



Universitat de Girona

CARACTERITZACIÓ DE DETERMINANTS ESTRUCTURALS DE PROPIETATS ESPECIALS DE LA RIBONUCLEASA PANCREÀTICA HUMANA

Pere TUBERT JUHÉ

Dipòsit legal: Gi. 1625-2013

<http://hdl.handle.net/10803/125442>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Girona
tesi doctoral

CARACTERITZACIÓ DE DETERMINANTS
ESTRUCTURALS DE PROPIETATS ESPECIALS
DE LA RIBONUCLEASA PANCREÀTICA HUMANA

Pere Tubert Juhé

2012



TUBERT JUHÉ



Universitat de Girona

tesi doctoral

CARACTERITZACIÓ DE DETERMINANTS ESTRUCTURALS DE PROPIETATS
ESPECIALS DE LA RIBONUCLEASA PANCREÀTICA HUMANA

Pere Tubert Juhé

2012

Programa de Doctorat en Ciències Experimentals i Sostenibilitat

Dirigida per la Dra Maria Vilanova i Brugués

Dirigida pel Dr Antoni Benito i Mundet

Memòria presentada per optar al títol de doctor per la Universitat de Girona

O, wonder!
How many goodly creatures are there here!
How beauteous mankind is!
O brave new world,
that has such people in't!
William Shakespeare
The Tempest

Però aquesta és una altra història, i ha de ser explicada en una altra ocasió.
Michael Ende
La història interminable

- Baldrick, què faries, si tinguessis molts diners?
- Em compraria un nap, senyor.
- Vull dir molts i molts diners, Baldrick.
- Oh, és que seria un nap molt gran, senyor.
AC Baldrick i Lord Blackadder
L'Escurçó Negre

AGRAÏMENTS	7
RESUM	9
SUMMARY	11
1 - INTRODUCCIÓ	13
1.1 - Ribonucleases.....	15
1.1.1 - Característiques Generals	15
1.1.2 - Classificació	15
1.1.3 - Funcions	15
1.1.4 - Funcions Especials	16
1.2 - Activitat Antitumoral.....	16
1.2.1 - RNases Citotòxiques	16
1.2.2 - Bases Moleculars de la Citotoxicitat	17
1.2.3 - Estratègies de Desenvolupament de Noves RNases Citotòxiques	19
1.2.4 - PE5	20
1.3 - Importació Nuclear.....	21
1.3.1 - Compartimentació Eucariota	21
1.3.2 - Seqüències de Localització Nuclear	21
1.3.3 - Importines	22
1.3.4 - Cicle d'Importació Nuclear	22
1.4 - Dimerització.....	23
1.4.1 - Intercanvi de Dominis	23
1.4.2 - Mutacions en el Pèptid Xarnera Poden Afavorir l'Intercanvi de Dominis	28
1.4.3 - Estats Patogènics Induïts per l'Agregació Proteica	30
OBJECTIUS	31
2 - MATERIAL I MÈTODES	35
2.1 - Material biològic.....	37
2.1.1 - Soques Bacterianes	37
2.1.2 - Vectors Procariotes	37
2.1.3 - Línies Cel·lulars Eucariotes	38
2.2 - Mètodes Microbiològics.....	38
2.2.1 - Medis de Cultiu	38
2.2.2 - Antibiòtics	39
2.2.3 - Cultius Líquids de Soques Bacterianes	39
2.2.4 - Manteniment de les Soques	40
2.3 - Cultiu de Cèl·lules Eucariotes.....	40
2.3.1 - Medis de Cultiu	40
2.3.2 - Expansió de Línies cel·lulars de creixement adherent	40
2.3.3 - Congelació i descongelació de les línies cel·lulars	41
2.3.4 - Recompte del nombre de cèl·lules	42
2.4 - Tècniques de DNA Recombinant.....	42
2.4.1 - Manipulació del DNA	42
2.4.2 - Obtenció de DNA Plasmídic	42
2.4.3 - Electroforesi de DNA en Gel d'Agarosa	43
2.4.4 - Purificació de Fragments de DNA a Partir de Gels d'Agarosa	43
2.4.5 - Precipitació del producte de PCR	43
2.4.6 - Estimació Espectrofotomètrica de la Concentració de DNA	43
2.4.7 - Utilització d'Enzims que Modifiquen el DNA	44
2.4.8 - Mutagènesi Dirigida per Oligonucleòtid	44
2.4.9 - Obtenció de Cèl·lules Competents d'E. coli	47

2.4.10 - Transformació de Cèl·lules Competents d'E. coli	47
2.4.11 - Seqüenciació de DNA	47
2.4.12 - Tècniques de treball amb RNA	49
2.5 - Mètodes d'Expressió i Purificació de Proteïnes Recombinants	51
2.5.1 - Expressió d'RNasa en E. coli BL21 (DE3)	51
2.5.2 - Expressió d' α -Importina en E. coli	51
2.5.3 - Purificació d'RNases Recombinants	52
2.5.4 - Obtenció de Dímers Covalents d'HP-RNasa	53
2.6 - Anàlisi i Caracterització Proteica	54
2.6.1 - Determinació de la Massa Molecular	54
2.6.2 - Determinació de la Quantitat de Proteïna	54
2.6.3 - Electroforesi Discontínua en Gel de Poliacrilamida	55
2.6.4 - Zimograma	56
2.6.5 - Anàlisi de la Interacció entre les RNases i l'Inhibidor	56
2.6.6 - Anàlisi de la Interacció entre les RNases i la Importina	57
2.6.7 - Anàlisi de l'Activitat Citotòxica Sobre Línies Cel·lulars Eucariotes	57
2.6.8 - Determinació de l'Estabilitat Tèrmica	58
2.6.9 - Càlcul de la Constant de Dissociació (Kd)	59
2.6.10 - Avaluació de l'Intercanvi de Dominis Mitjançant Divinilsulfona	59
2.7 - Espectroscòpia de Ressonància Magnètica Nuclear (NMR)	60
2.7.1 - Assignació de Variants de PM8E103C	60
2.7.2 - Experiments de Relaxació	60
2.7.3 - Intercanvi Protó - Deuteri	61
3 - RESULTATS I DISCUSSIÓ	63
3.1 - Importació Nuclear	65
3.1.1 - L'Importació Nuclear de PE5 és Crítica per a la Seva Citotoxicitat	65
3.1.2 - Estratègies per Dotar de Citotoxicitat l'HP-RNasa Mitjançant l'Addició d'una Seqüència NLS	69
3.1.3 - Noves Variants d'HP-RNasa	78
3.3 - Estudi dels Determinants que Indueixen la Dimerització de PM8	82
3.3.1 - Disseny de les Variants de PM8	84
3.3.2 - Construcció de les Variants de PM8	86
3.3.3 - Producció i Purificació de les Variants de PM8	86
3.3.4 - Caracterització del Plegament Global de les Variants	87
3.3.5 - Efectes Sobre l'Intercanvi de Dominis	92
DISCUSSIÓ GENERAL	95
CONCLUSIONS	103
BIBLIOGRAFIA	107

Això que sou a punt de llegir són els agraïments d'aquesta tesi.

En contra del que pot semblar inicialment els agraïments són la part més complicada d'escriure d'una tesi. No per la dificultat metodològica intrínseca, ni per l'extensa bibliografia necessària. Els agraïments són la part més difícil d'escriure d'una tesi perquè és l'única part que llegeix tothom qui la fulleja, de manera que es converteix en la secció on els errors o omissions són més susceptibles de ser trobats. Així doncs, em permetreu que abans de començar-los vagi a buscar una altra cervesa per no deixar-me ningú i perquè no m'importi ser tan malparlat com sóc de manera habitual.

Una vegada resolt, començarem per la part més òbvia. Això ha costat. Collons si ha costat. En part perquè les coses no sempre van com esperem o desitgem que vagin, en part perquè jo tampoc vaig sempre com espero o desitjo anar. I és que tot és sempre més senzill sobre el paper. Però sigui com sigui, d'una o altra manera, hem arribat al cap del camí, i ara tocaria recapitular una mica. Però anirem a buscar una altra cervesa, abans.

He de confessar que m'ha passat pel cap; no, he estat molt, molt temptat, d'utilitzar el comodí de "tots els que hi heu de ser ja ho sabeu, de manera que no cal que us llisti", però si sóc capaç d'utilitzar un punt i coma també he de poder fer uns agraïments. A veure com sortirà, això.

Vaig començar la carrera bastant convençut del què feia, tot i no ser massa conscient d'on em fotia. Una vegada emmerdat hi va haver unes quantes persones que m'ho van fer, i m'ho han fet, bastant més fàcil. Hi han contribuït en Marc (Yeste), en Paco, en Jose, en Miquel (Txex), el Nostralbert i la Glòria (Mas). Aquí poden semblar només un nom, però sense ells puc dir que no hauria acabat la llicenciatura de cap de les maneres.

En acabar la llicenciatura s'obre el primer forat negre. I ara què? Havent passat per les mans d'en Marc (Ribó), en Toni i la Maria la meua primera opció va ser fàcil, i vaig tenir la sort de convèncer-los també a ells. No sabien ben bé què feien. Però jo tampoc. Ho deixarem doncs en un empat.

Vaig tenir la sort de començar amb una generació enorme, sense els quals de ben segur ara no estaria escrivint això. L'Olaya, en Marçal, l'Olga, l'Alexandra i en Gela. Gràcies a vosaltres, això mai ha sigut simplement feina, sinó molt més. Han sigut tardes al sol, hores de despatx i passadís compartit i un munt de ciències i vivències comunes que arrossegare de molt bon grat per sempre.

Però n'hi han hagut i n'hi han anat venint més. Som-hi. El Becaripep, el primer i un dels principals responsables; en Gerard, que tot i que s'hi esforci perquè sigui el contrari acaba resultant completament imprescindible; la Jess, que a base d'ensucrament és capaç de fer l'impossible; en Roger (Vilà) i tot el que comporta; la Montse (Rodri) i tota la resta d'habitants del 107. L'Anna (Vert), en David (Soler), la Glòria (García), en Santi, la Vero i en Txus. Hi ha també tots els companys de despatx superpoblat. L'Àlex, en Marc (Llirós-Lairos), la Núria, la Vicky, en David (Díez), la Sònia, en Pau, en Roger (Verdaguer), la Mireia (Fillol), l'Ari, l'Arantxa. O d'ambient. Com la Marta (Pérez), la Montse (Ferrer), l'Eva o la Dolors.

Abans de continuar vull aclarir que a l'Anna (Plasencia) i la Mireia (López) (sé que esteu llegint això) no me les he deixat, sinó que volia reservar-les, a les dues juntes, un lloc especial. Ara mateix sento no poder oferir més que un paràgraf.

Però no tots els implicats són gironins o han passat per Girona, sinó que també hi ha hagut gent necessària a Madrid. Començant per en Douglas. No només un dels més enormes pous de coneixement (de coneixement de tot tipus) amb qui mai he tingut el plaer de compartir una conversa, sinó una de les millors persones amb qui mai m'he creuat. Continuant amb la Marta (Bruix) i la seva capacitat, gairebé maternal, d'acompanyar i guiar; bé sigui al costat d'un enorme aparell de ressonància, bé al costat d'un plat de bolets. També a tota la resta dels qui em van facilitar l'estada a *Spain*, molt especialment a l'Inés.

I deixant finalment de banda (del tot) la feina arriba el torn de la família, amb els pares, les germanes i l'avi, que no entenen pràcticament res del que explico però saben fer com si res.

O la Trini i en Joan, ja que sense ells no només no hauria arribat aquí sinó que seria algú totalment diferent.

O els amics. Com en Jordi, amb els webs, les pel·lícules, les cerveses, i que és sempre algú a qui recórrer i per qui ser-hi.

I les qui m'han suportat tot aquest temps. La Glòria. La Rosalia. La Judith. L'Ariadna. L'Eva. La Mariona. En major o menor mesura, d'una manera o altra, totes heu contribuït, contribuïu i contribuïreu al què sóc, de manera que també sou responsables d'això que teniu a les mans. Gràcies.

Gràcies a tothom.

I ara, amb el vostre permís, demano una altra cervesa i porto això a imprimir. Que ja toca.

(Ei, he aconseguit no dir polla cap cop!)

A vegades em pregunto com de gran seria el nap que em donarien a canvi de vosaltres.

RESUM

Les ribonucleases (RNases) són potencials agents anticancerosos. Hi ha diferents camins per aconseguir que una RNasa adquireixi propietats antitumorals. Entre les diferents possibilitats, la direccionalització de l'enzim al nucli de la cèl·lula és una opció potencial atès que aquest orgànel no té inhibidor de ribonucleases (RI), present en el citosol de les cèl·lules de mamífer. PE5 és una variant de la ribonucleasa pancreàtica humana (HP-RNasa) que malgrat no escapar a l'acció de l'RI és citotòxica perquè conté una seqüència de localització nuclear (NLS) conformacional. En aquest treball es demostra que aquesta seqüència permet la interacció de PE5 amb la importina- α gràcies a diferents residus bàsics que malgrat trobar-se allunyats en la seqüència es troben propers en l'estructura tridimensional. La seva disposició topològica s'assembla molt a un NLS bipartit. A diferència de l'onconasa, una ribonucleasa citotòxica que degrada RNA citoplasmàtic, PE5 degrada de forma específica RNA nuclear deixant el citoplasmàtic sencer. A més, la substitució de residus crítics de la seqüència NLS provoca una disminució de la citotoxicitat de les variants generades. En base a aquests fets es pot concloure que la presència d'un NLS és necessària per a la citotoxicitat de PE5. S'han produït noves variants de l'HP-RNasa que porten una seqüència NLS forta addicional amb la finalitat de comprovar si la direccionalització a nucli és una bona estratègia per dotar de citotoxicitat una ribonucleasa. Així, la seqüència de l'NLS de l'antigen T llarg d'SV40 es va introduir a diferents regions de l'enzim. Quan l'NLS es va afegir a l'extrem N-terminal de l'HP-RNasa no va ser funcional, en canvi la seva inserció en un llaç exposat, implicat en la interacció amb l'RI, va donar lloc a una variant que presentà unió específica a la importina- α . No obstant, en cap cas l'addició de l'NLS va permetre l'adquisició d'activitat citotòxica. Per tant, modificar l'HP-RNasa per addició o inserció d'una seqüència NLS no és una condició suficient per dotar l'enzim d'activitat citotòxica. Cal considerar altres factors, entre els quals probablement que la posició de l'NLS sigui crítica.

Una estratègia alternativa per dotar una RNasa d'activitat citotòxica consisteix en convertir-la en una RNasa que escapi a l'RI per adquisició d'estructura quaternària. La dimerització impedeix la unió a l'RI per impediments estèrics. Es va obtenir en solució una variant de l'HP-RNasa, anomenada PM8, la qual forma un dímer per intercanvi de dominis (3D-swapping). Aquesta variant dimeritza a través d'un mecanisme que té lloc en dues etapes. En primer lloc es genera una interfície oberta que acosta els monòmers i, en segon lloc, es produeix el bescanvi de dominis. Per comprovar aquest model es van obtenir variants de PM8 en les quals es van eliminar cadenes laterals de residus que estaven implicats en la flexibilitat del pèptid xarnera o en la formació de la interfície oberta. Es va determinar el canvi en el flexibilitat dels pèptids xarnera resultants, així com l'efecte dels canvis en la capacitat de les variants per dimeritzar i intercanviar els dominis.

La variant dissenyada per desestabilitzar el pèptid xarnera en el dímer, PM8_3A, va impedir la formació del dímer en dissolució i es va obtenir una reducció de la proporció de subunitats bescanviades en relació a PM8. Aquests efectes no poden ser deguts a canvis en l'estabilitat tèrmica de la variant ni al seu comportament dinàmic atès que aquestes propietats no són diferents de les presentades per les altres variants analitzades. La variant en la qual es va eliminar la interacció electrostàtica entre el glutàmic 103 i l'arginina 104 va veure reduïda la seva dimerització en un 50% respecte a la forma parental. Aquest resultat indica que aquesta interacció, implicada en la formació de la interfície oberta, no és necessària pel procés de dimerització, però probablement actua estabilitzant el dímer un cop s'ha produït el bescanvi de dominis. La variant PM8_H80S, que es va dissenyar per estabilitzar el pèptid xarnera en el monòmer; no va produir cap canvi en la propensió de bescanvi de dominis; no obstant, la tendència a la dimerització es va incrementar 10 vegades, probablement degut a una estabilització de la interfície oberta. Finalment, altres variants es van dissenyar per estudiar el paper de la interacció entre el pèptid xarnera i el cos de la proteïna en el procés de dimerització. Les posicions més crítiques en aquest procés són la tirosina 25 i la glutamina 101 d'una subunitat, que interaccionen amb la prolina 19 de l'altra subunitat promovent un canvi en la conformació del pèptid xarnera que afavoreix el bescanvi de dominis. En conseqüència, l'estabilització del pèptid xarnera en el dímer facilita el bescanvi de dominis i és un factor clau en el procés de dimerització.

SUMMARY

Ribonucleases (RNases) are promising candidates for use in anticancer therapy. There are different ways to endow an RNase with antitumor properties. Among them, targeting the enzyme to the cell nucleus is a potential approach because this organelle lacks the ribonuclease inhibitor (RI) present in the cytosol of mammalian cells. PE5 is a variant of human pancreatic ribonuclease (HP-RNase) that although it does not evade the action of RI is cytotoxic because it contains a conformational nuclear localization signal (NLS). In this work it has been shown that this sequence allows its interaction with α -importin through several basic residues which, despite being distant in the primary sequence, are close in the three-dimensional structure. Their topological disposition strongly resembles that of a classical bipartite nuclear localization signal. Unlike onconase, a cytotoxic RNase that cleaves cytoplasmatic RNA, PE5 specifically degrades nuclear RNA leaving the cytoplasmatic RNA undamaged. In addition, substitution of PE5 critical NLS residues results in a decrease of the cytotoxicity of the resulting variants. On this basis it is possible to conclude that the presence of the NLS is necessary for PE5 cytotoxicity. New HP-RNase variants carrying an additional strong and well characterized NLS have been produced in order to check whether the nuclear targeting is a good strategy to endow an RNase with cytotoxic activity. The NLS sequence of the T large antigen of SV40 was introduced at different regions of the enzyme. The NLS added at the N-terminal end of the HP-RNase was not functional, whereas its insertion in an exposed loop involved in the interaction with the RI resulted in a specific union to α -importin. Nevertheless, in any case the addition of the NLS led to the acquisition of cytotoxic activity. Thus, engineering HP-RNase by addition / insertion of an NLS is not enough to provide it with cytotoxic activity. Other factors should be taken into account. Among them, the location of the NLS may be critical.

An alternative strategy to endow an RNase with cytotoxic activity is to convert it to an RI-evading enzyme through its dimerization. Dimerization precludes the binding of the inhibitor by steric hindrance. An HP-RNase variant, called PM8, which forms a dimer through domain swapping, was previously produced in solution. This variant dimerized through a mechanism of domain swapping that takes place in two steps. First, creation of an open interface and second the swapping of the interchangeable domains. To prove this model several variants of PM8 were produced in which the side chains of residues, either involved in the flexibility of the hinge peptide or in the formation of the open interface, were removed. The variation of flexibility of the resulting hinge peptides and the effect of these changes on the ability of the variants to swap domains and to dimerize was determined.

The variant designed to destabilize the hinge peptide of the PM8 dimer, PM8_3A, prevented the dimer formation in solution, and reduced the proportion of domain swapped subunits relative to PM8. These effects can not be due to changes either in their thermal stability or in their dynamic behavior, since these properties do not differ significantly from those presented by the other variants studied. For the variant in which the electrostatic interactions between the glutamic acid 103 and the arginine 104 were removed, the dimerization decreased to 50% of that of the parental form. This result indicates that this interaction, involved in the open interface, is not required for the dimerization process, but likely it acts stabilizing the dimer once the domain swapping has taken place. The variant PM8_H80S, designed to stabilize the hinge peptide in the monomer did not produce any change in the domain swapping propensity, but the tendency to dimerization was increased tenfold, probably due to a stabilization of the open interface. Finally, some variants were designed to study the role of the interaction between the hinge peptide and the protein body in the dimerization process of PM8. The most critical residues in this process were tyrosine 25 and glutamine 101 from one subunit, which interact with proline 19 of the other subunit promoting a change in the conformation of the hinge peptide that favors the domain swapping. Therefore, the stabilization of the hinge peptide in the dimer facilitates the domain swapping and is a key factor in the dimerization process.



INTRODUCCIÓ I.



1.1 - RIBONUCLEASES

1.1.1 - Característiques Generals

Les ribonucleases (RNases) constitueixen un grup d'enzims present en tots els éssers vius que de manera general catalitzen el trencament dels enllaços fosfodiéster de l'àcid ribonucleic (RNA). Tant des del punt de vista estructural com funcional és un grup heterogeni. Dins d'aquest grup d'enzims n'hi ha que participen en processos degradatius bàsics tals com la renovació de l'RNA cel·lular o la digestió de l'RNA incorporat a través de la dieta. A més, però, moltes d'aquestes RNases poden veure's implicades en diverses funcions biològiques especials incloent la maduració cel·lular, l'al·lèrgenicitat del pol·len o la vascularització, entre d'altres (Schein 1997).

1.1.2 - Classificació

Les RNases de vertebrats es poden classificar en dos grans grups, les de tipus pancreàtic i les de tipus no pancreàtic (Sorrentino and Libonati 1997), segons l'homologia de seqüència, estructura i propietats catalítiques que presenten amb la ribonucleasa pancreàtica bovina (RNasa A) (**fig 1.1**), amb independència del teixit o fluid on es trobin. Tot i això, es poden utilitzar diferents criteris per tal d'establir agrupacions, segons el mecanisme de catàlisi sobre el substrat, segons la seva especificitat o segons el seu lloc d'acció.



fig 1.1 Model esquemàtic de boles on es representa l'estructura de l'RNasa A.

Segons el tipus de catàlisi es diferencien les exonucleases, que alliberen mononucleòtids a partir d'un extrem 5' o 3' lliure de la cadena d'RNA, de les endonucleases, que hidrolitzen enllaços fosfodiéster interns a la cadena d'RNA, generant oligonucleòtids.

Segons l'especificitat pel substrat es distingeixen les RNases inespecífiques, que catalitzen la degradació de tot tipus de molècules d'RNA (com ara la nucleasa estafilococal), de les RNases específiques de base, que hidrolitzen les cadenes d'RNA per l'extrem 3' de residus de pirimidina (com ara la RNasa A), i de les ribonucleases específiques de característiques concretes de seqüència o d'estructura, implicades en processos de maduració de l'RNA (RNasa III).

Segons el lloc on duen a terme la seva acció, parlem de RNases extracel·lulars si actuen fora de la cèl·lula que les ha sintetitzat, o de RNases intracel·lulars si actuen al seu interior. Les RNases extracel·lulars solen ser inespecífiques i de massa molecular baixa, mentre que les intracel·lulars, implicades en el metabolisme de l'RNA cel·lular, tenen una elevada especificitat i són estructuralment complexes.

1.1.3 - Funcions

Les RNases tenen un paper clau en el metabolisme i la maduració de l'RNA, sent presents en tots els organismes (Deutscher 1993). En la majoria de les RNases extracel·lulars es desconeix la seva funció específica. En el cas de la RNasa A s'accepta que intervé en processos digestius, a conseqüència de la gran quantitat d'RNA d'origen microbià que s'ha de degradar a l'intestí dels herbívors remugants (Barnard 1969). Molts éssers vius secreten RNases per tal de digerir l'RNA de l'entorn de manera que pugui ser absorbit i assimilat per les cèl·lules.

Les RNases intracel·lulars participen en la maduració, processament i recanvi dels diversos tipus d'RNA cel·lular, tant en eucariotes com en procariotes. El fet que facin la seva acció a l'interior de la cèl·lula, i que el metabolisme de l'RNA sigui essencial per a l'expressió gènica, fan que calgui una regulació acurada de la seva activitat (Deutscher 1988).

1.1.4 - Funcions Especials

Diversos membres de la família de les RNases pancreàtiques presenten accions biològiques especials, més enllà dels processos digestius i degradatius bàsics. D'entre aquestes funcions resulta d'especial interès la citotoxicitat, ja que dóna a les RNases un important potencial com agents terapèutics, en particular com agents antitumorals.

S'han descrit RNases amb activitat antibacteriana, antivírica, neurotòxica, helmintotòxica, espermatogènica, immunosupressora, embriotòxica o citostàtica (Sorrentino and Libonati 1997; Matousek 2001; Harder and Schroder 2002; Ardel et al. 2007). Hi ha també RNases amb un paper important en el creixement i desenvolupament eucariotes (Benner and Allemann 1989), com seria el cas de l'efecte vascularitzant de l'angiogenina (Fett et al. 1985), o que s'impliquen en la fertilització vegetal (Sijacic et al. 2004). Altres RNases estan implicades en processos de replicació i transcripció, en la maduració postranscripcional de l'RNA, en la prevenció de l'autopol·linització en plantes o en els mecanismes de defensa en front de virus o microorganismes (Schein 1997).

1.2 - ACTIVITAT ANTITUMORAL

1.2.1 - RNases Citotòxiques

Diversos membres de la superfamília de les RNases pancreàtiques presenten activitats especials, d'entre les quals ens interessa l'activitat antitumoral (**fig1.2**). Aquesta família inclou RNases pirimidina específiques de mamífers, ocells, rèptils i amfibis amb una seqüència i estructura homòlogues a la de la RNasa A (Beintema and Kleineidam 1998). L'activitat citotòxica ve determinada, de manera general, per la capacitat de degradació dels RNA cel·lulars, amb la conseqüent inhibició de la síntesi proteica i la mort de la cèl·lula. L'estudi d'aquestes RNases amb citotoxicitat natural ha permès el desenvolupament de noves RNases dissenyades per tenir una acció citotòxica amb interès clínic, com a substitut o complement dels agents quimioterapèutics d'ús estàndard pel tractament del càncer. A continuació, es presenten breument les diferents ribonucleases amb activitat antitumoral.

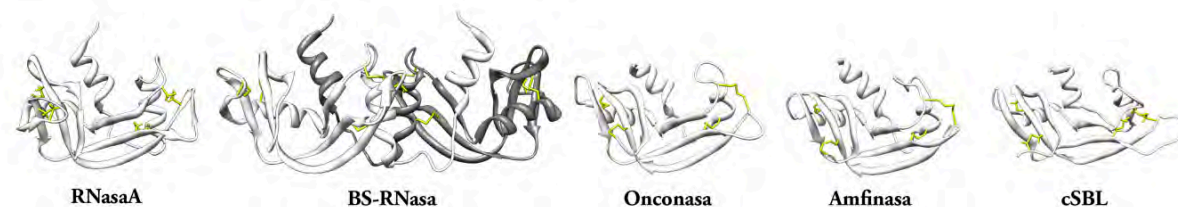


fig1.2 RNasa A i RNases citotòxiques. Els punts disulfur s'indiquen en groc.

1.2.1.1 - Ribonucleasa bovina seminal

La RNasa bovina seminal o BS-RNasa (Matousek 1973) és una proteïna homodimèrica aïllada de semen boví. L'estructura quaternària es manté mitjançant unions covalents (dos punts disulfur entre les cisteïnes 31 i 32 de cada subunitat) i no covalents. Entre les característiques especials que presenta s'hi inclou la seva activitat aspermatogènica, embriotòxica i immunosupressora, així com citotoxicitat selectiva per a cèl·lules tumorals (Matousek 2001).

L'especificitat per les cèl·lules tumorals s'hipotetitzava que podria venir donada pel fet que, tot i ser internalitzada de manera similar en cèl·lules tumorals i normals, la ruta d'internalització seguida per la BS-RNasa és diferent per cada tipus cel·lular. Només la ruta seguida en cèl·lules tumorals indueix mort cel·lular (Mastronicola et al. 1995).

La BS-RNasa es troba en dues formes dimèriques, una amb l'hèlix α N-terminal intercanviada entre les dues subunitats (forma $M \times M$) i una segona en la qual cada cadena polipeptídica conserva el domini N-terminal propi (forma $M = M$). Resulta interessant el fet que només la forma amb els dominis intercanviats presenta

citotoxicitat (Cafaro et al. 1995). L'estructura dimèrica evita, per impediments estèrics, la interacció amb l'inhibidor citoplasmàtic d'RNases (RI) (Murthy et al. 1996), permetent-se així l'acció sobre l'RNA ribosomal, cosa que inhibeix la síntesi proteica i porta a la mort de la cèl·lula (Mastronicola et al. 1995). Així mateix, l'estructura quaternària de la BS-RNasa és requerida per fer el trànsit a través de la bicapa lipídica (Mancheno et al. 1994), i es manté durant la seva internalització (Bracale et al. 2003), fets que es consideren importants per la seva activitat citotòxica.

1.2.1.2 - Onconasa

L'onconasa, proteïna p30 o ranpirnasa, és una proteïna aïllada d'embrions i oòcits de *Rana pipiens* (Darzynkiewicz et al. 1988) que *in vivo* presenta propietats antitumorals (Ellis et al. 2006). És una RNasa bàsica, amb una baixa activitat catalítica comparada amb les RNases pancreàtiques (Notomista et al. 2000). La seva estructura compacta, deguda a la presència d'un quart pont disulfur, li confereix una elevada termoestabilitat (Notomista et al. 2000) i capacitat d'evasió de l'RI. En estudis *in vivo* s'ha demostrat que l'onconasa té efecte sobre el tRNA i els miRNA, deixant els rRNA i mRNA intactes (Iordanov et al. 2000; Saxena et al. 2002; Ardelt et al. 2003; Zhao et al. 2008). Presenta activitats aspermatogènica, embriotòxica i immunosupressora més importants que la de la BS-RNasa (Matousek et al. 2003b). La seva elevada activitat citotòxica i citostàtica, juntament amb la seva relativament baixa immunogènica ha facilitat la seva aplicació en assajos clínics pel tractament del mesotelioma maligne (Mikulski et al. 2002) tot i presentar toxicitat renal (Vasandani et al. 1996; Vasandani et al. 1999).

1.2.1.3 - Amfinasa

En els oòcits de *R. pipiens* s'hi troba una altra RNasa més bàsica que l'onconasa, l'amfinasa (Singh et al. 2007). Se n'han caracteritzat quatre variants, les quals tenen capacitat d'evadir l'acció de l'RI i, tot i presentar uns nivells d'activitat més baixos que els de l'onconasa, presenten una citotoxicitat similar (Ardelt et al. 2007).

1.2.1.4 - Lectines de *Rana japonica* (jSBL) i *Rana catesbeiana* (cSBL)

Les lectines jSBL i cSBL són RNases (tenen activitat RNasa) aïllades d'oòcits de *R. japonica* i *R. catesbeiana*, respectivament. Presenten activitat citotòxica per a cèl·lules que presenten àcid siàlic (Sakakibara et al. 1979; Nitta et al. 1987). Són estructuralment similars a l'onconasa (presenten el quart pont disulfur que augmenta la seva compactació) i promouen l'aglutinació de cèl·lules tumorals, cosa que no s'observa per l'onconasa.

1.2.2 - Bases Moleculares de la Citotoxicitat

Tot i els múltiples estudis realitzats, els mecanismes moleculars que determinen la citotoxicitat de les RNases no són del tot clars. De manera general s'accepta que el model d'acció involucra la interacció de l'RNasa amb la membrana cel·lular i la seva posterior internalització per endocitosi, la translocació al citosol des de la vesícula endocítica en un determinat punt del seu recorregut intracel·lular i la degradació de l'RNA cel·lular evadint l'acció de l'RI, cosa que indueix la mort cel·lular per apoptosi. L'eficiència de la RNasa en cada pas determinarà la seva potència com a citotoxina (Benito et al. 2005; Benito et al. 2008b). A continuació es presenta una breu descripció del que es coneix de cada una de les etapes d'aquest procés (**fig 1.3**).

1.2.2.1 - Interacció amb la membrana plasmàtica i endocitosi

Abans de la internalització cal que la RNasa interaccioni amb la membrana cel·lular; bé sigui a través d'un receptor específic bé de manera inespecífica. Mentre que els receptors d'algunes RNases estan descrits, com ara els de cSBL i jSBL (Nitta et al. 1994), per a la majoria d'elles no s'ha demostrat la seva existència (Kim et al. 1995; Mastronicola et al. 1995; Bracale et al. 2003; Haigis et al. 2003; Haigis and Raines 2003).

El caràcter bàsic de les RNases pot afavorir la seva interacció i posterior absorció a les membranes cel·lulars, les quals tenen una càrrega neta negativa. Així, per exemple, s'ha descrit que la cationització de la cSBL (Iwama et al. 2001; Ogawa et al. 2002), l'RNasa A, l'HP-RNasa (Futami et al. 2001; Futami et al. 2002) i l'RNasa Sa (Ilinkaya et al. 2004) incrementa la seva eficiència d'internalització.

També, la conjugació química o genètica amb lligands de proteïnes de membrana, tals com la transferrina, factors de creixement o anticossos que afavoreixen la interacció amb la membrana cel·lular augmenten la citotoxicitat (Rybak and Newton 1999).

Una vegada s'ha donat la interacció amb la membrana, cal que les RNases siguin internalitzades per endocitosi. En el cas de BS-RNasa (Bracale et al. 2002), de l'onconasa (Rodríguez et al. 2007) i de variants citotòxiques d'RNasa A (Haigis and Raines 2003) o d'HP-RNasa (Bosch et al. 2004), s'han localitzat en endosomes. S'ha descrit que l'endocitosi de l'onconasa és dependent d'ATP (Rodríguez et al. 2007).

1.2.2.2 - Trànsit intracel·lular

El fet que la BS-RNasa sigui internalitzada en cèl·lules tumorals i en cèl·lules normals amb la mateixa eficiència, però que només sigui citotòxica sobre les primeres (Vescia et al. 1980; Mastronicola et al. 1995) fa pensar en l'existència de diferents vies en el seu transport intracel·lular.

Mitjançant estudis amb drogues desorganitzadores del transport intracel·lular s'ha demostrat que l'onconasa segueix un camí que exclou el reticle endoplasmàtic i l'aparell de Golgi (Wu et al. 1995; Newton et al. 1998; Haigis and Raines 2003), i que és independent d'un pH àcid en les vesícules transportadores (Rodríguez et al. 2007).

Mitjançant la colocalització de RNases marcades fluorescentment i marcadors específics per orgànuls cel·lulars s'ha demostrat que la internalització de l'onconasa es realitza a través d'endosomes de reciclatge (Rodríguez et al. 2007), mentre que en el cas de la BS-RNasa s'hi implica la xarxa trans-Golgi (Bracale et al. 2002).

1.2.2.3 - Translocació

El mecanisme de citotoxicitat requereix que les RNases citotòxiques siguin translocades al citoplasma des d'un compartiment subcel·lular determinat. En el cas que aquesta translocació no es produeixi, les RNases seran degradades als lisosomes cel·lulars (**fig1.3b**) o bé seguiran vies no productives (**fig1.3c**), impeding-se la seva acció degradativa.

No es coneix la manera com aquestes RNases, altament estables i hidrofíliques transloquen la bicapa lipídica de l'orgànul i o vesícula al qual s'incorporen des de la membrana cel·lular a la cèl·lula, però en el cas de la BS-RNasa dimèrica s'ha observat que té capacitat d'alterar i penetrar membranes artificials amb fosfolípids carregats negativament (Mancheno et al. 1994). Altres toxines, com seria el cas de la ricina o la toxina del còlera, presenten dos dominis diferenciats, un dels quals és responsable de la translocació a través de membranes en un procés que implica un cert grau de desplegament de la proteïna, mentre que l'altre té funció catalítica (Argent et al. 1994; Schmitz et al. 2000). Això fa pensar en un mecanisme diferent per les RNases.

1.2.2.4 - Acció al citosol

El darrer pas en el mecanisme de citotoxicitat consisteix en la degradació de l'RNA cel·lular. L'activitat RNasa és requerida per a la citotoxicitat (Vescia et al. 1980; Kim et al. 1995; Wu et al. 1995).

En el citoplasma de les cèl·lules eucariotes l'RI (Lee and Vallee 1993; Wu et al. 1993) és capaç d'actuar sobre un ampli ventall d'RNases pancreàtiques. Aquest inhibidor presenta una estructura formada per 15 repeticions de motius β - α rics en leucina distribuïts en forma de ferradura (Kobe and Deisenhofer 1996). Té la capacitat d'unir-se de manera específica a l'HP-RNasa (Boix et al. 1996), l'RNasa A i l'angiogenina (Lee et al. 1989) amb una relació estequiomètrica 1:1 i una constant de dissociació de l'ordre de fM (Lee et al. 1989; Vicentini et al. 1990; Johnson et al. 2007b). La funció de l'RI seria, mitjançant el bloqueig de residus implicats en l'activitat catalítica de l'enzim (Kobe and Deisenhofer 1996), evitar que RNases extracel·lulars que puguin penetrar de manera accidental al citosol hi desenvolupin la seva activitat degradativa (**fig1.3a**).

El fet que tant l'onconasa com la BS-RNasa no resultin inhibides per l'RI fa que l'evasió de l'inhibidor sigui una estratègia interessant per conferir de citotoxicitat RNases no citotòxiques. Aquesta capacitat es pot obtenir mitjançant diferents estratègies, les quals es descriuen a l'apartat següent.

1.2.3 - Estratègies de Desenvolupament de Noves RNases Citotòxiques

La dilucidació de les bases moleculars de la citotoxicitat de les RNases ha permès el desenvolupament mitjançant tècniques d'enginyeria de proteïnes de noves variants amb activitat citotòxica. Aquestes noves RNases tenen potencial per ser utilitzades com alternativa o complement als tractaments quimioterapèutics clàssics. D'entre totes les RNases, una de les més interessants per servir com a base per a la creació de noves variants és l'HP-RNasa (Rybak and Newton 1999). Les raons d'aquest interès radiquen per una banda en el seu origen humà, que fa preveure una menor immunogenicitat en ser aplicades com agents terapèutics en comparació amb les seves homòlogues d'altres espècies (Suzuki et al. 1999). Per altra banda, l'HP-RNasa no presenta acumulació renal (Vasandani et al. 1999) i la seva activitat catalítica es troba entre tres i quatre ordres de magnitud per sobre de la de l'onconasa (Leland et al. 2001).

El disseny d'aquestes variants s'ha basat en diferents estratègies. S'ha buscat interferir en la unió de la ribonucleasa amb l'RI, o augmentar la seva internalització a través d'una major cationització o la interacció amb lligands específics associats a receptors sobre-expressats en cèl·lules tumorals.

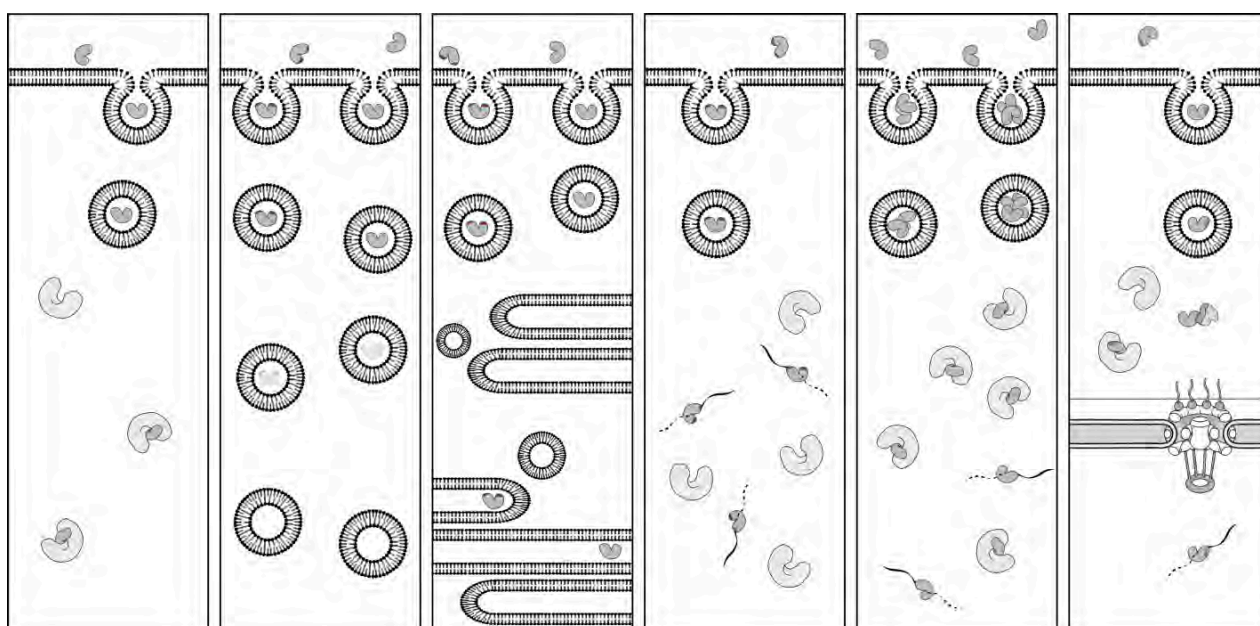


fig1.3 Mecanisme d'acció de les RNases citotòxiques. a. RNasa no citotòxica internalitzada i capturada per l'RI. b. RNases no citotòxiques internalitzades i degradades en lisosomes. c. RNases no citotòxiques que segueixen vies no productives. d. RNasa citotòxica que és internalitzada i escapa a l'acció de l'RI. e. RNases citotòxiques que són internalitzades de manera molt eficient i arriben a saturar l'RI. f. RNases citotòxiques capturades pel sistema d'importació nuclear i dirigides al nucli.

1.2.3.1 - Interacció amb l'inhibidor

L'HP-RNasa és inhibida de manera eficient per l'RI (**fig1.3a**), mentre que d'altres membres de la mateixa família que presenten activitat citotòxica, com l'onconasa i la BS-RNasa, escapen a l'acció d'aquest inhibidor (**fig1.3d**). Una baixa afinitat per l'inhibidor, com la que presenta l'onconasa (Boix et al. 1996), es tradueix en una baixa inhibició i la possibilitat de degradar l'RNA cel·lular. En el cas de l'HP-RNasa la interacció amb l'RI presenta una K_d de 0.29 fM (Johnson et al. 2007b), mentre que per l'onconasa, en condicions de baixa salinitat la constant de dissociació és de 0.15 μ M (Turcotte and Raines 2008). En el cas de l'onconasa, aquesta baixa afinitat és deguda al fet que els residus implicats de manera directa en la interacció entre l'RI i les RNases no es troben conservats a l'onconasa, mentre que en el cas de la forma dimèrica de la BS-RNasa es deu a impediments estèrics derivats de la dimerització. En aquest darrer cas, les condicions reductores del citosol poden trencar els ponts disulfur intercatenaris de la BS-RNasa, afavorint la seva monomerització i conseqüent inhibició per part de l'RI. Tal i com s'ha explicat prèviament, existeixen dues formes interconvertibles del dímer de BS-RNasa, una d'elles estabilitzada només pels dos ponts disulfur (M=M) i una que a més presenta l'intercanvi de l'hèlix α N-terminal (MxM), de les quals només la segona és citotòxica (Cafaro et al. 1995). Hi ha moltes evidències que

indiquen que l'intercanvi del domini N-terminal permet que la forma MxM conservi l'estructura dimèrica tot i la reducció dels ponts disulfur intercatenaris (Piccoli et al. 1992).

Mitjançant mutagènesi dirigida s'han obtingut variants de la RNasa A i de l'HP-RNasa amb modificacions en els residus implicats en la unió a l'RI (Leland et al. 1998; Gaur et al. 2001; Leland et al. 2001) o formes dimèriques d'aquestes (Di Donato et al. 1994; Piccoli et al. 1999; Di Gaetano et al. 2001). Totes elles tenen capacitat d'evasió de l'RI i són citotòxiques. La introducció de noves mutacions dirigides a afeblir en major mesura la interacció amb l'inhibidor es tradueix en un augment de la citotoxicitat (Haigis et al. 2002). La interacció entre les RNases i l'RI però, pot venir modulada per altres molècules, fent que una inhibició *in vitro* no es correspongui amb una inhibició *in vivo* (Murthy and Sirdeshmukh 1992; Murthy et al. 1996; Leland et al. 2001; Bosch et al. 2004). Així, en el cas de la BS-RNasa dimèrica, la forma citotòxica MxM és estabilitzada per la unió del dímer al substrat, de manera que es dificulta la seva dissociació i conseqüent captura per part de l'RI (Murthy and Sirdeshmukh 1992; Murthy et al. 1996). Per altra banda, en el cas de la variant de l'HP-RNasa anomenada PE5 (Bosch et al. 2004) la interacció amb la maquinària d'importació nuclear (Rodríguez et al. 2006b) li permet el trànsit al nucli cel·lular, on en un ambient lliure d'RI (Roth and Juster 1972) pot dur a terme la seva acció degradativa (**figl.3f**).

1.2.3.2 - Saturació de l'RI

Cationització

L'RI representa fins el 0.1% del contingut proteic total de la cèl·lula (Lee and Vallee 1993). En el cas que una RNasa penetri en quantitat suficient al citoplasma es pot donar la seva saturació, de manera que noves RNases que penetrin a la cèl·lula podrien exercir lliurement la seva acció degradadora sobre l'RNA cel·lular tot i no presentar capacitat intrínseca d'escapament a l'inhibidor (**figl.3e**).

Les RNases més catióniques són internalitzades de manera més eficient a les cèl·lules. La cationització es pot generar bé mitjançant tècniques de mutagènesi dirigida (Ilinskaya et al. 2002; Ilinskaya et al. 2004; Johnson et al. 2007a), bé mitjançant modificacions químiques de l'enzim (Futami et al. 2001; Futami et al. 2002; Futami and Yamada 2008). En afavorir la internalització de l'enzim, més molècules de RNasa poden assolir el citosol, on poden arribar a saturar el seu inhibidor, de manera que es permet la degradació de l'RNA fins i tot en el cas de RNases inhibides *in vitro*.

Interacció amb lligands específics

La fusió de l'HP-RNasa amb anticossos o altres lligands dirigits específicament contra cèl·lules tumorals, com ara la transferrina (Rybak et al. 1992) o factors de creixement (Tada et al. 2004; Hayashida et al. 2005), ha demostrat ser una estratègia eficient per millorar la manera com interacciona amb la membrana plasmàtica i és internalitzada, augmentant així la seva activitat citotòxica alhora que s'evita la seva acció sobre els teixits sans (Youle et al. 1993; Zewe et al. 1997; Rybak and Newton 1999). La unió amb lligands específics de receptors de cèl·lules tumorals, o amb anticossos dirigits contra aquests receptors (Newton et al. 1992), confereix citotoxicitat a RNases que són inhibides *in vitro*. Aquests lligands augmenten l'eficiència d'internalització, podent així saturar l'RI (**figl.3e**). A més s'augmenta la selectivitat de les RNases citotòxiques, ja que només aquelles cèl·lules que expressin els receptors a la seva superfície es veuran afectades per la seva acció citotòxica.

1.2.4 - PE5

S'ha descrit una variant de l'HP-RNasa, anomenada PE5, la qual presenta activitat citotòxica per a cèl·lules tumorals tot i ser inhibida per l'RI *in vitro* (Bosch et al. 2004). Aquesta variant incorpora els canvis G89R i S90R els quals, juntament amb d'altres residus de la proteïna, la doten d'una senyal de localització nuclear (NLS) que la dirigeix al nucli (Rodríguez et al. 2006c), on pot degradar l'RNA degut a l'absència d'inhibidor en aquest orgànu (Roth and Juster 1972) (**figl.3f**) i induir apoptosi (Castro et al. 2011a). Els canvis introduïts generen un solapament entre les zones d'interacció amb l'RI i les zones d'interacció amb la maquinària d'importació nuclear, de manera que s'estableix una competència entre la importina α i l'RI per unir-se a PE5. El fet que aquesta variant presenti un lleuger escapament a l'RI permet que petites quantitats de l'RNasa restin disponibles en tot moment per ser capturades per la importina, la qual translocarà l'RNasa al nucli cel·lular. Aquesta translocació fa disminuir la forma lliure de PE5 disponible, de manera que es produeix un

desplaçament de l'equilibri que afavoreix la dissociació del complex entre PE5 i l'RI, i una acumulació al nucli, principalment al nuclèol, de manera depenent d'energia (Bosch et al. 2004).

1.3 - IMPORTACIÓ NUCLEAR

1.3.1 - Compartimentació Eucariota

L'intercanvi de macromolècules entre el citoplasma i el nucli cel·lular (NPC) és un procés clau en els organismes eucariotes. L'estructura principal en aquest procés són els complexos de porus nuclears (NPC), uns grans complexos multiproteics que travessen la membrana nuclear formant un canal aquós que permet el trànsit selectiu de grans macromolècules, així com la difusió passiva de molècules més petites, a través seu (Izaurralde et al. 1999). L'acumulació nuclear de proteïnes, fins i tot per les que per la seva mida podrien difondre de manera passiva a través dels porus nuclears, és un procés que es dona generalment de manera activa, amb la mediació de transportadors específics (Kurz et al. 1997; Hock et al. 1998).

El nombre de porus presents al nucli és variable entre espècies, tipus cel·lulars mida de la cèl·lula i activitat transcripcional. El nucli d'una cèl·lula de llevat conté uns 200 NPC, mentre que una cèl·lula humana o un oòcit madur de *Xenopus* en poden contenir entre 5×10^3 i 5×10^7 (Lim et al. 2008). De manera general, el trànsit a través dels porus assoleix les 1000 macromolècules per segon.

L'estructura central dels NPC conté un canal de 30 nm de diàmetre que permet el trànsit per difusió passiva d'ions i petites molècules, incloent proteïnes amb una massa molecular de menys de 40 kDa. El trànsit de molècules més grans requereix mecanismes de transport actiu depenents d'energia (Fahrenkrog and Aebi 2003).

1.3.2 - Seqüències de Localització Nuclear

La translocació de proteïnes des del citoplasma a l'interior del nucli cel·lular implica diversos processos (Nigg 1997; Gorlich 1998). Inicialment, s'ha de donar el reconeixement d'una seqüència específica de localització nuclear (NLS), present a la seqüència de la proteïna a transportar, per part de proteïnes específiques que actuen de transportador en interaccionar amb components de l'NPC. La identificació d'aquestes seqüències i el seu subclonatge ha permès la direccionalització de proteïnes que no es troben de manera natural al nucli cel·lular.

Hi ha diferents tipus d'NLS, monopartits i bipartits. Els tipus de NLS monopartits més comuns impliquen la presència de seqüències curtes d'aminoàcids de caràcter bàsic, les quals són reconegudes de manera específica per les importines α i β , tot i que s'han descrit altres tipus de seqüències, algunes de les quals medien l'associació amb proteïnes diferents d'aquestes importines. Els NLS monopartits són formats per pocs residus bàsics, principalment lisines o arginines, segons una seqüència consens del tipus (K / R)₄₋₆. El prototipus d'NLS monopartit és el que trobem a l'antigen T llarg del virus SV40, el qual presenta la seqüència PKKKRKV¹³² (Colledge et al. 1986; Adam et al. 1990). S'ha vist que aquesta seqüència resulta necessària i suficient per promoure l'importació nuclear de proteïnes citoplasmàtiques heteròlogues, tals com la β galactosidasa i la piruvat quinasa (Kalderon et al. 1984).

Les seqüències de localització nuclear bipartides clàssiques són formades per dos petits grups de residus bàsics separats per una seqüència d'aproximadament una dotzena d'aminoàcids, segons una seqüència consens del tipus (K / R)₂ - X₁₀₋₁₂ - (K / R)₃. El model d'NLS bipartit clàssic és el que trobem a la nucleoplasmina, amb la seqüència KRPAATKKAGQAKKKKLD¹⁷¹ (Dingwall et al. 1988; Dingwall and Laskey 1991). Els dos grups de residus bàsics són essencials en el manteniment del trànsit nuclear (Robbins et al. 1991)

PE5 és una variant de l'HP-RNasa en la qual el canvi de la glicina en posició 89 i la serina en posició 90 per arginines li confereixen capacitat de translocació al nucli (Bosch et al. 2004). Aquestes dues substitucions, juntament amb la lisina 1 i les arginines 31, 32, 33 i 91, conformen una seqüència de localització nuclear formada per residus que, tot i trobar-se allunyats en la seqüència aminoacídica, el plegament tridimensional de la proteïna acosta generant un alineament equivalent a un NLS bipartit (Rodríguez et al. 2006b).

1.3.3 - Importines

Per a la majoria de macromolècules, el transport entre el citoplasma i el nucli a través dels porus nuclears és un procés depenent d'energia, mitjançat per uns receptors que generalment pertanyen a la família de les carioferines (Mosammaparast and Pemberton 2004). Les carioferines estan implicades tant en l'importació com en l'exportació de totes les proteïnes amb una mida que es trobi per sobre del límit d'exclusió de la difusió simple a través dels NPC. La formació de complexos d'importació o export ve determinada per la presència d'uns motius en la seqüència de les proteïnes a transportar. Aquests motius s'anomenen seqüències de localització nuclear (NLS) o seqüències d'export nuclear (NES), i s'associen amb importines i exportines, respectivament.

