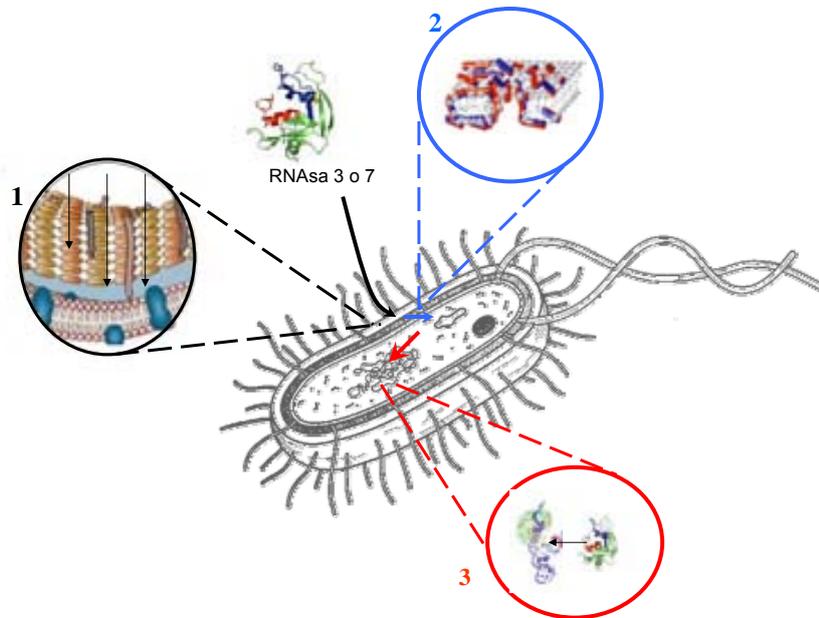




Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Biociencias

**Caracterización de la actividad bactericida de la proteína catiónica de eosinófilos (RNasa 3/ECP) y la RNasa derivada de epidermis (RNasa 7). Estudio por proteólisis limitada y mutagénesis dirigida.**



**Tesis doctoral**

**Daniel Sánchez Centellas**

2011



***Caracterización de la actividad bactericida de la proteína catiónica de eosinófilos (RNasa 3/ECP) y la RNasa derivada de epidermis (RNasa 7). Estudio por proteólisis limitada y mutagénesis dirigida.***

Tesis doctoral presentada por **Daniel Sánchez Centellas** bajo la dirección de la **Dra. Ester Boix Borràs**, profesora agregada del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Fac. de Biociencias, Universidad Autónoma de Barcelona.

Dra. Ester Boix

Daniel Sánchez

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Biociencias  
Universidad Autónoma de Barcelona



# ÍNDICE

<b>1 Resumen.....</b>	<b>pág. 1</b>
<b>2 Introducción</b>	
2.1 La superfamilia de la RNasa A.....	pág. 3
2.2 Ribonucleasas con actividad antibacteriana.....	pág. 7
2.3 Otras propiedades antipatógenas de las ribonucleasas.....	pág. 8
2.3.1 Actividad antiparasitaria.....	pág. 8
2.3.2 Actividad antifúngica.....	pág. 10
2.3.3. Actividad antivírica.....	pág. 10
2.4 Citotoxicidad frente a células del huésped.....	pág. 11
2.5 Mecanismo de acción de las ribonucleasas antimicrobianas .....	pág. 14
2.5.1 Acción a nivel de las membranas celulares.....	pág. 14
2.5.2 Acción a nivel de la pared celular bacteriana.....	pág. 16
2.5.3 Particularidades de las especies bacterianas	
Gram -positivo y Gram -negativo .....	pág. 19
2.6 Ribonucleasa 3 o Proteína Catiónica de Eosinófilos (RNasa 3/ECP).....	pág. 20
2.6.1 Localización y expresión.....	pág. 20
2.6.2 Propiedades, estructura génica y modificaciones	
postraduccionales .....	pág.22
2.6.3 Propiedades relacionadas con la actividad	
antibacteriana.....	pág.35
2.6.4 Péptidos con actividad antibacteriana .....	pág.46
2.7 RNasa 7 o RNasa derivada de epidermis.....	pág. 48
2.7.1 Propiedades y estructura génica .....	pág. 48
2.7.2 Localización tisular y presencia en patologías.....	pág. 53
2.8 Similitudes entre la RNasa 3 y RNasa 7 .....	pág. 57

