



DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

Tesi Doctoral

**IDENTIFICACIÓ IMMUNOLÒGICA I CHARACTERITZACIÓ DE LES  
PROPIETATS BIOLÒGIQUES DE LA PROTEÏNA CATIÒNICA  
D'EOSINÒFIL**

Esther Carreras Margalef

Març 2004



DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

**IDENTIFICACIÓ IMMUNOLÒGICA I CARACTERITZACIÓ DE LES  
PROPIETATS BIOLÒGIQUES DE LA PROTEÏNA CATIÒNICA  
D'EOSINÒFIL**

Tesis presentada per **Esther Carreras Margalef** per optar al grau de  
Doctor en Bioquímica i Biologia Molecular  
sota la direcció de la **Dra. M. Victòria Nogués Bara** i **Dra. Ester Boix Borràs**

Unitat de Ciències del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Universitat Autònoma de Barcelona

Dra. M. Victòria Nogués Bara

Dra. Ester Boix Borràs

Esther Carreras Margalef

Bellaterra, març de 2004

Todo el mundo quisiera marchar por la senda del conocimiento.  
Unos la buscan afanosamente: otros dicen haberla encontrado ya.  
Más un día una voz clamará: "No hay ruta ni sendero".

Omar Kayyam

## Agraïments

Són molts els noms que ara em venen al cap. Molta gent que ha fet possible que aquesta tesi arribés a la seva fi, però sobretot ha fet que m'ho passés bé mentre realitzava aquest treball. Tot i que no veig possible expressar el meu agraïment en unes poques frases, voldria almenys intentar-ho. Gràcies, sincerament:

A la Universitat Autònoma de Barcelona per la concessió d'una beca predoctoral de Formació d'Investigadors de la UAB i una beca per una estada breu fora de Catalunya.

A la Dra. M. Victòria Nogués per l'orientació, direcció i correcció d'aquesta tesi i en especial, per les enriquidores converses, per explicar resultats de difícil interpretació, per animar-me a continuar quan creia que algun experiment no sortiria i per mostrar la seva part humana.

A la Dra. Ester Boix per iniciar-me en el treball al laboratori, orientar-me, dirigir-me, no queixar-se quan li donava per corregir els primers esborranys encara poc treballats d'aquesta tesi, i també, pel interès que sempre ha mostrat per aquest treball.

Al Dr. Claudi M. Cuchillo per acceptar-me en el seu grup d'investigació i permetre així la continuïtat de la meva formació.

A la Dra. Helene F. Rosenberg per donar-me la oportunitat de realitzar una part de la tesi al seu laboratori al NIH. Vull agrair en especial tot l'ajut i col·laboració que vaig rebre durant la meua estada per part de tots els components del grup (Helene, Kimberly i George).

Als meus companys, els ribos, perquè ha estat un plaer treballar amb vosaltres: Gràcies Mohammed per estar sempre disponible en les incomptables ocasions en què he necessitat del teu ajut quan els aparells, els experiments o jo mateixa no acabaven de rutllar. Gennady, pel temps que has dedicat a ensenyar-me i com no, pel teu estrany sentit de l'humor. Zoran, perquè de les teves anades d'olla també he après alguna cosa. Susanna, per aguantar-me, que no és fàcil, i per la teua valuosa amistat. Sandra, perquè ha estat divertit compartir amb tu el teu treball dels gats mentre parlàvem d'eosinòfils i altres temes. I als que encara que per menys temps també han passat per aquest grup: Ingrid, Juliana, Marta, Marc, i Elisabet gràcies per la vostra simpatia.

A la resta de membres del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular pels moments distesos de xerrades al passadís, seminari o a la màquina de cafè. En

particular, voldria agrair al Salva la paciència que ha tingut amb mi i els meus problemes informàtics.

No em vull oblidar tampoc de qui en algun moment m'ha donat un bon consell quan estava estancada en algun experiment. Paqui i Júlia, per les vostres indicacions amb les cèl·lules i Ramon Barnades, pels suggeriments en l'assaig amb els liposomes.

Al Gabinet de Llengua Catalana de la UAB per la ràpida correcció del català.

Finalment, el més càlid agraïment pels meus amics i família, i sobretot, pels meus pares i els meus germans (Teresa, Ramon i Toni) i a la meva àvia pel seu suport i interès per mi i per aquesta tesis.

Índex .....	i
Abreviatures.....	iii
Resum / Summary.....	v
<b>CAPÍTOL 1: INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>1</b>
1 RIBONUCLEASES: DEFINICIÓ.....	1
2 RIBONUCLEASES: CLASSIFICACIÓ I FUNCIONS .....	1
3 LA SUPERFAMÍLIA DE LES RIBONUCLEASES PIRIMIDINA ESPECÍFIQUES (Superfamília de la RNasa A).....	5
3.1 RNasa A.....	5
3.1.1 Mecanisme de catàlisi de la RNasa A .....	6
3.1.2 Interacció RNasa A – RNA.....	7
3.2 Ribonucleases humanes .....	8
3.2.1 RNasa 1 .....	9
3.2.2 RNasa 2 (neurotoxina derivada d'eosinòfil).....	10
3.2.3 RNasa 3 (proteïna catiònica d'eosinòfil) .....	10
3.2.4 RNasa 4 .....	11
3.2.5 RNasa 5 (angiogenina) .....	11
3.2.6 RNasa 6.....	12
3.2.7 RNasa 7 .....	13
3.2.8 RNasa 8.....	14
4 RIBONUCLEASES D'EOSINÒFIL .....	14
4.1 Eosinòfils.....	14
4.2 Producció d'ECP per les cèl·lules sanguínies .....	17
4.3 Característiques genètiques de les ribonucleases d'eosinòfil: ECP i EDN.....	18
4.4 Característiques moleculars de l'ECP.....	19
4.5 Estructura tridimensional de l'ECP.....	19
4.6 Activitat RNasa .....	20
4.7 Propietats biològiques de l'ECP.....	21
4.7.1 Regulació del sistema del complement .....	22
4.7.2 Alteració de la coagulació .....	22
4.7.3 Fibrinòlisi.....	22
4.7.4 Activació de la secreció de mucus de les cèl·lules epitelials .....	22
4.7.5 Activació de mastòcits.....	23
4.7.6 Inhibició de la proliferació de limfòcits .....	23
4.7.7 Funció immunoreguladora .....	23
4.7.8 Citotoxicitat en front cèl·lules de l'hoste.....	24
4.7.9 Neurotoxicitat.....	24
4.7.10 Toxicitat en front paràsits .....	25
4.7.11 Activitat bactericida .....	26
4.7.12 Activitat antivírica .....	27
4.7.13 Propietats de l'ECP relacionades amb l'activitat citotòxica .....	27
4.7.14 Regulació de les activitats de l'ECP .....	28
4.8 Detecció de l'ECP per anticossos .....	31
4.9 Detecció de l'ECP en fluids corporals.....	32
4.9.1 Sang.....	32
4.9.2 Esput.....	33
4.9.3 Rentat nasal .....	33

4.9.4 Rentat broncoalveolar .....	33
4.9.5 Altres líquids corporals.....	34
5 OBJECTIUS.....	34
Bibliografia .....	37
<b>CAPÍTOL 2: IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF HUMAN EOSINOPHIL CATIONIC PROTEIN BY AN EPITOPE-SPECIFIC ANTIBODY .....</b>	<b>51</b>
<b>CAPÍTOL 3: BOTH AROMATIC AND CATIONIC RESIDUES CONTRIBUTE TO THE MEMBRANE-LYTIC AND BACTERICIDAL ACTIVITY OF EOSINOPHIL CATIONIC PROTEIN .....</b>	<b>61</b>
<b>CAPÍTOL 4: SURFACE EXPOSED AMINO ACIDS OF EOSINOPHIL CATIONIC PROTEIN PLAY A KEY ROLE ON THE INHIBITION OF MAMMALIAN CELLS PROLIFERATION.....</b>	<b>71</b>
<b>CAPÍTOL 5: RESULTATS I DISCUSSIÓ .....</b>	<b>93</b>
1 DETECCIÓ IMMUNOLÒGICA DE L'ECP PER UN ANTICÒS ESPECÍFIC .....	93
1.1 Disseny i obtenció d'un anticòs específic per a l'ECP.....	94
1.2 Caracterització de l'anticòs D112 – P123.....	96
1.3 Detecció de l'ECP en fluids corporals per l'anticòs D112-P123 .....	97
2 DETERMINANTS ESTRUCTURALS D'ACTIVITATS BIOLÒGIQUES ESPECÍFIQUES DE L'ECP.....	98
2.1 Model per l'estudi de l'activitat sobre membranes de l'ECP .....	100
2.2 Disseny de les variants de l'ECP .....	101
2.3 Activitat RNasa de les variants de l'ECP .....	103
2.4 Efecte de les mutacions sobre les activitats biològiques de l'ECP .....	103
2.4.1 Disrupció de vesícules lipídiques.....	103
2.4.2 Activitat bactericida .....	105
2.4.3 Inhibició de la proliferació de línies cel·lulars tumorals .....	107
2.5 Mecanisme d'acció de l'ECP .....	109
2.6 Possibles aplicacions terapèutiques de l'ECP.....	109
2.7 Funció fisiològica de l'ECP.....	110
Bibliografia .....	113
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>119</b>

## ABREVIATURES

À	Amstrong
BS-RNasa	Ribonucleasa seminal bovina
C>p	Citidina 2',3' -fosfat cíclic
CFU	Unitats de formació de colònies
ECP	Proteïna catiònica d'eosinòfil
ECPr	ECP recombinant
EDN	Neurotoxina derivada d'eosinòfil
EPO	Peroxidasa d'eosinòfil
kDa	quilodalton
MBP	Proteïna bàsica majoritaria
pI	Punt isoelèctric
poli (A)	Àcid poliadenílic
poli (C)	Àcid policitidílic
poli (U)	Àcid poliuridílic
RI	Inhibidor proteic de ribonucleases
dsRNA	Àcid ribonucleic de doble cadena
RNasa	Ribonucleasa
RNasa A	Ribonucleasa de pàncreas boví
RNasa 1	Ribonucleasa pancreàtica humana
RSV	Virus respiratori sincitial
SBL	<i>Sialic glicoprotein binding protein</i>
cSBL	SBL provinent de <i>Rana catesbeiana</i>
jSBL	SBL provinent de <i>Rana japonica</i>
3' UMP	Uridina 3' monofosfat



## RESUM

La proteïna catiònica d'eosinòfil (ECP) és una ribonucleasa que es troba als grànuls secundaris dels eosinòfils. Els nivells d'ECP en fluids corporals s'utilitza com a indicador del número i activació dels eosinòfils. L'ECP és tòxica per diversos patògens com són bacteris, paràsits, virus i per cèl·lules de mamífer.

Per identificar immunològicament l'ECP s'ha seleccionat una regió específica de la proteïna (D112-P123) com a possible epítot antigènic. La regió D112-P123 no es troba en l'RNasa A, 1, 4 i 5 i és on s'observa una màxima desviació de l'esquelet de la cadena principal de l'ECP i la neurotoxina derivada d'eosinòfil (EDN) amb la qual comparteix un 67% d'identitat de seqüència. S'han immunitzat conills amb un pèptid sintètic (D112-P123) conjugat a una proteïna transportadora i s'han purificat els anticossos policlonals amb una columna d'afinitat amb l'ECP immobilitzada.

L'anticòs D112-P123 reconeix específicament l'ECP en condicions reductores i no reductores i no presenta reactivitat creuada amb l'EDN, l'RNasa A i altres proteïnes control. La immunodetecció per transferència Western amb l'anticòs D112-P123 ha mostrat que hi ha una relació lineal entre la quantitat de proteïna (1-75 ng) i el senyal obtingut. S'ha assajat la reactivitat de l'anticòs D112-P123 en fluids corporals i granulòcits. L'anticòs D112-P123 detecta la forma nadiua no glicosilada i les formes glicosilades de l'ECP en granulòcits, esput i plasma. S'ha obtingut una bona correlació entre els nivells d'ECP determinants amb l'anticòs D112-P123 i amb un anticòs que comercialitza Pharmacia & Upjohn (Uppsala, Suècia).

Per estudiar la relació entre l'estructura i les activitats biològiques de l'ECP s'han obtingut variants de la proteïna en residus específics de l'ECP. S'han escollit residus catiònics i aromàtics exposats en la superfície de la proteïna (W10K, W35A/R36A, R75A/F76A, R101A/R104A) i de la regió del loop D115-Y122 (R121A, R121A/Y122A, ( $\Delta$  115-122) ECP i (115-122 EDN) ECP .

S'ha estudiat l'efecte de l'ECP i les seves variants en l'activitat ribonucleasa, la disrupció de membranes, la citotoxicitat per bacteris gramnegatius i grampositius i l'inhibició del creixement de cèl·lules de mamífer. També s'ha realitzat una predicció de l'estructura tridimensional dels mutants per modelatge molecular.

Les variants de l'ECP no modifiquen substancialment ni l'estructura tridimensional de la proteïna ni l'activitat ribonucleasa.

L'activitat sobre membranes de l'ECP i les seves variants s'ha analitzat utilitzant vesícules sintètiques. L'ECP mostra una clara preferència per desestabilitzar vesícules acídiques resultat que suggereix que les càrregues positives de la proteïna són importants per la interacció amb les membranes. L'estudi de l'efecte de les mutacions en l'activitat sobre les membranes ha mostrat que aminoàcids catiónics específics i els triptòfans de la proteïna (W10, W35R36 i R101R104) estan relacionats amb la desestabilització de la membrana.

Aquests resultats correlacionen bé amb l'efecte dels mutants en la inhibició del creixement de cèl·lules de mamífer. Les regions W35R36 i W10 són essencials per la inhibició de la proliferació. Altres residus catiónics i aromàtics R75F76, R101R104, Y122 tenen un paper secundari en l'inhibició del creixement que es pot explicar per la possible interacció d'aquests residus amb els carbohidrats de la superfície de les cèl·lules de mamífer.

La regió W35R36 té un paper essencial en l'activitat bactericida per grampositius i gramnegatius. Els altres residus estudiats tenen efectes diferents en l'activitat bactericida de l'ECP depenent es tracti d' *E. coli* o *S. aureus*. Mentre els residus R101R104 i R75F76 són importants per l'activitat bactericida sobre *E. coli*, els residus W10 i la regió del bucle D115-Y122 són necessaris per l'activitat bactericida sobre *S. aureus*.

Podem concloure que les regions catióniques i hidrofòbiques estudiades participen en la capacitat de l'ECP per desestabilitzar membranes biològiques i/o en la interacció de la proteïna amb components de la paret bacteriana o amb els carbohidrats de la superfície de cèl·lules de mamífer.

## SUMMARY

Eosinophil cationic protein (ECP) is a ribonuclease located in the secondary granules of eosinophils. ECP levels in body fluids are used as an indicator of number and activation of eosinophils. ECP is toxic for many pathogens including bacteria, parasites, virus and for mammalian cells.

To identify ECP we have selected a specific loop region of the protein (D112-P123) as a putative antigenic epitope. This sequence is absent in RNase A, 1, 4 and 5 and the polypeptide main chain adopts a specific conformation in ECP and also in eosinophil-derived neurotoxin (EDN) which shares 67 % sequence homology with ECP. A synthetic peptide containing the sequence and linked to a carrier protein was used to obtain rabbit polyclonal antibodies which were further purified by an affinity column with ECP as a ligand.

D112-P123 antibody specifically recognizes ECP in reducing and nonreducing conditions and does not cross-react with EDN, RNase A or other control proteins. The immunodetection of recombinant ECP by Western blot has shown a lineal relationship between the quantity of protein (1-75 ng) and the signal obtained. The reactivity of the antibody was assayed in different body fluids and granulocytes. D112-P123 antibody detects the glycosylated and nonglycosylated forms of the native ECP in granulocytes, plasma and sputum. A good correlation has been obtained between ECP levels determined by the antibody D112-P123 and by an antibody obtained from a commercial source.

To study the relationship between the structure and biological activities of ECP we have obtained variants of the protein in specific amino acids residues. We have chosen cationic and aromatic amino acids located at the protein surface (W10K, W35A/R36A, R75A/F76A and R101A/R104A) and in the loop region D115-Y122 (R121A, R121A/Y122A, ( $\Delta$  115-122) ECP and (115-122 EDN) ECP.

For the wild type form and mutants we have determined the ribonuclease and membrane-lytic activity, the cytotoxicity for gram negative and gram positive bacteria and the mammalian cell growth inhibition. The three dimensional structure of ECP mutants has been predicted by molecular modelling.

ECP variants do not show important changes neither on the three dimensional folding nor on the ribonuclease activity of the protein.

The lytic-activity of ECP and mutants on cell membranes has been analysed using synthetic lipid vesicles. ECP shows a notable preference to destabilize acidic liposomes which suggests that the electrostatic interaction between membrane and the protein are important for protein binding. The study of the effect of the mutations in the membrane-lytic activity has shown that specific arginine residues and the two tryptophan residues of the protein (W10, W35R36 and R101R104) are related to the membrane destabilization.

This results correlate well with the effect of the mutants in the mammalian cell growth inhibition. W35R36 and W10 are essentials for the inhibition of proliferation while other cationic and aromatic residues, R75F76, R101R104 and Y122, play a secondary role which might be explained for the possible interactions of these residues with the carbohydrates on the surface of mammalian cells.

W35R36 are essentials for the bactericidal activity for gram positive and negative bacteria. Other amino acid residues have different effects depending on the bacterial strain *E. coli* or *S. aureus*. While R101R104 and R75F76 are necessary for the bactericidal activity for *E. coli* the W10 residue and the loop region D115-Y122 are necessities for the cytotoxic activity for *S. aureus*.

We can conclude from the studied ECP mutants that specific cationic and hydrophobic residues studied participate on the ability of the protein to destabilize biological membranes and/or in the interaction of the protein with components of the bacterial cell wall or the surface of mammalian cells.

## **CAPÍTOL 1**

# INTRODUCCIÓ

## 1 RIBONUCLEASES: DEFINICIÓ

Les ribonucleases (RNases) són enzims que catalitzen el trencament de l'enllaç fosfodièster dels àcids ribonucleics, tant en la degradació no específica de l'RNA com en nombroses formes de processament de l'RNA (Mishra, 1995). D'aquí s'enten l'àmplia distribució de diferents formes de RNases en tots els tipus cel·lulars (eucariotes, arqueobacteris, bacteris). L'activitat RNasa es troba majoritàriament en enzims proteics però s'han descrit processos de trencament d'RNA on intervenen ribozims.

## 2 RIBONUCLEASES: CLASSIFICACIÓ I FUNCIONS

Les ribonucleases s'han classificat seguint diferents criteris.

Depenent de la seva acció sobre l'RNA es divideixen en dos grups: **exoribonucleases**, quan catalitzen la formació de mononucleòtids a partir d'un extrem 5' o 3' lliure d'una cadena d'RNA, i **endoribonucleases**, si catalitzen l'escissió d'enllaços fosfodièster de l'interior d'una cadena d'RNA, produint oligonucleòtids.