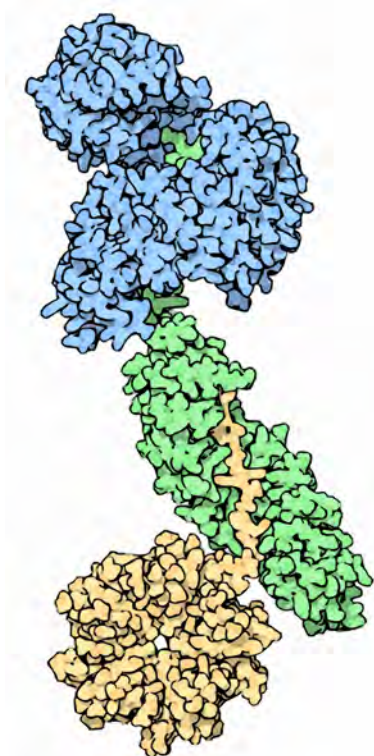


fig1.4 Complex de translocació nuclear entre la importina α (en verd), la importina β (en blau) i la nucleoplasmína (en groc).

Hi ha deu membres de la família de les carioferines en llevat que actuen com importines (Wozniak et al. 1998), i s'estima que aquest nombre es duplica en mamífers. Aquesta diversitat comporta una redundància funcional que fa que la deleció d'una importina no sigui normalment letal per la viabilitat de la cèl·lula. Així, una mateixa proteïna pot ser transportada per diverses importines diferents (Jakel and Gorlich 1998). Les més conegudes són la transportina I i la importina β .

La transportina I és un membre de la família de les carioferines de 101 kDa i una estructura composta d'hèlixs α en 18 dominis HEAT/Armadiño formats per dues hèlixs α (A i B) unides per un gir, i entregirats en una superhèlix, units per girs o per hèlixs α curtes. Les hèlixs B formen la cara còncava de la proteïna, determinant llocs d'unió a Ran (vegeu l'apartat següent) a la zona N-terminal i a seqüències de localització nuclear a la zona C-terminal. Les proteïnes transportades al nucli per la transportina I inclouen les que contenen la seqüència de localització nuclear M9 (Pollard et al. 1996) i proteïnes ribosomals com ara L23a a través del domini bàsic BIB (Jakel and Gorlich 1998).

La importina β és un membre de la família de les carioferines amb capacitat d'unir-se a diferents tipus de proteïnes a transportar, bé sigui de manera directa, bé a través d'un adaptador. L'adaptador més conegut és la importina α (**fig1.4**), tot i que també poden actuar amb aquesta funció d'altres proteïnes com la snurportina, XRIP α o la importina 7. L'extrem N-terminal de la importina α té caràcter bàsic, i comprèn una seqüència de 40 residus, anomenada IBB, que és necessària i suficient per la interacció amb la importina β (Gorlich et al. 1996), i que presenta homologia amb d'altres motius de proteïnes transportades a nucli per interacció directa

amb la importina β , com ara HIV-1, Rev i Tat. Aquestes proteïnes contenen seqüències riques en arginines que es poden estructurar de manera similar al domini IBB. Aquest extrem N-terminal actua en la importina α com a seqüència autoinhibitòria (Kobe 1999). La interacció entre el domini IBB i la importina β és similar a la que es dona entre la importina α i les proteïnes a transportar.

1.3.4 - Cicle d'Importació Nuclear

Una vegada a l'interior del nucli, cal que el complex format entre les importines i la proteïna transportada es dissocïi, permetent el retorn de les importines al citoplasma, on estaran disponibles per repetir el procés. En aquest procés hi té un paper crucial la GTPasa Ran, la qual promou la dissociació del complex entre la importina i la proteïna transportada, ja que en la seva forma unida a GTP presenta una elevada afinitat per les importines. La unió a Ran-GTP i a la proteïna transportada són mútuament excloents, ja que involucra contactes solapats, de manera una proteïna amb una seqüència de localització nuclear es pot unir a una importina al citosol, on les concentracions de Ran-GTP són baixes i ser alliberada al nucli, on hi ha una elevada concentració de Ran-GTP. Així, la proteïna amb NLS és alliberada a l'interior (**fig1.5**). Com altres GTPases, es pot trobar Ran en dues formes, unida a GTP o unida a GDP. Aquestes dues formes de Ran es troben distribuïdes de manera asimètrica entre el nucli i el citoplasma. Ran-GTP es troba predominantment al nucli,

mentre que Ran-GDP es troba de manera preferent al citoplasma (Kalab and Heald 2008). Aquesta distribució asimètrica és mantinguda per proteïnes reguladores específiques de nucli i citoplasma.

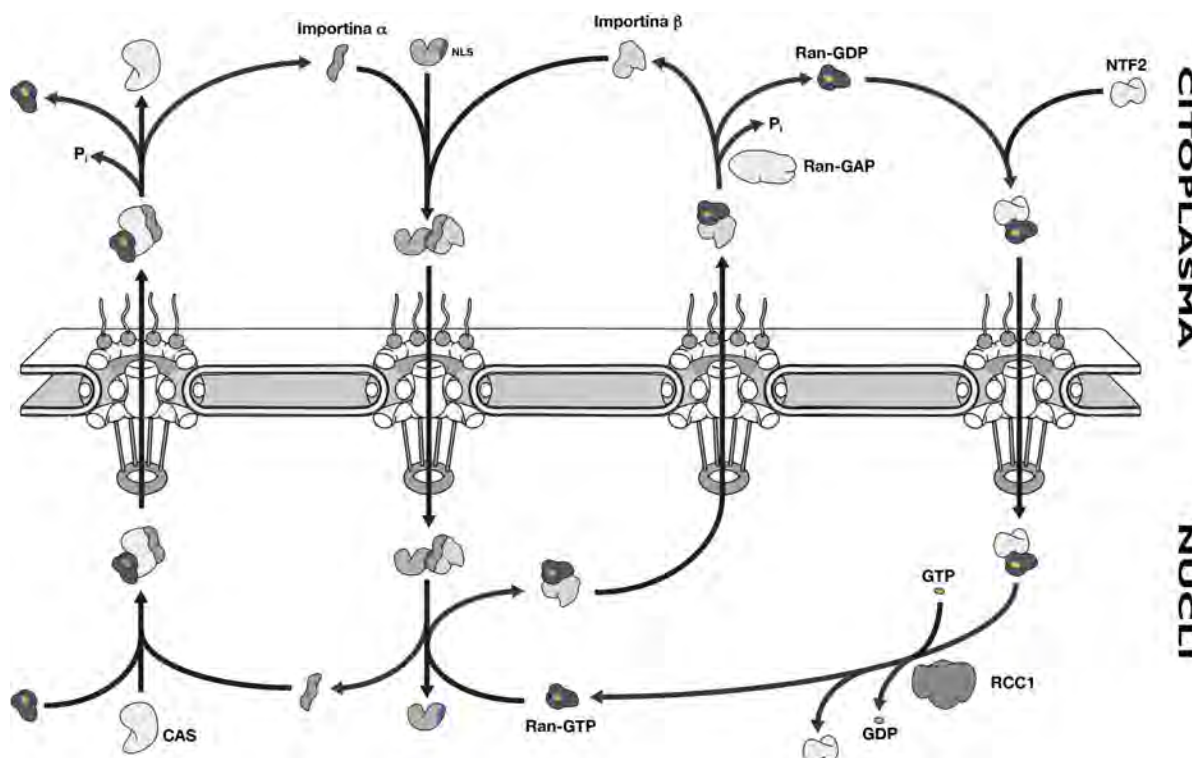


fig1.5 Esquema general del mecanisme d'importació nuclear.
En blau s'indica la seqüència NLS, en verd el GTP i en taronja el GDP.

1.4 - DIMERITZACIÓ

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, la dimerització és una de les estratègies que s'han descrit per a la creació d'RNases citotòxiques. L'associació de proteïnes per formar dímers i oligòmers d'ordre més elevat és un fenomen molt comú. L'oligomerització és un factor clau en la regulació de proteïnes tals com enzims, canals iònics, receptors i factors de transcripció. A més, l'autoassociació pot ajudar a minimitzar la mida del genoma mantenint la complexitat dels organismes. Però l'oligomerització pot tenir també efectes nocius en el cas que es formin oligòmers no nadius, freqüentment associats a estats patològics. Un dels mecanismes per a l'oligomerització de proteïnes és l'intercanvi de dominis.

1.4.1 - Intercanvi de Dominis

L'intercanvi tridimensional de dominis és un procés que consisteix en la formació d'oligòmers mitjançant l'intercanvi de dominis estructurals idèntics entre monòmers (Bennett et al. 1995; Heringa and Taylor 1997). Aquest procés va ser documentat per primera vegada en l'estructura cristal·logràfica de la toxina diftèrica (Bennett et al. 1994b). Des de llavors, s'han presentat diverses estructures d'altres proteïnes que presenten aquest tipus d'oligomerització, i s'ha relacionat amb l'evolució de proteïnes oligomèriques. Es troben exemples d'intercanvi de dominis en proteïnes no relacionades entre elles, i en alguns casos els dímers que es formen presenten una alteració de la funció respecte de la que presenten les formes monomèriques, cosa que es podria relacionar amb un paper regulador de l'oligomerització (O'Neill et al. 2006; Zhang et al. 2010).

1.4.1.1 - Mecanisme d'intercanvi de dominis

En l'intercanvi tridimensional de dominis, un domini d'una proteïna monomèrica és substituït pel mateix domini d'una altra subunitat idèntica. El domini intercanviat pot ser des d'una estructura terciària globular sencera fins a una simple cadena β o hèlix α (Liu and Eisenberg 2002), i tot i que generalment correspon a un extrem de la

cadena polipeptídica, bé sigui l'N-terminal bé el C-terminal, es pot donar també entre dominis interns de la proteïna.

El domini intercanviat es troba sovint unit a un segment flexible que actua com a pèptid xarnera, amb capacitat de moviment que permet que la regió intercanviada estableixi les interaccions correctes en les dues conformacions. Com a resultat, el domini intercanviat en l'estructura oligomèrica es troba en un ambient que resulta pràcticament idèntic al que té en la proteïna monomèrica, amb l'única excepció del pèptid xarnera que connecta el domini intercanviat amb la resta de la proteïna, el qual pot tenir conformacions diferents en les dues estructures (Bennett et al. 1995).

Anomenen interfície tancada la zona de contacte entre el domini intercanviat i el cos de la proteïna, tant en el monòmer com en el dímer. Aquesta interfície constitueix el factor essencial que permet la formació de l'oligòmer. A causa de la proximitat de les subunitats, en el dímer es crea una nova zona de contacte, anomenada interfície oberta, la qual només es troba en el dímer intercanviat. Aquesta interfície aporta noves interaccions favorables que permeten un guany en energia lliure de la forma oligomèrica respecte de la monomèrica, cosa que compensaria la pèrdua d'entropia associada a l'oligomerització (Erickson 1989; Tamura and Privalov 1997). Tanmateix, els oligòmers formats resulten metaestables, podent revertir a l'estat monomèric. S'han proposat dos mecanismes d'intercanvi de dominis (Piccoli et al. 1992; Bennett et al. 1995).

“Swap early”

De manera general, en el cas de monòmers estables que generen dímers metaestables amb dominis intercanviats es pot descriure un mecanisme simple d'oligomerització. Així, el monòmer correctament plegat és subjecte a condicions lleugerament desnaturalitzants (urea, clorur de guanidini, etanol, àcid acètic, etc) que afavoreixen l'obertura d'aquests monòmers, alliberant el domini que serà intercanviat. En restablir-se les condicions que estableixen la configuració tancada els monòmers oberts poden intercanviar dominis amb una altra o més subunitats, sobretot en concentracions elevades de proteïna. Aquest mecanisme (**fig1.6**) és seguit en el procés de dimerització de l'RNasa A, i es pot entendre com un fenomen *in vitro* que es dona com a conseqüència de les condicions experimentals emprades. En el cas de proteïnes que es troben *in vivo* en forma oligomèrica intercanviada com a via natural del seu camí de plegament s'hi pot arribar per altres vies, tot i que no es pot descartar que en determinades situacions es donin les condicions desnaturalitzants adequades dins la cèl·lula, com ara en un compartiment àcid. També es podria donar durant la síntesi de la proteïna.

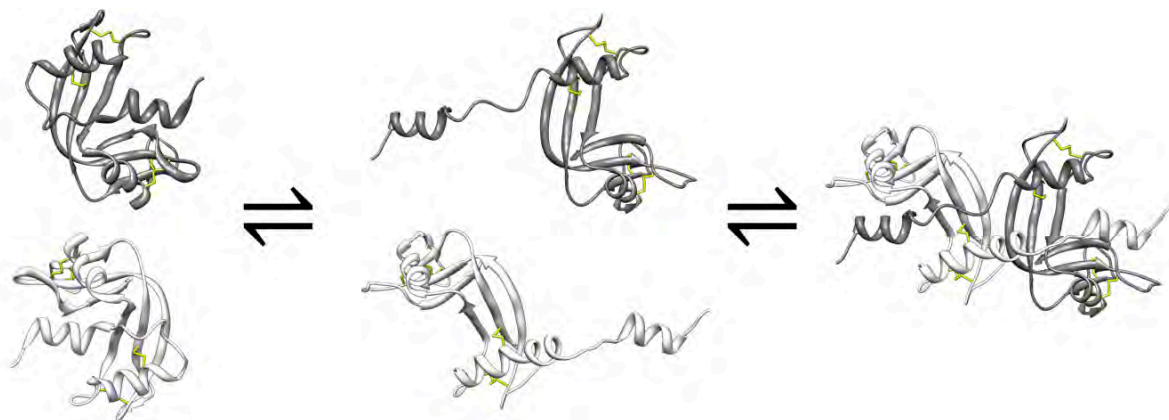


fig1.6 Mecanisme de dimerització de la RNasa A mitjançant intercanvi del domini N-terminal, seguint un procés amb un intermediari monomèric obert (swap early).

“Dimer early” o “Swap late”

En d'altres casos, com ara en la BS-RNasa o en la variant de l'HP-RNasa anomenada PM8, dos monòmers amb superfícies complementàries s'estabilitzen en un intermediari dimèric (**fig1.7**), el qual és posteriorment estabilitzat mitjançant noves interaccions que desemboquen en un intercanvi de dominis. El cas de la BS-RNasa aquesta primera estabilització es dona mitjançant dos punts disulfur, mentre que en el cas de PM8 s'estableixen interaccions febles (dos punts salins, en una primera aproximació descrita). En els dos casos amb aquesta primera interacció es donaria una orientació correcta de les dues subunitats per completar l'intercanvi de dominis.

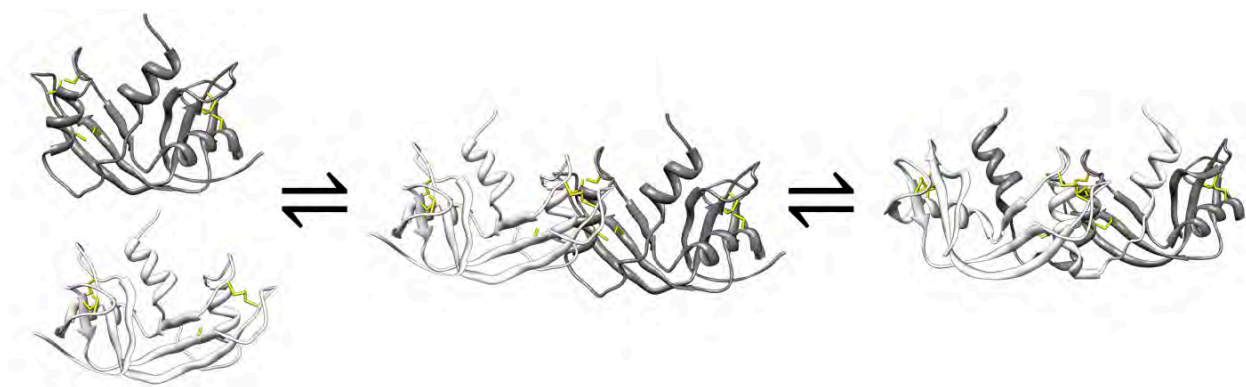


fig.7 Mecanisme de dimerització de la BS-RNasa mitjançant intercanvi del domini N-terminal, seguint un procés amb un intermediari dimèric sense intercanvi de dominis (swap late).

A continuació es descriuen algunes proteïnes que dimeritzen per intercanvi de dominis, algunes de les quals han estat rellevants en aquest treball.

1.4.1.2 - BS-RNasa

La BS-RNasa és una RNasa de 124 residus que de manera natural es troba en forma dimèrica (**fig1.8**) i que presenta una elevada homologia de seqüència amb la RNasa A (Mazzarella et al. 1993). En forma monomèrica té una estructura idèntica a la de la RNasa A, formada per dos fulls β i tres hèlixs α , la qual és igual a cada un dels protòmers de l'estructura dimèrica, excepte la regió del pèptid xarnera (Mazzarella et al. 1993). El dímer és estabilitzat per dos ponts disulfur a la interfície oberta, establerts entre les cisteïnes 31 i 32 de cada subunitat, i per l'intercanvi de les hèlixs N-terminals a través d'un pèptid xarnera de 9 aminoàcids. Aquesta estructura determina la formació d'un centre actiu compost, en el qual intervenen les histidines 12 i 119 provinents de dues cadenes polipeptídiques diferents.

1.4.1.3 - RNasa A

L'RNasa A és una RNasa de 124 residus. Va ser la primera RNasa de la qual es va descriure una forma dimèrica, la qual es produïa durant la liofilització en presència d'àcid acètic (Crestfield et al. 1962). La dimerització de la RNasa A no es dona de manera natural, i pot ocórrer bé per intercanvi del domini N-terminal (dímer minoritari) (Liu et al. 1998) bé per intercanvi del domini C-terminal (dímer majoritari) (Liu et al. 2001) (**fig1.8**).

La RNasa A pot formar agrupacions oligomèriques d'ordre superior per intercanvi d'aquests mateixos dominis N-terminal i C-terminal. S'han observat trímers lineals o cíclics (Gotte et al. 1999), tetràmers (Gotte and Libonati 2004) i altres formes oligomèriques superiors (Gotte et al. 2006).

Tot i que la RNasa A monomèrica no presenta cap activitat biològica especial, els seus oligòmers adquireixen capacitats antitumoral i aspermatogènica (Matousek et al. 2003a).

1.4.1.4 - PM8

S'ha descrit també un dímer no natural en una variant de l'HP-RNasa anomenada PM8, la qual incorpora els 20 primers residus de la BS-RNasa, a més de la substitució de la prolina en posició 101 per una glutamina (Canals et al. 1999). L'estructura cristal·logràfica d'aquesta variant va evidenciar l'establiment d'un dímer mitjançant l'intercanvi de l'hèlix N-terminal (Canals et al. 2001) (**fig1.8**). Posteriorment aquest dímer va ser estabilitzat en solució (Rodriguez et al. 2006a).

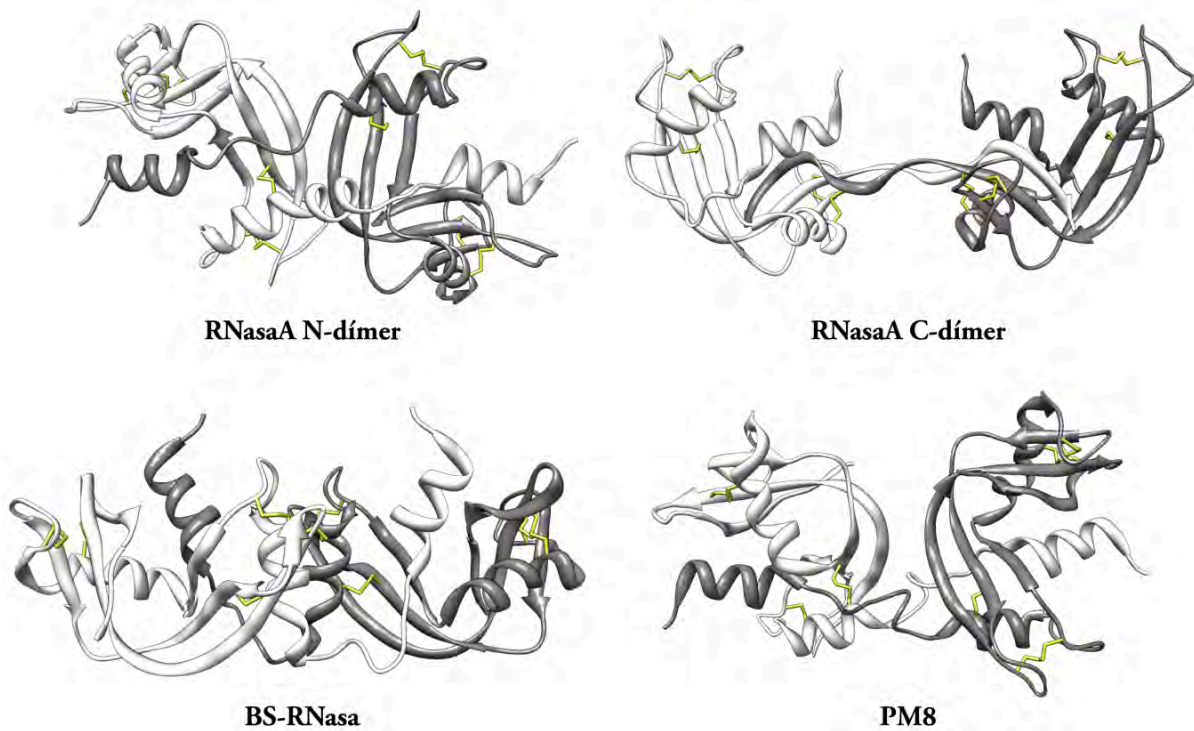


fig1.8 RNases que presenten dimerització per intercanvi de dominis.

1.4.1.5 - Altres proteïnes que presenten intercanvi de dominis

Toxina diftèrica

La toxina diftèrica (DT) és una proteïna de 535 residus secretada per soques tòxiques del bacteri *Corynebacterium diphtheriae*. La DT inactiva el factor d'elongació 2 (EF-2), un component essencial de la maquinària de translació de les cèl·lules eucariotes, causant així la seva mort. Consta de tres dominis; el domini catalític (C, residus 1-190), el domini transmembrana (T, residus 191-378) i el domini d'unió a receptor (R, residus 379-535). Cada un dels dominis desenvolupa un paper principal en cadascuna de les tres fases de la intoxicació amb DT. Primerament, el domini R s'uneix a un receptor de membrana i la proteïna és endocitada. El baix pH provoca un canvi conformacional que permet la inserció del domini T a la membrana lisosomal i la translocació de la toxina al citosol. Finalment, ja al citoplasma, el domini C catalitza la transferència d'una ADP-ribosa provinent de NAD a una histidina modificada d'EF-2, cosa que atura la síntesi proteica matant la cèl·lula.

La DT és activa en forma monomèrica, i no dimeritza de manera espontània ni tan sols a concentracions elevades (30 mg/ml). Tot i això, pot dimeritzar a concentracions elevades per congelació en tampó fosfat (Bennett et al. 1994a), la qual cosa provoca una caiguda en el valor de pH des de la neutralitat fins a 3.6 que converteix la DT en un monòmer obert, amb el domini catalític dissociat del cos de la proteïna. Durant la descongelació i conseqüent tornada de la solució a la neutralitat, els monòmers oberts formen dímers i oligòmers d'ordre més elevat.

En el dímer s'intercanvia el domini catalític complet, una estructura globular formada per diversos fulls β , a través d'un pèptid xarnera d'una desena d'aminoàcids. Aquesta forma dimèrica és metaestable però de dissociació lenta i no es troba a la natura, tenint una funció desconeguda. Un dímer estable podria haver evolucionat a partir d'un dímer metaestable similar al que genera DT, mitjançant la incorporació de mutacions estabilitzants a la interfície oberta, així com a través d'una mutació que provoqués una desestabilització del pèptid xarnera en la forma monomèrica.

CksHs2

La CksHs2 és una proteïna de 79 residus que tant en la seva forma monomèrica com dimèrica s'implica en la regulació del cicle cel·lular a través de la unió a quinases dependents de ciclina, sent essencial per la seva acció. S'estructura en quatre fulls β i dues hèlixs α , i intercanvia una cadena β de 14 residus (C-terminal) mitjançant

un pèptid xarnera de 5 aminoàcids per formar un dímer estabilitzat per la unió d'un ió metàl·lic que no és present en el monòmer (Parge et al. 1993; Seeliger et al. 2002). La presència de l'ió metàl·lic genera un efecte d'apantallament que impedeix repulsions electrostàtiques a pH neutre, mentre que a pH àcid aquest ió no és requerit per l'estabilitat del dímer.

La CksHs2 es pot purificar, segons les condicions de pH i força iònica, en forma de monòmers, dímers o hexàmers (Parge et al. 1993); la unió *in vivo* de ciclines depenents de quinases i d'ions metàl·lics pot estabilitzar de manera diferencial una o altra estructura, tot i que es creu que la forma activa és l'hexamèrica.

Nucleasa estafilococal

La nucleasa estafilococal és una proteïna de 149 residus que dimeritza de manera estable mitjançant l'intercanvi d'una hèlix α de 29 aminoàcids a través d'un pèptid de 8 residus (Green et al. 1995). No es troba de manera natural en forma dimèrica, de manera que la funció del dímer és desconeguda.

α -espectrina

La seva forma monomèrica és una cadena de 107 residus que intercanvia l'hèlix α C-terminal mitjançant un pèptid xarnera de quatre residus. Tot i que la forma dimèrica (Yan et al. 1993) no es troba de forma natural, l' α espectrina és una unitat de repetició en el citoesquelet.

Interleucina 5

La interleucina 5 humana és una proteïna de 113 residus que forma un homodímer estable (Milburn et al. 1993) mitjançant l'intercanvi d'una hèlix α i un full β situats a l'extrem C-terminal, amb un total de 26 aminoàcids, a través d'un pèptid xarnera de 8 residus. Presenta també dos enllaços disulfur intercatenaris. La forma dimèrica actua com a factor de creixement.

Interleucina 10

La interleucina 10 és una citoquina dimèrica en la qual les dues subunitats de 160 aminoàcids intercanvien els 46 residus de l'extrem C-terminal, els quals formen dues hèlixs α , a través d'un pèptid xarnera d'11 residus (Zdanov et al. 1995).

β B2 cristal·lina

La β B2 cristal·lina és un homodímer present a la matriu de la lent ocular. Està format per dues subunitats de 204 residus que intercanvien un domini globular complet mitjançant un pèptid xarnera de 9 residus (Lapatto et al. 1991).

1.4.1.6 - Intercanvi de dominis i funció

L'intercanvi de dominis permet a la cèl·lula regular l'acoblament i l'activitat de determinades proteïnes. Per proteïnes que poden presentar diferents nivells d'oligomerització, com ara CksHs2, els mecanismes que porten d'un estadi a l'altre no es coneixen amb detall, però en els casos de la BS-RNasa es demostra que aquest canvi es pot induir mitjançant mecanismes químics (canvis de pH o concentració) possibles dins la cèl·lula. Canvis en el pH o la força iònica que generin una desestabilització de les formes monomèriques poden ser habituals *in vivo*. Aquest canvi entre nivells d'organització pot ser transitori, com en CksHs2, o permanent, com en la BS-RNasa o la β B2 cristal·lina, i permetre funcions especials en els oligòmers que no són presents en el monòmer (Avitabile et al. 2003; Ercole et al. 2009).

Alguns dels dímers per intercanvi de dominis descrits, com ara les interleucines 5 i 10 o la β B2 cristal·lina, tenen una funció biològica definida (Lapatto et al. 1991; Milburn et al. 1993; Zdanov et al. 1995), mentre que bona part de les proteïnes dimèriques que presenten aquesta estructuració en la seva resolució cristal·logràfica poden correspondre a artefactes de cristallització.

L'intercanvi de dominis dóna també explicació a l'evolució d'enzims oligomèrics amb centres actius compostos, en zones d'unió entre subunitats, tals com la RuBisCO (Schreuder et al. 1993), la glutamina sintasa (Almassy et al. 1986) o la catalasa (Fita and Rossmann 1985).

1.4.2 - Mutacions en el Pèptid Xarnera Poden Afavorir l'Intercanvi de Dominis

De manera general, una diferència significativa entre les formes monomèriques i dimèriques de RNases que presenten dimerització mitjançant intercanvi de dominis es troba en el fet que els pèptids xarnera en els dímers presenten graus d'ordenació més elevats. En la majoria de monòmers el grau de desordenació impedeix l'establiment d'un model cristal·logràfic complet per aquestes regions, mentre que en les estructures dimèriques equivalents la major ordenació permet establir amb precisió l'estructura també pel pèptid xarnera.

A continuació es descriuen els pèptids xarnera de les tres RNases dimèriques.

1.4.2.1 - BS-RNasa

En el cas del dímer no intercanviat (forma M=M) de la BS-RNasa, els mapes de densitat electrònica dels residus que formen el pèptid xarnera (16 - 22), tot i presentar un grau de resolució menor que la resta de la proteïna, permeten la resolució estructural fins la serina 18, i en un dels monòmers apareix la prolina 19 (Berisio et al. 2003).

En canvi, en el dímer intercanviat (forma MxM) el pèptid xarnera apareix més estructurat, tot i adoptar diferents conformacions per les dues cadenes (Mazzarella et al. 1993), amb un gir β que comprèn els residus 18 - 21 i que és afavorit per la prolina 19 (Mazzarella et al. 1995).

En el cas del dímer no covalent (NCD) de la BS-RNasa, trobem també un gir β en aquesta mateixa posició que inclou a més tres ponts d'hidrogen, un entre el grup carboxil de la serina 18 i el grup amida de la serina 21 (també present a MxM), un entre el nitrogen amida de la serina 18 i l'oxigen carboxílic de la serina 21, i un altre entre les cadenes laterals de l'asparagina 17 i la serina 23. Aquest gir β evoluciona cap a un segon gir β de tipus I que comprèn els residus 22 - 25, punt on s'inicia l'hèlix $\alpha 2$ comuna a totes les RNases (Sica et al. 2004).

En la forma MxM s'han descrit en algunes estructures girs β equivalents als que es troben en el dímer no covalent. En aquests, a part dels ponts d'hidrogen establerts entre residus del pèptid xarnera, s'observen dos ponts d'hidrogen suplementaris entre el nitrogen amida de la serina 21 de cada subunitat i l'oxigen carboxílic de la prolina 19 de l'altra. A més, la cadena lateral de la prolina 19 de cada una de les subunitats se situa en la cavitat formada entre les cadenes laterals de la tirosina 25 i la glutamina 101 de l'altra (Sica et al. 2004), en una interacció intercatenària característica també de la forma dimèrica de la variant de l'HP-RNasa PM8 (Canals et al. 2001).

1.4.2.2 - PM8

En el dímer de PM8 els pèptids xarnera corresponents a les dues subunitats presenten la mateixa conformació, la qual resulta diferent a la de la BS-RNasa tot i ser seqüencialment idèntiques. Entre els residus 18 i 23 el pèptid xarnera adopta l'estructura d'una hèlix 3_{10} estabilitzada per diversos ponts d'hidrogen que involucren l'asparagina 17, la serina 18, la prolina 19 i les serines 20, 21, 22 i 23, a més d'enllaços intercatenaris entre la serina 20 i la glutamina 101.

En el cas de la variant de l'HP-RNasa monomèrica PM7, la qual difereix de PM8 en la presència d'una prolina en lloc d'una glutamina en posició 101 i d'una serina en lloc d'una prolina en posició 50 (Pous et al. 2000), el pèptid xarnera presenta un elevat grau de desordenació. És interessant remarcar que la seqüència del pèptid xarnera de PM7 és idèntica a la de PM8. Tal i com succeeix en comparar els dos dímers de la BS-RNasa, només es pot arribar a resoldre completament l'estructura del pèptid xarnera quan aquest es troba intercanviat (Avitabile et al. 2003; Berisio et al. 2003; Sica et al. 2003).

1.4.2.3 - RNasa A

En el cas de l'N-dímer de l'RNasa A els dos pèptids xarnera presenten diferents conformacions, i en una de les subunitats comprèn més residus i presenta un grau de desestructuració major. La presència d'una alanina en lloc de la prolina habitual en les altres RNases dimèriques a la posició 19 augmenta la mobilitat d'aquesta zona,

permetent una optimització més eficient dels contactes entre les dues subunitats. A causa d'aquesta major flexibilitat dels pèptids xarnera les dues subunitats adopten una orientació que permet la formació d'un full β de 6 tires continu entre les dues subunitats (**fig 1.8**). Aquesta conformació força els dos pèptids xarnera a adoptar estructures diferents, i un d'ells s'estructura en una hèlix α que no seria possible en el cas que hi hagués una prolina en posició 19, mentre que l'altre adopta una conformació estesa (Liu et al. 1998).

1.4.2.4 - Desestabilització del pèptid xarnera

Es poden generar dímers estables per intercanvi de dominis a partir de la desestabilització del monòmer. Com que les interfícies tancades són idèntiques en el monòmer i el dímer intercanviat, desestabilitzant aquesta interfície en el monòmer es desestabilitzarà també en el dímer; de manera que aquesta serà una zona en la qual els resultats d'introduir mutacions favorables a l'intercanvi de dominis seran poc predictius, tant poden afavorir com dificultar l'intercanvi. Per contra, la zona que comunica els dominis intercanviats amb la resta de la proteïna pot tenir un paper crucial en l'intercanvi.

Per una banda, si el pèptid xarnera que connecta els dos dominis es veu escurçat es pot impossibilitar estèricament l'establiment del monòmer tancat. Combinat amb el fet que el monòmer obert seria inestable per l'exposició de residus que de manera natural es trobarien enterrats en la interfície tancada, s'afavoriria l'establiment de dímers amb dominis intercanviats. Aquesta estratègia s'ha utilitzat prèviament en el cas de la nucleasa estafilococcal (Green et al. 1995), i s'observa també en anticossos de fracció variable (Fv) d'una única cadena, en els quals els dominis lleuger (V_L) i pesat (V_H) augmenten la dimerització en escurçar-se el pèptid que els uneix (Raag and Whitlow 1995). L'eliminació dels residus 16 - 20 possibilita la dimerització de l'HP-RNasa mitjançant intercanvi de dominis (Russo et al. 2000) mitjançant un tractament tèrmic a 70°C. En aquest cas, l'escurçament del pèptid xarnera dificulta que l'hèlix α N-terminal interaccioni amb el cos del monòmer; de manera que s'afavoreix la interacció d'aquest domini amb un altre protòmer per establir un dímer intercanviat.

Una altra estratègia per afavorir l'intercanvi de dominis mitjançant canvis en el pèptid xarnera seria mitjançant mutacions en aquest que afavoreixin les conformacions obertes. Això es pot aconseguir bé a partir de canvis que restringeixin (prolina) o augmentin (glicina) les conformacions possibles, bé a partir de canvis que introdueixin impediments estèrics o electrostàtics en el monòmer tancat. Així, en l'estructura de la $\beta\beta 2$ cristal·lina hi ha un àcid aspàrtic en posició 106 que en la conformació tancada es repel·leix electrostàticament amb un altre residu acídic que es troba en posició 87, al pèptid xarnera que connecta el domini intercanviat amb la resta de la proteïna (Lapatto et al. 1991). S'ha descrit que l'eliminació del residu àcid en posició 87 converteix la $\beta\beta 2$ cristal·lina en monomèrica (Trinkl et al. 1994).

1.4.2.5 - Construcció de dímers d'HP-RNasa

Tot i que l'HP-RNasa salvatge és una proteïna monomèrica, mitjançant tècniques de mutagènesi dirigida s'han pogut generar diverses variants que formen dímers mitjançant un mecanisme d'intercanvi del domini N-terminal (Piccoli et al. 1999; Russo et al. 2000; Canals et al. 2001).

En el cas de la variant PM8, en solució la població de dímer és molt reduïda, a causa segurament que les interaccions electrostàtiques que estabilitzarien la interfície oberta són massa febles com per generar una quantitat significativa de dímer. La dimerització pot ser afavorida mitjançant una incubació en etanol 20% a 25°C, assolint-se fins un 20% de dímer (Rodríguez et al. 2006a). En aquest cas, a mesura que la temperatura disminueix, l'equilibri de la dimerització es desplaça cap a les formes intercanviades. Tenint en compte que en el rang de temperatures analitzat el domini intercanviat no es troba dissociat de la resta de la proteïna, es pot interpretar com una evidència que el primer pas limitant de la dimerització en PM8 és l'estabilització de la interfície oberta. Així doncs, el procés de dimerització seguiria un camí equivalent al de la BS-RNasa, amb un primer estadi limitant d'estabilització de la interfície oberta, seguit de l'intercanvi del domini N-terminal. En aquest primer pas d'interacció es va descriure que hi tindrien un paper crític els ponts salins que s'estableixen entre l'àcid glutàmic 103 i l'arginina 104 de cada protòmer.

En PM8, l'establiment d'un dímer no intercanviat posicionaria les dues subunitats en una orientació que afavoriria l'intercanvi de dominis en un segon pas. Les interaccions entre el pèptid xarnera d'una de les subunitats i el cos de l'altra permetria llavors aquest intercanvi, el qual seria estabilitzat per noves interaccions que estructurarien el pèptid xarnera.

L'eliminació dels residus 16-18 en la variant des(16-18)HP o dels residus 16-20 en la variant des(16-20)HP de l'HP-RNasa genera unes variants amb capacitat de dimeritzar mitjançant un mecanisme per intercanvi de dominis, la qual és major en el cas de des(16-20)HP. El fet que després d'un tractament tèrmic a 70°C, en ser retornada a temperatura ambient es trobi preferentment en forma dimèrica, indica que és probable que aquesta variant es dissociï parcialment i dimeritzi durant el refredament. A 37°C i una concentració de 5 µM el temps mig de dissociació és de 3 h, i la K_d d'1.54 µM, un valor cinc ordres de magnitud inferior al de l'HP-RNasa salvatge. Resulta probable que l'escurçament del pèptid xarnera impedeixi que el domini N-terminal pugui interaccionar de manera correcta amb el cos de la pròpia proteïna, mentre que s'afavoriria la interacció amb un segon protòmer.

1.4.3 - Estats Patogènics Induïts per l'Agregació Proteica

L'agregació de proteïnes és un fenomen que es dona tant en situacions fisiològiques (com ara en assemblatges proteics) com patològiques (deposicions proteiques). Les malalties associades a dipòsits proteics es caracteritzen per l'agregació de proteïnes codificades pel propi genoma de l'individu afectat. Les proteïnes associades a aquestes malalties sovint tenen funcions biològiques ben caracteritzades i que resulten essencials en situació normal. Quan es produeix l'estat patogènic, bé sigui provocat per una predisposició genètica o per un factor ambiental, una part de la proteïna no és capaç d'assolir la seva estructura nativa i pateix un canvi conformacional que actua de motlle per al creixement encadenat d'agregats.

L'intercanvi de dominis és un dels possibles mecanismes pels quals es pot produir agregació proteica i formació de fibres amiloides, tal i com s'observa en diverses malalties neurodegeneratives. L'intercanvi de dominis permet la formació d'oligòmers amb extrems oberts, en els quals cada domini intercanviat es pot unir a una nova cadena polipeptídica, generant un agregat lineal que acabarà precipitant dins la cèl·lula.

Les malalties de deposició proteica es poden dividir en dos grans grups segons si els agregats proteics presenten o no les característiques pròpies de les fibril·les amiloides.

La formació de fibril·les amiloides és un procés d'autoassociació proteica, específic i ordenat, que porta a l'ensamblatge de dues o més protofibril·les a través d'una estructura axial de fulls β apilats, i que va ser descrita inicialment en estats patogènics tals com l'Alzheimer (Sunde and Blake 1997). S'ha proposat que qualsevol proteïna té el potencial de formar aquest tipus de fibril·les (Dobson 2003). La deposició extracel·lular de fibres amiloides s'ha trobat en més de 25 síndromes clínics ben descrits, i cada un associat a una proteïna característica com a constitutiva de la fibril·la (Sipe and Cohen 2000; Westermarck et al. 2005; Pepys 2006). Algunes malalties, tals com l'Alzheimer i la diabetis de tipus II s'associen a la deposició extracel·lular de fibril·les amiloides, però no s'ha demostrat que la seva causa es trobi en aquesta deposició (Pepys 2006). També hi ha casos de proteïnes formadores de fibril·les en d'altres organismes, com ara els agregats de Sup35 en llevats (Glover et al. 1997). Tot i això, no tots els processos de formació de fibres amiloides per intercanvi de dominis resulten perjudicials per l'organisme. En el cas de llevats, s'ha descrit un mecanisme de transferència hereditària d'informació mediat per proteïnes que generen canvis fenotípics a través d'agregacions amiloides (Sondheimer and Lindquist 2000). En *E. coli* fibres extracel·lulars de tipus amiloide s'impliquen en processos de colonització i unió a hostes (Chapman et al. 2002). Alguns fongs produeixen proteïnes que oligomeritzen formant cobertes hidrofòbiques per les espores (Mackay et al. 2001; Hakanpaa et al. 2004).

Les fibril·les de tipus no amiloide no presenten estructuració axial amb fulls β apilats. Un exemple és l'HgbS característica de l'anèmia falciforme, la qual diposita formant fibril·les de tipus no amiloide, però mantenint l'estructura nativa. Una simple mutació puntual converteix l'hemoglobina A normal en l'hemoglobina S que agrega formant fibril·les a l'interior dels glòbuls vermells (Geever et al. 1981).

L'intercanvi de dominis, quan es dona de manera irregular, generant dominis desaparellats, pot portar a la formació de fibres amiloides, les quals s'associen a malalties neurodegeneratives (Cohen and Prusiner 1998; Bennett et al. 2006). S'ha descrit que la cistatina C i la Prp, que en humans poden generar fibres amiloides, poden formar dímers i tetràmers mitjançant intercanvi tridimensional de dominis (Janowski et al. 2001; Lee and Eisenberg 2003), els quals poden representar intermediaris en el procés de formació de les fibres amiloides (Sanders et al. 2004). El fet que monòmers de cistatina C dissenyats per prevenir l'intercanvi de dominis redueixin de manera significativa la formació de fibres amiloides dona força a la idea que l'intercanvi tridimensional de dominis sigui un procés clau en la formació de fibril·les (Nilsson et al. 2004).



OBJECTIUS



L'estudi de les ribonucleases pertanyents a la superfamília de les ribonucleases de tipus pancreàtic ha permès descobrir que algunes d'aquestes presenten activitats especials, en aparença allunyades de les seves funcions biològiques bàsiques de degradació del RNA. D'entre aquestes funcions especials destaca pel seu interès l'activitat antitumoral, que ha obert el camí a la possibilitat d'utilitzar les ribonucleases com agents terapèutics en la lluita contra el càncer. En els darrers anys, diferents grups han construït, mitjançant enginyeria de proteïnes, variants de la RNasa A o de la HP-RNasa que presenten modificacions que han estat dissenyades per tal que aquests enzims adquireixin propietats citotòxiques. Aquestes modificacions confereixen a la molècula o bé una major capacitat d'internalització o bé la capacitat d'escapar a l'acció de l'inhibidor citoplasmàtic de ribonucleases (RI). L'obtenció, per part del nostre grup, d'una variant de la HP-RNasa, anomenada PE5, que no evadeix l'RI, tot i ser citotòxica, obre el camí a una nova estratègia de construcció de ribonucleases antitumorals. La seqüència de PE5 conté un senyal de localització nuclear (NLS) atípic, el qual li permet transitar fins al nucli de la cèl·lula mitjançant la unió a unes proteïnes específiques de transport nuclear, anomenades importines. Es postula que la base molecular del comportament citotòxic de PE5 radica en què les importines competeixen amb l'RI per unir-se a PE5. Així, part de la fracció de molècules de PE5 que poden arribar al citoplasma serien transportades al nucli, on no hi ha RI, sense estar complexades amb aquest. Com a conseqüència de la desaparició de molècules de PE5 del citoplasma, l'equilibri entre la HP-RNasa lliure i la HP-RNasa complexada amb l'RI es desplaçaria cap a la primera forma. Un cop al nucli, la degradació del RNA nuclear induiria la mort cel·lular.

En aquesta tesi es va proposar demostrar que PE5 deu la seva activitat citotòxica a la presència d'un NLS. També es va voler dissenyar variants de l'HP-RNasa que presentessin una seqüència NLS ben caracteritzada per tal de comprovar si la direccionalització al nucli podia ésser una bona estratègia per a dotar de citotoxicitat una RNasa no citotòxica. Amb aquesta finalitat es van dissenyar noves variants de la HP-RNasa en les quals la seqüència del NLS de l'antigen T llarg de SV40 va ser introduïda en diferents regions de l'enzim. Aquestes regions es van escollir per tal de permetre una major o menor competència entre l'RI i les importines per unir-se a la RNasa.

Una estratègia alternativa que s'ha emprat per dotar una RNasa d'activitat citotòxica és la de l'escapament a l'RI per adopció d'estructura quaternària. Les RNases dimèriques no s'uneixen a l'RI degut a impediments estèrics. És el cas de la BS-RNasa o de dímers artificials de l'RNasa A o de l'HP-RNasa. A més les RNases dimèriques són un model interessant per a l'estudi del procés d'oligomerització per intercanvi de dominis, procés que es postula que pot estar a la base d'algunes patologies que apareixen com a conseqüència de l'agregació proteica. En el nostre laboratori vam identificar les condicions necessàries per tal de poder obtenir en solució el dímer cristal·logràfic de la variant de l'HP-RNasa anomenada PM8, la qual cristal·litza en forma de dímer mitjançant intercanvi tridimensional de dominis. A més, vam obtenir un dímer equivalent estabilitzat per un pont disulfur intercatenari a partir de la variant PM8E103C. La caracterització dels dos dímers va portar a la proposta d'un nou mecanisme de dimerització per intercanvi de dominis basat en dues etapes. Segons aquest model, el fet que el pèptid xarnera de la forma monomèrica es trobi en una conformació desordenada, i que gràcies a la dimerització s'estabilitzi en una conformació que facilita l'intercanvi de dominis, es presentava com un dels principals determinants d'aquest procés. En aquesta tesi també es va proposar aprofundir en aquest procés de dimerització. En concret, els objectius proposats van ser:

1. Estudiar la importància de la seqüència de localització nuclear de PE5 i la seva arribada a nucli en les propietats citotòxiques d'aquesta variant de l'HP-RNasa.
2. Construir variants de PM5 que presentin a l'extrem C-terminal una seqüència NLS addicional derivada de l'antigen T llarg de SV40, la qual no interfereixi en la unió de l'RNasa a l'RI.
3. Construir variants de PM5 en les quals s'introdueixi la mateixa seqüència NLS en una regió de l'HP-RNasa implicada en l'ancoratge de l'RI, de manera que, a banda d'introduir un nou NLS, s'impedeixi la unió de l'RNasa a l'RI.
4. Construir noves variants de PM8 i PM8E103C en les quals se suprimeixin les cadenes laterals d'un conjunt de residus presumptament implicats en el procés d'intercanvi de dominis. Aquests residus estarien implicats en el grau de flexibilització del pèptid xarnera i en la formació de la interfície oberta del dímer.

// objectius

5. Caracteritzar per tècniques d'NMR, el procés d'intercanvi de dominis de PM8 mitjançant l'estudi de la variació de la flexibilitat del pèptid xarnera en les diferents variants construïdes i en les seves formes parentals, produïdes en medi marcat (^{15}N o $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$).
6. Determinar l'efecte de les diferents mutacions introduïdes sobre la capacitat de dimerització i d'intercanvi de dominis i correlacionar aquests efectes amb els resultats d'NMR obtinguts.



MATERIAL I MÈTODES 2.



2.1 - MATERIAL BIOLÒGIC

2.1.1 - Soques Bacterianes

En la realització d'aquest treball s'han emprat les següents soques de l'espècie *Escherichia coli*, amb el genotip i procedència detallats en cada cas.

E. coli DH5 α

Aquesta soca ha estat utilitzada per a l'obtenció de les diferents construccions realitzades a partir del vector pET17b. S'ha utilitzat aquesta soca perquè presenta una elevada taxa de transformabilitat, a més del caràcter genotípic *hsdR17*(rk⁻;mk⁺), que li proporciona la capacitat de metilar el DNA propi i alhora l'incapacita de destruir qualsevol DNA forà. Aquesta característica és essencial per tal d'obtenir el DNA que serà utilitzat com a motlle en les reaccions de mutagènesi dirigida per oligonucleòtid, el qual ha d'estar metilat en la seqüència reconeguda per l'enzim de restricció *DpnI*.

Genotip: F⁻, ϕ 80 Δ *lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*), U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk⁻; mk⁺), *phoA*, *supE44*, λ , *thi1*, *gyrA96*, *relA1*

E. coli BL21 (DE3)

Aquesta soca ha estat utilitzada per a l'expressió de les diferents construccions obtingudes a partir del vector pET17b. Ha estat obtinguda de Novagen (EUA). Presenta la particularitat que en el gen *int* del genoma bacterià s'hi ha inserit el profag DE3 (derivat del fag λ). Conseqüentment, el gen *int* bacterià resta inactivat. La inactivació del gen *int* fa que el profag DE3 no es pugui escindir del genoma ni tornar-se a integrar, de manera que resta com a lisogen estable. El profag DE3 consisteix en un fragment de DNA que conté el promotor *lacUV5*, un fragment inicial del gen *lacZ* i el gen que codifica per la RNA polimerasa de T7. En aquestes condicions, l'únic promotor capaç de conduir la transcripció de la RNA polimerasa de T7 és el promotor *lacUV5*, el qual és induïble amb IPTG. En afegir IPTG a un cultiu d'aquesta soca en fase exponencial de creixement, es transcriu la RNA polimerasa de T7, la qual transcriu el gen que ha estat clonat darrera del promotor reconegut per aquesta polimerasa en el plasmidi pET17b.

Genotip: F⁻, *ompT*⁻, *hsdS*(rB⁻ mB⁻), *dcm*⁺, *gal*, λ (DE3), *lon*⁻

E. coli M15 [pREP4]

La importina alfa genera una elevada toxicitat en les cèl·lules hoste, de manera que per tal d'augmentar els seus nivells d'expressió les construccions derivades d' α -importina van ser transformades i expressades en aquesta soca, la qual presenta còpies extra en trans del repressor *lac* en el plasmidi accessori pREP4. Així s'aconsegueix minimitzar els nivells d'expressió basal de la proteïna recombinant. El plasmidi pREP4 incorpora un gen de resistència a kanamicina com a marcador de selecció.

Genotip: *nal*^S, *str*^S, *rif*^S, *thi*⁻, *lac*⁻, *ara*⁻, *gal*⁺, *mtl*⁻, F⁻, *recA*⁺, *uvr*⁺, *lon*⁺, [pREP4: Kan^R, *lacI*]

2.1.2 - Vectors Procariotes

2.1.2.1 - Vectors derivats de pET17b

Per al clonatge i l'expressió de les diferents construccions recombinants d'HP-RNasa descrites en aquest treball, s'ha utilitzat el vector pET17b (Studier and Moffatt 1986; Rosenberg et al. 1987; Studier et al. 1990), procedent de Novagen (Madison, EUA).

Aquest vector presenta un origen de replicació d'*E. coli* (*ori*) i un promotor del tipus T7/*lac*, la qual cosa significa que està format per la fusió de l'operador *lac* i el promotor de la RNA polimerasa de T7. A més, el plasmidi codifica pel repressor *lac* (*lacI*) i és portador del gen de resistència a l'ampicil·lina. Quan aquest vector s'utilitza en lisògens del tipus DE3 per l'expressió dels gens forans, el repressor *lac* actua tant sobre el promotor *lacUV5*

de la soca hoste per reprimir la transcripció de la RNA polimerasa de T7, com sobre el promotor de la RNA polimerasa de T7 del plasmidi per bloquejar la transcripció del gen forà. Darrera d'aquesta seqüència presenta una regió policonnectora amb deu possibles dianes, on es poden inserir els gens forans.

2.1.2.2 - Vectors derivats de pET22b(+)

L'onconasa es troba clonada en el vector pET22b(+) (Better et al. 1988), procedent de Novagen (Madison, EUA). Aquest vector presenta un origen de replicació d' *E. coli* (ori) i un promotor del tipus T7lac. El vector també conté la seqüència pelB de 63 pb que codifica per un pèptid senyal d'exportació periplasmàtica. Darrera d'aquesta seqüència presenta una zona policonnectora amb deu possibles dianes, on es poden inserir els gens forans, expressant-se la proteïna per la qual codifiquen fusionada al pèptid pelB. Aquest pèptid està dissenyat per exportar les proteïnes heteròlogues al periplasma de la cèl·lula bacteriana.

2.1.2.3 - Vectors derivats de pGEX4T2

En l'expressió de l' α -importina de *Xenopus laevis* s'ha utilitzat un plasmidi derivat de pGEX4T2 (Amersham Biosciences) facilitat pel Dr Dirk Görlich (ZMBH, Heidelberg). Es va construir una variant truncada d'aquesta proteïna, en la qual es va eliminar el segment autoinhibitori que es troba en el domini IBB, entre els residus 41 i 51. El fragment del gen comprès entre els residus 59 i 529 va ser amplificat per PCR utilitzant dos oligonucleòtids que introduïren als extrems 3' i 5' una diàna de restricció per l'enzim BamHI i una per XhoI, respectivament. El producte de la PCR es va digerir amb aquests dos enzims i va ser clonat dins el plasmidi pGEX4T2. Com a resultat la proteïna truncada resultant, anomenada $\Delta 59-529$ Imp α , es troba fusionada a l'extrem C-terminal de la glutatí S-transferasa (GST).