2.9 Inhibidor proteico de Ribonucleasas.....	pág. 59
<b>3 Objetivos.....</b>	<b>pág. 61</b>
<b>4 Materiales y métodos.....</b>	<b>pág. 64</b>
4.1 Métodos en Biología Molecular	
4.1.1 Métodos básicos .....	pág. 64
4.1.2 Mutagénesis dirigida.....	pág. 69
4.2 Métodos de caracterización de proteínas	
4.2.1 Expresión recombinante de las RNasa 3/ECP y RNasa 7 en <i>E. coli</i> BL21 (DE3) y purificación de las Proteínas a partir de los cuerpos de inclusión.....	pág. 70
4.2.2 Expresión recombinante a pequeña escala en forma soluble de las RNasa 3, RNasa 7 y variantes en <i>E. coli Rosetta Gami</i> .....	pág. 76
4.2.3 Desnaturalización irreversible de la RNasa 3/ECP.....	pág. 77
4.2.4 Escisión química y enzimática de la RNasa 3/ECP.....	pág. 79
4.2.4.1 Proteólisis de la RNasa 3/ECP por Lys-endoproteasa.....	pág. 79
4.2.4.1.1 Separación y purificación de péptidos resultantes de la proteólisis.....	pág. 80
4.2.4.2.Digestión con BrCN de la RNasa 3/ECP.....	pág. 82
4.2.4.2.1.Separación cromatográfica de los fragmentos de escisión de la RNasa 3/ECP con BrCN.....	pág. 83
4.2.5 Métodos cromatográficos de separación y purificación de las proteínas recombinantes.....	pág. 86
4.2.5.1 Cromatografía de intercambio catiónico para la purificación de las RNasas 3 y 7 .....	pág. 86
4.2.5.2 Cromatografía de fase reversa para la purificación de las RNasas 3 y 7.....	pág. 87

4.2.5.3	Análisis final de las muestras.....	pág. 88
4.2.6	Electroforesis de proteínas.....	pág. 88
4.2.6.1	Tinción de <i>Coomassie</i> .....	pág. 90
4.2.6.2	Tinción con nitrato de plata.....	pág. 91
4.2.6.3	Zimograma.....	pág. 92
4.2.6.4	<i>Western Blot</i> .....	pág. 94
4.2.7	Determinación de la concentración de proteína.....	pág. 95
4.2.7.1	Método espectrofotométrico.....	pág. 95
4.2.7.2	Método de Bradford.....	pág. 96
4.2.7.3	Método <i>Micro BCA</i> .....	pág. 96
4.3	Estudios de la actividad antibacteriana.....	pág. 97
4.3.1	Cultivo y crecimiento de las cepas de <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> ...	pág. 97
4.3.2	Ensayos de viabilidad bacteriana.....	pág. 99
4.3.2.1	Ensayo por recuento de unidades formadoras de colonias.....	pág. 99
4.3.2.2	Viabilidad por cuantificación de ATP ( <i>BacTiterGlo</i> ).....	pág. 99
4.4.	Estudio de la actividad RNasa .....	pág. 102
4.4.1	Obtención del RNA bacteriano. ....	pág.102
4.4.2	Digestión del RNA.....	pág.106
4.4.3	Electroforesis microfluídica para el análisis del RNA.....	pág.108
4.5	Cristalización de proteínas para estudios estructurales por difracción de rayos X.....	pág.114
4.5.1	Metodología de la gota colgante ( <i>hanging drop</i> ).....	pág.116
4.5.2	Metodología de la gota sentada ( <i>sitting drop</i> ).....	pág.118



