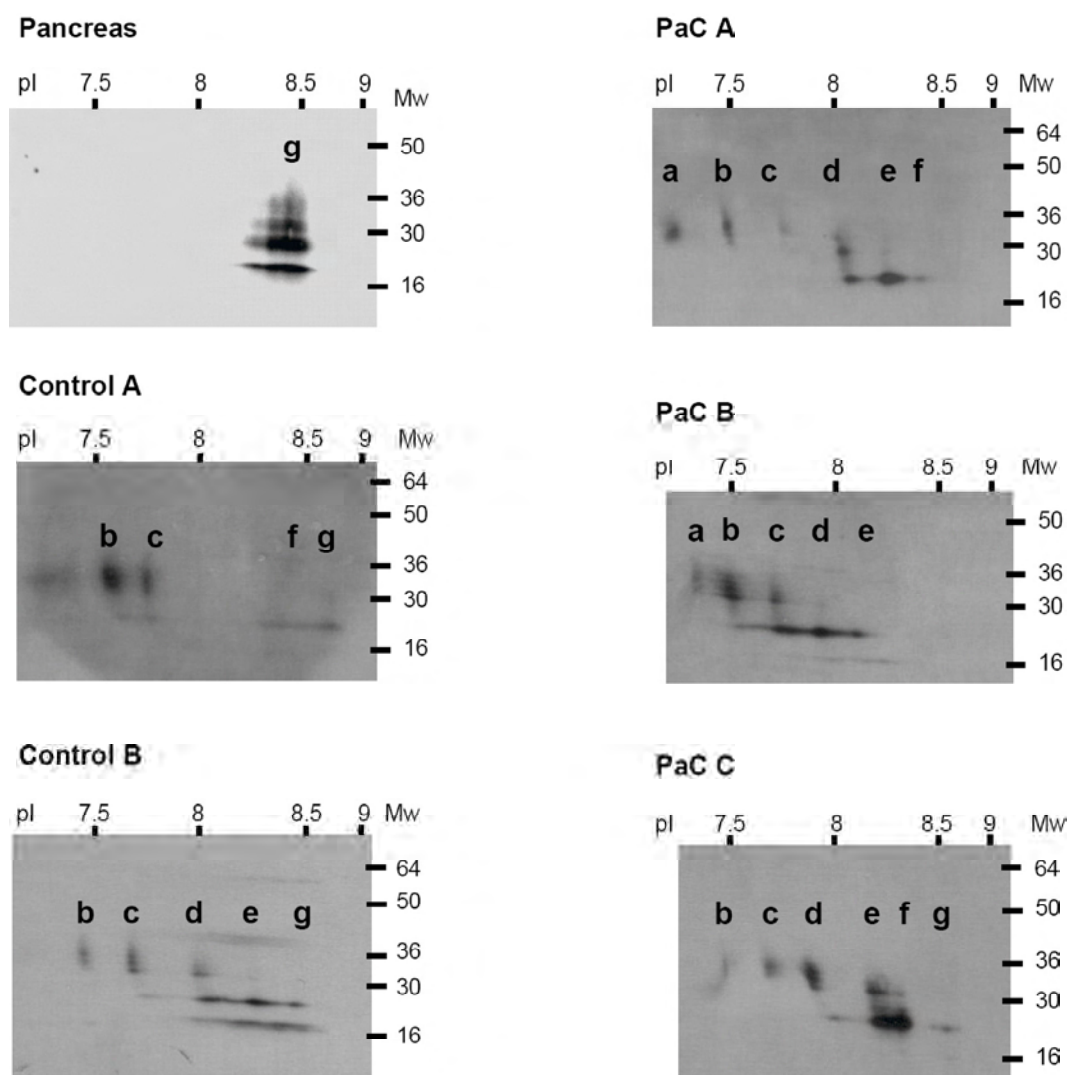


Figura 5.1: A. Es mostren els resultats de la seqüenciació glucídica de la RNasa 1 sèrica d'individus sans (controls) i pacients amb adenocarcinoma pancreàtic (PaC), i les quatre principals estructures glucídiques descrites a la RNasa 1 sèrica. B. Proporció d'estructures biantenàries amb Fc (FcA2G2S1+FcA2G2S2) i sense Fc (A2G2S1+A2G2S2) en la RNasa 1 sèrica.

L'increment d'estructures amb Fc respecte estructures sense Fc trobada en la RNasa 1 sèrica en situació tumoral és de gran interès de cara a una possible discriminació entre la situació normal i la tumoral. Altres estudis també revelen un increment de Fc en glicoproteïnes en situació tumoral, com és el cas de la glicoproteïna GP76 en carcinoma hepatocel·lular (Block et al., 2005) o la haptoglobina en el mateix càncer de pàncreas (Okuyama et al., 2006). En el futur es vol determinar els nivells de Fc en la RNasa 1 sèrica en un major nombre de sèrums d'individus sans i pacients amb càncer de pàncreas. En una primera etapa s'eliminaran les immunoglobulines (Wang et al., 2003) i en segon lloc s'aplicarà la metodologia descrita per Block et al. (2005), que es basa en utilitzar una sèrie de lectines que reconeixen la Fc i es determinarà la proporció de RNasa 1 sèrica unida a les lectines respecte a la no unida. Segons els resultats previs obtinguts en el present estudi, aquesta proporció hauria de ser major en el cas de la RNasa 1 de sèrums de pacients amb adenocarcinoma pancreàtic.

Les mateixes mostres de sèrum utilitzades per obtenir la seqüenciació glucídica, han estat també analitzades per electroforesi bidimensional. Donades les diferències descrites per la RNasa 1 de pàncreas sa i la RNasa 1 de medi condicionat de línies d'adenocarcinoma pancreàtic en quant al seu contingut en àcid siàlic, s'ha utilitzat l'electroforesi bidimensional per determinar possibles diferències entre la RNasa 1 d'individus sans i de pacients amb adenocarcinoma pancreàtic pel que fa a la presència d'àcid siàlic. Aquest monosacàrid amb càrrega negativa fa disminuir el pI de la glicoproteïna, fet que permet observar canvis en la distribució de *spots* en el patró bidimensional de la RNasa 1. En aquest cas, la RNasa 1 sèrica d'individus sans i pacients amb càncer de pàncreas parcialment purificada es separa per isoelectroenfoc i posteriorment per SDS-PAGE, i la RNasa 1 és detectada amb anticossos policlonals després de ser transferida sobre una membrana de PVDF. El patró de *spots* obtinguts per ambdós casos, tant per pacients com per individus sans, és clarament similar (Figura 5.2).

La RNasa 1 sèrica presenta heterogeneïtat de formes de diferent massa molecular (des de 16 fins a 36 kDa aproximadament) i diferent punt isoelèctric (de pI 8.59 ± 0.14 a pI 7.26 ± 0.14). Les formes de més baixa massa molecular corresponen a les formes no glicosilades, mentre que les de major massa molecular són formes amb 3 dianes de N-glicosilació ocupades. Són les formes de més alta massa molecular les que tenen menor pI donat que són les que poden presentar un major contingut en àcid siàlic. Aquest patró difereix completament a l'obtingut per la RNasa 1 de pàncreas sa en el



	a	b	c	d	e	f	g
Pancreas							8,43
Control A		7,58	7,74			8,37	8,72
Control B		7,44	7,68	8,02	8,27		8,44
PaC A	7,20	7,47	7,75	8,04	8,26	8,40	
PaC B	7,32	7,49	7,71	7,93	8,11		
PaC C		7,48	7,7	7,9	8,21	8,33	8,60
pI	7,26	7,49	7,72	7,97	8,21	8,37	8,55
SD	0,08	0,05	0,03	0,07	0,07	0,04	0,14

Figura 5.2: Electroforesi bidimensional de la RNasa 1 sèrica d'individus sans (controls) i pacients amb adenocarcinoma pancreàtic (PaC). En cada patró bidimensional s'han marcat els *spots* detectats classificats en base al seu pI en set grups diferents (a-g) que apareixen resumits en la taula, així com la mitjana i desviació estàndard que es pot obtenir d'ells.

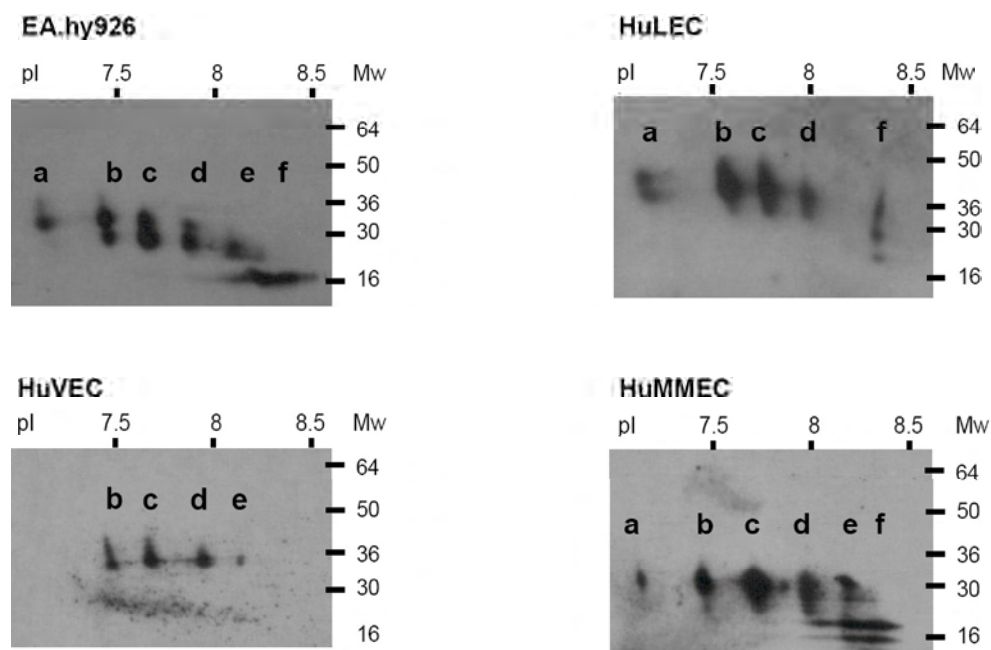
que només s'observa heterogeneïtat de massa molecular, degut al grau de glicosilació, però no de pI, ja que les seves estructures glucídiques són totes neutres.

La gran semblança dels patrons bidimensionals i les estructures glucídiques descrites per la RNasa 1 sèrica d'individus sans i pacients amb adenocarcinoma pancreàtic, i alhora la gran diferència amb el patró bidimensional i les estructures glucídiques descrites per la RNasa 1 de pàncreas sa, sembla indicar que la RNasa 1 de sèrum no prové en la seva majoria del pàncreas. Tot i això, no es pot descartar que una part de la RNasa 1 sèrica sigui d'origen pancreàtic si es té en compte la circulació enteropancreàtica i el canvi en la proporció de Fc en les estructures de la RNasa 1 en càncer de pàncreas.

Anàlisi de la glicosilació de la RNasa 1 d'origen endotelial per seqüenciació glucídica i electrophoresi bidimensional

L'origen de la RNasa 1 sèrica ha estat motiu de polèmica. Com ja s'ha comentat prèviament, alguns estudis posen en dubte l'origen pancreàtic de la RNasa 1 sèrica per la presència d'aquesta després d'una pancreatectomia radical (Peterson, 1979). Els resultats del present estudi recolzarien aquesta hipòtesi. Landré et al. (2002), suggerien que l'endoteli podria ser la font de la RNasa 1 sèrica en descriure la secreció d'aquesta proteïna per part de línies cel·lulars endotelials de diversos orígens.

Amb l'objectiu d'avaluar si la RNasa 1 d'origen endotelial pot ser una font apreciable de la RNasa 1 sèrica, s'ha determinat el patró bidimensional de la RNasa 1 produïda per cèl·lules endotelials de diferents vasos sanguinis. Les línies cel·lulars utilitzades han estat les HUVEC (cèl·lules endotelials de vena de cordó umbilical humà), HuMMEC (cèl·lules endotelials de microvasos mamaris humans), HuLEC (cèl·lules endotelials de microvasos de pulmó humà) i EA.hy926 (híbrid immortal obtingut de la fusió de cèl·lules HUVEC amb cèl·lules de carcinoma A549/8) (Edgell et al., 1983). El patró bidimensional obtingut per aquestes cèl·lules (Figura 5.3) revela un elevada heterogeneïtat de pIs (de pI 8.36 ± 0.03 a pI 7.13 ± 0.01) i predomini de les formes de major massa molecular (de 30 a 36 kDa) (Pagès-Pons, 2006). En general, el patró descrit per aquestes cèl·lules és molt similar entre elles i ho és també al patró obtingut per la RNasa 1 sèrica tant d'individus sans com de pacients amb adenocarcinoma pancreàtic.



	a	b	c	d	e	f
Eahy	7,14	7,46	7,67	7,89	8,12	8,39
HUVEC		7,47	7,68	7,95	8,14	
HULEC	7,13	7,57	7,76	7,97		8,34
HUMMEC	7,12	7,45	7,72	7,98	8,2	8,35
pI	7,13	7,49	7,71	7,95	8,15	8,36
SD	0,01	0,06	0,04	0,04	0,04	0,03

Figura 5.3: Electroforesi bidimensional de la RNasa 1 de medi condicionat de diverses línies cel·lulars endotelial. En cada patró bidimensional s'han marcat els *spots* detectats classificats en base al seu pI en sis grups diferents (a-f) que apareixen resumits en la taula, així com la mitjana i desviació estàndard que es pot obtenir d'ells.

La RNasa 1 endotelial està altament glucosilada i sialidada, i podria correspondre's a la RNasa 1 sèrica.

Per tal de comparar les seves estructures glucídiques amb les de la RNasa 1 sèrica obtingudes prèviament, els glicans de la RNasa 1 endotelial han estat seqüenciats seguint el mateix procediment que per la RNasa 1 de sèrum. La RNasa 1 endotelial s'ha purificat a partir de la línia cel·lular EA.hy926, que s'ha escollit com a model de les cèl·lules endotelials donat que totes les línies endotelials estudiades han mostrat

un patró bidimensional de la RNasa 1 molt similar. La purificació de la RNasa 1 del medi condicionat d'aquesta línia cel·lular és més senzill ja que, un cop s'obté un cultiu confluent d'aquestes cèl·lules, es poden mantenir en cultiu fins a tres dies en medi de cultiu sense FBS (sèrum fetal boví) sense que deixin de produir RNasa 1. El FBS conté RNasa A que dificulta molt la completa purificació de la RNasa 1 i és un gran avantatge poder disposar de medi condicionat d'aquestes cèl·lules sense RNasa A provinent del FBS.