2.1.3 - Línies Cel·lulars Eucariotes

En el present treball s'han emprat les següents línies cel·lulars, les característiques de les quals es troben descrites a la **taula 2.1**.

taula 2.1 Característiques generals de les línies cel·lulars utilitzades.

nom	codi ATCC	organisme	origen	morfologia	creixement
HeLa	CCL-2	<i>Homo sapiens</i>	adenocarcinoma de cèrvix	epitelial	adherent
A-431	CRL-1555	<i>Homo sapiens</i>	carcinoma epitelial	epitelial	adherent

Informació obtinguda de l'American Type Culture Collection (ATCC)

2.2 - MÈTODES MICROBIOLÒGICS

2.2.1 - Medis de Cultiu

Pel creixement i propagació de les diferents soques bacterianes s'han utilitzat els medis de cultiu LB (*lysogeny broth*) i TB (*terrific broth*). El medi LB s'ha utilitzat de manera general en el creixement de les soques, mentre que el medi TB, molt més ric, s'ha utilitzat de manera puntual per tal de millorar l'expressió d'algunes de les variants produïdes. En les produccions d'importina s'ha utilitzat el medi 2xYT. Les composicions per un litre són en cada cas:

Medi LB

Tripton	10 g
Extracte de llevat	5 g
NaCl	10 g

Enrasar a un volum final de 1 litre amb aigua destil·lada. Cal ajustar el pH a 7.2 amb NaOH, esterilitzant posteriorment a l'autoclau durant 20 min a 121°C.

Per l'obtenció de medi sòlid per plaques de cultiu s'afegeixen 15 g d'agar per litre de medi (1.5% final).

Medi TB

Triptona	12 g
Extracte de llevat	24 g
Glicerol 80%	4 ml
Fosfat potàssic monobàsic	2.31 g
Fosfat potàssic dibàsic	12.5 g

La triptona i l'extracte de llevat es dissolen en 900 ml d'aigua destil·lada, mentre que les sals es dissolen en 100 ml. Les dues solucions i el glicerol 80% s'esterilitzen per separat, a l'autoclau durant 20 min a 121°C. Una vegada estèrils, les diferents solucions es reuneixen, mantenint les condicions d'esterilitat necessàries.

Medi 2xYT

Triptona	16 g
Extracte de llevat	10 g
NaCl	5 g

Enrasar a un volum final d'1 litre amb aigua destil·lada. Cal ajustar el pH a 7.2 amb NaOH, esterilitzant posteriorment a l'autoclau durant 20 min a 120°C.

2.2.2 - Antibiòtics

Quan es treballa amb soques transformades amb vectors, els medis de cultiu s'han de suplementar amb els antibiòtics pels quals el vector confereix resistència. D'aquesta manera creixen només les cèl·lules portadores del vector. En la suplementació dels medis es parteix d'una solució mare esterilitzada d'antibiòtic.

Si cal suplementar medi sòlid, l'antibiòtic s'afegeix al medi ja fred, just abans de distribuir-lo a les plaques.

L'antibiòtic de selecció de les cèl·lules que contenen el plasmidi pET17b, pET22b(+), pGEX4T2 o derivats és l'ampicil·lina, la qual es prepara en una solució d'emmagatzematge 100 mg/ml en aigua destil·lada. Una vegada preparada aquesta solució, s'esterilitza per filtració (0,22 µm de diàmetre de porus) i es guarda aliquidada a -20°C. Per al seu ús, la solució mare es descongela i s'addiciona al medi en condicions estèrils. La concentració de treball d'ampicil·lina en els diferents medis de cultiu ha estat de 100 µg/ml.

2.2.3 - Cultius Líquids de Soques Bacterianes

Tot el material que s'usa per a la manipulació de microorganismes ha de ser estèril. El material i la majoria de reactius s'esterilitzen a l'autoclau amb l'excepció dels antibiòtics, que s'esterilitzen per filtració a través d'un filtre de 0.22 µm. En general, les condicions d'esterilització a l'autoclau són de 20 min a 120°C.

El volum del medi de cultiu ha estat sempre com a màxim 1/5 part de la capacitat del flascó.

Els cultius de menys de 10 ml s'han preparat sempre a partir d'una colònia única aïllada en placa de Petri o bé d'un glicerinat. Per a cultius de volum superior sempre s'ha fet créixer abans un pre-inòcul de volum adequat, referit normalment com a cultiu *overnight* (O/N), per després afegir-lo al medi de cultiu a una relació 1:100 (inòcul:medi). El temps d'incubació dels cultius O/N ha estat sempre d'entre 12 i 15 h. No s'han realitzat incubacions de més durada, ja que pot veure's reduïda la població de cèl·lules portadores del vector d'interès, en favor de la població de cèl·lules sense vector.

Tot els cultius s'han incubat a 37°C i en agitació constant d'entre 200 i 250 rpm.

Totes les manipulacions s'han de fer a la cabina de flux laminar. Aquesta s'esterilitza per irradiació durant 10 min amb llum ultraviolada i mentre no s'atura el flux es pot considerar estèril. També es convenient, si la cabina s'ha utilitzat moltes vegades, rentar la superfície de treball amb etanol. També és convenient treballar amb la flama encesa i flamejar qualsevol tub, pot o ampolla que s'obri. La nansa de Kolle s'esterilitza flamejant-la al bunsen i la de Digrafsky, flamejant-la amb l'ajut d'etanol 95%.

2.2.4 - Manteniment de les Soques

Per al manteniment a curt termini de les soques de *E. coli*, portadores o no de plasmidis, es cultiven en plaques de Petri amb medi LB i es guarden a 4°C en posició invertida.

Les plaques han d'estar etiquetades convenientment (soca, plasmidi i data de sembra) i seques (si és necessari es poden deixar obertes dins de la cabina de flux laminar per tal d'assecar-les). un cop sembrades, les plaques s'incuben en posició invertida a 37°C durant una nit fins que les colònies siguin visibles i després es guarden a 4°C protegides amb parafilm.

El procediment dut a terme per a l'obtenció dels glicerinatats consisteix en inocular una colònia de la soca desitjada en 10 ml de medi LB, incubar a 37°C en agitació (250 rpm) O/N, prendre una alíquota de 800 µl del cultiu, transferir-la a un tub Eppendorf estèril i afegir 200 µl d'una solució de glicerol 80% esterilitzada a l'autoclau (16% final). S'homogeneïtza i es guarda a -80°C.

Per inocular un cultiu a partir d'un d'aquests estocs congelats, es toca amb una nansa de Kolle, esterilitzada a la flama, la superfície del glicerinat (superficialment descongelat) i es realitza una estria en medi sòlid. Posteriorment es selecciona una colònia i s'inocula en un nou medi líquid. El glicerinat es retorna al congelador sense que s'hagi deixat descongelar completament.

2.3 - CULTIU DE CÈL·LULES EUCARIOTES

2.3.1 - Medis de Cultiu

Les línies cel·lulars A-431 i HeLa s'ha fet créixer amb medi DMEM-L-glutamina (Dulbecco's modified Eagle's medium) (GibcoRTM) suplementat amb 10% de sèrum boví fetal (Fetal Calf Serum Gold, PAA laboratories) i 50 U/ml de penicil·lina-estreptomicina (GibcoRTM). Totes les solucions suplementades en el medi han estat filtrades amb filtres de 0.22 µm de diàmetre.

Els mateixos medis utilitzats pel creixement, però amb una suplementació del 20% de sèrum boví fetal, són utilitzats per processos de congelació i descongelació.

Per tal de preparar el medi DMEM-L-glutamina suplementat amb el 10% de sèrum boví fetal i antibiòtics es descongela el sèrum boví fetal prèviament inactivat i dispensat en vials de 50 ml, es tempera el medi DMEM-L-glutamina Dulbecco's (500ml) i se'n descarten 50 ml. S'hi addicionen 47,5 ml de sèrum boví fetal inactivat prèviament filtrat amb filtre de 0.22 µm i 2.5 ml de solució estoc de penicil·lina-estreptomicina.

2.3.2 - Expansió de línies cel·lulars de creixement adherent

Quan les cèl·lules arriben a condicions de confluència es procedeix a subcultivar per a assegurar-ne el seu creixement exponencial.

Les incubacions s'han realitzat en un incubador amb ambient saturat d'aigua, a 37°C i 5 % de CO₂. Per a les línies de creixement adherent, els cultius s'han de trobar en un estat de semiconfluència d'entre el 75 i el 100 % en el moment de ser subcultivats. Si es dilueixen més tard, el fenomen d'inhibició per contacte entre les cèl·lules atura el seu creixement i, finalment, condueix a la seva mort. Si se subcultiven abans, obtindrem una fase de latència més llarga del normal, alentint-se l'establiment del cultiu. Les característiques de creixement varien en cada línia cel·lular.

El primer pas per al subcultiu de cèl·lules que creixen en monocapa és desenganxar-les del substrat mitjançant un tractament amb tripsina. La suspensió de cèl·lules resultant pot ser subdividida o diluïda tot seguit en medi fresc.

Cal inicialment eliminar el medi vell amb una pipeta estèril, rentar la monocapa de cèl·lules adherides al flascó amb 10 ml de PBS (GibcoRTM) estèril per tal d'eliminar les restes de sèrum boví fetal del medi, els quals

actuarien inhibint l'acció de la tripsina, i afegir la solució de tripsina IM (GibcoRTM) a 37°C fins que cobreixi la monocapa de cèl·lules adherida a la superfície del flascó (~5 ml per a flascons de cultiu de 25 ml).

Incubar el flascó a 37°C i 5 % CO₂, controlant regularment al microscopi el moment en què les cèl·lules deixen d'estar adherides. Una vegada les cèl·lules s'han deslligat de la superfície del flascó, afegir 10 ml de medi complet fresc i temperat a 37 °C, pipetejant la suspensió de cèl·lules repetidament. Aquesta acció mecànica permet dissociar les cèl·lules que encara romanen lligades entre elles o a la superfície del flascó. El sèrum boví fetal que conté el medi inhibirà l'acció de la tripsina, evitant que aquesta malmeti les cèl·lules.

En aquest punt es pot realitzar la dilució que correspongui en nous flascons. Incubar en un incubador saturat de vapor d'aigua a 37°C i 5 % CO₂. Per la simple propagació del cultiu cal subcultivar cada vegada que les cèl·lules assoleixin la pre-confluència, que sol ser cada 2-3 dies.

2.3.3 - Congelació i descongelació de les línies cel·lulars

Al llarg del temps, les cèl·lules cultivades pateixen canvis en el seu creixement, morfologia i característiques genètiques. Aquests canvis afecten negativament la reproductibilitat dels resultats experimentals. La criopreservació de les línies cel·lulars és una tècnica que permet preservar i retenir la integritat de les línies cel·lulars subjectes a estudi. Congelant les cèl·lules s'evita la senescència cel·lular, la transformació i la pèrdua accidental d'una línia per mort o contaminació.

Els cultius seleccionats per a la criopreservació han d'estar en fase exponencial de creixement. La suspensió de cèl·lules es congela en presència de dimetil sulfòxid (DMSO, Sigma, USA) com a agent crioprotector que evita la formació de cristalls de gel que malmetrien les cèl·lules. La composició del medi de congelació pot variar lleugerament d'una línia cel·lular a una altra, en funció de la seva sensibilitat als processos de congelació i descongelació. El medi pot estar compost simplement amb medi de cultiu suplementat amb un 10% de DMSO. Tot i això, en augmentar la quantitat de sèrum la viabilitat és major, de manera que en el cas de treballar amb cèl·lules més sensibles és millor utilitzar medi amb 20% de sèrum i suplementat amb un 10% de DMSO o bé, en els casos de més sensibilitat, només sèrum suplementat amb un 10% de DMSO.

Passat un mínim de 4 h i un màxim d'un mes a -80°C les cèl·lules es transfereixen a un tanc amb nitrogen líquid (-196°C) on s'emmagatzemen durant llargs períodes de temps sense deteriorament cel·lular apreciable. L'emmagatzematge a -80°C és possible tot i que es detecta deteriorament de les cèl·lules després de poques setmanes o mesos.

2.3.3.1 - Congelació de línies cel·lulars de creixement adherent

Primerament cal aspirar el medi d'un flascó amb cèl·lules crescudes fins a un 80% de confluència, desadherir les cèl·lules mitjançant un tractament amb tripsina i centrifugar a 1500 rpm durant 5 min i eliminar el sobrenedant.

A continuació, resuspendre el sediment en el volum necessari de medi (preferiblement fred) per tal de tenir 2 - 4 · 10⁶ cèl/ml. En un criotub posar 900 µl de medi amb cèl·lules i afegir tot seguit 100 µl (10% del volum final) de dimetil sulfòxid (DMSO).

Cal tenir en compte que els agents crioprotectors, malgrat ser imprescindibles en el procés de congelació, són altament tòxics per les cèl·lules a temperatura ambient i a concentracions superiors al 2%. Per aquest motiu és aconsellable realitzar la congelació i descongelació amb la màxima rapidesa possible per tal de garantir-ne la viabilitat cel·lular.

Homogeneïtzar i congelar en un dipòsit de congelació gradual d'isopropanol a -80°C durant 24 h.

Transferir els vials a una cambra de nitrogen líquid per a una conservació a llarg termini.

2.3.3.2 - Descongelació de línies cel·lulars

Per tal de recuperar les cèl·lules congelades i minimitzar l'efecte de la mort cel·lular és imprescindible realitzar una descongelació ràpida i fer una sembra a una alta densitat.

Agafar el vial del recipient de nitrogen líquid, i col·locar-lo immediatament en un vas de precipitats amb gel fins que es pugui començar apreciar una descongelació del menisc. Llavors, afegir gota a gota amb una pipeta pasteur medi de descongelació (DMEM-L-glutamina suplementat amb 20% sèrum boví fetal) en fred fins que estigui totalment descongelat. Llavors, transferir ràpidament el contingut del vial a un tub de centrifuga estèril i diluir el DMSO fins a 1% addicionant un mínim de 9 ml del mateix medi de descongelació.

Seguidament centrifugar 10 min a 1500 rpm a temperatura ambient i descartar el sobrenedant. Aquest rentat es realitza per tal d'eliminar el DMSO residual del medi fresc. Resuspendre suaument el sediment en 1 ml de medi complet, i transferir a un flascó de cultiu amb 9 ml de medi.

2.3.4 - Recompte del nombre de cèl·lules

El recompte cel·lular es porta a terme mitjançant la utilització del blau tripà al 1% (Sigma, EUA). Les cèl·lules vives apareixen refringents i clares, mentre que les mortes s'observen tenyides de blau. Això es deu a que el colorant no pot penetrar a les cèl·lules vives, mentre que sí que ho pot fer a les mortes.

Partint d'un cultiu en flascó, tripsinitzar les cèl·lules en el cas de soques de creixement adherent i afegir la suspensió cel·lular a un tub estèril de centrifuga, centrifugar 10 min a 1500 rpm i resuspendre les cèl·lules amb 5 ml de medi de cultiu. Preparar un Eppendorf amb 40 μ l de blau tripà 0.1% i 10 μ l de suspensió cel·lular assegurant una perfecta homogeneïtzació de la suspensió per evitar alteracions en els resultat del recompte.

Preparar l'hemocitòmetre (Cambra de Neubauer) amb la col·locació d'un cobreobjectes i aplicar la mostra sota el cobreobjectes per capil·laritat. Finalment, disposar l'hemocitòmetre en el microscopi invertit i realitzar el recompte de cèl·lules que apareixen als 4 quadrants, els quals a la vegada estan subdividits en 16 quadrats.

Per obtenir la concentració de cèl·lules s'aplica la següent fórmula:

$$N = \frac{\bar{n} \cdot FD}{V}$$

N = nombre de cèl·lules per ml
 \bar{n} = nombre mitjà de cèl·lules per quadrant
FD = factor de dilució en afegir el blau tripà
V = volum del quadrant (ml)

2.4 - TÈCNIQUES DE DNA RECOMBINANT

2.4.1 - Manipulació del DNA

A l'hora de treballar amb àcids nucleics és important l'esterilitat del material i la cura amb què ha de treballar qui el manipula, per tal d'evitar contaminacions amb nucleases que podrien degradar la mostra o amb altres fragments de DNA que podrien donar lloc a resultats no desitjats. Per això, cal esterilitzar en l'autoclav les puntes de pipeta, tubs Eppendorf i qualsevol altre material que hagi de tenir un contacte directe amb el DNA. Pel mateix motiu també cal sotmetre a un procés d'autoclavat totes les solucions que hagin de prendre contacte amb el DNA i si això no és possible esterilitzar-les per filtració. Així mateix, és recomanable manipular les solucions amb guants.

2.4.2 - Obtenció de DNA Plasmídic

En aquest treball s'ha utilitzat un Kit comercial, QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen), seguint el protocol següent:

Transferir 1.5 ml d'un cultiu de nit de cèl·lules transformades amb el vector d'interès a un tub Eppendorf. Centrifugar a 12000 g durant 30 s i eliminar el sobrenedant per aspiració. Resuspendre el sediment amb 250 μ l de solució de resuspensió. En aquest pas es produeix el trencament de les cèl·lules i l'eliminació del RNA.

Aplicar 250 µl de solució de lisi cel·lular. La solució esdevindrà viscosa i lleugerament clara per la desnaturalització del DNA. Afegir 350 µl de solució neutralitzadora. La solució es tornarà tèrbola i blanquinosa degut a la precipitació del DNA genòmic. Centrifugar 10 min a 12000 g. Aplicar sobrenedant a les columnes d'adsorció de sílica i centrifugar durant 60 s. La sílica de les columnes reté el DNA. Rentar del DNA amb 0.75 ml de solució de rentat. Es fan dos centrifugacions de 60 s per eliminar restes d'etanol. Assecar durant 15 min a 37°C per acabar d'eliminar l'etanol, el qual podria interferir en les reaccions enzimàtiques posteriors, i eluir el DNA amb 60 µl d'aigua milliQ temperada a 60°C.

2.4.3 - Electroforesi de DNA en Gel d'Agarosa

Aquesta tècnica, s'ha utilitzat per analitzar preparacions de DNA plasmídic, productes de digestió amb enzims de restricció i productes de PCR, a banda de ser l'etapa preliminar per a la purificació de fragments de DNA.

Per a la preparació dels gels s'ha utilitzat agarosa de baixa electroendosmosi (Ecogen, Espanya). Pel què fa al percentatge d'agarosa per a la preparació del gel, ha oscil·lat sempre entre un 0.8% i un 1.2%, en funció de la mida dels fragments que es volen separar, com més gran sigui el fragment de DNA menys percentatge cal utilitzar d'agarosa. El tampó d'electroforesi utilitzat és el TAE (Tris-Acetat 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0). En aquestes condicions el DNA es mou en base a la seva càrrega i se separa en funció de la longitud i conformació de les molècules. Les molècules de DNA es visualitzen tenyint el gel amb un agent que s'intercala entre les bases del DNA (Bromur d'etidi, afegit al gel a una concentració final de 0.5 µg/ml) i que emet fluorescència quan és transil·luminat amb llum UV.

2.4.4 - Purificació de Fragments de DNA a Partir de Gels d'Agarosa

Per dur a terme la purificació de fragments de DNA s'ha utilitzat el Kit comercial QIAquick® Gel Extraction Kit (Quiagen), que permet purificar fragments d'entre 70 pb i 10 Kb, seguint el protocol de la casa comercial.

Tallar la banda de DNA minimitzant al màxim la mida del fragment escindit, posar la banda de gel en un tub Eppendorf i pesar-la. Solubilitzar el fragment amb 300 µl de tampó de solubilització per cada 100 mg de gel. Incubar 20 min a 50°C – 60°C o fins que el fragment de gel estigui totalment dissolt, carregar la columna d'adsorció de sílica proporcionada per la casa comercial amb la solució i centrifugar 60 s a 12000 g, eliminar el sobrenedant i addicionar 750 µl de tampó de rentat (conté etanol). Centrifugar dues vegades a 12000 g durant 60 s, evaporar les restes d'etanol mantenint 15 min a 37°C i eluir el DNA amb 60 µl d'aigua milliQ estèril temperada a 60°C.

2.4.5 - Precipitació del producte de PCR

La reacció en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) permet l'obtenció d'un gran elevat nombre de còpies d'un motlle de DNA. Per tal de concentrar el producte de la PCR, aquest pot ser precipitat de la següent manera.

Recuperar el producte de PCR i afegir-hi 0.1 volums d'acetat sòdic 3 M pH 5.5 i 3 volums d'etanol absolut refredat a -20°C. Agitar en vòrtex i guardar a -80°C durant 1 h o a -20°C tota la nit (~10 h). Passat aquest temps, centrifugar durant 25 min a 12000 g i eliminar el sobrenedant. Afegir-hi 500 µl d'etanol al 70% refredat a -20°C i centrifugar durant 5 min a 12.000 g, aspirar el sobrenedant i deixar assecar el sediment a 37°C durant 10 - 15 min. Finalment, resuspendre el sediment en el volum desitjat d'aigua milliQ estèril.

2.4.6 - Estimació Espectrofotomètrica de la Concentració de DNA

Per a fer una estimació de la quantitat de DNA present en una dissolució, s'ha mesurat l'absorbància a 260 nm d'una dilució de la solució de DNA de la qual es vol determinar la concentració. S'accepta de forma general que una unitat de densitat òptica a 260 nm equival a una concentració de 50 µg/mL de DNA de doble cadena i a 20 µg/mL d'un oligonucleòtid.

2.4.7 - Utilització d'Enzims que Modifiquen el DNA

2.4.7.1 - Tractament amb enzims de restricció

Durant aquest treball s'han utilitzat enzims de restricció de tipus II per obtenir fragments de DNA amb extrems cohesius, els quals es poden purificar i unir per donar lloc a molècules de DNA quimèriques.

L'activitat dels enzims de restricció i la seva especificitat es troba directament relacionada amb el pH, la força iònica i la temperatura a la qual la reacció es duu a terme. Així, les condicions òptimes d'incubació per a cada digestió dependran dels requeriments específics de l'enzim a fi d'assolir el seu màxim d'activitat i un correcte reconeixement de la seva diana específica. Tanmateix, les condicions generals que s'han emprat es resumeixen a continuació.

El volum d'enzim de restricció addicionat a la reacció no ha sigut mai superior al 10% del volum final de la digestió. Això és degut a que els enzims de restricció són subministrats en solucions al 50% de glicerol i per a molts d'ells, una concentració de glicerol superior al 5% en la barreja de reacció els fa perdre l'especificitat de reconeixement. Aquesta pèrdua d'especificitat també es pot manifestar, si la concentració d'enzim respecte la de DNA és massa elevada (> 25 U/ μ g de DNA).

Les barreges de restricció s'han incubat a 37°C entre 3 i 12 h.

En el cas de reaccions amb dos enzims de restricció diferents, l'addició dels enzims era simultània quan tots dos presentaven activitat òptima en les mateixes condicions, és a dir, en el mateix amortidor. Una vegada realitzada la digestió caldrà separar els fragments obtinguts mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa seguida d'una purificació d'aquests fragments.

2.4.7.2 - Reacció de lligament amb la DNA lligasa de T4

Barrejar els fragments de DNA que es volen lligar i que prèviament s'hauran purificat d'un gel d'agarosa amb el volum necessari d'amortidor de la DNA lligasa de T4 (Roche). Aquest amortidor el proporciona concentrat deu vegades la casa comercial juntament amb l'enzim, i és recomanable guardar-lo en alíquotes de 5-10 μ l a -20°C. En el cas d'extrems cohesius és aconsellable utilitzar una relació entre vector i insert de 1:4.

Afegir la lligasa de DNA de T4 (Roche) en una proporció de 0.1 - 0.5 unitats per μ g de DNA. Incubar la reacció de lligament a 18°C durant 15 - 20 h. Si es treballa amb concentracions més elevades de lligasa (fins a 5 U/ μ g de DNA), es pot optar, sobretot en lligaments d'extrems cohesius, per incubacions de 2 - 4 h a temperatura ambient, cosa que redueix el risc de degradació dels components de la reacció.

En el cas d'un lligament vector-insert que no requereixi manipulacions posteriors, aquesta mescla pot utilitzar-se directament per a transformar cèl·lules competents. En el cas que no es pensi utilitzar immediatament, es pot guardar a -20°C.

2.4.8 - Mutagènesi Dirigida per Oligonucleòtid

La mutagènesi dirigida per oligonucleòtid és una tècnica que permet introduir qualsevol mutació que es desitgi en una seqüència de DNA coneguda. Existeixen diverses variants de la tècnica, de les quals en aquest treball se n'han utilitzat dues.

2.4.8.1 - Mutagènesi dirigida per oligonucleòtid mitjançant el mètode del megaprimer

Aquest mètode utilitza DNA de doble cadena com a motlle i una polimerasa amb activitat correctora 3' - 5', la DeepVentDNA polimerasa (New England Biolabs, EUA), en dos passos d'amplificació del gen sobre el qual es treballa per tal d'introduir-hi la mutació, amb un posterior tractament amb enzims de restricció i lligament sobre un vector.

Es parteix del gen a mutar clonat entre dues dianes de restricció situades en les zones immediatament anterior i posterior, en un vector adequat, pel qual es tenen dos oligonucleòtids universals que hibriden als extrems del gen, i un oligonucleòtid mutagènic.

Es realitza un primer pas d'amplificació per PCR que comprèn la zona situada entre el punt de la mutació i un dels extrems del gen, utilitzant un dels oligonucleòtids universals i l'oligonucleòtid mutagènic, complementari a la cadena oposada que l'oligonucleòtid universal. El producte de la reacció d'amplificació es precipita, es purifica en un gel d'agarosa i s'utilitza com a encebador en una segona amplificació, de manera conjunta amb el segon oligonucleòtid universal.

El producte d'aquesta segona amplificació es precipita i digereix amb els dos enzims de restricció. Després es procedeix al seu lligament en un vector digerit amb els mateixos dos enzims, i es transforma sobre cèl·lules competents d'*E. coli*.

A continuació es detallen les condicions de la PCR utilitzades en els dos passos d'amplificació.

Barreja de reacció primera PCR

DeepVent Buffer (x10)	10 µl
dNTPs 10 mM (0.2 mM final)	2 µl
dsDNA motlle (~50 ng)	5 µl
Oligonucleòtid universal (5 pmol/µl)	5 µl
Oligonucleòtid mutagènic (5 pmol/µl)	5 µl
Aigua milliQ estèril	73 µl
DeepVent DNA Polimerasa (1 U)	0.5 µl

Barreja de reacció segona PCR

DeepVent Buffer (x10)	10 µl
dNTPs 10 mM (0.2 mM final)	2 µl
dsDNA motlle (~50 ng)	5 µl
Oligonucleòtid universal (5 pmol/µl)	5 µl
Megaprimer	40 µl
Aigua milliQ estèril	38 µl
DeepVent DNA Polimerasa (1 U)	0.5 µl

Programa (Termociclador)

Desnaturalització inicial 2 min a 94°C

Desnaturalització	1 min 15 s a 94°C	} x 30 cicles
Hibridació	1 min a 50°C	
Extensió	1 min 15 s a 72°C	
Extensió final	5 min a 72°C	
	Indefinidament a 4°C	

2.4.8.2 - Mutagènesi dirigida per oligonucleòtid mitjançant el mètode *QuikChange*

El mètode *QuikChange*, desenvolupat per Stratagene (EUA), permet introduir una mutació específica en una seqüència de DNA coneguda, utilitzant DNA de doble cadena com a motlle. El procés consta de dues etapes: una amplificació no exponencial amb un termociclador per tal de produir DNA mutat i una digestió amb l'enzim de restricció *DpnI* per tal d'eliminar el DNA parental.

Per a aquest mètode és necessari un vector de doble cadena portador del gen a modificar i dos encebadors sintètics que continguin la seva seqüència amb la mutació desitjada. Aquests dos encebadors han de ser complementaris entre ells i d'aquesta manera es generen, utilitzant la reacció en cadena de la polimerasa, plasmidis portadors dels gens amb la mutació desitjada. El producte és tractat amb l'enzim de restricció *DpnI*, la funció del qual és digerir el DNA que contingui una cadena parental (metilat o hemimetilat) i així seleccionar el DNA sintetitzat que conté la mutació (no metilat). *DpnI* és un enzim de restricció de tipus II que reconeix la diana GATC únicament quan la guanina es troba metilada a la posició 6'. La reacció de digestió es realitza a 37°C durant un mínim d'1 h. El producte digerit pot ser transformat directament sobre cèl·lules d'*E. coli*.

Reacció d'amplificació

Amortidor de Reacció 10x	5 µl
DNA motlle (1 ng/ml)	10 µl
Oligonucleòtid Mutagènic #1	4 µl
Oligonucleòtid Mutagènic #2	4 µl
dNTPs 10 mM (0.2 mM final)	1 µl
DeepVent DNA Polimerasa	1 µl
Aigua milliQ	25 µl

Programa (Termociclador)

Desnaturalització inicial	30 s a 95°C	
Desnaturalització	30 s a 95°C] x 20 cicles
Hibridació	1 min a 55°C	
Extensió	12 min a 68°C	
	Indefinidament a 4°C	

Calen uns dos min d'extensió per cada quilobase de longitud del plasmidi sobre el qual s'introdueix la mutació.

2.4.8.3 - Disseny dels oligonucleòtids

De manera general, quan es vol substituir una única base per una altra, els oligonucleòtids utilitzats per a la mutagènesi han de tenir una longitud de 21 bases, amb la mutació centrada. En el cas d'insercions, delecions o canvis de més d'una base consecutiva, els oligonucleòtids han de tenir com a mínim una longitud de 15 bases a cada costat de la regió de mutació. La longitud de cada braç s'ha d'ajustar de manera que la temperatura teòrica d'hibridació (o temperatura de fusió, T_m) sigui superior a 42°C, d'acord amb la fórmula següent:

$$T_m = 81.5 + 0.41 \cdot (\%GC) - 675 / N - \%desaparellament$$

on N és el nombre de nucleòtids totals de l'oligonucleòtid, i $\%desaparellament$ és el percentatge de nucleòtids que no hibriden amb la seqüència patró.

El protocol de *QuikChange* recomana que els oligonucleòtids tinguin una T_m per sobre de 70°C , per tal de poder ajustar la temperatura d'hibridació de la PCR.

Els oligonucleòtids han estat subministrats, de manera liofilitzada, per Roche Diagnostics S.L. (Roche Molecular Biochemicals, Alemanya). Aquests liofilitzats s'han resuspès amb $200\ \mu\text{l}$ d'aigua milliQ, s'ha determinat la seva concentració espectrofotomètricament, i s'han preparat alíquotes de cada oligonucleòtid a la concentració de treball per a cada metodologia.

2.4.9 - Obtenció de Cèl·lules Competents d'*E. coli*

Posar $10\ \text{ml}$ de medi LB en una ampolla de $75\ \text{ml}$ o en un tub Falcon, i inocular-hi la soca desitjada d'*E. coli* procedent del socari. Aquestes soques estan glicerinades.

Incubar durant tota la nit a 37°C i $180\ \text{rpm}$.

L'endemà, reinocular a una dilució $1/100$ a partir del cultiu de nit ($100\ \mu\text{l}$ de cultiu de nit en $10\ \text{ml}$ de medi) i incubar a 37°C i $180\ \text{rpm}$ fins a assolir una DO_{550} de $0,6 - 0,7$ (aproximadament $2\ \text{h}$).

Aliquotar en tubs Eppendorf o bé transferir a un tub Falcon de manera estèril.

Centrifugar a $4000\ \text{rpm}$ a 4°C durant $10\ \text{min}$. Descartar el sobrenedant de manera estèril. Resuspendre el sediment amb el mateix volum de $\text{CaCl}_2\ 100\text{mM}$ fred i estèril.

Incubar en gel durant un mínim de $30\ \text{min}$.

Centrifugar novament a $4000\ \text{rpm}$ a 4°C durant $10\ \text{min}$. Descartar el sobrenedant de manera estèril. Resuspendre el sediment amb $1/10$ del volum de $\text{CaCl}_2\ 100\text{mM}$ fred i estèril. Si s'escau, aliquotar el volum en tubs Eppendorf de $100\ \mu\text{l}$.

A partir d'aquí es poden transformar les cèl·lules competents o emmagatzemar-les a -80°C . En cas de guardar-les, en el pas final s'ha d'utilitzar una solució de $\text{CaCl}_2\ 100\text{mM}$ amb glicerol per obtenir-ne una concentració final del 15% .

2.4.10 - Transformació de Cèl·lules Competents d'*E. coli*

Afegir estèrilment, a cada alíquota de $100\ \mu\text{l}$ de cèl·lules competents, $2\ \mu\text{L}$ de DNA plasmídic si prové de minipreps o $10\ \mu\text{L}$ de DNA si prové de la reacció amb *DpnI* posterior al *QuikChange* o d'un lligament (un màxim de $50\ \text{ng}$ de DNA en un volum que no sobrepassi $1/10$ del volum de la fracció o alíquota). Agitar suaument, colpejant amb un dit, per tal d'homogeneïtzar la solució.

Incubar en gel durant $1 - 2\ \text{h}$ (mínim $20\ \text{min}$) i posar els tubs Eppendorf al bany a 42°C durant $1 - 2\ \text{min}$. Incubar els tubs en gel durant $10\ \text{min}$.

Realitzar una recuperació fenotípica, afegint $300\ \mu\text{l}$ (transformants de minipreps) o $600\ \mu\text{L}$ (transformants de *QuikChange* i lligaments) de medi LB líquid a cada tub Eppendorf. Incubar a 37°C en agitació suau durant $1\ \text{h}$.

Centrifugar $1\ \text{min}$ a $12000\ \text{rpm}$, eliminar el volum de medi necessari fins un volum final de $200\ \mu\text{l}$ i fer una sembra en plaques d'agar LB suplementades amb l'antibiòtic pel qual el vector que s'està manipulant proporcioni resistència (marcador de selecció). Incubar les plaques en una estufa a 37°C O/N, fins que s'observin les colònies transformants ($12 - 15\ \text{h}$).

2.4.11 - Seqüenciació de DNA

La seqüenciació del DNA de les construccions realitzades en aquest treball ha estat el mètode que ha permès validar els diferents clons obtinguts. S'ha seguit l'anomenat mètode del dideoxiribonucleòtid.

S'ha emprat el kit comercial *ABI PRISM® dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems, EUA), el qual utilitza *AmpliTaq® DNA polymerase*. Aquest sistema es basa en reaccions de seqüenciació cíclica amb dideoxiribonucleòtids marcats amb un fluoròfor. L'enzim *AmpliTaq® DNA polymerase* és

// material i mètodes

una variant de la polimerasa de *Thermus aquaticus* sense activitat correctora 3'→5', de manera que s'evita l'eliminació dels ddNTPs que s'incorporen a la cadena i aturen la síntesi.

La tècnica es basa en la síntesi d'una cadena complementària a la cadena motlle, per part de la *AmpliTaq*[®] DNA polymerase, fins que s'incorpora un dideoxiribonucleòtid marcat fluorescentment (ddNTP) al qual li manca el grup OH en 3' de la ribosa, de manera que s'atura la síntesi, ja que la polimerasa no pot seguir incorporant dNTPs. D'aquesta manera es van generant fragments de diferents mides aleatòriament, els quals són posteriorment separats i identificats mitjançant un seqüenciador automàtic. La identificació dels fragments es pot fer gràcies a la presència de fluoròfors units a cada un dels ddNTPs. Hi ha quatre tipus de ddNTP, un per cada nucleòtid, els quals porten incorporat un fluoròfor diferent, per facilitar la seva identificació.

Per portar a terme aquesta tècnica, cal obtenir prèviament gran quantitat del fragment de DNA a seqüenciar, és a dir del gen teòricament mutat. Aquest DNA s'aconsegueix utilitzant la reacció en cadena de la polimerasa PCR i utilitzant els encebadors universals T7term i T7prom, els quals són complementaris a les regions del promotor i finalitzador dels gens clonats en el vector pET17.

Un cop amplificat el fragment de DNA a seqüenciar, es realitza una segona PCR amb els ddNTPs i l'enzim *AmpliTaq*[®] DNA polymerase.

A continuació es detallen les condicions per a dur a terme la primera i la segona PCR.

2.4.11.1 - Primera PCR (amplificació de l'insert)

Barreja de reacció

DeepVent Buffer (x10)	10 µl
dNTPs 10 mM (0.2 mM final)	2 µl
dsDNA motlle (~50 ng)	5 µl
T7Prom (5 pmol/µl)	5 µl
T7Term (5 pmol/µl)	5 µl
Aigua milliQ estèril	73 µl
DeepVent DNA Polimerasa (1 U)	0.5 µl

Programa (Termociclador)

Desnaturalització inicial	2 min a 94°C	
Desnaturalització	1 min 15 s a 94°C] x 30 cicles
Hibridació	1 min a 50°C	
Extensió	1 min 15 s a 72°C	
Extensió final	5 min a 72°C	
	Indefinidament a 4°C	

El DNA amplificat es precipita i es purifica a partir d'un gel d'agarosa. El DNA s'elueix en 40 µl d'aigua milliQ estèril escalfada prèviament a 65°C.

2.4.11.2 - Reacció de seqüenciació (PCR asimètrica)

Utilitzant el kit comercial *ABI PRISM*[®] dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems), com a motlle el dsDNA obtingut en la primera PCR i com a encebador T7Prom o T7Term.

Barreja de reacció

dsDNA motlle	5.5 µl
Encebador (T7 term o T7prom, 5pmol/µl)	0,5 µl
Ready Mix	4 µl

El Ready Mix és subministrat per la casa comercial i conté ddNTPs, dNTPs, Tris-HCl (pH 9.0), MgCl₂ i AmpliTaq DNA Polimerasa,.

Programa (Termociclador)

Desnaturalització inicial	2 min a 96°C	
Desnaturalització	30 s a 96°C	} x 25 cicles
Hibridació	15 s 50°C	
Extensió	4 min a 60°C	
	Indefinidament a 4°C	

2.4.11.3 - Precipitació de la reacció de seqüenciació

Utilitzant el T7 Term i el T7 Prom per separat com a encebadors s'aconsegueix la seqüenciació de cada una de les cadenes, la qual cosa permet seqüenciar tot el gen. Els diferents fragments marcats amb ddNTPs es precipiten afegint 0.1 volums d'Acetat de Sodi 3 M pH 5.5 i 3 volums d'etanol absolut al producte de la reacció. Es vorteja suaument i es deixa 15 min a temperatura ambient. Es transfereix a un tub Eppendorf.

Centrifugar 15 min a 15000 rpm, aspirar el sobrenedant, afegir-hi 250 µl d'etanol 70% fred i vortejar suaument. Centrifugar 5 min a 15000 rpm, aspirar el sobrenedant i assecar 15 min a l'estufa a 37°C. Resuspendre amb 10 µl de formamida, vortejar suaument i deixar 10 min a temperatura ambient. Fer un pols de centrifuga i portar al servei de seqüenciació.

2.4.12 - Tècniques de treball amb RNA**2.4.12.1 - Aïllament d'RNA de cèl·lules tractades amb RNasa**

A partir de dos flascons T75 confluents, se sembren 6 nous flascons a una dilució 1:5 i es deixen créixer durant 12 h. Tres dels flascons seran utilitzats per l'aïllament de l'RNA total de les cèl·lules tractades amb PE5 o onconasa, i les utilitzades com a control. Els tres restants seran utilitzats per l'aïllament selectiu de l'RNA citoplasmàtic i nuclear de les cèl·lules amb els mateixos tractaments.

S'afegeix a dos dels flascons PE5 dissolta en medi DMEM 10% FBS per obtenir una concentració final de 5 µM, a dos flascons s'afegeix onconasa a una concentració final de 0.5 µM, i dos es deixen com a control, afegint-hi medi DMEM 10% FBS sense RNasa. S'incuben durant 18 h a 37°C i 5% CO₂. Passat aquest temps, es tripsinitzen i recullen les cèl·lules amb PBS, i se'n fa un recompte.

Se centrifuga la suspensió cel·lular 5 min a 1500 rpm per tal d'eliminar el PBS.

Per la purificació de l'RNA s'ha utilitzat el kit PARIS (Applied Biosystems / Ambion) seguint els següents passos:

Aïllament d'RNA total

1. Resuspendre en 500 µl de *Cell Disruption Buffer* fred, homogeneïtzant bé.

Separació i aïllament d'RNA nuclear i citoplasmàtic

1. Resuspendre en 500 µl de *Cell Fractination Buffer* fred, homogeneïtzant amb compte.
2. Incubar 10 min en gel.
3. Centrifugar 5 min a 500 xg i 4°C.
4. Retirar amb compte el sobrenedant, que correspondrà a la **fracció citoplasmàtica**.
5. Resuspendre el pellet nuclear en 500 µl de *Cell Disruption Buffer* fred.

6. Afegir 500 µl de *2x Lysis / Binding Solution* atemperada a 37°C.

7. Afegir 500 µl d'etanol.

8. Transferir el volum a una columneta.

9. Centrifugar 1 min a 10000 rpm i aspirar el través.

10. Repetir per tal de passar la totalitat del volum per la columneta.

11. Afegir 700 µl de *Wash Solution 1*.

12. Centrifugar 1 min a 10000 rpm i aspirar el través.

13. Afegir 500 µl de *Wash Solution 2/3*.

14. Centrifugar 1 min a 10000 rpm i aspirar el través.

15. Afegir 500 µl de *Wash Solution 2/3*.

16. Centrifugar 1 min a 10000 rpm i aspirar el través.

17. Centrifugar 1 min a 10000 rpm.

18. Transferir la columneta a un nou tub Eppendorf.

19. Afegir 70 µl d'*Elution Solution* a 95°C.

20. Centrifugar 30 s a 10000 rpm.

21. Repetir l'elució dues vegades, fins obtenir un volum final d'aproximadament 200 µl.

22. Aliquotar en fraccions de 20 µl i guardar a -80°C.

2.4.12.2 - Electroforesi d'RNA en Gel d'Agarosa

Es prepara un gel d'agarosa a l'1.5%, amb formaldehid 15% i en tampó MEN (a partir d'una solució d'emmagatzematge 10x MOPS 200 mM Acetat de Sodi 50 mM EDTA 10 mM pH 7.0).

Es carrega l'RNA corresponent a 5×10^5 cèl·lules, afegint 1.5 volums de tampó de càrrega (100 µl formamida, 20 µl MEN 10x, 30 µl formaldehid, 2 µl bromur d'etidi).

Es visualitza transil·luminant amb llum ultraviolada.

2.5 - MÈTODES D'EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS

2.5.1 - Expressió d'RNasa en *E. coli* BL21(DE3)

2.5.1.1 - Procediment general

Les condicions de producció i purificació de les RNases recombinats han estat les mateixes en tots els casos, utilitzant sempre la soca *E. coli* BL21(DE3).

A partir d'un glicerinat o d'una colònia aïllada d'una sembra en placa d'*E. coli* BL21(DE3) transformat amb el vector corresponent es realitza un inòcul en 10 ml de medi LB suplementat amb ampicil·lina 100 µg/ml. S'incuba durant 10 min i es reinocula a una dilució 1/100 sobre 40 ml de medi LB suplementat amb ampicil·lina 100 µg/ml. D'aquesta manera s'assegura que la fase estacionària no és massa llarga i que la quantitat de cèl·lules viables és suficientment gran. S'incuba durant 10 - 12 h a 37°C i sota agitació constant a 180 rpm.

Després d'aquest temps d'incubació, s'inoculen 5 flascons Erlenmeyer amb 400 ml de medi líquid LB suplementat amb ampicil·lina 100 µg/mL amb una dilució 1/100 del volum provinent del cultiu de nit. Es deixa créixer el cultiu a 37°C sota agitació constant de 250 rpm durant 3 h, fins que s'assoleix un valor d'absorbància a 550 nm de 2 - 2.5.

En aquest moment s'afegeix al cultiu IPTG (Fermentas, EUA) a una concentració final de 1 mM, partint d'una solució mare de 200 mM en aigua milliQ preparada just abans d'induir. Es deixa créixer el cultiu induït durant 3 - 4 h, en les mateixes condicions i, tot seguit, se centrifuga a 5000 rpm durant 10 min per tal de recollir les cèl·lules. Aquestes es guarden a -20°C fins al moment de començar el procés de purificació.

Per tal d'analitzar la producció de proteïna recombinant durant la inducció, es prenen mostres d'1 ml de cultiu en el moment anterior a la inducció i al finalitzar el temps d'inducció. Les mostres se centrifuguen a 12000 g durant 1 min, s'elimina el sobrenedant per aspiració i es resuspèn el sediment cel·lular en 100 µl de tampó d'aplicació de proteïnes x1 amb β - mercaptoetanol. L'anàlisi de l'expressió es duu a terme electroforèticament, utilitzant gels de poliacrilamida SDS tenyits amb Coomassie blue per visualitzar proteïnes i/o revelats per l'activitat amb un zimograma.

2.5.1.2 - Producció de variants d'HP-RNasa marcades amb ¹⁵N o ¹³C¹⁵N

Per tal d'obtenir proteïnes marcades amb isòtops pel treball amb ressonància magnètica nuclear (NMR) es va seguir un procediment equivalent al descrit en el punt previ, substituint el medi de creixement per medi mínim M9 (Cambridge Isotope Labs) suplementat amb ¹⁵NH₄Cl 1 g/l com a única font de nitrogen en el cas de marcatges amb ¹⁵N, o suplementat amb ¹⁵NH₄Cl 1 g/l com a única font de nitrogen i ¹³C₆ glucosa com a única font de carboni en el cas de marcatges amb ¹³C i ¹⁵N.

2.5.2 - Expressió d'α-Importina en *E. coli*

A partir d'un glicerinat d'*E. coli* transformat amb el vector corresponent a la importina truncada Δ59-529Impα es realitza un inòcul en 10ml de medi 2xYT suplementat amb ampicil·lina 100 µg/ml. S'incuba durant 10 min a 30°C amb agitació constant de 200 rpm i es reinocula a una dilució 1/100 sobre 40 ml de medi 2xYT suplementat amb antibiòtic. S'incuba durant 10 - 12 h a 30°C i sota agitació a 180 rpm.

Després d'aquest temps d'incubació, s'inoculen 5 flascons Erlenmeyer amb 400 ml de medi líquid LB suplementat amb antibiòtic amb una dilució 1/100 del volum provinent del cultiu de nit. Es deixa créixer el cultiu a 30°C sota agitació constant de 200 rpm durant 3 h, fins que s'assoleix un valor d'absorbància a 550 nm d'1.5.

En aquest moment s'indueix l'expressió de proteïna amb IPTG a una concentració final de 1 mM, partint d'una solució mare de 200 mM en aigua milliQ preparada just abans d'induir. Es deixa créixer el cultiu induït durant 3 - 4 h a 28°C i 200 rpm i, tot seguit, se centrifuga a 5000 rpm durant 10 min per tal de recollir les cèl·lules.

2.5.3 - Purificació d'RNases Recombinants

2.5.3.1 - Procediment general de purificació de variants de l'HP-RNasa

En aquest treball s'ha seguit el protocol de purificació descrit a (Canals et al. 1999) i a (Ribo et al. 2001), el qual permet obtenir quantitats suficients de proteïna pura i homogènia. El protocol utilitzat, adaptat per a la purificació a partir de dos litres de cultiu induït es descriu a grans trets tot seguit.

El procés de purificació s'inicia amb l'expressió heteròloga de la proteïna. Les cèl·lules recollides per centrifugació es resuspenen en un tampó i tot seguit es procedeix al seu trencament per mitjà de tres passades a la premsa de French. A continuació s'aïllen els cossos d'inclusió per centrifugació, que és on es troba la major part de la proteïna recombinant produïda per la cèl·lula. El procés continua amb la desnaturalització d'aquests agregats amb clorur de guanidini (Gnd-HCl) i amb la seva reducció amb glutatió reduït (GSH). La mostra, desnaturalitzada i reduïda, es dilueix lentament, abocant-la de gota en gota en un tampó de replegament que conté L-Arginina (L-Arg) i glutatió oxidat (GSSG) a pH 8.5. A través de la dilució, tant el Gnd-HCl com el GSH passen a estar a una concentració molt baixa, de manera que s'inicia el replegament i, gràcies a la presència de GSSG, la reoxidació de la proteïna. Per a la reoxidació de la proteïna el parell redox GSH/GSSG es troba en el tampó de replegament a una concentració optimitzada per a la reoxidació de les cisteïnes de l'HP-RNasa. La mostra s'incuba en aquestes condicions a 4°C durant 24 - 48 h i tot seguit se li ajusta el pH a 5.0 amb àcid acètic glacial per tal d'aturar el procés d'oxidació.

Com que en aquest estadi la mostra es troba molt diluïda, es procedeix a la seva concentració per mitjà d'un sistema d'ultrafiltració tangencial. La mostra ja concentrada es dialitza contra l'amortidor d'equilibrat d'una columna de bescanvi catiònic Mono-S d'HPLC, de la qual s'elueix mitjançant un gradient de clorur de sodi. Es recull el pic principal del cromatograma, que correspon a la proteïna pura i homogènia.

De manera detallada, el protocol utilitzat és el següent:

1. Les cèl·lules, provinents de la centrifugació de 2 litres de cultiu, es resuspenen en 30 ml de Tris HCl 50 mM EDTA 10mM pH 8.0. En aquest punt es poden congelar les cèl·lules a -20°C.
2. Si les cèl·lules han estat prèviament congelades, es descongelen en un bany a 37°C i se sotmeten tres vegades a la premsa de French. Un bon indicador de la lisi és la pèrdua de terbolesa i l'augment de viscositat de la suspensió.
3. Centrifugar les mostres a 10000 rpm durant 45 min a 4°C. Els cossos d'inclusió (agregats de proteïna i mRNA) no són solubles i es poden aïllar per centrifugació, un cop aïllats es poden solubilitzar mitjançant agents desnaturalitzants
4. Descartar el sobrenedant i solubilitzar el sediment que conté els cossos d'inclusió en 10 ml de Tris-Acetata 100 mM, Gdn-HCl 6 M, EDTA 2 mM pH 8.5. Desprendre el sediment de les parets del tub amb l'ajuda d'una micropipeta. Reduir els cossos d'inclusió afegint GSH en pols fins a una concentració final de 0,1 M. Ajustar el pH a 8.5 amb Tris sòlid i tot seguit bombollejar amb N₂ per tal de desplaçar l'O₂ present. Deixar la solució tancada sota agitació suau 2 h. L'eliminació dels agents desnaturalitzant i reductor per dilució i la reoxidació de les cisteïnes permeten el replegament de la proteïna. Aquesta etapa és determinant de cara a assolir correctament l'estructura nativa.
5. Centrifugar les mostres a 10000 rpm durant 30 min a 4°C, amb la finalitat d'eliminar el material insoluble.
6. Diluir el sobrenedant, abocant-lo gota a gota, en 2 l de Tris - Acetata 100 mM, L-Arg 0.5 M, GSSG 1 mM, EDTA 2 mM pH 8.5.
7. Incubar la mostra a 4°C sense agitació, durant un mínim de 24 h.
8. Ajustar pH de la mostra a 5.0 amb àcid acètic glacial per tal d'aturar la reoxidació.

9. En aquest punt la major part de la proteïna s'ha d'haver replegat, però és possible que apareguin precipitats de molècules mal plegades, que poden ser eliminats per centrifugació de la mostra, durant 30 min a 10000 rpm.
10. Concentrar fins poc més de 50 ml per ultrafiltració tangencial. En aquest treball s'ha utilitzat un cartutx de cel·lulosa de 5000 NMWL (*cutoff*) juntament amb la bomba Acrylic Minitan II. Un cop acabat, rentar l'aparell i el cartutx d'ultrafiltració tangencial amb NaOH al 4% (p-v).
11. Dialitzar la mostra contra 5 l d'acetat sòdic 50 mM pH 5.0 a 10°C, fent un canvi de tampó.
12. Centrifugar a 10000 rpm durant 45 min, reservar el sobrenedant i filtrar-lo amb un filtre de 0.22 µm.
13. Aplicar la mostra a una columna Mono-S HR 5/5 (Pharmacia, Suècia) d'intercanvi catiònic. El tampó d'equilibrat ha estat acetat de sodi 50 mM pH 5.0, i la proteïna s'ha eluït utilitzant un gradient de clorur de sodi amb el tampó acetat de sodi 50 mM NaCl 1M pH 5.0, el qual ha de ser optimitzat per cada una de les variants, ja que les diferències en la seqüència aminoacídica que determinen diferències en càrrega neta de la proteïna, comporten diferències en l'afinitat per la columna. L'elució de la proteïna se segueix amb una mesura contínua d'absorbància a 280 nm i es recull el volum corresponent al pic principal del cromatograma.
14. Dialitzar la mostra enfront d'aigua milliQ per tal d'eliminar les sals de la mostra. S'han emprat sacs de diàlisi *Spectra/Por*® MWCO: 3.500.
15. Congelar les mostres a -80°C i liofilitzar-les.
16. La mostra liofilitzada s'emmagatzema a -20°C en un recipient tancat. D'aquesta manera la proteïna es manté en òptimes condicions durant mesos.

De manera puntual s'han introduït canvis en el protocol general per tal de millorar el procés de purificació.