5.3.1 Análisis de la actividad bactericida de las RNasas recombinantes en cultivos de <i>E.coli</i> BL21 y en <i>S.aureus</i> A502.....	pág.155
5.3.1.1 Análisis de la actividad bactericida de la RNasa 3/ECP por adición (efecto exógeno).....	pág.156
5.3.1.1.1 Estudio de la potencial implicación de la actividad catalítica de la RNasa 3/ECP en su actividad bactericida mediante el mutante de centro activo ECPH128N.....	pág.160
5.3.1.2 Análisis de la actividad bactericida de la RNasa 7 por adición (efecto exógeno) .....	pág.164
5.3.1.3. Análisis de la lisis celular por detección de la liberación de RNasa bacteriana endógena por zimograma.....	pág.166
5.3.1.3.1 Estudio comparativo entre la RNasa 3/ECP nativa y la variante RNasa 3/ECP-H128N .....	pág 170
5.3.2 Análisis de la actividad bactericida mediante la expresión de la RNasa 3/ECP a nivel endógeno en <i>E.coli Rosetta Gami</i> .....	pág. 171
5.3.2.1 Selección de los clones.....	pág.172
5.3.2.2 <i>Western Blot</i> para la detección de la proteína.....	pág.173
5.3.2.3 Zimograma para la confirmación de la actividad ribonucleasa.....	pág.174
5.3.2.4 Efectos de las proteínas a nivel endógeno.....	pág.175
5.3.2.4.1 Densidad de crecimiento del cultivo bacteriano.....	pág.176
5.3.2.4.2 Viabilidad celular bacteriana por cuantificación de ATP .....	pág.177
5.3.3 Cribado de mutantes de RNasa 3/ECP y variantes de la RNasa 7 a nivel de expresión endógena en la cepa <i>Rosetta Gami</i> de <i>E.coli</i> .....	pág.177
5.3.3.1 Expresión y actividad antibacteriana de la RNasa 3/ECP y sus mutantes en la cepa <i>Rosetta Gami</i> de <i>E.coli</i> .....	pág.177
5.3.3.2 Expresión y actividad antibacteriana de la RNasa 7 y sus variantes en la cepa <i>Rosetta Gami</i> de <i>E.coli</i> .....	pág.181
5.3.4 Estudios de la degradación del RNA por las Ribonucleasas.....	pág.182
5.3.4.1 Consideraciones metodológicas.....	pág.183
5.3.4.1.1 Experimentos con el inhibidor proteico de placenta de RNasas.....	pág.189

5.3.4.2 Estudios del efecto de la adición exógena de la RNasa 3/ECP y la RNasa 7 sobre el RNA intracelular bacteriano .....	pág.194
5.3.4.2.1 Actividad degradativa sobre el RNA celular bacteriano de la RNasa 3/ECP.....	pág.195
5.3.4.2.2 Efecto comparativo de la RNasa 3/ECP nativa y variante de la RNasa 3/ECP defectiva en el centro activo (ECP-H128N) sobre el RNA.....	pág.197
5.3.4.2.3 Actividad degradativa de la RNasa7 sobre el RNA celular bacteriano .....	pág.199
5.3.4.3 Experimentos comparativos mediante expresión endógena de las RNasa 3/ECP y RNasa 7.....	pág.200
5.3.4.3.1. Comparación de la RNasa 3/ECP y la variante ECPH128N.....	pág.200
5.3.4.3.2 Estudio de la RNasa 7 y sus variantes.....	pág.201
5.3.4.4 Experimentos con preparaciones de RNA.....	pág.203
5.3.4.4.1 Determinación de rangos de concentración de trabajo y cinéticas comparativas para la RNasa 3/ECP.....	pág.204
5.3.4.4.2 Comparativa entre la RNasa 3 y la RNasa 7 en su actividad degradativa sobre el RNA...	pág.208
5.3.4.4.3 Zimogramas para el estudio comparativo de los procesos de lisis celular bacteriana degradación de RNA .....	pág.212
5.3.4.5 Experimentos comparativos según la fase de crecimiento bacteriano y otras condiciones de ensayo.....	pág.213
5.3.4.6. Comparación de la actividad RNasa en cultivos bacterianos y en extracciones de RNA celular purificado .....	pág.219
5.4 Resultados de la cristalización de proteínas.....	pág.220