Les estructures glucídiques de RNasa 1 d'origen endotelial determinades per seqüenciació glucídica corresponen majoritàriament a estructures complexes biantenàries, mono- o di-sialidades amb o sense Fc. Aquestes estructures són les mateixes que s'han descrit també per la RNasa 1 sèrica. En aquest cas, la proporció de formes biantenàries amb Fc respecte a les formes biantenàries sense Fc és la mateixa a la descrita per la RNasa 1 sèrica d'individus sans (Figura 5.4).

Donada la similitud entre les estructures glucídiques de la RNasa 1 sèrica i la RNasa 1 endotelial i tenint en compte que la glicosilació és òrgan específica, es pot concloure que la RNasa 1 sèrica prové principalment de l'endoteli. Les cèl·lules endotelials produeixen aquest enzim i el podrien abocar directament a la sang on pot romandre en circulació. La vida mitja d'aquesta proteïna en sang dependrà de la seva eliminació per part dels ronyons i també de la captació per part del fetge. L'eliminació de la RNasa 1 sembla produir-se principalment als ronyons donada la seva baixa massa molecular (Vasandani et al., 1996). S'ha determinat injectant ribonucleasa pancreàtica bovina en ratolins, que l'eliminació en els ronyons sembla augmentar molt quan les estructures glucídiques corresponen a arbres simples amb manoses terminals, i és menor a mesura que el pI de la proteïna disminueix per presència de l'àcid siàlic (Baynes and Wold, 1976). La presència d'àcid siàlic també fa augmentar la vida mitja en sang de les glicoproteïnes al disminuir la taxa d'eliminació per part del receptor d'asialoproteïnes (ASGP-R) hepàtic (Pricer and Ashwell, 1971), que depèn de la presència d'una galactosa terminal que es pugui unir al ASGP-R. D'aquesta manera, la presència de terminals siàlics eviten que la glicoproteïna sigui reconeguda pel ASGP-R i permet allargar la seva vida mitja en sang.

Cal tenir en compte que la proporció d'estructures amb Fc i estructures sense Fc en la RNasa 1 endotelial coincideix amb la proporció trobada en la RNasa 1 sèrica d'in-

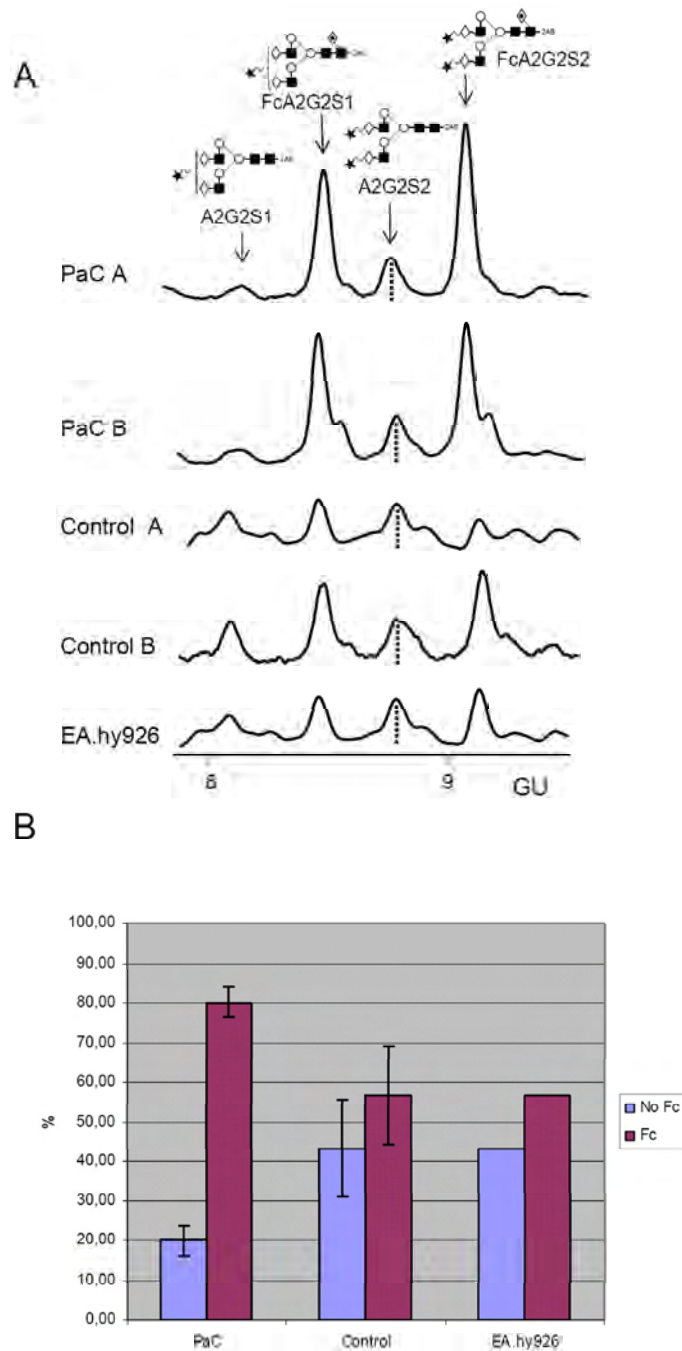


Figura 5.4: A. Es mostren els resultats de la seqüenciació glucídica de la RNasa 1 de la línia cel·lular endotelial EA.hy926 comparada amb la RNasa 1 sèrica d'individus sans (controls) i pacients amb adenocarcinoma pancreàtic (PaC), i les quatre principals estructures glucídiques descrites a la RNasa 1 d'origen endotelial i la RNasa 1 sèrica. B. Proporció d'estructures biantenàries amb Fc (FcA2G2S1+FcA2G2S2) i sense Fc (A2G2S1+A2G2S2) en la RNasa 1 d'origen endotelial i la RNasa 1 sèrica.

dividus sans. D'altra banda i com ja ha estat comentat, la RNasa 1 sèrica amb major contingut de Fc és derivada del procés tumoral. Així doncs, l'augment d'estructures amb Fc en la RNasa 1 sèrica en situació tumoral pot ser degut a múltiples esdeveniments que es podrien estar produint en la cèl·lula tumoral, en la cèl·lula endotelial del teixit vascular proper al tumor o a ambdues. Una possible hipòtesi seria la producció de RNasa 1 amb una glicosilació alterada (amb més Fc) per part del tumor que podria arribar més fàcilment al torrent sanguini per disrupció del teixit pancreàtic a causa del creixement cel·lular anòmal i desorganitzat. Cal considerar també, com a hipòtesi alternativa, un canvi en la maquinària de glicosilació de les cèl·lules endotelials de l'entorn del tumor causada per algun factor secretat per les cèl·lules tumorals. En qualsevol de les dues hipòtesis, els canvis que s'estan produint impliquen una modificació del procés de glicosilació que es porta a terme en la cèl·lula, i que podria ser tant a nivell dels enzims de l'aparell de Golgi (augment de l'activitat de la fucosiltransferasa 8 o FUT8) (Miyoshi et al., 1999), com disponibilitat del substrats (Noda et al., 2003) o alteració del transit a través de les cisternes de l'aparell de Golgi (Kellokumpu et al., 2002).

Les estructures glucídiques descrites a la RNasa 1 de les línies d'adenocarcinoma pancreàtic estudiades (Capan-1 i MDA-Panc3) no coincideixen amb les estructures trobades a la RNasa 1 sèrica de pacients amb càncer de pàncreas. És per això que es vol estudiar properament si un factor alliberat pel tumor pot estar alterant el sistema de glicosilació de les cèl·lules endotelials incrementant la proporció en estructures amb Fc. La possibilitat que un tumor pancreàtic alliberi algun factor que pugui alterar la glicosilació d'un altre teixit ja ha estat anteriorment proposada per Okuyama et al. (2006). El seu estudi demostra un increment de Fc en la haptoglobina en càncer de pàncreas, tot i que l'haptoglobina és produïda de forma majoritària en el fetge. Okuyama i col·laboradors proposen que algun factor alliberat pel tumor modificaria la maquinària de glicosilació de les cèl·lules hepàtiques i ho demostra 'in vitro' tractant una línia cel·lular d'hepatoma amb medi condicionat de línies cel·lulars de càncer de pàncreas. Aquesta mateixa estratègia és la que es vol seguir en el futur per determinar si les cèl·lules d'adenocarcinoma pancreàtic produeixen factors que promoguin el canvi de glicosilació en la línia cel·lular endotelial EA.hy926.

En resum, els resultats del present treball apunten a que les cèl·lules de l'endoteli vascular estan produint RNasa 1 que possiblement arriba a sèrum molt fàcilment donat que l'endoteli representa una gran extensió de teixit en contacte directe amb la sang.

La similitud en els patrons bidimensionals i les estructures glucídiques entre la RNasa 1 sèrica i endotelial indiquen que l'endoteli seria la font principal de RNasa 1 sèrica, però no es pot descartar que part de la RNasa 1 del pàncreas pugui arribar també al torrent circulatori. De fet, la RNasa 1 sèrica presenta canvis importants en la proporció d'algunes de les seves estructures glicosilades en situació tumoral. Concretament, les estructures biantenàries amb Fc augmenten respecte les mateixes estructures sense Fc en la RNasa 1 sèrica de pacients amb càncer de pàncreas. Aquest canvi de proporció s'estudiarà properament ja que podria ser la clau de l'ús diagnòstic de la RNasa 1 com a marcador tumoral del càncer de pàncreas.

Determinació de l'efecte de l'àcid siàlic en el pI de la RNasa 1 per electroforesi bidimensional

L'electroforesi bidimensional és una tècnica que ens pot proporcionar informació referent a alteracions en la massa molecular i el pI d'una proteïna que poden ser degudes a alteracions en el processament proteic, modificacions post-traduccionals, com la presència de monosacàrids (alguns amb càrrega), desamidacions dels residus d'Asn i de Gln de la proteïna (Robinson and Robinson, 2001; Sarioglu et al., 2000), fosforilacions (Ogata et al., 2006), etc. Encara que la tècnica no permeti la caracterització de manera directe d'aquestes modificacions, una mateixa proteïna produïda per teixits diferents o pel mateix teixit en diferents situacions fisiològiques pot generar un patró bidimensional completament diferent que indiqui que aquesta proteïna ha patit diferents modificacions post-traduccionals.

El coneixement detallat de les estructures glucídiques de la RNasa 1 de diversos orígens obtingut per seqüenciació glucídica, ha permès correlacionar aquesta informació amb el patró d'*spots* obtingut per electroforesi bidimensional de la RNasa 1 d'aquests orígens. Aquesta correspondència s'ha fet a nivell de nombre de dianes de N-glicosilació ocupades i, per tant, l'increment de la massa molecular corresponent; i a nivell del nombre de terminals siàlics presents en les diferents glicofomes (presència de càrregues negatives) i disminució del pI de la proteïna. S'ha treballat especialment en aquest segon punt, assignant a cada *spot* un contingut en àcid siàlic i, finalment, fent la correspondència entre el contingut d'àcid siàlic i la disminució en el pI que suposa.

Les diferents mostres assajades són la RNasa 1 de pàncreas sa, de la línia d'adenocarcinoma pancreàtic Capan-1, de sèrum d'individus sans i de pacients amb càncer de pàncreas i, finalment, la RNasa 1 de les línies cel·lulars endotelials HUVEC, HuMMEC, HuLEC i EA.hy926. El patró bidimensional de la RNasa 1 de pàncreas presenta grups de *spots* d'igual pI (8.55 ± 0.22) ja que la RNasa 1 de pàncreas no conté àcid siàlic i totes les formes (no glicosilada i amb diferent grau de glicosilació) són formes neutres. La RNasa 1 de medi condicionat de Capan-1 conté àcid siàlic en les seves formes glicosilades i per això s'observen diferents grups de *spots* de més baix pI (7.38; 7.68; 8.03; 8.28 i 8.39). Les mostres de RNasa 1 sèrica i RNasa 1 endotelial presenten la més alta heterogeneïtat de formes degut al gran contingut en àcid siàlic i es poden diferenciar 7 grups de *spots* focalitzats als pIs 7.22 ± 0.11 ; 7.49 ± 0.05 ; 7.71 ± 0.03 ; 7.97 ± 0.06 ; 8.20 ± 0.07 ; 8.36 ± 0.03 i 8.55 ± 0.18 . A totes les mostres també s'observen formes de diferent massa molecular, des de 16 kDa fins a 36 kDa aproximadament, que correspon al diferent nivell d'ocupació de les tres dianes de glicosilació. Tal com s'ha esmentat, aquesta variabilitat en massa molecular i pI pot atribuir-se al grau de glicosilació (Asn ocupades) i al grau de sialilació (nombre d'àcids siàlics) de la RNasa 1, respectivament.

Analitzant en detall els set grups d'*spots*, cal tenir en compte que les formes de diferent massa molecular són formes de RNasa 1 amb cap, una, dues o tres dianes de N-glicosilació ocupades i es poden separar en formes no glicosilades, de baixa glicosilació, mitjanament glicosilades i altament glicosilades. Les formes de major massa molecular, altament glicosilades, poden tenir les tres dianes de glicosilació ocupades amb estructures biantenàries mono- o di-sialidades (estructures majoritàries descrites per seqüenciació glucídica) i, per tant, poden tenir entre 3 i 6 àcids siàlics, essent les que contenen 4 o 5 àcids siàlics les formes majoritàries. De la mateixa manera, les formes mitjanament glicosilades tenen de forma majoritària 2, 3 i 4 àcids siàlics, i les formes de baixa glicosilació poden tenir 1 o 2 àcids siàlics (Figura 5.5).