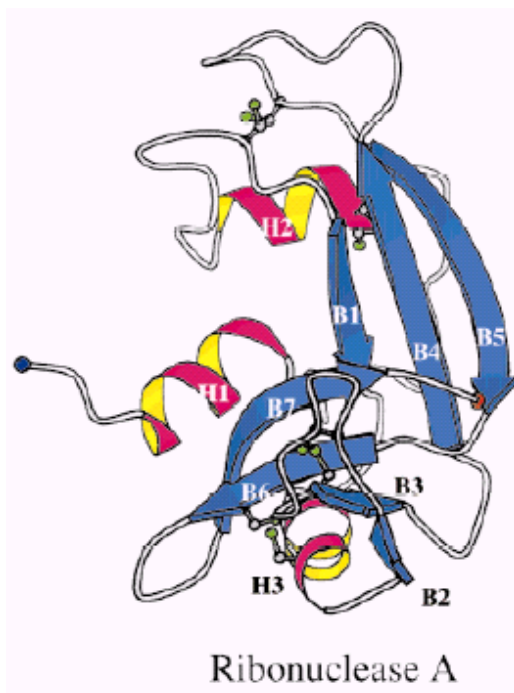
Considerant el lloc d'actuació tenim RNases **extracel·lulars**, quan són proteïnes de secreció que actuen fora de la cèl·lula on han estat sintetitzades, i RNases **intracel·lulars**, quan actuen a l'interior de les cèl·lules i estan implicades en el metabolisme de l'RNA cel·lular (maduració, modificació, recanvi i degradació de l'mRNA, tRNA i rRNA). Es caracteritzen per tenir una elevada especificitat de substrat i estructures diverses.

Aravind i Koonin (2001) han fet una classificació evolutiva de les RNases a partir de l'homologia de seqüència i d'estructura de la regió catalítica i, secundàriament, dels dominis accessoris i altres criteris, com el patró filogenètic. L'activitat RNasa ha sorgit de forma independent en diferents estructures tridimensionals. Les RNases s'han classificat segons el seu patró de plegament en RNases  $\alpha/\beta$  (successió de dominis majoritàriament compostos d'unitats  $\alpha - \beta$ ),  $\alpha + \beta$  (elements aïllats  $\alpha$  i  $\beta$ ) com per exemple les de la família de l'RNasa T i, de forma més minoritària trobem RNases amb plegament tot  $\alpha$ , com les de la superfamília de la RNase III, o tot  $\beta$  com les que

## Introducció

---

pertanyen a la superfamília de les termonucleases. Les RNases que tenen una estructura tipus ribonucleasa de pàncrees boví (RNasa A) (figura 1) formen part de la família de plegament tipus  $\alpha + \beta$  i es caracteritzen per estar estabilitzades per enllaços disulfre i tenir un centre actiu format per dues histidines i una lisina.



**Figura 1.** Estructura tridimensional de l'RNasa A. H 1, 2 i 3 són regions d'estructura hèlix- $\alpha$  i B 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 7 regions amb estructura de cadena  $\beta$ . Reproduït de Boix i col·l., 1999a.

D'aquest estudi s'han extret diverses consideracions evolutives: si bé algunes nucleases que processen RNA són uns dels enzims més antics que existeixen i ja estaven presents en la forma ancestral comuna de tots els tipus de vida (Last Universal Common Ancestor o LUCA), la majoria de nucleases es troben en pocs tipus cel·lulars, cosa que suggereix una elaboració secundària important de sistemes més específics de degradació de l'RNA. L'elevat nombre de nucleases compartides per bacteris i eucariotes indica una adquisició d'enzims bacterians per part dels eucariotes provinents dels seus bacteris endosimbionts. Les formes eucariotes de vida, especialment les pluricel·lulars, mostren una proliferació de nucleases de diferents famílies. A més, algunes d'aquestes proteïnes mostren una acumulació de dominis típics d'eucariotes, la qual cosa indicaria una adaptació evolutiva a nous requeriments

de degradació de l'RNA. Un exemple són les RNases secretores amb enllaços dissofre que presenten una distribució filogenètica molt pròxima i han evolucionat en branques terminals de l'arbre de la vida.

D'Alessio (1993) ha anomenat les RNases amb activitats biològiques que actuen com a factors externs que influeixen en les funcions cel·lulars com a RISBASEs. Estructuralment, les RISBASEs es caracteritzen per ser en la majoria dels casos proteïnes bàsiques, tenir un pèptid senyal i ponts dissofre a la molècula.

Les RISBASEs es poden subagrupar en dos grups d'homologia diferent:

- Superfamília de les RNases animals, on s'inclou l'angiogenina, que participa en la formació de vasos sanguinis, l'RNasa seminal bovina (BS-RNasa) amb activitat antitumoral, immunosupresiva i antifertil, les RNases de *Rana catesbeiana* (RCE-RNasa), *Rana japonica* (RJE-RNasa) i *Rana pipiens* (onconasa) amb activitat antitumoral i les RNases d'eosinòfil: neurotòxina derivada d'eosinòfil (EDN) i proteïna catiònica d'eosinòfils (ECP).

- Superfamília on s'inclouen RNases de plantes, bacteris i fongs. En aquest grup cal destacar:

- RNases que pertanyen a la família T2; S-RNases de *Nicotiana glauca* i altres membres de la família de les Solanàcies que són responsables del control gametofític d'autoincompatibilitat per evitar l'autopol·linització. Actuen degradant l'rRNA de les cèl·lules del pol·len i impeding el creixement del tub pol·línifer i, per tant, la fertilització (revisió a Parry i col·l., 1997). RNases S-like que es troben en plantes autocompatibles i tenen una funció de protecció de les llavors en front de patògens (revisió a Irie i Ohgi, 2001).

- S'ha descrit a *Zinnia elegans* la inducció d'RNases àcides per ferides. El resultat final de l'acció d'aquestes RNases és la mort de les cèl·lules que envolten la ferida i, en conseqüència, la protecció del teixit sa.

- Les RNases LE i Lx de *Lycopersicon esculentum* sembla que estan implicades en el metabolisme en l'estadi de senescència.

- Les RNases Tf1 i Tf2 involucrades en el creixement i desenvolupament del fruit de *Lycopersicon esculentum*.

- Les ribotoxines de fongs,  $\alpha$ -sarcina d'*Aspergillus giganteus* i restrictocin i mitogillin d'*Aspergillus restrictus* són RNases homòlogues que presenten citotoxicitat en front de cèl·lules animals. Actuen catalitzant la hidròlisi d'un únic enllaç en l'rRNA 28S que impedeix la unió dels factors d'elongació al ribosoma.



– Les bacteriocines colicin E3 d'*Escherichia coli* i Cloacin DF13 d'*Enterobacter cloacae* actuen sobre les cèl·lules diana bloquejant la síntesi proteica mitjançant un tall en un enllaç fosfodiéster específic en el 16S rRNA.

La relació entre l'activitat RNasa i biològica de les RISBASEs no és evident. Mentre que en la majoria de RISBASEs (angiogenina, ribotoxines de fong, BS-RNasa, onconasa, les lectines RCE-RNasa i RJE-RNasa i EDN) l'activitat RNasa és necessària per a la funció biològica, el tractament per calor, que suprimeix el 98% de l'activitat RNasa, no afecta l'habilitat de les S-RNases per inhibir el creixement del tub de pol·linífer. Un altre cas compromès és l'ECP, que es discutirà extensament en posteriors apartats d'aquesta introducció.

Encara no és possible proposar una hipòtesi unificadora de les bases moleculars d'actuació de les RISBASEs. Però, generalitzant-ho, es poden apuntar algunes de les condicions necessàries perquè una RNasa tingui una funció fisiològica diferent del metabolisme de l'RNA. En primer lloc, hi ha d'haver una ruta d'entrada a la cèl·lula, ja sigui mitjançant endocitosi mediada per receptor o travessant la membrana cel·lular i, en la majoria dels casos, una activitat RNasa funcional. Una vegada l'RNasa ha entrat a la cèl·lula hi ha dos factors que poden limitar l'acció d'aquestes proteïnes.

- Les cèl·lules animals contenen en el citosol l'inhibidor proteic d'RNases (RI) que s'uneix fortament i inhibeix l'activitat enzimàtica de les RNases ( $K_i = 5,9 \cdot 10^{-14}$  M Vicentini i col·l., 1990). L'RI és una proteïna composta en la seva totalitat per repeticions riques en leucines, l'eficiència de la interacció de l'RI amb l'RNasa es basa en l'estructura no globular de l'inhibidor, format per fulles  $\beta$  exposades al solvent i la flexibilitat conformacional de l'estructura (Kobe i Deisenhofer, 1995).

- Els residus 7-11 de l'RNasa A constitueixen la seqüència de reconeixement d'una proteïna de la família *heat shock protein* hsp 70 que dirigeix la RNasa A al lisosoma. Per tant, el destí final de la RNasa A quan es microinjecta en cultius cel·lulars és la degradació als lisosomes (Chiang i col·l., 1989).

Sierakowska i Shugar (1977) van classificar les RNases humanes juntament amb altres RNases de mamífers depenent de l'òrgan on havien estat primerament purificades, en secretores (si presentaven característiques similars a les purificades a partir del pàncrees (RNasa A) o no secretores (si eren similars a les purificades a partir de fetge). Sorrentino i Libonati (1994) van caracteritzar en l'àmbit cinètic aquests dos tipus de RNases.

**Tipus secretor o pancreàtic:** es troben en òrgans secretors com el pàncrees, la pròstata i en fluids corporals com ara la llet, la saliva i el fluid seminal. Hidrolitzen l'intermediari 2',3'-fosfat cíclic (vegeu l'apartat 3.1.1). Són més actives en la degradació dels poliribonucleòtids de cadena simple que les no pancreàtiques i mostren la següent preferència de substrat: àcid policitidílic (poli (C)) > RNA > àcid poliuridílic (poli (U)). Tenen una activitat òptima pròxima a *pH* 8 i són inhibides per  $Zn^{2+}$  i  $Cu^{2+}$ . Les RNases pancreàtiques humanes són més actives que la RNasa A bovina en la degradació de l'àcid poliadenílic (poli (A)) i poliribonucleòtids de cadena doble.

**Tipus no secretor o no pancreàtic:** es troben a la melsa, fetge, ronyó, placenta, estómac, pulmons, leucòcits i en fluids com el sèrum i l'orina. Presenten la següent preferència de substrat RNA > poli (U) > poli (C). Tenen una activitat òptima a *pH* 7, són poc inhibides per  $Zn^{2+}$  i  $Cu^{2+}$ . Degraden els dinucleòtids molt lentament i no se'ls hi ha trobat activitat d'hidròlisi de U > p i C > p ni sobre l'RNA de doble cadena.

### 3 LA SUPERFAMÍLIA DE LES RIBONUCLEASES PIRIMIDINA ESPECÍFIQUES (superfamília de l'RNasa A)

La superfamília de les ribonucleases pirimidina específiques està formada per proteïnes amb estructures primàries amb diferent grau d'homologia. Tots els membres d'aquesta família han estat identificats i aïllats de vertebrats (mamífers, aus, rèptils i amfibis). L'estructura tridimensional està estabilitzada, en la major part dels casos, per quatre ponts disulfurats i està composta per cadenes antiparal·leles de fulla plegada  $\beta$  flanquejades per hèlix- $\alpha$ .

Les RNases que pertanyen a aquesta superfamília van ser en un principi catalogades com enzims digestius però actualment es coneix que algunes d'elles participen en diferents funcions biològiques. Els experiments de Ledoux (1955) van demostrar, per primer cop, la toxicitat d'aquestes proteïnes sobre cèl·lules tumorals.

#### 3.1 RNasa A

La ribonucleasa pancreàtica bovina (RNasa A, EC 3.1.27.5) és una proteïna secretada en grans quantitats pel pàncrees. En els anys 1960 – 1970 va ser intensament estudiada gràcies a la seva abundància en l'òrgan d'origen, la seva relativa fàcil purificació i petita massa molecular, i es va convertir en una proteïna

model per estudis d'estructura de proteïnes, reaccions d'enllaços dissofre, plegament i mecanisme de catàlisi enzimàtica.

### 3.1.1 Mecanisme de catàlisi de l'RNasa A

L'estudi exhaustiu de l'RNasa A ha permès conèixer el mecanisme de catàlisi general de les RNases pirimidina específiques.

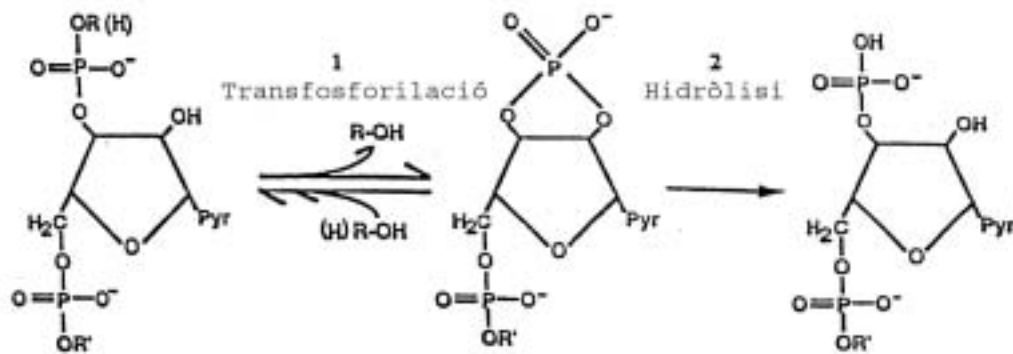
La RNasa A catalitza la hidròlisi dels enllaços 3',5'- fosfodièster de les cadenes senzilles d'RNA mitjançant un procés en dues etapes (Richards i Wyckoff, 1971; Eftink i Biltonen, 1987) (figura 2.A.). La primera reacció és una transfosforilació des de la posició 5' d'un nucleòtid a la posició 2' del nucleòtid adjacent, formant-se un extrem 2',3'-fosfat cíclic i un extrem 5'-OH lliure. En la segona reacció es produeix la hidròlisi del fosfodièster cíclic, formant-se un grup 3' fosfat terminal. La base en la posició 3' de l'enllaç que s'hidrolitza ha de ser una pirimidina (citosina o uracil) mentre que la base en la posició 5' pot ser tant una pirimidina com una purina tot i que l'enzim mostra una certa preferència per purines. La reacció de transfosforilació es produeix a una velocitat molt superior a la d'hidròlisi.

El mecanisme de catàlisi de l'RNasa A més acceptat ha estat el proposat per Findlay, i col·l., (1961) modificat per Roberts i col·l., (1969) i refinat per Usher i col·l., (1970) (figura 2.B.). En la catàlisi intervenen principalment els dos anells imidazole de dos residus d'histidina (Eftink i Biltonen, 1983; Eftink i Biltonen, 1987; Herschlag, 1994). En la reacció de transfosforilació, la His-12 actua de base, desprotonant el grup O2' i la His-119 d'àcid, protonant el grup O5'R que s'allibera i debilitant l'enllaç P-O5'; així facilitant l'atac "in line" de l'O2' sobre el fòsfor. En la reacció d'hidròlisi, la His-119 capta un protó d'una molècula d'aigua i facilita la hidròlisi de l'enllaç 2', 3'-fosfat cíclic, mentre la His-12 protona el grup O2'. Durant el procés es forma un complex intermediari, on el fosfat adopta una configuració de bipiràmide trigonal estabilitzada principalment per la Lys-41 (Borkakoti, 1983; Wlodawer, i col·l., 1983).

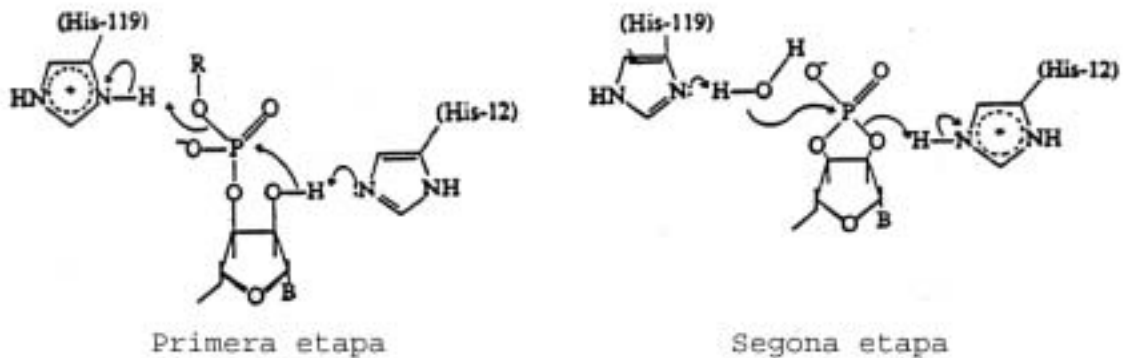
Cuchillo i col·l., (1993) van indicar que les dues reaccions en el mecanisme de catàlisi (transfosforilació i hidròlisi) no constitueixen un procés seqüencial, amb la formació d'un intermediari associat a l'enzim, sinó que són dos processos catalítics separats i l'intermediari és un producte final de la primera reacció i no transitori. La hidròlisi dels enllaços 2',3'-fosfodièster s'hauria de considerar com un procés equivalent a la reacció inversa de la transfosforilació dels enllaços 3',5'-fosfodièster i,

per tant, seria més acurat catalogar l'enzim com una transferasa i no com una hidrolasa.

A.



B.



**Figura 2.** Mecanisme de catàlisi de l'RNasa A. A) Esquema de les dues etapes de degradació de l'RNA (reproduït de Cuchillo i col·l., (1993)). B) Esquema dels desplaçaments electrònics originats durant la catàlisi àcid – base segons el mecanisme catalític acceptat actualment. Reproduït de Fersht (1985).