En el cas de les variants de l'HP-RNasa PM5NLS β 4 β 5 i PM5scNLS β 4 β 5 es va realitzar una resuspensió i tractament amb la premsa de French utilitzant acetat sòdic 50 mM EDTA 10mM pH 5.0 per tal de mantenir la proteïna en forma insoluble, mentre que la cromatografia de bescanvi catiònic es va utilitzar Tris - HCl 50 mM pH 8.0 com a tampó d'equilibrat i Tris - HCl 50 mM NaCl 1M pH 8.0 per eluir la proteïna.

2.5.3.3 - Purificació de l'onconasa

El protocol optimitzat de purificació d'onconasa és similar a l'utilitzat per les variants d'HP-RNasa. Cal però un pas extra de diàlisi després de la que segueixi la concentració de la mostra, per tal d'activar l'enzim.

Així doncs, després de concentrar la mostra per ultrafiltració tangencial es dialitza contra 5 l de fosfat potàssic dibàsic (FPDB) 200 mM EDTA 2 mM pH 7.2 a temperatura ambient. Aquesta diàlisi permet la ciclació de la glutamina N-terminal a àcid piroglutàmic, canvi imprescindible per l'activitat de l'enzim.

La mostra activada és llavors dialitzada contra 5 l d'FPDB 20 mM pH 7.2, aplicada a una columna Mono-S HR 5/5 i eluïda en un gradient de clorur de sodi.

2.5.4 - Obtenció de Dímers Covalents d'HP-RNasa

Per a l'obtenció de dímers covalents d'HP-RNasa s'ha usat la variant PM8E103C (Rodríguez et al. 2006a) o altres variants descrites en aquest treball que contenen una cisteïna addicional en la posició 103, localitzada en la interfície oberta del dímer.

Per tal d'afavorir la dimerització cal tenir els monòmers a una concentració elevada. Per això, cal pesar ~3 mg d'RNasa i dissoldre'ls en 1 ml de Tris 100 mM pH 8.5, prendre una mesura de la concentració i ajustar a 2.5 mg/ml.

// material i mètodes

Afegir-hi 1.7 µl de ditiotreitòl (DTT) 1 M per cada ml de solució de proteïna, per obtenir una concentració final d'1.7 µM. A aquesta concentració el DTT reduirà de manera selectiva les cisteïnes lliures en posició 103, alliberant possibles glutacions que hi hagi units procedents de la purificació.

Incubar 30' al bany a 25°C per tal que s'estabilitzin els dímers de manera no covalent, mitjançant les interaccions que es donen a la seva interfície oberta.

Deixar dialitzant O/N contra 2 l de Tris 50 mM pH 8.5 a 4°C, fent un canvi de diàlisi passades unes hores. Es permet així la formació dels pots disulfur entre les cisteïnes en posició 103 dels dos monòmers, estabilitzant-se els dímers de manera covalent.

Seguidament, s'atura la diàlisi amb l'addició d'àcid acètic glacial a una relació 1:1000 (v/v) i es realitza una separació de les formes dimèrica i monomèrica mitjançant una columna de gel-filtració Sephadex G75 HR 10/30 (Pharmacia) equilibrada amb Acetat de Sodi 200 mM pH 5.0. La fracció corresponent a la forma dimèrica s'elueix aproximadament als 12 ml, mentre que el monòmer s'elueix als 14 ml.

La integració dels pics obtinguts amb el seguiment de l'absorbància a 280 nm permet el càlcul de la relació de dímer obtingut.

Les fraccions corresponents a les formes dimèrica i monomèrica poden ser dialitzades contra aigua milliQ i liofilitzades per tal de conservar-les a -20°C durant llargs períodes de temps.

2.6 - ANÀLISI I CARACTERITZACIÓ PROTEICA

2.6.1 - Determinació de la Massa Molecular

La massa molecular de les proteïnes recombinants estudiades en aquest treball s'ha comprovat per espectrometria de masses MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight mass spectrometry*) en un equip BRUKER-BIFLEX. Aquesta anàlisi s'ha dut a terme al Servei de Seqüenciació de Proteïnes i Biocomputació del Institut de Biologia i Biotecnologia de la Universitat Autònoma de Barcelona i als Serveis Tècnics de Recerca de la UdG.

2.6.2 - Determinació de la Quantitat de Proteïna

2.6.2.1 - Mètode espectrofotomètric

La concentració de les diferents proteïnes es va determinar per espectrofotometria, a partir del valor d'absorbància a 280 nm, segons la fórmula:

$$Abs = [proteïna] \cdot \epsilon_{280} \cdot l$$

on *Abs* és l'absorbància a 280 nm, *[proteïna]* és la concentració de la proteïna en M, ϵ_{280} és el coeficient d'extinció molar a 280 nm utilitzant els coeficients d'extinció molar calculats seguint el mètode de Pace (Pace et al. 1995) i *l* és la longitud de pas de la cubeta utilitzada en cm.

2.6.2.2 - Mètode de Bradford

La determinació de la quantitat de proteïna total també s'ha dut a terme utilitzant el mètode de Bradford (Bradford 1976). Aquest mètode es basa en el canvi del màxim d'absorció, de 465 nm a 595 nm, del colorant Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad, EUA) en solució àcida quan s'uneix a proteïna.

Inicialment cal preparar 1 ml de BSA (Sigma) a una concentració de 1 mg/ml en aigua milliQ i dispensar en tubs Eppendorf 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 i 4 µl de la solució de BSA i ajustar els volums fins a 400 µl amb aigua milliQ. Aquests tubs s'utilitzaran per a confeccionar una recta patró amb la qual determinar la concentració de la mostra problema.

A part, preparar una solució de la mostra problema que contingui idealment 0.4 mg/ml i preparar en tubs Eppendorf les dilucions d'aquesta mostra, afegint a 400 µl d'aigua milliQ diferents volums de proteïna 0.4 mg/ml (1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 µl).

Diluir 1:5 amb aigua milliQ el reactiu de Bradford i afegir 600 µl de reactiu de Bradford diluït a cada un dels tubs Eppendorf. Incubar a temperatura ambient durant 5 min i fer una lectura de l'absorbància a 595 nm.

2.6.3 - Electroforesi Discontínua en Gel de Poliacrilamida

L'electroforesi discontínua en gel de poliacrilamida en presència d'SDS (SDS-PAGE) permet la separació de proteïnes segons la seva massa molecular, gràcies a l'acció d'un camp elèctric. Ha estat el mètode analític utilitzat de manera rutinària per a la determinació del contingut proteic de cadascuna de les fraccions cel·lulars, i el seguiment dels processos de purificació, així com per a la determinació del grau de puresa de les mostres obtingudes al final del procés.

En aquest treball s'ha utilitzat el mètode d'electroforesi discontínua descrit per Lane & Harlow (Lane and Harlow 1982). Aquest mètode es caracteritza per la utilització d'un gel superior o gel apilador (amb una concentració d'acrilamida insuficient per separar les proteïnes) que té com a funció concentrar les proteïnes abans que entrin en el gel inferior o gel separador (amb una concentració superior d'acrilamida) el qual permetrà separar les proteïnes.

En el cas de la preparació d'un gel SDS-PAGE 15% el procediment és el següent:

1. Preparació del gel separador al 15% d'acrilamida (5 ml)

Acrilamida 30 % – Bisacrilamida 0.8%	2.5 ml
Tampó de gel separador (Tris/HCl 1.5M, pH 8.8 SDS 0.4%)	1.35 ml
Aigua milliQ	1.1 ml
TEMED	2 µl
Persulfat amònic 10% (p/v)	50 µl

2. Preparar el suport de polimerització dels gels i abocar la dissolució del gel separador en el suport evitant la formació de bombolles. Acte seguit afegir una capa fina d'aigua Milli-Q per facilitar la polimerització i evitar malformacions del front.

3. Preparació del gel concentrador (2 ml)

Acrilamida 30 % – Bisacrilamida 0.8%	0.33 ml
Tampó de gel separador (Tris/HCl 1.5M, pH 8.8 SDS 0.4%)	0.27 ml
Aigua Milli-Q	1.4 ml
TEMED	2 µl
Persulfat amònic 10% (p/v)	20 µl

4. Eliminar la capa d'aigua i abocar el gel concentrador. Col·locar el motlle formador de butxaques i deixar polimeritzar.

5. Preparar la cubeta d'electroforesi i l'amortidor d'elució:

100 ml d'amortidor d'elució x10 (Tris - HCl 0.25M, SDS 1%, glicina 1.92 M, pH 8.5)
900 ml d'aigua milliQ

// material i mètodes

6. Preparar les mostres aplicant amortidor d'aplicació de mostres x4 (Tris HCl 50mM SDS 8% glicerol 20% blau de bromofenol 0.02%) en una relació de 3:1. Si es vol que l'amortidor tingui caràcter reductor s'afegeix β - mercaptoetanol (15% v/v) al tampó d'aplicació.
7. Connectar la font d'alimentació a un voltatge constant de 80V i deixar avançar la separació fins que el tampó d'aplicació, que marca el límit de la separació, assolixi l'extrem inferior del gel (aproximadament dues hores).
8. Tenyir el gel de poliacrilamida amb blau de Coomassie: 0.1% (p/v) Coomassie Blue, 45% (v/v) metanol, 10% (v/v) àcid acètic.
9. Eliminar l'excés de colorant amb diversos rentats amb àcid acètic al 7%.

2.6.4 - Zimograma

Aquesta tècnica s'ha utilitzat per detectar l'activitat de les variants d'RNasa en un extracte. S'ha utilitzat el mètode de tinció negativa de gels de poliacrilamida-SDS amb poli(C) (Bravo et al. 1994).

Essencialment, la tècnica es caracteritza pel fet que el gel separador conté un substrat de la RNasa d'elevada massa molecular, el poli(C), que s'afegeix durant el procés d'entrecruament de les cadenes d'acrilamida. La tècnica consisteix en separar primer les proteïnes mitjançant una electroforesi convencional, per a continuació eliminar l'SDS del gel mitjançant rentats amb isopropanol aquós. D'aquesta manera es permet la renaturalització de les proteïnes. Una vegada plegades, les RNases recuperen la seva activitat enzimàtica i degraden localment el substrat del gel. Per tinció negativa (el gel se submergeix en colorants que tenyeixen els àcids nucleics) es visualitzen les bandes d'activitat.

Per a la realització d'un zimograma s'utilitza un procediment idèntic a l'utilitzat en la realització d'un gel d'electroforesi discontinua en gel de poliacrilamida-SDS amb les següents modificacions:

1. Preparació del gel separador:

En un vas de precipitats amb 1.1 ml d'aigua Milli-Q es dissolen 1.5 mg de poli (C) (Amersham). S'escalfa el recipient tapat a 37°C per facilitar la dissolució del poli(C), durant 10 min. Un cop dissolt s'afegeixen la resta de components del gel separador:

2. Revelat del gel:

El gel se sotmet a diferents rentats.

- a. 15 min en 50 - 100 ml de Tris-HCl 10 mM, isopropanol 20% pH 8.0 amb agitació, per tal d'eliminar el SDS. Aquest rentat es realitza dues vegades.
- b. 20 - 40 min en 50 ml de Tris-HCl 100 mM pH 8.0 amb agitació suau. En aquest pas les bandes que contenen RNasa degraden el poli(C).
- c. 10 - 15 min amb una solució de toluídina 0.1% (p/v), Tris-HCl 10mM pH 8.0 per tal de tenyir el poli(C) que no ha estat digerit.
- d. S'elimina l'excés de colorant rentant el gel amb aigua fins que apareixen bandes d'activitat.

2.6.5 - Anàlisi de la Interacció entre les RNases i l'Inhibidor

Per analitzar el nivell d'interacció de les variants d'RNasa amb l'RI, s'ha emprat una variant d'un mètode (Blackburn et al. 1977; Park et al. 2001) que es basa en la visualització de la degradació del substrat 16S- i 23S-rRNA d'*E. coli* per acció de les RNases en absència o presència de 40 unitats d'RI (on una unitat és la quantitat necessària per inhibir l'activitat de 5 ng d'RNasa A en un 50%), en un gel d'agarosa a l'1,2 %.

Cal preparar una solució amb 40 U d'RI (Promega, Madison, EUA) en tampó RIB (HEPES 20 mM, NaCl 125 mM, DTT 10 mM, EDTA 1 mM pH 7.0) i 15 ng de proteïna, en un volum total de 20 µl, i incubar durant 5 min a 37°C. Seguidament, afegir 1 µl de substrat 16S-23S rRNA (Roche, USA) a cada tub. Com a control d'integritat del substrat s'utilitza una mostra en la qual només s'afegeix el 16S-23S rRNA, sense inhibidor ni RNasa.

S'incuba durant 10 min a 37°C i s'atura la reacció amb 3 µl de tampó Stop (sacarosa 40%, blau de bromofenol 0.25%, dietilpirocarbonat 0.2%).

La degradació del substrat es determina aplicant les mescleres de reacció en un gel d'agarosa a l'1.5%, realitzant una tinció amb bromur d'etidi, i visualitzant el gel en un transil·luminador de llum UV. En aquelles mostres on s'observa degradació del substrat, l'enzim no ha perdut la seva activitat RNasa, i per tant no ha estat inhibit per l'RI.

2.6.6 - Anàlisi de la Interacció entre les RNases i la Importina

El sediment cel·lular provinent de la inducció de dos litres de cultiu d'*E.coli* BL21(DE3) transformada amb el vector pGEX4T2 (vegeu els apartats 2.1.2.3 i 2.5.2) es resuspèn en 50 ml de tampó d'unió (Tris 50 mM, NaCl 250 mM, MgCl₂ 5 mM, PMSF 1 mM pH 7.5) i es lisa amb la premsa de French. La mostra és centrifugada durant 30 min a 10000 rpm per tal d'eliminar les restes cel·lulars, i el sobrenedant corresponent a 0.5 l de cultiu induït s'incuba, durant 1.5 h a 4°C i amb agitació constant de 80 rpm, amb 1 ml de reina glutatió sepharosa 4B (Amersham Biosciences) prèviament equilibrada amb tampó d'unió.

Aquesta matriu és llavors abocada dins una columna, i rentada amb 10 ml de tampó d'unió per tal d'eliminar els compostos cel·lulars no units. De manera paral·lela, cal muntar una columna amb reina sense lisat cel·lular, la qual serà utilitzada com a control.

Després del rentat s'afegeixen 0.25 mg de RNasa dissolta en 2 ml de tampó d'unió i filtrada, i s'incuba durant 2 h a 4°C i 80 rpm. Es renta la reina amb tampó d'unió fins que s'elimina completament la RNasa no unida, cosa que es controla fent un seguiment de l'absorbància a 280 nm fins que s'estabilitza a zero.

S'elueix amb 2 ml de tampó d'elució (Tris 50 mM GSH 11.7 mM pH 8), recollint fraccions de 250 µl que posteriorment poden ser analitzades mitjançant un zimograma i/o gel SDS-PAGE.

2.6.7 - Anàlisi de l'Activitat Citotòxica Sobre Línies Cel·lulars

Eucariotes

2.6.6.1 - Assaig de proliferació cel·lular amb MTS

L'assaig de proliferació (Celltiter 96® Aqueous, Promega, USA) es basa en una sal de tetrazolium (MTS) que en cèl·lules viables és reduïda a un producte derivat del formazan, el qual absorbeix a 490 nm. Aquesta reducció la realitzen deshidrogenases mitocondrials de la cadena respiratòria del mitocondri presents en les cèl·lules metabòlicament actives.

Per a aquest assaig de proliferació s'han utilitzat les cèl·lules de les diferents línies tractades amb concentracions creixents de cadascuna de les variants.

El protocol es presenta adaptat per a cèl·lules A431, de creixement adherent, i variants de l'HP-RNasa. El nombre de cèl·lules pot variar en funció de la línia cel·lular escollida. En el cas de l'onconasa o d'altres RNases d'elevada citotoxicitat cal també adaptar les concentracions aplicades en el tractament.

1. Sembrar 2500 cèls/pouet (100 µl medi) en plaques de 96 pouets. Incubar durant 3 h per a permetre l'adhesió de les cèl·lules a la superfície dels pouets.
2. Afegir les dilucions d'enzim, prèviament esterilitzat per filtració amb filtres de 0.22 µm (Nalgene), necessàries per assolir la concentració desitjada dissoltes en 100 µl de medi DMEM, FCS 10% (volum final per pouet: 200 µl). Com a control de viabilitat 100 % s'ha utilitzat medi DMEM FCS 10%.

// material i mètodes

3. Concentracions aplicades: 60 μM , 20 μM , 6 μM , 2 μM , 0.6 μM i 0.2 μM . Les concentracions finals de tractament són la meitat de les aplicades.
4. Incubar 3 dies a 37°C i 5% CO_2 , en saturació de vapor d'aigua.
5. Aspirar el medi vell i afegir 100 μl de medi fresc a cada pouet. Seguidament aplicar 20 μl de solució de MTS a cada pou i incubar 1 - 4h a 37°C i 5% CO_2 .
6. Mesurar l'absorbància a 490 nm en un lector de plaques de 96 pous.
7. La citotoxicitat s'expressa en valors d' IC_{50} , que correspon a la concentració de cadascuna de les RNases que provoca una reducció del 50 % del valor de l'activitat metabòlica.

2.6.6.2 - Assaig de proliferació cel·lular amb MTT

De manera alternativa s'ha utilitzat un assaig de proliferació basat en una altra sal de tetrazolium (MTT, Sigma), el qual pot també ser reduït a un producte de formazan, els cristalls insolubles del qual poden ser dissolts en DMSO i la seva concentració determinada amb una mesura d'absorbància a 570 nm.

En ambdós casos els resultats d'un experiment individual es presenten com la mitjana de tres rèpliques, i cada experiment ha sigut repetit un mínim de tres vegades.

2.6.8 - Determinació de l'Estabilitat Tèrmica

2.6.8.1 - Espectrofotometria UV

L'estabilitat conformacional d'una proteïna pot ser determinada mitjançant el seguiment espectrofotomètric del desplegament induït per temperatura. Els canvis en l'entorn dels residus aromàtics durant aquest procés de desplegament poden ser monitoritzats mitjançant mesures d'absorbància a 287 nm, permetent-se la determinació de la temperatura mitja de fusió (T_m).

Per això, es dissol la proteïna a estudiar fins una concentració de 0.5 mg/ml en acetat de sodi 50 mM pH 5.0 i es fa un seguiment de l'absorbància a 287 nm, entre 10°C i 80°C, amb increments de temperatura de 2°C i un temps d'equilibrat de 5 - 10 min a cada temperatura, en un espectrofotòmetre equipat amb una cel·la termostatitzada.

Una vegada assolida la temperatura màxima, amb l'absorbància constant, es retorna a l'estat inicial amb salts de temperatura de 10°C per tal d'assegurar la reversibilitat del procés. En la desnaturalització proteica s'estableix un equilibri entre les formes plegada i desplegada. Si en refredar la mostra se segueix un camí equivalent al de desplegament es pot entendre el procés com una reacció en dos estats. En el cas que una corba d'estabilitat tèrmica no sigui reversible, aquesta no es pot ajustar a un model de dos estats, de manera que s'obté un equilibri desplaçat cap a la dreta, cosa que genera una sobreestimació de la temperatura mitja de fusió.

Les corbes de desnaturalització s'ajusten a un model termodinàmic de dos estats, combinat amb funcions lineals ajustades pels estats plegat i desplegat, de manera que es permet el càlcul dels paràmetres termodinàmics (Mozhaev et al. 1996; Torrent et al. 1999; Font et al. 2006).

2.6.8.2 - Dicroïsm circular

De manera alternativa, l'estabilitat conformacional ha sigut determinada mitjançant dicroïsm circular, utilitzant un espectropolarímetre equipat amb una cel·la termostatitzada.

La proteïna va ser dissolta en KH_2PO_4 100 mM 10% D_2O fins una concentració de 20 μM , i es va fer un seguiment de l'el·lipticitat molar a 218 nm augmentant la temperatura de 20°C a 85°C, amb lectures cada 0.5°C. Cal també comprovar la reversibilitat del procés per tal d'ajustar-lo a un model de dos estats.

Després de substreure la contribució del solvent, les transicions de desplegament van ser ajustades a un model termodinàmic de dos estats, combinat amb funcions lineals ajustades pels estats plegat i desplegat, de manera que es permet el càlcul dels paràmetres termodinàmics.

2.6.9 - Càlcul de la Constant de Dissociació (K_d)

Per tal de determinar la constant de dissociació de les variants dimèriques no covalents d'HP-RNasa es van dissoldre en MOPS 50 mM NaCl 50 mM 20% etanol pH 6.7, a concentracions d'entre 0.1 i 1.5 mM (a partir d'una solució mare 3mM) i a 29°C. Després de 100 h d'incubació, temps necessari perquè el procés de dimerització assolís l'estadi d'equilibri, les mostres van ser transferides a una columna de gel-filtració Sephadex G75 H 10/30 (Pharmacia) equilibrada en fosat de sodi 200 mM pH 6.7.

L'absència d'agregació o d'oligòmers d'ordre major permeten la quantificació de les concentracions de dímer i monòmer mitjançant la integració dels pics del cromatograma.

En cas que no hi hagi agregació es pot assumir un equilibri del tipus $M + M \leftrightarrow D$, de manera que es pot realitzar un càlcul de la K_d a partir del pendent de la recta que relaciona $[M]^2$ i $[D]$ (Russo et al. 2000; Rodriguez et al. 2006a).

1. A partir de l'àrea dels pics corresponents al dímer i al monòmer, es calcula la relació que hi ha entre l'àrea total i la concentració de proteïna en cada cas, dividint l'àrea total per la concentració de treball de monòmer. A partir dels valors discrets, es calcula la relació mitjana en $\text{mAU} \times \text{ml} / \text{mM}$.
2. Es divideix cada una de les àrees obtingudes per dímer i monòmer a cada concentració d'RNasa de treball, per tal d'obtenir les concentracions reals a l'equilibri. Cal corregir els valors de concentració de dímer, ja que el seu coeficient d'extinció molar és el doble que per el monòmer, de manera que cal dividir per 2 el valor de concentració obtingut.
3. Representar les concentracions reals de monòmer a l'equilibri elevades al quadrat respecte de la concentració de dímer. El valor de K_d ve representat pel pendent de la recta de correlació de les dades.

2.6.10 - Avaluació de l'Intercanvi de Dominis Mitjançant Divinilsulfona

El grau d'intercanvi del domini N-terminal de les variants d'HP-RNasa es pot determinar mitjançant un experiment d'unió creuada a partir del protocol amb divinilsulfona (DVS) descrit per Ciglic i col·laboradors (Ciglic et al. 1998). El mètode es basa en el fet que quan en una RNasa dimèrica es dona l'intercanvi de l'hèlix N-terminal entre les dues subunitats es generen centres actius compostos, en els quals les histidines 12 i 119 provenen de dos protòmers diferents. La DVS crea un enllaç covalent entre cadenes laterals d'histidines, de manera que en el cas de dímers intercanviats aquest enllaç covalent s'estableix entre les dues subunitats, mentre que en el cas de dímers no intercanviats s'estableix dins del mateix protòmer.

Per tal d'evitar que el procés de dissociació del dímer interfereixi en el procés d'intercanvi de dominis, aquest assaig s'ha realitzat amb els dímers covalents purificats tal i com es descriu a l'apartat 2.5.4.

Partint de 21 μg de dímer per cada 150 μl d'acetat de sodi 100 mM pH 5.0 (1 nM de cada subunitat) s'afegeix 1 μl de DVS 1 M (en 10% etanol) per cada 100 μl de solució de proteïna, per assolir una concentració de treball d'1 μM , cosa que representa un excés de 1000 vegades de DVS per subunitat d'RNasa. S'incuba a 30°C i s'extreuen al·lquotes de 25 μl a les 0, 2, 5, 10, 24, 48, 72, 96, 150, 200 i 250 h. S'atura la reacció afegint β -mercaptoetanol fins una concentració final de 200 mM (6.25 μl 1 M), que reduirà l'enllaç disulfur entre les dues subunitats, i es deixa a temperatura ambient 30 min abans de guardar les mostres a -80°C.

Finalment, es carreguen les mostres en un gel SDS-PAGE 1.5% i es realitza una quantificació per densitometria de les bandes corresponents a la forma intercanviada, que apareixerà a una alçada equivalent a la massa molecular del dímer, i la forma no intercanviada, que es trobarà a una alçada equivalent a la massa molecular del monòmer.

2.7 - ESPECTROSCÒPIA DE RESSONÀNCIA MAGNÈTICA NUCLEAR (NMR)

El fenomen de la ressonància magnètica té el seu origen en la interacció entre el moment magnètic d'un nucli atòmic amb un camp magnètic extern. La causa d'aquest moment magnètic es troba en el moment quàntic mecànic angular (moment angular d'spin), que tenen els nuclis atòmics amb un número imparell de protons i neutrons.

Es pot imaginar el nucli com una petita partícula carregada que gira al voltant del seu propi eix, de manera que passa a comportar-se com un petit electromagnet. En aplicar un camp magnètic extern fort aquests nuclis s'hi alinearan, assolint un estat energètic superior. La NMR estudia aquests nuclis magnètics alienant-los a un camp constant i pertorbant aquest alienament utilitzant un altre camp.

De manera general, les mostres de proteïna preparades per NMR es prepararen a una concentració de fins 0.5 mM en KH_2PO_4 100 mM 10% D_2O o en D_2O pH 4.5. Tots els espectres d'NMR han estat recollits a 25°C en un espectròmetre Bruker BioSpin AV-800 equipat amb una criosonda, processats amb Topspin (Bruker BioSpin) i analitzats i integrats amb SPARKY (T. D. Goddard and D. G. Kneller, SPARKY 3, University of California, San Francisco).

2.7.1 - Assignació de Variants de PM8E103C

En el cas del monòmer PM8E103C marcat amb ^{13}C i ^{15}N es va realitzar l'assignació de les ressonàncies de ^1H , ^{13}C i ^{15}N utilitzant el següent conjunt d'espectres bidimensionals heteronuclears i tridimensionals de triple ressonància: $^1\text{H}^{15}\text{N}$ HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*), $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HSQC, HN(CO)CA, HNCA, CBCA(CO)NH, CBCANH i HNCO. El procés d'assignació va ser facilitat per les assignacions prèvies de la forma salvatge de l'HP-RNasa (el-Joubary et al. 1999), dipositades al *Biological Magnetic Resonance Bank* amb el codi 4370.

Els espectres de ressonància de ^1H i ^{15}N per les formes monomèriques de les variants PM8E103C_H80S i PM8E103C_3A van ser assignats per comparació amb PM8E103C i amb l'ajuda addicional d'espectres tridimensionals $^1\text{H}^{15}\text{N}$ HSQC TOCSY (*total correlation spectroscopy*) i $^1\text{H}^{15}\text{N}$ HSQC NOESY (*nuclear Overhauser enhancement spectroscopy*).

Els espectres de ressonància de la forma dimèrica de PM8E103C van ser també assignats per comparació amb la forma monomèrica corresponent, amb l'ajuda d'un experiment tridimensional $^1\text{H}^{15}\text{N}$ HSQC TOCSY realitzat en les mateixes condicions.

2.7.2 - Experiments de Relaxació

En els experiments de relaxació s'observa com la magnetització d'un sistema retorna a una situació d'equilibri després de l'acció d'un camp magnètic fort perpendicular a l'eix d'orientació del camp magnètic extern.

El component T1 representa la taxa amb la qual el component longitudinal M_z del vector de magnetització retorna a l'equilibri. És un valor de temps (ms) que té el seu equivalent en velocitat, R1 ($1/T1$). T1 ens dona informació sobre la relació del solvent amb cada sistema d'spin.

Per contra, el component T2 representa la taxa amb la qual retorna a l'equilibri el component transversal M_{xy} . És també un valor de temps (ms) que té el seu equivalent en velocitat, R2 ($1/T2$). T2 ens dona informació sobre la relació de cada sistema d'spin amb els que l'envolten. En els casos en què no va ser possible fer-ne una bona representació es va optar per una variant anomenada T1rho, que dona la mateixa informació.

Pel què fa a la relaxació NOE (*nuclear Overhauser effect*), es relacionen dos espectres, un en el qual s'observa l'efecte NOE i un altre on no s'observa (NOE/noNOE), de manera que es pot veure per cada residu com n'és d'important la dispersió de la magnetització atribuïble al seu entorn directe.

Els experiments de relaxació van ser duts a terme en les mateixes condicions descrites anteriorment. Es van recollir espectres heteronuclears ^{15}N NOE de les variants monomèriques de PM8E103C, PM8E103C_H80S i

PM8E103C_3A. Els experiments amb i sense saturació de protons van ser adquirits simultàniament, de manera intercalada, amb un retard de reciclatge de 5 s, i es van dividir durant el processament en espectres separats per a la seva anàlisi. Els valors de NOE heteronuclear es van obtenir a partir de la relació d'intensitat entre les ressonàncies ($I_{\text{sat}} / I_{\text{ref}}$), amb una incertesa estimada en ~5%.

2.7.3 - Intercanvi Protó - Deuteri

L'estabilitat conformacional a nivell de residu de les formes monomèriques de les variants PM8E103C, PM8E103C_3A i PM8E103C_H80S va ser estudiada per NMR mitjançant experiments d'intercanvi protó - deuteri.

L'intercanvi dels protons amida amb els deuterons del solvent va ser iniciat dissolent les mostres liofilitzades de cada variant, protonada i marcada amb ^{15}N , en un solvent deuterat (KH_2PO_4 100 mM) i en les condicions de pH i temperatura descrites anteriorment.

Les taxes d'intercanvi per cada residu van ser determinades a partir de la integració dels volums dels pics corresponents als $^1\text{H}^{15}\text{N}$ amida en una sèrie d'espectres HSQC recollits de manera seqüencial després d'un lapse inicial de 30 min. Les dades obtingudes van ser ajustades a una funció de decreixement exponencial, a partir del qual es pot determinar la taxa observada d'intercanvi, k_{ex} . Les taxes intrínseques d'intercanvi per grups HN desprotegits, k_{rc} , van ser calculades a partir dels paràmetres determinats per Bai i col·laboradors (Bai et al. 1993), i corregides pels valors de pH i temperatura utilitzats.

Es permet així el càlcul dels factors de protecció, la relació existent entre la taxa d'intercanvi intrínseca i l'observada per cada residu. Quan l'intercanvi segueix un règim EX2, en el qual la velocitat d'intercanvi ve determinada per la constant d'equilibri entre les formes plegada i oberta, molt més ràpida que la constant intrínseca d'intercanvi, tal i com passa en RNases en condicions similars de temperatura i pH (Qu and Bolen 2003; Bruix et al. 2008), l'estabilitat conformacional ΔG_{HX} pot ser calculada per cada grup amida a partir del factor de protecció:

$$\Delta G_{\text{HX}} = -RT \ln \left(\frac{k_{\text{ex}}}{k_{\text{rc}}} \right) = -RT \ln K_{\text{op}} = -RT \ln \left(\frac{1}{\text{PF}} \right)$$

on K_{op} és la constant d'equilibri global o local per la reacció d'obertura i PF el factor de protecció.



RESULTATS I DISCUSSIÓ 3.



3.1 - IMPORTACIÓ NUCLEAR

Una de les línies de recerca del nostre grup se centra en l'estudi de les bases moleculars que determinen la citotoxicitat de determinades RNases. La comprensió dels mecanismes biològics que confereixen l'activitat citotòxica a aquestes RNases hauria de permetre obtenir variants citotòxiques de l'HP-RNasa que puguin ser emprades com a drogues antitumorals. L'interès en l'HP-RNasa rau en el seu origen humà, el qual comporta una menor immunogenicitat en cas que variants d'aquesta proteïna s'utilitzin com agents quimioterapèutics, i en el fet que, a diferència de l'onconasa, no s'ha observat que la seva administració provoqui una acumulació als ronyons que indueixi toxicitat renal (Vasandani et al. 1999). A més, l'onconasa presenta una activitat enzimàtica menor que la de l'HP-RNasa i la de PM5, una variant de l'HP-RNasa desenvolupada en el nostre grup de recerca amb l'objectiu de millorar-ne els nivells d'expressió i purificació (Canals et al. 1999).

En el disseny de les diferents RNases citotòxiques descrites fins el moment s'ha intentat facilitar que aquestes segueixin els mateixos mecanismes de citotoxicitat que les RNases citotòxiques naturals. Els esforços per obtenir variants citotòxiques d'RNases s'han centrat en afavorir la seva internalització mitjançant la seva cationització (Futami et al. 2001; Futami et al. 2002) o unió a lligands de receptors situats a la membrana (Rybak and Newton 1999) i en permetre l'escapament de l'acció de l'RI, bé sigui per modificació dels residus implicats en la unió (Leland et al. 1998; Leland et al. 2001) o bé per la generació d'impediments estèrics a la formació del complex RNasa-RI (Di Donato et al. 1994; Piccoli et al. 1999; Di Gaetano et al. 2001).

L'obtenció, en el nostre grup de recerca, d'una variant citotòxica de l'HP-RNasa, anomenada PE5 (Bosch et al. 2004), les propietats adquirides de la qual no es podien englobar dins cap de les estratègies citades, va obrir una nova via en el disseny d'RNases citotòxiques. Aquesta variant presenta una activitat citotòxica només 10 vegades menys potent que la de l'onconasa, tot i escapar molt feblement a l'RI i tenir menys estabilitat i la mateixa basicitat que l'HP-RNasa. PE5 presenta dues mutacions que suposen la substitució per arginines dels residus 89 i 90, situats al laç $\beta 4\beta 5$ en una zona d'interacció amb l'RI. Aquests canvis no n'impedeixen la unió, de manera que la variant resulta inhibida. Aquestes mutacions, juntament amb altres residus bàsics presents a la superfície proteïna, actuen com un NLS, dirigint la proteïna al nucli, un compartiment lliure d'RI on l'RNasa pot degradar lliurement l'RNA.

3.1.1 - L'Importació Nuclear de PE5 és Crítica per a la Seva Citotoxicitat

El potencial citotòxic d'una RNasa és el resultat de múltiples característiques de la proteïna, tals com la seva estabilitat, capacitat d'internalització i eficiència de translocació, la seva capacitat d'evadir l'acció de l'RI i la seva eficiència catalítica (Benito et al. 2005). En dissenyar una nova variant d'RNasa és complicat preveure com una mutació específica afectarà cada una d'aquestes característiques, de manera que cal ser cautelós a l'hora d'atribuir un augment de la citotoxicitat induït per una mutació en una variant a l'increment en l'eficiència en una característica específica. Fins i tot en el cas de mutacions encarades a millorar una d'aquestes característiques se'n poden afectar d'altres de manera negativa. En aquest apartat del treball es va avaluar si la inserció d'un NLS en la seqüència de l'HP-RNasa és un factor crític per l'adquisició de citotoxicitat en la variant PE5.

Tot i que s'havia demostrat que PE5 es dirigia al nucli cel·lular i que l'eliminació d'aquests residus suposava una disminució de la capacitat de la proteïna d'anar al nucli (Bosch et al. 2004; Rodriguez et al. 2006c), no es coneixia si aquesta venia donada per la capacitat de PE5 d'unir-se a una importina (PE5 conté un NLS) o si bé PE5 tenia la capacitat d'interaccionar amb una proteïna que contingués un NLS i que així la dirigís indirectament al nucli. Aquest mecanisme s'ha descrit, per exemple, en el cas de la DNA primasa de ratolí (Mizuno et al. 1996) o per a l'inhibidor **IKB α** (Turpin et al. 1999)

Prèviament s'havia demostrat també que PE5 és transportada a l'interior del nucli mitjançant un mecanisme que requereix la presència d'ATP i Ran (Bosch et al. 2004), tot i que amb les eines PredictNLS (<http://www.predictprotein.org/>) (Cokol et al. 2000) i PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp>) (Nakai and Horton 1999) no es va poder identificar cap NLS en la seva seqüència. Aquest fet va fer pensar en la possibilitat que PE5

presentés un NLS no convencional en la seva estructura o que interaccionés amb una tercera proteïna que posseís un NLS.

3.1.1.1 - PE5 té capacitat d'unió a la importina α

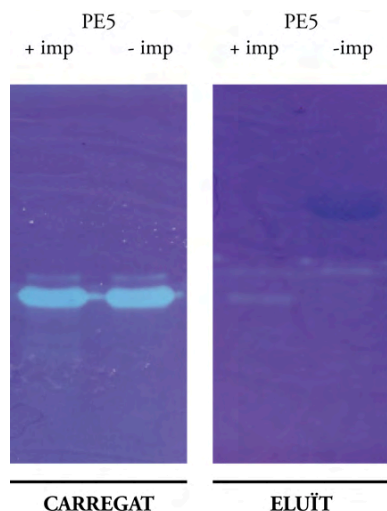


fig3.1 Anàlisi de la capacitat d'unió a la importina truncada $\Delta 59-529\text{Imp}\alpha$ de la variant PE5. Zimograma dels travessos corresponents a les fraccions rentades, no unides a la matriu, i de les fraccions eluïdes amb GSH d'una columna en la qual s'ha unit (+imp) o no (-imp) importina α .

Es va investigar la capacitat de PE5 d'interaccionar amb la importina α , una proteïna clau en el mecanisme d'importació nuclear que actua d'adaptador entre una proteïna que contingui un NLS i la importina β . Amb aquest objectiu, va ser necessari obtenir una variant de la importina α de *X. laevis* fusionada a la glutatió S-transferasa (GST), codificada pel plasmidi pGEX4T2, i sense el domini autoinhibitori d'interacció a importina β , IBB. Aquest domini va ser eliminat perquè en absència de la importina β ocupa el lloc d'unió a NLS, disminuint així la seva afinitat pels NLSs (Kobe 1999; Catimel et al. 2001). Per a la construcció de la variant truncada de la importina α es va partir de la seqüència de la importina α de *X. laevis*, en la qual es va identificar el domini IBB per comparació amb la seqüència aminoacídica de la importina α de ratolí utilitzant el programa Blast Two Sequences. L'alineament va mostrar que la seqüència compresa entre els residus 41 i 51 de la importina α de *X. laevis* és homòloga al segment autoinhibitori del domini IBB de la importina α de ratolí, en la qual comprèn els residus 44-54 (Kobe 1999). Així doncs, el fragment de la importina α codificant entre els residus 59 i 529 va ser amplificat per PCR utilitzant dos oligonucleòtids que introdueixen als extrems 3' i 5' les dianes de restricció de BamHI i XhoI, respectivament. El fragment va ser digerit amb aquests enzims i clonat en el plasmidi pGEX4T2 (Amersham Biosciences), de manera que la importina α truncada resultant, anomenada $\Delta 59-529\text{Imp}\alpha$, es troba fusionada a l'extrem C-terminal de la GST. La GST permetia unir la $\Delta 59-529\text{Imp}\alpha$ a una reina d'agarosa que portava unit covalentment un glutatió.

La interacció de $\Delta 59-529\text{Imp}\alpha$ amb PE5 va ser estudiada mitjançant un anàlisi per pull-down, en el qual, s'afegia la mateixa quantitat de PE5 a dues columnes, una amb $\Delta 59-529\text{Imp}\alpha$ unida a GST i una només amb GST, les proteïnes retingudes de manera específica van ser eluïdes amb glutatió reduït i se'n va determinar la presència d'activitat RNasa mitjançant un zimograma (**fig3.1**). Tal i com es pot observar, només es va recuperar activitat RNasa de la columna que presentava la $\Delta 59-529\text{Imp}\alpha$ unida i així es va poder demostrar que PE5 s'uneix a $\Delta 59-529\text{Imp}\alpha$.

3.1.1.2 - La presència d'un NLS determina la citotoxicitat de PE5

Si l'NLS era important per a la citotoxicitat de PE5 era d'esperar que l'eliminació de residus importants per aquest NLS es traduís en una disminució de la seva citotoxicitat. Experiments previs (Rodríguez et al. 2006c) van mostrar que la lisina en posició 1, juntament amb les dues agrupacions d'arginines en posicions 31 - 33 i 89 - 91, són crítiques per la funcionalitat de l'NLS de PE5. En aquests experiments, la substitució d'aquests residus per alanina o àcid glutàmic va afectar de manera significativa la capacitat d'import nuclear *in vitro* de les variants resultants (Rodríguez et al. 2006c). Es va assajar la citotoxicitat d'alguna d'aquestes variants: la proteïna parental PM5 (que no presenta les arginines 89 i 90), PN4 (que no presenta l'arginina 31), PN7 (que no presenta l'arginina 33) i PN8 (que no presenta la lisina 1). En aquestes variants, els residus bàsics de l'NLS van ser substituïts o bé per residus àcids o bé per residus neutres, de manera que presenten una càrrega neta diferent de la de PE5 i el seu transport al nucli es veu clarament afectat.

La substitució d'aquests residus va comportar una disminució significativa de la citotoxicitat respecte de la de PE5 (**fig3.2**), amb valors d'IC₅₀ entre 5 i 7 vegades superiors. Tenint en compte que PE5 escapa lleugerament a l'acció de l'RI (Bosch et al. 2004), es va voler comprovar si la disminució de la citotoxicitat en les noves variants podia estar relacionada amb la seva captura per part de l'inhibidor. Es va testar la capacitat d'evasió a l'RI per cada una de les variants mitjançant un assaig qualitatiu en gel d'agarosa. Mentre que l'RNasa parental PM5 resulta fortament inhibida per l'RI i PE5 presenta un cert grau d'escapament, les variants PN4, PN7 i PN8

presenten activitat RNasa en presència de 40 unitats d'RI. Es pot doncs descartar la inhibició per part de l'RI com a responsable de la disminució de la citotoxicitat en aquestes variants.

Per tal de presentar citotoxicitat, cal que una RNasa mantingui la seva conformació nativa i sigui catalíticament activa a temperatura fisiològica. Es va determinar l'estabilitat tèrmica de les noves variants, la qual per PN4 i PN7 va resultar similar a la de PE5, mentre que en PN8 era 6°C menor; de manera que a 37°C es comença a desnaturalitzar i no es pot descartar que sigui aquesta disminució de l'estabilitat la responsable de la menor citotoxicitat en aquesta variant. Es va determinar també l'activitat ribonucleolítica de les variants mitjançant la hidròlisi de C>p, obtenint en totes elles valors de k_{cat} i K_m molt semblants als de PE5 (**taula3.1**). En el cas de PN4, PN7 i PN8 es va observar un lleuger increment en el valor de K_m , però tenint en compte que PE5 realitza la seva acció ribonucleolítica al nucli, i probablement al nuclèol, on la concentració d'RNA és molt elevada, aquestes petites diferències no podrien explicar el canvi significatiu que s'observa en la citotoxicitat de les variants en les quals s'han substituït els residus corresponents a l'NLS de PE5.

S'ha també apuntat que un augment de les càrregues positives netes d'una RNasa augmenta la seva internalització i la seva citotoxicitat (Futami et al. 2001; Ilinskaya et al. 2004). PN4 i PN7 presenten el mateix grau de citotoxicitat, però tenen una càrrega global diferent, cosa que indica que la disminució de la citotoxicitat respecte de PE5 no es pot deure a la pèrdua de residus bàsics.

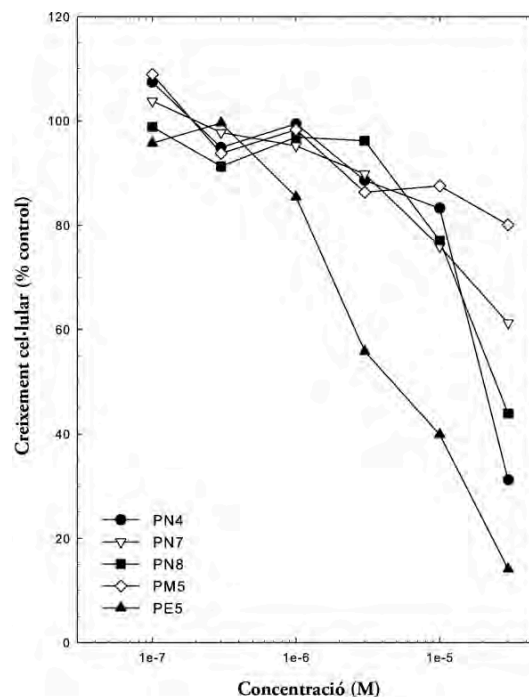


fig3.2 Representació de la capacitat de cèl·lules HeLa de reduir una sal de formazan després d'una incubació de 72 hores amb concentracions creixents de les RNases corresponents.

taula3.1 Caracterització Bioquímica de PE5 i de les variants amb substitucions en residus importants per la funcionalitat de l'NLS

variant	mutacions ^a	càrrega neta ^b	$T_{1/2}$ (°C)	paràmetres cinètics	
				k_{cat} (min ⁻¹)	K_m (mM)
PE5		+6	45.7	93.0	1.34
PM5	R89G R90S	+4	58.3	85.0	1.08
PN4	R31E	+4	45.8	77.5	3.15
PN7	R33A	+5	43.7	52.3	2.61
PN8	K1A	+5	39.4	69.71	2.82

^a Mutacions respecte de la variant citotòxica PE5

^b Diferència entre arginines + lisines i àcids aspàrtics + àcids glutàmics

Es pot concloure doncs que en el cas de les variants PN4 i PN7 la pèrdua de citotoxicitat és causada per l'eliminació de residus importants per la funcionalitat de l'NLS. Així doncs, la introducció d'una seqüència NLS funcional és el factor determinant en l'adquisició de citotoxicitat en l'RNasa PE5. Aquesta particularitat li permet realitzar la seva acció en un compartiment cel·lular lliure d'RI i diferent de la resta d'RNases citotòxiques.

És interessant assenyalar que les zones d'unió de la importina i l'RI a PE5 es troben solapades, i que probablement la unió RI-RNasa sigui molt més forta. Encara que a priori això suposaria que PE5 fos quasi completament inhibida, hi ha dos factors que ajuden al fet que una certa quantitat d'enzim pugui arribar al nucli. En primer lloc, la maquinària d'importació nuclear és molt activa en una cèl·lula, i és de suposar que la concentració d'importina sigui comparable a la d'RI. En aquest sentit, s'ha descrit que la concentració

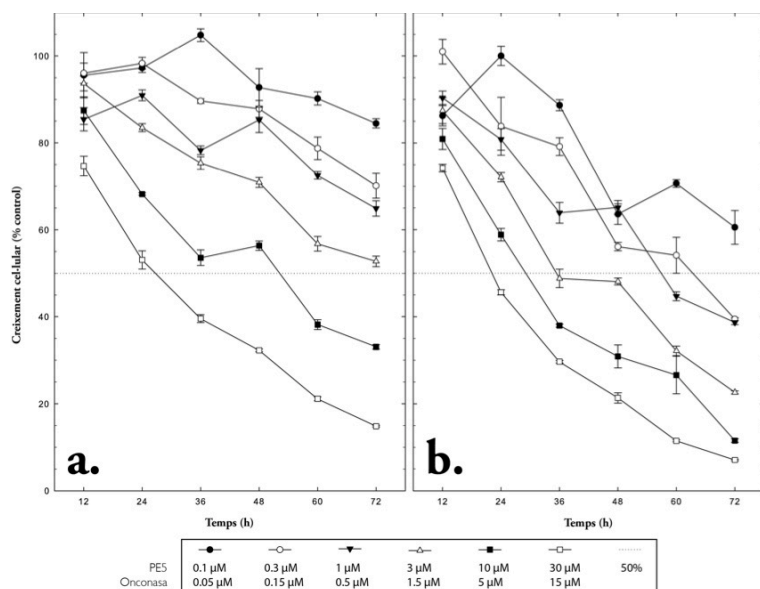


fig3.3 Efecte citotòxic de diferents concentracions de PE5 (a) i onconasa (b) sobre cèl·lules HeLa després de diversos temps d'incubació.

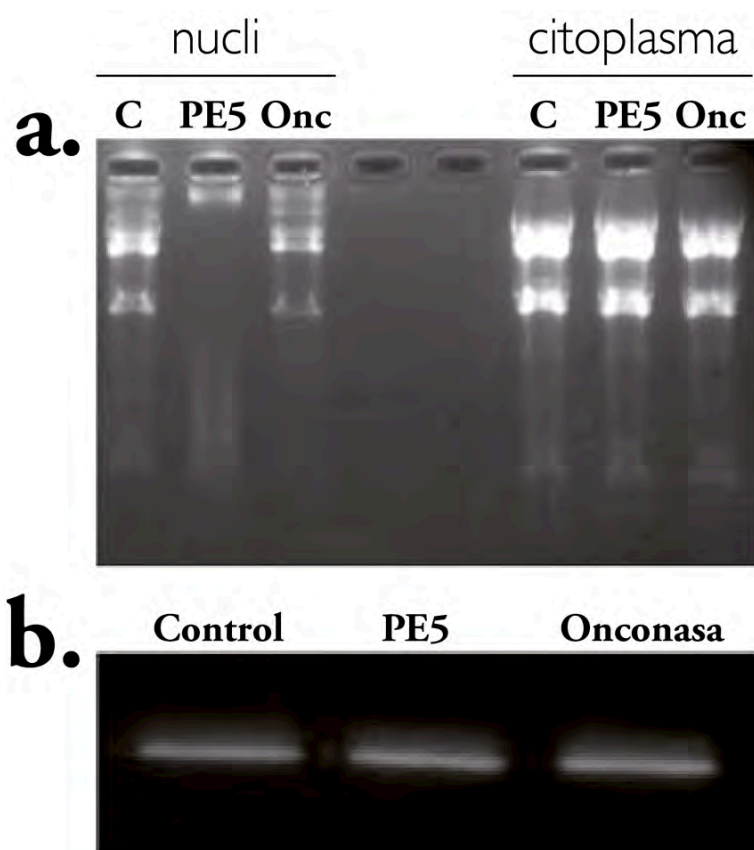


fig3.4 Degradació de l'RNA nuclear i citoplasmàtic de cèl·lules HeLa tractades amb PE5 i onconasa (Onc) respecte d'una mostra control (C) (a) i western blot en el qual s'identifica la GAPDH procedent de la fracció proteica de les mateixes mostres (b).

d'importina α en el citosol d'oòcits de *X. laevis* és de 3 μ M (Gorlich et al. 1994) i que la concentració de RI en el citosol és de 4 μ M (Haigis et al. 2003). En segon lloc, donat que qualsevol molècula de PE5 que s'uneixi a la importina α serà transportada al nucli, es promou la dissociació del complex PE5 - RI i paulatinament PE5 serà transportada al nucli. Per altra banda, el solapament de les regions d'interacció suposa que només es transportaran al nucli aquelles molècules de PE5 que no es trobin unides a l'RI, de manera que el nucli se'n manté lliure.

3.1.1.3 - PE5 degrada de manera selectiva l'RNA nuclear

En el cas que la capacitat citotòxica de PE5 es relacioni de manera directa amb la presència del seu NLS, s'esperaria que aquesta RNasa degradés de manera preferent l'RNA present al nucli de les cèl·lules. Per tal d'avaluar aquest fet, es va determinar la integritat de l'RNA nuclear i citoplasmàtic de cèl·lules HeLa tractades amb PE5.

Ha estat descrit que en cèl·lules que es troben en estats avançats d'apoptosi es produeix una degradació general del seu RNA (Mondino and Jenkins 1995). Per tal de descartar la possibilitat que la degradació de l'RNA nuclear fos una conseqüència directa de la inducció d'apoptosi en lloc de l'acció de PE5, es va investigar el seu efecte citotòxic sobre cèl·lules HeLa a diferents concentracions i temps d'incubació, tant per PE5 com per onconasa. Es pretenia així trobar unes condicions en les quals s'hagués produït un efecte mínim però significatiu de les dues RNases en el menor temps possible. Com era d'esperar, els resultats van indicar que la citotoxicitat augmenta amb el temps d'incubació amb les RNases (**fig3.3**). Després de 24 h s'observa una disminució d'aproximadament el 50% en l'activitat metabòlica de HeLa, tant per PE5 com per onconasa a les concentracions més grans assajades (30 μ M per PE5 i 15 μ M per onconasa). En base als resultats obtinguts es van escollir unes concentracions de treball de 5 μ M en el cas de PE5 i de 0.5 μ M en el cas de l'onconasa, amb uns temps de tractament de 24 h. Amb aquest temps i concentracions l'activitat metabòlica de les cèl·lules HeLa es va veure inhibida al voltant del 20%.

cas de l'onconasa, amb uns temps de tractament de 24 h. Amb aquest temps i concentracions l'activitat metabòlica de les cèl·lules HeLa es va veure inhibida al voltant del 20%.

Es van incubar les cèl·lules HeLa en aquestes condicions i es van aïllar en cada cas els RNAs citosòlic i nuclear, així com el de cèl·lules no tractades, com a control. La degradació dels diferents RNAs es va analitzar sotmetent les diferents mostres a una electroforesi d'agarosa 1.5% i formamida 15%. La degradació de l'RNA nuclear és evident per les cèl·lules tractades amb PE5, mentre que no se n'observa en el cas del tractament amb onconasa en condicions equivalents, així com en les cèl·lules no tractades (**fig3.4a**). En aquests dos darrers casos s'observen bandes definides, corresponents majoritàriament a precursors dels rRNA, mentre que en el cas de les cèl·lules tractades amb PE5 es pot observar una degradació clara. En contrast, en les mostres corresponents a l'RNA citoplasmàtic no hi ha diferències apreciables en cap cas. Per tal de descartar la possibilitat que les diferències observades en el cas de la mostra d'RNA nuclear fossin degudes a diferències en el nombre de cèl·lules de partida en els aïllaments d'RNA es va determinar la quantitat de GAPDH present a cada mostra amb un western-blot de les mostres utilitzades per la purificació de l'RNA (**fig3.4b**). La intensitat de les bandes obtingudes mitjançant densitometria no era significativament diferent, de manera que es pot afirmar que les diferències observades en les mostres d'RNA nuclear són degudes als diferents tractaments amb les RNases, essent PE5 responsable de la seva degradació.