Per tal de poder assignar a cada grup d'*spots* (a-g) el seu contingut en àcid siàlic, es va separar per cromatografia de fase reversa Vydac-C4 la RNasa 1 sèrica en tres fraccions que corresponien a fraccions amb les tres dianes ocupades (altament glicosilada, que correspon al grup d'*spots* a, b i c), dues dianes (mitjanament glicosilada, que corresponen al grup d'*spots* c, d i e) i una diana ocupada (baixa glicosilació, corresponent al grup d'*spots* e i f) (Figures 5.2 i 5.4). La RNasa 1 altament, mitjanament i

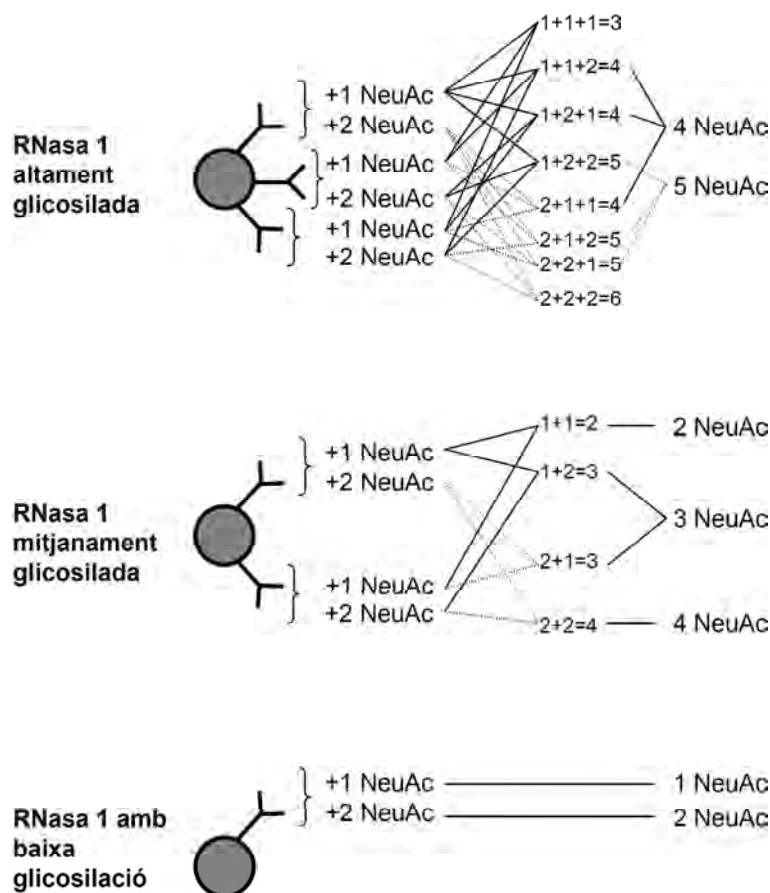


Figura 5.5: Proporcio teòrica del contingut d'àcid siàlic en la RNasa 1 amb tres, dos i una (de dalt a baix) dianes de N-glicosilació ocupades amb estructures biantenàries mono- o di-sialidades

de baixa glicosilació ha permès correlacionar cada grup de *spots* amb el seu contingut en àcid siàlic. Els *spots* de les diferents mostres assajades s'han pogut classificar en base a aquesta correlació i s'ha determinat que per la RNasa 1, una glicoproteïna amb tres dianes de N-glicosilació amb estructures complexes principalment biantenàries, la incorporació d'un àcid siàlic suposa una disminució del punt isoelèctric de 0.25 unitats de pH.

Aquesta correlació pot ser de molta utilitat en estudis de proteòmica generals. Entendre la influència de les modificacions post-traduccionals sobre el patró bidimensional pot ser de gran ajut per identificar alteracions en situacions patològiques o nous marcadors tumorals. Concretament, molts d'aquests nous marcadors tumorals s'han identificat per glicòmica. És el cas de varies proteïnes com el PSA en el càncer de pròstata (Tabarés et al., 2006), la alfa-fetoproteïna (Poon et al., 2002) o l'haptoglobina

(Ang et al., 2006) en el càncer hepatocel·lular, o la mateixa RNasa 1 en el càncer de pàncreas, que són proteïnes que tenen un patró de glicosilació alterat en situació tumoral, en molts casos amb diferent contingut d'àcid siàlic, el que comporta canvis en el pI de la proteïna. Per tant, l'aparició de nous *spots* i desaparició d'alguns altres en el patró bidimensional d'un teixit en situació tumoral no només es pot assignar a un canvi en l'expressió proteica del teixit, sinó també a una modificació post-traducciona de la proteïna que situa aquesta en un punt diferent del patró. El coneixement exhaustiu d'aquestes modificacions i el canvi que provoquen en la localització dels *spots* en el patró bidimensional poden ajudar en el futur a la interpretació dels mapes complexos que s'obtenen a partir d'un teixit, tipus cel·lular o fluid biològic

En aquest treball, l'ús de dues tècniques complementàries (la seqüenciació glucídica i l'electroforesi bidimensional) ha permès obtenir molta informació sobre l'origen de la RNasa 1 sèrica i el canvi de glicosilació d'aquesta en situació tumoral (increment de les estructures biantenàries amb Fc). Gràcies als resultats obtinguts s'han obert diverses noves línies a seguir que mereixen especial atenció i que estan enfocades, d'una banda, a determinar l'ús diagnòstic de la RNasa 1 com a marcador del càncer de pàncreas i, d'altra banda, a augmentar el nostre coneixement sobre els canvis que es produeixen en el microentorn del tumor i la seva influència en l'expressió de certes estructures glucídiques.

General discussion

Pancreatic adenocarcinoma is the tumor with one of the worst prognoses, since its incidence and mortality rates are very similar (García Sáenz, 1999). The incidence of pancreatic cancer in 2004 has been estimated at 58,700 cases in the European Union, 12th in the classification of cancer incidence rate. Mortality for the same year has been estimated at 61,000 cases, the 6th position for cancer mortality (Boyle and Ferlay, 2005). One of the reasons for this situation is that pancreatic adenocarcinoma symptomatology is not clear and can be easily misinterpreted, which makes its detection difficult. Because of this, pancreatic adenocarcinoma is diagnosed late, when it is already disseminated and the only possible treatment is palliative, maintaining the low values of pancreatic cancer survival rate (Saif, 2006). Improvement in the diagnostic system for pancreatic cancer is needed to apply treatment during the early stages of the disease and to make that treatment more efficient. This improvement, in turn, requires the identification of sensitive and specific tumor markers.

Ribonucleases have been under study for many years due to their biochemical features, biological activity and their possible therapeutic applications (Schein, 1997). The present work is focused on the study of human pancreatic ribonuclease (RNase 1). This is an enzyme of the RNase A superfamily (Sorrentino and Libonati, 1997), in which 13 human ribonucleases are currently included (Soochin et al., 2005). RNase 1 is produced mainly by the pancreas (Weickmann et al., 1981), the tissue in which it is also mainly expressed (Futami et al., 1997; Fernández-Salas et al., 2000). However, it is also present in other tissues and fluids such as serum, kidney, brain (Weickmann and Glitz, 1982) or urine (Kurokawa et al., 1983). RNase 1 is also secreted by the cells of the vascular endothelium of different blood vessels (veins, arteries and capillaries) as has been described recently (Moenner et al., 1997; Landré et al., 2002).

Many authors have thought of the RNase 1 as a tumor marker because of the increase in RNase 1 secretion by the pancreas in the pancreatic adenocarcinoma. Assuming the hypothesis of the pancreas as the main source of serum RNase 1, many authors during the 1970s proposed the levels of serum RNase 1 as a possible marker of pancreatic adenocarcinoma (Reddi and Holland, 1976; Maor and Mardiney, 1978). Subsequent studies revealed that neither serum RNase 1 levels nor serum RNase 1 activity are sensitive nor specific enough for this tumor marker (Weickmann et al., 1984; Kurihara et al., 1984). Actually, serum RNase 1 levels can be altered in several pathological conditions such as pancreatitis and renal insufficiency, and they also increase with age (Weickmann et al., 1984).

It is necessary to highlight the controversy of the origin of serum RNase 1. Previously mentioned studies are based on the presumption that serum RNase 1 is produced by the pancreas. The transport of some digestive enzymes from intestines through the blood system to be recycled in the pancreas, known as 'enteropancreatic circulation' (Rothman et al., 2002, has been reported 'in vitro' and 'in vivo' in rabbits. Pancreatic ribonuclease is eliminated from the circulation mainly in the kidneys due to its low molecular weight, as described by Baynes and Wold (1976) for bovine RNase A. Enteropancreatic circulation backs up the theory of the pancreas being the main source of serum RNase 1. On the contrary, there are studies demonstrating that RNase 1 can be detected in serum after a total pancreatectomy (Peterson, 1979), which suggests a serum RNase 1 origin other than a pancreatic one.

Glycan analysis of serum RNase 1 by glycan sequencing and two-dimensional electrophoresis

Glycosylation of membrane and secreted proteins is a reflection of the glycosylation machinery active in the endoplasmatic reticulum and Golgi apparatus in the cell, and it is not only organ-specific (Yamashita et al., 1986; Kobata, 2004; Fujihara et al., 2006) but it is also altered in pathological situations (Naitoh et al., 1999; Ørntoft and Vestergaard, 1999). Changes in the glycosylated pattern of glycoconjugates in cancer cells are one of the features of tumoral transformation. These changes in the cell surface glycoconjugates are also reflected in the secreted glycoproteins (Peracaula et al., 2003a) and correspond mainly to a branching and sialylation increase in N-

glycans in tumor situation (Dennis et al., 1999; Gorelik et al., 2001). Over-expression of Lewis structures in carcinoma is also a general feature; specifically, SLe^x and SLe^a antigens have been identified as tumor antigens (Ørntoft and Vestergaard, 1999; Dennis et al., 1999). Therefore, changes in glycosylation associated with tumor transformation can be of diagnostic usefulness as a tumor marker. Apart from being specific and sensitive, a tumor marker has to be detected in biological fluids of easy acquisition and, consequently, serum markers are more advantageous. Hence, serum glycoproteins are a good target for discovering new tumor markers.

Taking these precedents into account, the usefulness of human pancreatic ribonuclease (RNase 1) as a possible tumor marker for pancreatic adenocarcinoma has been studied in this work. RNase 1 has three N-glycosylation sites at Asn-34, Asn-76 and Asn-88. Since the alteration in the glycosylation pattern in tumor cells is an established fact and the glycosylation pattern is tissue-specific, this work studies if RNase 1 glycosylation is altered in tumor situation and if these modifications are useful for identifying the cancer. Previous studies have shown significant differences between the glycan structures of RNase 1 from healthy pancreas and RNase 1 from pancreatic adenocarcinoma cell lines (Peracaula et al., 2003a). RNase 1 of healthy origin has only neutral structures, heavily fucosylated like the Le^y antigen; while the structures present in the RNase 1 from pancreatic adenocarcinoma cell lines contain sialic acid and the sialylated antigens SLe^a and SLe^x. It is necessary to determine if these or other differences are detectable in serum RNase 1 from pancreatic adenocarcinoma patients in relation to healthy people.

In this work, the glycan structures of serum RNase 1 from healthy controls and pancreatic adenocarcinoma patients have been described in order to establish its diagnostic usefulness. With this purpose, serum RNase 1 from two healthy people and two pancreatic adenocarcinoma patients (stage III and IV) has been purified. RNase 1 purification is difficult due to the low concentration of RNase 1 in serum (about 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the serum of healthy controls, which can be increased in patients with pancreatic adenocarcinoma or other pathologies). For this reason, and considering the normal protein loss in a purification protocol, the purification starts with a high amount of serum (20 mL) from which RNase 1 is purified with three chromatographic steps. First of all, a Cibacon blue affinity chromatography is used to eliminate most of the albumin present in the serum. After that, a Heparin affinity chromatography is carried out

followed by Vydac C4 reverse phase chromatography. RNase 1 is eluted from this chromatography according to its polarity. Due to RNase 1 monosaccharide content, high glycosylated forms elute from the chromatography before the unglycosylated ones, and it is possible to separate the forms according to their degree of glycosylation (site occupancy), from the most glycosylated (with three N-glycosylation sites occupied) to the unglycosylated one. Then, it is possible to obtain pure RNase 1 separated according to its degree of glycosylation.

Pure RNase 1 has been treated with endoglycosidase F to obtain all the oligosaccharides chains, which have been sequenced using a combination of normal phase chromatography (by HPLC) and the combined digestion with specific exoglycosydases (Guile et al., 1996). Glycan chains have also been characterized by mass spectrometry.

Glycan sequencing of serum RNase 1 shows very similar structures between the samples analysed. Serum RNase 1 from both healthy controls and pancreatic adenocarcinoma patients presents mainly complex type biantennary structures, mono- or di-sialylated with or without fucose α 1-6 linked to the pentasaccharide core (Fc, fucose in the pentasaccharide core of N-glycans) (Figure 5.6). Although the glycan structures described are very similar among the samples, there is an increase of 40% in biantennary structures with Fc with respect to the same structures without Fc, in the RNase 1 from pancreatic adenocarcinoma patients.

The increase in structures with Fc with respect to structures without Fc found in serum RNase 1 in tumor situation is of great interest in order to distinguish between normal and tumor situation. Other studies also reveal an increase in Fc in glycoproteins in tumor situation, such as the glycoprotein GP76 in hepatocellular carcinoma (Block et al., 2005) or the haptoglobin in pancreatic cancer (Okuyama et al., 2006). In the near future, the levels of Fc in serum RNase 1 in the sera of a larger number of healthy controls and pancreatic adenocarcinoma patients will be analysed. The first step will be the elimination of the immunoglobulines (Wang et al., 2003) and, in the second, the methodology described by Block et al. (2005) will be used. This is based on a mixture of different lectins against the Fc structure and the determination of the proportion of RNase 1 bound to the lectins with respect to the one unbound. According to our previous results, the proportion should be higher for the RNase 1 from pancreatic adenocarcinoma patients' sera.