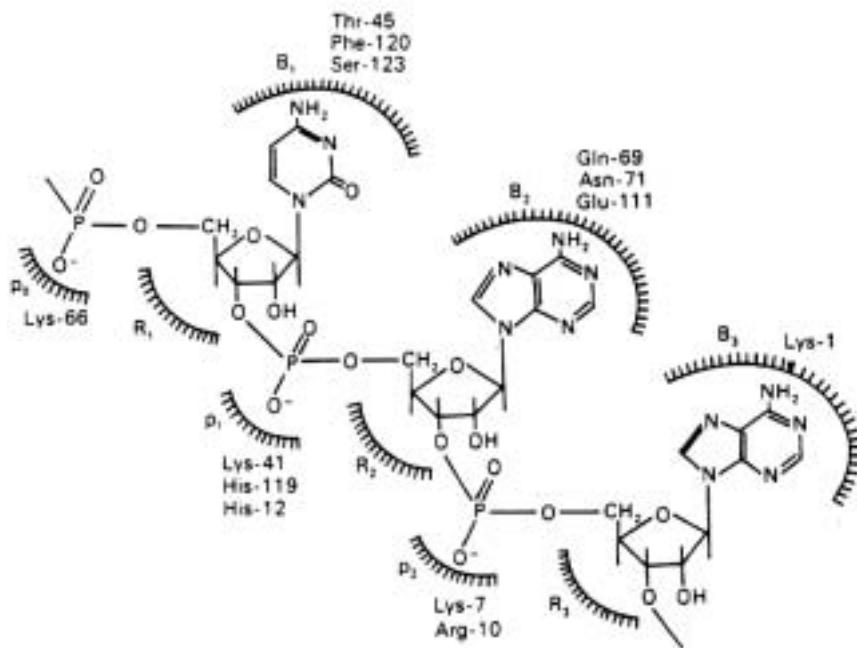
### 3.1.2 Interacció RNasa A–RNA

L'RNasa A s'uneix a l'RNA no només pel centre actiu sinó també per altres subtesis d'interacció amb els fosfats ( $p_0...p_n$ ), bases ( $B_0...B_n$ ) i riboses ( $R_0...R_n$ ) i del substrat (Richards i Wyckoff 1971) que contribueixen a la disposició correcta dels substrat polimèric (figura 3).  $p_1$  és el centre catalític que interacciona amb el grup fosfat de l'enllaç fosfodiéster que s'escindeix,  $B_1$  és el seti principal específic per pirimidines i

## Introducció

---

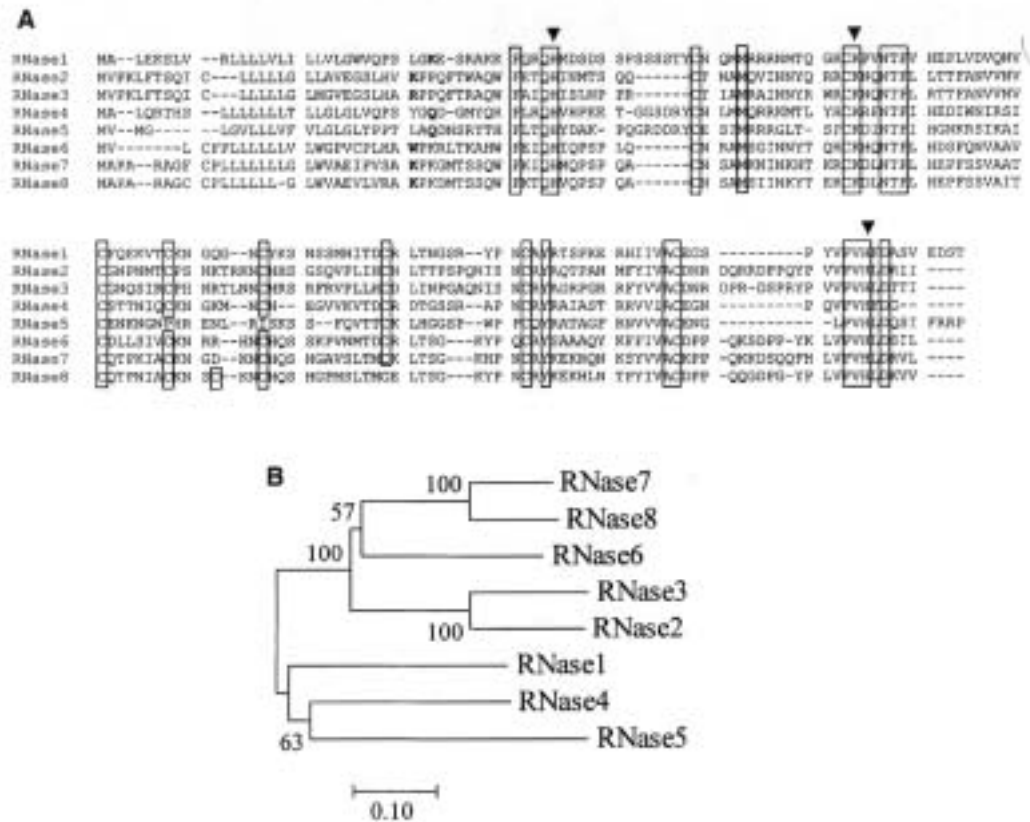
B<sub>2</sub> seria el subseti d'interacció amb la base que ocupa la posició 5' de l'enllaç que s'escindeix.



**Figura 3:** Representació esquemàtica de la interacció d'un fragment d'RNA amb l'RNasa A. B, R i p indiquen els subconjunts d'interacció de bases, riboses i fosfats, respectivament. S'hi indiquen els residus que podrien intervenir en cada subconjunt. Reproduït de Parés i col·l., (1991).

### 3.2 Ribonucleases humanes

En humans s'ha identificat vuit membres de la família de l'RNasa A amb diversos patrons d'expressió, diferents activitats catalítiques en substrats específics d'RNA i funcions biològiques diferents.



**Figura 4.** A. Alineament de la seqüència d'aminoàcids de la proteïna i pèptid senyal de les proteïnes humanes de la superfamília de l'RNasa A. Els aminoàcids conservats estan enquadrats i els residus implicats amb la catàlisi s'indiquen amb un triangle. B. Arbre filogenètic de les vuit RNases humanes. Reproduït de Zhang i col·l., (2002).

### 3.2.1 RNasa 1

La RNasa pancreàtica humana (RNasa 1) es considera l'RNasa homòloga a l'RNasa A amb la qual comparteix un 70% d'homologia de seqüència, sent la majoria de substitucions d'aminoàcids conservatives (Beintema i col·l., 1984). S'han aïllat productes del gen que codifica per a l'RNasa 1 en pàncrees (Weickmann i col·l., 1981), orina (Iwama i col·l., 1981), plasma seminal (De Prisco i col·l., 1984), cervell (Yasuda i col·l., 1993) i ronyons (Mizuta i col·l., 1990). Les cèl·lules endotelials secreten grans quantitats d'RNasa 1, cosa que suggereix que aquesta RNasa pot tenir una funció en l'homeòstasi vascular (Landré i col·l., 2002). La proteïna mostra diferents patrons de glicosilació a les tres seqüències Asn-Xaa-Thr/Ser (Asn-34, Asn-76, Asn-88)) dependent del teixit d'origen (Ribó i col·l., 1994). Tant l'RNasa A com l'RNasa 1 tenen una major activitat per al substrat poli (C) que per al substrat poli (U) i una activitat òptima a pH 8.

No obstant, l'RNasa 1 presenta una major activitat en front de dsRNA i en la desestabilització del DNA que l'RNasa A. No s'ha identificat clarament cap activitat biològica de l'RNasa 1 fora de la digestió de l'RNA, d'aquí que la funció fisiològica d'aquest enzim encara no estigui clarament definida.

Algunes de les proteïnes no humanes de la família de les RNases pancreàtiques tenen funcions biològiques que han obert nous estudis sobre el seu ús com agents terapèutics: no obstant això presenten el problema de l'elevada antigenicitat. En aquest context, les RNases humanes, especialment l'RNasa 1, són la base del disseny de nous agents antitumorals. Així, s'han dedicat esforços a desenvolupar modificacions de les RNases humanes amb els determinants estructurals necessaris per tenir activitat citotòxica. Alguns exemples representatius de les diferents aproximacions són els treballs de Zewe i col·l., (1997) i Suzuki i col·l., (1999) on es demostra que la fusió de l'RNasa 1 amb anticossos contra receptors de membrana incrementa la seva entrada a la cèl·lula diana. Piccoli i col·l., (1999), basant-se en el fet que l'estructura en dímer és essencial per a l'activitat antitumoral de la ribonucleasa seminal bovina, han construït un dímer de l'RNasa 1 que mostra una toxicitat específica per línies cel·lulars malignes. Gaur i col·l., (2001) han creat variants de l'RNasa 1 insensibles a l'inhibidor d'RNases que mostren una major toxicitat que la RNasa 1 enfront de diverses línies cel·lulars.

### 3.2.2 RNasa 2 (neurotoxina derivada d'eosinòfil)

L'RNasa 2 o neurotoxina derivada d'eosinòfil (EDN) es troba a la melsa (Yasuda i col·l., 1990), fetge (Sorrentino i col·l., 1988), placenta (Shapiro i col·l., 1991) i eosinòfils (Gleich i col·l., 1986) orina (Iwama i col·l., 1981) i ronyons (Mizuta i col·l., 1990). La seqüència de l'EDN presenta 5 posicions d'N-glicosilació a més de la unió d'un residu aldohexopiranosil al Trp 7 de la proteïna mitjançant una C-glicosilació a la posició 2 de l'anell indol (Hofsteenge i col·l., 1994).

L'activitat RNasa i propietats biològiques de l'RNasa 2 s'explicaran en relació amb les activitats de l'RNasa 3 a l'apartat 4 de la introducció.

### 3.2.3 RNasa 3 (proteïna catiónica d'eosinòfil)

La RNasa 3, o proteïna catiónica d'eosinòfil (ECP), és una proteïna efectora secretada pels eosinòfils humans i s'explicarà detalladament a l'apartat 4 d'aquesta introducció.

### 3.2.4 RNasa 4

La RNasa 4 es va aïllar per primer cop del medi d'una línia tumoral d'adenocarcinoma humà (Shapiro i col·l., 1986a) i, posteriorment, de plasma humà (Zhou i col·l., 1993). S'ha detectat l'RNA missatger que codifica per a l'RNasa 4 en un gran nombre de teixits com el pàncrees, fetge, pulmons, múscul esquelètic, cor, ronyons i placenta (Rosenberg i Dyer 1995a). L'anàlisi de la seva seqüència mostra l'absència de llocs d'N-glicosilació. Tampoc no presenta altres modificacions posttranscripcionals exceptuant-ne de l'àcid pirolutàmic a l'extrem amino terminal. El grau de similitud de seqüència interespecífica (90% entre l'RNasa 4 humana la de boví i porc) (Zhou i col·l., 1993) és molt més elevada que per altres RNases pirimidina específiques, fet que suggereix que aquesta RNasa pot tenir una funció fisiològica important a part del catabolisme general de l'RNA. L'enzim presenta una marcada especificitat per uridines en el lloc de tall 3' (Shapiro i col·l., 1986a).

### 3.2.5 RNasa 5 (angiogenina)

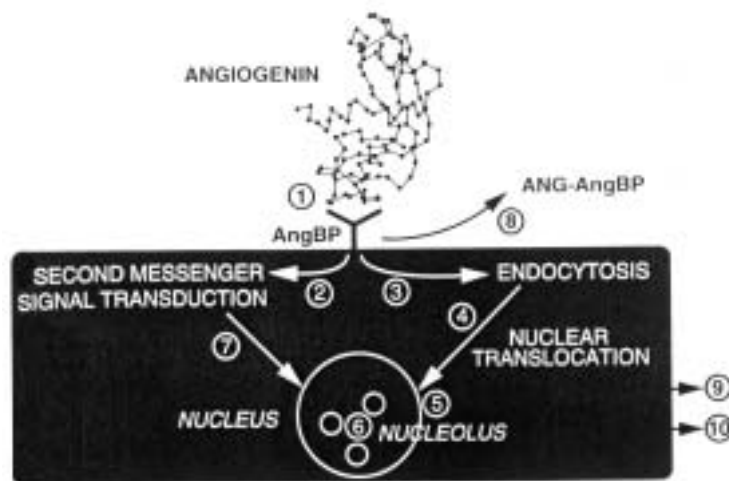
La RNasa 5 o angiogenina es va purificar per primera vegada del medi d'una línia tumoral d'adenocarcinoma humà a partir de la seva capacitat per formar vasos sanguinis (Strydom i col·l., 1985). Aviat, però, es va descobrir que també es trobava en plasma humà d'individus sans (Shapiro i col·l., 1987) i s'expressava en diferent tipus de cèl·lules humanes (Moenner i col·l., 1994) i en altres espècies (conill, porc, vaca, ratolí) (Bond i col·l., 1993). Tot i la similitud estructural de l'angiogenina amb les proteïnes de la superfamília de l'RNasa A (comparteix un 33% d'identitat de seqüència amb l'RNasa A, incloent-hi les corresponents dues histidines i lisina que formen la triada catalítica (Strydom i col·l., 1985)) la seva activitat catalítica enfront RNAs com a substrats és extremament baixa (Shapiro i col·l., 1986b).

La baixa activitat RNasa s'ha atribuït a canvis estructurals com són l'absència en l'angiogenina del pont dissofre que en la RNasa A formen els residus 65-72 (Harper i col·l., 1989). Aquesta regió constitueix en l'RNasa A part del lloc d'unió al substrat B<sub>2</sub>, mentre que en l'angiogenina sembla que té un paper d'unió a un receptor de la superfície cel·lular. El lloc d'unió a pirimidines B<sub>1</sub>, que en l'RNasa A forma una butxaca oberta, també està modificat en l'angiogenina en ser obstruït per la cadena lateral de la Gln 117. L'activitat enzimàtica de l'angiogenina, tot i ser molt baixa, és necessària per la seva activitat angiogènica (Shapiro i Vallee 1989). S'ha proposat que una de les



## Introducció

funcions biològiques de l'angiogenina del plasma podria ser promoure la cicatrització en facilitar el creixement dels vasos sanguinis i, per tant, la reparació del teixit (Hu i col.l., 1997). El mecanisme molecular encara presenta moltes incògnites però s'ha proposat que l'angiogenina s'uneix a un receptor de la superfície de la cèl·lula endotelial, encara no identificat, i entra a la cèl·lula mitjançant endocitosis mitjançada per receptor, seguidament, es trafega al nucli i s'acumula al nucleol (Moroianu i Riordan, 1994). Aquest procés ha suggerit que l'acció de l'angiogenina pot estar relacionada amb la biosíntesi del ribosoma ja sigui per una activació de la transcripció o un processament de l'rRNA o de tots. Estudis on han neutralitzat l'angiogenina mitjançant un anticòs monoclonal específic (Olson i col.l., 1994) o utilitzant actina (proteïna d'unió a l'angiogenina) (Olson i col.l., 1995) han confirmat la importància de l'angiogenina en el creixement i el manteniment de tumors primaris i en metàstasi.



**Figura 5.** Esquema hipotètic del mecanisme d'acció de l'angiogenina. (1) L'angiogenina s'uneix a un receptor cel·lular (AngBP) i (2) s'activen les fosfolipases C i  $A_2$  entre d'altres. A més (3) l'angiogenina pot entrar a la cèl·lula per endocitosis, (4) trafegar al nucli i (5) localitzar-se al nucleol on (7) en conjunt amb els senyals iniciats pels segons missatgers potencia la proliferació de les cèl·lules endotelials. (8) Algunes de les formes de l'angiogenina formen un complex extracel·lular amb la proteïna d'unió a l'angiogenina (AngBP), que intervé amb l'activació de les cascades proteolítiques. (9) L'angiogenina extracel·lular també serveix de substrat que promou l'adhesió i migració cel·lular. (10) El resultat final de tot el procés és l'angiogènesi. Reproduït de Riordan (1997).

### 3.2.6 RNasa 6

Rosenberg i Dyer (1996) van clonar i caracteritzar l'RNasa 6 humana. Van amplificar un marc obert de lectura en el cromosoma 14 del genoma humà que

codificava per a un polipètid de 150 aminoàcids, amb vuit cisteïnes i les histidines i lisines característiques del centre actiu de l'RNasa A. Van detectar el transcrit primari del gen de l'RNasa 6 en tots els teixits examinats sent majoritari en el pulmó. En l'àmbit cel·lular es va detectar l'mRNA en neutròfils i monòcits però no en eosinòfils.

L' RNasa 6 presenta la major homologia de seqüència amb l'EDN (47%) però una activitat catalítica aproximadament 40 vegades inferior a aquesta. Deming i col·l., (1998) a fi d'entendre l'evolució gènica de l'RNasa 6 van aïllar i caracteritzar gens ortòlegs de l'RNasa 6 en primats (grans simis, simis del vell món i simis del nou món) i van concloure que el llinatge de l'RNasa 6 s'ha conservat relativament estable al llarg de l'evolució. Aquest resultat contrasta amb l'elevada velocitat d'incorporació de substitucions no sinònims pels ortòlegs primats de les dues RNases d'eosinòfil humanes (ECP i EDN).

### 3.2.7 RNasa 7

Recentment s'ha descobert i s'ha caracteritzat l'RNasa 7 per dos grups independents.

Harder i Schröder (2002) estaven interessats a estudiar la producció de proteïnes antimicrobianes en la pell humana sana a fi d'entendre la gran resistència de la pell a les infeccions. Analitzant l'estrat corni de la pell sana van aïllar una proteïna de 14.500 Da, que era la principal responsable de l'activitat antimicrobiana de l'estrat. El cDNA aïllat de queratinòcits codifica per a un precursor de 156 aminoàcids i una proteïna madura de 128. La seva seqüència va demostrar que la proteïna pertany a la superfamília de l'RNasa A, i la van anomenar RNasa 7. L'eficiència catalítica de l'RNasa 7 és aproximadament 50 cops més elevada que la de l'ECP utilitzant tRNA com a substrat. L'RNasa 7 mostra un ampli espectre d'activitat antimicrobiana vers diversos patògens potencials com bacteris grampositius i gramnegatius i llevats, però no s'ha detectat citotoxicitat enfront de queratinòcits. Analitzant l'mRNA de diferents teixits mitjançant *real time* RT-PCR s'ha detectat expressió del gen en la majoria de teixits epitel·lials (pell, tracte respiratori i genitourinal i, en menor grau, en estómac, intestí prim i còlon). L'expressió del gen de l'RNasa 7 en queratinòcits primaris s'indueix per citocines proinflamatòries i estímuls infecciosos.

Zhang i col·l. (2002) van identificar els gens de les RNases 7 i 8 mitjançant una cerca informàtica a la seqüència del genoma humà. Zhang i col·l. (2003) van

caracteritzar l'RNasa 7 i van trobar resultats similars als de Harder and Schröder. Del treball de Zhang es pot destacar l'anàlisi del patró d'expressió de l'RNasa 7 en dotze teixits. El màxim senyal el van trobar en fetge, seguit del cor i múscul esquelètic, però no han detectat senyal en cervell, còlon, tim, intestí prim, pulmons, leucòcits i placenta.

A diferència de l'ECP (l'altra ribonucleasa bactericida humana) l'RNasa 7 no presenta activitat antivírica vers el virus respiratori sincític.

### 3.2.8 RNasa 8

Zhang i col·l. (2002) van identificar un marc obert de lectura de 462 nucleòtids que codifica per a l'RNasa 8 en el cromosoma 14 de l'esbós del genoma humà, junt amb els altres set gens de la superfamília de l'RNasa A. Només s'ha trobat expressió del gen de l'RNasa 8 en placenta. L'enzim presenta una activitat catalítica molt baixa si es compara amb altres membres de la família. Els estudis filogenètics suggereixen que l'RNasa 7 i l'RNasa 8 són molt properes i, probablement, han sorgit d'una duplicació gènica recent en primats i posterior incorporació de mutacions no silencioses, a una elevada velocitat. Els gens ortòlegs de l'RNasa 8 en altres espècies de primats s'han desactivat per deleccions que modifiquen el marc de lectura o mutacions puntuals en residus clau per a la catàlisi o l'estructura de la proteïna.