Tot i que totes les RNases tenen la capacitat de degradar l'RNA cel·lular, s'han detectat preferències per diferents tipus d'RNA en diverses RNases. Així, la BS-RNasa i la cSBL degraden rRNA (Mastronicola et al. 1995; Liao et al. 1996), mentre que l'onconasa degrada el tRNA citosòlic sense afectar l'rRNA ni l'mRNA (Iordanov et al. 2000; Saxena et al. 2002), i s'ha postulat que es dirigeix també contra el sistema d'RNA d'interferència que s'involucra en la regulació de l'expressió gènica (Ardelt et al. 2003; Zhao et al. 2008). La **fig3.4a** mostra que PE5 degrada rRNA i, tot i que amb la tècnica utilitzada no és possible de determinar-ho, no es pot descartar que també degradi d'altres tipus d'RNA. Aquesta degradació de l'RNA nuclear per part de PE5 és consistent amb resultats previs que indiquen que aquesta variant de l'HP-RNasa s'acumula al nuclèol de cèl·lules tumorals (Bosch et al. 2004).

3.1.2 - Estratègies per Dotar de Citotoxicitat l'HP-RNasa Mitjançant l'Addició d'una Seqüència NLS

En base als resultats obtinguts per la variant PE5, ens vam proposar comprovar si l'addició de seqüències NLS a RNases no citotòxiques podria constituir una bona estratègia per tal de dotar-les d'activitat citotòxica gràcies a la seva direccionalització al nucli. Per això, es va proposar la construcció de variants de l'HP-RNasa amb una seqüència NLS ben caracteritzada i descrita com eficaç. La seqüència escollida va ser la corresponent a l'antigen T llarg d'SV40 (¹²⁶PKKKRKVED) (Colledge et al. 1986; Adam et al. 1990; Lobl et al. 1990), que s'uneix de manera específica a la importina α . Es va escollir aquesta seqüència perquè havia estat prèviament descrit que la seva unió a GFP (Leung et al. 2003) o BSA (Cordes et al. 1997; Kohler et al. 1999) permet l'import al nucli d'aquestes proteïnes de manera molt eficaç.

L'addició de seqüències NLS a determinats agents quimioterapèutics ha estat assajada per diferents laboratoris i, en alguns casos, ha permès el desenvolupament de derivats d'aquests fàrmacs amb una major capacitat citotòxica. Conjugats de mesoclorina e6 (Jensen et al. 2003; Tijerina et al. 2003b) o clorina e6 (Akhlynina et al. 1997) amb l'NLS de l'antigen T llarg d'SV40 potencien el seu efecte sobre les cèl·lules tumorals a través de la direccionalització al nucli. A més, la substitució de l'NLS propi de l'interferó γ pel d'SV40 ha permès determinar que l'importació nuclear és un factor requerit en l'activitat citotòxica i antiviral d'aquest (Subramaniam et al. 2001). Aquesta estratègia no ha estat vàlida per a tots els compostos antitumorals assajats. Així, conjugats de carboplatí a polietilenglicol als quals s'ha unit la seqüència d'un NLS són transportats molt eficaçment al nucli, però són menys citotòxics que el conjugat sense NLS (Aronov et al. 2004), probablement per la necessitat d'una activació al citoplasma prèvia a la unió al DNA nuclear.

Donat que la seqüència SV40NLS és molt bàsica, calia descartar que l'efecte citotòxic que es pogués detectar fos degut a una major capacitat d'interaccionar amb la membrana cel·lular, en lloc del transport al nucli. Tal i com ja s'ha esmentat, la cationització d'RNases suposa en alguns casos un augment de la seva capacitat citotòxica. A més, la variació de la càrrega de la molècula podria també afectar la seva activitat enzimàtica o la seva estabilitat, paràmetres que també poden ser importants en la citotoxicitat de les RNases. Per tal de discriminar un possible efecte de la seqüència bàsica introduïda, es van utilitzar com a control dues variants de l'SV40NLS que presenten canvis en la seva seqüència que n'impedeixen el reconeixement per part de la importina. La primera seqüència, anomenada SV40mutNLS (SV40 *mutated* NLS), consisteix en la substitució de

la lisina 128 per una asparagina (¹²⁶PKNKRKVED). S'ha descrit (Colledge et al. 1986; Adam et al. 1990) que aquesta mutació en la seqüència de l'SV40NLS l'inhabilita per a la seva funció. La segona seqüència, anomenada SV40scNLS (SV40 *scrambled* NLS) presenta la mateixa composició aminoacídica que l'NLS escollit, però en un ordre diferent (PKVKEKDKR), cosa que n'impedeix el reconeixement per part de la importina α . S'ha comprovat que aquesta darrera seqüència no constitueix cap NLS conegut usant la base de dades *predictNLS* (Cokol et al. 2000). La introducció d'aquests controls ha permès determinar en altres tipus de construccions que en alguns casos l'augment de citotoxicitat no és degut específicament al transport nuclear (Tijerina et al. 2003a).

Per a la síntesi de cada una d'aquestes seqüències es van dissenyar dos oligonucleòtids complementaris entre ells, excepte als extrems, de tal manera que després de realitzar-ne la hibridació s'obtinguessin uns desaparellaments que permetessin la seva unió a fragments de DNA digerits amb els enzims de restricció *Bam*HI (extrem 5') i *Hind*III (extrem 3') (**fig3.5**). En la síntesi de les seqüències dels oligonucleòtids es va tenir en compte tant el manteniment de la pauta de lectura en la seqüència de l'RNasa com l'ús de codó d'*E. coli*.

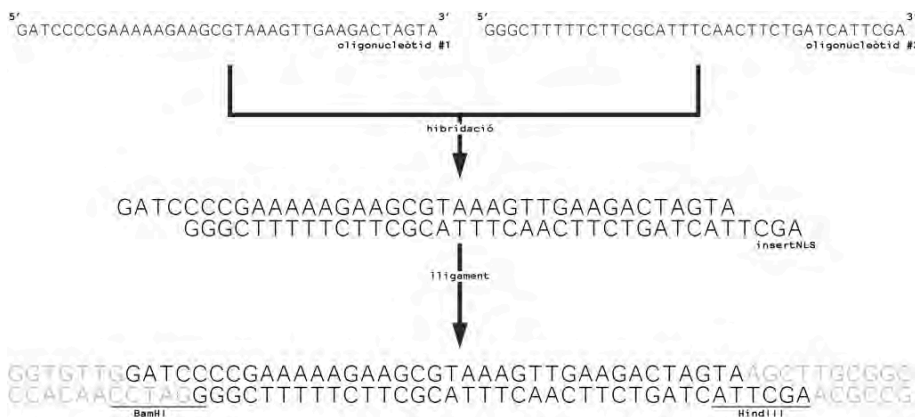


fig3.5 Estratègia de clonatge del segment SV40NLS. La hibridació dels dos oligonucleòtids complementaris #1 i #2 permet la formació d'un fragment de dsDNA amb extrems compatibles amb les dianes de restricció *Bam*HI i *Hind*III, que pot ser lligat a un vector que conté la seqüència de PM5 prèviament digerit amb els mateixos enzims de restricció.

3.1.2.1 - Disseny de les variants d'HP-RNasa amb una seqüència NLS

Per al disseny de les variants es va treballar sobre PM5, una variant de l'HP-RNasa que difereix en tan sols cinc aminoàcids de la forma salvatge i que no és citotòxica ni escapa l'inhibidor. PM5 és una proteïna híbrida que incorpora, sobre la seqüència de l'HP-RNasa, els vint primers aminoàcids de la BS-RNasa. Aquest canvi va permetre la sobreexpressió de la proteïna recombinant (Canals et al. 1999), ja que la seqüència codificant introduïda de la BS-RNasa va ser dissenyada tenint en compte l'estructura teòrica de l'mRNA per tal d'optimitzar-ne l'expressió en *E. coli*. PM5 presenta a més una major estabilitat tèrmica respecte de la forma parental (Canals et al. 1999), amb un augment de 5°C del punt mig de fusió (T_m). El fet de partir d'una variant més estable era convenient ja que hauria de permetre compensar, al menys fins a cert punt, possibles pèrdues d'estabilitat generades per les substitucions introduïdes.

Per tal de determinar si per a l'activitat citotòxica era necessària l'existència d'una competència entre l'RI i la importina per unir-se a l'RNasa conjugada a un NLS es van construir dos tipus de variants. Per una banda es pretenia l'obtenció d'una variant sensible l'RI i amb capacitat d'importació a nucli, conferida per l'SV40NLS. Per això es va afegir la seqüència SV40NLS a l'extrem C-terminal de la variant no citotòxica i sensible l'RI, PM5. Per altra banda, es va dissenyar un segon grup de variants en les quals es va introduir la seqüència NLS en regions internes de la proteïna. Així, es va decidir afegir la seqüència SV40NLS a zones exposades a la superfície que haguessin estat descrites com importants per a la unió del RI (Pous et al. 2000). Aquestes regions són, en ordre decreixent d'importància, els llaços $\alpha 2\beta 1$ (residus 30-42), $\beta 2\beta 3$ (residus 64-71) i $\beta 4\beta 5$ (residus 87-96) (Johnson et al. 2007b). Es van escollir els llaços $\beta 2\beta 3$ (entre els residus 67 i 71) i $\beta 4\beta 5$ (entre els residus 87 i 93) per tal d'introduir-hi la seqüència NLS (**fig3.6**). La inserció en algun d'aquests dos llaços hauria d'impedir la interacció amb l'RI sense afectar de manera significativa l'activitat catalítica de l'enzim. No es va escollir el llaç $\alpha 2\beta 1$, ja que aquest inclou la lisina 41, residu implicat en la catàlisi (Pares et al. 1991). El major grau d'escapament a l'acció del RI afavoriria a més la importació al nucli, ja que una major quantitat de molècules quedarien lliures per unir-se a la importina.

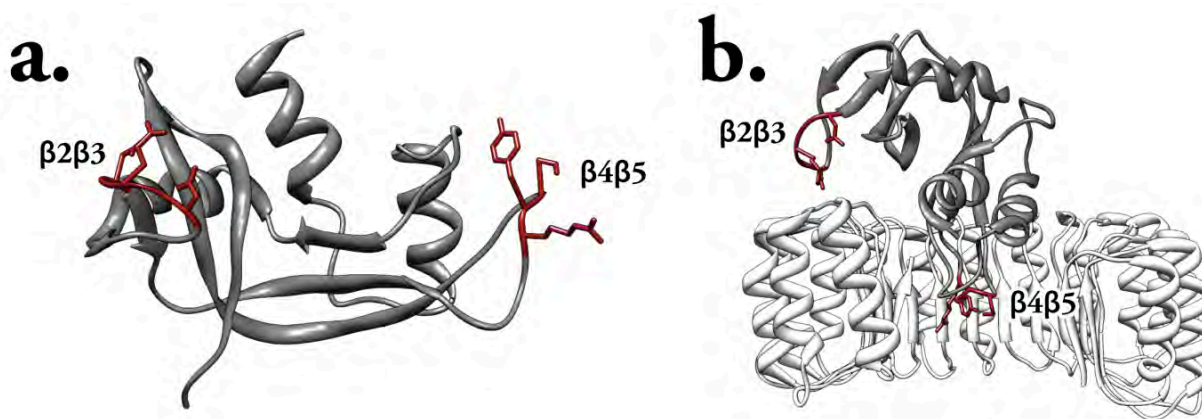


fig3.6 Estructura de l'HP-RNasa en la qual s'indica, ressaltats en vermell, la posició dels llaços $\beta 2\beta 3$ i $\beta 4\beta 5$, en els quals s'ha inserit l'NLS (a.) i situació d'aquests llaços en el complex format entre l'HP-RNasa i l'RI (b.).

3.1.2.2 - Construcció de les variants d'HP-RNasa amb una seqüència NLS

Una vegada hibridades, les seqüències SV40NLS i SV40mutNLS es van lligar sobre el vector pM5cct digerit amb els enzims de restricció *Bam*HI i *Hind*III (**fig3.7**). pM5cct és un vector que codifica per la proteïna PM5cct (Bosch et al. 2004), una variant de PM5 que presenta la substitució dels sis últims aminoàcids de la seqüència per un braç espaïador no estructurat (GVGS), el qual potenciarà la mobilitat de la seqüència introduïda. D'aquesta manera es van obtenir les variants PM5NLS i PM5mutNLS.

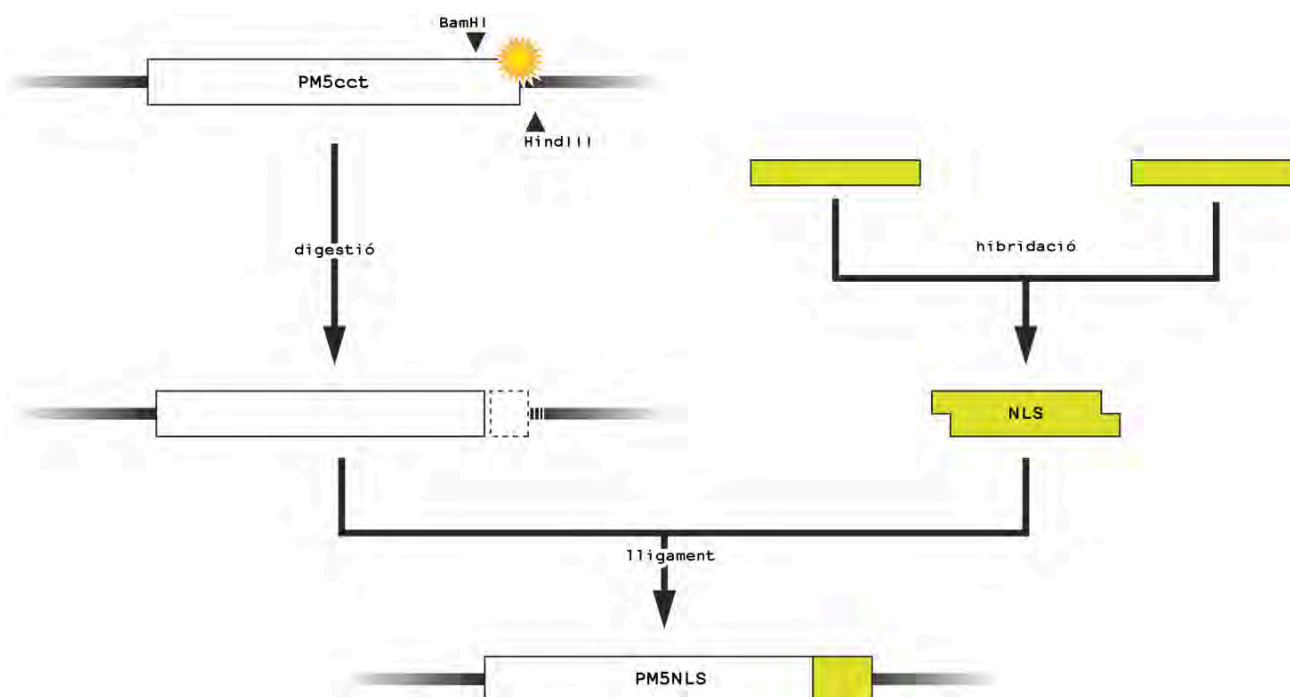


fig3.7 Esquema de l'estratègia d'obtenció de la variant PM5NLS. La variant es va obtenir lligant l'insert, SV40NLS, sobre el vector portador de PM5cct digerit amb *Bam*HI i *Hind*III. Per a la construcció de PM5mutNLS es va utilitzar la mateixa estratègia, amb l'insert SV40mutNLS. La cisteïna addicional a l'extrem C-terminal de la variant PM5cct s'indica en taronja.

Per tal de substituir els segments 66-70 i 86-93 dels llaços $\beta 2\beta 3$ i $\beta 4\beta 5$ de PM5, respectivament, per les seqüències NLS, es van introduir mitjançant mutagènesi dirigida per oligonucleòtid les seqüències de dues noves dianes de restricció, *Bam*HI i *Mun*I. D'aquesta manera es van obtenir els vectors pM5 $\beta 2\beta 3$ i pM5 $\beta 4\beta 5$. Per a la síntesi de la seqüència codificant per l'SV40NLS i l'SV40scNLS es van dissenyar dos nous oligonucleòtids per a cada una de les seqüències, complementaris entre ells excepte als extrems, de tal manera que després d'hibridar-los s'obtinguessin uns desaparellaments que permetessin la seva unió a fragments de DNA digerits amb els enzims de restricció *Bam*HI (extrem 5') i *Mun*I (extrem 3'). Una vegada hibridats, els

fragments de dsDNA resultant es van lligar sobre els vectors pM5 β 2 β 3 i pM5 β 4 β 5 digerits amb els enzims de restricció anteriorment indicats, obtenint-se les variants PM5NLS β 2 β 3, PM5scNLS β 2 β 3, PM5NLS β 4 β 5 i PM5scNLS β 4 β 5 (**fig3.8**).

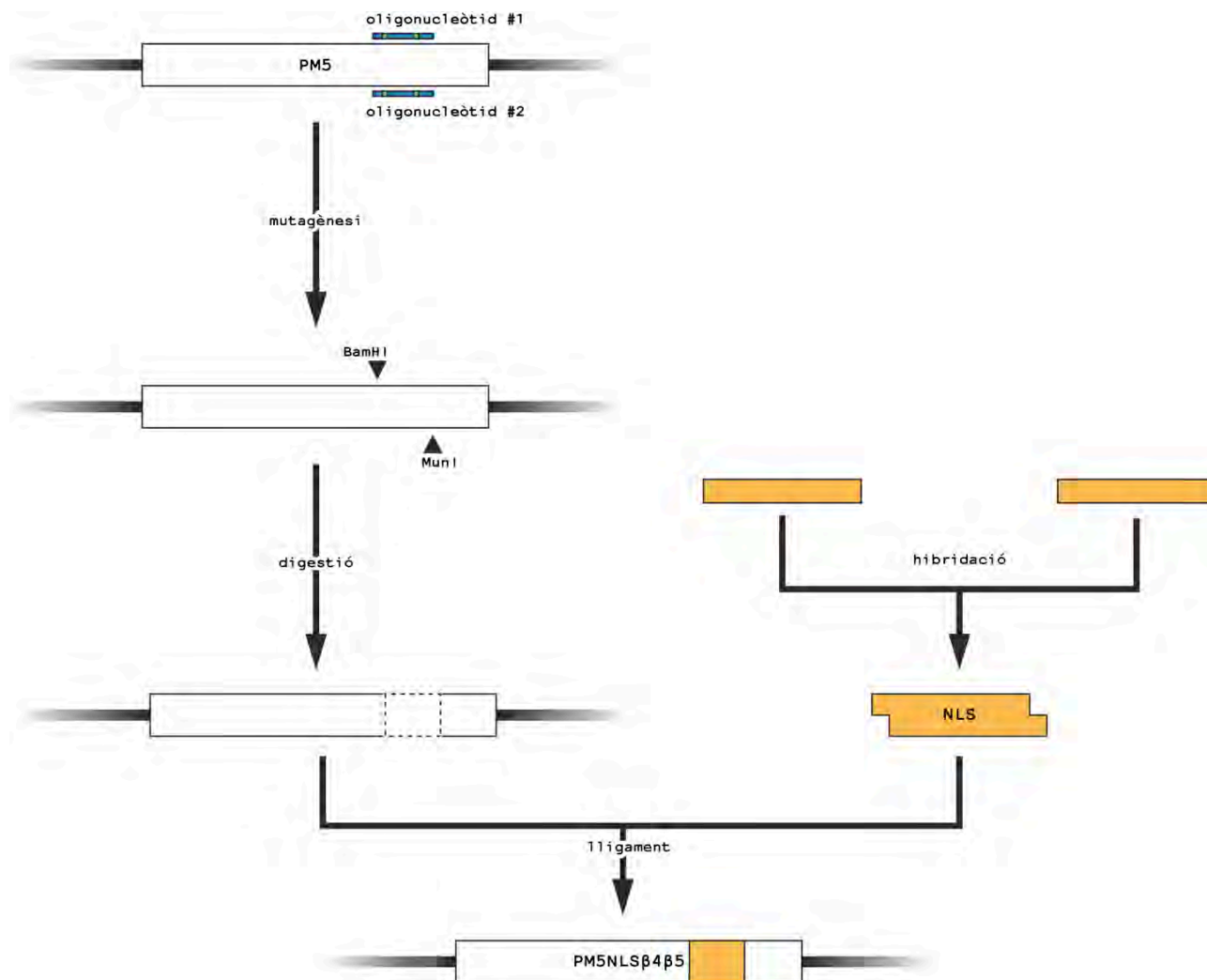


fig3.8 Esquema de l'estratègia d'obtenció de la variant PM5NLS β 4 β 5. La variant es va obtenir lligant l'insert, SV40intNLS, sobre el vector portador de PM5 digerit amb *Bam*HI i *Mun*I. Per a la construcció de PM5NLS β 2 β 3, PM5scNLS β 2 β 3 i PM5scNLS β 4 β 5 es va utilitzar la mateixa estratègia, amb l'insert SV40intNLS en la primera i l'insert SV40intscNLS en les altres dues variants.

3.1.2.3 - Producció i purificació de les RNases amb una seqüència NLS

Abans d'iniciar el procés de producció i purificació de cada una de les variants d'HP-RNasa, es va analitzar el grau d'expressió de diferents clons. Per a això, es van analitzar electroforèticament cultius induïts d'aquests clons i es va seleccionar aquell que presentés millor expressió. En el cas d'aquelles variants que incorporen la seqüència NLS a l'extrem C-terminal, PM5NLS i PM5mutNLS, es van obtenir uns rendiments de 9.1 i 8.2 mg per litre de cultiu, respectivament (**taula3.2**), els quals no difereixen significativament dels obtinguts per d'altres variants purificades en el nostre laboratori.

Pel què fa a les variants que presenten una inserció en unllaç, tot i partir de clons amb bons nivells d'expressió de la proteïna recombinant, no es va obtenir una quantitat de proteïna apreciable al final del procés de purificació seguint aquest protocol general. Per això, es va decidir fer un seguiment del procés de purificació per tal d'analitzar quins canvis caldria introduir en el protocol inicial que permetessin la seva optimització per a aquestes variants. El seguiment del procés de purificació per SDS-PAGE de les variants PM5NLS β 4 β 5 i PM5scNLS β 4 β 5 va revelar que aquestes es trobaven a la fracció cel·lular soluble quan es provocava la lisi

taula3.2 Rendiments de purificació obtinguts per a cada una de les variants de l'HP-RNasa portadores d'una seqüència NLS i relació de pesos moleculars esperats i mesurats per MALDI-TOF

proteïna	rendiment (mg/l de cultiu)	Mw teòric (Da)	Mw observat (Da)
PM5NLS	9.1	15316	15324
PM5NLSct	17.5	15291	15187 / 15512
PM5mutNLS	8.2	15373	15376
PM5mutNLSct	10.2	15348	15260 / 15574
PM5NLS β 4 β 5	7	14970	14968
PM5scNLS β 4 β 5	10	14970	14975

cel·lular (**fig3.9**), mentre que s'esperava aïllar-les a la fracció insoluble. A causa d'això hi havia una pèrdua important en la quantitat de proteïna recombinant en aquesta fracció soluble. A més, en la diàlisi posterior a la concentració la proteïna recombinant es trobava al sediment, mentre que s'esperava recuperar-la al sobrenedant. Aquest seguiment del procés de purificació va permetre observar que el pH determinava la solubilitat d'aquestes RNases de manera diferent a l'esperada. Aquestes RNases eren solubles a pH bàsic, mentre que romanien insolubles a pH àcid. El canvi del tampó de lisi cel·lular per acetat de sodi 50mM EDTA 10mM pH 5.0 i la realització de la cromatografia de bescanvi catiónic amb Tris-HCl 50 mM pH 8.0 va permetre l'obtenció de suficient quantitat de PM5NLS β 4 β 5 i PM5scNLS β 4 β 5 en forma pura i homogènia, amb uns rendiments similars als descrits anteriorment. En el cas de les variants PM5NLS β 2 β 3, PM5NLS β 4 β 5cct i PM5NLS β 2 β 3cct, el protocol de purificació optimitzat per les variants PM5NLS β 4 β 5 i PM5scNLS β 4 β 5 no va permetre l'obtenció de quantitats apreciables de proteïna recombinant, tot i observar-se efectes similars del pH sobre la seva solubilitat.

L'augment de la solubilitat de les variants PM5NLS β 4 β 5 i PM5scNLS β 4 β 5 a pH àcids és sorprenent, ja que d'una manera general, les proteïnes són menys solubles a valors de pH propers al seu punt isoelèctric, i l'HP-RNasa és una proteïna bàsica. En aquestes dues variants s'havia introduït una seqüència portadora de 5 residus bàsics, els quals es troben molt més carregats a pH 5 que a pH 8, generant forces de repulsió amb la resta de la proteïna, cosa que podria induir la seva desestabilització. En el cas de les mateixes variants amb una cisteïna addicional a l'extrem C-terminal s'introdueix un nou factor que pot dificultar el plegament de la proteïna. Durant el procés de plegament, aquesta cisteïna addicional podria facilitar l'establiment de ponts disulfur incorrectes, i en conseqüència la formació de formes mal plegades que disminueixen el rendiment.

En el cas de les variants amb la seqüència inserida al llaç β 2 β 3, el fet que no fos possible la seva purificació es pot explicar en base a la desestabilització creada per la introducció de l'NLS. (9 aminoàcids que substitueixen un grup de tres residus, entre les posicions 68 i 70). Aquesta desestabilització es podria deure, al menys en part, a la presència de l'enllaç disulfur que s'estableix entre els residus 65 i 72, situats als dos extrems del llaç β 2 β 3. Fóra possible que la inserció neta de 6 residus en aquest llaç en distorsionés la seva conformació d'una manera prou important com per impedir la formació d'aquest enllaç disulfur. Malgrat que en el cas de l'RNasa A no existeix un consens sobre com l'eliminació d'aquest enllaç disulfur pot afectar el procés de plegament de la proteïna (Laity et al. 1997; Iwaoka et al. 1998; Ruoppolo et al. 2000), sí que s'ha determinat que aquesta

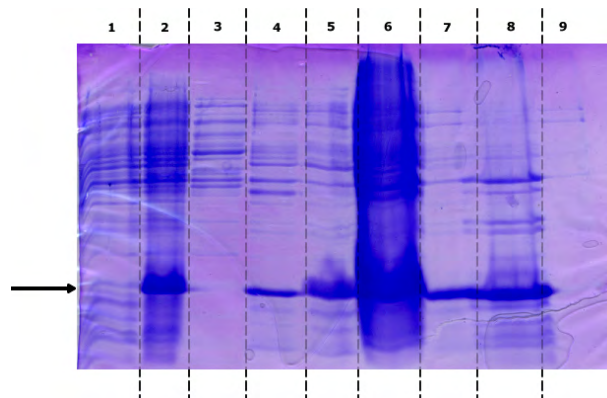


fig3.9 Anàlisi per SDS-PAGE del procés de purificació de la variant PM5NLS β 4 β 5. Es va carregar a cada carril una fracció equivalent de la mostra per tal que les bandes d'RNasa resultessin comparables. **1.** Extracte cel·lular de BL21(DE3) abans d'induir **2.** Extracte cel·lular després de 3h d'inducció amb 1mM IPTG **3.** Sobrenedant del lisat cel·lular **4.** Sediment del lisat cel·lular **5.** Sobrenedant del procés de solubilització dels cossos d'inclusió **6.** Sediment del procés de solubilització dels cossos d'inclusió **7.** Mostra després de concentrar **8.** Sediment de la diàlisi prèvia a la cromatografia de bescanvi catiónic **9.** Traves de la cromatografia de bescanvi catiónic

eliminació suposa una pèrdua d'estabilitat, mesurada a partir de corbes de desnaturalització induïda per temperatura, de quasi 20°C (Klink et al. 2000).

Totes les proteïnes purificades es van analitzar per espectrometria de masses MALDI-TOF (**taula3.2**). Els valors de massa molecular obtinguts en cada cas no diferien significativament dels esperats a partir del càlcul teòric. Així, l'anàlisi per espectrometria de masses (MALDI-TOF) va permetre confirmar que en general les proteïnes purificades no presentaven modificacions químiques ni, en principi, de la seqüència aminoacídica.

3.1.2.4 - Anàlisi de la interacció amb l'RI

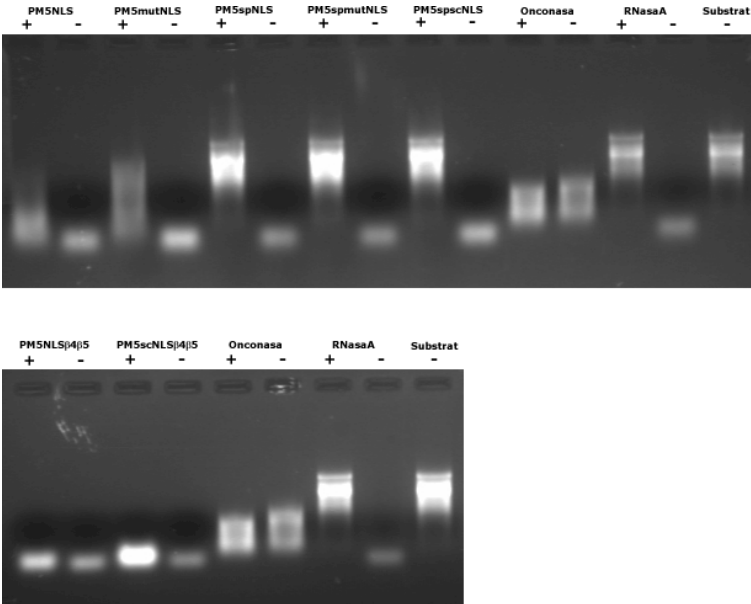


fig3.10 Inhibició de l'activitat enzimàtica de les variants per efecte de l'RI. La inhibició s'ha detectat visualitzant en un gel d'agarosa la degradació catalitzada per l'enzim del substrat 16S 23S – rRNA en absència (-) o presència (+) de 40 U d'RI.

Per tal de valorar la capacitat de l'RI d'inhibir les diverses variants construïdes, es va realitzar una anàlisi d'escapament a inhibidor en gel d'agarosa (**fig3.10**). Es va utilitzar RNasa A, que és inhibida, i onconasa, que no ho és, com a controls positiu i negatiu, respectivament, de l'experiment. Es va descartar la possible degradació intrínseca del substrat aplicant també una mostra del propi substrat incubat en les mateixes condicions en les quals es va dur a terme l'assaig.

En el cas de les variants que incorporen la seqüència al llaç $\beta 4\beta 5$ (PM5NLS $\beta 4\beta 5$ i PM5scNLS $\beta 4\beta 5$), es va poder observar que aquestes mantenien una activitat enzimàtica pràcticament equivalent tant en absència com en presència d'RI. En aquestes variants, la seqüència introduïda representa un increment net de tres aminoàcids respecte de l'RNasa parental a expenses de l'eliminació de residus importants per la unió específica de l'HP-

RNasa a l'RI, tals com són l'asparagina 88, la glicina 89 i l'arginina 91, les quals interaccionen mitjançant ponts d'hidrogen amb l'àcid glutàmic 264, el triptòfan 261 i l'àcid glutàmic 287, respectivament, de l'RI (Johnson et al. 2007b), i la substitució dels quals en l'HP-RNasa es tradueix en una disminució de l'afinitat per l'RI d'unes 1000 vegades (Leland et al. 2001). En les dues variants la seqüència introduïda és equivalent, tant pel què fa a la composició aminoacídica com a la zona de la seqüència on s'insereix, de manera que el comportament similar que van mostrar en front de l'RI era l'esperat. A més, aquest assaig ens va indicar de manera qualitativa que les dues RNases mantenien la seva activitat, donant suport a l'afirmació que la inserció dels NLS al llaç $\beta 4\beta 5$ no afectava de manera dràstica l'estructura de la proteïna.

És interessant destacar que en el cas de les variants PM5NLS i PM5mutNLS s'aprecia un cert grau d'escapament a l'acció de l'RI, lleugerament major en el cas de PM5NLS. Aquest resultat és en certa mesura sorprenent, ja que les modificacions que presenten aquestes dues variants respecte de la parental, la qual resulta totalment inhibida, no inclouen la zona implicada en la interacció RNasa-RI. És possible que l'escapament a l'RI observat es degui a la conformació que pren la seqüència introduïda en l'estructuració tridimensional de la proteïna, la qual interferiria físicament amb la unió a l'RI (**fig3.11**).

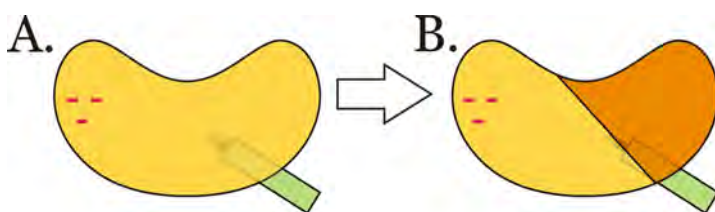


fig3.11 Esquema de la possible disposició tridimensional de les seqüències NLS introduïdes a l'extrem C-terminal sobre la superfície de l'HP-RNasa (A.) i relació amb la interacció amb l'RI (B.) en les variants PM5NLS i PM5mutNLS. S'indica l'NLS (verd), la zona de densitat de càrrega negativa (-) i la zona d'unió a l'RI (ombrejat taronja).

3.1.2.5 - Propietats citotòxiques en cultius cel·lulars

La capacitat citotòxica de totes les variants construïdes es va mesurar aplicant concentracions creixents de cada una d'elles en cultius cel·lulars *in vitro*, i mesurant l'activitat metabòlica de les cèl·lules mitjançant la seva capacitat de reduir una sal de formazan (**fig3.12**). Per a aquestes assaigs es va utilitzar la línia d'epidermocarcinoma A431. Com a control positiu es va utilitzar onconasa, per a la qual es van obtenir valors d'IC₅₀ (definit com la concentració de cadascuna de les RNases que provoca una reducció del 50% del creixement cel·lular) de 0,2 µM. Aquest valor és del mateix ordre que els que han estat descrits prèviament al nostre grup per a aquesta línia cel·lular (Bosch et al. 2004). Com a control negatiu es va utilitzar la variant parental no citotòxica PM5 la qual no presentà cap efecte a concentracions fins i tot de 15 µM (**fig3.12c**).

Pel què fa a les variants que incorporen la seqüència a l'extrem C-terminal (**fig3.12a**), no s'observà en cap cas un comportament citotòxic significatiu. A més a més, a concentracions elevades de proteïna, no s'observaren diferències entre la inhibició induïda per la variant que porta un SV40NLS (PM5NLS) i aquella induïda per la variant portadora d'una seqüència no reconeguda com a NLS (PM5mutNLS).

En el cas de les dues variants que incorporen la seqüència en el llaç $\beta 4\beta 5$ (**fig3.12b**), ni la variant PM5NLS $\beta 4\beta 5$ ni PM5scNLS $\beta 4\beta 5$ presentaren una citotoxicitat clara a les concentracions més grans assajades. Per les dues variants s'aprecia una tendència similar a disminuir l'activitat metabòlica a mesura que se n'augmenta la concentració, però en cap dels casos s'assolí una inhibició del 50% d'aquesta a les concentracions més grans testades (15 µM). La lleugera disminució en l'activitat metabòlica en els dos casos pot ser atribuïda a la seva capacitat d'escapar l'acció de l'RI o bé a l'augment de les càrregues positives. L'únic tret divergent entre les dues es troba en la funcionalitat de l'NLS; el fet que no hi hagi diferències significatives entre la variant que incorpora un NLS funcional i la variant que incorpora l'NLS desordenat sembla apuntar que la presència d'un NLS funcional en les posicions indicades no permet dotar de citotoxicitat una RNasa.

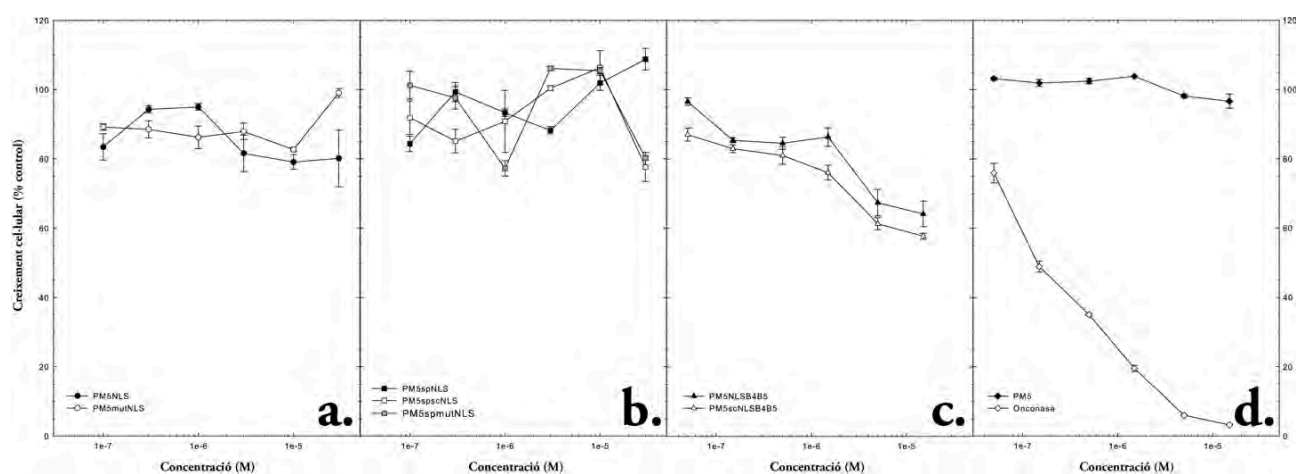


fig3.12 Assaig de citotoxicitat sobre cèl·lules de la línia d'epidermocarcinoma A431. Representació de la capacitat de reduir una sal de formazan després d'una incubació de 72 hores amb concentracions creixents de les RNases que incorporen un NLS a l'extrem C-terminal (a), dins de la seqüència de l'RNasa (b) i controls (c).

3.1.2.6 - Anàlisi de la importació nuclear mitjançant marcatge fluorescent i de la unió a la importina α

El fet que les variants realitzades fins el moment no presentessin activitat citotòxica podia indicar que l'NLS addicionat no era funcional. Per tal d'analitzar la funcionalitat de la seqüència NLS es va investigar, mitjançant tècniques de microscopia confocal de fluorescència, la importació nuclear de les variants marcades fluorescentment. Per tal de poder-ne assajar l'importació nuclear era necessari poder-hi unir de manera covalent un fluoròfor. Per a això es van construir, a partir de les formes PM5NLS i PM5mutNLS, mitjançant mutagènesi dirigida utilitzant l'oligonucleòtid universal T7Term i l'oligonucleòtid mutagènic M5NCT, noves variants que incorporen una cisteïna addicional a l'extrem N-terminal. Aquestes variants es van anomenar PM5NLS_{scnt} i PM5mutNLS_{scnt}. Aquesta cisteïna va ser introduïda per tal de permetre la unió al fluoròfor Alexa

Fluor 594 mitjançant un enllaç maleimida estable. Es va escollir l'extrem N-terminal de la proteïna per tal que el fluoròfor no interferís en la unió de la importina α a la seqüència NLS introduïda a l'altre extrem de l'enzim. Es van obtenir també les variants PM5NLS β 2 β 3cct i PM5NLS β 4 β 5cct, les quals incorporen una cisteïna addicional a l'extrem C terminal de la proteïna amb la mateixa finalitat. Aquestes variants es van obtenir utilitzant la mateixa estratègia que en el cas de les variants PM5NLSct i PM5mutNLSct, utilitzant en aquest cas l'oligonucleòtid universal T7Prom i l'oligonucleòtid mutagènic M9CCT.

L'assaig d'importació nuclear mitjançant microscòpia confocal de fluorescència només es va poder realitzar amb aquelles variants que incorporen la seqüència NLS a l'extrem C-terminal de l'RNasa, PM5NLSct i PM5mutNLSct. Per a aquestes variants, amb el protocol general de purificació d'RNases recombinants es van obtenir rendiments de 17.5 i 10.2 mg per litre de cultiu, respectivament (**taula3.2**), valors que no difereixen significativament dels obtinguts per d'altres variants purificades en el nostre laboratori. En el cas de les variants que incorporen aquesta seqüència en el laç β 4 β 5 no va ser possible d'obtenir suficient quantitat de proteïna pura com per a marcar-la amb el fluoròfor Alexa Fluor 594.

Totes les proteïnes purificades es van analitzar per espectrometria de masses MALDI-TOF (**taula3.2**). Es va observar que el valor de massa molecular de les variants PM5NLSct i PM5mutNLSct era uns 100 Da inferior a l'esperat teòricament. A més, apareixia un segon pic, amb un valor de massa molecular al voltant de 300 Da més gran que el primer. La seqüenciació de l'extrem N-terminal d'aquestes variants, realitzada al Servei Tècnic de Seqüenciació i Proteòmica de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la UAB, va revelar que en totes elles s'havia eliminat la metionina inicial. Aquest és un fenomen típic en la síntesi de proteïnes en bacteris, en els quals la síntesi proteica s'inicia amb una formilmertonina. El grup formil és eliminat post-transcripcionalment mitjançant l'acció de l'enzim pèptid deformilasa (PDF) i, depenent de la naturalesa de l'aminoàcid següent, la deformilació és seguida de l'eliminació de la metionina inicial per acció de l'enzim metionina aminopeptidasa (MAP) (Spector et al. 2003). Aquest enzim presenta especificitat per la metionina en posició inicial, però la seva acció depèn també de l'aminoàcid situat a continuació. Així, en el cas d'una metionina seguida d'una lisina, com és el cas de l'HP-RNasa, la MAP no la pot hidrolitzar, mentre que en substituir aquesta lisina per una cisteïna la hidròlisi es pot donar (Gonzales and Robert-Baudouy 1996). Aquesta eliminació post-transcripcional explica el desfasament observat entre la massa molecular teòrica i l'observada.

Pel què fa al segon pic de l'espectre, aquest corresponia a una fracció de la proteïna que presentava, unida a la cisteïna addicional, una molècula de glutatió (de seqüència aminoacídica Glu-Cys-Gly, i amb una massa molecular de 307.32 Da) com a resultat del procés de repliegament i reoxidació durant la purificació. Per tal de confirmar-ho, es van aplicar a una SDS-PAGE mostres de PM5NLSct i de PM5mutNLSct tractades i no tractades amb l'agent reductor DTT (**fig3.13**). L'aplicació d'un agent reductor permet trencar l'enllaç disulfur entre el glutatió i la cisteïna lliure d'aquestes dues variants. S'observa com la banda doble que apareix a la mostra no reduïda, que correspondria a les dues formes, unida i no unida a glutatió, desapareix a la mostra tractada amb l'agent reductor. La presència d'aquesta molècula de glutatió es va eliminar posteriorment, al moment d'unir-hi el fluoròfor.

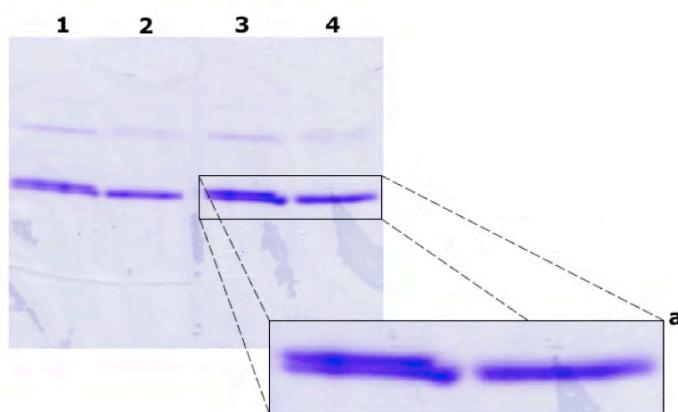


fig3.13 Anàlisi per SDS-PAGE de mostres purificades de PM5NLSct i PM5mutNLSct reduïdes o no amb DTT. La banda doble que s'observa en la proteïna sense tractar, corresponent a les formes unida i no unida a glutatió, desapareix en les mostres tractades amb l'agent reductor. **1.** PM5NLSct 11 μ M **2.** PM5NLSct 11 μ M +DTT 1mM **3.** PM5mutNLSct 11 μ M **4.** PM5mutNLSct 11 μ M +DTT 1mM **a.** Detall de la desaparició de la banda doble.

Així doncs, tot i observar-se modificacions en la seqüència aminoacídica de les variants PM5NLSct i PM5mutNLSct, aquestes s'han pogut caracteritzar, determinant que no causarien interferències en els processos i anàlisis posteriors.

L'assaig va ser realitzat al "Laboratoire de Dynamique Moléculaire des Interactions Membranaires", dirigit pel Dr. Bruno Beaumelle, a la Universitat Montpellier II de França. Aquest assaig consisteix en incubar les proteïnes marcades fluorescentment amb cèl·lules HeLa tractades amb digitonina. Aquest detergent permeabilitza la membrana cel·lular deixant intacta la membrana nuclear, de manera que permet la difusió de les variants al citosol, des d'on poden ser transportades al nucli. En aquests experiments, per tal de determinar la localització del nucli cel·lular, es van marcar paral·lelament les cèl·lules HeLa amb Sytox Green, el qual és un agent fluorescent intercalant del DNA. La superposició de les imatges obtingudes pel Sytox Green i de la de cada una de les RNases permet comprovar la colocalització dels dos elements, determinant per tant l'acumulació nuclear dels enzims marcats.

Juntament amb les variants PM5NLSct i PM5mutNLSct, es va utilitzar com a control positiu de la importació nuclear la variant PE5cct, la qual és internalitzada al nucli seguint un mecanisme de transport actiu, i com a control negatiu la variant parental PM5cct, que no és internalitzada (Bosch et al. 2004). L'anàlisi de la importació nuclear (**fig3.14**) mostra que PE5cct, però no PM5cct, s'acumula al nucli després de 10 minuts d'incubació. En el cas de les variants PM5NLSct i PM5mutNLSct, no es va detectar importació nuclear en els temps assajats (5, 10 i 15 minuts). No va ser possible assajar temps superiors, ja que suposen el deteriorament de la membrana nuclear.

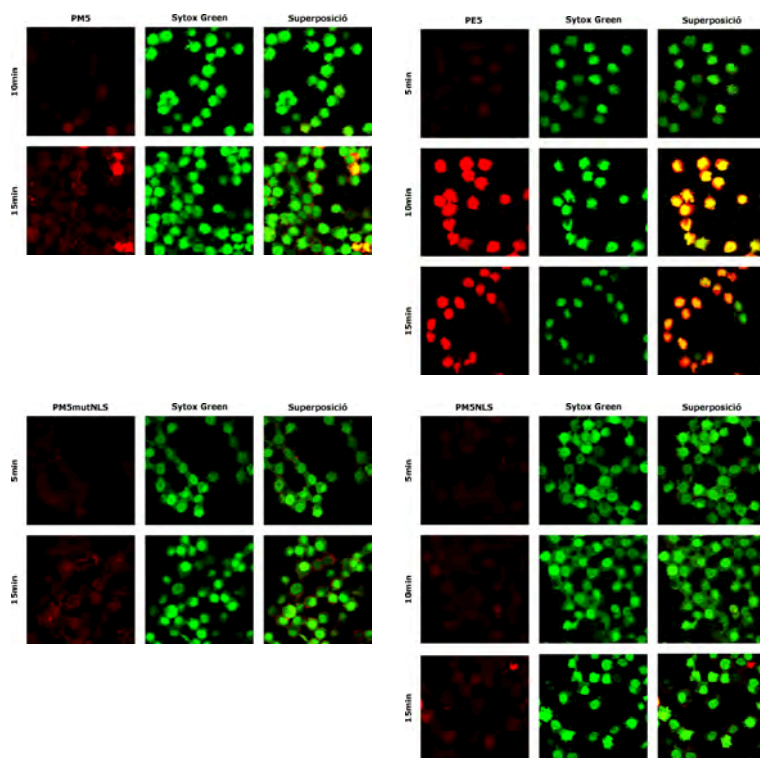


fig3.14 Anàlisi de l'acumulació nuclear de PM5cct, PE5cct, PM5NLSct i PM5mutNLSct. Les cèl·lules HeLa s'han incubat durant 5, 10 o 15 minuts a 30°C en presència de cada una de les variants (2.3 μM) marcades amb el fluoròfor Alexa Fluor 594. La localització cel·lular de les variants es mostra en vermell, la del Sytox Green en verd i la superposició dels dos colors genera zones de color groc. Les imatges representen una àrea de 124x124 μm.

La manca de funcionalitat de l'NLS observada podria ser deguda a què l'espaiador que separa aquesta seqüència de la proteïna no fos prou llarg com per permetre'n una bona exposició, de manera que la seva interacció amb la importina α es veuria impossibilitada per impediments estèrics (**fig3.15**). Aquests resultats són conseqüents i donen una explicació al fet que aquestes variants no presentin citotoxicitat sobre la línia cel·lular A431.

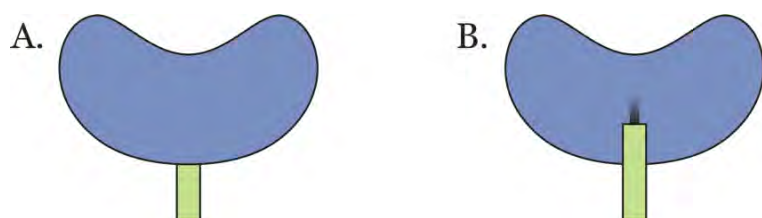


fig3.15 Esquema de la possible disposició tridimensional de les seqüències NLS introduïdes a l'extrem C-terminal sobre la superfície de l'HP-RNasa. Vista frontal (A) i posterior (B).

En el cas de les variants que incorporen l'NLS al llaç $\beta 4\beta 5$ no va ser possible la purificació de quantitats suficients amb una cisteïna lliure a l'extrem C-terminal, de manera que va ser necessari un sistema alternatiu per tal d'avaluar la funcionalitat de l'NLS. Així, per les variants PM5NLS $\beta 4\beta 5$ i PM5scNLS $\beta 4\beta 5$, es va realitzar

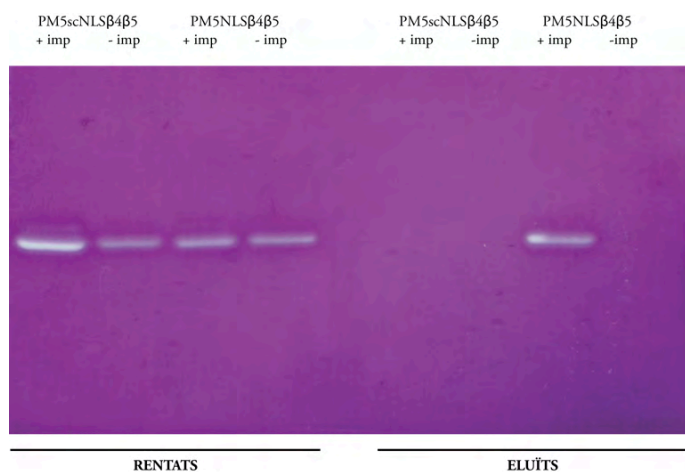


fig3.16 Anàlisi de la capacitat d'unió a la importina truncada $\Delta 59-529$ Imp α de les variants PM5NLS $\beta 4\beta 5$ i PM5scNLS $\beta 4\beta 5$. Zimograma de les fraccions rentades, no unides específicament a la matriu, i de les fraccions eluïdes amb GSH d'una columna en la qual s'ha unit (+imp) o no (-imp) importina α .

un assaig de *pull-down*, en el qual es va avaluar la capacitat d'unió d'aquestes RNases a una matriu a la qual prèviament es va immobilitzar la importina α truncada $\Delta 59-529$ Imp α fusionada a GST. Per tal d'eliminar la possibilitat que hi hagués unions inespecífiques de les RNases a la reïna es van realitzar controls sense presència d'importina α , i només en presència de GST.

L'anàlisi de la unió de PM5NLS $\beta 4\beta 5$ i PM5scNLS $\beta 4\beta 5$ a la importina α va mostrar que l'NLS que la variant PM5NLS $\beta 4\beta 5$ incorpora al llaç $\beta 4\beta 5$ li confereix capacitat d'interaccionar amb la importina, mentre que en el cas de PM5scNLS $\beta 4\beta 5$ no s'observà interacció (**fig.3.16**). Així doncs, l'NLS conservava la funcionalitat en l'RNasa, mentre que la forma desordenada scNLS no resultava funcional.

Així doncs, a PM5NLS $\beta 4\beta 5$ tot i la presència d'un NLS funcional no s'aconsegueix un increment de la citotoxicitat.