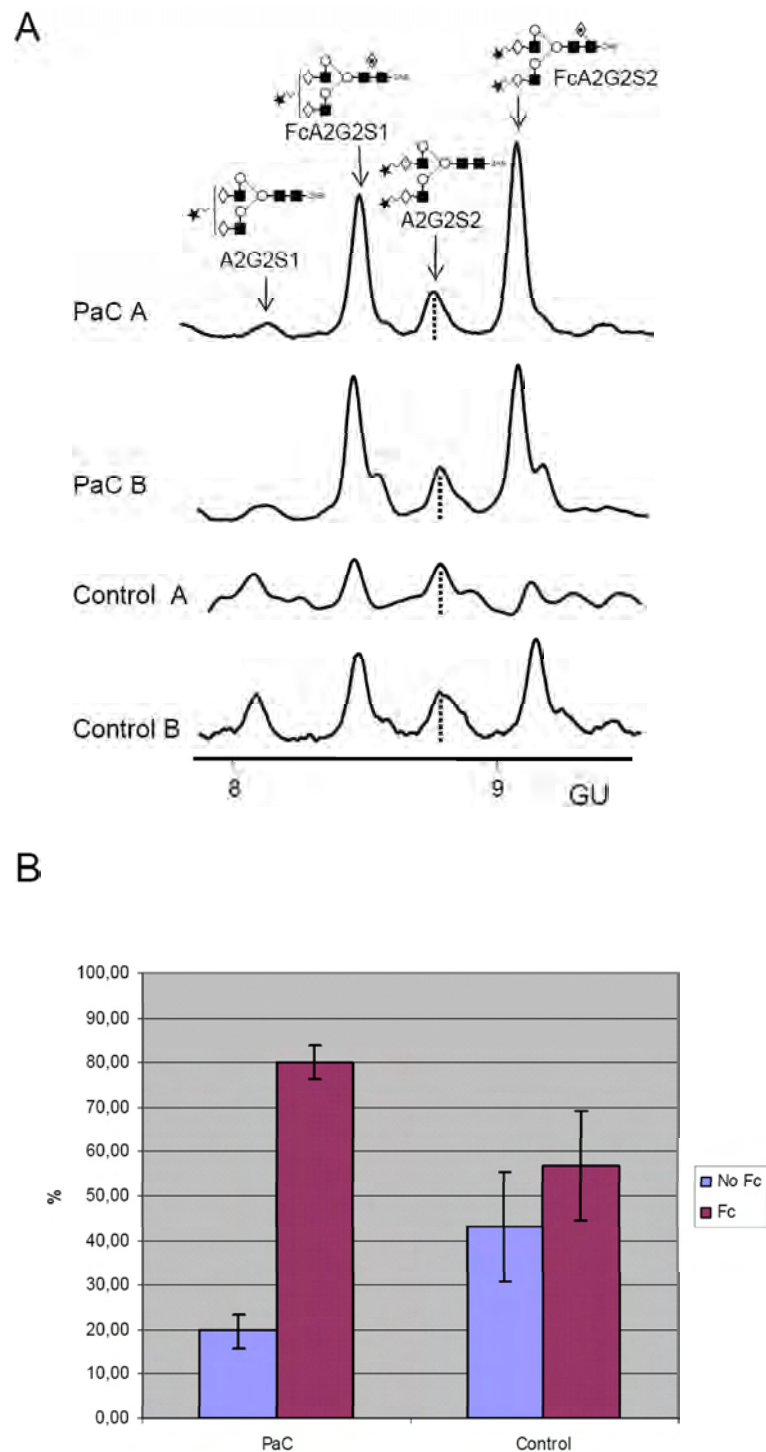
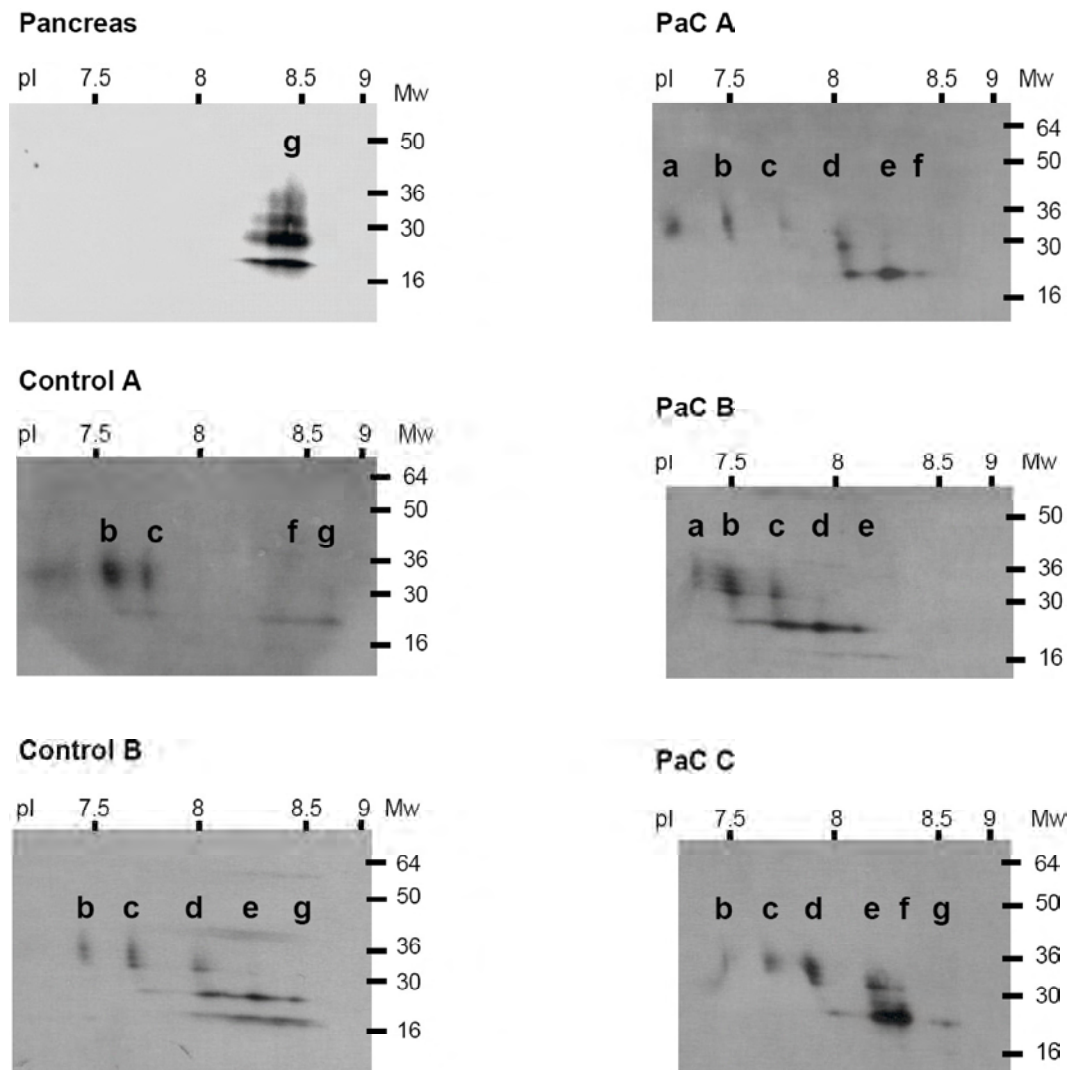


Figura 5.6: A. Results of glycan sequencing of serum RNase 1 from healthy donors (controls) and pancreatic adenocarcinoma patients (PaC), and the four main glycan structures described for the serum RNase 1. B. Proportion of biantennary structures with Fc (FcA2G2S1+FcA2G2S2) and without Fc (A2G2S1+A2G2S2) in serum RNase 1.

The same serum samples used to obtain the RNase 1 glycan structures have also been analysed by two-dimensional electrophoresis. Due to the differences in sialic acid content described for the RNase 1 from healthy pancreas and from pancreatic adenocarcinoma cell line conditioned media, two-dimensional electrophoresis has been used to determine the differences between the RNase 1 from healthy people and from pancreatic adenocarcinoma patients in relation to its sialic acid content. This negatively charged monosaccharide decreases the pI of the glycoprotein, which can be detected as a change in the spots distribution in the two-dimensional pattern of RNase 1. In this case, the partially purified serum RNase 1 of healthy people and pancreatic cancer patients is separated by isoelectrofocusing and SDS-PAGE, consecutively. RNase 1 is detected with polyclonal antibodies after the transfer of the proteins from the gel to a PVDF membrane. The spots pattern obtained in both cases, healthy people and patients, is clearly similar (Figure 5.7).

Serum RNase 1 presents heterogeneity of forms with different molecular weight (from 16 to 36 kDa approximately) and different isoelectric points (from pI 8.59 ± 0.14 to pI 7.26 ± 0.14). The forms with lower molecular weight correspond to those unglycosylated ones, while those with higher molecular weight have three N-glycosylated sites occupied. The forms with higher molecular weight are also the ones with the lowest pI due to the highest amount of sialic acid that their glycans can present. This pattern is completely different to the one observed for the healthy pancreas RNase 1, in which there is only molecular weight heterogeneity, due to the degree of glycosylation, but not in its pI, since all its glycan structures are neutral.

There is a high similarity in the two-dimensional patterns and the glycan structures described for the serum RNase 1 of healthy people and pancreatic adenocarcinoma patients, and there is also a clear difference with the two-dimensional pattern and glycan structures of healthy pancreas RNase 1. All this seems to indicate that serum RNase 1 does not come from the pancreas, but this hypothesis cannot be ruled out considering the enteropancreatic circulation and the change in the proportion of structures with Fc in the glycan structures of pancreatic cancer RNase 1.



	a	b	c	d	e	f	g
Pancreas							8,43
Control A		7,58	7,74			8,37	8,72
Control B		7,44	7,68	8,02	8,27		8,44
PaC A	7,20	7,47	7,75	8,04	8,26	8,40	
PaC B	7,32	7,49	7,71	7,93	8,11		
PaC C		7,48	7,7	7,9	8,21	8,33	8,60
pI	7,26	7,49	7,72	7,97	8,21	8,37	8,55
SD	0,08	0,05	0,03	0,07	0,07	0,04	0,14

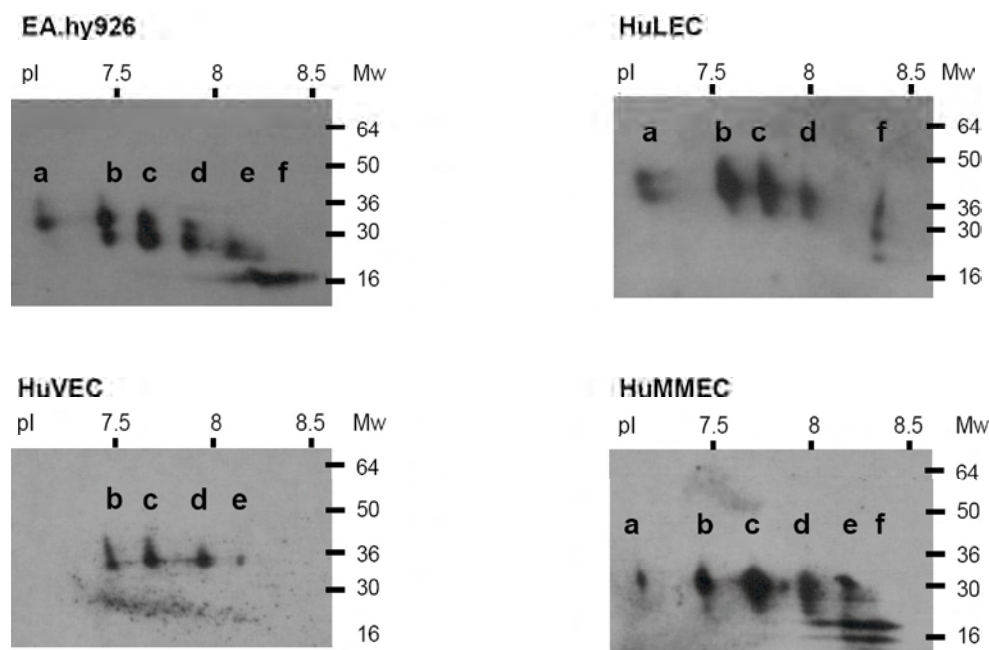
Figure 5.7: Two-dimensional electrophoresis of serum RNase 1 from healthy people (controls) and pancreatic adenocarcinoma patients (PaC). The spots detected in each two-dimensional pattern have been labelled and classified according to their pI, in seven different groups (a-g) and are summarised in the table. The median and the standard deviation are also shown.

Glycan analysis of RNase 1 from endothelial origin by glycan sequencing and two-dimensional electrophoresis

The origin of serum RNase 1 has been controversial. As has already been described, some studies question the pancreatic origin of serum RNase 1 since this is still present after a total pancreatectomy (Peterson, 1979). The results of the present study agree with this hypothesis. Landré et al. (2002) suggested that the endothelium could be the origin of serum RNase 1 after describing the secretion of RNase 1 by endothelial cells of different origins.

With the aim of evaluating if RNase 1 from endothelial origin can be a considerable source of serum RNase 1, the two-dimensional pattern of RNase 1 produced by endothelial cell lines of different blood vessels has been obtained. The cell lines used were HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), HuMMEC (Human Mammary Microvessels Endothelial Cells), HuLEC (Human Lung Endothelial Cells) and EA.hy926 (immortal hybrid obtained from the fusion of HUVEC cells and A549/8 carcinoma cells) (Edgell et al., 1983). The two-dimensional pattern of these cells (Figure 5.8) shows high pI heterogeneity (from pI 8.36 ± 0.03 to pI 7.13 ± 0.01) and a prevalence of forms of high molecular weight (from 30 to 36 kDa) (Pagès-Pons, 2006). In general, the pattern described for these cells is very similar among them and also very similar to the ones obtained for serum RNase 1 from both healthy people and pancreatic adenocarcinoma patients. Endothelial RNase 1 is highly glycosylated and sialylated, and could correspond to serum RNase 1.

In order to compare its glycan structures with the ones from serum RNase 1 obtained previously, the glycans of endothelial RNase 1 have been sequenced following the same procedure carried out for the serum RNase 1. Endothelial RNase 1 has been purified from the endothelial cell line EA.hy926, which has been chosen as a model of endothelial cells since all the lines studied show a very similar RNase 1 two-dimensional pattern. The purification of RNase 1 from the conditioned media of this endothelial cell line is easier. Once the cell culture is confluent, the cells can be cultured up to three days in media without FBS (foetal bovine serum) and cells do not stop producing RNase 1. The FBS contains RNase A which makes the complete purification of RNase 1 very difficult and it is of great advantage to be able to have these cells conditioned media free of RNase A from the FBS.



	a	b	c	d	e	f
Eahy	7,14	7,46	7,67	7,89	8,12	8,39
HUVEC		7,47	7,68	7,95	8,14	
HULEC	7,13	7,57	7,76	7,97		8,34
HUMMEC	7,12	7,45	7,72	7,98	8,2	8,35
pI	7,13	7,49	7,71	7,95	8,15	8,36
SD	0,01	0,06	0,04	0,04	0,04	0,03

Figure 5.8: Two-dimensional electrophoresis of RNase 1 from the conditioned media of different endothelial cell lines. The spots detected in each two-dimensional pattern have been labelled and classified according to their pI, in seven different groups (a-f) and are summarised in the table. The median and the standard deviation is also shown.