<b>6</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>pág.222</b>
6.1	Identificación de la región N-terminal con actividad antimicrobiana	
6.1.1	Digestión enzimática y química de la RNasa 3/ECP.....	pág.222
6.1.2	Actividad antibacteriana de los fragmentos N-terminales de la RNasa 3/ECP y relación con los mutantes de la región N-terminal.....	pág.224
6.1.3	Relación del cribado de mutantes de la RNasa 3/ECP por su actividad antibacteriana en <i>Rosetta Gami</i> y las sustituciones de la región N-terminal.....	pág.229
6.2	Caracterización de la actividad antibacteriana de la RNasa 3/ECP.....	pág.230
6.2.1	Viabilidad celular bacteriana.....	pág.230
6.2.2	Agregación celular bacteriana.....	pág.233
6.2.3	Efectos de la expresión endógena de RNasa 3/ECP y mutantes estudiados.....	pág.234
6.2.4	Efectos sobre el RNA celular bacteriano .....	pág.236
6.2.5	Aproximaciones teóricas sobre potenciales interacciones de la RNasa 3/ECP.....	pág.238
6.3	Caracterización de la actividad antibacteriana de la RNasa 7.....	pág.240
6.3.1	Análisis de las variedades P75Y93 y A75H93 de la RNasa7.....	pág.240
6.4	Papel potencial de la actividad ribonucleasa de la RNasa 3/ECP y la RNasa 7 en su actividad antibacteriana.....	pág.248
6.4.1	Análisis del proceso de degradación del RNA celular por la actividad ribonucleasa.....	pág.251
6.5	Optimización de las condiciones de cristalización de RNasa 3/ECP.....	pág.257
<b>7.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>pág.258</b>
<b>8.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>pág.263</b>
<b>9.</b>	<b>Apéndice.....</b>	<b>pág.275</b>
<b>10.</b>	<b>Abreviaturas.....</b>	<b>pág.285</b>

<b>11. Anexos</b> .....	pág. 289
11.1. Publicaciones relacionadas con la tesis .....	pág. 291
11.2. Publicación principal de la tesis .....	pág. 293
<b>12. Agradecimientos</b> .....	pág.309

## 1. Resumen

La superfamilia de las ribonucleasa A incluye proteínas de propiedades muy diversas, entre ellas RNasas altamente catiónicas con propiedades antipatógenas como: bactericida, antihelmíntica y antivírica. Las dos principales RNasas con capacidad bactericida son la RNasa 3, también conocida como Proteína Catiónica de Eosinófilos, (RNasa 3/ECP), y la RNasa 7, denominada también RNasa derivada de piel. La RNasa 3/ECP fue originalmente identificada como factor liberado por eosinófilos y sus niveles fisiológicos son marcadores ya establecidos en el asma y en varios tipos de inflamaciones y/o infecciones.

En este proyecto se plantea establecer cuál es el mecanismo molecular de acción bactericida de la RNasa 3, que presenta abundancia de argininas en su superficie, así como estudiar la potencial participación de la actividad ribonucleasa en el proceso. La RNasa 7 es otra ribonucleasa implicada en el sistema inmunitario de defensa, de carácter igualmente catiónico, en este caso debido a la abundancia de lisinas en su superficie. El conocimiento de esta proteína procede de su purificación a partir de un extracto de epidermis. Su actividad ribonucleasa en las descamaciones epiteliales puede ser uno de los principales factores de degradaciones del RNA en las manipulaciones de laboratorio. Su mecanismo de acción aún está por estudiar en detalle. Esta proteína presenta una actividad RNasa superior en relación a la RNasa 3/ECP y al mismo tiempo una actividad bactericida ligeramente superior.

La hipótesis de trabajo para el estudio de la RNasa 3/ECP es la identificación de las regiones determinantes de su actividad bactericida. Para ello se han realizado varias aproximaciones: a) la utilización de péptidos resultantes de escisión química y enzimática limitada b) la utilización de péptidos sintéticos y c) la utilización de mutantes en modelos de expresión a pequeña escala que expresan la proteína en su forma soluble.

Por otra parte, el presente trabajo representa la puesta a punto del primer protocolo de expresión de RNasa 7 recombinante con elevado rendimiento. Se realizó un estudio comparativo entre las dos variantes de la RNasa 7 identificadas a partir de cDNA de queratinocitos (variante P75Y93) y de cDNA proveniente de riñón (variante A75H93).

La hipótesis de trabajo para el estudio de la RNasa 7 es la caracterización de su actividad antibacteriana para las dos variantes identificadas comparándolas entre ambas y al mismo tiempo con la RNasa 3. Las propiedades diferenciales de estas proteínas nos facilitarán la comprensión de su función *in vivo*, durante el proceso de respuesta inmunitaria.