3.1.3 - Noves Variants d'HP-RNasa

L'assaig d'importació nuclear va mostrar que la seqüència SV40NLS inserida al residu 122 amb un espaiador flexible de 4 residus no resultava funcional. Com ja s'ha comentat, una possible explicació d'aquest fet és que aquest espaiador no fos suficientment llarg com per assegurar una bona exposició de l'NLS, de manera que existien impediments estèrics, generats per l'RNasa, que s'oposarien a la formació del complex NLS-importina. Per això, es va proposar allargar la seqüència de l'espaiador que precedeix l'NLS, aprofitant per una banda la totalitat de la seqüència de PM5 i afegint una seqüència espaiadora addicional poc estructurada que conferís a l'NLS una gran mobilitat.

3.1.3.1 - Disseny, construcció i purificació de les variants d'HP-RNasa amb una seqüència NLS precedida d'un espaiador

Es van construir tres noves variants que incorporen, a l'extrem C-terminal, les seqüències SV40NLS, SV40scNLS i SV40mutNLS respectivament, amb una seqüència espaiadora de longitud superior. Per a la construcció d'aquestes variants es va amplificar per PCR el gen de PM5 utilitzant un encebador mutagènic per a l'extrem 3' del gen. Aquest encebador va suposar l'eliminació del codó Stop, així com la introducció de la seqüència codificant pel tetrapèptid SVGG i de la diana de l'enzim de restricció *Bam*HI. El fragment obtingut, una vegada digerit amb els enzims de restricció *Nde*I (present a l'extrem 5' del gen) i *Bam*HI, va ser lligat als vectors pM5NLS, pM5mutNLS i pM5scNLS digerits amb la mateixa parella d'enzims de restricció (**fig3.17**). D'aquesta manera es van obtenir les variants PM5spNLS, PM5spmutNLS i PM5spscNLS, en les quals l'NLS es troba separat de la resta de la proteïna per un espaiador addicional, amb un augment net total de 7 residus respecte de les variants anteriorment descrites (**fig3.18**).

També es van construir tres noves variants, derivades d'aquestes, que incorporen una cisteïna addicional a l'extrem N-terminal de la proteïna. Aquestes variants es van obtenir per mutagènesi dirigida per oligonucleòtid mitjançant PCR, utilitzant l'oligonucleòtid universal T7Term i l'oligonucleòtid mutagènic M5_{NCT}.

Per totes aquestes variants, seguint el protocol general de producció i purificació d'HP-RNases recombinants, es van obtenir els rendiments mostrats a la **taula3.3**. Totes les proteïnes purificades es van analitzar per

espectrometria de masses MALDI-TOF per tal de confirmar la seva massa molecular. En general, els valors de massa molecular obtinguts en cada cas no van diferir significativament dels esperats a partir del càlcul teòric. Com en el cas de les variants sense seqüència espaiadora, s'observaren diferències significatives en el cas de les variants que incorporen una cisteïna addicional a l'extrem N-terminal (PM5spNLSct, PM5spmutNLSct i PM5spscNLSct), les quals són també atribuïbles a l'eliminació de la metionina inicial i la incorporació d'una molècula de glutatió durant el procés de purificació.

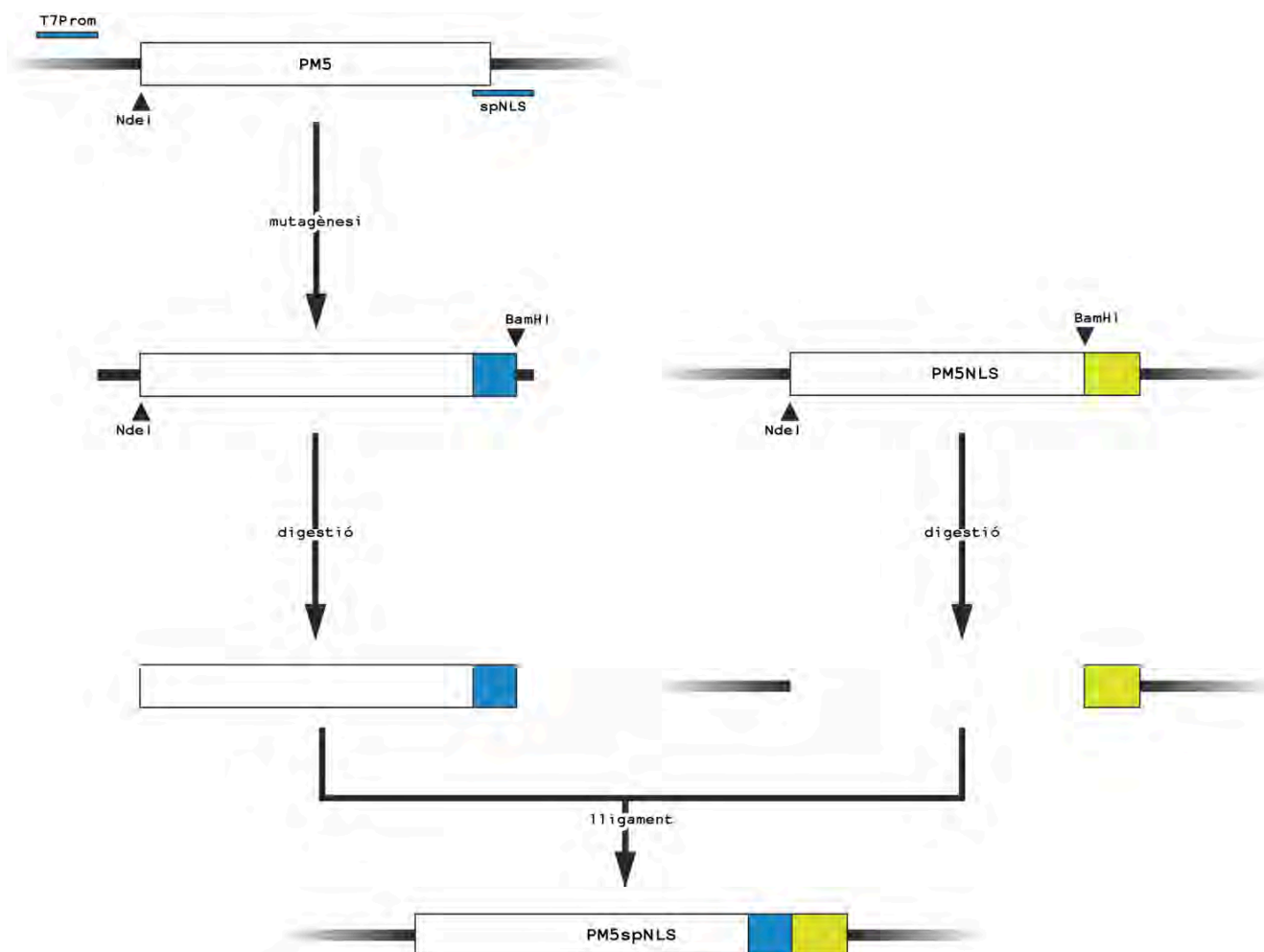


fig3.17 Esquema de l'estratègia d'obtenció de la variant PM5spNLS. La variant es va obtenir lligant el producte d'amplificació de PM5 entre T7Prom i spNLS, digerit amb *NdeI* i *BamHI*, sobre el vector portador de PM5NLS digerit amb els mateixos enzims. Per a la construcció de PM5spmutNLS i PM5spscNLS es va utilitzar la mateixa estratègia, amb els vectors portadors de PM5mutNLS i PM5scNLS, respectivament.



fig3.18 Seqüència de l'extrem C-terminal de les variants PM5_{cct}, PM5NLS, PM5 i PM5spNLS. S'indica la seqüència gènica i aminoacídica en cada cas. En color blau es mostra la seqüència corresponent a PM5, en verd la seqüència corresponent a SV40NLS, en taronja l'espaiador de PM5_{cct} i en vermell la seqüència espaiadora addicional. El triangle invertit indica el punt de tall de l'enzim de restricció *Bam*HI.

taula3.3 Rendiments de purificació obtinguts per cada una de les HP-RNases recombinants amb una seqüència NLS precedida d'un espaiador i pesos moleculars obtinguts i teòrics per a cada una d'elles

proteïna	rendiment (mg/l de cultiu)	Mw teòric (Da)	Mw observat (Da)
PM5spNLS	5	16022	16035
PM5spNLSctnt	5	15997	15892 / 16223
PM5spmutNLS	4.9	16079	16083
PM5spmutNLSctnt	1.4	16054	15928 / 16236
PM5spscNLS	11.5	16022	16025
PM5spscNLSctnt	10	15997	15894 / 16225

3.1.3.2 - Anàlisi de la interacció amb l'RI

Per tal de valorar la capacitat de l'RI d'inhibir les diverses variants construïdes, es va realitzar una anàlisi d'escapament a inhibidor en gel d'agarosa (**fig3.10**). A diferència de les variants amb l'NLS a l'extrem C-terminal, les quals presentaven un lleuger escapament a l'acció de l'RI, en la sèrie de variants que incorporen la seqüència a l'extrem C-terminal amb un braç espaiador addicional no es va observar que cap de les tres variants produïdes (PM5spNLS, PM5spmutNLS i PM5spscNLS) fos capaç d'evadir l'acció de l'RI. Aquest resultat no era sorprenent, ja que la zona on es va inserir l'NLS o les seves variants es troba allunyada de les zones d'interacció de l'RNasa amb l'RI. La inhibició es podria donar per tant amb la mateixa afinitat que en el cas de l'HP-RNasa. Per altra banda, el fet que les variants amb un espaiador més llarg siguin completament inhibides per l'RI suggereix que en aquestes variants l'estructuració tridimensional es dona de manera diferent. Es podria explicar en base a la densitat de càrregues de la proteïna parental PM5, ja que PM5 presenta una regió amb un elevat nombre de càrregues negatives propera a l'extrem C-terminal, en la qual es troben els residus Glu49, Asp53, Glu103, Glu125 i Asp126, els quals es troben situats en l'estructura de l'enzim en una regió propera a l'extrem C-terminal (**fig3.19a**).

En aquesta situació, els residus bàsics de les seqüències NLS es trobarien atrets electrostàticament per aquesta zona, de manera que es compactarien amb la superfície de la proteïna (**fig3.19b**). El fet que la regió de densitat de càrrega negativa amb la qual podrien interaccionar les seqüències NLS no impliqui cap residu putativament implicat en la interacció ni d'altres residus propers a aquests (Pous et al. 2000), podria explicar que el replegament de les seqüències NLS introduïdes no interfereixi amb la unió RNasa-RI, de manera que la inhibició sigui completa (**fig3.19c**).

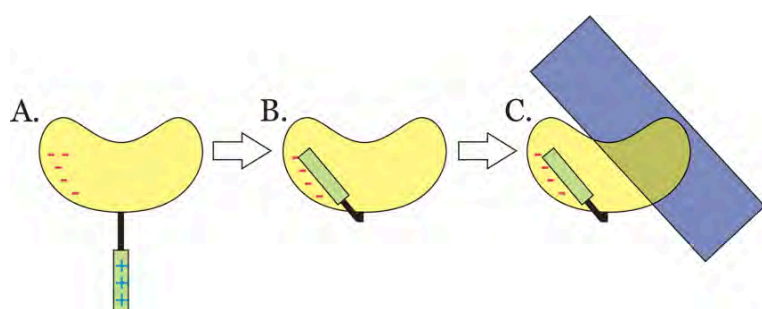


fig3.19 Esquema de la possible disposició tridimensional de les seqüències NLS introduïdes a l'extrem C-terminal sobre la superfície de l'HP-RNasa i relació amb la interacció amb l'RI. Variants que incorporen una seqüència espaiadora addicional. S'indica l'NLS (verd), els residus bàsics de l'NLS (+), la zona de densitat de càrrega negativa (-) i l'RI (blau).

3.1.3.3 - Propietats citotòxiques en cultius cel·lulars

Com en els casos anteriors, la capacitat citotòxica de les noves variants construïdes es va mesurar aplicant concentracions creixents de cada una de les proteïnes en cultius cel·lulars *in vitro*, i mesurant l'activitat metabòlica de les cèl·lules de la línia d'epidermocarcinoma A431 mitjançant la seva capacitat de reduir una sal de formazan. Com a control positiu es va utilitzar onconasa, i com a control negatiu es va utilitzar la variant parental no citotòxica PM5.

Tal i com es pot observar (**fig3.20**), cap de les tres variants estudiades (PM5spNLS, PM5spmutNLS i PM5spscNLS) presenta activitat citotòxica.

3.1.3.4 - Anàlisi de la importació nuclear mitjançant marcatge fluorescent

La funcionalitat de l'NLS en aquestes noves construccions es va estudiar mitjançant un experiment d'importació nuclear determinant la colocalització, per microscopia confocal de fluorescència, de les variants

marcades amb Alexa fluor 594 per unió a la cisteïna addicional a l'extrem N-terminal (spNLScnt, spscNLScnt i spmutNLScnt) (**fig3.21**) amb Sytox Green. Com en el cas de les variants que incorporen l'NLS sense un espaiador addicional, es van utilitzar com a controls positiu i negatiu de la importació nuclear PE5 i PM5, respectivament.

fig3.20 Assaig de citotoxicitat sobre cèl·lules de la línia cel·lular d'apidermocarcinoma A431. Representació de la capacitat de cèl·lules A431 de reduir una sal de formazan després d'una incubació de 72 hores amb concentracions creixents de les RNases que incorporen un NLS a l'extrem C-terminal amb una seqüència espaiadora (**a**) i controls (**b**).

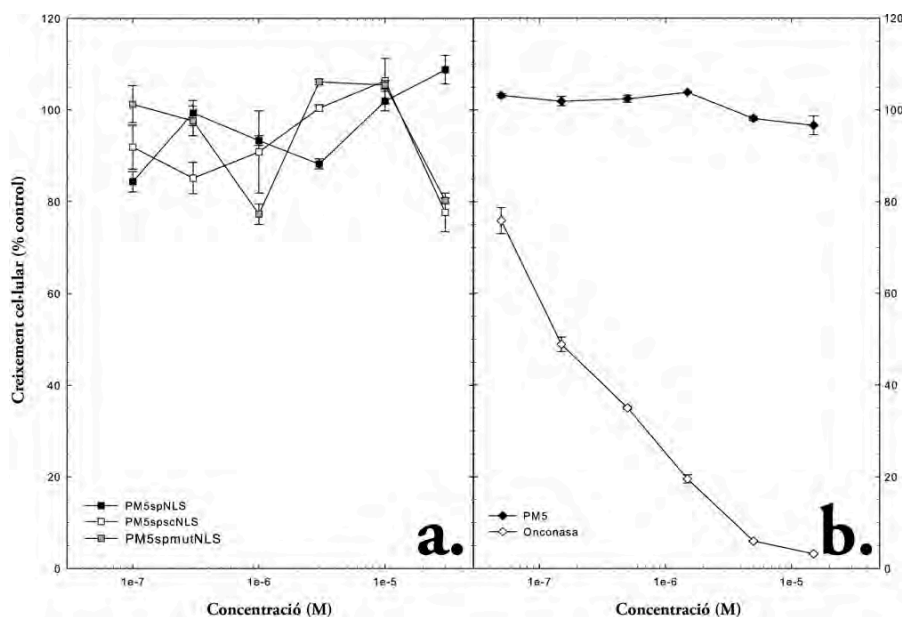
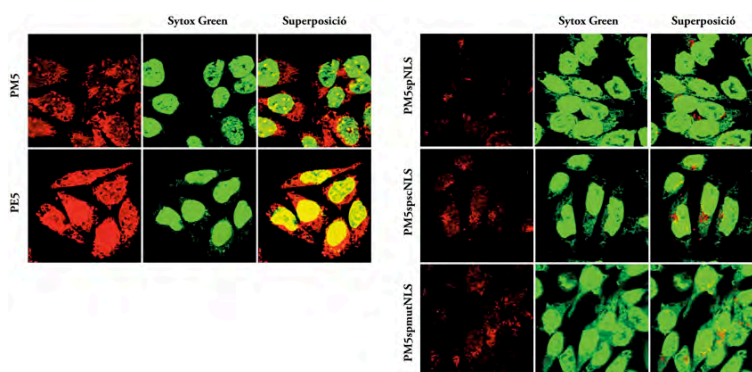


fig3.21 Anàlisi de l'acumulació nuclear de PM5, PE5, PM5spNLS, PM5spscNLS i PM5spmutNLS. Les cèl·lules HeLa s'han incubat durant 10 minuts a 30°C en presència de cada una de les variants (2.3 μM) marcades amb el fluoròfor Alexa Fluor 594. La localització cel·lular de les variants es mostra en vermell, la del Sytox Green en verd i la superposició dels dos colors genera zones de color groc. Les imatges representen una àrea de 94x94 μm.



Per a cap de les tres variants es produí una acumulació nuclear significativament diferent de la que s'observà per PM5. La manca de funcionalitat de l'NLS no podia ser deguda a què el possible complex RI-RNasa-Importina α fos massa gran com per ser translocat, ja que la capacitat dels porus nuclears de permetre el trànsit de molècules i complexos és de fins a 25 MDa (Fontes et al. 2000). Aquesta manca de funcionalitat de l'NLS es podria explicar, com en el cas de l'absència d'escapament a RI, en base a la densitat de càrregues de PM5 (**fig3.19**). Els residus bàsics de les seqüències NLS, atrets electrostàticament per la zona d'elevada densitat de càrrega negativa, es trobarien insuficientment exposats, de manera que s'evitaria el reconeixement específic per part de la importina α .

Malgrat el conjunt de resultats obtinguts no es descarta que la presència d'una seqüència de localització nuclear en una RNasa sigui una bona estratègia per dotar-la d'activitat citotòxica. Cal però que a banda del reconeixement per part de la importina la variant sigui prou estable i capaç d'establir una competència entre l'RI la importina α per a la seva captura.

3.3 - ESTUDI DELS DETERMINANTS QUE INDUEIXEN LA DIMERITZACIÓ DE PM8

L'intercanvi tridimensional de dominis és un mecanisme a través del qual dues o més proteïnes idèntiques intercanvien un mateix element estructural per tal de formar un oligòmer, mantenint una conformació equivalent a la nativa del seu estat monomèric (Bennett et al. 1995). L'intercanvi de dominis ha sigut proposat com un mecanisme que donaria explicació a l'evolució de les proteïnes oligomèriques, i ha pres rellevància en la investigació biomèdica en ser associat a malalties relacionades amb la formació de dipòsits amiloides, tals com l'Alzheimer o la malaltia de Creutzfeldt–Jakob (Janowski et al. 2001; Sambashivan et al. 2005; Bennett et al. 2006). L'oligomerització pot conferir noves propietats a les proteïnes que poden establir dímers o oligòmers ordenats d'ordre superior mitjançant intercanvi de dominis, millorar l'eficiència de les funcions pròpies de la forma monomèrica o permetre'n nous mecanismes de control de l'activitat.

En la família de les RNases, l'única proteïna dimèrica natural és la BS-RNasa, que presenta les dues subunitats idèntiques unides mitjançant dos ponts disulfur intercatenaris entre les cisteïnes 31 i 32 de cada subunitat. En el dímer de BS-RNasa s'estableix un equilibri entre les formes que presenten o no intercanvi de les hèlixs α que conformen el domini N-terminal, M×M i M=M, respectivament. Aquest procés d'intercanvi de dominis té implicacions biològiques rellevants, ja que la forma M×M presenta funcions biològiques especials, entre les quals destaca l'activitat antitumoral (Piccoli et al. 1992).

Tal i com s'ha destacat en el capítol previ, l'obtenció de noves RNases amb propietats antitumorals és actualment un camp d'interès que pot obrir noves vies a la lluita contra el càncer. Així, la dilucidació dels mecanismes a través dels quals la variant de l'HP-RNasa PM8 assoleix la dimerització mitjançant l'intercanvi de dominis resulta interessant, no només com a mitjà de comprensió dels processos bàsics d'oligomerització que han permès la complexitat estructural de bona part de les proteïnes cel·lulars i de les patologies associades a aquests processos, sinó també en el camí de disseny de noves RNases citotòxiques.

PM8 és una variant de l'HP-RNasa en la qual la seqüència del domini N-terminal va ser substituït pel de la BS-RNasa, i incorpora el canvi de la prolina 101 per una glutamina. L'estructura cristal·logràfica està constituïda per un dímer format mitjançant un procés d'intercanvi de dominis en el qual el domini N-terminal, entre els residus 1 i 15, és intercanviat entre els dos protòmers a través d'un pèptid connector que inclou el segment comprès entre els residus 16 i 22 (Canals et al. 2001).

Es va proposar que el procés de dimerització de PM8 era diferent dels postulats pels dos dímers de l'RNasa A. Segons el model proposat, la dimerització tindria lloc en un procés en dos passos (Rodríguez et al. 2006a; Benito et al. 2008a). Primerament es donaria la interacció entre els monòmers, formant-se una interfície oberta estabilitzada mitjançant dos ponts salins entre la glutamina 103 d'una subunitat i l'arginina 104 de l'altra (Canals et al. 2001). En aquest punt, les posicions relatives de les dues subunitats prepararien la molècula per l'intercanvi de dominis. En un segon pas, el procés d'intercanvi tridimensional de dominis vindria dirigit per l'estabilització dels pèptids xanera, desestructurats o altament flexibles en el monòmer, en una conformació que afavoriria l'intercanvi dels dominis N-terminals. En la forma intercanviada, les prolines 19 es troben encaixades entre les cadenes laterals de la glutamina 101 i la tirosina 25 de l'altra subunitat, i la glutamina 101 estableix a més tres ponts d'hidrogen amb les serines 20 de les dues subunitats. Finalment, el pèptid xanera seria estabilitzat mitjançant un entramat de ponts d'hidrogen en una conformació d'hèlix 3_{10} (Canals et al. 2001). Segons aquest model, les interaccions establertes entre residus del pèptid xanera de les dues subunitats, i entre aquest pèptid connector i el cos de les proteïnes, n'estabilitzarien la conformació de manera que es desplaça l'equilibri entre les formes no intercanviada i intercanviada cap a la segona (Rodríguez et al. 2006a).

En aquest capítol del treball s'ha investigat el paper que tenen diferents residus en el procés de dimerització de PM8. S'ha determinat l'efecte sobre la constant de dissociació, sobre la propensió a l'intercanvi de dominis, l'estabilitat i la flexibilitat de diversos residus pertanyents a tres possibles determinants del procés de dimerització. Es demostra que els residus més crítics pel procés de dimerització i intercanvi de dominis són els que estableixen interaccions que estabilitzen les subunitats en una conformació que afavoreixi l'intercanvi.

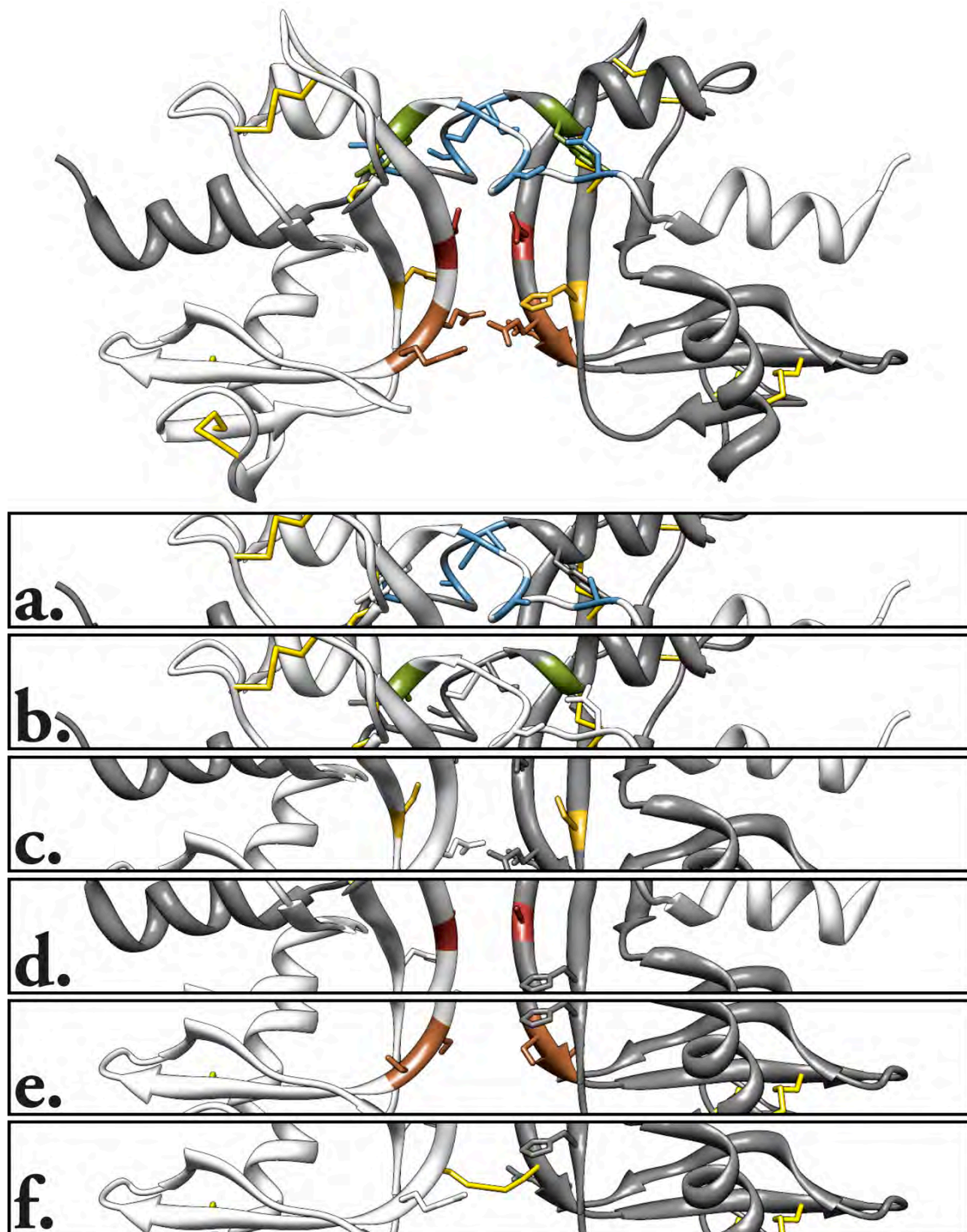


fig3.22 Posició dins l'estructura tridimensional de PM8 del residus mutats. En els panells (a - f) es mostren els canvis introduïts en cada una de les variants construïdes: **a.** PM8_3A. Substitució de l'asparagina 17 i les serines 21 i 23 per alanines per tal d'augmentar la flexibilitat del pèptid xarnera al dímer intercanviat. **b.** PM8_Y25A. Mutació dirigida a impedir l'apilament de la prolina 19 entre les cadenes laterals de la histidina 25 i la glutamina 101. **c.** PM8_H80S. Canvi per tal d'establir un nou pont d'hidrogen entre les serines 80 i 18 que estabilitzi el pèptid xarnera al monòmer. **d.** PM8_Q101A. Mutació dirigida a impedir l'apilament de la prolina 19 entre les cadenes laterals de la tirosina 25 i la glutamina 101 i per dificultar l'establiment de la interfície oberta. **e.** PM8_E103SR104S. Canvi per dificultar l'establiment de la interfície oberta. **f.** PM8E103C. Mutació per l'establiment d'un dímer estabilitzat covalentment mitjançant un enllaç disulfur intercatenari.

3.3.1 - Disseny de les Variants de PM8

Per tal de caracteritzar el paper que diferents residus de la proteïna tenen en l'intercanvi de dominis i en la dimerització de PM8, es van substituir aquests mitjançant tècniques de mutagènesi dirigida. Es van dissenyar tres grups de variants dirigits a l'estudi de diferents zones o processos que es creien importants per la dimerització (**taula3.4**).

taula3.4 Variants de PM8 dissenyades i determinant estructural a l'estudi del qual es dirigeixen.

<i>variant de PM8</i>	<i>determinant estructural estudiat</i>
PM8	variant pseudo-parental
PM8E103C	indueix el dímer covalent
PM8_3A	formació de ponts d'hidrogen en el pèptid xarnera en la dimerització
PM8E103C_3A	formació de ponts d'hidrogen en el pèptid xarnera en l'intercanvi de dominis
PM8_Y25A	apilament de la prolina 19 i la tirosina 25 en la dimerització
PM8E103C_Y25A	apilament de la prolina 19 i la tirosina 25 en l'intercanvi de dominis
PM8_Q101A	formació de ponts d'hidrogen amb la serina 20 i apilament amb la prolina 19 en la dimerització
PM8E103C_Q101A	formació de ponts d'hidrogen amb la serina 20 i apilament amb la prolina 19 en l'intercanvi de dominis
PM8_H80S	formació de pont d'hidrogen amb el pèptid xarnera en la dimerització
PM8E103C_H80S	formació de ponts d'hidrogen en el pèptid xarnera en l'intercanvi de dominis
PM8_E103S_R104S	formació de ponts salins en la interfície oberta en la dimerització

3.3.1.1 - Variants per estudiar el rol de la formació de la interfície oberta en la dimerització

A l'estructura cristal·logràfica de PM8 (Canals et al. 2001) la interfície oberta és estabilitzada principalment per dues interaccions electrostàtiques entre l'àcid glutàmic 103 i l'arginina 104 de cada subunitat. Per tal d'avaluar la importància d'aquests dos residus en la formació del dímer no intercanviat de PM8 es va construir la variant PM8_E103S_R104S, en la qual els dos residus carregats van ser substituïts per una serina (**fig3.22a**). Aquestes serines es troben massa allunyades per establir ponts d'hidrogen intercatenaris, i no es van detectar altres possibles interaccions en l'estructura de PM8.

Amb la construcció d'aquesta variant es pretenia dificultar l'establiment de la interfície oberta en els passos inicials de la dimerització mitjançant l'eliminació de les interaccions que l'afavoreixen.

3.3.1.2 - Variants per estudiar el rol de la interacció entre el pèptid xarnera i el cos de la proteïna en la dimerització

A l'estructura cristal·logràfica de PM8 s'observa com les cadenes laterals de la glutamina 101 i la tirosina 25 de cada subunitat creen una cavitat en la qual s'insereix la prolina 19 de l'altra subunitat, de manera que el pèptid xarnera s'estabilitza en una conformació que afavoreix l'intercanvi del domini N-terminal.

A més, la glutamina 101 estableix tres ponts d'hidrogen amb la serina 20 en cada una de les dues subunitats, de manera que s'estabilitza la conformació estesa del pèptid xarnera en el dímer. Per tal d'estudiar el paper d'aquests dos residus en el procés de dimerització es van construir les variants PM8_Y25A (**fig3.22b**) i PM8_Q101A (**fig3.22c**), en les quals cada un d'aquests residus es va substituir per una alanina.

S'esperava que aquestes dues variants dificultessin l'estabilització del dímer intercanviat, disminuint l'avantatge termodinàmic de la forma intercanviada en front de la que no estableix intercanvi del domini N-terminal.

3.3.1.3 - Variants per estudiar el rol de l'estabilitat del pèptid xarnera en la dimerització

Tal i com s'ha comentat, l'estabilitat i la mobilitat del pèptid xarnera podria ser un factor crític a l'hora de determinar la propensió d'un dímer a realitzar intercanvi de dominis (Rodríguez et al. 2006a). Per tal de

modificar la mobilitat d'aquesta zona, es va estudiar l'estructura de PM8 (Canals et al. 2001). En aquesta estructura es pot observar la presència d'un entramat de ponts d'hidrogen als pèptids xarnera, els quals són així estabilitzats en una conformació d'hèlix 3_{10} . Aquests ponts d'hidrogen s'estableixen entre l'esquelet polipeptídic o de les cadenes laterals de l'asparagina 17, la serina 18, la prolina 19 i les serines 20, 21, 22 i 23. Per altra banda, l'estructura de la variant monomèrica PM7 (Pous et al. 2000), la qual només presenta els canvis P50S i Q101P respecte de PM8, mostra que aquesta zona és molt flexible o dinàmica en el monòmer i per tant no s'hi estableixen ponts d'hidrogen. Es va proposar que l'eliminació d'alguns d'aquests ponts d'hidrogen hauria de desestabilitzar l'estructura en l'hèlix 3_{10} del dímer, però sense tenir efecte en el monòmer.

Es van seleccionar l'asparagina 17 i les serines 21 i 23, les quals es van substituir per alanines en la variant PM8_3A, ja que són els residus que estableixen un major nombre d'enllaços per pont d'hidrogen (**fig3.23**). Aquesta variant tenia l'objectiu de desestabilitzar el pèptid xarnera en la forma intercanviada, impedit la formació de l'hèlix 3_{10} i minimitzant així el benefici termodinàmic del dímer intercanviat respecte del monòmer.

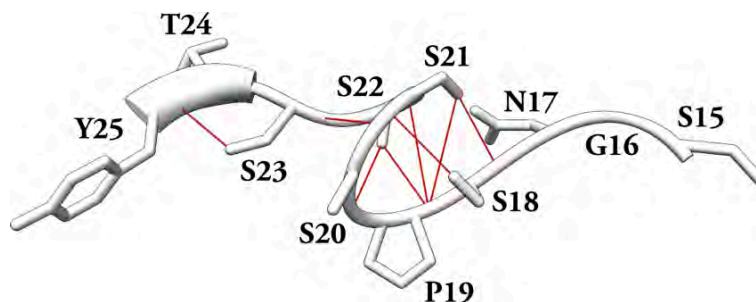


fig3.23 Ponts d'hidrogen intracatenaris (línies vermelles) que s'estableixen al pèptid xarnera estabilitzant-lo en una conformació d'hèlix 3_{10} .

De manera complementària es va dissenyar una variant en la qual el pèptid xarnera pogués presentar una mobilitat menor quan es trobés en forma monomèrica. Aquesta variant tenia com objectiu l'estabilització del pèptid xarnera en la forma no intercanviada per tal de minimitzar el benefici termodinàmic de la seva estabilització en l'hèlix 3_{10} pel procés de dimerització. Amb aquesta finalitat, la histidina 80, que no estableix cap interacció amb el pèptid xarnera en el dímer intercanviat (**fig3.24b**), es va substituir per una serina a la variant PM8_H80S. Aquesta variant es va construir en base a treballs previs en els quals s'ha descrit que el pèptid xarnera de l'RNasa A és estabilitzat per la presència d'un pont d'hidrogen que s'estableix només a la forma monomèrica, entre les serines 18 i 80 (**fig3.24a**), i que la substitució de la serina 80 per una arginina genera una variant amb un pèptid xarnera d'elevada mobilitat (Vatzaki et al. 1999). A més, s'ha descrit una variant de la BS-RNasa a la qual s'ha substituït el pèptid xarnera pel de l'RNasa A, a més de la substitució de l'asparagina 67 per un àcid aspàrtic. En aquesta variant, anomenada hA-mBS, la substitució de l'arginina 80 per una serina redueix la flexibilitat del pèptid xarnera i la tendència a l'intercanvi de dominis del 70% al 30% (Ercole et al. 2007). Aquesta disminució de la tendència a intercanviar el domini N-terminal s'ha atribuït a la interacció estabilitzant que s'estableix entre les serines 80 i 18 dins del mateix protòmer (Ercole et al. 2007), així com a la pèrdua d'interaccions favorables de la càrrega positiva de l'arginina en el dímer (Ercole et al. 2009).

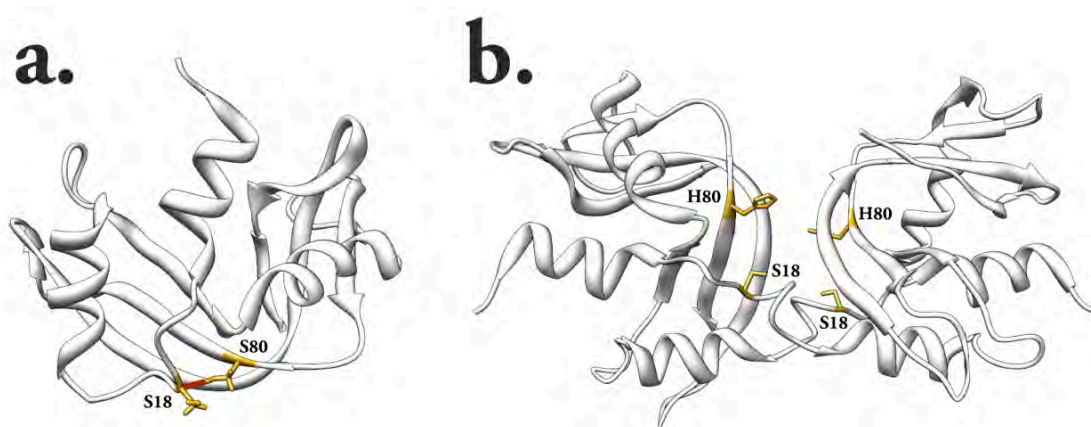


fig3.24 Estructura de l'RNasa A en la qual es mostra el pont d'hidrogen intracatenari (línia vermella) establert entre la serina 80 i la serina 18 de l'RNasa A, que actua estabilitzant el pèptid xarnera en la forma monomèrica (a). En PM8 la presència d'una histidina en aquesta posició impedeix l'establiment d'aquesta interacció estabilitzant i afavorint la dimerització (b).

L'objectiu de la variant PM8_H80S era doncs permetre la formació d'un nou pont d'hidrogen entre la serina 18 i la serina introduïda a la posició 80, de manera que es donés una major estabilització del pèptid xarnera en el monòmer.

3.3.1.4 - Variants creades per estabilitzar la interfície oberta mitjançant un enllaç disulfur

Tal i com s'ha indicat, per tal de determinar el rol que cada un dels diferents residus seleccionats tenia en el procés de dimerització, es va estudiar per a cada una de les diferents variants esmentades l'efecte de la mutació tant sobre la capacitat de dimerització de la molècula com sobre la seva capacitat d'intercanviar el domini N-terminal. L'estudi de l'intercanvi de dominis en variants de PM8 té la limitació que la formació de la interfície oberta i el procés d'intercanvi de dominis poden tenir lloc de manera simultània, cosa que dificulta la discriminació de les interaccions que regeixen un i altre procés. Per tal de superar aquesta limitació, els estudis d'intercanvi de dominis s'han realitzat utilitzant una bateria de mutants que incorporen, a banda de les substitucions descrites anteriorment, el canvi de l'àcid glutàmic en posició 103 per una cisteïna (Rodríguez et al. 2006a), de manera que es permet l'estabilització de la interfície oberta del dímer mitjançant un enllaç disulfur. Aquesta posició va ser escollida perquè en l'estructura del dímer de PM8 les cadenes laterals dels dos residus 103 es troben encarades i la distància que separa els seus carbonis α (7.83 Å) és similar a la mitjana dels vuit residus de cisteïna que formen els quatre enllaços disulfur a PM8 (5.6 Å) (Canals et al. 2001). Es van considerar també les lisines 102, les quals presenten una distància interatòmica entre carbonis α encara més propera, però es va desestimar perquè les seves cadenes laterals es troben encarades en sentits oposats a l'estructura del dímer. Aquest nou enllaç disulfur intercatenari permet que el dímer no es dissociï, de manera que es pot estudiar el procés d'intercanvi de dominis sense la interferència del procés de dissociació.

En concret, les variants construïdes amb l'objectiu d'avaluar les interaccions importants per l'intercanvi de dominis van ser PM8E103C_3A, PM8E103C_Y25A, PM8E103C_H80S i PM8E103C_Q101A, a partir de les variants PM8_3A, PM8_Y25A, PM8_H80S i PM8Q101A, respectivament. La introducció de la cisteïna addicional no es va realitzar sobre PM8_E103S_R104S, ja que amb la seva construcció es pretenia dificultar l'establiment de la interfície oberta en els passos inicials de la dimerització mitjançant l'eliminació de les interaccions que l'afavoreixen, mentre que la formació d'un pont disulfur en les posicions 103 busca l'efecte contrari, l'estabilització covalent d'aquesta interfície oberta.

3.3.2 - Construcció de les Variants de PM8

Per a la construcció de les diferents variants de PM8 es va utilitzar una estratègia de mutagènesi dirigida basada en la reacció en cadena de la polimerasa mitjançant una amplificació en dos passos, utilitzant un oligonucleòtid mutagènic i un oligonucleòtid universal complementari a un dels extrems de la seqüència a modificar, T7Prom o T7Term segons el cas. En les variants que incorporen una cisteïna lliure en posició 103 es va utilitzar com a motlle de la reacció un plasmidi que incorpora la seqüència codificant per la variant PM8_E103C, mentre que en els altres casos es va utilitzar com a motlle un plasmidi que incorpora la seqüència de PM8.

Totes les variants construïdes es van seqüenciar per tal de comprovar la incorporació de la mutació o mutacions desitjades.

3.3.3 - Producció i Purificació de les Variants de PM8

Abans d'iniciar el procés d'expressió i purificació de les RNases recombinants, es va analitzar el nivell d'expressió de diversos clons per tal de seleccionar aquells que presentessin una millor expressió i així assegurar un bon nivell d'expressió en tots els casos. Amb aquesta finalitat, s'analitzaren electroforèticament cultius induïts d'aquests clons.

Totes les variants van ser produïdes i purificades seguint el mètode general per RNases recombinants, posat a punt al laboratori on s'ha dut a terme aquesta tesi, i se'n van obtenir rendiments d'entre 5 i 20 mg per litre de cultiu. La massa molecular es va comprovar en tots els casos mitjançant MALDI-TOF al Servei Tècnic de Recerca de la UdG. En el cas de les variants que incorporaven una cisteïna a la posició 103 es va detectar la presència d'un glutatió unit a la cisteïna addicional 103 com a resultat del procés de replegament i reoxidació.

Per tal de facilitar el seu posterior anàlisi per NMR, les variants PM8E103C, PM8E103C_H80S i PM8E103C_3A van ser produïdes en medi marcat amb ^{15}N , i la variant parental PM8E103C també va ser produïda en medi marcat amb ^{13}C i ^{15}N . En aquest cas es va seguir el mateix procediment d'expressió i purificació i se'n van obtenir rendiments similars. El marcatge isotòpic d'aquestes variants va ser necessari perquè per aquestes variants es pretenia estudiar per NMR l'efecte d'aquestes mutacions sobre la mobilitat o flexibilitat del segment modificat i com afectava a la resta de la proteïna (estudis dinàmics i d'estabilitat).

3.3.4 - Caracterització del Plegament Global de les Variants

3.3.4.1 - Assignació dels espectres NMR de PM8E103C

Abans de poder dur a terme els estudis de dimerització, es va considerar que era important poder conèixer com les diferents mutacions podien haver afectat el plegament global de les proteïnes. Primerament es va caracteritzar per NMR la variant parental PM8E103C. Es va realitzar l'assignació dels espectres de ressonància de ^1H , ^{15}N i ^{13}C mitjançant una aproximació a partir d'espectres tridimensionals (Bax 1994). En tots els casos es va dissoldre la proteïna en 90% H_2O / 10% D_2O per tal de poder fer correctament el *lock* de deuteri. Com a referència es va utilitzar DSS (àcid 2,2-dimetil-2-silapentan-5-sulfònic) a una concentració de 50 μM . La mostra es va tractar prèviament amb DTT 1 mM per tal d'eliminar així possibles molècules de glutatió unides a la cisteïna 103. Es van registrar els espectres que es descriuen a continuació:

^1H	Permet avaluar de manera ràpida i senzilla la qualitat de la mostra de proteïna.
$^1\text{H}^{15}\text{N}$ HSQC	Espectre bidimensional que permet la visualització dels nitrògens amida de l'esquelet de la cadena polipeptídica i de les cadenes laterals de les arginines, asparagines, glutamines i triptòfans.
$^1\text{H}^{13}\text{C}$ HSQC	Espectre bidimensional que permet la visualització dels carbonis alifàtics i/o aromàtics.
HNCA	HNCA, Espectre tridimensional que a partir de l'estimulació del protó amida d'un residu ens dóna informació dels carbonis α del propi residu i del precedent
HN(CO)CA	Espectre tridimensional que a partir de l'estimulació del protó amida d'un residu ens dóna informació del carboni α del residu precedent.
CBCA(CO)NH	Espectre tridimensional que a partir de l'estimulació del protó amida d'un residu ens dóna informació dels carbonis α i β del residu precedent.
CBCANH	Espectre tridimensional que a partir de l'estimulació del protó amida d'un residu ens dóna informació dels carbonis α i β del propi residu i del precedent.

La informació proporcionada per cada un dels espectres tridimensionals va permetre identificar-ne els àtoms corresponents, tant sobre els propis espectres tridimensionals com sobre els espectres bidimensionals HSQC (**fig3.25**).

3.3.4.2 - Determinació de l'estructura secundària de PM8E103C

Una vegada feta l'assignació seqüencial, es van prendre els valors de desplaçament obtinguts pels carbonis α i β en cada residu i es van restar dels valors teòrics en pèptids no estructurats (Wishart et al. 1995).

$$\Delta\delta = \delta_{\text{experimental}} - \delta_{\text{random coil}}$$

En el cas dels carbonis α , un valor positiu de $\Delta\delta$ indica una estructuració secundària en hèlix α , mentre que els valors negatius són indicadors de full β . En el cas dels desplaçaments dels carbonis β és a la inversa. L'anàlisi d'aquests valors va indicar que el plegament de la proteïna s'ajustava a l'estructura secundària descrita anteriorment per a PM8 (Canals et al. 2001), de manera que es pot concloure que l'RNasa es troba correctament plegada (**fig3.26**).

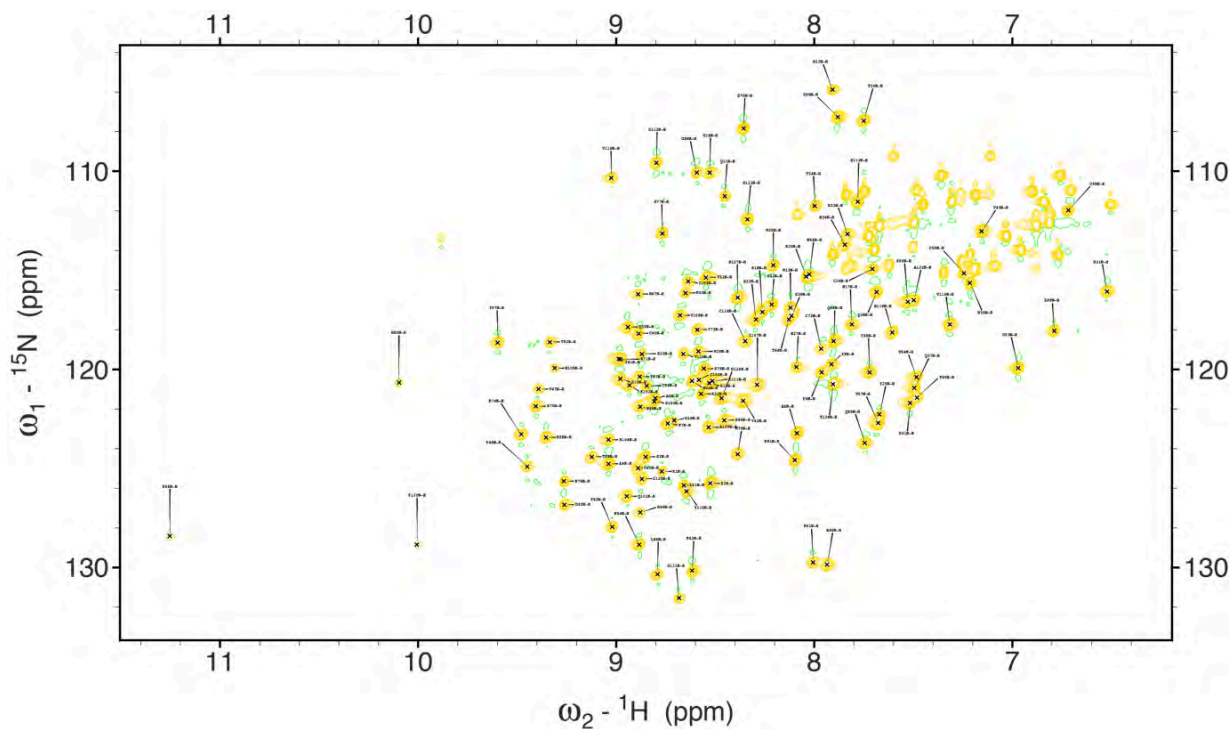


fig3.25 Espectre N HSQC del monòmer de PM8E103C amb els pics corresponents als nitrògens amida de cada residu identificats.

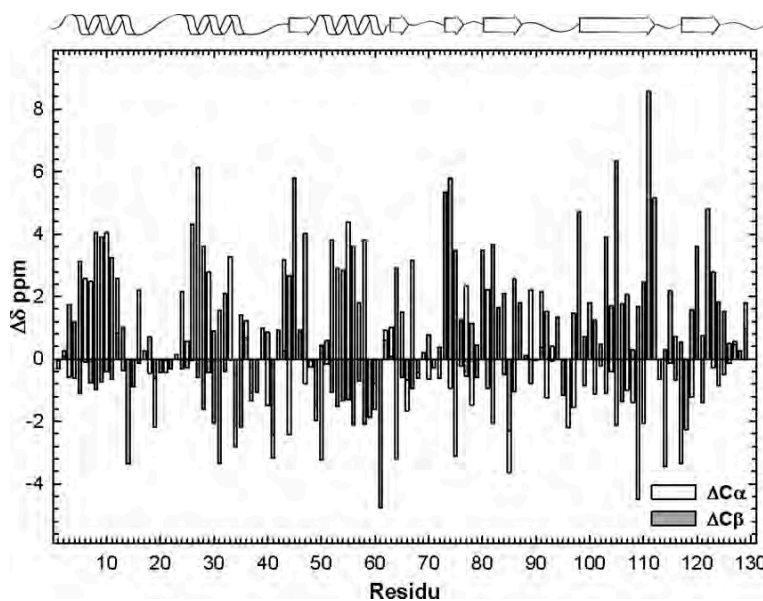


fig3.26 Diferències entre els valors de desplaçament químic dels carbonis α (en blanc) i β (en gris) del monòmer de PM8E103C i els valors teòrics en pèptids no estructurats. A la part superior de la figura s'indica el tipus d'estructura secundària que presenta cada un d'aquests residus en la proteïna PM8.

3.3.4.3 - Avaluació de canvis conformacionals

Els valors de desplaçament químic són molt sensibles a les variacions estructurals, de manera que poden ser utilitzats per fer una avaluació dels efectes de les mutacions introduïdes en l'estructura. Es van aprofitar aquestes mesures per tal de poder observar quins canvis estructurals es produïen en PM8E103C en el moment de la dimerització.

Es va realitzar l'assignació dels espectres N HSQC de PM8E103C i es van comparar els valors de desplaçament químic per ^{15}N i per ^1H amb els obtinguts per al monòmer (**fig3.27a**). Tal i com es pot observar existeixen grans variacions en els desplaçaments químics a la zona del pèptid xarnera, cosa que indica que s'hi donen variacions estructurals en el procés de dimerització. S'observen variacions més petites però també significatives

a les zones corresponents als fulls β que formen la interfície oberta (residus 48-49, 80-83 i 101-103) i que topològicament es troben properes a l'estructura. És interessant notar com l'hèlix α N-terminal, element estructural que és intercanviat en la dimerització, manté pràcticament valors idèntics de desplaçament en el monòmer i en el dímer; cosa que indica que la seva conformació i estructuració es mantenen sense canvis en les dues formes.

S'observa un patró de diferències similar també en el cas dels senyals corresponents a ^1H .

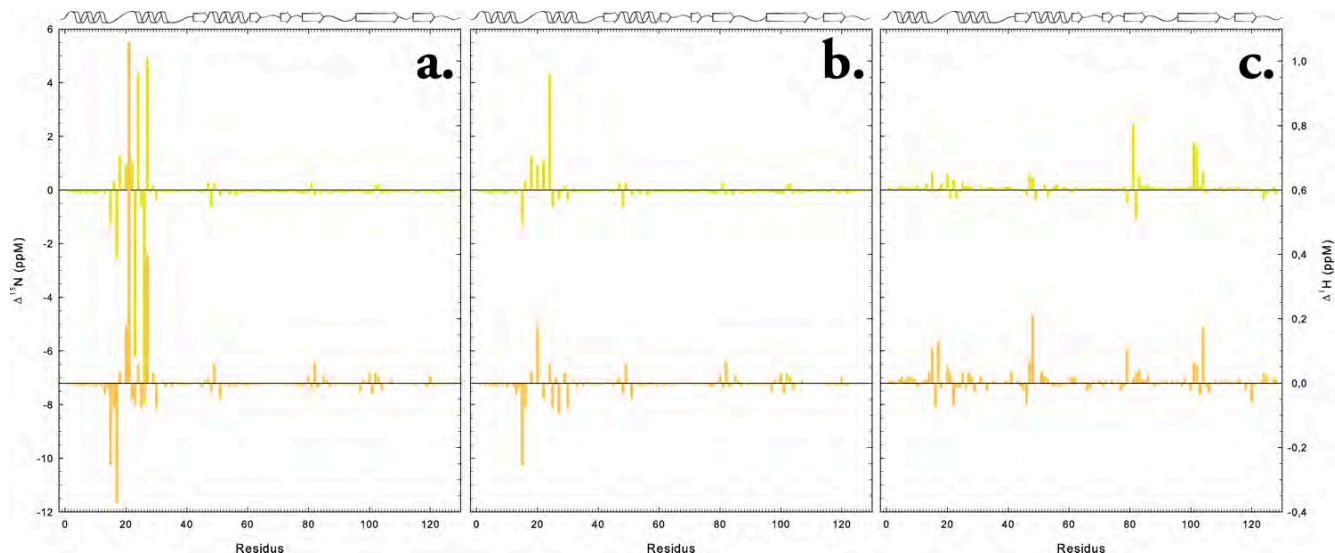


fig3.27 Diferències respecte de la forma parental PM8E103C en els valors de desplaçament químic per ^{15}N (eix esquerre, verd) i ^1H (eix dret, taronja) pel dímer de PM8E103C (a) i per les variants PM8E103C_3A (b) i PM8E103C_H80S (c).