Fins al moment no s'ha trobat cap funció fisiològica per a l'RNasa 8.

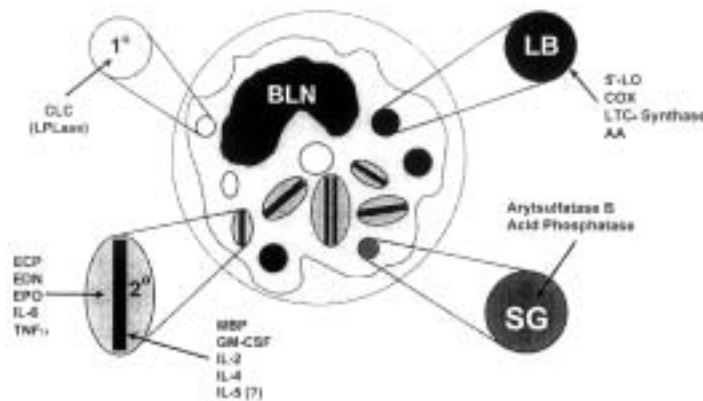
## 4 RIBONUCLEASES D'EOSINÒFIL

L'any 1963, Archer i Hirsch van demostrar l'associació entre l'activitat RNasa i una fracció específica dels grànuls dels eosinòfils. Gleich i col·l., (1986) van purificar per primer cop l'ECP i l'EDN dels eosinòfils i van veure la similitud de la regió amino terminal d'aquestes proteïnes amb la de l'RNasa A.

### 4.1 Eosinòfils

El eosinòfils són leucòcits diferenciats que es distingeixen per la seva afinitat a l'eosina i per presentar un nucli bilobulat amb cromatina parcialment condensada. L'eosinopoesi es dona quasi bé exclusivament a la medulla espinal, tot i que el tim, els nòduls limfàtics i la melsa poden actuar com a lloc auxiliar de producció d'eosinòfils. Un cop a la circulació, els eosinòfils tenen una vida mitjana de 18 hores en

sang, que pot ser perllongada en situacions d'eosinofília. Els eosinòfils, però, són majoritàriament cèl·lules de teixit on poden residir de 2 a 5 dies, els principals llocs d'acumulació són el tracte gastrointestinal, els pulmons i la pell. Un tret estructural característic d'aquestes cèl·lules sanguínies és la presència de grànuls de forma esfèrica i ovoide que ocupen aproximadament una cinquena part del citoplasma i contenen proteïnes responsables de gran part de les funcions de la cèl·lula. S'han reconegut tres poblacions diferents de grànuls (grànuls petits, grànuls secundaris o específics, i grànuls primaris), a més dels cossos lipídics.



**Figura 6.** Representació de les estructures dels eosinòfils humans. BLN *bi-lobed nucleus*, LB *lipid bodies*, SG *small granules*, 1º grànuls primaris, 2º grànuls secundaris. Reproduït de Giembycz i Lindsay (1999).

Els grànuls primaris són esfèrics, de mida variable i apareixen en els primers estadis en la maduració dels eosinòfils. Es caracteritzen per contenir la proteïna Charcot-Leyden, que pot formar cristalls d'estructura hexagonal (Dvorak i col·l., 1988).

Els grànuls secundaris comprenen més del 95% dels grànuls de la cèl·lula i apareixen en l'estadi mielocític de maduració dels eosinòfils (Giembycz i Lindsay 1999). Contenen proteïnes altament catióniques: la proteïna bàsica majoritària (MBP) que forma una inclusió cristal·loide, l'ECP, l'EDN i la peroxidasa d'eosinòfil (EPO) juntament amb un gran nombre de citocines a la matriu no cristal·loide. S'ha trobat diferències en la morfologia d'aquests grànuls en diferents espècies (McEwen, 1992).

S'ha identificat una població de grànuls petits en eosinòfils (Parmley i Spicer, 1974) que tenyeixen positivament per arilsulfatasa B, fosfatasa àcida i també podrien contenir catalasa (revisió a Giembycz i Lindsay., 1999) així com ECP (revisió a Venge i col·l., 1999).

Els cossos lipídics són estructures esfèriques (0,5 – 2 µm de diàmetre) on s'emmagatzema l'àcid araquidònic que s'esterifica a glicerofosfolípids (Weller i Dvorak, 1985).

La diferenciació, activació i les funcions efectores dels eosinòfils estan sota control de diferents citocines i factors de creixement. S'han identificat diversos estímuls que promouen la degranulació dels eosinòfils, entre els quals trobem partícules opsonitzades, òxid de deuteri, immunoglobulines, paràsits metazous, mitjancers proinflamatoris, citocines i el complement.

El resultat final de l'activació dels eosinòfils és l'alliberació de les proteïnes dels grànuls; s'ha distingit tres formes diferents de degranulació dels eosinòfils: exocitosi, secreció específica de proteïnes i citòlisi. Majoritàriament, s'ha identificat els eosinòfils activats circulants en pacients amb hipereosinofília, a partir de la seva baixa densitat en la separació per gradient de densitat (Peters i col·l., 1988). La baixa densitat d'aquests eosinòfils s'explica pel seu estat activat que es tradueix en l'alliberament del contingut dels grànuls i, per tant, en una menor quantitat de proteïnes (Peters i col·l., 1988). A més, els eosinòfils hipodensos tenen una major activitat funcional i, per tant, una capacitat superior de produir dany tissular, si es compara amb els seus homòlegs de densitat normal (Owen i col·l., 1987).

Els eosinòfils són unes de les cèl·lules més poc conegudes de la biologia dels mamífers i la seva funció és encara avui molt equívoca. S'ha demostrat que juguen un paper dual ja que estan involucrats en la resposta innata i en la patogènia d'algunes malalties. Les proteïnes bàsiques dels eosinòfils participen en aquesta dualitat: quan les seves propietats tòxiques estan dirigides a dianes no pròpies (paràsits, cèl·lules tumorals o bacteris) els eosinòfils actuen en la resposta immunològica protectora. Però, quan les propietats citotòxiques estan dirigides a cèl·lules o teixits del propi organisme (cèl·lules dels epitelis, nervioses, cardíques, etc.) els eosinòfils hi juguen un paper perjudicial. L'eosinofília en sang perifèrica o en teixit s'ha associat amb malalties del sistema respiratori (asma, rinitis al·lèrgica, pneumònia eosinofílica, síndrome de Loeffler i aspergil·losi), gastrointestinal (gastroenteritis eosinofílica), pell (dermatitis atòpica i urticària), virals (virus de la immunodeficiència humana i virus respiratori sincític), malalties mieloproliferatives, reaccions a drogues i toxines (revisió a Rosenberg i Domachowske, 1999). D'altra banda, Butterworth i col·l., (1984) indicaven que els eosinòfils tenen un paper crucial en la defensa davant de paràsits helmints. Posteriorment, nombrosos autors han confirmat o qüestionat les seves

conclusions. També s'han relacionat els eosinòfils amb la cicatrització (Wong i col·l., 1990 i Todd i col·l., 1991) i presentació d'antigen (Lucey i col·l., 1989 i Mawhorter i col·l., 1994). Rosenberg i Domachowske (2001) proposen que els eosinòfils podrien jugar un paper important en la immunitat enfront de virus respiratoris patògens.

### **Secreció de l'ECP**

Tant en estudis *in vivo* com en models *in vitro* s'ha observat que la unió dels eosinòfils mitjançant el complement o immunoglobulines (Ig G, Ig E, Ig A) a una superfície produeix un fort senyal de degranulació i alliberació del contingut dels grànuls (Venge i col·l., 1998 i Abu-Ghazaleh i col·l., 1989). Aquesta resposta de degranulació s'incrementa quan els eosinòfils han estat prèviament activats per citocines (interleucina 3 (IL-3), interleucina 5 (IL-5) i factor estimulador de colònies de granulòcits macròfags (GM-CSG)) (Fujisawa i col·l., 1990). S'ha observat un alliberament diferencial de les proteïnes dels grànuls en resposta a diferents estímuls, mentre que la Ig G produeix l'alliberament d'ECP, la Ig E produeix l'alliberament d'ECP i MBP. Una degranulació selectiva explicaria per què, per exemple, en infeccions bacterianes agudes s'observa un augment de l'ECP en sèrum però no d'EPO (Karawajczyk, 1995).

Els mastòcits són cèl·lules efectores amb una acció essencial en reaccions d'hipersensibilitat immediata mitjançades per IgE. S'ha suggerit que la correlació de mastòcits i eosinòfils és la responsable de patologies de tipus al·lèrgic. Els mastòcits produeixen citocines amb activitat quimiotàctica i de degranulació dels eosinòfils. Alguns dels seus mitjancers (leucotriè (LT)<sub>4</sub> i factor activador de plaquetes (PAF)) provoquen l'alliberació de l'ECP dels eosinòfils (Takafuji i col·l., 1998).

També s'ha comprovat que els eosinòfils prèviament activats amb el fragment C5a del complement o amb el factor activador de plaquetes (PAF) augmenten la secreció d'ECP en resposta a la unió a una superfície (partícules opsonitzades "*nonphagocytosable Sephadex bead*") (Egesten i Malm, 1998).

### **4.2 Producció d'ECP per les cèl·lules sanguínies**

Els eosinòfils són sense dubte la font principal d'ECP. En individus sans trobem valors de 3,5 – 5 µg ECP/ 10<sup>6</sup> cèl·lules (Abu-Ghazaleh i col·l., 1992 i Sur i col·l., 1998).

Això no obstant, s'han trobat petites quantitats d'ECP en altres cèl·lules sanguínies com neutròfils, basòfils i monòcits.

S'ha detectat mRNA que codifica per l'ECP i petites quantitats de proteïna en monòcits ( $0,01 \mu\text{g ECP} / 10^6$  cèl·lules) i en línies cel·lulars mieloides en diferents estadis de diferenciació a monòcits. En canvi, els macròfags o línies cel·lulars diferenciades a macròfags no contenen ni mRNA codificador d'ECP ni la proteïna (Byström i col·l., 2001). Per tant, sembla que els monòcits produeixen ECP però en la diferenciació a macròfags perden aquesta propietat.

Llisats de neutròfils i basòfils altament purificats contenen petites concentracions d'ECP,  $0,05 \mu\text{g} / 10^6$  cèl·lules i  $0,08 \mu\text{g} / 10^6$  cèl·lules, respectivament (Abu-Ghazaleh i col·l., 1992).

Els resultats de Byström i col·l., (2002) apunten que l'ECP que es troba als neutròfils no ha estat sintetitzada per les mateixes cèl·lules sinó que ha estat internalitzada des de l'exterior i s'ha emmagatzemat als grànuls primaris.

### **4.3 Característiques genètiques de les ribonucleases d'eosinòfil: ECP i EDN**

Els gens que codifiquen per a l'ECP i l'EDN comparteixen un 90% d'homologia de seqüència, es troben a la regió q24-q31 del cromosoma 14 (Hamann i col·l., 1990a) i cada un està compost per un exó no codificant i un exó codificant separats per un intró (Hamann i col·l., 1990a). Aquesta estructura del gen és característica de la família gènica de les RNases (Kurachi i col·l., 1985, Carsana i col·l., 1988, i Hamann, i col·l., 1990a). L'expressió òptima de l'ECP i l'EDN depèn de la interacció entre la regió del promotor 5' i un element activador de l'intró. Aquest element activador és la seqüència consens d'unió al factor de transcripció NFAT-1 de la transcripció i es localitza dins dels 60 primers parells de bases de l'intró (Tiffany i col·l., 1996, Handen i col·l., 1997).

Aquests gens són el resultat d'una duplicació d'un gen ancestral que codificava per una RNasa similar a l'EDN en els simis del nou món. Aquesta duplicació del gen es va produir fa 30 milions d'anys, després de la divergència dels simis del vell món i del nou món, però, abans de la separació dels homínids i els simis del vell món (Hamann i col·l., 1990a i Rosenberg i Dyer 1995b). El resultat és que els simis de vell món i els homínids tenen les dues proteïnes, ECP i EDN, mentre que els simis del nou món (titís) només tenen una proteïna que s'aproxima més a l'EDN. El clonatge i expressió

en bacteris de la proteïna dels monos del nou món va revelar que no presentava ni l'activitat citotòxica específica de l'ECP ni l'activitat RNasa de l'EDN, la qual cosa suggereix que aquestes dues funcions van evolucionar després de la duplicació sota una pressió Darwiniana positiva. Els gens de l'EDN i l'ECP han evolucionat (incorporat mutacions no silencioses) a una velocitat molt més elevada que la resta de seqüències de proteïnes estudiades en primats (Rosenberg i col·l., 1995).

#### 4.4 Característiques moleculars de l'ECP

L'ECP es sintetitza com una preproteïna amb un pèptid senyal de 27 residus. La proteïna madura està composta per un sol polipèptid de 133 aminoàcids (15,5 kDa) i conté 2,5 mols de zinc per mol d'ECP. Té una homologia de seqüència d'un 30% amb la RNasa A i un 67% amb l'EDN (Gleich i col·l., 1986). La proteïna té un elevat *pI* (*pI*: 10,8) per raó de l'elevat nombre d'arginines de la superfície de la molècula. Conté tres llocs potencials d'N-glicosilació que donen heterogeneïtat a la proteïna purificada d'eosinòfils (18 – 21 kDa). El tractament amb endoglicosidasa F (elimina el complex híbrid de polisacàrids units amb un enllaç de N) degrada les isoformes de l'ECP a diferència del tractament amb endoglicosidasa H (elimina oligosacàrids amb alta proporció de manosa units per enllaç N) que no afecta l'heterogeneïtat de la molècula (revisió Boix., 2001).

#### 4.5 Estructura tridimensional de l'ECP

L'estructura tridimensional de l'ECP s'ha determinat a partir dels estudis de cristal·lografia i difracció de raigs X (Boix i col·l., 1999a i Mallorquí-Fernández i col·l., 2000). L'ECP mostra un plegament tipus RNasa A i és especialment similar, tant en l'estructura general com en l'arquitectura del centre actiu, a l'EDN (l'altra RNasa dels eosinòfils). La cadena polipeptídica de l'ECP té un plegament tipus  $\alpha + \beta$  amb forma de V amb el centre actiu al mig i unes dimensions aproximades de 44 Å x 37 Å x 41 Å. Els residus Gln 14, His 15, Lys 38, Thr 42 i His 128 del centre actiu es troben conservats amb relació a la resta dels homòlegs de l'RNasa A, però en la estructura de l'ECP es fan evidents diferències en els subetis de reconeixement del substrat que poden explicar, almenys en part, la baixa activitat catalítica d'aquest enzim. És important la distribució de càrregues positives en la proteïna, mentre en l'RNasa A i l'EDN es troben majoritàriament restringides a la cavitat catalítica, en l'ECP tota la superfície de



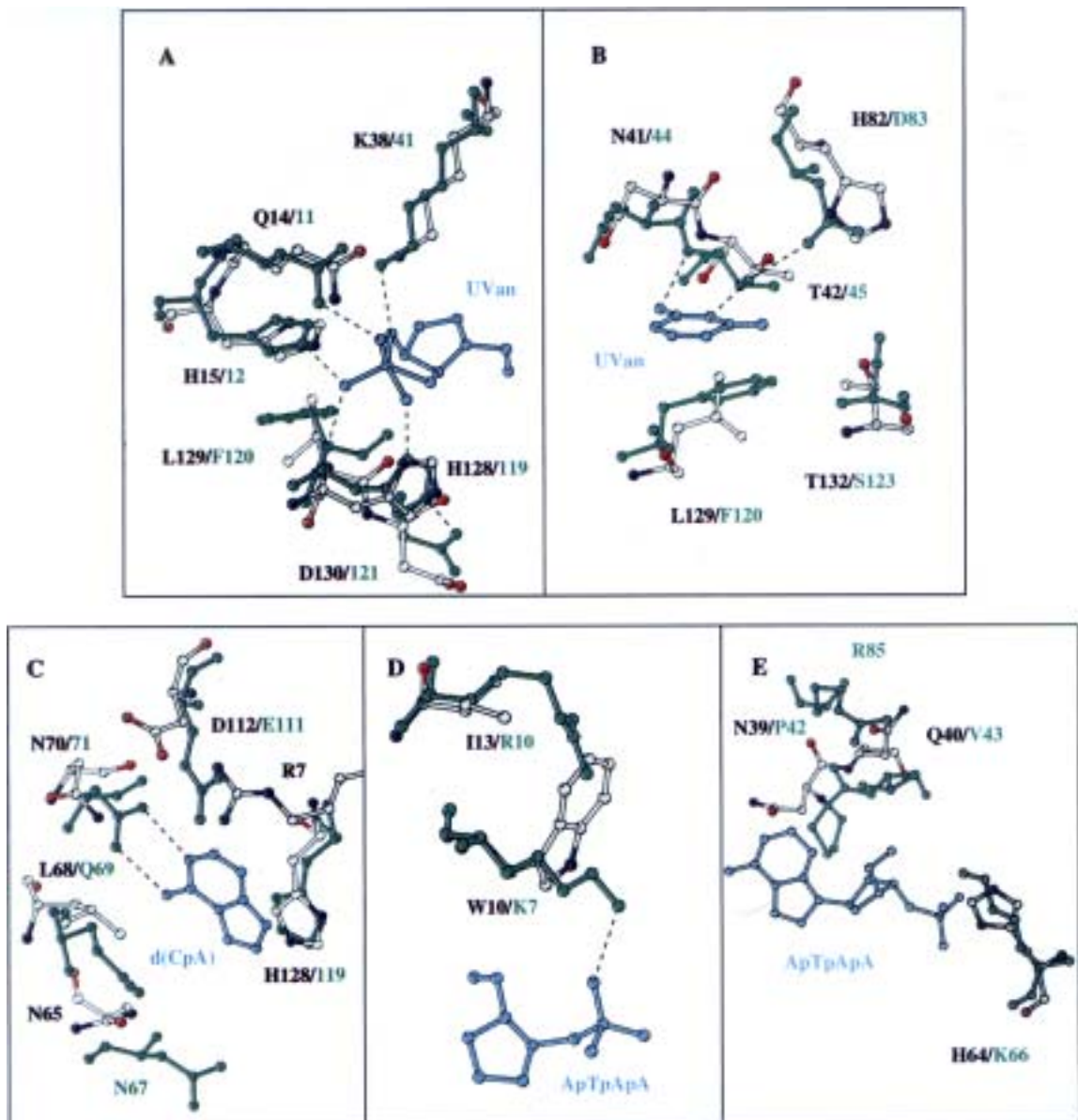
la molècula es troba carregada positivament. Aquesta distribució de la càrrega s'ha relacionat amb la capacitat de la proteïna d'interaccionar amb membranes cel·lulars i amb la baixa activitat catalítica de l'enzim.