Glycan structures of RNase 1 of endothelial origin obtained by glycan sequence correspond mainly to complex biantennary structures, mono- or di-sialylated with or without Fc. These structures are the same described for serum RNase 1. In this case, the proportion of biantennary structures with Fc with respect to the same structures without Fc is the same as the proportion described for serum RNase 1 from healthy controls (Figure 5.9).

Considering the high similarity in the glycan structures of serum RNase 1 and endothelial RNase 1 and taking into account that glycosylation is organ-specific, it can

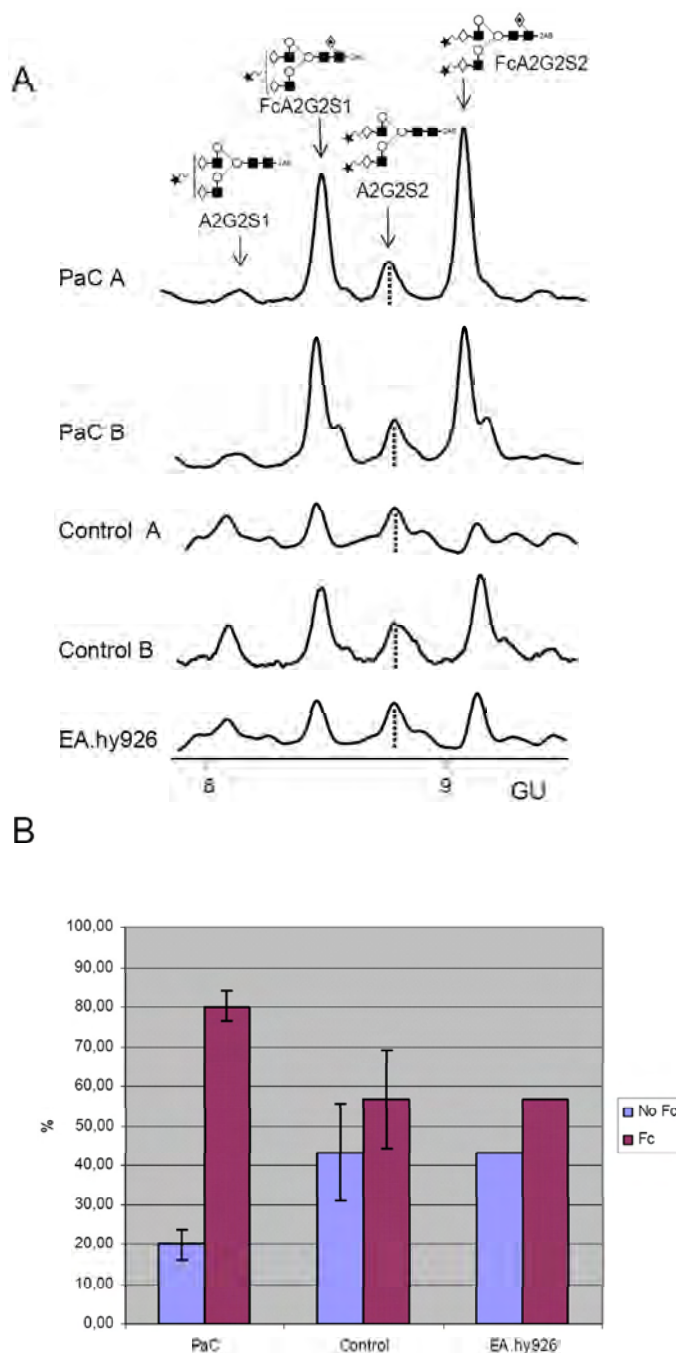


Figura 5.9: A. Results of glycan sequencing of RNase 1 from the conditioned media of EA.hy296 endothelial cell line compared to the serum RNase 1 from healthy people (controls) and pancreatic adenocarcinoma patients (PaC), and the four main glycan structures described for endothelial RNase 1 and serum RNase 1. B. Proportion of biantennary structures with Fc (FcA2G2S1+FcA2G2S2) and without Fc (A2G2S1+A2G2S2) in endothelial and serum RNase 1.

be concluded that serum RNase 1 comes mainly from the endothelium. Endothelial cells produce this enzyme and secrete it into the blood stream where it remains in circulation. The half life of this protein in the blood depends on its elimination by the kidneys and also on its capture by the liver. RNase 1 elimination seems to occur mainly in the kidneys due to its low molecular weight (Vasandani et al., 1996). It has been determined, injecting bovine pancreatic ribonuclease in mice, that the elimination in the kidneys increases significantly when the glycan structures of the protein are simple structures with terminal mannoses, and it is lower when the pI of the protein decreases by the effect of the sialic acid (Baynes and Wold, 1976). The presence of sialic acid also increases the blood half-life of glycoproteins, decreasing the elimination rate by the hepatic asialoglycoprotein receptors (ASGP-R) (Pricer and Ashwell, 1971), which depends on the presence of an external galactose that can bind the ASGP-R. Thus, the presence of terminal sialic acid avoids the recognition of the glycoprotein by the ASGP-R and allows its half life in blood to be lengthened.

Furthermore, it should be pointed out that the proportion of structures with Fc and structures without Fc in the endothelial RNase 1 coincides with the proportion found for serum RNase 1 of healthy controls. Also, serum RNase 1 with higher content of Fc structures is derived from a tumoral process. Therefore, the increase in structures with Fc in serum RNase 1 in tumor situation could be ascribed to several events taking place in the tumor cell, in the endothelial cell of the vascular tissue nearest to the tumor or both. A possible hypothesis could be the production of RNase 1 with an aberrant glycosylation pattern (more Fc) by the tumor that could reach the blood stream easily due to the pancreatic tissue disruption cause by the anomalous and unorganized cellular division. A change in the glycosylation machinery of the endothelial cells in the tumor environment caused by a factor secreted by the tumor cells should also be considered as an alternative hypothesis. In both hypotheses, the changes imply the modification of the glycosylation process taking place in the cell, and could be ascribed to the levels of enzymes in the Golgi apparatus (an increase of the activity of fucosyl-transferase 8 or FUT8) (Miyoshi et al., 1999), the substrate availability (Noda et al., 2003) and/or the alteration of Golgi cisterns trafficking (Kellokumpu et al., 2002).

Glycan structures of RNase 1 from pancreatic adenocarcinoma cell lines (Capan-1 and MDA-Panc3) do not coincide with the structures found in serum RNase 1 from pancreatic cancer patients. In the near future, the possibility of a factor secreted by

the tumor altering the glycosylation machinery of endothelial cells and causing the increase in structures with Fc will be studied. The possibility of the pancreatic tumor releasing a factor that can alter the glycosylation of another tissue has been previously proposed by Okuyama et al. (2006). This work shows an increase of Fc in haptoglobin in pancreatic cancer, although haptoglobin is produced mainly by the liver. Okuyama and collaborators propose the existence of a factor produced by the tumor that could modify the glycosylation machinery of hepatic cells. The hypothesis is tested 'in vitro' treating a hepatic cell line with conditioned media of pancreatic cancer cell lines. This strategy will be used in the future to determine if the pancreatic adenocarcinoma cells secrete a molecule that promotes changes in glycosylation in the endothelial cell line EA.hy926.

In summary, the results presented in this work show that the cells from the vascular endothelium produce RNase 1 that can easily arrive to the serum since the important surface of the blood vessel lining is in direct contact with blood. The similarity in the two-dimensional patterns and glycan structures of serum and endothelial RNase 1 indicates that endothelium is the main source of serum RNase 1, but it cannot be ruled out that some RNase 1 from the pancreas could also arrive to the blood stream. Actually, serum RNase 1 presents important changes in the proportion of some of its glycan structures in tumor situation. Specifically, the biantennary structures with Fc increased with respect to the same structures without Fc in the serum RNase 1 from pancreatic cancer patients. This change in proportion will be studied in the near future since it could be the key for the diagnostic usefulness of RNase 1 as a tumor marker for pancreatic cancer.

Determination of the effect of sialic acid in the pI of RNase 1 by two-dimensional electrophoresis

Two-dimensional electrophoresis is a technique that can provide information about the alterations in the molecular weight and pI of a protein caused by alterations in the protein processing, post-translational modification, such as the presence of monosaccharides (some of them charged), deamidations of Asn and Gln residues of the protein, (Robinson and Robinson, 2001; Sarioglu et al., 2000), phosphorylation (Ogata et al., 2006), etc. Although the technique does not allow the direct characterization of these

modifications, the same protein produced by different tissues or the same tissue in different pathological conditions could generate a completely different two-dimensional pattern, indicative of the post-translational modifications suffered by the protein.

The detailed knowledge of the glycan structures of RNase 1 from different origins obtained by glycan sequencing made possible the correlation between this information and the spots pattern obtained by two-dimensional electrophoresis of RNase 1 from different origins. This correspondence has been made according to the number of N-glycan sites occupied and, therefore, the increase in molecular weight; and according to the number of sialic acid monosaccharides present in the glycoforms (the presence of the negative charges) and the protein's pI decrease. The study is focused on this second point, assigning to every spot its sialic acid content and establishing the correspondence between the sialic acid content and the concomitant pI decrease.

The different RNase 1 assayed samples are from a healthy pancreas, the pancreatic adenocarcinoma cell line Capan-1, the serum of healthy controls and pancreatic cancer patients and, finally, the endothelial cell lines HUVEC, HuMMEC, HuLEC and EA.hy926. The two-dimensional pattern of RNase 1 from the pancreas presents a group of spots with the same pI (8.55 ± 0.22) since the RNase 1 from healthy pancreas does not contain sialic acid and all the forms (unglycosylated and with different degree of glycosylation) are neutral forms. RNase 1 from Capan-1 conditioned media contains sialic acid in its glycosylated forms and different groups of spots with lower pIs can be observed (7.38; 7.68; 8.03; 8.28 and 8.39). The serum RNase 1 and endothelial RNase 1 samples present the highest heterogeneity due to the high sialic acid content, and seven different groups can be identified at pIs 7.22 ± 0.11 ; 7.49 ± 0.05 ; 7.71 ± 0.03 ; 7.97 ± 0.06 ; 8.20 ± 0.07 ; 8.36 ± 0.03 and 8.55 ± 0.18 . All the samples present forms of different molecular weight, from 16 kDa to 36 kDa approximately, which correspond to different site occupancy of the three glycosylation sites. As has been commented, this variability in molecular weight and pI can be attributed to the glycosylation degree (N-glycosylated Asn) and the degree of sialylation (number of sialic acid residues) of the RNase 1, respectively.

When analysing in detail the seven groups of spots, it is important to notice that the forms with different molecular weight are RNase 1 forms with no, one, two or three occupied N-glycosylation sites and that they can be separated into unglycosylated, low

glycosylated, medium glycosylated and high glycosylated forms. The high molecular weight forms, highly glycosylated, can have the three N-glycosylation sites occupied with biantennary structures, mono- or di-sialylated (main structure described by glycan sequencing) and, thus, can contain from 3 to 6 sialic acids, the main forms having 4 and 5 sialic acids. Similarly, medium glycosylated forms contain mainly 2, 3 and 4 sialic acids, and the low glycosylated form can have only 1 or 2 sialic acids (Figure 5.10).

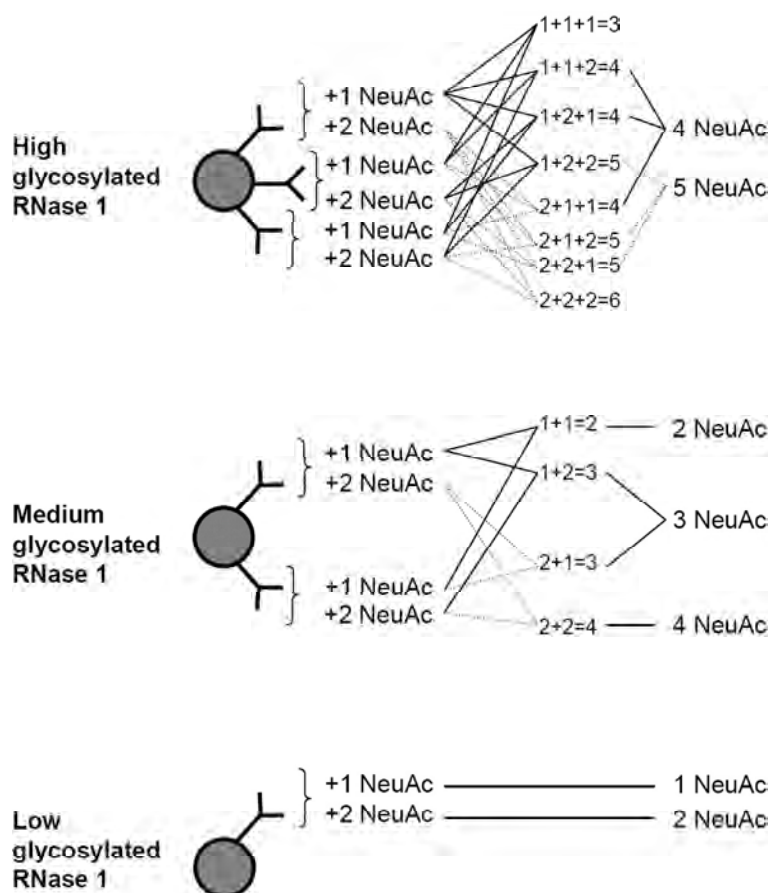


Figura 5.10: Theoretical proportion of sialic acid content in RNase 1 with three, two and one (from top to bottom) N-glycosylation sites occupied with biantennary structures, mono- and di-sialylated.

In order to assign each group of spots (a-g) to its sialic acid content, serum RNase 1 has been separated by a reverse phase chromatography into three fractions that correspond to fractions with the three N-glycosylation sites occupied (high glycosylated and the groups of spots a, b and c), two N-glycosylation sites occupied (medium glycosylated and the groups of spots c, d and e) and one N-glycosylation site occupied

(low glycosylated and the groups of spots e and f) (Figures 5.7 and 5.9). These high, medium and low glycosylated forms allowed the correlation of each group of spots with its sialic acid content. The spots of the different samples could be classified according to this correlation and it has been determined for RNase 1, a glycoprotein with three N-glycosylation sites with mainly complex biantennary structures, that the incorporation of one sialic acid causes a decrease in the isoelectric point of 0.25 pH units.