Les diferències en els desplaçaments químics, tant per ^{15}N com per ^1H , resulten molt petites en elsllaços compresos entre els residus 34 - 42, 64 - 70, 87 - 96 i 112 - 114. Aquest fet és indicador de l'absència de diferències conformacionals en aquestes regions. Tots aquests girs es troben allunyats tant del pèptid xarnera com de la interfície oberta. De manera semblant, pràcticament tots els elements d'estructuració secundària són essencialment idèntics en totes les variants, amb l'excepció dels fulls β 4 i β 5 (79 - 86 i 97 - 111) esmentats anteriorment, els quals formen part de la interfície oberta. En base a les diferències en els valors de desplaçament químic, es pot concloure que l'estructura general de PM8E103C en la seva forma dimèrica, així com el seu plegament, es troben conservats, i que les diferències estructurals significatives es concentren a les regions corresponents al pèptid xarnera i a la interfície oberta.

Adicionalment també es va caracteritzar per RMN les estructures de les variants PM8E103C_3A i PM8E103C_H80S. (Es va incloure aquestes variants en l'estudi ja que s'esperava que les mutacions introduïssin canvis en la mobilitat i/o conformació de segments de la proteïna que podien ser detectats per RMN). Com ja s'ha esmentat, en la variant PM8E103C_3A es van substituir l'asparagina 17 i les serines 21 i 23 per alanines. L'objectiu d'aquestes substitucions era d'avaluar el paper que en l'intercanvi de dominis i en la dimerització tenen els ponts d'hidrogen formats per aquests residus, els quals estableixen el pèptid xarnera en una conformació d'hèlix 3_{10} . Els espectres de RMN es van assignar per comparació amb aquells obtinguts per al monòmer de PM8E103C. A partir dels espectres mesurats per NMR (**fig3.27b**), es va poder veure que les tres mutacions introduïdes generen grans diferències en els valors dels desplaçaments químics en aquesta regió. Fins a quatre residus presenten diferències de desplaçament superiors a 1 ppm en el senyal corresponent a ^{15}N , i en un dels casos el canvi resulta de més de 4 ppm respecte de PM8E103C. A més, s'observen canvis menors però significatius, d'entre 0.2 i 0.6 ppm en els segments 48 - 49, 80 - 82 i 101 - 102, pertanyents als fulls β que formen la interfície oberta. Pels senyals corresponents a ^1H s'observa un patró de diferències similar. En canvi, les diferències en els desplaçaments químics, tant per ^{15}N com per ^1H , resulten molt petites en els loops compresos entre els residus 34 - 42, 64 - 70, 87 - 96 i 112 - 114. Aquest fet és indicador de l'absència de diferències conformacionals en aquestes regions. Tots aquests girs es troben allunyats tant del pèptid xarnera com de la interfície oberta. Es pot doncs concloure que pràcticament tots els elements d'estructura secundària són essencialment idèntics respecte de la forma parental PM8E103C, amb l'excepció dels fulls β que s'impliquen en la formació de la interfície oberta.

La substitució de la histidina en posició 80 per una serina, que en l'RNasa A estabilitza el pèptid xarnera en el monòmer mitjançant un pont d'hidrogen amb la serina 18, genera en els valors de desplaçament químic de la variant PM8E103C_H80S diferències superiors a 1 ppm pels senyals corresponents a ¹⁵N en la zona de la mutació i en els residus 101 - 103 (**fig3.27c**). Aquests residus es troben propers a la posició 80 en l'estructura tridimensional de la proteïna i formen part de la interfície oberta. S'observen canvis menors però significatius en els llaços 14 - 23 i 48 - 49. Com en els casos exposats anteriorment, s'observa un patró de diferències similar també en el cas dels senyals corresponents a ¹H.

De manera semblant a PM8E103C_3A, s'observen poques diferències en els valors de desplaçament químic respecte de PM8E103C. Les diferències estructurals significatives es concentren a les regions corresponents al pèptid xarnera i a la interfície oberta.

3.3.4.4 - Anàlisi de l'estabilitat

La comparació de l'estabilitat conformacional de les diferents variants respecte a la proteïna parental es va usar també per predir si la introducció de mutacions havia produït algun canvi dràstic en l'estructura de les diferents proteïnes.

Es va analitzar l'estabilitat de les diferents variants així com de les formes dimèriques de PM8E103 i PM8E103C_3A. Per a això es va seguir mitjançant dicromisme circular el procés de desplegament induït per temperatura i es va determinar la temperatura mitja de fusió ($T_{1/2}$) de cada variant. En tots els casos es va observar una única transició que s'ajustava a un model termodinàmic de dos estats. Pel que fa als valors de $T_{1/2}$ obtinguts pel monòmer i del dímer de PM8E103C aquests van ser de 61.8°C pel monòmer i de 62.3°C pel dímer (**taula3.5**). L'estabilitat del monòmer i del dímer de PM8E103C_3A també va ser molt similar. Es van obtenir uns valors de $T_{1/2}$ de 62.6°C pel monòmer i de 63.3°C pel dímer. El petit d'augment en la $T_{1/2}$ del dímer respecte del monòmer en aquests casos es pot atribuir a l'enllaç disulfur intercatenari que uneix els dos protòmers. Excepte PM8E103C_Y25A totes les altres variants presentaven una $T_{1/2}$ molt semblant a l'obtinguda per PM8E103C. En el cas de PM8E103C_3A aquest resultat era inesperat ja que els canvis introduïts comporten la pèrdua de diversos ponts d'hidrogen, i s'esperava que això es traduiria en una menor estabilitat tèrmica. En el cas de la variant PM8E103C_Y25A, el valor de $T_{1/2}$ mesurat mitjançant dicromisme circular va ser de 54.8°C, uns 7°C menor a PM8E103C. Aquesta gran disminució de l'estabilitat pot ser atribuïda a la pèrdua d'interaccions hidrofòbiques i de van der Waals, així com d'un pont d'hidrogen que s'estableix entre el grup OH de la cadena lateral de la tirosina 25 i el grup carboxil de l'aspàrtic en posició 14 (Juminaga et al. 1997).

taula3.5 Estabilitat tèrmica de les variants de PM8.

variant	$T_{1/2}$ (°C)	variant	$T_{1/2}$ (°C)
PM8E103C monòmer	61.8	PM8E103C_Y25A monòmer	54.8
PM8E103C dímer	62.3	PM8E103C_H80S monòmer	60.0
PM8E103C_3A monòmer	62.6	PM8E103C_Q101A monòmer	61.1
PM8E103C_3A dímer	63.3	PM8_E103S_R104S monòmer	60.0

A tall de comparació, l'estabilitat conformacional de les formes monomèriques de PM8E103C, PM8E103C_3A i PM8E103C_H80S també va ser estudiada mitjançant intercanvi protó - deuteri (Huyghues-Despointes et al. 1999) (**fig3.28**). En el cas de PM8E103C la seva estabilitat va resultar ser de 9.9 kcal/mol, lleugerament inferior a la de PM8E103C_3A (10.3 kcal/mol). En conjunt, les dades obtingudes en l'anàlisi de l'estabilitat de PM8E103C_3A indiquen que les mutacions introduïdes no disminueixen de manera dràstica l'estabilitat global d'aquesta variant, i de fet en determinen una lleugera estabilització, cosa que coincideix amb els resultats obtinguts en l'estudi de desnaturalització tèrmica. Les dades d'intercanvi protó - deuteri de PM8E103C_3A mostren com les diferències en l'estabilitat no són uniformes al llarg de la seqüència, l'estabilitat de la primera hèlix α és més elevada en la variant PM8E103C_3A respecte dels valors observats en la forma parental PM8E103C, cosa que podria ser deguda directament a la introducció de les tres alanines en el pèptid xarnera proper, ja que les alanines tenen la propensió intrínseca més elevada per a la formació d'hèlixs (Chakrabartty et al. 1991). Això confirmaria la hipòtesi que la xarxa d'enllaços d'hidrogen estabilitza la conformació intercanviada en el dímer (Canals et al. 2001). En el cas de PM8E103C_H80S l'estabilitat conformacional va ser de 8.3 kcal/

mol. La disminució observada en l'estabilitat conformacional respecte de PM8E103C i PM8E103C_3A presenta variacions en les mesures a nivell de residu. S'observa com tots els elements estructurals són menys estables que en les altres dues variants estudiades excepte en el cas de l'hèlix α N-terminal, la qual és l'element més estable d'aquesta variant.

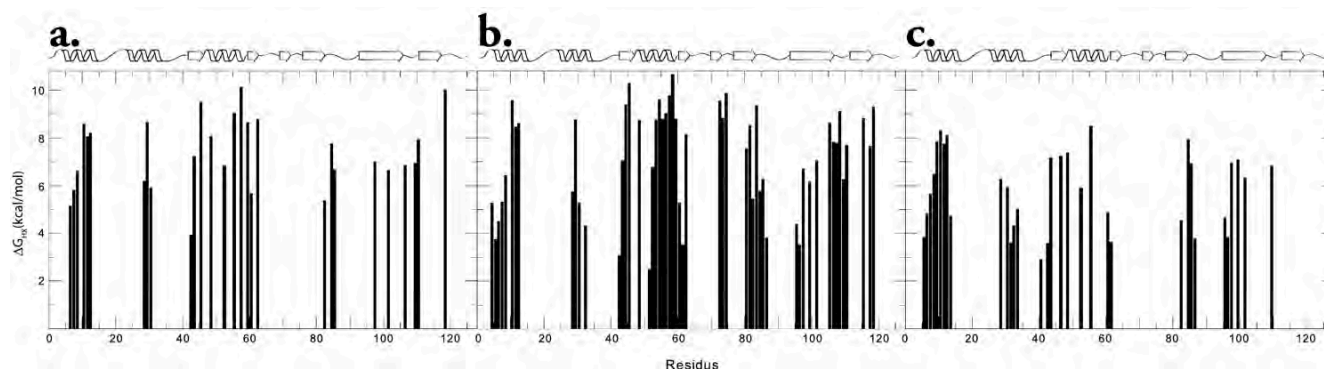


fig3.28 Energia lliure conformacional dels hidrògens amida individuals pel monòmer de PM8E103C (a) i per les variants PM8E103C_3A (b) i PM8E103C_H80S (c) mesurada mitjançant el seguiment per NMR de l'intercanvi protó-deuteri a 25°C pH 4.5.

3.3.4.5 - Mesura de la flexibilitat de la cadena polipeptídica

Es van mesurar les dinàmiques internes de PM8E103C mitjançant experiments de relaxació utilitzant espectres $^{15}\text{N} \{^1\text{H}\}$ NOE (**fig3.29**). La relació entre els espectres amb NOE i sense NOE dóna una mesura del grau de flexibilitat de la cadena polipeptídica en una escala d'entre picosegons i nanosegons. En les regions de mobilitat més elevada, tals com girs i *loops*, aquesta relació és menor. Segons els paràmetres dinàmics, la zona de més gran mobilitat és la corresponent al pèptid xarnera.

En el casos de PM8E103C_3A i PM8E103C_H80S s'observa que els paràmetres dinàmics mesurats mitjançant experiments de relaxació utilitzant espectres $^{15}\text{N} \{^1\text{H}\}$ NOE són molt similars a la variant pseudo-parental, sense diferències significatives en cap punt de la seqüència.

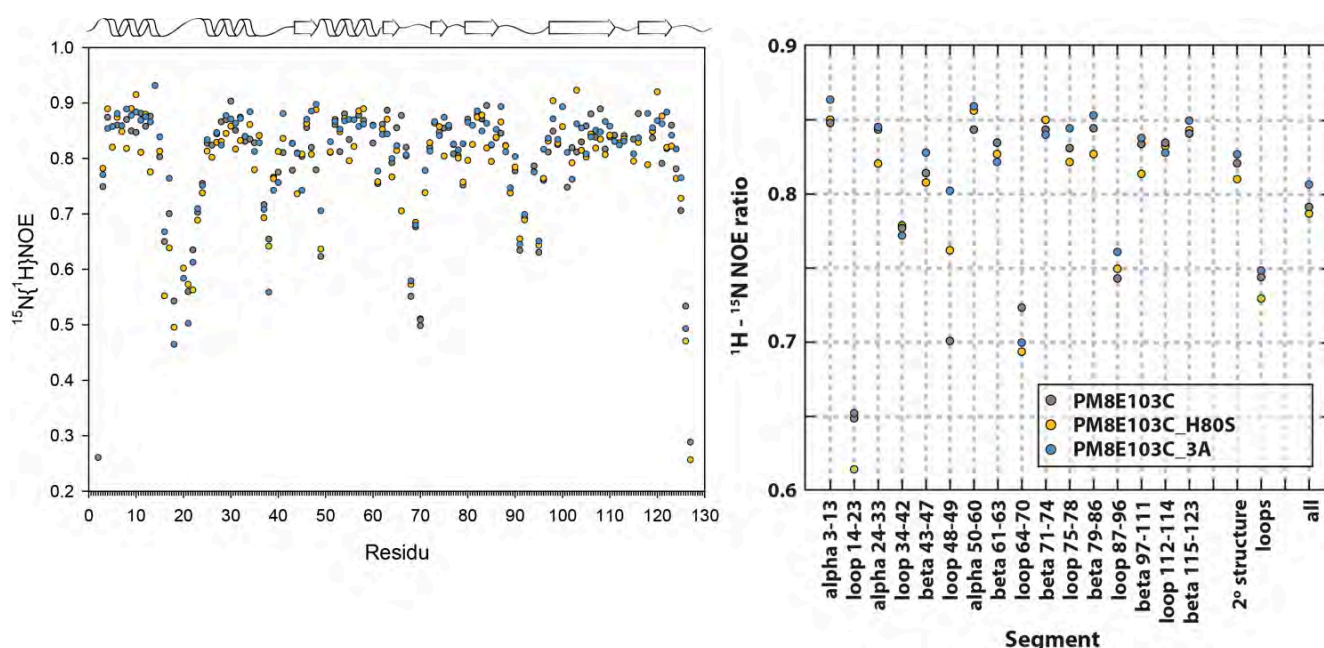


fig3.29 Dinàmica interna mesurada mitjançant NMR $^{15}\text{N} \{^1\text{H}\}$ NOE de PM8E103C (gris), PM8E103C_3A (blau) i PM8E103C_H80S (taronja), a nivell de residu (panell esquerre) i segment (panell dret)

A diferència de l'RNasa A, la qual cal que es desplegui per tal de generar un dímer amb intercanvi de dominis (Lopez-Alonso et al. 2010), PM8 i la BS-RNasa poden intercanviar el seu domini N-terminal mantenint la seva conformació nativa en solució. L'anàlisi de l'estructura, la dinàmica i l'estabilitat conformacional de les diverses variants ha evidenciat que les mutacions introduïdes no han afectat de manera significativa la seva estabilitat o estructura terciària, tot i que es poden observar efectes importants en la conformació dels segments propers als punts de mutació. Aquests resultats no difereixen dels observats en RNases desestabilitzades de manera més severa, en les quals l'estructura terciària és preservada i els canvis estructurals més significatius es limiten a les zones que flanquegen els punts de mutació (Bruix et al. 2008; Kurpiewska et al. 2009).

3.3.5 - Efectes Sobre l'Intercanvi de Dominis

El grau d'intercanvi de dominis en les diverses variants es va analitzar mitjançant una reacció d'enllaç creuat entre l'His12 i l'His19 mitjançant divinil sulfona (DVS) (Ciglić et al. 1998), la qual forma un enllaç covalent entre les cadenes laterals de les dues histidines que formen part del centre actiu de l'RNasa. Si en el procés de dimerització entre dues RNases es dona intercanvi del domini N-terminal es forma un centre actiu compost, en el qual l'His12 prové d'una de les subunitats i l'His19 de l'altra. En aquest cas, l'enllaç creuat mediat per la DVS uneix de manera covalent les dues subunitats, les quals romanen unides fins i tot en condicions reductores suficients per trencar els enllaços disulfur. En canvi, si no es dona intercanvi de dominis, l'enllaç creuat connecta les dues histidines d'una mateixa subunitat, de manera que en condicions reductores s'alliberen monòmers. Com que la disposició de les histidines és idèntica en les dues disposicions, intercanviada i no intercanviada, la velocitat de reacció és equivalent en els dos casos.

Per tal d'optimitzar la reacció es van assajar diferents temps d'incubació amb DVS, de manera que mitjançant un gel reductor SDS-PAGE es va comprovar que, excepte en el cas de PM8E103C_H80S, la proporció entre les fraccions de dímer i monòmer es mantenen constants després de 150 h, cosa que indica que la reacció és completa.

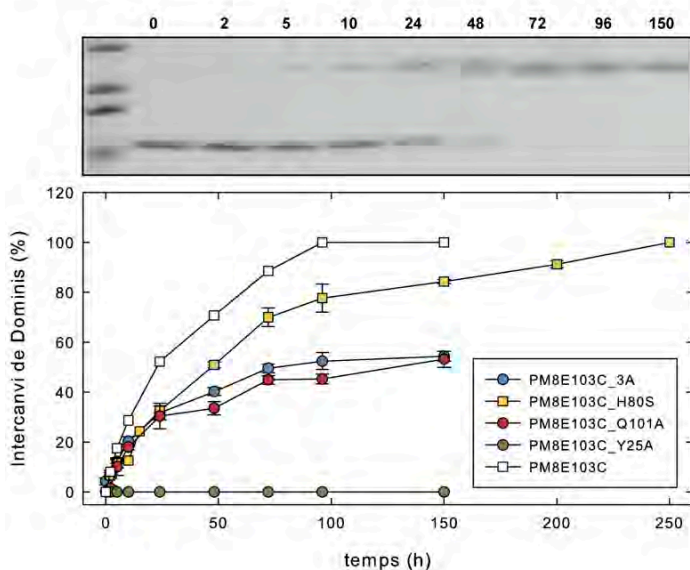


fig3.30 Grau d'intercanvi de dominis a l'equilibri en les variants de PM8E103C. **a.** Anàlisi per SDS-PAGE de la reacció d'enllaç creuat amb DVS en PM8E103C a diferents temps d'incubació. **b.** Percentatge d'intercanvi de dominis de cada variant en funció del temps d'incubació amb DVS.

Tal i com s'havia observat en experiments previs (Rodríguez et al. 2006a), els dímers de la variant parental PM8E103C presenten un intercanvi total de l'hèlix α N-terminal. Pel què fa a la variant PM8E103C_H80S no es va observar canvi en la fracció intercanviada respecte de PM8E103C, la qual assoleix el 100% d'intercanvi. En PM8E103C_3A i PM8E103C_Q101A s'observa una clara disminució de l'intercanvi de gairebé el 50% respecte de la forma parental (**fig3.30**). Això confirma que l'estabilització del pèptid xarnera en el dímer és important per al desplaçament de l'equilibri entre la forma no intercanviada i intercanviada, a favor d'aquesta segona.

Pel què fa a la contribució de la tirosina 25 al procés d'intercanvi de dominis, la disminució va ser encara més dràstica en la variant PM8E103C_Y25A, per a la qual no es va observar intercanvi de dominis. Els nostres resultats mostren per tant com el pont d'hidrogen establert entre la glutamina 101 i les serines 20 de cada subunitat, de manera més important, la intercalació de l'anell de la prolina

19 entre la cadena lateral de la glutamina 101 i l'anell de la tirosina 25, tenen un paper crucial en l'estabilització del pèptid xarnera en la seva conformació intercanviada i en la capacitat de la molècula per dimeritzar. En el cas de PM8 aquestes interaccions s'estableixen per part de la glutamina 101 i la tirosina 25, i generen una conformació del pèptid xarnera més fixada que podria ajudar a dirigir el procés d'intercanvi de dominis. Això resultaria consistent amb resultats previs dels dímers intercanviats de BS-RNasa, en els quals la prolina 19

també resulta encaixada entre les cadenes laterals de la tirosina 25 i la glutamina 101 (Merlino et al. 2004; Sica et al. 2004; Merlino et al. 2009), cosa que indicaria que aquesta interacció podria també resultar important per l'intercanvi de dominis de la BS-RNasa.

3.3.6 - Efectes sobre la K_d dels dímers

Es va també estudiar com les mutacions introduïdes a PM8 afecten, i en quin grau, la tendència a dimeritzar de les variants resultants. La quantitat de dímer i monòmer a l'equilibri es va mesurar a partir de les àrees dels pics corresponents a cada fracció mitjançant la integració en els cromatogrames obtinguts per gelfiltració, i les concentracions calculades es van utilitzar per determinar la constant de dissociació de les variants.

En el cas de la forma parental PM8 es va obtenir un valor de K_d de 7.38 ± 0.70 mM, el qual no difereix significativament dels valors observats en experiments previs (Rodríguez et al. 2006a). En el cas de PM8_H80S, el valor de K_d obtingut va ser de 0.50 ± 0.04 mM, el qual és significativament inferior al de PM8, cosa que indica que el dímer format és molt més estable. Cal indicar que amb la substitució de la histidina en posició 80 per una serina, en les condicions escollides pel càlcul de la K_d es dona la pèrdua d'una càrrega positiva, ja que a pH 5.0 les histidines presents a la interfície oberta de PM8 es troben protonades. Per tal de descartar que l'efecte estabilitzador de la mutació en PM8_H80S fos degut a l'eliminació d'aquesta càrrega, es va calcular la K_d de PM8 a pH 8.0, al qual les histidines no estan protonades. A aquest pH es va observar com el valor de K_d resultava fins i tot lleugerament superior a l'obtingut a pH 5.0, de 12.54 ± 0.37 mM en front de 7.38 ± 0.70 mM. Aquest resultat permet descartar que la pèrdua de la càrrega positiva de les histidines sigui la causa de l'augment d'estabilitat del dímer de PM8_H80S respecte PM8.

A priori s'esperava que el canvi per una serina estabilitzés la forma monomèrica en front de la dimèrica, i per tant dificultés la dimerització i augmentés la proporció de monòmer. La comparativa de l'estabilitat a nivell de residu i de la dinàmica de la cadena polipeptídica entre els pèptids xarnera de PM8E103C i PM8E103C_H80S indica que la introducció de la serina en posició 80 no altera el comportament dinàmic del pèptid xarnera. L'increment de l'estabilitat del dímer tampoc no pot ser deguda a l'eliminació de la càrrega positiva de la histidina, la qual podria establir interaccions desfavorables amb residus de l'altre monòmer. La cadena lateral de la histidina 80 es projecta cap a la interfície oberta, de manera que és possible que l'eliminació d'aquest residu generi una nova interfície oberta més estable i per tant favorable per la dimerització. En suport a la hipòtesi d'una possible reorganització d'aquesta zona, cal destacar que les diferències més importants en els desplaçaments químics de ^1H i ^{15}N s'observen en la glutamina 101 i la cisteïna 103, que juntament amb la zona de la mutació es localitzen a la interfície oberta.

En el cas de la variant PM8_E103SR104S es va observar que aquestes substitucions disminueixen lleugerament el valor de la K_d del dímer resultant, la qual és de 4.45 ± 0.43 mM, de manera que aquest resulta més estable.

En els primers estadis de la dimerització de PM8, abans que tingui lloc l'intercanvi de dominis, les posicions relatives de les dues subunitats les prepararia per l'intercanvi dels dominis N-terminal. Nosaltres havíem postulat que com que les interaccions càrrega-càrrega tenen lloc a distàncies grans, seria d'esperar que s'establissin interaccions electrostàtiques favorables entre els glutàmics en posició 103 i les arginines en posició 104 de diferents monòmers, cosa que ajudaria al seu acostament i correcta orientació en aquests estadis inicials de la dimerització. Semblava també donar suport a aquesta hipòtesi el fet que aquestes interaccions electrostàtiques són presents en el dímer intercanviat. Tot i això, la substitució d'aquests dos residus carregats per serines demostra que les interaccions electrostàtiques que estableixen no són crítiques per l'establiment inicial del dímer. En el monòmer de l'HP-RNasa la cadena lateral de l'arginina 104 presenta una gran mobilitat, de manera que es pot trobar en un ampli ventall de conformacions (Kover et al. 2008). Aquesta mobilitat es veu restringida amb l'establiment d'un pont salí amb el glutàmic 103 de l'altra subunitat, de manera que la cadena lateral es veu fixada, amb la conseqüent pèrdua d'entropia. El valor de K_d observat per la variant PM8_E103SR104S podria indicar que aquesta pèrdua d'entropia en l'establiment del pont salí representa un component desfavorable a la dimerització que arriba a superar la contribució favorable de les interaccions electrostàtiques. És doncs possible que tot i l'eliminació d'aquests dos residus carregats, en el dímer no covalent es puguin formar interfícies obertes alternatives, a partir de les quals es pugui donar l'intercanvi de dominis. En aquest sentit, hi ha diferents variants molt similars de la BS-RNasa de les que s'han descrit interfícies obertes diferents per a cada una d'elles (Merlino et al. 2008).

// resultats i discussió

Per les variants PM8_3A, PM8_Y25A i PM8_Q101A no s'ha pogut detectar la presència de dímer ni tan sols a les concentracions més grans assajades. Prenent un coeficient d'extinció molar de $15900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pel dímer de PM8_3A i PM8_Q101A i de $12920 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ per PM8_Y25A, tenint en compte que per a aquestes variants la major concentració assajada va ser 1.5 mM en tots els casos i que el llindar inferior de detecció de l'aparell d'HPLC és 1 mAU, es va poder estimar el límit del seu valor de K_d . Per PM8_3A i PM8_Q101A aquest llindar va ser $K_d > 29 \text{ M}$ i per la variant PM8_Y25A va ser $K_d > 36 \text{ M}$. Aquests valors es troben tres ordres de magnitud per sobre dels obtinguts per la variant parental, cosa que es correspon amb una diferència en el valor d'energia lliure a 29°C d'aproximadament 5 kcal/mol . La determinació de la K_d posa, per tant, també de manifest la importància d'aquestes posicions en el procés de dimerització.



DISCUSSIÓ GENERAL



// discussió general

Amb una incidència anual estimada de 3.2 milions de nous casos i 1.7 milions de morts, el càncer resulta un dels principals problemes de salut que afronta la societat europea (Ferlay et al. 2010). Actualment, i en un futur a curt i mitjà termini, durant el qual s'espera que l'envelliment de la població s'incrementi, també ho farà el nombre de casos, fins i tot en el cas d'una estabilització o disminució de les taxes d'aparició. Així, el desenvolupament de noves teràpies i estratègies d'atac de la malaltia resulta un factor puntal de cara a afrontar-ne l'efecte.

Una de les línies de recerca del nostre grup se centra en l'estudi de les bases moleculars que determinen la citotoxicitat de determinades RNases. La comprensió dels mecanismes biològics que confereixen i permeten l'activitat citotòxica d'aquestes RNases hauria de permetre obtenir noves variants citotòxiques a partir d'RNases no citotòxiques per tal de poder-les utilitzar com a drogues antitumorals. D'entre aquestes, té un interès especial l'HP-RNasa, ja que té un origen humà, el qual comportaria una menor antigenicitat en cas de ser aplicada com agent quimioterapèutic. A més, i a diferència de l'onconasa, no s'ha observat una acumulació renal que indueixi toxicitat en aquest òrgan (Vasandani et al. 1999).

El mecanisme de citotoxicitat de les RNases té lloc a través d'un seguit d'etapes. Tal i com s'ha apuntat, els esforços per obtenir variants citotòxiques d'RNases s'han centrat en afavorir la seva internalització (mitjançant cationització o unió a lligands de receptors situats a la membrana) o en permetre l'escapament de l'acció de l'RI. Aquest escapament es pot donar a través de la modificació dels residus implicats en la unió que provoquin impediments estèrics per a la formació del complex RNasa-RI. D'entre les RNases que deuen la seva citotoxicitat a impediments estèrics que n'impedeixen la inhibició per part de l'RI en destaquen les que presenten una estructura quaternària. De manera natural, presenta aquesta estructuració la BS-RNasa, i aquesta estratègia ha estat utilitzada amb èxit en la construcció de dímers artificials de l'HP-RNasa o l'RNasa A amb propietats citotòxiques (Catanzano et al. 1997; Piccoli et al. 1999).

La variant citotòxica de l'HP-RNasa anomenada PE5 va obrir una nova via per l'adquisició de citotoxicitat, la direccionalització nuclear mitjançant la unió a importines a través d'un NLS. L'NLS de PE5 representa a més una nova tipologia d'NLS, un NLS conformacional, en el qual diversos residus bàsics que es troben allunyats en la seqüència de la proteïna s'alineen a la superfície de l'RNasa correctament plegada. En aquest treball s'han presentat diferents dades que demostren que l'NLS de PE5 és funcional. Mitjançant un assaig de *pull-down* es va poder demostrar com aquest NLS conformacional és reconegut de manera específica per la importina α . A més, s'ha demostrat que PE5 degrada de manera preferent l'RNA nuclear de les cèl·lules tumorals tractades, fet que a més posa de manifest que PE5 manté l'activitat RNasa després de la importació nuclear. La importància d'aquesta direccionalització en el potencial citotòxic de PE5 es va poder determinar amb la construcció de mutants en els quals es van substituir residus que formen part del seu NLS. Així, la disminució de la citotoxicitat observada en les variants PN4, PN7 i PN8 pot ser atribuïda a l'eliminació de residus importants per la direccionalització nuclear, cosa que posa de manifest el paper crític d'aquest NLS en la citotoxicitat de PE5. Així doncs, PE5 realitza la seva acció degradadora en un compartiment diferent del de l'onconasa, de manera que aquestes dues RNases poden induir mecanismes de mort cel·lular diferents. En aquest sentit, treballs recents del nostre grup de recerca mostren que l'efecte d'ambdues RNases sobre les cèl·lules tumorals és diferent (Castro et al. 2011a; Castro et al. 2011b). Aquest fet obre la via a la utilització de PE5, o d'altres RNases amb un mecanisme d'acció equivalent, pel tractament de tipus de càncer contra els quals l'onconasa o d'altres RNases no han resultat efectives, o a un tractament combinat per tal d'obtenir una resposta més eficaç.

Totes les cèl·lules eucariotes posseeixen RNases, les quals estan implicades en diversos nivells bàsics de la regulació del metabolisme. Aquesta implicació en processos bàsics suposa que l'activitat de les RNases es troba fortament regulada, de manera que la seva utilització com agent quimioterapèutic requereix superar diverses barreres, d'entre les quals destaca la inhibició per part de l'RI. L'RI representa entre el 0.01 i el 0.1% del contingut proteic total de la cèl·lula (Lee and Vallee 1993), cosa que dóna una indicació de la seva importància. PE5 obre una nova via pel disseny d'RNases citotòxiques basada en la seva direccionalització a un compartiment lliure d'RI i crucial per la viabilitat cel·lular com és el nucli. A més, el paper central que tenen els mecanismes d'import nuclear en la viabilitat cel·lular fan que la seva implicació necessària en la citotoxicitat no pugui ser combatuda per la cèl·lula sense comprometre la seva pròpia viabilitat.

Així doncs, la demostració del paper crític que té l'NLS de PE5 en la seva citotoxicitat va portar al disseny i construcció de noves variants amb un NLS descrit com a fort, bé exposat a l'extrem C-terminal de la seqüència de la proteïna, bé en zones implicades en la unió a l'RI.

Les variants que incorporaven un NLS a l'extrem C-terminal, PM5NLS i PM5mutNLS, no eren funcionals quan es va assajar l'import nuclear. Es va pensar que aquesta manca de funcionalitat de l'NLS era deguda al fet que l'espaiador que separava aquesta seqüència de la proteïna no era prou llarg com per permetre'n una bona exposició, de manera que la interacció amb la importina α es veuria impossibilitada per impediments estèrics. Això suposaria que aquestes variants es mantinguessin al citoplasma, on serien permanentment capturades per l'RI. Així, l'absència de citotoxicitat observada vindria determinada per la incapacitat d'aquestes variants de ser importades al nucli cel·lular.

Per tal d'evitar els impediments estèrics que podien dificultar la funcionalitat de l'NLS C-terminal es construïren les variants PM5spNLS, PM5spmutNLS i PM5spscNLS, les quals presentaven un espaiador de set residus addicionals. El fet que novament en aquestes variants l'NLS no fos funcional, ens va portar a buscar una explicació alternativa a l'exposada per a les variants sense seqüència espaiadora addicional. La variant PM5spNLS presenta una regió amb un elevat nombre de càrregues negatives propera a aquest extrem, en la qual es troben els residus Glu49, Asp53, Glu103, Glu125 i Asp126, els quals es troben situats en l'estructura de l'enzim en una regió propera a l'extrem C-terminal. En aquesta situació, els residus bàsics de les seqüències NLS es trobarien atrets electrostàticament per aquesta zona, de manera que es compactarien amb la superfície de la proteïna i, al no estar prou exposats, això evitaria el reconeixement específic per part de la importina α . En el cas de la variant PM5NLS, els residus àcids més propers a l'extrem C-terminal es troben substituïts per d'altres aminoàcids (residus 125 i 126). Aquest fet, juntament amb la menor llargada de l'espaiador, atenuaria en aquest cas la interacció electrostàtica, permetent que l'NLS adoptés una conformació alternativa.

El fet que tant PM5NLS com PM5mutNLS presentin un cert grau d'escapament a l'acció de l'RI, atribuïble a la conformació que prendria la seqüència introduïda en l'estructura de la proteïna podria donar suport a aquesta interpretació. Així, el fet que les variants amb un espaiador més llarg siguin completament inhibides pel RI suggereix que en aquestes variants l'estructura o disposició tridimensional de l'NLS és diferent. El fet que la regió de densitat de càrrega negativa, amb la qual podrien interaccionar les seqüències NLS, no impliqui cap residu putativament implicat en la interacció ni d'altres residus propers a aquests (Pous et al. 2000), podria explicar que el replegament de les seqüències NLS introduïdes en aquestes variants no interferís amb la unió RNasa-RI, de manera que la inhibició fos completa.

És interessant recordar que en el cas de PE5 es produeix un solapament entre les zones d'unio a la importina α i l'RI, de manera que s'estableix una competència entre les dues molècules per interaccionar amb l'RNasa. La unió de l'RI per l'HP-RNasa és de les més fortes descrites a la natura (Johnson et al. 2007b) i per tant és probable que tot i escapar lleugerament al RI, l'afinitat de PE5 per l'RI sigui superior a la de l'importina. Tot i això, encara que PE5 es trobés majoritàriament inhibit al citoplasma sempre hi hauria molècules de PE5 disponibles per interaccionar amb la importina α i ser així importades al nucli. El caràcter cíclic del transport nuclear permet que els nivells citoplasmàtics d'importina α es mantinguin constants, mentre que la concentració de PE5 lliure disminueix a mesura que és alliberada al nucli, cosa que desplaça contínuament l'equilibri PE5-RI cap a la forma lliure i permet la formació de més complexe amb la importina. El solapament de les regions d'interacció suposa que només es transportaran al nucli aquelles molècules d'RNasa que no estiguin inhibides per l'RI, de manera que resulta interessant el disseny de variants en les quals les zones d'unio al RI i a la importina α es trobin solapades. Ja que no es va poder construir una variant amb un NLS funcional a la qual es puguin unir de manera independent tant l'RI com la importina α , queda per determinar el paper que aquesta competència pot exercir sobre la citotoxicitat.

En aquest sentit, l'elecció dels llaços exposats $\beta 2\beta 3$ i $\beta 4\beta 5$, importants en la inhibició de l'HP-RNasa per part de l'RI, es va fer intentant evitar zones que a priori comprometessin de manera evident l'activitat o l'estructura de la proteïna, tals com serien el llaç $\alpha 2\beta 1$ o elements d'estructuració secundària com hèlixs α o fulls plegats β . Tot i això, el fet que no fos possible la purificació de les variants amb la seqüència inserida al llaç $\beta 2\beta 3$, es pot explicar en base a la desestabilització creada a la proteïna amb la introducció de la seqüència SV40NLS. Aquesta desestabilització es pot deure, al menys en part, a la presència de l'enllaç disulfur que s'estableix entre els residus 65 i 72, situats als dos extrems del llaç $\beta 2\beta 3$. És possible que la inserció de 6 residus en aquest llaç en distorsioni la seva conformació d'una manera prou important com per impedir la formació d'aquest enllaç disulfur, que en la RNasaA implica una pèrdua d'estabilitat de quasi 20°C (Klink et al. 2000). A més, en el cas que aquest enllaç no es pogués formar, la presència de cisteïnes lliures afavoriria l'agregació. També en el cas de les variants que incorporen noves seqüències bàsiques al llaç $\beta 4\beta 5$ es va evidenciar un efecte dràstic sobre la

// discussió general

seva estabilitat, per una banda en la impossibilitat d'obtenir mínimes quantitats de les variants estudiades amb una cisteïna addicional a l'extrem C-terminal (NLS $\beta 4\beta 5$ cct i scNLS $\beta 4\beta 5$ cct), i per l'altra en l'efecte negatiu observat sobre la solubilitat a pH àcids de PM5NLS $\beta 4\beta 5$ i PM5scNLS $\beta 4\beta 5$. La baixa solubilitat de la proteïna a pH5 pot ser induïda per l'estat d'ionització dels cinc nous residus bàsics introduïts, que podrien generar noves zones de repulsió electrostàtica a la superfície de la proteïna que en dificultessin el replegament. A més, en el cas de les variants amb una cisteïna addicional a l'extrem C-terminal s'introdueix un nou factor que pot dificultar el replegament de la proteïna. Durant el procés de plegament, la cisteïna addicional pot facilitar l'establiment de ponts disulfur incorrectes, i en conseqüència la formació de formes mal plegades que disminueixin el rendiment.

El fet que no resultés possible l'obtenció en forma pura i nativa de les variants amb una cisteïna addicional a l'extrem C-terminal no va permetre determinar la funcionalitat, mitjançant microscòpia confocal de fluorescència, de la seqüència SV40NLS introduïda. L'estudi de la capacitat d'unió d'aquestes variants a la importina α va permetre però comprovar la funcionalitat de l'NLS introduït al llaç $\beta 4\beta 5$, de manera que la manca de citotoxicitat observada per aquesta variant no és atribuïble a que l'NLS no pugui ser reconegut per la maquinària d'importació nuclear.

En conjunt s'ha pogut demostrar que la inserció d'un NLS funcional en una RNasa no comporta de manera necessària l'adquisició de citotoxicitat, tot i que l'adquisició de capacitat de translocació nuclear resulta una condició necessària per la citotoxicitat de la variant PE5. Si bé la manca de citotoxicitat de PM5NLS o PM5spNLS és atribuïble a la no funcionalitat de l'NLS introduït, en el cas de PM5NLS $\beta 4\beta 5$ l'absència de comportament citotòxic podria atribuir-se a una desestructuració crítica que en promogui l'agregació abans de poder realitzar la degradació de l'RNA nuclear, possibilitat que podria venir suportada pel comportament diferent que presenta respecte al pH en comparació a l'HP-RNasa.

Per tal que l'NLS introduït sigui accessible a la importina α sense afectar l'estabilitat de l'RNasa es podrien introduir els NLS en d'altres zones de la proteïna, com per exemple l'extrem N-terminal, o bé introduir-ne diversos. En aquest sentit, podria resultar interessant la introducció d'un NLS fort a un extrem de la seqüència de PE5 per tal de poder-ne augmentar l'eficiència de translocació, determinant així un desplaçament de l'equilibri establert entre les diferents formes cap al complex amb la importina.

En estudis previs, el nostre grup de recerca va obtenir i caracteritzar un dímer estable en un mutant derivat de l'HP-RNasa, anomenat PM8 (Canals et al. 2001; Rodriguez et al. 2006a). Tot i que en l'estructura cristal·logràfica és un dímer establert mitjançant intercanvi de dominis, el grau de dimerització que presenta PM8 en solució és baix, i no permet que aquesta variant manifesti activitat citotòxica sobre cèl·lules tumorals. Tot i això, PM8 representa un bon model per tal d'estudiar els determinants que indueixen la dimerització en les RNases pancreàtiques. La comprensió d'aquests mecanismes, per una banda, pot resultar important en el futur per a l'obtenció de noves RNases dimèriques, amb una estructura quaternària més estable que en permeti la utilització com a drogues antitumorals. Per altra banda, la informació extreta del procés de dimerització d'aquesta RNasa pot també ajudar a comprendre com el mecanisme de dimerització mitjançant intercanvi de dominis s'implica en la formació dels dipòsits amiloides en malalties tals com l'Alzheimer.

A diferència de l'RNasa A, la qual requereix un desplegament de la proteïna previ a l'establiment del dímer amb intercanvi de dominis (Lopez-Alonso et al. 2010), PM8 i la BS-RNasa poden intercanviar els seus dominis N-terminals mantenint la seva estructura nativa en solució. El model de dimerització proposat per PM8 (Rodriguez et al. 2006a) implicava un procés en dos passos diferent del proposat per l'RNasa A, segons el qual es donaria un primer pas d'estabilització de la interfície oberta formant-se un dímer sense intercanvi de dominis. Posteriorment es facilitaria l'intercanvi del domini N-terminal en un segon pas que permetria l'establiment de les interfícies tancades, i que es veuria afavorit termodinàmicament per l'aparició de noves interaccions estabilitzadores a la zona del pèptid xarnera. En el primer pas es van postular com importants l'àcid glutàmic en posició 103 i l'arginina en posició 104, així com la prolina 19, la tirosina 25 i la glutamina 101. Pel que fa al segon pas, l'estudi de l'estructura cristal·logràfica de PM8 va mostrar que el pèptid xarnera es trobava en una conformació en hèlix 3_{10} no present a la variant monomèrica equivalent anomenada PM7. En aquesta hèlix 3_{10} hi ha implicat un entramat de ponts d'hidrogen en el qual participen la glutamina 17 i les serines 18, 20, 21, 22 i 23, així com la prolina 19 i la tirosina 25.

Mitjançant tècniques de mutagènesi dirigida es va estudiar el paper d'aquests diferents residus en la dimerització i intercanvi de dominis de PM8. L'anàlisi de l'estructura, la dinàmica i l'estabilitat conformacional d'aquestes variants ha donat evidències clares que la introducció de les mutacions dissenyades no va comportar un efecte significatiu en l'estabilitat i estructura general de PM8 més enllà dels punts contigus a la zona de mutació. També en el cas d'RNases desestabilitzades de manera més severa s'observa com els canvis estructurals es veuen limitats a les zones properes als punts de mutació (Bruix et al. 2008; Kurpiewska et al. 2009).

Tal i com s'ha comentat, en les etapes inicials del procés de dimerització de PM8, i de manera prèvia a l'establiment de l'intercanvi de dominis, les posicions relatives dels dos protòmers han de preparar la molècula per a l'intercanvi dels dominis N-terminal. El fet que les interaccions electrostàtiques actuïn a distàncies grans, feia esperar que els ponts salins establerts entre els residus 103 i 104 de cada una de les subunitats del dímer tinguessin un paper important en l'acostament i orientació dels protòmers en aquests estadis inicials de la dimerització. Tot i això, aquest treball demostra que el paper dels residus 103 i 104 en la formació de la interfície oberta és secundari, ja que la pèrdua dels ponts salins que estableixen no comporta cap disminució dràstica ni de la capacitat de dimerització ni de la propensió a l'intercanvi de dominis. Tot i contribuir a l'estabilització del dímer, aquestes interaccions no resulten crítiques en el procés de dimerització. Una possible explicació es podria trobar en el fet que l'arginina 104 presenta una elevada mobilitat a la forma monomèrica de l'HP-RNasa (Kover et al. 2008), mentre que a causa de la formació del pont salí de la forma dimèrica adopta una estructura fixa, amb la conseqüent pèrdua d'entropia. El valor de K_d observat per la variant PM8E103SR104S indica que la contribució d'aquesta pèrdua d'entropia resulta superior a la contribució favorable de les interaccions electrostàtiques que s'estableixen. Tot i l'eliminació d'aquests residus carregats, és possible l'establiment d'interfícies obertes alternatives que afavoreixin de manera semblant l'establiment d'un dímer intercanviat. En el cas de variants de la BS-RNasa s'han descrit gran varietat d'interfícies obertes que generen dímers intercanviats equivalents (Merlino et al. 2008).

Per contra, aquest treball mostra que la tirosina 25 i la glutamina 101 són claus tant en el procés de dimerització com d'intercanvi. Els ponts d'hidrogen en els quals intervenen i l'apilament que es dona entre les seves cadenes laterals i l'anell de la prolina 19 serien interaccions crucials tant en l'establiment inicial del dímer com afavorint el posterior intercanvi de l'hèlix N-terminal. Així, les interaccions establertes per aquests dos residus determinen una conformació més fixada que ajuda a dirigir l'intercanvi de dominis. Això seria consistent amb resultats estructurals previs (Bruix et al. 2008) i amb dades obtingudes dels dímers covalent i no covalent de la BS-RNasa, en els quals la prolina 19 s'estructura també de forma apilada entre les cadenes laterals de la tirosina 25 i la glutamina 101 (Merlino et al. 2004; Sica et al. 2004; Merlino et al. 2009), cosa que indicaria que aquesta interacció resulta també important en l'intercanvi de dominis de la BS-RNasa.

Prèviament a aquest treball, s'havia postulat que la propensió a l'intercanvi de dominis podria dependre de l'estabilitat relativa de les conformacions del pèptid xarnera en el dímer i en els monòmers (Benito et al. 2008a). En el cas de l'RNasa A, el comportament dinàmic d'aquest pèptid xarnera està restringit en la forma monomèrica per l'establiment de diversos ponts d'hidrogen, mentre que en el cas de la BS-RNasa aquestes interaccions no es produeixen. En el cas de l'RNasa A, la mobilitat limitada del pèptid xarnera podria explicar el fet que calguin condicions desestabilitzadores severes per la formació dels N-dímers. La importància de les diferències d'estabilitat d'aquest pèptid xarnera entre les formes monomèriques i dimèrica es posa de manifest en la proporció de dímer a l'equilibri que s'observa en les variants dimèriques de la CC-RNasa (RNasa A amb dues cisteïnes en posicions 31 i 32) (Di Donato et al. 1995), la qual presenta a l'equilibri un 15% de molècules intercanviades (Ercole et al. 2009), mentre que per PM8E103C s'assoleix el 100% i per la BS-RNasa el 70%. La diferència observada entre PM8 i BS-RNasa s'ha atribuït a una major estabilització del pèptid xarnera en la variant humana (Benito et al. 2008a).

En PM8, l'eliminació dels residus polars que estableixen ponts d'hidrogen intercatenaris en el pèptid xarnera de la forma dimèrica genera un dímer menys estable i amb un grau menor d'intercanvi de dominis. Tot i això, les dades d'intercanvi d'hidrogen indiquen que les diferències d'estabilitat no resulten homogènies al llarg de la seqüència. L'estabilitat de la primera hèlix α resulta major en PM8E103C_3A en comparació amb PM8E103C, cosa que indicaria que la introducció de tres nous residus d'alanina en posicions properes contribueix a la seva estabilització. Això segurament és degut al fet que els residus d'alanina presenten una propensió intrínseca a la formació d'hèlixs α superior (Chakrabartty et al. 1991), cosa que confirmaria la hipòtesi que la xarxa de ponts d'hidrogen estabilitzaria la conformació intercanviada dimèrica del pèptid xarnera (Canals et al. 2001). Aquesta

// discussió general

variant resulta més estable que la forma parental, i resulta possible avançar la idea que això es pot relacionar amb un augment de l'estabilitat del pèptid xarnera en la forma monomèrica. La constant de dissociació d'aquesta variant també realça la importància que tenen aquestes posicions, juntament amb la tirosina 25 i la glutamina 101, en el procés de dimerització. En tots aquests casos, les mutacions introduïdes determinen una disminució de la constant de dissociació de tres ordres de magnitud en comparació amb la forma parental, cosa que correspon a una diferència d'energia lliure de 5 kcal/mol.

Pel què fa al paper de la histidina 80, s'esperava que la substitució d'aquesta histidina per una serina comportés una estabilització del monòmer en relació al dímer. Tot i això, els nostres resultats mostren com el dímer de PM8_H80S es veu fortament estabilitzat, cosa que es tradueix en una disminució dràstica de la seva constant de dissociació. La comparació de l'estabilitat individual dels hidrògens amida i les dinàmiques internes del pèptid xarnera entre el monòmer de PM8E103C i PM8E103C_H80S indiquen que la introducció de la serina en posició 80 no altera el comportament dinàmic del pèptid xarnera. També es mostra que l'increment de l'estabilitat del dímer no es pot atribuir a l'eliminació de la càrrega positiva de la histidina a pH8, la qual podria establir repulsions electrostàtiques amb residus de l'altre monòmer. Es pot postular que l'eliminació de la histidina 80, ja que aquesta és projectada cap a la superfície de la interfície oberta, podria generar una nova interfície oberta més estable. De fet, en PM8E103C_H80S, les majors diferències de desplaçament químic s'observen en residus de la interfície oberta com la glutamina 101 i la cisteïna 103, a part del punt de mutació, cosa que donaria suport a la hipòtesi de la reorganització local d'aquesta zona.

En conjunt, els resultats presentats en aquesta part del treball indiquen que els residus més crítics pel procés de dimerització de PM8 són la tirosina 25 i la glutamina 101, les quals interaccionen amb la prolina 19 del pèptid xarnera de l'altra subunitat. També s'apunta que el dímer intercanviat pot ser obtingut a partir de diferents interfícies obertes, i que la propensió a l'intercanvi de dominis pot ser modulada mitjançant canvis en l'estabilitat del pèptid xarnera de monòmer i dímer. Així, es donen vies per la comprensió de la formació d'oligòmers proteics a través de l'intercanvi tridimensional de dominis.



CONCLUSIONS



1. S'ha construït una variant de l'importina α en la qual s'ha eliminat el domini autoinhibitori IBB i s'ha posat a punt un mètode per a detectar la unió d'importina α a ribonucleases que presenten un NLS.
2. PE5 s'uneix *in vitro* de manera específica a la importina α i, per tant, *in vivo* és transportat al nucli cel·lular gràcies al seu NLS i no a través d'un mecanisme indirecte que impliqui altres proteïnes que continguin una seqüència NLS.
3. *In vivo*, PE5 degrada de manera específica RNA nuclear. La degradació de l'RNA observada en cèl·lules tractades amb PE5 és conseqüència directa de l'acció de l'RNasa, i no de la inducció de processos apoptòtics.
4. L'eliminació de residus bàsics necessaris per a la funcionalitat de l'NLS suposen un pèrdua de la capacitat citotòxica de la proteïna resultant. Donat que altres variants que canvien la seva basicitat sense alterar l'NLS no canvien la seva capacitat citotòxica, l'NLS de PE5 és un element crític per a la seva citotoxicitat.
5. La introducció de la seqüència de localització nuclear SV40NLS o les seves variants amb la seqüència alterada, SV40mutNLS i SV40scNLS, a l'extrem C-terminal de la variant de l'HP-RNasa anomenada PM5 no altera l'expressió heteròloga d'aquest gen, i permet la seva purificació amb rendiments similars als obtinguts per la variant parental.
6. La introducció de les seqüències SV40NLS i SV40scNLS dins de la seqüència de PM5, en els llaços exposats $\beta 2\beta 3$ (entre els residus 67 i 71) i $\beta 4\beta 5$ (entre els residus 87 i 93), no afecta la seva expressió heteròloga, però en canvi compromet la seva purificació ja que altera el seu comportament al llarg del procés de purificació. En el cas de les insercions en el llaç $\beta 4\beta 5$ aquests canvis es tradueixen en una variació de la solubilitat de la proteïna en funció del pH.
7. La incorporació d'una seqüència NLS al llaç $\beta 4\beta 5$ evita la seva interacció amb l'RI. En el cas de les variants que incorporen la seqüència a l'extrem C-terminal, s'observa una lleugera distorsió de la interacció, mentre que les variants en les quals la seqüència introduïda ve precedida d'un espaiador flexible són completament inhibides per l'RI.
8. La seqüència SV40NLS introduïda a l'extrem C-terminal de PM5 no és funcional *in vivo* per a la translocació de les variants PM5NLS i PM5spNLS al nucli.
9. La incorporació d'una seqüència NLS al llaç $\beta 4\beta 5$ en permet la interacció amb la importina α , la qual és específica, ja que en incorporar-hi la seqüència desordenada scNLS aquesta interacció no es dona.
10. Tot i la capacitat que té la variant PM5NLS $\beta 4\beta 5$ d'escapar a l'acció de l'RI i d'interaccionar amb la importina α , aquesta no presenta activitat citotòxica per a cèl·lules HeLa. La presència d'una seqüència NLS activa no resulta per tant condició suficient per dotar de citotoxicitat una RNasa.
11. L'eliminació de les cadenes laterals de l'asparagina 17 i les serines 21 i 23 de PM8 impedeix la formació de dímer en solució, i la proporció de molècules amb el domini N-terminal intercanviat disminueix a la meitat respecte de la proteïna parental. Tot i això, la seva estabilitat tèrmica i el seu comportament dinàmic són semblants al de les altres variants estudiades. Les interaccions establertes per aquestes cadenes laterals són per tant importants pels processos de dimerització i intercanvi de dominis.
12. L'eliminació de les cadenes laterals de l'àcid glutàmic 103 i l'arginina 104 fa disminuir a la meitat el valor de K_d del dímer, respecte al parental. L'establiment del pont salí entre aquests dos residus en les dues subunitats no és, per tant, necessari per tal que es produeixi la dimerització, tot i que podria estabilitzar l'estructura dimèrica una vegada s'ha donat l'intercanvi de dominis.
13. La substitució de la histidina 80 per una serina fa disminuir la K_d del dímer un ordre de magnitud respecte del dímer parental, tot i no tenir efecte en la propensió a l'intercanvi de dominis i que la seva estabilitat tèrmica i comportament dinàmic siguin semblants als de les altres variants estudiades. L'efecte produït per la substitució de la histidina 80 no és degut a l'eliminació de la càrrega positiva a la cadena lateral.