### 4.6 Activitat ribonucleasa

L'eficiència catalítica de l'ECP pels substrats típics de les RNases és relativament baixa. L'ECP i l'EDN tenen una especificitat de substrat semblant però l'eficiència catalítica de l'ECP és molt més baixa que la de l'EDN (Slifman i col·l., 1986). L'ECP mostra la següent preferència de substrat: RNA de cadena senzilla > poli (U) > poli (C) > RNA de llevat. L'ECP, a diferència de la RNasa A, no mostra activitat en front RNA de doble cadena, el dinucleòsid monofosfat UpG (Gullberg i col·l., 1986 i Boix i col·l., 1999b) i poli (A) (Sorrentino i Glitz 1991) i una activitat molt baixa enfront mononucleòtids de 2', 3' fosfat cíclic (Boix i col·l. 1999b). La falta d'activitat de l'ECP enfront ds RNA es correlaciona amb l'absència d'activitat desestabilitzadora d'hèlix de doble cadena (Sorrentino i Glitz, 1991).

El patró de digestió de substrats d'alt pes molecular, poli (U) i poli (C), indica que l'ECP té un mecanisme d'actuació de tipus exonucleasa a diferència del mecanisme tipus endonucleasa característic de l'RNasa A (Boix i col·l., 1999b). L'estructura del centre actiu i llocs d'unió al substrat determina, en gran part, la baixa activitat catalítica, l'especificitat de substrat i el mecanisme d'acció tipus exonucleasa de l'ECP (figura 7).

Per definir els subsetis d'interacció de l'ECP amb el substrat (fosfat, ribosa i base nitrogenada) s'ha utilitzat la nomenclatura originalment designada per l'RNasa A (Richards i Wyckoff, 1971). La His 15, His 128 i Lys 38 formen la tríada catalítica en l'ECP i ocupen posicions equivalents a la His 12, His 119 i Lys 41 en la RNasa A. Les interaccions als subsetis B<sub>2</sub>p<sub>2</sub> són molt dèbils o absents en l'ECP ja que la posició Asn 70 en l'ECP està separada de la butxaca d'interacció amb purines en comparació a la corresponent Asn 71 de l'RNasa A; la cadena lateral de l'Asp 112 en l'ECP no pot mimetitzar les interaccions del Glu 111 de l'RNasa A amb l'adenina i l'ECP no té residus equivalents als subseti p<sub>2</sub> (Lys 7 i Arg 10) de l'RNasa A. L'anàlisi de l'estructura suggereix que l'ECP té una nova regió addicional d'interacció de substrat, a la regió 5' del P-05' de l'enllaç fosfodièster que es trenca, que correspondria a p<sub>-1</sub>, B<sub>0</sub> i p<sub>0</sub> (Boix i col·l., 1999a).



**Figura 7.** (A-E) Complexos dels anàlegs de substrat [UVan, d(CpA) i d(ApTpApA)] i l'RNasa A i sobreposició de l'estructura de l'ECP mostrant els subconjunts  $p_1$  (A),  $B_1$  (B),  $B_2$  (C),  $p_2$  (D) i  $B_0/P_0/p_{-1}$  (E). Es mostren en blau les porcions dels anàlegs de substrat. Els residus de l'ECP estan marcats amb els colors estàndards (blau per al nitrogen, vermell per a l'oxigen i gris per al carboni) i els de l'RNasa A, amb verd. Les línies discontinues representen enllaços d'hidrogen en l'RNasa A. Reproduït de Boix i col·l., 1999a.

#### 4.7 Propietats biològiques de l'ECP

L'ECP s'ha relacionat amb algunes de les activitats biològiques dels eosinòfils. A la taula 1 s'inclou un resum comparatiu de les propietats de l'ECP i l'EDN.

### 4.7.1 Regulació del sistema del complement

Les proteïnes més catióniques dels grànuls secundaris dels eosinòfils, ECP, MBP i EPO tenen l'habilitat de regular la via clàssica i alternativa del sistema del complement, a diferència de l'EDN, que no presenta cap activitat sobre el complement (Weiler i col·l., 1992 i 1995). El mecanisme de regulació de la via alternativa es basa en la inhibició de la interacció de C3b amb el factor B, així s'interfereix amb la formació de convertasa de C3 de la via alternativa. Cap de les proteïnes dels grànuls no té cap efecte en els passos posteriors a la formació de la convertasa de C3 com és la lisi cel·lular. En la via clàssica les proteïnes dels grànuls actuen directament sobre C1 inhibint la formació de la convertasa de C3 unida a membrana.

### 4.7.2 Alteració de la coagulació

L'ECP afecta el mecanisme de coagulació depenent del factor XII, disminuint de forma dosi dependent el temps de coagulació del plasma. De forma similar, l'ECP augmenta la formació de cal·licreïna a partir de precal·licreïna depenent del factor XII. L'augment de la coagulació de la sang que podria causar l'ECP contribuiria en la formació del coàgul característica dels pacients amb síndrome d'hipereosinofília (Venge i col·l., 1979). Les anomalies en la coagulació són freqüents en individus amb nivells elevats d'ECP a la sang ja sigui per raó d'una hipereosinofília o l'activació dels eosinòfils (Spry i col·l., 1983).

### 4.7.3 Fibrinòlisi

L'ECP augmenta la fibrinòlisi incrementant l'eficiència de l'activació del plasminogen per la urocinasa (Dahl i Venge, 1979). L'ECP actua directament sobre el plasminogen i s'obté la màxima activitat a una relació molar ECP:plasminogen de 1:1. Per contra, l'ECP anul·la l'activació del plasminogen induïda per l'estreptocinasa a causa de la formació d'un complex ECP-estreptocinasa que precipita (Dahl i Venge 1979).

### 4.7.4 Activació de la secreció de mucus de les cèl·lules epitelials

Mitjançant les proteïnes dels grànuls ECP i MBP, els eosinòfils activats regulen la secreció de glicoconjugats respiratoris (RGC) i lactoferrina de les vies respiratòries (Lundgren i col·l., 1991). La hipersecreció de mucus és una de les causes principals de

l'obstrucció de les vies respiratòries que s'observa en malalties com l'asma (Lundgren i Shelhamer, 1990). L'ECP, en estimular la secreció de productes de les glàndules submucoses, podria afavorir les crisis d'asma (Lundgren i col·l., 1991).

### 4.7.5 Activació de mastòcits

L'ECP i, en menor grau, l'MBP indueixen l'alliberació de mitjancers proinflamatoris i vasoactius en mastòcits del teixit cardíac que podrien influir en el dany en el teixit cardíac en pacients amb hipereosinofília (Patella i col·l., 1996). El caràcter catiònic d'aquestes dues proteïnes sembla que és important per a l'activació dels mastòcits ja que altres polipèptids rics amb arginines (protamina) produeixen efectes similars, per contra, l'EPO i la substància P, tot i tenir un elevat *pI* no tenen cap efecte sobre els mastòcits del cor (Patella i col·l., 1995).

### 4.7.6 Inhibició de la proliferació de limfòcits

L'ECP inhibeix la producció d'immunoglobulines i la proliferació de línies cel·lulars plasmàtiques humanes (IM9, AF 10) de forma dosiddependent. Aquesta inhibició no sembla ser deguda a una citotoxicitat de l'ECP sobre les línies cel·lulars ja que la viabilitat cel·lular és superior al 98%. L'efecte inhibitori és reversible i bloquejat per sèrum anti ECP (Kimata i col·l., 1992).

El fet que les proteïnes catiòniques d'eosinòfil (ECP i EDN) inhibeixen de forma dosiddependent la proliferació dels limfòcits suggereix que podrien intervenir en la regulació de reaccions immunològiques (Peterson i col·l., 1986).

### 4.7.7 Funció immunoreguladora

Les funcions biològiques de l'ECP i les altres proteïnes catiòniques dels eosinòfils fan pensar que els eosinòfils poden tenir una funció immunoreguladora mitjançant els productes dels seus grànuls. A més, sembla que aquestes activitats estiguin regulades entre elles. Així, trobem exemples en què una activitat citotòxica pot estar modulada per una activitat no citotòxica. L'activació del complement genera factors quimiotàctics que atreuen els eosinòfils a la superfície del paràsit, on secreten els seus productes i, d'altra banda, s'ha comprovat que un dels productes de secreció dels eosinòfils (l'ECP) inhibeix la via clàssica i alternativa del complement. Els limfòcits

T segreguen interleucina 5 (IL-5), que és un dels factors més importants de diferenciació i degranulació dels eosinòfils i l'ECP inhibeix la proliferació dels limfòcits.

### 4.7.8 Citotoxicitat enfront de cèl·lules de l'hoste

Hi ha un elevat nombre de treballs que assenyalen els eosinòfils i els seus productes de secreció com els responsables de la patologia de malalties que impliquen inflamació. En malalties com l'asma o en infeccions per paràsits, els eosinòfils s'infiltraen en el teixit afectat i la citotoxicitat de les proteïnes dels seus grànuls sobre les cèl·lules de l'hoste contribueix a la patologia d'aquestes afeccions.

En estudis immunohistoquímics s'ha trobat una forta correlació entre els nivells d'ECP i la necrosi de diferents òrgans (cor, intestí, pell, bufeta urinària) afectats d'inflamació amb eosinòfils (Fredens i col·l., 1988).

En experiments in vitro Tai i col·l., (1982) observaren que el sobrenedants d'eosinòfils, però no de neutròfils, eren tòxics per a cèl·lules cardíques de rata i l'efecte era inhibit per heparina. Aquesta toxicitat s'associava amb un augment en l'absorció d'O<sub>2</sub> i suggeria que s'havia produït un augment de la permeabilitat de la membrana amb la consegüent activació de l'ATPasa Na-K dependent i augment de l'absorció d'O<sub>2</sub>. Molina i Kierszenbaum (1989) trobaren dipòsits de MBP, ECP, EDN i EPO en mioblast lesionat després de la incubació amb eosinòfils i *T. cruzi*. El dany que s'observava en aquestes cèl·lules cardíques (desquamació i lisi) es podia així atribuir a les proteïnes dels grànuls d'aquests leucòcits. La lesió cardiovascular associada a la hipereosinofília crònica s'ha atribuït també als productes de secreció dels eosinòfils (Tai i col·l., 1987). L'ECP, a diferència de l'EDN, lesiona l'epiteli de la tràquea de cobai in vitro (Motojima i col·l., 1989).

L'ECP inhibeix in vitro el creixement de diferents línies cel·lulars de mamífers de forma dosi depenent. El grau d'inhibició està condicionat al tipus cel·lular i l'efecte sembla ser citostàtic i no citotòxic (Maeda i col·l., 2002a).

### 4.7.9 Neurotoxicitat

L'any 1933, Gordon publicà que la injecció intracerebral a conills d'una suspensió dels nòduls limfàtics de pacients amb la malaltia de Hodgkin produïa una síndrome neurològica que comportava falta de coordinació, atàxia, paràlisi i, finalment, la mort. Posteriorment, Turner i col·l. (1938) van apuntar als eosinòfils com la causa d'aquesta

resposta neuromuscular anomenada actualment fenomen Gordon, que histològicament es caracteritza, principalment, per la pèrdua de les cèl·lules Purkinje i la degeneració de la substància blanca del cerebel (Durack i col·l., 1979). Fredens i col·l., (1982) van determinar que dosis entre 0,1 – 0,3 µg d' ECP o 3,5 – 14 µg d'EDN són suficients per produir el fenomen Gordon. Tot i no haver-se descrit una síndrome semblant al fenomen Gordon en humans, s'han relacionat anormalitats neurològiques amb malalties que comporten eosinofília (Chusid i col·l., 1975) i s'ha detectat nivells elevats d'ECP en el fluid cerebrospinal en pacients amb diferent tipus de desordres neuronals (Hällgren i col·l., 1983).

La inactivació de l'activitat RNasa de l'EDN i l'ECP mitjançant carboximetilació de les histidines catalítiques comporta la pèrdua de l'activitat neurotòxica d'aquestes proteïnes (Sorrentino i col·l., 1992).

#### 4.7.10 Toxicitat enfront de paràsits

Mackenzie i col·l. (1977) i Ramalho-Pinto i col·l. (1978) demostraren que els eosinòfils amb combinació amb anticossos antischistosomula o amb el complement tenen la capacitat de matar el trematode *Schistosoma mansoni* in vitro i Mc Laren, i col·l., (1979) comprovaren l'efecte acumulatiu del complement quan s'activa mitjançant la via clàssica (dependent d'anticòs) i alternativa. Els eosinòfils tenen receptors de membrana tant per al fragment Fc de les immunoglobulines com per fragments dels complement. L'activació dels eosinòfils per anticossos s'ha estudiat en pacients amb filariasi i s'ha observat un alliberament diferencial dels mitjancers depenent del tipus d'immunoglobulina.

Mc Laren i col·l. (1981) demostraren que les proteïnes catióniques dels eosinòfils i dels neutròfils, a concentracions equimolars, lesionen *S. mansoni* de forma comparable, a diferència d'altres polications (poli-L-arginina o protamina) que provoquen canvis patològics diferents i necessiten un major temps d'incubació amb el paràsit per produir-li la patologia.

D'altra banda, les diferents proteïnes dels eosinòfils produeixen efectes diferents segons l'estadi de desenvolupament del paràsit. Mentre l'ECP és més potent que l'EDN enfront de schistosomula i dirigeix l'efecte sobre la membrana del tegument, l'EDN és més tòxica per paràsits a l'estadi de pulmó i la lesió es produeix sobre les

fibres musculars longitudinals que es troben a sota del tegument (Mc Laren i col·l., 1984).

Ackerman i col·l., (1985) en comparar a concentracions equimolars ( $0,3 \times 10^{-6}$  –  $2 \times 10^{-5}$  M) la toxicitat de l'MBP, ECP, EDN enfront de *S. mansoni* proven que l'ECP es de 8 a 10 vegades més potent que l'MBP. Tot i això, l'abundància relativa de la MBP en els grànuls la converteix en la màxima responsable de la toxicitat dels eosinòfils. A la concentració que l'ECP provoca un 100% de mortalitat en *Schistosoma mansoni* ( $3,7 \times 10^{-6}$  M), l'EDN només és marginalment tòxica pel paràsit.

Estudis *in vitro* han posat de manifest la capacitat dels eosinòfils per destruir protozous flagel·lats (*Trypanosoma cruzi*) mitjançant dos mecanismes diferents: fusió del fagolisosoma que conté *Trypanosoma cruzi* i les proteïnes catióniques o adhesió dels eosinòfils a la superfície del paràsit amb la subsegüent alliberació del material granular. Tot i el fet que l'MBP, l'ECP i l'EDN lisen *T. cruzi*, el seu mecanisme d'actuació sembla que és diferent. Si bé els polianions inhibeixen l'efecte tòxic de l'MBP i l'ECP, tenen un efecte molt dèbil sobre l'EDN. En canvi, la inhibició de l'activitat RNasa mitjançant l'inhibidor de RNases (RI) suprimeix la toxicitat de l'EDN però no la de l'ECP (Molina i col·l., 1988).

Altres estudis comparatius indiquen una major activitat citotòxica de l'ECP, en comparació amb l'EDN, enfront de paràsits nemàtodes com *Trichinella spiralis* (Hamann, i col·l., 1987) i *Brugia pahangi* i *Brugia malayi* (Hamann i col·l., 1990b). Aquests estudis també comproven la incapacitat de l'inhibidor d'RNases per eliminar la toxicitat de l'ECP per a aquests nemàtodes i l'eficàcia dels polianions per inhibir l'activitat de l'MBP i ECP.

Els estudis anteriors han posat en evidència la importància de la interacció dels grups catiónics de l'ECP amb la superfície electronegativa del paràsit en el mecanisme de toxicitat de la proteïna.

### 4.7.11 Activitat bactericida

Els eosinòfils són tòxics per a *E. coli* en condicions aeròbiques gràcies a l'acció conjunta del superòxid i l'EPO i, a més, també s'ha atribuït una activitat independent d'oxigen als extractes proteics dels eosinòfils (Persson i col·l., 2001). Lehrer i col·l. (1989) van estudiar les propietats bactericides de l'ECP i van concloure que l'ECP purificada d'eosinòfils a concentracions de l'ordre de micromolar és bactericida per a bacteris grampositius (*S. aureus*) i gramnegatius (*E. coli*). També demostraren la

capacitat de l'ECP per permeabilitzar la membrana externa i interna d' *E.coli*, suggerint que l'efecte tòxic de la proteïna és el resultat de l'atac a la membrana de la cèl·lula diana. Rosenberg (1995) va eliminar l'activitat RNasa de l'ECP, modificant residus del centre actiu de l'enzim mitjançant mutagènesi dirigida, i va comprovar que la proteïna resultant, tot i no tenir activitat RNasa, manté la toxicitat per a *S. aureus*.

#### 4.7.12 Activitat antivírica

Els eosinòfils s'acumulen i es degranulen en el tracte respiratori quan es produeixen infeccions del sistema respiratori per virus (virus respiratori sincitial (RSV); virus d'RNA de cadena simple de la família Paramyxoviridae) (Garofalo i col·l., 1992) en resposta a les substàncies que actuen com agents quimioattractants i secretades per les cèl·lules epitelials infectades (revisió a Domachowske i Rosenberg, 1999). Els eosinòfils per raó de la seva acció sobre els epitelis (vegeu l'apartat 4.7.8) contribueixen a la lesió de la mucosa de les vies aèries. S'ha trobat l'ECP al tracte respiratori d'infants amb infecció aguda per RSV i s'ha correlacionat elevades concentracions d'ECP amb la severitat de la malaltia (Garofalo i col·l., 1992).

Domachowske i Rosenberg (1997) van trobar una certa explicació a la presència d'eosinòfils en infeccions virals, en principi només amb efectes perjudicials, en comprovar que quan aquests leucòcits s'afegien in vitro a suspensions virals de RSV es produïa una reducció dependent de la dosis de la capacitat infectiva d'aquests virus. L'addició de l'inhibidor de RNases (RI) revertia l'efecte la qual cosa indicava que l'activitat d'alguna de les RNases d'eosinòfil era crucial per l'efecte antiviral de l'eosinòfil. L'EDN, i menys efectivament l'ECP, actuant soles eren suficients per disminuir la infectivitat del virus. Una mutació puntual que abolia l'activitat RNasa de l'EDN o l'addició de l'inhibidor de RNases juntament amb l'ECP eliminava la capacitat antivírica d'aquestes proteïnes (Domachowskei col·l., 1998 a,b). Tot i que l'activitat RNasa es necessària no sembla ser suficient per a l'activitat antivírica, ja que altres RNases (RNasa A bovina, RNasa 6 i onconasa) no comparteixen aquesta activitat (Domachowske i col·l., 1998 b).