This correlation can be very useful for general proteomic studies. The understanding of the influence of post-translational modifications in the two-dimensional pattern can be of great help for identifying alterations in pathological situations or new tumor markers. Concretely, many of these new tumor markers have been identified using glycomic studies. That is the case of several proteins such as the PSA in prostate cancer (Tabarés et al., 2006), the alpha-fetoprotein (Poon et al., 2002) or haptoglobin (Ang et al., 2006) in hepatocellular cancer, and the RNase 1 in pancreatic cancer, all of which are proteins with altered glycosylation patterns in tumor situation, in most cases in their sialic acid content, which implies changes in the pI of the protein. Thus, the appearance of new spots and the disappearance of others in a two-dimensional pattern of a tissue in a tumor situation is not only useful for assigning changes in the protein expression of the tissue, but also for identifying post-translational modifications of the protein that correspond to that specific spot. Exhaustive acknowledgment of these modifications and the change that they provoke in the spot localization in the two-dimensional pattern can help in the future to interpret complex maps obtained from a tissue, cell type or biological fluid.

In this work, the use of two complementary techniques (glycan sequencing and two-dimensional electrophoresis) has permitted to obtain information about the origin of serum RNase 1 and the glycosylation changes of this protein in tumor situation (the increase of biantennary structures with Fc). Thanks to the obtained results, new research lines have been opened, deserving special attention and focused on the determination of the diagnostic usefulness of RNase 1 as a pancreatic cancer tumor marker, and the increase of our knowledge of the changes produced in the microenvironment of the tumor and its influence on the expression of certain glycan structures.

Capítol 6

Conclusions

1. S'ha modificat el protocol d'extracció de la ribonucleasa 1 descrit per Weickmann et al., 1981 incloent inhibidors de proteases (Leupeptina, PMSF, Aprotinina i EDTA) en diferents etapes de l'extracció, per evitar degradacions de la RNasa 1 provinent de pàncreas d'autòpsia de donants sans.
2. S'han estudiat diferents etapes cromatogràfiques per a la purificació de la RNasa 1 sèrica essent les millors condicions: Cromatografia d'afinitat a Cibacron Blue, seguida d'una cromatografia d'afinitat a Heparina (on es va modificar la composició i pH del tampó) i, finalment, cromatografia de fase reversa Vydac C4.
3. S'ha purificat la RNasa 1 sèrica d'individus sans i pacients amb adenocarcinoma pancreàtic, i se n'han caracteritzats els N-glicans. Les estructures glucídiques de les formes de RNasa 1 amb tres dianes de glicosilació ocupades, consisteixen en una combinació de les estructures de la RNasa 1 amb una diana de glicosilació ocupada (estructures principalment complexes biantenàries) i les estructures de la RNasa 1 amb dues dianes de glicosilació ocupades (estructures complexes de tipus tri- i tetra-antenàries, i extensions poli-*N*-lactosamines).
4. Les principals estructures glucídiques de la RNasa 1 sèrica, tant d'individus sans com de pacients amb adenocarcinoma pancreàtic, són estructures complexes biantenàries mono- o di-sialidades, amb presència o absència d'una fucosa unida α -1,6 al core pentasacàrid dels N-glicans (Fc). També s'han descrit estructures

tri- i tetraantennàries, poli-*N*-lactosamines i l'antígen glucídic Le^x , molt possiblement sialidat donant lloc al antígen SLe^x .

5. Tot i la similitud en les estructures glucídiques de la RNasa 1 sèrica d'individus sans i pacients amb adenocarcinoma pancreàtic, s'ha observat un increment del 40 % d'estructures biantennàries amb Fc respecte les estructures biantennàries sense Fc en la RNasa 1 sèrica de pacients amb càncer de pàncreas.
6. S'ha purificat la RNasa 1 de medi condicionat de la línia endotelial EA.hy926, i se n'han seqüenciat les seves estructures glucídiques. Les principals estructures trobades són complexes biantennàries, mono- o di-sialidades amb presència o absència de Fc, però també s'han descrit estructures triantennàries, poli-*N*-lactosamines i l'antígen glucídic Le^x que, com en el cas de la RNasa 1 sèrica, molt possiblement estigui sialidat donant lloc al antígen SLe^x . En aquest cas, la proporció d'estructures biantennàries amb Fc respecte les estructures biantennàries sense Fc és la mateixa que la proporció trobada en la RNasa 1 sèrica d'individus sans. Donada la similitud en les estructures glucídiques i que la glicosilació és òrgan-específica, la RNasa 1 sèrica sembla ser principalment d'origen endotelial.
7. La RNasa 1 de diversos orígens (pàncreas sa, medi condicionat de cèl·lules d'adenocarcinoma pancreàtic, sèrums d'individus sans i pacients amb adenocarcinoma pancreàtic, i medi condicionat de cèl·lules endotelials) ha estat avaluada per electroforesi bidimensional. La principal diferència entre la RNasa 1 d'aquests diferents orígens és el contingut en àcid siàlic, fet que es pot comprovar per electroforesi bidimensional. Els patrons bidimensionals obtinguts són sensiblement diferents entre ells i demostren la influència de la càrrega negativa de l'àcid siàlic en el pI de la glicoproteïna.
8. L'electroforesi bidimensional de la RNasa 1 de pàncreas sa mostra un conjunt d'*spots* de diferent massa molecular i d'igual pI. Les masses moleculars són aproximadament 16 kDa per la forma no glicosilada, 25 kDa per la forma de baixa glicosilació, 30 kDa per la forma mitjanament glicosilada i 36 kDa per la forma altament glicosilada. El punt isoelèctric correspon a 8.55 ± 0.22 , i és igual per totes les formes ja que la RNasa 1 de pàncreas sa no conté àcid siàlic en les seves estructures glucídiques.

9. La RNasa 1 de medi condicionat de la línia de càncer de pàncreas Capan-1, de les línies cel·lulars endotelials HUVEC, HuLEC, HuMMEC i EA.hy926, i de sèrum d'individus sans i pacients amb adenocarcinoma pancreàtic contenen àcid siàlic, com mostra el seu patró bidimensional. Per totes aquestes mostres, les formes de RNasa 1 de major pes molecular, tenen un pI més àcid degut al major contingut en àcid siàlic dels seus glicans. S'han pogut establir set grups de *spots*, més o menys majoritaris segons l'origen de la RNasa 1, de pI 7.18 ± 0.08 , 7.49 ± 0.05 , 7.72 ± 0.05 , 7.96 ± 0.05 , 8.20 ± 0.07 , 8.37 ± 0.03 i 8.56 ± 0.18 . La separació de la RNasa 1 sèrica d'un pacient amb adenocarcinoma pancreàtic en formes altament, mitjanament i de baixa glicosilació ha permès assignar a cadascun d'aquests grups de *spots* el seu contingut en àcid siàlic, des de 6 a 0 molècules d'àcid siàlic per molècula de RNasa 1 respectivament.
10. El pI de la RNasa 1 no glicosilada també s'ha determinat per electroforesi bidimensional, utilitzant la ribonucleasa 1 recombinant com a referència. La RNasa 1 recombinant presenta un pI de 9.12 ± 0.01 , molt similar al pI teòric de la RNasa 1 (8.98), però també conté altres formes de menor pI (8.40 ± 0.11 i 8.52 ± 0.13). Aquestes formes podrien correspondre a formes desamidades de la RNasa 1, concretament amb tres i quatre desamidacions. També s'han observat formes desamidades en la RNasa 1 no glicosilada purificada de sèrum d'un pacient amb adenocarcinoma pancreàtic. En aquest cas, en el patró bidimensional s'observen formes de pI 9.15, 8.94, 8.71 i 8.53; que podrien correspondre a la forma no glicosilada intacta (no desamidada) i formes amb una, dues o tres desamidacions respectivament.
11. S'ha establert una correlació entre la disminució del pI de la RNasa 1 i el seu contingut en àcid siàlic, que correspon a una disminució de 0.25 unitats de pH en el pI de la RNasa 1 per cada molècula d'àcid siàlic addicionada en estructures complexes biantenàries.

Conclusions

1. The protocol for ribonuclease extraction described by Weickmann et al., 1981 has been modified by adding protease inhibitors (Leupeptin, PMSF, Aprotinin and EDTA) in different extraction steps, in order to avoid the degradation of the RNase 1 from the autopsy pancreas from healthy donors.
2. Different chromatographic steps have been studied for the purification of serum RNase 1, and the best conditions were an affinity chromatography to Cibacron Blue, followed by an affinity chromatography to heparin (for which the composition and pH of the buffer was changed) and, finally, a reverse phase chromatography to Vydac C4.
3. Serum RNase 1 from healthy donors and pancreatic adenocarcinoma patients has been purified and its N-glycans characterized. The glycan structures of RNase 1 with three N-glycosylation sites occupied consist of a combination of the structures present in the RNase 1 with one N-glycosylation site occupied (mainly complex bi-antennary structures), and the structures present in the RNase 1 with two N-glycosylation sites occupied (tri- and tetra-antennary complex structures and poly-*N*-lactosamines extensions).
4. The main glycan structures in serum RNase 1, both from healthy donors and pancreatic adenocarcinoma patients, are complex bi-antennary structures, mono- or di-sialylated, with or without fucose linked α 1,6 to the pentasaccharide core of N-glycans (Fc). Tri- and tetra-antennary structures and poly-*N*-lactosamines have also been described as well as the glycan antigen Le^x, probably sialylated as a SLe^x antigen.

5. Although the glycan structures of serum RNase 1 from healthy donors and pancreatic adenocarcinoma patients are very similar, there was a 40% increase in biantennary structures with Fc with respect to biantennary structures without Fc in the RNase 1 from pancreatic cancer patients.
6. The RNase 1 from the conditioned media of the EA.hy926 endothelial cell line has been purified and its glycans have been sequenced. The main structures found are complex bi-antennary structures, mono- or di-sialylated, with or without Fc, but there are also tri-antennary structures, poly-*N*-lactosamines and the glycan antigen Le^x, which is probably sialylated as a SLe^x antigen, as in the case of the serum RNase 1. In this case, the proportion of bi-antennary structures with Fc to bi-antennary structures without Fc is the same found for serum RNase 1 from healthy donors. Due to this high degree of similarity in the glycan structures and the fact that the glycosylation is organ-specific, we can conclude that serum RNase 1 seems to be produced mainly by the endothelium.
7. The RNase 1 from different origins (healthy pancreas, conditioned media from an adenocarcinoma cell line, healthy donors' and pancreatic cancer patients' sera, and conditioned media from endothelial cell lines) has been evaluated by two-dimensional electrophoresis. The main difference in the RNase 1 from different origins is the sialic acid content, which can be corroborated by two-dimensional electrophoresis. The two-dimensional patterns obtained are noticeably different from each other and show the influence of the sialic acid negative charge on the pI of the glycoprotein.
8. The two-dimensional electrophoresis of RNase 1 from healthy pancreas shows a group of spots with different molecular weight but the same pI. The molecular weights are approximately 16 kDa for the unglycosylated form, 25 kDa for the low glycosylated form, 30 kDa for the medium glycosylated form and 36 kDa for the high glycosylated form. The pI is 8.55 ± 0.22 , and is the same for all forms since the RNase 1 from healthy pancreas does not contain sialic acid in its glycan structures.
9. The RNase 1 from the conditioned media of the pancreatic cancer cell line Capan-1, the endothelial cell lines HUVEC, HuLEC, HuMMEC and EA.hy926, and from healthy donors' and pancreatic cancer patients' sera contain sialic acid, as can

be seen in its two-dimensional pattern. For all these samples, the RNase 1 forms with the highest molecular weight have a higher acid pI due to the high content of sialic acid in their glycans. Seven different groups of spots could be established: pI 7.18 ± 0.08 , 7.49 ± 0.05 , 7.72 ± 0.05 , 7.96 ± 0.05 , 8.20 ± 0.07 , 8.37 ± 0.03 and 8.56 ± 0.18 . The separation of the serum RNase 1 from a pancreatic cancer patient in high, medium and low glycosylated forms allowed each group of spots to be assigned to its sialic acid content, from 6 to 0 molecules of sialic acid per RNase 1 molecule respectively.

10. The pI of the unglycosylated recombinant RNase 1 has also been determined by two-dimensional electrophoresis, using the recombinant RNase 1 as a reference. The recombinant RNase 1 presents a pI of 9.12 ± 0.01 , very similar to the theoretical pI of RNase 1 (8.98), but it also contains lower pI forms (8.40 ± 0.11 and 8.52 ± 0.13). These forms could correspond to deamidated forms of RNase 1, specifically with three and four deamidations. Deamidated forms have also been observed in the unglycosylated RNase 1 purified from a pancreatic cancer patient's serum. In this case, the two-dimensional pattern shows four forms at pI 9.15, 8.94, 8.71 and 8.53; which could correspond to the intact unglycosylated RNase 1 (non deamidated) and forms with one, two or three deamidations respectively.
11. A correlation has been established between RNase 1 pI decrease and its sialic acid content, which corresponds to a decrease of 0.25 pH units in the RNase 1 pI per sialic acid molecule added to its bi-antennary complex structures.