// conclusions

14. Els residus que són més crítics en el procés de dimerització de PM8 són la tirosina 25 i la glutamina 101, els quals interaccionen amb la prolina 19 de l'altra subunitat un cop es produeix l'intercanvi. L'eliminació de les cadenes laterals d'un d'aquests dos residus implica que no es formi dímer en solució i que la tendència a la dimerització disminueixi (Q101A) fins a un 50% respecte de la parental o desaparegui (Y25A), de manera que la seva presència és requerida per a la dimerització de PM8.

15. La predisposició a l'intercanvi de dominis pot ser modulada mitjançant canvis en l'estabilitat del pèptid xarnera en el monòmer o el dímer.

16. Del conjunt de resultats es pot concloure que el model proposat per la dimerització de PM8 implica una primera etapa de formació d'interaccions entre les dues subunitats, les quals canvien l'estructura del pèptid xarnera afavorint, en una segona fase, l'intercanvi de dominis.



BIBLIOGRAFIA



- Adam, S. A., Marr, R. S. and Gerace, L. (1990). "Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors." J Cell Biol **111**(3): 807-816.
- Akhlylina, T. V., Jans, D. A., Rosenkranz, A. A., Statsyuk, N. V., Balashova, I. Y., Toth, G., Pavo, I., Rubin, A. B. and Sobolev, A. S. (1997). "Nuclear targeting of chlorin e6 enhances its photosensitizing activity." J Biol Chem **272**(33): 20328-20331.
- Almassy, R. J., Janson, C. A., Hamlin, R., Xuong, N. H. and Eisenberg, D. (1986). "Novel subunit-subunit interactions in the structure of glutamine synthetase." Nature **323**(6086): 304-309.
- Ardelt, B., Ardelt, W. and Darzynkiewicz, Z. (2003). "Cytotoxic ribonucleases and RNA interference (RNAi)." Cell Cycle **2**(1): 22-24.
- Ardelt, B., Ardelt, W., Pozarowski, P., Kunicki, J., Shogen, K. and Darzynkiewicz, Z. (2007). "Cytostatic and cytotoxic properties of Amphinase: a novel cytotoxic ribonuclease from *Rana pipiens* oocytes." Cell Cycle **6**(24): 3097-3102.
- Argent, R. H., Roberts, L. M., Wales, R., Robertus, J. D. and Lord, J. M. (1994). "Introduction of a disulfide bond into ricin A chain decreases the cytotoxicity of the ricin holotoxin." J Biol Chem **269**(43): 26705-26710.
- Aronov, O., Horowitz, A. T., Gabizon, A., Fuertes, M. A., Perez, J. M. and Gibson, D. (2004). "Nuclear localization signal-targeted poly(ethylene glycol) conjugates as potential carriers and nuclear localizing agents for carboplatin analogues." Bioconjug Chem **15**(4): 814-823.
- Avitabile, F., Alfano, C., Spadaccini, R., Crescenzi, O., D'Ursi, A. M., D'Alessio, G., Tancredi, T. and Picone, D. (2003). "The swapping of terminal arms in ribonucleases: comparison of the solution structure of monomeric bovine seminal and pancreatic ribonucleases." Biochemistry **42**(29): 8704-8711.
- Bai, Y., Milne, J. S., Mayne, L. and Englander, S. W. (1993). "Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange." Proteins **17**(1): 75-86.
- Barnard, E. A. (1969). "Biological function of pancreatic ribonuclease." Nature **221**(5178): 340-344.
- Bax, A. (1994). "Multidimensional nuclear magnetic resonance methods for protein studies." Current Opinion in Structural Biology **4**(5): 738-744.
- Beintema, J. J. and Kleineidam, R. G. (1998). "The ribonuclease A superfamily: general discussion." Cell Mol Life Sci **54**(8): 825-832.
- Benito, A., Laurents, D. V., Ribo, M. and Vilanova, M. (2008a). "The structural determinants that lead to the formation of particular oligomeric structures in the pancreatic-type ribonuclease family." Curr Protein Pept Sci **9**(4): 370-393.
- Benito, A., Ribo, M. and Vilanova, M. (2005). "On the track of antitumour ribonucleases." Mol Biosyst **1**(4): 294-302.
- Benito, A., Vilanova, M. and Ribo, M. (2008b). "Intracellular routing of cytotoxic pancreatic-type ribonucleases." Curr Pharm Biotechnol **9**(3): 169-179.
- Benner, S. A. and Allemann, R. K. (1989). "The return of pancreatic ribonucleases." Trends Biochem Sci **14**(10): 396-397.
- Bennett, M. J., Choe, S. and Eisenberg, D. (1994a). "Domain swapping: entangling alliances between proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(8): 3127-3131.
- Bennett, M. J., Choe, S. and Eisenberg, D. (1994b). "Refined structure of dimeric diphtheria toxin at 2.0 Å resolution." Protein Sci **3**(9): 1444-1463.
- Bennett, M. J., Sawaya, M. R. and Eisenberg, D. (2006). "Deposition diseases and 3D domain swapping." Structure **14**(5): 811-824.

bibliografia //

- Bennett, M. J., Schlunegger, M. P. and Eisenberg, D. (1995). "3D domain swapping: a mechanism for oligomer assembly." *Protein Sci* **4**(12): 2455-2468.
- Berisio, R., Sica, F., De Lorenzo, C., Di Fiore, A., Piccoli, R., Zagari, A. and Mazzarella, L. (2003). "Crystal structure of the dimeric unswapped form of bovine seminal ribonuclease." *FEBS Lett* **554**(1-2): 105-110.
- Better, M., Chang, C. P., Robinson, R. R. and Horwitz, A. H. (1988). "Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment." *Science* **240**(4855): 1041-1043.
- Blackburn, P., Wilson, G. and Moore, S. (1977). "Ribonuclease inhibitor from human placenta. Purification and properties." *J Biol Chem* **252**(16): 5904-5910.
- Boix, E., Wu, Y., Vasandani, V. M., Saxena, S. K., Ardel, W., Ladner, J. and Youle, R. J. (1996). "Role of the N terminus in RNase A homologues: differences in catalytic activity, ribonuclease inhibitor interaction and cytotoxicity." *J Mol Biol* **257**(5): 992-1007.
- Bosch, M., Benito, A., Ribo, M., Puig, T., Beaumelle, B. and Vilanova, M. (2004). "A nuclear localization sequence endows human pancreatic ribonuclease with cytotoxic activity." *Biochemistry* **43**(8): 2167-2177.
- Bracale, A., Castaldi, F., Nitsch, L. and D'Alessio, G. (2003). "A role for the intersubunit disulfides of seminal RNase in the mechanism of its antitumor action." *Eur J Biochem* **270**(9): 1980-1987.
- Bracale, A., Spalletti-Cernia, D., Mastronicola, M., Castaldi, F., Mannucci, R., Nitsch, L. and D'Alessio, G. (2002). "Essential stations in the intracellular pathway of cytotoxic bovine seminal ribonuclease." *Biochem J* **362**(Pt 3): 553-560.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Bravo, J., Fernandez, E., Ribo, M., de Llorens, R. and Cuchillo, C. M. (1994). "A versatile negative-staining ribonuclease zymogram." *Anal Biochem* **219**(1): 82-86.
- Bruix, M., Ribo, M., Benito, A., Laurents, D. V., Rico, M. and Vilanova, M. (2008). "Destabilizing mutations alter the hydrogen exchange mechanism in ribonuclease A." *Biophys J* **94**(6): 2297-2305.
- Cafaro, V., De Lorenzo, C., Piccoli, R., Bracale, A., Mastronicola, M. R., Di Donato, A. and D'Alessio, G. (1995). "The antitumor action of seminal ribonuclease and its quaternary conformations." *FEBS Lett* **359**(1): 31-34.
- Canals, A., Pous, J., Guasch, A., Benito, A., Ribo, M., Vilanova, M. and Coll, M. (2001). "The structure of an engineered domain-swapped ribonuclease dimer and its implications for the evolution of proteins toward oligomerization." *Structure* **9**(10): 967-976.
- Canals, A., Ribo, M., Benito, A., Bosch, M., Mombelli, E. and Vilanova, M. (1999). "Production of engineered human pancreatic ribonucleases, solving expression and purification problems, and enhancing thermostability." *Protein Expr Purif* **17**(1): 169-181.
- Castro, J., Ribo, M., Navarro, S., Nogues, M. V., Vilanova, M. and Benito, A. (2011a). "A human ribonuclease induces apoptosis associated with p21/WAF1/CIP1 induction and JNK inactivation." *BMC Cancer* **11**: 9.
- Castro, J., Ribo, M., Puig, T., Colomer, R., Vilanova, M. and Benito, A. (2011b). "A cytotoxic ribonuclease reduces the expression level of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines." *Invest New Drugs*.
- Catanzano, F., Graziano, G., Cafaro, V., D'Alessio, G., Di Donato, A. and Barone, G. (1997). "From ribonuclease A toward bovine seminal ribonuclease: a step by step thermodynamic analysis." *Biochemistry* **36**(47): 14403-14408.
- Catimel, B., Teh, T., Fontes, M. R., Jennings, I. G., Jans, D. A., Howlett, G. J., Nice, E. C. and Kobe, B. (2001). "Biophysical characterization of interactions involving importin-alpha during nuclear import." *J Biol Chem* **276**(36): 34189-34198.

- Chakrabartty, A., Schellman, J. A. and Baldwin, R. L. (1991). "Large differences in the helix propensities of alanine and glycine." *Nature* **351**(6327): 586-588.
- Chapman, M. R., Robinson, L. S., Pinkner, J. S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Normark, S. and Hultgren, S. J. (2002). "Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation." *Science* **295**(5556): 851-855.
- Ciglic, M. I., Jackson, P. J., Raillard, S. A., Haugg, M., Jermann, T. M., Opitz, J. G., Trabesinger-Ruf, N. and Benner, S. A. (1998). "Origin of dimeric structure in the ribonuclease superfamily." *Biochemistry* **37**(12): 4008-4022.
- Cohen, F. E. and Prusiner, S. B. (1998). "Pathologic conformations of prion proteins." *Annu Rev Biochem* **67**: 793-819.
- Cokol, M., Nair, R. and Rost, B. (2000). "Finding nuclear localization signals." *EMBO Rep* **1**(5): 411-415.
- Colledge, W. H., Richardson, W. D., Edge, M. D. and Smith, A. E. (1986). "Extensive mutagenesis of the nuclear location signal of simian virus 40 large-T antigen." *Mol Cell Biol* **6**(11): 4136-4139.
- Cordes, V. C., Rackwitz, H. R. and Reidenbach, S. (1997). "Mediators of nuclear protein import target karyophilic proteins to pore complexes of cytoplasmic annulate lamellae." *Exp Cell Res* **237**(2): 419-433.
- Crestfield, A. M., Stein, W. H. and Moore, S. (1962). "On the aggregation of bovine pancreatic ribonuclease." *Arch Biochem Biophys* **Suppl 1**: 217-222.
- Darzynkiewicz, Z., Carter, S. P., Mikulski, S. M., Ardelt, W. J. and Shogen, K. (1988). "Cytostatic and cytotoxic effects of Pannon (P-30 Protein), a novel anticancer agent." *Cell Tissue Kinet* **21**(3): 169-182.
- Deutscher, M. P. (1988). "The metabolic role of RNases." *Trends Biochem Sci* **13**(4): 136-139.
- Deutscher, M. P. (1993). "Ribonuclease multiplicity, diversity, and complexity." *J Biol Chem* **268**(18): 13011-13014.
- Di Donato, A., Cafaro, V. and D'Alessio, G. (1994). "Ribonuclease A can be transformed into a dimeric ribonuclease with antitumor activity." *J Biol Chem* **269**(26): 17394-17396.
- Di Donato, A., Cafaro, V., Romeo, I. and D'Alessio, G. (1995). "Hints on the evolutionary design of a dimeric RNase with special bioactions." *Protein Sci* **4**(8): 1470-1477.
- Di Gaetano, S., D'Alessio, G. and Piccoli, R. (2001). "Second generation antitumour human RNase: significance of its structural and functional features for the mechanism of antitumour action." *Biochem J* **358**(Pt 1): 241-247.
- Dingwall, C. and Laskey, R. A. (1991). "Nuclear targeting sequences--a consensus?" *Trends Biochem Sci* **16**(12): 478-481.
- Dingwall, C., Robbins, J., Dilworth, S. M., Roberts, B. and Richardson, W. D. (1988). "The nucleoplasmic nuclear location sequence is larger and more complex than that of SV-40 large T antigen." *J Cell Biol* **107**(3): 841-849.
- Dobson, C. M. (2003). "Protein folding and misfolding." *Nature* **426**(6968): 884-890.
- el-Joubary, A., Bruix, M., Santoro, J., Cafaro, V., Scognamiglio, R., Di Donato, A., D'Alessio, G., Kover, K. E., Batta, G., Szilagyi, L. and Rico, M. (1999). "I^H and I^{5N} sequential assignment and solution secondary structure of I^{5N} labelled human pancreatic ribonuclease." *J Biomol NMR* **15**(3): 265-266.
- Ellis, P., Davies, A. M., Evans, W. K., Haynes, A. E., Lloyd, N. S. and Lung Cancer Disease Site Group of Cancer Care Ontario's Program in Evidence-based, C. (2006). "The use of chemotherapy in patients with advanced malignant pleural mesothelioma: a systematic review and practice guideline." *J Thorac Oncol* **1**(6): 591-601.
- Ercole, C., Colamarino, R. A., Pizzo, E., Fogolari, F., Spadaccini, R. and Picone, D. (2009). "Comparison of the structural and functional properties of RNase A and BS-RNase: a stepwise mutagenesis approach." *Biopolymers* **91**(12): 1009-1017.

bibliografia //

- Ercole, C., Spadaccini, R., Alfano, C., Tancredi, T. and Picone, D. (2007). "A New Mutant of Bovine Seminal Ribonuclease with a Reversed Swapping Propensity." *Biochemistry*.
- Erickson, H. P. (1989). "Co-operativity in protein-protein association. The structure and stability of the actin filament." *J Mol Biol* **206**(3): 465-474.
- Fahrenkrog, B. and Aebi, U. (2003). "The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(10): 757-766.
- Ferlay, J., Parkin, D. M. and Steliarova-Foucher, E. (2010). "Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008." *Eur J Cancer* **46**(4): 765-781.
- Fett, J. W., Strydom, D. J., Lobb, R. R., Alderman, E. M., Bethune, J. L., Riordan, J. F. and Vallee, B. L. (1985). "Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells." *Biochemistry* **24**(20): 5480-5486.
- Fita, I. and Rossmann, M. G. (1985). "The active center of catalase." *J Mol Biol* **185**(1): 21-37.
- Font, J., Benito, A., Torrent, J., Lange, R., Ribo, M. and Vilanova, M. (2006). "Pressure- and temperature-induced unfolding studies: thermodynamics of core hydrophobicity and packing of ribonuclease A." *Biol Chem* **387**(3): 285-296.
- Fontes, M. R., Teh, T. and Kobe, B. (2000). "Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- α ." *J Mol Biol* **297**(5): 1183-1194.
- Futami, J., Maeda, T., Kitazoe, M., Nukui, E., Tada, H., Seno, M., Kosaka, M. and Yamada, H. (2001). "Preparation of potent cytotoxic ribonucleases by cationization: enhanced cellular uptake and decreased interaction with ribonuclease inhibitor by chemical modification of carboxyl groups." *Biochemistry* **40**(25): 7518-7524.
- Futami, J., Nukui, E., Maeda, T., Kosaka, M., Tada, H., Seno, M. and Yamada, H. (2002). "Optimum modification for the highest cytotoxicity of cationized ribonuclease." *J Biochem (Tokyo)* **132**(2): 223-228.
- Futami, J. and Yamada, H. (2008). "Design of cytotoxic ribonucleases by cationization to enhance intracellular protein delivery." *Curr Pharm Biotechnol* **9**(3): 180-184.
- Gaur, D., Swaminathan, S. and Batra, J. K. (2001). "Interaction of human pancreatic ribonuclease with human ribonuclease inhibitor: Generation of inhibitor-resistant cytotoxic variants." *J Biol Chem* **276**(27): 24978-24984.
- Geever, R. F., Wilson, L. B., Nallaseth, F. S., Milner, P. F., Bittner, M. and Wilson, J. T. (1981). "Direct identification of sickle cell anemia by blot hybridization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(8): 5081-5085.
- Glover, J. R., Kowal, A. S., Schirmer, E. C., Patino, M. M., Liu, J. J. and Lindquist, S. (1997). "Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of [PSI⁺], a heritable prion-like factor of *S. cerevisiae*." *Cell* **89**(5): 811-819.
- Gonzales, T. and Robert-Baudouy, J. (1996). "Bacterial aminopeptidases: properties and functions." *FEMS Microbiol Rev* **18**(4): 319-344.
- Gorlich, D. (1998). "Transport into and out of the cell nucleus." *EMBO J* **17**(10): 2721-2727.
- Gorlich, D., Henklein, P., Laskey, R. A. and Hartmann, E. (1996). "A 41 amino acid motif in importin- α confers binding to importin- β and hence transit into the nucleus." *EMBO J* **15**(8): 1810-1817.
- Gorlich, D., Prehn, S., Laskey, R. A. and Hartmann, E. (1994). "Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import." *Cell* **79**(5): 767-778.
- Gotte, G., Bertoldi, M. and Libonati, M. (1999). "Structural versatility of bovine ribonuclease A. Distinct conformers of trimeric and tetrameric aggregates of the enzyme." *Eur J Biochem* **265**(2): 680-687.

- Gotte, G., Laurents, D. V. and Libonati, M. (2006). "Three-dimensional domain-swapped oligomers of ribonuclease A: identification of a fifth tetramer, pentamers and hexamers, and detection of trace heptameric, octameric and nonameric species." *Biochim Biophys Acta* **1764**(1): 44-54.
- Gotte, G. and Libonati, M. (2004). "Oligomerization of ribonuclease A: two novel three-dimensional domain-swapped tetramers." *J Biol Chem* **279**(35): 36670-36679.
- Green, S. M., Gittis, A. G., Meeker, A. K. and Lattman, E. E. (1995). "One-step evolution of a dimer from a monomeric protein." *Nat Struct Biol* **2**(9): 746-751.
- Haigis, M. C., Kurten, E. L., Abel, R. L. and Raines, R. T. (2002). "KFERQ sequence in ribonuclease A-mediated cytotoxicity." *J Biol Chem* **277**(13): 11576-11581.
- Haigis, M. C., Kurten, E. L. and Raines, R. T. (2003). "Ribonuclease inhibitor as an intracellular sentry." *Nucleic Acids Res* **31**(3): 1024-1032.
- Haigis, M. C. and Raines, R. T. (2003). "Secretory ribonucleases are internalized by a dynamin-independent endocytic pathway." *J Cell Sci* **116**(Pt 2): 313-324.
- Hakanpaa, J., Paananen, A., Askolin, S., Nakari-Setälä, T., Parkkinen, T., Penttilä, M., Linder, M. B. and Rouvinen, J. (2004). "Atomic resolution structure of the HFBII hydrophobin, a self-assembling amphiphile." *J Biol Chem* **279**(1): 534-539.
- Harder, J. and Schroder, J. M. (2002). "RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin." *J Biol Chem* **277**(48): 46779-46784.
- Hayashida, T., Ueda, M., Aiura, K., Tada, H., Onizuka, M., Seno, M., Yamada, H. and Kitajima, M. (2005). "Anti-angiogenic effect of an insertional fusion protein of human basic fibroblast growth factor and ribonuclease-I." *Protein Eng Des Sel* **18**(7): 321-327.
- Heringa, J. and Taylor, W. R. (1997). "Three-dimensional domain duplication, swapping and stealing." *Curr Opin Struct Biol* **7**(3): 416-421.
- Hock, R., Scheer, U. and Bustin, M. (1998). "Chromosomal proteins HMG-14 and HMG-17 are released from mitotic chromosomes and imported into the nucleus by active transport." *J Cell Biol* **143**(6): 1427-1436.
- Huyghues-Despointes, B. M., Scholtz, J. M. and Pace, C. N. (1999). "Protein conformational stabilities can be determined from hydrogen exchange rates." *Nat Struct Biol* **6**(10): 910-912.
- Ilinskaya, O. N., Dreyer, F., Mitkevich, V. A., Shaw, K. L., Pace, C. N. and Makarov, A. A. (2002). "Changing the net charge from negative to positive makes ribonuclease Sa cytotoxic." *Protein Sci* **11**(10): 2522-2525.
- Ilinskaya, O. N., Koschinski, A., Mitkevich, V. A., Repp, H., Dreyer, F., Pace, C. N. and Makarov, A. A. (2004). "Cytotoxicity of RNases is increased by cationization and counteracted by K(Ca) channels." *Biochem Biophys Res Commun* **314**(2): 550-554.
- Iordanov, M. S., Ryabinina, O. P., Wong, J., Dinh, T. H., Newton, D. L., Rybak, S. M. and Magun, B. E. (2000). "Molecular determinants of apoptosis induced by the cytotoxic ribonuclease onconase: evidence for cytotoxic mechanisms different from inhibition of protein synthesis." *Cancer Res* **60**(7): 1983-1994.
- Iwama, M., Ogawa, Y., Sasaki, N., Nitta, K., Takayanagi, Y., Ohgi, K., Tsuji, T. and Irie, M. (2001). "Effect of modification of the carboxyl groups of the sialic acid binding lectin from bullfrog (*Rana catesbeiana*) oocyte on anti-tumor activity." *Biol Pharm Bull* **24**(9): 978-981.
- Iwaoka, M., Juminaga, D. and Scheraga, H. A. (1998). "Regeneration of three-disulfide mutants of bovine pancreatic ribonuclease A missing the 65-72 disulfide bond: characterization of a minor folding pathway of ribonuclease A and kinetic roles of Cys65 and Cys72." *Biochemistry* **37**(13): 4490-4501.

bibliografia //

- Izaurralde, E., Kann, M., Pante, N., Sodeik, B. and Hohn, T. (1999). "Viruses, microorganisms and scientists meet the nuclear pore. Leysin, VD, Switzerland, February 26-March 1, 1998." *EMBO J* **18**(2): 289-296.
- Jakel, S. and Gorlich, D. (1998). "Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells." *Embo J* **17**(15): 4491-4502.
- Janowski, R., Kozak, M., Jankowska, E., Grzonka, Z., Grubb, A., Abrahamson, M. and Jaskolski, M. (2001). "Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping." *Nat Struct Biol* **8**(4): 316-320.
- Jensen, K. D., Nori, A., Tijerina, M., Kopeckova, P. and Kopecek, J. (2003). "Cytoplasmic delivery and nuclear targeting of synthetic macromolecules." *J Control Release* **87**(1-3): 89-105.
- Johnson, R. J., Chao, T. Y., Lavis, L. D. and Raines, R. T. (2007a). "Cytotoxic ribonucleases: the dichotomy of Coulombic forces." *Biochemistry* **46**(36): 10308-10316.
- Johnson, R. J., McCoy, J. G., Bingman, C. A., Phillips, G. N., Jr. and Raines, R. T. (2007b). "Inhibition of human pancreatic ribonuclease by the human ribonuclease inhibitor protein." *J Mol Biol* **368**(2): 434-449.
- Juminaga, D., Wedemeyer, W. J., Garduno-Juarez, R., McDonald, M. A. and Scheraga, H. A. (1997). "Tyrosyl interactions in the folding and unfolding of bovine pancreatic ribonuclease A: a study of tyrosine-to-phenylalanine mutants." *Biochemistry* **36**(33): 10131-10145.
- Kalab, P. and Heald, R. (2008). "The RanGTP gradient - a GPS for the mitotic spindle." *J Cell Sci* **121**(Pt 10): 1577-1586.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D. and Smith, A. E. (1984). "A short amino acid sequence able to specify nuclear location." *Cell* **39**(3 Pt 2): 499-509.
- Kim, J. S., Soucek, J., Matousek, J. and Raines, R. T. (1995). "Mechanism of ribonuclease cytotoxicity." *J Biol Chem* **270**(52): 31097-31102.
- Klink, T. A., Woycechowsky, K. J., Taylor, K. M. and Raines, R. T. (2000). "Contribution of disulfide bonds to the conformational stability and catalytic activity of ribonuclease A." *Eur J Biochem* **267**(2): 566-572.
- Kobe, B. (1999). "Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha." *Nat Struct Biol* **6**(4): 388-397.
- Kobe, B. and Deisenhofer, J. (1996). "Mechanism of ribonuclease inhibition by ribonuclease inhibitor protein based on the crystal structure of its complex with ribonuclease A." *J Mol Biol* **264**(5): 1028-1043.
- Kohler, M., Speck, C., Christiansen, M., Bischoff, F. R., Prehn, S., Haller, H., Gorlich, D. and Hartmann, E. (1999). "Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import." *Mol Cell Biol* **19**(11): 7782-7791.
- Kover, K. E., Bruix, M., Santoro, J., Batta, G., Laurents, D. V. and Rico, M. (2008). "The solution structure and dynamics of human pancreatic ribonuclease determined by NMR spectroscopy provide insight into its remarkable biological activities and inhibition." *J Mol Biol* **379**(5): 953-965.
- Kurpiewska, K., Font, J., Ribo, M., Vilanova, M. and Lewinski, K. (2009). "X-ray crystallographic studies of RNase A variants engineered at the most destabilizing positions of the main hydrophobic core: further insight into protein stability." *Proteins* **77**(3): 658-669.
- Kurz, M., Doenecke, D. and Albig, W. (1997). "Nuclear transport of H1 histones meets the criteria of a nuclear localization signal-mediated process." *J Cell Biochem* **64**(4): 573-578.
- Lait, J. H., Lester, C. C., Shimotakahara, S., Zimmerman, D. E., Montelione, G. T. and Scheraga, H. A. (1997). "Structural characterization of an analog of the major rate-determining disulfide folding intermediate of bovine pancreatic ribonuclease A." *Biochemistry* **36**(42): 12683-12699.

- Lane, D. and Harlow, E. (1982). "Two different viral transforming proteins bind the same host tumour antigen." *Nature* **298**(5874): 517.
- Lapatto, R., Nalini, V., Bax, B., Driessen, H., Lindley, P. F., Blundell, T. L. and Slingsby, C. (1991). "High resolution structure of an oligomeric eye lens beta-crystallin. Loops, arches, linkers and interfaces in beta B2 dimer compared to a monomeric gamma-crystallin." *J Mol Biol* **222**(4): 1067-1083.
- Lee, F. S., Shapiro, R. and Vallee, B. L. (1989). "Tight-binding inhibition of angiogenin and ribonuclease A by placental ribonuclease inhibitor." *Biochemistry* **28**(1): 225-230.
- Lee, F. S. and Vallee, B. L. (1993). "Structure and action of mammalian ribonuclease (angiogenin) inhibitor." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **44**: 1-30.
- Lee, S. and Eisenberg, D. (2003). "Seeded conversion of recombinant prion protein to a disulfide-bonded oligomer by a reduction-oxidation process." *Nat Struct Biol* **10**(9): 725-730.
- Leland, P. A., Schultz, L. W., Kim, B. M. and Raines, R. T. (1998). "Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(18): 10407-10412.
- Leland, P. A., Staniszewski, K. E., Kim, B. M. and Raines, R. T. (2001). "Endowing human pancreatic ribonuclease with toxicity for cancer cells." *J Biol Chem* **276**(46): 43095-43102.
- Leung, S. W., Harreman, M. T., Hodel, M. R., Hodel, A. E. and Corbett, A. H. (2003). "Dissection of the karyopherin alpha nuclear localization signal (NLS)-binding groove: functional requirements for NLS binding." *J Biol Chem* **278**(43): 41947-41953.
- Liao, Y. D., Huang, H. C., Chan, H. J. and Kuo, S. J. (1996). "Large-scale preparation of a ribonuclease from *Rana catesbeiana* (bullfrog) oocytes and characterization of its specific cytotoxic activity against tumor cells." *Protein Expr Purif* **7**(2): 194-202.
- Lim, R. Y., Aebi, U. and Fahrenkrog, B. (2008). "Towards reconciling structure and function in the nuclear pore complex." *Histochem Cell Biol* **129**(2): 105-116.
- Liu, Y. and Eisenberg, D. (2002). "3D domain swapping: as domains continue to swap." *Protein Sci* **11**(6): 1285-1299.
- Liu, Y., Gotte, G., Libonati, M. and Eisenberg, D. (2001). "A domain-swapped RNase A dimer with implications for amyloid formation." *Nat Struct Biol* **8**(3): 211-214.
- Liu, Y., Hart, P. J., Schlunegger, M. P. and Eisenberg, D. (1998). "The crystal structure of a 3D domain-swapped dimer of RNase A at a 2.1-Å resolution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(7): 3437-3442.
- Lobl, T. J., Mitchell, M. A. and Maggiora, L. L. (1990). "SV40 large T-antigen nuclear signal analogues: successful nuclear targeting with bovine serum albumin but not low molecular weight fluorescent conjugates." *Biopolymers* **29**(1): 197-203.
- Lopez-Alonso, J. P., Bruix, M., Font, J., Ribo, M., Vilanova, M., Jimenez, M. A., Santoro, J., Gonzalez, C. and Laurents, D. V. (2010). "NMR spectroscopy reveals that RNase A is chiefly denatured in 40% acetic acid: implications for oligomer formation by 3D domain swapping." *J Am Chem Soc* **132**(5): 1621-1630.
- Mackay, J. P., Matthews, J. M., Winefield, R. D., Mackay, L. G., Haverkamp, R. G. and Templeton, M. D. (2001). "The hydrophobin EAS is largely unstructured in solution and functions by forming amyloid-like structures." *Structure* **9**(2): 83-91.
- Mancheno, J. M., Gasset, M., Onaderra, M., Gavilanes, J. G. and D'Alessio, G. (1994). "Bovine seminal ribonuclease destabilizes negatively charged membranes." *Biochem Biophys Res Commun* **199**(1): 119-124.
- Mastronicola, M. R., Piccoli, R. and D'Alessio, G. (1995). "Key extracellular and intracellular steps in the antitumor action of seminal ribonuclease." *Eur J Biochem* **230**(1): 242-249.

bibliografia //

- Matousek, J. (1973). "The effect of bovine seminal ribonuclease (AS RNase) on cells of Crocker tumour in mice." *Experientia* **29**(7): 858-859.
- Matousek, J. (2001). "Ribonucleases and their antitumor activity." *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **129**(3): 175-191.
- Matousek, J., Gotte, G., Pouckova, P., Soucek, J., Slavik, T., Vottariello, F. and Libonati, M. (2003a). "Antitumor activity and other biological actions of oligomers of ribonuclease A." *J Biol Chem* **278**(26): 23817-23822.
- Matousek, J., Soucek, J., Slavik, T., Tomanek, M., Lee, J. E. and Raines, R. T. (2003b). "Comprehensive comparison of the cytotoxic activities of onconase and bovine seminal ribonuclease." *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **136**(4): 343-356.
- Mazzarella, K., Vitagliano, L. and Zagari, A. (1995). "Swapping structural determinants of ribonucleases: an energetic analysis of the hinge peptide 16-22." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(9): 3799-3803.
- Mazzarella, L., Capasso, S., Demasi, D., Di Lorenzo, G., Mattia, C. A. and Zagari, A. (1993). "Bovine seminal ribonuclease: structure at 1.9 Å resolution." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **49**(Pt 4): 389-402.
- Merlino, A., Ercole, C., Picone, D., Pizzo, E., Mazzarella, L. and Sica, F. (2008). "The buried diversity of bovine seminal ribonuclease: shape and cytotoxicity of the swapped non-covalent form of the enzyme." *J Mol Biol* **376**(2): 427-437.
- Merlino, A., Russo Krauss, I., Perillo, M., Mattia, C. A., Ercole, C., Picone, D., Vergara, A. and Sica, F. (2009). "Toward an antitumor form of bovine pancreatic ribonuclease: the crystal structure of three noncovalent dimeric mutants." *Biopolymers* **91**(12): 1029-1037.
- Merlino, A., Vitagliano, L., Sica, F., Zagari, A. and Mazzarella, L. (2004). "Population shift vs induced fit: the case of bovine seminal ribonuclease swapping dimer." *Biopolymers* **73**(6): 689-695.
- Mikulski, S. M., Costanzi, J. J., Vogelzang, N. J., McCachren, S., Taub, R. N., Chun, H., Mittelman, A., Panella, T., Puccio, C., Fine, R. and Shogen, K. (2002). "Phase II trial of a single weekly intravenous dose of ranpirnase in patients with unresectable malignant mesothelioma." *J Clin Oncol* **20**(1): 274-281.
- Milburn, M. V., Hassell, A. M., Lambert, M. H., Jordan, S. R., Proudfoot, A. E., Graber, P. and Wells, T. N. (1993). "A novel dimer configuration revealed by the crystal structure at 2.4 Å resolution of human interleukin-5." *Nature* **363**(6425): 172-176.
- Mizuno, T., Okamoto, T., Yokoi, M., Izumi, M., Kobayashi, A., Hachiya, T., Tamai, K., Inoue, T. and Hanaoka, F. (1996). "Identification of the nuclear localization signal of mouse DNA primase: nuclear transport of p46 subunit is facilitated by interaction with p54 subunit." *J Cell Sci* **109** (Pt 11): 2627-2636.
- Mondino, A. and Jenkins, M. K. (1995). "Accumulation of sequence-specific RNA-binding proteins in the cytosol of activated T cells undergoing RNA degradation and apoptosis." *J Biol Chem* **270**(44): 26593-26601.
- Mosammamarast, N. and Pemberton, L. F. (2004). "Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators." *Trends Cell Biol* **14**(10): 547-556.
- Mozhaev, V. V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P. and Balny, C. (1996). "High pressure effects on protein structure and function." *Proteins* **24**(1): 81-91.
- Murthy, B. S., De Lorenzo, C., Piccoli, R., D'Alessio, G. and Sirdeshmukh, R. (1996). "Effects of protein RNase inhibitor and substrate on the quaternary structures of bovine seminal RNase." *Biochemistry* **35**(13): 3880-3885.
- Murthy, B. S. and Sirdeshmukh, R. (1992). "Sensitivity of monomeric and dimeric forms of bovine seminal ribonuclease to human placental ribonuclease inhibitor." *Biochem J* **281** (Pt 2): 343-348.

- Nakai, K. and Horton, P. (1999). "PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization." *Trends Biochem Sci* **24**(1): 34-36.
- Newton, D. L., Boque, L., Wlodawer, A., Huang, C. Y. and Rybak, S. M. (1998). "Single amino acid substitutions at the N-terminus of a recombinant cytotoxic ribonuclease markedly influence biochemical and biological properties." *Biochemistry* **37**(15): 5173-5183.
- Newton, D. L., Ilercil, O., Laske, D. W., Oldfield, E., Rybak, S. M. and Youle, R. J. (1992). "Cytotoxic ribonuclease chimeras. Targeted tumoricidal activity in vitro and in vivo." *J Biol Chem* **267**(27): 19572-19578.
- Nigg, E. A. (1997). "Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation." *Nature* **386**(6627): 779-787.
- Nilsson, M., Wang, X., Rodziewicz-Motowidlo, S., Janowski, R., Lindstrom, V., Onnerfjord, P., Westermark, G., Grzonka, Z., Jaskolski, M. and Grubb, A. (2004). "Prevention of domain swapping inhibits dimerization and amyloid fibril formation of cystatin C: use of engineered disulfide bridges, antibodies, and carboxymethylpapain to stabilize the monomeric form of cystatin C." *J Biol Chem* **279**(23): 24236-24245.
- Nitta, K., Ozaki, K., Ishikawa, M., Furusawa, S., Hosono, M., Kawauchi, H., Sasaki, K., Takayanagi, Y., Tsuiki, S. and Hakomori, S. (1994). "Inhibition of cell proliferation by *Rana catesbeiana* and *Rana japonica* lectins belonging to the ribonuclease superfamily." *Cancer Res* **54**(4): 920-927.
- Nitta, K., Takayanagi, G., Kawauchi, H. and Hakomori, S. (1987). "Isolation and characterization of *Rana catesbeiana* lectin and demonstration of the lectin-binding glycoprotein of rodent and human tumor cell membranes." *Cancer Res* **47**(18): 4877-4883.
- Notomista, E., Catanzano, F., Graziano, G., Dal Piaz, F., Barone, G., D'Alessio, G. and Di Donato, A. (2000). "Onconase: an unusually stable protein." *Biochemistry* **39**(30): 8711-8718.
- O'Neill, J. W., Manion, M. K., Maguire, B. and Hockenbery, D. M. (2006). "BCL-XL dimerization by three-dimensional domain swapping." *J Mol Biol* **356**(2): 367-381.
- Ogawa, Y., Iwama, M., Ohgi, K., Tsuji, T., Irie, M., Itagaki, T., Kobayashi, H. and Inokuchi, N. (2002). "Effect of replacing the aspartic acid/glutamic acid residues of bullfrog sialic acid binding lectin with asparagine/glutamine and arginine on the inhibition of cell proliferation in murine leukemia P388 cells." *Biol Pharm Bull* **25**(6): 722-727.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. and Gray, T. (1995). "How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein." *Protein Sci* **4**(11): 2411-2423.
- Pares, X., Nogues, M. V., de Llorens, R. and Cuchillo, C. M. (1991). "Structure and function of ribonuclease A binding subsites." *Essays Biochem* **26**: 89-103.
- Parge, H. E., Arvai, A. S., Murtari, D. J., Reed, S. I. and Tainer, J. A. (1993). "Human CksHs2 atomic structure: a role for its hexameric assembly in cell cycle control." *Science* **262**(5132): 387-395.
- Park, C., Kelemen, B. R., Klink, T. A., Sweeney, R. Y., Behlke, M. A., Eubanks, S. R. and Raines, R. T. (2001). "Fast, facile, hypersensitive assays for ribonucleolytic activity." *Methods Enzymol* **341**: 81-94.
- Pepys, M. B. (2006). "Amyloidosis." *Annu Rev Med* **57**: 223-241.
- Piccoli, R., Di Gaetano, S., De Lorenzo, C., Grauso, M., Monaco, C., Spalletti-Cernia, D., Laccetti, P., Cinatl, J., Matousek, J. and D'Alessio, G. (1999). "A dimeric mutant of human pancreatic ribonuclease with selective cytotoxicity toward malignant cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(14): 7768-7773.
- Piccoli, R., Tamburrini, M., Piccialli, G., Di Donato, A., Parente, A. and D'Alessio, G. (1992). "The dual-mode quaternary structure of seminal RNase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(5): 1870-1874.
- Pollard, V. W., Michael, W. M., Nakielnny, S., Siomi, M. C., Wang, F. and Dreyfuss, G. (1996). "A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway." *Cell* **86**(6): 985-994.

bibliografia //

- Pous, J., Canals, A., Terzyan, S. S., Guasch, A., Benito, A., Ribo, M., Vilanova, M. and Coll, M. (2000). "Three-dimensional structure of a human pancreatic ribonuclease variant, a step forward in the design of cytotoxic ribonucleases." *J Mol Biol* **303**(1): 49-60.
- Qu, Y. and Bolen, D. W. (2003). "Hydrogen exchange kinetics of RNase A and the urea:TMAO paradigm." *Biochemistry* **42**(19): 5837-5849.
- Raag, R. and Whitlow, M. (1995). "Single-chain Fvs." *FASEB J* **9**(1): 73-80.
- Ribo, M., Benito, A., Canals, A., Nogues, M.V., Cuchillo, C. M. and Vilanova, M. (2001). "Purification of engineered human pancreatic ribonuclease." *Methods Enzymol* **341**: 221-234.
- Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A. and Dingwall, C. (1991). "Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence." *Cell* **64**(3): 615-623.
- Rodriguez, M., Benito, A., Ribo, M. and Vilanova, M. (2006a). "Characterization of the dimerization process of a domain-swapped dimeric variant of human pancreatic ribonuclease." *FEBS J* **273**(6): 1166-1176.
- Rodriguez, M., Benito, A., Tubert, P., Castro, J., Ribo, M., Beaumelle, B. and Vilanova, M. (2006b). "A cytotoxic ribonuclease variant with a discontinuous nuclear localization signal constituted by basic residues scattered over three areas of the molecule." *J Mol Biol* **360**(3): 548-557.
- Rodriguez, M., Torrent, G., Bosch, M., Rayne, F., Dubremetz, J. F., Ribo, M., Benito, A., Vilanova, M. and Beaumelle, B. (2007). "Intracellular pathway of Onconase that enables its delivery to the cytosol." *J Cell Sci* **120**(Pt 8): 1405-1411.
- Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D. S., Lin, S. W., Dunn, J. J. and Studier, F. W. (1987). "Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase." *Gene* **56**(1): 125-135.
- Roth, J. S. and Juster, H. (1972). "On the absence of ribonuclease inhibitor in rat liver nuclei." *Biochim Biophys Acta* **287**(3): 474-476.
- Ruoppolo, M., Vinci, F., Klink, T. A., Raines, R. T. and Marino, G. (2000). "Contribution of individual disulfide bonds to the oxidative folding of ribonuclease A." *Biochemistry* **39**(39): 12033-12042.
- Russo, N., Antignani, A. and D'Alessio, G. (2000). "In vitro evolution of a dimeric variant of human pancreatic ribonuclease." *Biochemistry* **39**(13): 3585-3591.
- Rybak, S. M., Hoogenboom, H. R., Newton, D. L., Raus, J. C. and Youle, R. J. (1992). "Rational immunotherapy with ribonuclease chimeras. An approach toward humanizing immunotoxins." *Cell Biophys* **21**(1-3): 121-138.
- Rybak, S. M. and Newton, D. L. (1999). "Natural and engineered cytotoxic ribonucleases: therapeutic potential." *Exp Cell Res* **253**(2): 325-335.
- Sakakibara, F., Kawauchi, H., Takayanagi, G. and Ise, H. (1979). "Egg lectin of *Rana japonica* and its receptor glycoprotein of Ehrlich tumor cells." *Cancer Res* **39**(4): 1347-1352.
- Sambashivan, S., Liu, Y., Sawaya, M. R., Gingery, M. and Eisenberg, D. (2005). "Amyloid-like fibrils of ribonuclease A with three-dimensional domain-swapped and native-like structure." *Nature* **437**(7056): 266-269.
- Sanders, A., Jeremy Craven, C., Higgins, L. D., Giannini, S., Conroy, M. J., Hounslow, A. M., Waltho, J. P. and Staniforth, R. A. (2004). "Cystatin forms a tetramer through structural rearrangement of domain-swapped dimers prior to amyloidogenesis." *J Mol Biol* **336**(1): 165-178.
- Saxena, S. K., Sirdeshmukh, R., Ardelt, W., Mikulski, S. M., Shogen, K. and Youle, R. J. (2002). "Entry into cells and selective degradation of tRNAs by a cytotoxic member of the RNase A family." *J Biol Chem* **277**(17): 15142-15146.

- Schein, C. H. (1997). "From housekeeper to microsurgeon: the diagnostic and therapeutic potential of ribonucleases." *Nat Biotechnol* **15**(6): 529-536.
- Schmitz, A., Herrgen, H., Winkeler, A. and Herzog, V. (2000). "Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex." *J Cell Biol* **148**(6): 1203-1212.
- Schreuder, H. A., Knight, S., Curmi, P. M., Andersson, I., Cascio, D., Sweet, R. M., Branden, C. I. and Eisenberg, D. (1993). "Crystal structure of activated tobacco rubisco complexed with the reaction-intermediate analogue 2-carboxy-arabinitol 1,5-bisphosphate." *Protein Sci* **2**(7): 1136-1146.
- Seeliger, M. A., Schymkowitz, J. W., Rousseau, F., Wilkinson, H. R. and Itzhaki, L. S. (2002). "Folding and association of the human cell cycle regulatory proteins cks1 and cks2." *Biochemistry* **41**(4): 1202-1210.
- Sica, F., Di Fiore, A., Merlino, A. and Mazzarella, L. (2004). "Structure and stability of the non-covalent swapped dimer of bovine seminal ribonuclease: an enzyme tailored to evade ribonuclease protein inhibitor." *J Biol Chem* **279**(35): 36753-36760.
- Sica, F., Di Fiore, A., Zagari, A. and Mazzarella, L. (2003). "The unswapped chain of bovine seminal ribonuclease: Crystal structure of the free and liganded monomeric derivative." *Proteins* **52**(2): 263-271.
- Sijacic, P., Wang, X., Skirpan, A. L., Wang, Y., Dowd, P. E., McCubbin, A. G., Huang, S. and Kao, T. H. (2004). "Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility." *Nature* **429**(6989): 302-305.
- Singh, U. P., Ardel, W., Saxena, S. K., Holloway, D. E., Vidunas, E., Lee, H. S., Saxena, A., Shogen, K. and Acharya, K. R. (2007). "Enzymatic and structural characterisation of amphinase, a novel cytotoxic ribonuclease from *Rana pipiens* oocytes." *J Mol Biol* **371**(1): 93-111.
- Sipe, J. D. and Cohen, A. S. (2000). "Review: history of the amyloid fibril." *J Struct Biol* **130**(2-3): 88-98.
- Sondheimer, N. and Lindquist, S. (2000). "Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast." *Mol Cell* **5**(1): 163-172.
- Sorrentino, S. and Libonati, M. (1997). "Structure-function relationships in human ribonucleases: main distinctive features of the major RNase types." *FEBS Lett* **404**(1): 1-5.
- Spector, S., Flynn, J. M., Tidor, B., Baker, T. A. and Sauer, R. T. (2003). "Expression of N-formylated proteins in *Escherichia coli*." *Protein Expr Purif* **32**(2): 317-322.
- Studier, F. W. and Moffatt, B. A. (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." *J Mol Biol* **189**(1): 113-130.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. and Dubendorff, J. W. (1990). "Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes." *Methods Enzymol* **185**: 60-89.
- Subramaniam, P. S., Green, M. M., Larkin, J., 3rd, Torres, B. A. and Johnson, H. M. (2001). "Nuclear translocation of IFN-gamma is an intrinsic requirement for its biologic activity and can be driven by a heterologous nuclear localization sequence." *J Interferon Cytokine Res* **21**(11): 951-959.
- Sunde, M. and Blake, C. (1997). "The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction." *Adv Protein Chem* **50**: 123-159.
- Suzuki, M., Saxena, S. K., Boix, E., Prill, R. J., Vasandani, V. M., Ladner, J. E., Sung, C. and Youle, R. J. (1999). "Engineering receptor-mediated cytotoxicity into human ribonucleases by steric blockade of inhibitor interaction." *Nat Biotechnol* **17**(3): 265-270.
- Tada, H., Onizuka, M., Muraki, K., Masuzawa, W., Futami, J., Kosaka, M., Seno, M. and Yamada, H. (2004). "Insertional-fusion of basic fibroblast growth factor endowed ribonuclease I with enhanced cytotoxicity by steric blockade of inhibitor interaction." *FEBS Lett* **568**(1-3): 39-43.

- Tamura, A. and Privalov, P.L. (1997). "The entropy cost of protein association." *J Mol Biol* **273**(5): 1048-1060.
- Tijerina, M., Kopeckova, P. and Kopecek, J. (2003a). "Correlation of subcellular compartmentalization of HPMA copolymer-Mce6 conjugates with chemotherapeutic activity in human ovarian carcinoma cells." *Pharm Res* **20**(5): 728-737.
- Tijerina, M., Kopeckova, P. and Kopecek, J. (2003b). "Mechanisms of cytotoxicity in human ovarian carcinoma cells exposed to free Mce6 or HPMA copolymer-Mce6 conjugates." *Photochem Photobiol* **77**(6): 645-652.
- Torrent, J., Connelly, J. P., Coll, M. G., Ribo, M., Lange, R. and Vilanova, M. (1999). "Pressure versus heat-induced unfolding of ribonuclease A: the case of hydrophobic interactions within a chain-folding initiation site." *Biochemistry* **38**(48): 15952-15961.
- Trinkl, S., Glockshuber, R. and Jaenicke, R. (1994). "Dimerization of beta B2-crystallin: the role of the linker peptide and the N- and C-terminal extensions." *Protein Sci* **3**(9): 1392-1400.
- Turcotte, R. F. and Raines, R.T. (2008). "Interaction of onconase with the human ribonuclease inhibitor protein." *Biochem Biophys Res Commun* **377**(2): 512-514.
- Turpin, P., Hay, R.T. and Dargemont, C. (1999). "Characterization of IkappaBalpha nuclear import pathway." *J Biol Chem* **274**(10): 6804-6812.
- Vasandani, V. M., Burris, J. A. and Sung, C. (1999). "Reversible nephrotoxicity of onconase and effect of lysine pH on renal onconase uptake." *Cancer Chemother Pharmacol* **44**(2): 164-169.
- Vasandani, V. M., Wu, Y. N., Mikulski, S. M., Youle, R. J. and Sung, C. (1996). "Molecular determinants in the plasma clearance and tissue distribution of ribonucleases of the ribonuclease A superfamily." *Cancer Res* **56**(18): 4180-4186.
- Vatzaki, E. H., Allen, S. C., Leonidas, D. D., Trautwein-Fritz, K., Stackhouse, J., Benner, S. A. and Acharya, K. R. (1999). "Crystal structure of a hybrid between ribonuclease A and bovine seminal ribonuclease--the basic surface, at 2.0 A resolution." *Eur J Biochem* **260**(1): 176-182.
- Vescia, S., Tramontano, D., Augusti-Tocco, G. and D'Alessio, G. (1980). "In vitro studies on selective inhibition of tumor cell growth by seminal ribonuclease." *Cancer Res* **40**(10): 3740-3744.
- Vicentini, A. M., Kieffer, B., Matthies, R., Meyhack, B., Hemmings, B. A., Stone, S. R. and Hofsteenge, J. (1990). "Protein chemical and kinetic characterization of recombinant porcine ribonuclease inhibitor expressed in *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochemistry* **29**(37): 8827-8834.
- Westermarck, P., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Cohen, A. S., Frangione, B., Ikeda, S., Masters, C. L., Merlini, G., Saraiva, M. J. and Sipe, J. D. (2005). "Amyloid: toward terminology clarification. Report from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis." *Amyloid* **12**(1): 1-4.
- Wishart, D. S., Bigam, C. G., Holm, A., Hodges, R. S. and Sykes, B. D. (1995). "1H, 13C and 15N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects." *J Biomol NMR* **5**(1): 67-81.
- Wozniak, R. W., Rout, M. P. and Aitchison, J. D. (1998). "Karyopherins and kissing cousins." *Trends Cell Biol* **8**(5): 184-188.
- Wu, Y., Mikulski, S. M., Ardelt, W., Rybak, S. M. and Youle, R. J. (1993). "A cytotoxic ribonuclease. Study of the mechanism of onconase cytotoxicity." *J Biol Chem* **268**(14): 10686-10693.
- Wu, Y., Saxena, S. K., Ardelt, W., Gadina, M., Mikulski, S. M., De Lorenzo, C., D'Alessio, G. and Youle, R. J. (1995). "A study of the intracellular routing of cytotoxic ribonucleases." *J Biol Chem* **270**(29): 17476-17481.
- Yan, Y., Winograd, E., Viel, A., Cronin, T., Harrison, S. C. and Branton, D. (1993). "Crystal structure of the repetitive segments of spectrin." *Science* **262**(5142): 2027-2030.

- Youle, R. J., Newton, D., Wu, Y. N., Gadina, M. and Rybak, S. M. (1993). "Cytotoxic ribonucleases and chimeras in cancer therapy." *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **10**(1): 1-28.
- Zdanov, A., Schalk-Hihi, C., Gustchina, A., Tsang, M., Weatherbee, J. and Wlodawer, A. (1995). "Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon gamma." *Structure* **3**(6): 591-601.
- Zewe, M., Rybak, S. M., Dubel, S., Coy, J. F., Welschof, M., Newton, D. L. and Little, M. (1997). "Cloning and cytotoxicity of a human pancreatic RNase immunofusion." *Immunotechnology* **3**(2): 127-136.
- Zhang, S., Zhong, N., Xue, F., Kang, X., Ren, X., Chen, J., Jin, C., Lou, Z. and Xia, B. (2010). "Three-dimensional domain swapping as a mechanism to lock the active conformation in a super-active octamer of SARS-CoV main protease." *Protein Cell* **1**(4): 371-383.
- Zhao, H., Ardelt, B., Ardelt, W., Shogen, K. and Darzynkiewicz, Z. (2008). "The cytotoxic ribonuclease onconase targets RNA interference (siRNA)." *Cell Cycle* **7**(20): 3258-3261.