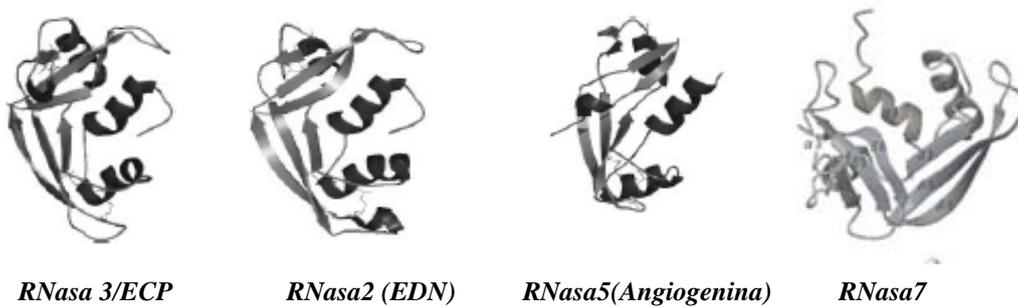
Adicionalmente se pretende poner a punto, nuevos protocolos de cocrystalización de la RNasa 3/ECP con potenciales ligandos naturales, para identificar los residuos de interacción con componentes de la pared bacteriana.

Para todos estos estudios se utilizaron las siguientes metodologías:

- Para la obtención de péptidos derivados de la RNasa 3/ECP se diseñó un protocolo de escisión enzimática y química. Los péptidos se separaron por gel filtración o por cromatografía de fase reversa.
- La ECP/RNasa 3 y la RNasa 7 recombinantes se expresaron en *E. coli* BL21DE3.
- Se clonó el gen de la RNasa 7 en el plásmido de expresión pET11c para su expresión a gran escala como proteína recombinante. El protocolo se ha optimizado en nuestro laboratorio. En dicha expresión la proteína recombinante se agrega formando cuerpos de inclusión, y se recupera mediante su solubilización y procesos de replegamiento y posterior purificación por intercambio catiónico. La segunda variante conocida de la RNasa 7 se obtuvo por mutagénesis dirigida y se expresaron ambas de la misma manera. En caso de requerir la proteína para procesos de cristalización se purifica adicionalmente por cromatografía de fase reversa.
- Las proteínas recombinantes también fueron expresadas a pequeña escala de forma soluble en *E. coli Rosetta Gami*®, en un sistema de expresión que permite realizar un cribado de diferentes mutantes y variantes de las ribonucleasas en estudio, en función de sus efectos sobre la viabilidad del cultivo bacteriano. Dicha viabilidad celular fue evaluada mediante la cuantificación de los niveles de ATP.
- La actividad ribonucleasa de la RNasa 3/ECP y la RNasa 7 se estudiará *in vivo*, mediante extracción y análisis del RNA celular bacteriano.

## 2. Introducción

En esta introducción se incluye una revisión bibliográfica, sobre las dos proteínas de estudio RNasa 3 y RNasa 7 (Fig. 1), detallándose los aspectos moleculares que tengan una relación con el alcance del trabajo de esta tesis. Se ha presentado un breve hilo argumental que introduzca la descripción de los modelos de envueltas bacterianas, para abordar los aspectos teóricos sobre la interacción de estas proteínas para ejercer su efecto antibacteriano. Tampoco se descuidará la conexión de los estudios biológicos con las implicaciones fisiológicas y algunas aplicaciones terapéuticas.



*Fig. 1 Figuras esquemáticas de la estructura tridimensional de RNasas representativas de la superfamilia de la RNasa A, denotando la similitud estructural entre ellas. Extraído de Boix & Nogués (2007) y Huang et al (2007) para la RNasa 7.*

### 2.1 La superfamilia de la Ribonucleasa A

La superfamilia de proteínas de la Ribonucleasa A, a la que pertenecen la RNasa 7 y la RNasa 3/ECP, se distingue por ser un grupo de proteínas de cadena polipeptídica única, estabilizada por la formación de puentes disulfuro. Todas son capaces de degradar en mayor o menor grado polímeros de RNA. Todas las proteínas de esta familia comparten una homología de secuencia significativa a pesar de llevar a cabo funciones muy diferentes tanto en un mismo organismo como en diferentes especies (Cho et al, 2005; Rosenberg & Dyer, 1995)

A partir de las secuenciaciones que se hicieron en los años ochenta de las ribonucleasas, muchas de ellas identificadas inicialmente por otras propiedades y no por su actividad ribonucleasa, se pudieron incluir en una amplia familia (Beintema et al 1986, 1977). Para el genoma humano se reconocieron 8 RNasas que conservaban actividad ribonucleasa, aunque con eficiencias muy variadas.