Bibliografia

- Abbas, A. and Lichtman, A. (2003). *Cellular and molecular immunology. Fifth Edition.* Saunders.
- Akagi, K., Murai, K., and Yamanaka, M. (1976). Purification and properties of alkaline ribonuclease from human serum. *Biochemical and biophysical Acta*, 442(3):368–378.
- Alaiya, A., Al-Mohanna, M., and Linder, S. (2005). Clinical cancer proteomics: Promises and pitfalls. *J. Proteome Res.*, 4:1213–1222.
- Ang, I., Poon, T., Lai, P., Chan, A., Ngai, S., Hui, A., Johnson, P., and Sung, J. (2006). Study of serum haptoglobin and its glycoforms in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a glycoproteomic approach. *J. Proteome Res.*, 5(10):2691–2700.
- Audisio, R., Veronesi, P., Maisonneuve, P., Chiappa, A., Andreoni, B., Bombardieri, E., and Garaghty, J. (1996). Clinical relevance of serological markers in the detection and follow-up of pancreatic adenocarcinoma. *Surg. Oncol.*, 5:49–63.
- Barrabés, S., Pagès-Pons, L., Radcliffe, C., Tabares, G., Fort, E., Royle, L., Harvey, D., Moenner, M., Dwek, R., Rudd, P., De Llorens, R., and Peracaula, R. (2007). Glycosylation of serum ribonuclease 1 indicates a major endothelial origin and reveals an increase in core fucosylation in pancreatic cancer. *Glycobiology.*, 17(4):388–400.
- Baynes, J. and Wold, F. (1976). Effect of glycosylation on the in vivo circulating half-life of ribonuclease. *J. Biol. Chem.*, 251(19):6016–6024.
- Beintema, J., Schüller, C., Irie, M., and Carsana, A. (1988). Molecular evolution of the ribonuclease superfamily. *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 51:165–192.
- Berge, P., Wilhelm, A., Schriewer, H., and Wust, G. (1982). Serum-sialyltransferase activity in cancer patients. *Klinische Wochenschrift.*, 60(9):445–449.

- Bigge, J., Patel, T., Bruce, J., Goulding, P., Charles, S., and Parekh, R. (1995). Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. *Anal. Biochem.*, 230(2):229–238.
- Block, T., Comunale, M., Lowman, M., Steel, L., Romano, P., Fimmel, C., Tennant, B., London, W., Evans, A., Blumberg, B., Dwek, R., Mattu, T., and Mehta, A. (2005). Use of targeted glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(3):779–784.
- Blum, H., Beier, H., and Gross, H. (1987). Improved silver staining of plant proteins, rna and dna in polyacrylamide gels. *Electrophoresis.*, 8(2):93–99.
- Boyle, P. and Ferlay, J. (2005). Cancer incidence and mortality in europe, 2004. *Annals of Oncology.*, 16:481–488.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method of quantitation of microgran quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248–254.
- Bravo, J., Fernández, E., Ribó, M., de Llorens, R., and Cuchillo, C. (1994). A versatile negative-staining ribonuclease zymogram. *Anal. Biochem.*, 219:82–86.
- Brockhausen, I., Schulzbach, J., and Kuhns, W. (1998). Glicoproteins and their relationship to human disease. *Acta Anat.*, 161:36–78.
- Cavestro, G., Comparato, G., Nouvenne, A., Sianesi, M., and Di Mario, F. (2003). The race from chronic pancreatitis to pancreatic cancer. *JOP*, 4(5):165–168.
- Chavan, M., Kawle, P., and Mehta, N. (2005). Increased sialylation and defucosylation of plasma proteins are early events in the acute phase response. *Glycobiology.*, 15(9):838–848.
- Comunale, M., Mattu, T., Lowman, M., Evans, A., London, W., Semmes, O., Ward, M., Drake, R., Romano, P., Steel, L., Block, T., and Mehta, A. (2004). Comparative proteomics analysis of de-n-glycosylated serum from hepatitis b carriers reveals polypeptides that correlate with disease status. *Proteomics*, 4:826–838.
- Corbishley, T., Greenway, B., Johnson, P., and Williams, R. (1982). Serum ribonuclease in the diagnosis of pancreatic carcinoma and in monitoring chemotherapy. *Clinica Chimica Acta*, 124:225–233.

- Dennis, J., Granovsky, M., and Warren, C. (1999). Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1473:21–34.
- Deutscher, M. (1993). Ribonuclease multiplicity, diversity and complexity. *J. Biol. Chem.*, 268:13011–13014.
- Drickamer, K. and Taylor, M. (2002). Glycan arrays for functional genomics. *Genome Biol.*, 3(12):Reviews1034.1–4.
- Edgell, C., McDonald, C., and Graham, J. (1983). Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80(12):3734–3737.
- Eissa, S. (1995). *Tumor Markers*. Chapman & Hall.
- Elrick, M., Walgren, J., Mitchell, M., and Thompson, D. (2006). Proteomics: Recent applications and new technologies. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 98:432–441.
- Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P., and Parkin, D. (2004). Globocan 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. iarc cancerbase no. 5, version 2.0.
- Fernández, E., Fallon, M., Frazier, M., de Llorens, R., and Cuchillo, C. (1994). Expression of acinar and ductal products in capan-1 cells growing in synthetic serum and serum-free media. *Cancer.*, 73:2285–2295.
- Fernández-Salas, E., Peracaula, R., Frazier, M., and de Llorens, R. (2000). Ribonucleases expressed by human pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Eur. J. Biochem.*, 267(5):1484–1494.
- Flatmarks, T. (1967). Multiple molecular forms of bovine heart cytochrome c. *J. Biol. Chem.*, 242(10):2454–2459.
- Fogh, J., Fog, J., and Orfeo, T. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, 59:221–226.
- Friess, H., Buchler, M., Auerbach, B., Weber, A., Malfertheiner, P., Hammer, K., Madry, N., Greiner, S., Bosslet, K., and Beger, H. (1993). Ca 494—a new tumor marker for the diagnosis of pancreatic cancer. *Int. J. Cancer.*, 53(5):759–763.

- Fujihara, J., Hieda, Y., Xue, Y., Nakagami, N., Takayama, K., Kataoka, K., and Takeshita, H. (2006). One-step purification of mammalian deoxyribonucleases i and differences among pancreas, parotid, and pancreas-parotid (mixed) types based on species- and organ-specific n-linked glycosylation. *Biochemistry (Mosc.)*, 1:S65–70.
- Fukuda, M. (1996). Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens. *Cancer Res.*, 56:2237–2244.
- Fuster, M. and Esko, J. (2005). The sweet and sour of cancer: Glycans as novel therapeutic targets. *Nature Reviews of Cancer*, 5:526–542.
- Futami, J., Tsushima, Y., Murato, Y., Tada, H., Sasaki, J., Seno, M., and Yamada, H. (1997). Tissue-specific expression of pancreatic-type rnaes and rnae inhibitors in humans. *DNA Cell Biol.*, 16:413–419.
- García Sáenz, J. (1999). Cáncer de páncreas. *Medicine.*, 7(116):5416–5423.
- Gassman, M., Thömmes, P., Weixer, T., and Hübscher, U. (1990). Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.*, 4:2528–2532.
- Geng, J. (2003). Interaction of vascular endothelial cells with leucocytes, platelets and cancer cells in inflammation, thrombosis and cancer growth and metastasis. *Acta Pharmacol. Sin.*, 24(12):1297–1300.
- Gianazza, E. (1995). Isoelectric focusing as a tool for the investigation of post-translational processing and chemical modifications of proteins. *J. Chromatogr. A*, 705:67–87.
- Gorelik, E., Galili, U., and Raz, A. (2001). On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, 20(3-4):245–277.
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., and Weiss, W. (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized ph gradients. *Electrophoresis.*, 21(6):1037–1053.
- Guile, G., Rudd, P., Wing, D., Prime, S., and Dwek, R. (1996). A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles. *Anal. Biochem.*, 240(2):210–226.

- Hakomori, S. (1985). Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Res.*, 45(6):2405–2414.
- Hakomori, S. (2006). Glycosylation defining cancer malignancy: New wine in an old bottle. *PNAS*, 99(16):10231–10233.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold spring Harbor Laboratory Pub. New York. EEUU.
- Harvey, D. (1993). Quantitative aspects of the matrix-assisted laser desorption mass spectrometry of complex oligosaccharides. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 7(7):614–619.
- Harvey, D. (2005). Fragmentation of negative ions from carbohydrates: Part 3, fragmentation of hybrid and complex n-linked glycans. *J Am Soc Mass Spectrom*, 16:647–659.
- Hayat, M., Howlader, N., Reichman, M., and Edwards, B. (2007). Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the surveillance, epidemiology, and end results (seer) program. *Oncologist*, 12:20–37.
- Hirabayashi, J., Arata, Y., and Kasai, K. (2001). Glycome project: Concept, strategy and preliminary application to caenorhabditis elegans. *Proteomics*, 1:295–303.
- Hitot, A., Yamashita, K., Niwata, Y., Irie, M., Kochibe, N., and Kobata, A. (1987). The carbohydrate moieties of human urinary ribonuclease UL. *J. Biochem. (Tokyo)*, 101(1):29–41.
- Houck, J. and Berman, L. (1958). Serum ribonuclease activity. *Journal of Applied Physiology.*, 12:473–476.
- Isaacs, P. (1981). Non-specificity of elevated serum ribonuclease as a pancreatic tumor marker. *Digestion*, 22:101–107.
- Ito, Y., Miyauchi, A., Yoshida, H., Uruno, T., Nakano, K., Takamura, Y., Miya, A., Kobayashi, K., Yokozawa, T., Matsuzuka, F., Taniguchi, N., Matsuura, N., Kuma, K., and Miyoshi, E. (2003). Expression of α 1,6-fucosyltransferase (fut8) in papillary carcinoma of the thyroid: its linkage to biological aggressiveness and anaplastic transformation. *Cancer Lett*, 200:167–172.

- Kaltner, H. and Stierstorfer, B. (1998). Animal lectins as cell adhesion molecules. *Acta Anat.*, 161:162–179.
- Kannagi, R., Izawa, M., Koike, T., Miyazaki, K., and Kimura, N. (2004). Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci.*, 95(5):377–384.
- Kellokumpu, S., Sormunen, R., and Kellokumpu, I. (2002). Abnormal glycosylation and altered golgi structure in colorectal cancer: dependence on intra-golgi ph. *FEBS Lett*, 561(1-3):217–224.
- Kemmer, T., Malfertheiner, P., Büchler, M., Kemmer, M., and Ditschuneit, H. (1991). Serum ribonuclease activity in the diagnosis of pancreatic disease. *Int. J. Pancreatol.*, 8:23–33.
- Kim, Y. and Varki, A. (1997). Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconj. J.*, 14:569–576.
- Klose, J. (1975). Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. a novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik.*, 26(3):231–243.
- Kobata, A. (2000). A journey to the world of glycobiology. *Glycoconj. J.*, 17(7-9):443–464.
- Kobata, A. (2004). The third chains of living organisms—a trail of glycobiology that started from the third floor of building 4 in nih. *Arch. Biochem. Biophys.*, 426(2):107–121.
- Kremser, L., Brückner, A., Heger, A., Grunert, T., Buchacher, A., Josic, D., Allmaier, G., and Rizzi, A. (2003). Characterization of antithrombin iii from human plasma by two-dimensional gel electrophoresis and capillary electrophoretic methods. *Electrophoresis*, 24:4282–4290.
- Küster, B., Wheeler, S., Hunter, A., Dwek R.A., and Harvey, D. (1997). Sequencing of n-linked oligosaccharides directly from protein gels: in-gel deglycosylation followed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and normal-phase high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 250:82–101.

- Kurihara, M., Ogawa, M., Ohta, T., Kurokawa, E., Kitahara, T., Matsuda, K., Kosaki, G., Watanabe, T., and Wada, H. (1984). Radioimmunoassay for human pancreatic ribonuclease and measurement of serum immunoreactive pancreatic ribonuclease in patients with malignant tumors. *Cancer Res.*, 44:2240–2243.
- Kurokawa, E., Ogawa, M., Kurihara, M., Ohta, T., Kitahara, T., Kosaki, G., Iwama, M., Ohgi, K., and Irie, M. (1983). Radioimmunoassays for two types of human urinary ribonucleases: Differential determination of ribonucleases in human serum. *Clin. Chim. Acta.*, 128:83–93.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage t4. *Nature.*, 227:680–685.
- Landré, J., Hewett, P., Olivot, J., Friedl, P., Ko, Y., Sachinidis, A., and Moenner, M. (2002). Human endothelial cells selectively express large amounts of pancreatic-type ribonuclease (rnase 1). *J. Cell. Biochem.*, 86(3):540–552.
- Lim, Y. (2005). Mining the tumor phosphoproteome for cancer markers. *Clin. Cancer Res.*, 11(9):3163–3169.
- Lüttges, J., Schlehe, B., Menke, M., Vogel, I., Henne-Bruns, D., and Klöppel, G. (1999). The k-ras mutation pattern in pancreatic ductal adenocarcinoma usually is identical to that in associated normal, hyperplastic and metaplastic ductal epithelium. *Cancer*, 85(8):1703–1710.
- Malette, B. and Bleau, G. (1993). Biochemical characterization of hamster oviductin as a sulphated zona pellucida-binding glycoprotein. *Biochem. J.*, 295:437–445.
- Maor, D. and Mardiney, M. J. (1978). Alteration of human serum ribonuclease activity in malignancy. *CRC. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 10(1):89–111.
- Mas, E., Pasqualini, E., Caillol, N., Battari, A., Crotte, C., Lombardo, D., and Sadoulet, M. (1998). Fucosyltransferase activities in human pancreatic tissue: comparative study between cancer tissues and established tumoral cell lines. *Glycobiology.*, 8(6):605–613.
- Migliarese, J. (1958). Serum ribonuclease in the cancer patient. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 2:327 (abstr.).

- Miyoshi, E., Noda, K., Yamaguchi, Y., Inoue, S., Ikeda, Y., Wang, W., Ko, J., Uozumi, N., Li, W., and Taniguchi, N. (1999). The α 1-6-fucosyltransferase gene and its biological significance. *Biochim Biophys Acta*, 1473:9–20.
- Moenner, M., Hatzi, E., and Badet, J. (1997). Secretion of ribonucleases by normal and immortalized cells grown in serum-free culture conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 33(7):553–561.
- Molina, R. and Filella, X. (2003). *Marcadores tumorales. Estado actual y perspectivas de futuro II*. Roche Diagnostics S.L.
- Naitoh, A., Aoyagi, Y., and Asakura, H. (1999). Highly enhanced fucosylation of serum glycoproteins in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 14(5):436–45.
- Nan, B., Shao, D., Chen, H., Huang, Y., Gu, J., Zhang, Y., and Wu, Z. (1998). Alteration of n-acetylglucosaminyltransferases in pancreatic carcinoma. *Glycoconj. J.*, 15:1033–1037.
- Navarro, S., Pérez-Mateo, M., and Guarner, L. (2002). *Tratado de páncreas exocrino*. J&C Ediciones Médicas S.L.
- Nelson, D. and Cox, M. (2000). *Lehninger principles of biochemistry. Third edition*. Woth Publishers.
- Ni, X., Bai, X., Mao, Y., Shao, Y., Wu, J., Shan, Y., Wang, C., Wang, J., Tian, Y., Liu, Q., Xu, D., and Zhao, P. (2005). The clinical value of serum cea, ca19-9, and ca242 in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *EJSO.*, 31:164–169.
- Noda, K., Miyoshi, E., Gu, J., Gao, C., Nakahara, S., Kitada, T., Honke, L., Suzuki, K., Yoshihara, H., Yoshikawa, K., Kawano, K., Tonetti, M., Kasahara, A., Hori, M., Hayashi, N., and Taniguchi, N. (2003). Relationship between elevated fx expression and increased production of gdp-l-fucose, a common donor substrate for fucosylation in human hepatocellular carcinoma and hepatoma cell lines. *Cancer Res*, 63(19):6282–6289.
- O'Farrell, P. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250:4007–4021.