#### 4.7.13 Propietats de l'ECP relacionades amb l'activitat citotòxica

L'ECP compleix els requisits per ser catalogada tant d'enzim (RNasa) com de proteïna antimicrobiana.



La relació entre l'activitat RNasa i les diferents activitats citotòxiques de la proteïna s'ha descrit en apartats anteriors però, en resum, es pot assenyalar que les activitats neurotòxica i antivírica depenen de l'activitat RNasa mentre que les activitats bactericida i parasitocida semblen que són independents de l'activitat enzimàtica.

Maeda i col·l. (2002b) han demostrat que l'ECP és excepcionalment estable davant de la desnaturalització per agents químics en comparació a l'RNasa A i altres RNases humanes i relacionen l'estabilitat de l'ECP amb el seu efecte tòxic. L'elevada estabilitat de l'enzim disminueix la seva degradació per proteòlisi, afavorint que es pugui acumular al citosol a concentracions superiors a l'inhibidor de RNases i pugui degradar molècules d'RNA citosòlic.

Young i col·l., (1986) van proposar que el mecanisme de citotoxicitat de l'ECP havia d'estar lligat amb la capacitat de la proteïna per crear canals iònics en membranes cel·lulars i vesícules lipídiques. Des d'aquest punt de vista es pot incloure l'ECP dins del grup de proteïnes i pèptids catiónics tòxics.

El pèptids antimicrobians es descriuen com a components importants de la immunitat innata, amb capacitat per interaccionar amb les membranes biològiques, causant-hi diferents tipus d'impactes (Hancock i Lehrer, 1998) o amb altres dianes aniòniques (Hancock i Chapple, 1999). En molts casos el mecanisme detallat d'acció d'aquests pèptids encara no s'ha establert. Es troben àmpliament distribuïts en varietat d'organismes, els trobem en bacteris, fongs, plantes, insectes, ocells, crustacis, amfibis i mamífers (Ganz i Lehrer, 1998) i són tòxics per un ampli espectre de patògens que inclou bacteris grampositius i gramnegatius, fongs, virus encapsulats, paràsits i cèl·lules tumorals (Maloy i Kari, 1995). Els pèptids antimicrobians presenten una gran variabilitat en l'estructura, seqüència d'aminoàcids, pes molecular i espectre d'acció. De tota manera, estudis d'estructura i activitat han demostrat que els pèptids més potents es caracteritzen per ser altament bàsics amb un pronunciat caràcter amfipàtic (Tossi i col·l., 2000).

#### 4.7.14 Regulació de les activitats de l'ECP

Moltes de les funcions biològiques de l'ECP poden ser perjudicials per a l'organisme i, per tant hi ha d'haver algun sistema de regulació. Dins de l'estudi d'aquest mecanisme, Perterson i Venge (1987) van demostrar la formació de complex

no covalents entre l'ECP i l'  $\alpha_2$  – macroglobulina del sèrum que podrien explicar un dels mecanismes que utilitza l'organisme per protegir-se dels efectes nocius de l'ECP.

D'altra banda la unió de l'ECP a la heparina (1:1) neutralitza moltes de les activitats de l'ECP in vitro i en conseqüència aquest podria ser un dels mecanismes de regulació in vivo (Molina i col·l., 1988, Hamann i col·l., 1990b i Tai i col·l., 1982).

L'interacció de l'ECP amb l'inhibidor de ribonucleases proteic (RI) inhibeix l'activitat ribonucleasa de l'enzim ( $K_i < 1$  nM) i s'observa aproximadament un 50 % de l'activitat ribonucleasa amb un ratio inhibidor:enzim de 0,5 (Boix i col·l., 1999b). L'efecte de l'RI en les activitats biològiques de l'ECP és controvertit, mentre que l'RI no inhibeix la toxicitat de l'ECP per *Trypanosoma cruzi* (Molina i col·l., 1988), *Brugia pahangi* i *Brugia malayi* (Hamann i col·l., 1990) l'activitat antivírica de l'ECP es redueix en presència de l'RI (Domachowske i col·l., 1998).

## Introducció

**Taula 1. Comparació de les activitats de les dues ribonucleases d'eosinòfil (ECP i EDN)**

ACTIVITATS	RIBONUCLEASA	
	ECP	EDN
Enzimàtica. Activitat relativa ECP:EDN Poli (U) tRNA i RNA de llevat	1 <sup>a</sup> 1 <sup>b</sup>	10 <sup>a</sup> 100 <sup>b</sup>
Regulació del complement Via clàssica Via alternativa	Inhibició <sup>c</sup> Inhibició <sup>d</sup>	No té efecte <sup>c</sup> No té efecte <sup>d</sup>
Alteració de la coagulació. Coagulació dependent del factor XII Activació del plasminogen per la urokinasa	Activació 100 µg /L <sup>e</sup> Estimulació <sup>f</sup>	No estudiat No estudiat
Secreció de mucus de les vies respiratòries.	Estimulació (2,5 – 25 µg /mL) <sup>g</sup>	No té efecte (0,025 – 50 µg/mL) <sup>g</sup>
Activació de mastòcits cardíacs humans. Concentració que induïx l'alliberació de mitjancers en mastòcits.	0,3 – 5 µM <sup>h</sup>	No té efecte <sup>h</sup>
Inhibició de la proliferació de cèl·lules de mamífer. % creixement respecte del control. Cèl·lules mononuclears Cèl·lules plasmàtiques Cèl·lules epitelials de la còrnia Línies tumorals: cèl·lules HL60 cèl·lules K562	68% (10 <sup>-7</sup> M) <sup>i</sup> 20% (0,5 ng/mL) <sup>j</sup> 70% (100 µg /mL) <sup>k</sup> 2,1% (10 <sup>-5</sup> M) <sup>l</sup> 1,7% (10 <sup>-5</sup> M) <sup>m</sup>	80% (10 <sup>-7</sup> M) <sup>i</sup> No estudiat 106% (100 µg/ml) <sup>k</sup> No estudiat 100% (10 <sup>-5</sup> M) <sup>m</sup>
Citotoxicitat enfront les cèl·lules de l'hoste. Concentració de proteïna necessària per lesionar l'epiteli traqueal.	100 µg /mL <sup>n</sup>	No té efecte (200 µg/ mL) <sup>n</sup>
Neurotoxicitat. Quantitat de proteïna necessària per provocar la síndrome anomenada <i>Gordon fenomenon</i> .	0.1 – 3 µg <sup>o</sup>	3.5 – 14 µg <sup>o</sup>
Helmintotòxica. Concentració necessària per provocar un ~50% de mortalitat en: <i>Schistosoma mansoni</i> <i>Trichinella spiralis</i> <i>Brugia pahangi</i> <i>Brugia malayi</i>	2x10 <sup>-6</sup> M <sup>p</sup> 5.6x10 <sup>-6</sup> M <sup>r</sup> 5x10 <sup>-5</sup> M <sup>s</sup> 1x10 <sup>-4</sup> M <sup>s</sup>	5x10 <sup>-6</sup> M <sup>q</sup> 1.5x10 <sup>-4</sup> M <sup>r</sup> 1x10 <sup>-4</sup> M <sup>s</sup> 2x10 <sup>-4</sup> M <sup>s</sup>
Bactericida. % CFU que sobreviuen en presència de 2.3 µM proteïna. <i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	~ 10 % <sup>t</sup> ~ 0,1% <sup>t</sup>	No té efecte <sup>t</sup> No estudiat
Antivírica. Reducció de la infectivitat de l'RSV.	6,3 ( 0,5 10 <sup>-6</sup> M ) <sup>u</sup>	54 (0,5 10 <sup>-6</sup> M) <sup>u</sup>

<sup>a</sup> Slifman i col·l., 1986, <sup>b</sup> Gullberg i col·l., 1986, <sup>c</sup> Weiler i col·l., 1995, <sup>d</sup> Weiler i col·l., 1992, <sup>e</sup> Venge i col·l., 1979, <sup>f</sup> Dahl i Venge., 1979, <sup>g</sup> Lundgren i col·l., 1991, <sup>h</sup> Patella i col·l., 1996, <sup>i</sup> Peterson i col·l., 1986, <sup>j</sup> Kimata i col·l., 1992, <sup>k</sup> Trocmé i col·l., 1997, <sup>l</sup> Maeda i col·l., 2002a, <sup>m</sup> Maeda i col·l., 2002b, <sup>n</sup> Motojima i col·l., 1989, <sup>o</sup> Fredens i col·l., 1982, <sup>p</sup> Ackerman i col·l., 1985, <sup>q</sup> Slifman i col·l., 1989, <sup>r</sup> Hamann i col·l., 1987, <sup>s</sup> Hamann i col·l., 1990b, <sup>t</sup> Rosenberg 1995, <sup>u</sup> Domachowski i col·l., 1998a.

## 4.8 Detecció de l'ECP per anticossos

L'ECP s'ha convertit en un marcador del nombre, recanvi i activitat dels eosinòfils i, en conseqüència, en un marcador de patologies associades amb inflamació eosinofílica.

Tot i que s'han descrit diversos anticossos per detectar l'ECP en mostres biològiques no es coneix l'epítot que reconeixen aquests anticossos. S'ha de destacar alguns d'ells per la seva àmplia utilització ja sigui en estudis d'immunohistoquímica, de citometria de flux o en estudis clínics.

Tai i col·l. (1984) van obtenir dos anticossos monoclonals, EG1 i EG2, a partir de pacients amb hipereosinofília. EG1 es va obtenir de ratolins injectats amb extractes de proteïnes d'eosinòfil no estimulats. EG2 deriva de ratolins injectats amb les proteïnes secretades per eosinòfils activats. Mentre EG2 reconeix les formes secretades de l'ECP i l'EDN, l'EG1 reconeix l'ECP en la forma secretada i emmagatzemada en condicions no reductores.

Rosenberg i Tiffany (1994) van estudiar quines eren les diferències bioquímiques entre les formes secretades i emmagatzemades de l'ECP. Van determinar que l'EG2 detectava les formes completament deglicosilades de l'ECP i l'EDN i una de les formes glicosilades de l'ECP (18 kDa). En canvi, EG1 a l'igual que un anticòs policlonal anti-ECP reconeix les tres formes glicosilades de l'ECP (18, 20, 22 kDa).

S'ha publicat nombrosos estudis immunohistoquímics on s'ha considerat que un elevat nombre de cèl·lules EG2 +, és a dir, cèl·lules que expressen l'antigen que reconeix l'anticòs EG2, indica infiltració per eosinòfils activats i, per tant, és un índex de la gravetat de la malaltia inflamatòria.

Això no obstant, alguns treballs han qüestionat la capacitat d'EG1 i EG2 per discriminar entre eosinòfils en repòs i activats.

Jahnsen i col·l., (1994) van publicar que la reactivitat d'EG2 depenia principalment del mètode utilitzat en la preparació de la mostra i Nakajima i col·l., (1999) van confirmar que la reactivitat d'EG1 i EG2 no depèn de l'estat d'activació dels eosinòfils sinó del mètode de fixació i la concentració d'anticòs que s'utilitza.

Reimert (1991) ha descrit un mètode d'ELISA amb una elevada especificitat i sensibilitat utilitzant anticossos policlonals anti-ECP, obtinguts injectant conills amb ECP purificada d'eosinòfils.

Pharmacia Diagnostics ha comercialitzat dos assaigs (FEIA *fluoroenzim immuno assay* i RIA *radioimmuno assay*) per detectar l'ECP en fluids biològics. Els mètodes es basen en un anticòs monoclonal anti-ECP unit a una fase sòlida que es fa reaccionar amb el fluid biològic a estudiar i, seguidament, s'afegeix un altre anticòs monoclonal anti-ECP marcat radioactivament o amb fluorescència. Tots dos mètodes permeten detectar de 2 a 200 µg ECP/ L i la reactivitat creuada amb l'EDN és molt baixa. Totes dues tècniques (FEIA i RIA) s'han utilitzat extensament en clínica per al diagnòstic, seguiment i control del tractament en l'asma i altres malalties inflamatòries.

### 4.9 Detecció de l'ECP en fluids corporals

Els fluids corporals d'individus sans tenen unes concentracions determinades d'ECP que en processos inflamatoris augmenten significativament i tornen a baixar després de tractaments amb antiinflamatoris, fet pel qual s'està utilitzant l'ECP com a marcador de la gravetat de la inflamació en diferents malalties.

#### 4.9.1 Sang

En processos inflamatoris com per exemple l'asma, els eosinòfils s'activen i tenen més propensió a alliberar ECP durant el procés de coagulació de la sang que es produeix *in vitro*. En canvi, en persones sanes els eosinòfils no estan activats i alliberen quantitats molt menors d'ECP. En conseqüència, la concentració d'ECP en el sèrum, part líquida de la sang un cop ha coagulat, és un reflex del nivell de l'activitat dels eosinòfils i la seva propensió a alliberar les proteïnes dels grànuls. El plasma és la part líquida de la sang sense coagular obtinguda després de separar els elements cel·lulars d'aquesta. L'EDTA és un anticoagulant que inactiva les cèl·lules que deixen d'alliberar el contingut dels seus grànuls. Els nivells d'ECP en EDTA-plasma indiquen quina és la concentració d'ECP en la circulació sanguínia en el moment d'obtenir la mostra. En resum, els nivells d'ECP obtinguts en sèrum discriminen més que els nivells d'ECP en EDTA-plasma entre individus sans i malalts ja que mesuren l'activació dels eosinòfils. Això no obstant, els nivells d'ECP en sèrum varien molt segons el temps i la temperatura de coagulació i els estris que s'han utilitzat en la manipulació de la sang (Reimert i col·l., 1993). Estandarditzar l'obtenció i el processament de la mostra és important per obtenir resultats comparables amb validesa clínica i de diagnòstic. Diferents tractaments de la mostra poden explicar la variabilitat que s'ha observat en la

concentració d'ECP en sèrum d'individus sans (7-25 µg/L) que s'ha publicat en diferents estudis (Marks i col·l., 1998 i Venge i col·l., 1999). Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB, Uppsala, Suècia recomana que valors superiors a 15 µg ECP/L en sèrum, obtinguts utilitzant el seus assaigs i protocol, s'han de considerar com a indicadors d'inflamació.

### 4.9.2 Esput

El recompte del nombre d'eosinòfils en esput és un mètode vàlid i segur per mesurar la inflamació de les vies respiratòries (Pin i col·l., 1992), això no obstant, és un mètode molt laboriós i no factible en estudis amb un elevat nombre de casos (Popov i col·l., 1994). Els nivells d'ECP en esput es poden utilitzar per estimar la severitat de la inflamació i obstrucció dels bronquis i monitorar el tractament (Pizzichini i col·l., 1997). S'ha de considerar, però, que la concentració d'ECP en l'esput varia segons el processament de la mostra (Grebski, i col·l., 1998).

La concentració mitjana d'ECP en el sobrenadant de l'esput és de 51 µg/L en individus sans i pot arribar a 4600 µg/L en crisis d'asma (Gibson, i col·l., 1998). El lisat de les cèl·lules de l'esput té una concentració mitjana d'ECP de 51 µg/L en individus sans i arriba a 1.600 µg/L en crisis d'asma (Gibson i col·l., 1998).

### 4.9.3 Rentat nasal

Els valors d'ECP en el rentat nasal s'utilitzen principalment per estudiar les reaccions inflamatòries després de l'exposició a l'al·lergen en pacients amb rinitis al·lèrgica (Svensson i col·l., 1990). La concentració d'ECP en les secrecions nasals d'individus sans es mou entre 3 – 51 ng/ mL segons el mètode de col·lecció de la mostra (Klimek i Rasp, 1999) i es troba augmentada a la fase tardana de la reacció al·lèrgica, en sinusitis crònica i atopia.

### 4.9.4 Rentat broncoalveolar

S'han associat nivells elevats d'ECP en el rentat broncoalveolar amb la reacció asmàtica tardana després de l'exposició a l'al·lergen (De Monchy i col·l., 1985) i s'ha trobat una correlació positiva entre la severitat de l'asma i els nivells d'ECP (Vignola i col·l., 1998). També s'han observat valors elevats d'ECP en altres patologies que comporten la inflamació de les vies respiratòries com són ara la pneumònia eosinofílica

crònica (Janin, i col·l., 1993) i la fibrosi pulmonar idiopàtica (Hällgren, i col·l., 1989). En infeccions per virus de RNA del tracte respiratori (RSV) s'ha detectat nivells elevats d'ECP en les secrecions de les vies respiratòries (1000 µg/L/mg proteïna) respecte dels valors control (5 – 35 µg/L/mg proteïna) (Harrison i col·l., 1999).

### 4.9.5 Altres líquids corporals

La concentració d'ECP està augmentada en les llàgrimes de pacients amb conjuntivitis (Montan i col·l., 1996), en el líquid sinovial de pacients d'artritis (Hällgren i col·l., 1984) i, en general, en tot fluid en contacte amb teixits inflamats.

## 5. OBJECTIUS

La relació entre l'estructura i la funció de les proteïnes és un tema d'importància rellevant per entendre l'evolució dels gens, el mecanisme molecular que hi ha darrere de molts processos fisiològics i condicions patològiques i en el desenvolupament de noves estratègies terapèutiques. La família de les RNases ens dona una excel·lent oportunitat per estudiar la funció biològica resultat d'una determinada seqüència d'aminoàcids i estructura tridimensional. En les RNases pirimidina específiques humanes trobem vuit proteïnes amb una seqüència d'aminoàcids, un patró de plegament similar i una activitat RNasa funcional però amb funcions biològiques diverses.

Ens vam proposar com a objectiu general d'aquest treball identificar aminoàcids o regions de l'ECP que la diferenciaven immunològicament d'altres RNases i/o eren responsables de les seves funcions biològiques.

En concret ens vam plantejar:

### **1 Identificació immunològica de l'ECP**

Obtenir un anticòs a partir d'una regió específica de la proteïna que reconegui únicament l'ECP.

Analitzar la possible reactivitat creuada de l'anticòs amb altres proteïnes i estudiar en quines condicions l'anticòs reconeix l'ECP.

Comprovar la capacitat de l'anticòs per reconèixer les diferents isoformes de l'ECP en cèl·lules i fluids corporals.

### **2 Identificació dels determinants estructurals de les activitats citotòxica i/o citostàtica de l'ECP**

Optimitzar un mètode per estudiar l'activitat desestabilitzadora de membranes de l'ECP i mesurar l'efecte de l'ECP sobre vesícules sintètiques de diferent composició lipídica.

Construir formes modificades de l'ECP en les regions de la proteïna potencialment implicades en la interacció amb la membrana citoplàsmica i, per tant, en les activitats citotòxiques i/o citostàtiques.



## Introducció

---

Analitzar per modelat l'efecte de les mutacions en l'estructura tridimensional de la proteïna.

Determinar els paràmetres cinètics de l'activitat RNasa de l'ECP i de les formes modificades utilitzant un substrat de baix pes molecular ((Up)<sub>4</sub>U>p).