- Ogata, Y., Hepplmann, C., Charlesworth, M., Madden, B., Miller, M., Kalli, K., Cilly, W., Bergen, R. I., Saggese, D., and Muddiman, D. (2006). Elevated levels of phosphorylated fibrinogen-alpha-isoforms and differential expression of other post-translationally modified proteins in the plasma of ovarian cancer patients. *J. Proteome Res.*, 5(12):3318–3325.
- Okuyama, N., Ide, Y., Nakano, M., Nakagawa, T., Yamanaka, K., Moriwaki, K., Murata, K., Ohigashi, H., Yokoyama, S., Eguchi, H., Ishikawa, O., Ito, T., Kato, M., Kasahara, A., Kawano, S., Gu, J., Taniguchi, N., and Miyoshi, E. (2006). Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: a detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation. *Int. J. Cancer.*, 118(11):2803–2808.
- Pagès-Pons, L. (2006). Glicosilació alterada en l'adenocarcinoma pancreàtic: sialil-transferases i ribonucleasa 1. Master's thesis, Bioquímica del càncer, Departament de Biologia, Universitat de Girona.
- Park, E., Mi, Y., Unverzagt, C., Gabius, H., and Baenziger, J. (2005). The asialoglycoprotein receptor clears glycoconjugates terminating with sialic acid alpha2,6galnac. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102(47):17125–17129.
- Patwa, T., J., Anderson, M., Simeone, D., and Lubman, D. (2006). Screening of glycosylation patterns in serum using natural glycoprotein microarrays and multi-lectin fluorescence detection. *Anal. Chem.*, 78:6411–6421.
- Pennington, K., McGregor, E., Beasley, C., Everall, I., Cotter, D., and Dunn, M. (2004). Optimization of the first dimensional for separation by two-dimensional gel electrophoresis of basic proteins from human brain tissue. *Proteomics*, 4:27–30.
- Peracaula, R., Cleary, K., Lorenzo, J., de Llorens, R., and Frazier, M. (2000). Human pancreatic ribonuclease 1: expression and distribution in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*, 89(6):1252–1258.
- Peracaula, R., Royle, L., Tabares, G., Mallorqui-Fernández, G., Barrabés, S., Harvey, D., Dwek, R., Rudd, P., and de Llorens, R. (2003a). Glycosylation of human pancreatic ribonuclease: differences between normal and tumor states. *Glycobiology*, 13(4):227–244.

- Peracaula, R., Tabarés, G., Royle, L., Harvey, D., Dwek, R., Rudd, P., and de Llorens, R. (2003b). Altered glycosylation pattern allows the distinction between prostate-specific antigen (PSA) from normal and tumor origins. *Glycobiology*, 13(6):457–70.
- Peterson, L. (1979). Serum RNase in the diagnosis of pancreatic carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76(6):2630–2634.
- Poon, T., Mok, T., Chan, A., Chan, C., Leong, V., Tsui, S., Leung, T., Wong, H., Ho, S., and Johnson, P. (2002). Quantification and utility of monosialylated alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma with nondiagnostic serum total alpha-fetoprotein. *Clin. Chem.*, 48(7):1021–1027.
- Pous, J., Mallorquí-Fernández, G., Peracaula, P., Terzyan, S., Futami, J., Tada, H., Yamada, H., Seno, M., de Llorens, R., Gomis-Rüth, F., and Coll, M. (2001). Three-dimensional structure of human RNase 1 delta N7 at 1.9 Å resolution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 57(Pt 4):498–505.
- Pricer, W. J. and Ashwell, G. (1971). The binding of desialylated glycoproteins by plasma membranes of rat liver. *J. Biol. Chem.*, 246(15):4825–4833.
- Radcliffe, C., Diedrich, G., Harvey, D., Dwek, R., Cresswell, P., and Rudd, P. (2002). Identification of specific glycoforms of major histocompatibility complex class I heavy chains suggests that class I peptide loading is an adaptation of the quality control pathway involving calreticulin and erp57. *JBC*, 277(48):46415–46423.
- Raggiaschi, R., Gotta, S., and Terstappen, G. (2005). Phosphoproteome analysis. *Biosci. Rep.*, 25(1-2):33–44.
- Reddi, K. and Holland, J. (1976). Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73:2308–2310.
- Ribó, M., Beintema, J., Osset, M., Fernández, E., Bravo, J., de Llorens, R., and Cuchillo, C. (1994). Heterogeneity in the glycosylation pattern of human pancreatic ribonuclease. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.*, 375:357–363.
- Righetti, P. (2006). Real and imaginary artefacts in proteome analysis via two-dimensional maps. *J. Chromatogr. B*, 841:14–22.

- Roberts, G., Dennis, E., Meadows, D., Cohen, J., and Jardetzky, O. (1969). The mechanism of action of ribonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 62:1151–1158.
- Robinson, N. and Robinson, A. (2001). Prediction of protein deamidation rates from primary and three-dimensional structure. *PNAS.*, 98(8):4367–4372.
- Robinson, N., Zabrouskov, V., Zhang, J., Lampi, K., and Robinson, A. (2006). Measurement of deamidation of intact proteins by isotopic envelope and mass defect with ion cyclotron resonance fourier transform mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20:3535–3541.
- Rosenberg, H. and Dyer, K. (1996). Molecular cloning and characterization of a novel human ribonuclease (rnase k6): Increasing diversity in the enlarging ribonuclease gene family. *Nucleic Acids Res.*, 24:3507–3513.
- Rothman, S., Liebow, C., and Isenman, L. (2002). Conservation of digestive enzymes. *Physiol. Rev.*, 82(1):1–18.
- Rudd, P., Colominas, C., Royle, L., Murphy, N., Hart, E., Merry, A., Hebestreit, H., and Dwek, R. (2001). A high-performance liquid chromatography based strategy for rapid, sensitive sequencing of n-linked oligosaccharide modifications to proteins in sodium dodecyl sulphate polyacrylamide electrophoresis gel bands. *Proteomics*, 1:285–294.
- Ruiz, N. (1997). Estudio de la ribonucleasa de saliva humana. Master's thesis, Universitat de Girona.
- Saif, M. (2006). Pancreatic cancer: Highlights from the 42nd annual meeting of the american society of clinal oncology. *JOP*, 7(4):337–348.
- Sarioglu, H., Lottspeich, F., Walk, T., Gunther, J., and Eckerskorn, C. (2000). Deamidation as a widespread phenomenon in two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis of human blood plasma proteins. *Electrophoresis*, 21:2209–2218.
- Schein, C. (1997). From housekeeper to microsurgeon: The diagnostic and therapeutic potential of ribonucleases. *Nat. Biotechnol.*, 15:529–536.
- Schlags, W., Lachmann, B., Walther, M., Kratzel, M., and Noe, C. (2002). Two-dimensional electrophoresis of recombinant human erythropoietin: a future method for the european pharmacopoeia? *Proteomics*, 2(6):679–682.

- Seno, M., Futami, J., Tsushima, Y., Akutagawa, K., Kosada, M., Tada, H., and Yamada, H. (1995). Molecular cloning and expression of human ribonuclease 4 cDNA. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1261:424–426.
- Singhal, A. and Hakomori, S. (1990). Molecular changes in carbohydrate antigens associated with cancer. *BioEssays.*, 12(5):223–230.
- Soochin, C., Beintema, J., and Zhang, J. (2005). The ribonuclease a superfamily of mammals and birds: identifying new members and tracing evolutionary histories. *Genomics*, 85:208–220.
- Sorrentino, S. and Libonati, M. (1997). Structure-function relationships in human ribonucleases: main distinctive features of the major rnase types. *FEBS Lett.*, 404:1–5.
- Sorrentino, S., Tucker, G., and Glitz, D. (1988). Purification and characterization of a ribonuclease from human liver. *J. Biol. Chem.*, 263(31):16125–16131.
- Tabarés, G., Jung, K., Reiche, J., Stephan, C., Lein, M., Peracaula, R., de Llorens, R., and Hösel, W. (2007). Free psa forms in prostatic tissue and sera of prostate cancer patients: Analysis by 2-de and western blotting of immunopurified samples. *Clin Biochem.*, 40(5-6):343–350.
- Tabarés, G., Radcliffe, C., Barrabés, S., Ramírez, M., Aleixandre, R., Hoesel, W., Dwek, R., Rudd, P., Peracaula, R., and de Llorens, R. (2006). Different glycan structures in prostate-specific antigen from prostate cancer sera in relation to seminal plasma PSA. *Glycobiology*, 16(2):132–145.
- Takamatsu, S., Fukuta, K., Asanagi, M., Abe, R., Yokomatsu, T., Fujibayashi, Y., and Makino, T. (2003). Monitoring biodistribution of glycoproteins with modified sugar chains. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1622:179–191.
- Takeuchi, M., Takasaki, S., Miyazaki, H., Kato, T., Hoshi, S., Kochibel, N., and Ko, A. (1988). Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, 263(8):3657–3663.

- Thomas, J., Crisp, M., and Hodes, M. (1984). Sialic acid residues contributes to the heterogeneity of human serum ribonuclease: demonstration by isoelectric focusing and neuraminidase treatment fo serum. *Clin. Chim. Acta.*, 142:73–81.
- Tournut, R., Allan, B., and White, T. (1978). Cancer, pancreatitis, and the detection of the isoenzymes of dnase, rnase and amylase. *Clin. Chim. Acta.*, 88:345–353.
- Uehara, H., Nakaizumi, A., Baba, M., Iishi, H., Tatsuda, M., Kitamura, T., Ohigashi, H., Ishikawa, O., Takenaka, A., and Ishiguro, S. (1996). Diagnosis of pancreatic cancer by k-ras point mutation and cytology of pancreatic juice. *Am. J. Gastroenterol.*, 91(8):1616–1621.
- Varki, A. (2007). Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature.*, 446:1023–1029.
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., and Marth, J. (1999). *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vasandani, V., Wu, Y., Mikulski, S., Youle, R., and Sung, C. (1996). Molecular determinants in the plasma clearance and tissue distribution of ribonucleases of the ribonuclease a superfamily. *Cancer Res.*, 56:4180–4186.
- Wang, Y., Cheng, P., and Chan, D. (2003). A simple affinity spin tube filter method for removing high-abundant common proteins or enriching low-abundant biomarkers for serum proteomic analysis. *Proteomics*, 3:243–248.
- Weickmann, J., Elson, M., and Glitz, D. (1981). Purification and characterization of human pancreatic ribonuclease. *Biochemistry.*, 20:1272–1278.
- Weickmann, J. and Glitz, D. (1982). Human ribonucleases: Quantitation of pancreatic-like enzymes in serum, urine and organ preparation. *J. Biol. Chem.*, 257:8705–8710.
- Weickmann, J., Olson, E., and Glitz, D. (1984). Immunological assay of pancreatic ribonuclease in serum as an indicator of pancreatic cancer. *Cancer Res.*, 44:1682–1687.
- Winstead, J. and Wold, F. (1965). The effect of high concentrations of salts on kinetic properties of pancreatic ribonuclease. *J. Biol. Chem.*, 249(9):3694–3696.

- Yamaguchi, K., Enjoji, M., Nakashima, M., Nakamuta, M., Watanabe, T., and Tanaka, M. (2005). Novel serum tumor marker, rca1, in pancreatic diseases. *World Journal of Gastroenterology.*, 11(33):5199–5202.
- Yamashita, K., Hitoi, A., Irie, M., and Kobata, A. (1986). Fractionation by lectin affinity chromatography indicates that the glycosylation of most ribonucleases in human viscera and body fluid is organ specific. *Arch. Biochem. Biophys.*, 250:263–266.
- Yanagisawa, A., Ohtake, K., Ohashi, K., Hori, M., Kitagawa, T., Sugano, H., and Kato, Y. (1993). Frequent c-kis-ras oncogene activation in mucous cell hyperplasia of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Res.*, 53(5):953–956.
- Yang, D., Chen, Q., Rosenberg, H., Rybak, S., Newton, D., Wang, Z., Fu, Q., Tchernev, V., Wang, M., Schweitzer, B., Kingsmore, S., Patel, D., Oppenheim, J., and Howard, O. (2004). Human ribonuclease a superfamily members, eosinophil-derived neurotoxin and pancreatic ribonuclease, induce dendritic cell maturation and activation. *Journal of immunology.*, 173:6134–6142.
- Yang, Z. and Hancock, W. (2005). Monitoring glycosylation pattern changes of glycoproteins using multi-lectin affinity chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1070:57–64.
- Yasuda, T., Mizuta, K., Sato, W., and Kishi, K. (1990). Purification and characterization of a ribonuclease from human spleen. immunological and enzymological comparison with nonsecretory ribonuclease from human urine. *Eur. J. Biochem.*, 191:523–529.
- Zhou, H., Liu, Y., Chui, J., Guo, K., Shun, Q., Lu, W., Jin, H., Wei, L., and Yang, P. (2006). Investigation on glycosylation patterns of proteins from human liver cancer cell lines based on the multiplexed proteomics technology. *Arch. Biochem. Biophys.*, page doi:10.1016/j.abb.2006.10.027.
- Zhou, H. and Strydom, D. (1993). The aminoacid sequence of human ribonuclease 4, a highly conserved ribonuclease that cleaves specifically on the 3' side of uridine. *Eur. J. Biochem.*, 217:401–410.

- Zittle, C. and Reading, E. (1945). Ribonucleinase i. manometric determination of ribonucleinase in blood and tissues of the rat and the rabbit. *J. Biol. Chem.*, 160:519–525.
- Ørntoft, T. and Vestergaard, E. (1999). Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Electrophoresis.*, 20:362–371.