Estudiar l'efecte de les mutacions en l'activitat desestabilitzadora de membranes de l'ECP.

Caracteritzar l'activitat bactericida enfront bacteris grampositius i gramnegatius de cada una de les variants de l'ECP en relació la proteïna salvatge.

Analitzar l'efecte de l'ECP i les variants en les cèl·lules de mamífer.

## BIBLIOGRAFIA

- Abu-Ghazaleh, R. I., Fujisawa, T., Mestecky, J., Kyle, R. A. & Gleich, G. J. (1989) IgA-induced eosinophil degranulation. *J. Immunol.* **142**, 2393-2400
- Abu-Ghazaleh, R. I., Dunnette, S. L., Loegering, D. A., Checkel, J. L., Kita, H., Thomas, L. L. & Gleich, G. J. (1992) Eosinophil granule proteins in peripheral blood granulocytes. *J. Leukoc. Biol.* **52**, 611-618
- Ackerman, S. J., Gleich, G. J., Loegering, D. A., Richardson, B. A. & Butterworth, A. E. (1985) Comparative toxicity of purified human eosinophil granule cationic proteins for schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**, 735-745
- Aravind, L. & Koonin, E. V. (2001) A natural classification of ribonucleases. *Methods. Enzymol.* **341**, 3-28
- Archer, G. T. & Hirsch, J. G. (1963) Isolation of granules from eosinophil leucocyte and study of their enzyme content. *J. Exp. Med.* **118**, 277-286
- Beintema, J. J., Wietzes, P., Weickmann, J. L. & Glitz, D. G. (1984) The amino acid sequence of human pancreatic ribonuclease. *Anal. Biochem.* **136**, 48-64
- Boix, E., Leonidas, D. D., Nikolovski, Z., Nogués, M. V., Cuchillo, C. M. & Acharya, K. R. (1999a) Crystal structure of eosinophil cationic protein at 2.4 Å resolution. *Biochemistry* **38**, 16794-16801
- Boix, E., Nikolovski, Z., Moiseyev, G. P., Rosenberg, H. F., Cuchillo, C. M. & Nogués, M. V. (1999b) Kinetic and product distribution analysis of human eosinophil cationic protein indicates a subsite arrangement that favors exonuclease-type activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 15605-15614
- Boix, E. (2001) Eosinophil cationic protein. *Methods Enzymol.* **341**, 287-305
- Bond, M. D., Strydom, D. J. & Vallee, B. L. (1993) Characterization and sequencing of rabbit, pig and mouse angiogenins: discernment of functionally important residues and regions. *Biochim. Biophys. Acta.* **1162**, 177-186
- Borkakoti, N. (1983) The active site of ribonuclease A from the crystallographic studies of ribonucleaseA-inhibitor complexes. *Eur. J. Biochem.* **132**, 89-94
- Butterworth, A. E., (1984) Cell-mediated damage to helminths. *Adv. Parasitol.* **23**, 143-235
- Byström, J., Tenno, T., Hakansson, L., Amin, K., Trulsson, A., Högbom, E. & Venge, P. (2001) Monocytes, but not macrophages, produce the eosinophil cationic protein. *APMIS* **109**, 507-516.
- Byström, J., Garcia, R. C., Hakansson, L., Karawajczyk, M., Moberg, L., Soukka, J. & Venge, P. (2002) Eosinophil cationic protein is stored in, but not produced by, peripheral blood neutrophils. *Clin. Exp. Allergy.* **32**, 1082-1091.

Carsana, A., Confalone, E., Palmieri, M., Libonati, M. & Furia, A. (1988) Structure of the bovine pancreatic ribonuclease gene: the unique intervening sequence in the 5' untranslated region contains a promoter-like element. *Nucleic. Acids. Res.* **16**, 5491-5502.

Chiang, H. L., Terlecki, S. R., Plant, C. P. & Dice, J. F. (1989) A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins *Science* **246**, 382-385.

Chusid, M. J., Dale, D. C., West, B. C. & Wolff, S. M. (1975) The hypereosinophilic syndrome. *Medicine* **54**, 1-27

Cuchillo, C. M., Parés, X., Guasch, A., Barman, T. E., Travers, F. & Nogués, M. V. (1993) The role of 2',3'-cyclic phosphodiester in the bovine pancreatic ribonuclease A catalysed cleavage of RNA: intermediates or products? *FEBS Lett.* **333**, 207-210

D'Alessio, G. (1993) New and cryptic biological messages from RNases. *Trends. Cell. Biol.* **3**, 106-109.

Dahl, R. & Venge, P. (1979) Enhancement of urokinase-induced plasminogen activation by the cationic protein of human eosinophil granulocytes. *Thromb. Res.* **14**, 599-608

De Monchy, J. G., Kauffman, H. F., Venge, P., Koeter, G. H., Jansen, H. M., Sluiter, H. J., De Vries, K. (1985) Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am. Rev. Respir. Dis.* **131**, 373-376

De Prisco, R., Sorrentino, S., Leone, E. & Libonati, M. (1984) A ribonuclease from human seminal plasma active on double-stranded RNA. *Biochim. Biophys. Acta.* **788**, 356-363

Deming, M. S., Dyer, K. D., Bankier, A. T., Piper, M. B., Dear, P. H. & Rosenberg, H. F. (1998) Ribonuclease K6: Chromosomal mapping and divergent rates of evolution within the RNase A gene superfamily. *Genome. Res.* **8**, 599-607

Domachowske, J. B. & Rosenberg, H. F. (1997) Eosinophils inhibit retroviral transduction of human target cells by a ribonuclease-dependent mechanism. *J. Leukoc. Biol.* **62**, 363-368.

Domachowske, J. B., Dyer, K. D., Adams, A. G., Leto, T. L. & Rosenberg, H. F. (1998a) Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNase A-family ribonuclease with direct antiviral activity. *Nucleic. Acids. Res.* **26**, 3358-3363

Domachowske, J. B., Dyer, K. D., Bonville, C. A. & Rosenberg, H. F. (1998b) Recombinant human eosinophil-derived neurotoxin/RNase 2 functions as an effective antiviral agent against respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* **177**, 1458-1464.

Domachowske, J. B. & Rosenberg, H. F. (1999) Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 298-309

Durack, D. T., Sumi, S. M. & Klebanoff, S. J. (1979) Neurotoxicity of human eosinophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 1443-1447.

- Dvorak, A. M., Letourneau, L., Login, G. R., Weller, P. F. & Ackerman, S. J. (1988) Ultrastructural localization of the Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase) to a distinct crystalloid-free granule population in mature human eosinophils. *Blood* **72**, 150-158.
- Dvorak, A. M. (1991) Subcellular morphology and biochemistry of eosinophils, a "Blood Cell Biochemistry: Megakaryocytes, Platelets, Macrophages and Eosinophils" (Harris JR ed) pp237-344 Plenum Press, London
- Eftink, M. R. & Biltonen R. L. (1983) Energetics of ribonuclease A catalysis. 1. pH, ionic strength and solvent isotope dependence of the hydrolysis of cytidine cyclic 2',3'-phosphate. *Biochemistry* **22**, 5123-5134.
- Eftink, M. R & Biltonen, R. L. (1987) Pancreatic ribonuclease A: The most studied endoribonuclease a "Hydrolytic Enzymes" (Elsevier Science Publishers) pp 333-375 Amsterdam, New York and Oxford
- Egesten, A. & Malm, J. (1998) Eosinophil leukocyte degranulation in response to serum-opsinized beads: C5a and platelet-activating factor enhance ECP release, with roles for protein kinases A and C. *Allergy*. **53** 1066-1073.
- Fersht, A. (1985) Ribonuclease a "Enzyme, Structure and Mechanism", (2<sup>nd</sup> ed. W. H. Freeman and Co.) pp 426-431 New York,
- Findlay, D., Herries, D. G., Mathias, A. P., Rabin, B. R. & Ross, C. A. (1961) The active site and mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease. *Nature* **190**, 781-785
- Fredens, K., Dahl, R. & Venge, P. (1982) The Gordon phenomenon induced by the eosinophil cationic protein and eosinophil protein X. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **70**, 361-366
- Fredens, K., Dybdahl, H., Dahl, R. & Baandrup, U. (1988) Extracellular deposit of the cationic proteins ECP and EPX in tissue infiltrations of eosinophils related to tissue damage. *APMIS* **96**, 711-719
- Fujisawa, T., Abu-Ghazaleh, R., Kita, H., Sanderson, C. J. & Gleich, G. J. (1990) Regulatory effect of cytokines on eosinophil degranulation. *J Immunol.* **144**, 642-646.
- Ganz, T & Lehrer, R. I. (1998) Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 41-44
- Garofalo, R., Kimpen, J. L., Welliver, R. C. & Ogra, P. L. (1992) Eosinophil degranulation in the respiratory tract during naturally-acquired respiratory syncytial virus infection. *J. Pediatr.* **120**, 28-32
- Gaur, D., Swaminathan, S. & Batra, J. K. (2001) Interaction of human pancreatic ribonuclease with human ribonuclease inhibitor. Generation of inhibitor-resistant cytotoxicity variants. *J. Biol. Chem.* **27**, 24978-24984

Gibson, P. G., Woolley, K. L., Carty, K., Murree-Allen, K. & Saltos, N. (1998) Induced sputum eosinophil cationic protein (ECP) measurement in asthma and chronic obstructive airway disease (COAD). *Clin. Exp. Allergy*. **28**, 1081-1088

Giembycz, M. A. & Lindsay, M. A. (1999) Pharmacology of the Eosinophil. *Pharmacol. Rev.* **51**, 213-340.

Gleich, G. J., Loegering, D. A., Bell, M. P., Checkel, J. L., Ackerman, S. J. & McKean, D. J. (1986) Biochemical and functional similarities between human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein: homology with ribonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3146-3150

Gordon, M. H. (1933) Hodgkin's Disease: a pathogenic agent in the glands and its application in diagnosis. *Br. Med. J.* **1**, 641-644

Grebski, E., Graf, C., Hinz, G., Wüthrich, B. & Medici, T. C. (1998) Eosinophil cationic protein in sputum is dependent on temperature and time. *Eur. Respir. J.* **11**, 734-737

Gullberg, U., Widegren, B., Arnason, U., Egesten, A. & Olsson, I. (1986) The cytotoxic eosinophil cationic protein (ECP) has ribonuclease activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**, 1239-1242.

Hällgren, R., Terent, A., Venge, P. (1983) Eosinophil cationic protein (ECP) in the cerebrospinal fluid. *J. Neurol. Sci.* **58**, 57-71.

Hällgren, R., Bjelle, A. & Venge, P. (1984) Eosinophil cationic protein in inflammatory synovial effusions as evidence of eosinophil involvement. *Ann. Rheum. Dis.* **43**, 556-562

Hällgren, R., Bjermer, L., Lundgren, R. & Venge, P. (1989) The eosinophil component of the alveolitis in idiopathic pulmonary fibrosis. Signs of eosinophil activation in the lung are related to impaired lung function. *Am. Rev. Respir. Dis.* **139**, 373-377

Hamann, K. J., Barker, R. L., Loegering, D. A & Gleich, G. J. (1987) Comparative toxicity of purified human eosinophil granule proteins for newborn larvae of *Trichinella spiralis*. *J. Parasitol.* **73**, 523-529

Hamann, K. J., Ten, R. M., Loegering, D. A., Jenkins, R. B., Heise, M.T., Schad, C.R., Pease, L. R., Gleich, G. J. & Barker, R. L. (1990a) Structure and chromosome localization of the human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein genes: evidence for intronless coding sequences in the ribonuclease gene superfamily. *Genomics* **7**, 535-546.

Hamann, K. J., Gleich, G. J., Checkel, J. L., Loegering, D. A., McCall, J. W., & Barker, R. L. (1990b) *In vitro* killing of microfilariae of *Brugia pahangi* and *Brugia malayi* by eosinophil granule proteins. *J. Immunol.* **144**, 3166-3173

Hancock, R. E. & Lehrer, R. (1998) Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends. Biotechnol.* **16**, 82-88

- Hancock, R. E. & Chapple, D. S. (1999) Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1317-1323
- Handen, J. S. & Rosenberg, H. F. (1997) Intronic enhancer activity of the eosinophil-derived neurotoxin (*RNS2*) and eosinophil cationic protein (*RNS3*) genes is mediated by and NFAT-1 consensus binding sequence. *J. Biol. Chem.* **272**, 1665-1669
- Harder, J. & Schröder, J. M. (2002) RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J. Biol. Chem.* **48**, 46779-46784
- Harper, J. W. & Vallee, B. L. (1989) A covalent angiogenin/ribonuclease hybrid with a fourth disulfide bond generated by regional mutagenesis *Biochemistry* **28**, 1875-1884.
- Harrison, A. M., Bonville, C. A., Rosenberg, H. F. & Domachowske, J. B. (1999) Respiratory syncytial virus-induced chemokine expression in the lower airways: eosinophil recruitment and degranulation. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **159**, 1918-1924
- Herschlag, D. (1994) Ribonuclease revisited: Catalysis via the classical general acid-base mechanism or a triester-like mechanism ?. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11631-11635
- Hofsteenge, J., Muller, D. R., de Beer, T., Loffler, A., Richter, W. J. & Vliegenthart, J. F. (1994) New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us. *Biochemistry* **33** 13524-13530
- Hu, G.-F., Riordan, J. F. & Vallee, B. L. (1997) A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 2204-2209
- Irie, M. & Ohgi, K. (2001) Ribonuclease T2. *Methods. Enzymol.* **341**, 42-55.
- Iwama, M., Kunihiro, M. Ohgi, K. & Irie, M (1981) Purification and properties of human urine ribonucleases. *J. Biochem.* **89**, 1005-1016
- Jahnsen, F. L., Brandtzaeg, P. & Halstensen, T. S. (1994) Monoclonal antibody EG2 does not provide reliable immunohistochemical discrimination between resting and activated eosinophils. *J. Immunol. Methods.* **175**, 23-36
- Janin, A., Torpier, G., Courtin, P., Capron, M., Prin, L., Tonnel, A. B., Hatron, P. Y. & Gosselin, B. (1993) Segregation of eosinophil proteins in alveolar macrophage compartment sinchronic eosinophilic pneumonia. *Thorax* **48**, 57-62
- Karawajczyk, M., Pauksen, K., Peterson, C. G., Eklund, E. & Venge, P. (1995) The differential release of eosinophil granule protein. Studies on patients with acute bacterial and viral infections. *Clin. Exp. Allergy* **25**, 713-719.
- Kimata, H., Yoshida, A., Ishioka, C., Jiang, Y. & Mikawa, H. (1992) Eosinophil cationic protein inhibits immunoglobulin production and proliferation *in vitro* in human plasma cells. *Cell. Immunol.* **141**, 422-432

Klimek, L. & Rasp, G (1999) Norm values for eosinophil cationic protein in nasal secretions: influence of specimen collection. *Clin. Exp. Allergy*, **29**, 367-374

Kobe, B. & Deisenhofer, J. (1995) A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature*. **374**, 183-186

Kurachi, K., Davie, E. W., Strydom, D. J., Riordan, J. F. & Vallee, B. L. (1985) Sequence of the cDNA and gene for angiogenin, a human angiogenesis factor. *Biochemistry*. **24**, 5494-5499

Landre, J. B., Hewett, P. W., Olivot, J. M., Friedl, P., Ko, Y., Sachinidis, A., Moenner, M. (2002) Human endothelial cells selectively express large amounts of pancreatic-type ribonuclease (RNase 1). *J. Cell. Biochem*. **86**, 540-552

Ledoux, L.(1955) Action of ribonuclease on certain ascites tumours. *Nature* **175**, 258-259

Lehrer, R. I., Szklarek, D., Barton, A., Ganz, T., Hamann, K. J. & Gleich, G. J (1989) Antibacterial properties of eosinophil major basic protein and eosinophil cationic protein. *J. Immunol*. **142**, 4428-4434

Lucey, D. R., Nicholson-Weller, A. & Weller, P. F. (1989) Mature human eosinophils have the capacity to express HLA-DR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1348-1351

Lundgren, J. D. & Shelhamer, J. H. (1990) Pathogenesis of airway mucus hypersecretion. *J. Allergy. Clin. Immunol*. **85**, 399-417.

Lundgren, J. D., Davey, R. T. Jr, Lundgren, B., Mullol, J., Marom, Z., Logun, C., Baraniuk, J., Kaliner, M. A. & Shelhamer, J. H. (1991) Eosinophil cationic protein stimulates and major basic protein inhibits airway mucus secretion. *J. Allergy. Clin. Immunol*. **87**, 689-698

Mackenzie, C. D., Ramalho-Pinto, F. J., McLaren, D. J. & Smithers, S. R. (1977) Antibody mediated adherence of rat eosinophils to schistosomula of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *Clin. Exp. Immunol*. **30**, 97-104

Maeda, T., Kitazoe, M., Tada, H., de Llorens, R., Salomon, D. S., Ueda, M., Yamada, H. & Seno, M. (2002a) Growth inhibition of mammalian cells by eosinophil cationic protein. *Eur. J. Biochem*. **269**, 307-316

Maeda, T., Mahara, K., Kitazoe, M., Futami, J., Takidani, A., Kosaka, M., Tada, H, Seno, M. & Yamada, H (2002b) RNase 3 (ECP) Is an extraordinarily stable protein among human pancreatic-type RNases. *J. Biochem*. **132**, 737-742

Mallorqui-Fernandez, G., Pous, J., Peracaula, R., Aymami, J., Maeda, T., Tada, H., Yamada, H., Seno, M., de Llorens, R., Gomis-Ruth. F. X. & Coll, M. (2000) Three-dimensional crystal structure of human eosinophil cationic protein (RNase 3) at 1.75 Å resolution. *J. Mol. Biol*. **300**, 1297-1307

Maloy, W. L. & Kari, U. P. (1995) Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers* **37**, 105-122

- Marchiori, F., Borin, G. & Moroder, L. (1974) Studies on ribonuclease S': the role of lysine-7 for activation of S-protein. *Int. J. Protein. Peptide. Res.* **6**, 419-434
- Marks, G. B., Kjellerby, J., Luczynska, C. M. & Burney, P. G. (1998) Serum eosinophil cationic protein: distribution and reproducibility in a randomly selected sample of men living in rural Norfolk, UK. *Clin. Exp. Allergy.* **28**, 1345-1350
- Mawhorter, S. D., Kazura, J. W. & Boom, W. H. (1994) Human eosinophils as antigen presenting cells: relative efficiency for superantigen and antigen induced CD4+T-cell proliferation. *Immunology* **81**, 584-591
- McEwen, B. J. (1992) Eosinophils: a review. *Vet. Res. Commun.* **16**, 11- 44
- McLaren, D. J. & Ramalho-Pinto, F. J. (1979) Eosinophil-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* *in vitro*: synergistic effect of antibody and complement. *J. Immunol.* **123**, 1431-1438
- McLaren, D. J., McKean, J. R., Olsson, I., Venge, P. & Kay, A. B. (1981) Morphological studies on the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by human eosinophil and neutrophil cationic proteins *in vitro*. *Parasite. Immunol.* **3**, 359-373
- McLaren, D. J., Peterson, C. G. & Venge, P. (1984) *Schistosoma mansoni*: further studies of the interaction between schistosomula and granulocyte-derived cationic proteins *in vitro*. *Parasitology* **88**, 491-503
- Mishra, N. C. "Molecular Biology of Nucleases." CRC Press, Boca Raton, FL, 1995
- Mizuta, K., Awazu, S., Yasuda, T. & Kishi, K. (1990) Purification and characterization of three ribonucleases from human kidney: comparison with urine ribonucleases. *Arch. Biochem. Biophys.* **281**, 144-151
- Moenner, M., Gusse, M., Hatzi, E. & Badet, J. (1994) The widespread expression of angiogenin in different human cells suggests a biological function not only related to angiogenesis. *Eur. J. Biochem.* **226**, 483-490
- Molina, H. A., Kierszenbaum, F., Hamann, K. J. and Gleich, G. J. (1988) Toxic effects produced or mediated by human eosinophil granule components on *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **38**, 327-334
- Molina, H. A. & Kierszenbaum, F. (1989) Interaction of human eosinophils or neutrophils with *Trypanosoma cruzi* *in vitro* causes bystander cardiac cell damage. *Immunology.* **66**, 289-295
- Montan, P. G. & van Hage-Hamsten, M. (1996) Eosinophil cationic protein in tears in allergic conjunctivitis. *Br. J. Ophthalmol.* **80** 556-560
- Moroianu, J. & Riordan, J. F. (1994) Nuclear translocation of angiogenin in proliferating endothelial cells is essential to its angiogenic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 1677-1681



Motojima, S., Frigas, E., Loegering, D. A. & Gleich, G. J. (1989) Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium *in vitro*. *Am. Rev. Respir. Dis.* **139**, 801-805.

Nakajima, H., Loegering, D. A., Kita, H., Kephart, G. M. & Gleich, G. J. (1999) Reactivity of monoclonal antibodies EG1 and EG2 with eosinophils and their granule proteins. *J. Leukoc. Biol.* **66**, 447-454

Olson, K. A., French, T. C., Vallee, B. L. & Fett, J. W. (1994) A monoclonal antibody to human angiogenin suppresses tumor growth in athymic mice. *Cancer Res.* **54**, 4576-4579.

Olson, K. A., Fett, J. W., French, T. C., Key, M. E. & Vallee, B. L. (1995) Angiogenin antagonists prevent tumor growth *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 442-446.

Owen, W. F., Soberman, R. J., Yoshimoto, T., Sheffer, A. L., Lewis, R. A. & Austen, K. F. (1987) Synthesis and release of leukotriene C<sub>4</sub> by human eosinophils. *J. Immunol.* **138**, 532-538

Parés, X., Nogués, M. V., de Llorens, R. & Cuchillo, C. M. (1991) Structure and function of ribonuclease A binding subsites. *Essays. Biochem.* **26**, 89-103

Parmley, R. T. & Spicer, S. S. (1974) Cytochemical and ultrastructural identification of a small type granule in human late eosinophils. *Lab. Invest.* **30**, 557-567

Parry, S. K., Liu, Y., Clarke, A. E. & Newbigin, Ed. (1997) S-RNases and other plant extracellular ribonucleases a "Ribonucleases, structures and functions" ( G. D' Alessio and J. F. Riordan eds) pp. 305-341 Academic press, New York.

Patella, V., de Crescenzo, G., Ciccarelli, A., Marino, I., Adt, M. & Marone, G. (1995) Human heart mast cells: a definitive case of mast cell heterogeneity. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* **106**, 386-393.

Patella, V., de Crescenzo, G., Marinò, I., Genovese, A., Adt, M., Gleich, G. J. & Marone, G. (1996) Eosinophil granule proteins activate human heart mast cells. *J. Immunol.* **157**, 1219-1225.

Persson, T., Andersson, P., Bodelsson, M., Laurell, M., Malm, J. & Egesten, A (2001) Bactericidal activity of human eosinophilic granulocytes against *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **69**, 3591-3596.

Peters, M. S., Gleich, G. J., Dunnette, S. L. & Fukuda, T. (1988) Ultrastructural study of eosinophils from patients with the hypereosinophilic syndrome: A morphological basis of hypodense eosinophils. *Blood* **71**, 780-785.

Peterson, C. G., Skoog, V. & Venge, P. (1986) Human eosinophil cationic proteins (ECP and EPX) and their suppressive effects on lymphocyte proliferation. *Immunobiology.* **171**, 1-13.

Peterson, C. G. & Venge, P. 1987 Interaction and complex-formation between the eosinophil cationic protein and alpha 2-macroglobulin. *Biochem J.* **1** 781-787

- Piccoli, R., Di Gaetano, S., De Lorenzo, C., Grauso, M., Monaco, C., Spalletti-Cernia, D., Laccetti, P., Cinátl, J., Matousek, J. & 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**, 7768-7773
- Pin, I., Gibson, P. G., Kolendowicz, R., Girgis-Gabardo, A., Denburg, J. A., Hargreave, F. E. & Dolovich, J. (1992) Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* **47**, 25-29
- Pizzichini, E., Pizzichini, M. M., Efthimiadis, A., Dolovich, J. & Hargreave, F. E. (1997) Measuring airway inflammation in asthma: eosinophils and eosinophilic cationic protein in induced sputum compared with peripheral blood. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **99**, 539-544
- Popov, T., Gottschalk, R., Kolendowicz, R., Dolovich, J., Powers, P. & Hargreave, F. E. (1994) The evaluation of a cell dispersion method of sputum examination *Clin. Exp. Allergy.* **24**, 778-783.
- Ramalho-Pinto, F. J., McLaren, D. J. & Smithers, S. R. (1978) Complement mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by rat eosinophils *in vitro*. *J. Exp. Med.* **147**, 147-156
- Reimert, C. M., Venge, P., Kharazmi, A. & Bendtzen, K. (1991) Detection of eosinophil cationic protein (ECP) by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods.* **138**, 285-290
- Reimert, C. M., Poulsen, L. K., Bindslev-Jensen, C., Kharazmi, A. & Bendtzen, K. (1993) Measurement of eosinophil cationic protein (ECP) and eosinophil protein X/ eosinophil derived neurotoxin (EPX/EDN). Time and temperature dependent spontaneous release *in vitro* demands standardized sample processing. *J. Immunol. Methods.* **166**, 183-190
- Ribó, M., Beintema, J. J., Osset, M., Fernández, E., Bravo, J., De Llorens, R. & Cuchillo, C. M. (1994) Heterogeneity in the glycosylation pattern of human pancreatic ribonuclease. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* **375**, 357-363
- Richards, F.M & Wyckoff, H.W. (1971) Bovine Pancreatic Ribonuclease a "The Enzymes" (Ed. Boyer P. D.) pp 647-806 Academic Press, New York
- Riordan, J. F. (1997) Structure and function of angiogenin a "Ribonucleases, structures and functions" (G. D'Alessio and J. F. Riordan eds) pp 445-489. Academic press, New York
- Roberts, G. C., Dennis, E. A., Meadows, D. H., Cohen, J. S. & Jardetzky, O. (1969) The mechanism of action of ribonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **62**, 1151-1158.
- Rosenberg, H. F. & Tiffany, H. L. (1994) Characterization of the eosinophil granule proteins recognized by the activation-specific antibody EG2. *J. Leukoc. Biol.* **56**, 502-506.

Rosenberg, H. F. & Dyer, K. D. (1995a) Human ribonuclease 4 (RNase 4): coding sequence, chromosomal localization and identification of two distinct transcripts in human somatic tissues. *Nucl. Acids. Res.* **23**, 4290-4295

Rosenberg, H. F. & Dyer, K. D. (1995b) Eosinophil cationic protein and eosinophil-derived neurotoxin. Evolution of novel function in a primate ribonuclease gene family. *J. Biol. Chem.* **270**, 21539-21544

Rosenberg, H. F. (1995) Recombinant human eosinophil cationic protein. Ribonuclease activity is not essential for cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **270**, 7876-7881

Rosenberg, H. F., Dyer, K. D., Tiffany, H. L. & Gonzalez, M. (1995) Rapid evolution of a unique family of primate ribonuclease genes. *Nat. Genet.* **10**, 219-223

Rosenberg, H. F. & Dyer, K. D. (1996) Molecular cloning and characterization of a novel human ribonuclease (RNase K6): increasing diversity in the enlarging ribonuclease gene family. *Nucleic. Acid. Res.* **24**, 3507-3513

Rosenberg, H. F. & Domachowske, J. B. (1999) Eosinophils, ribonucleases and host defense: solving the puzzle. *Immunol. Res.* **20**, 261-274

Rosenberg, H. F. & Domachowske, J. B. (2001) Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. *J. Leukoc. Biol.* **70**, 691-698.

Shapiro, R., Fett, J. W., Strydom, D. J. & Vallee, B. L. (1986a) Isolation and characterization of a human colon carcinoma-secreted enzyme with pancreatic ribonuclease-like activity. *Biochemistry* **25**, 7255-7264

Shapiro, R., Riordan, J. F. & Vallee, B. L. (1986b) Characteristic ribonucleolytic activity of human angiogenin. *Biochemistry* **25**, 3527-3532

Shapiro, R., Strydom, D. J., Olson, K. A. & Vallee, B. L. (1987) Isolation of angiogenin from normal human plasma. *Biochemistry* **26**, 5141-5146

Shapiro, R. & Vallee, B. L. (1989) Site-directed mutagenesis of histidine-13 and histidine-114 of human angiogenin. Alanine derivatives inhibit angiogenin-induced angiogenesis. *Biochemistry* **28**, 7401-7408

Shapiro, R. & Vallee, B. L. (1991) Interaction of human placental ribonuclease with placental ribonuclease inhibitor. *Biochemistry* **30**, 2246-55

Sierakowska, H. & Shugar, D. (1977) Mammalian nucleolytic enzymes. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* **20**, 59-130.

Slifman, N. R., Loegering, D. A., McKean, D. J. & Gleich, G. J. (1986) Ribonuclease activity associated with human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein. *J. Immunol.* **137**, 2913-2917

- Slifman, N. R., Venge, P., Peterson, C. G., McKean, D. J. & Gleich, G. J. (1989) Human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil protein-X are likely the same protein. *J. Immunol.* **143**, 2317-2322
- Sorrentino, S., Tucker, G. K. & Glitz, D. G. (1988) Purification and characterization of a ribonuclease from human liver. *J. Biol. Chem.* **263**, 16125-16131
- Sorrentino, S. & Glitz, D. G. (1991) Ribonuclease activity and substrate preference of human eosinophil cationic protein (ECP). *FEBS Lett.* **288**, 23-26.
- Sorrentino, S., Glitz, D. G., Hamann, K. J., Loegering, D. A., Checkel, J. L. & Gleich, G. J. (1992) Eosinophil-derived neurotoxin and human liver ribonuclease. Identity of structure and linkage of neurotoxicity to nuclease activity. *J. Biol. Chem.* **267**, 14859-14865.
- Sorrentino, S. & Libonati, M. (1994) Human pancreatic-type and nonpancreatic-type ribonucleases: a direct side-by-side comparison of their catalytic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **312**, 340-348.
- Spry, C. J., Davies, J., Tai, P. C., Olsen, E. G., Oakley, C. M. & Goodwin, J. F. (1983) Clinical features of fifteen patients with the hypereosinophilic syndrome. *Q. J. Med.* **52**, 1-22
- Strydom, D. J., Fett, J. W., Lobb, R. R., Alderman, E. M., Bethune, J. L., Riordan, J. F. & Vallee, B. L. (1985) Amino acid sequence of human tumor derived angiogenin. *Biochemistry* **24**, 5486- 5494.
- Sur, S., Glitz, D. G., Kita, H., Kujawa, S. M., Peterson, E. A., Weiler, D. A., Kephart, G. M., Wagner, J. M., George, T. J., Gleich, G. J. & Leiferman, K. M. (1998) Localization of eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein in neutrophilic leukocyte. *J. Leukoc. Biol.* **63**, 715-722.
- Suzuki, M., Saxena, S. K., Boix, E., Prill, R. J., Vasandani, V. M., Ladner, J. E., Sung, C. & Youle, R. J. (1999) Engineering receptor mediated cytotoxicity into human ribonucleases by steric blockade of inhibitor interaction. *Nat. Biotechnol.* **17**, 265-270
- Svensson, C., Andersson, M., Persson, C. G., Venge, P., Alkner, U. & Pipkorn, U. (1990) Albumin, bradykinins, and eosinophil cationic protein on the nasal mucosal surface in patients with hay fever during natural allergen exposure. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **85**, 828-833
- Tai, P.-C., Hayes, D. J., Clark, J. B. & Spry, C. J. (1982) Toxic effects of human eosinophil products on isolated rat heart cells *in vitro*. *Biochem. J.* **204**, 75-80.
- Tai, P.-C., Spry, C. J. F., Peterson, C., Venge, P. & Olsson, I. (1984) Monoclonal antibodies distinguish between storage and secreted forms of eosinophil cationic protein. *Nature* **309**, 182-184
- Tai, P. C., Ackerman, S. J., Spry, C. J. F., Dunnette, S., Olsen, E. G. & Gleich, G. J. (1987) Deposits of eosinophil granule proteins in cardiac tissues of patients with eosinophilic endomyocardial disease. *Lancet* **21**, 643-647

Takafuji, S., Tadokoro, K., Ito, K. & Nakagawa, T. (1998) Release of granule proteins from human eosinophils stimulated with mast-cell mediators. *Allergy* **53**, 951-956

Tiffany, H. L., Handen, J. S. & Rosenberg, H. F. (1996) Enhanced expression of the eosinophil-derived neurotoxin ribonuclease (RNS2) gene requires interaction between the promoter and intron. *J. Biol. Chem.* **271**, 12387-12393

Todd, R., Donoff, B.R., Chiang, T., Chou, M. Y., Elovic, A., Gallagher, G. T. & Wong, D. T. (1991) The eosinophil as a cellular source of transforming growth factor alpha in healing cutaneous wounds. *Am. J. Pathol.* **138**, 1307-1313

Tossi, A., Sandri, L. & Giangaspero, A. (2000) Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **55**, 4-30

Trocmé, S. D., Hallberg, C. K., Gill, K. S., Gleich, G. J., Tying, S. K. & Brysk, M. M. (1997) Effects of eosinophil granule proteins on human corneal epithelial cell viability and morphology. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **38**, 593-599

Turner, J. C., Jackson, H. Jr. & Parker, F. Jr. (1938) The etiologic relation of the eosinophil to the Gordon phenomenon in Hodgkin's disease. *Am. J. Med. Sci.* **195**, 27-33

Usher, D. A., Richardson, D. I. & Eckstein, F. (1970) Absolute stereochemistry of the second step of ribonuclease action. *Nature* **228**, 663-665.

Venge, P., Dahl, R. & Hällgren, R. (1979) Enhancement of factor XII dependent reactions by eosinophil cationic protein. *Thromb. Res.* **14**, 641-649

Venge P. (1998) Eosinophils a "Asthma: basic Mechanism and clinical management" (Barnes P, Rodgers, I. A., Thomson, N. C. eds) pp 141-157 3rd edn. London: Academic Press,:

Venge, P., Byström, J., Carlson, M., Håkansson, L., Karawaczyk, M., Peterson, C., Sevéus, L. & Trulsson, A. (1999) Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. *Clin. Exp. Allergy.* **29**, 1172-1186

Vicentini, A. M., Kieffer, B., Matthies, R., Meyhack, B., Hemmings, B. A., Stone, S. R. & Hofsteenge J. (1990) Protein chemical and kinetic characterization of recombinant porcine ribonuclease inhibitor expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **29**, 8827-8834

Vignola, A. M., Chanez, P., Campbell, A. M., Souques, F., Lebel, B., Enander, I., Bousquet, J. (1998) Airway inflammation in mild intermittent and in persistent asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **157**, 403-409

Weickmann, J. L., Elson, M. & Glitz, D. G. (1981) Purification and characterization of human pancreatic ribonuclease. *Biochemistry* **20**, 1272-1278

- Weiler, J. M., Edens, R. E. & Gleich, G. J. (1992) Eosinophil granule cationic proteins regulate complement. I. Activity on the alternative pathway. *J. Immunol.* **149**, 643-648
- Weiler, J. M., Edens, R. E., Bell, C. S. & Gleich, G. J. (1995) Eosinophil granule cationic proteins regulate the classical pathway of complement. *Immunology* **84**, 213-219
- Weller, P. F. & Dvorak, A. M. (1985) Arachidonic acid incorporation by cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. *Blood* **65**, 1269-1274
- Wlodawer, A. & Sjölin, L. (1983) Structure of ribonuclease A: results of a joint neutron and X-ray refinement at 2.0 Å resolution. *Biochemistry* **22**, 2720-2728.
- Wong, D. T., Weller, P. F., Galli, S. J., Elovic, A., Rand, T. H., Gallagher, G. T., Chiang, T., Chou, M.Y., Matossian, K, McBride, J., et al. (1990) Human eosinophils express transforming growth factor alpha. *J. Exp. Med.* **172**, 673-681
- Yasuda, T., Mizuta, K., Sato, W. & Kishi, K. (1990) Purification and characterization of a ribonuclease from human spleen. Immunological and enzymological comparison with nonsecretory ribonuclease from human urine. *Eur. J. Biochem.* **191**, 523-529
- Yasuda, T., Nadano, D., Takeshita, H. & Kishi, K. (1993) Two distinct secretory ribonucleases from human cerebrum: purification, characterization and relationships to other ribonucleases. *Biochem. J.* **296**, 617-625
- Young, J. D., Peterson, C. G., Venge, P. & Cohn, Z. A. (1986) Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature.* **321**, 613-616
- Zewe, M., Rybak, S. M., Dubel, S., Coy, J. F., Welschof, M., Newton, D. L. & Little, M. (1997) Cloning and cytotoxicity of a human pancreatic RNase immunofusion. *Immunotechnology.* **3**, 127-136.
- Zhang, J., Dyer, K. D. & Rosenberg, H. F. (2002) RNase 8, a novel RNase A superfamily ribonuclease expressed uniquely in placenta. *Nucleic. Acids. Res.* **30**, 1169-1175
- Zhang, J., Dyer, K. D. & Rosenberg, H. F. (2003) Human RNase 7: a new cationic ribonuclease of the RNase superfamily. *Nucleic. Acids. Res.* **31**, 602-607
- Zhou, H.-M. & Strydom, D. J. (1993) The amino acid sequence of human ribonuclease 4, a highly conserved ribonuclease that cleaves specifically on the 3' side of uridine. *Eur. J. Biochem.* **217**, 401-410