Asimismo este grupo presenta 5 secuencias divergentes. Como ya se ha comentado, dentro de la superfamilia (Fig. 2), todas ellas conservan una serie de características comunes (Cho et al 2005, Rosenberg & Dyer, 1995) que se pasan a enumerar:

- Presencia de un péptido señal de secreción, que ayuda a vehicular la proteína naciente.
- 6 a 8 cisteínas internas en posiciones equivalentes que formarán puentes disulfuro para estabilizar la proteína.
- Dos histidinas que forman parte del centro activo.
- Una lisina conservada en la secuencia, que participa en el mecanismo de catálisis.

Se comenta a continuación las propiedades de las RNasas 2 y 3, secretadas por eosinófilos. Los eosinófilos expresan la RNasa 3/ECP, durante los procesos inflamatorios e inmunitarios. Curiosamente, los eosinófilos son un tipo celular minoritario entre los leucocitos, que no son en esencia citotóxicos y que su función es la de promover la respuesta de otros tipos celulares. En 1983 el grupo de Gleich identificó la RNasa 3/ECP en un extracto del cual se aisló previamente esta proteína denominándola proteína catiónica de eosinófilo.

Las dos RNasas de eosinófilo (RNasa 3/ECP y la RNasa2/EDN) emergen como duplicaciones génicas ocurridas en la transición de primates del Viejo Mundo al Nuevo Mundo (Fig. 3), alrededor de unos 50 millones de años atrás. Aunque todas conserven su actividad ribonucleasa, las secuencias son altamente divergentes. La conservación de la actividad ribonucleasa a lo largo de la evolución podría explicarse por su acción sobre el RNA de diversos tipos de patógenos, como por ejemplo, el caso del virus de sincitio respiratorio (SRV) tal como se apunta en la bibliografía (Domachovske et al 1998).

```

ECP      RPPQFTR AQWFAIQHIS LNPPR..... .CTIAMRAIN NYRWRCRQGN
EDN      KPPQFTW AQWFETQHIN MTSQQ..... .CTNAMQVIN NYQRRCRQGN
RK6      WPKRLTK AHWFEIQHIQ PSPLQ..... .CNRAMSGIN NYTQHCKHQG
HPR      KESR AKKFFQCHMD SDSSPSSSST YCNQMMRRRN MTQGRCKPVN
R4       QDGM YQRFLLQHVH PE.ETGSSDR YCDLMMQRRK MTLYHCKRFN
ANG      QDNSR YTFELTQHYD AKPQ.GRDDR YCESIMRRRG LT.SECKDIN

TFLRITTFANV VNVCGNQSIR CPHNRTLNNC HRSRFRVPLL HCDLINEGAQ
TFILITTFANV VNVCGNPNMT CPSNKTRKNC HHSQSQVPLI HCNLITTFSPQ
TFIHDSEFQNV ARVCDLLSIV CKNRR..HNC HQSSKPVNMT DCRLT..SG.
TFVHEPLVIDV QNVCFQEKVT CKNGQG..NC YKSNSSMHIT DCRLTNGSR.
TFIHEDIWNI  RSICSTTNIQ CKNGKM..NC H..EGVVKVT DCRDTGSSR.
TFIHGNKRSI  KAICENKNG.. ..NPHRE.NL RISKSSFQVT TCKLHGGSP.

NISNCRYADR PGRRFYVVAC DNRD.PRDSP RYPVVPVHLD TTI
NISNCRYAQT PANMFYIVAC DNRDQRRDPP QYPVVPVHLD RII
KYPCRYSA A QYKFFIVAC DPPQ..KSDP FYKLVPHLD SIL
.YPNCRYRTS PKERHIVAC EGS..... ..PYVPVHFD ATV
.APNCRYRAI ASTRRVVIAC EGN..... ..PQVPVHFD G
.WPFCYRAT AGFRNVVVAC ENG..... ....LPVHLD QSIFRRP

```

Figura 2. Alineación de secuencias de aminoácidos de seis miembros humanos, definiendo cinco linajes distintos de la familia génica de la RNasa A. Las cajas sombreadas adjuntan ocho cisteínas e histidinas catalíticas y lisinas; las cajas abiertas adjuntan otros residuos conservados adicionales. ECP: proteína catiónica de eosinófilo, EDN: neurotoxina derivada de eosinófilo; RK6: ribonucleasa K6; HPR: ribonucleasa Pancreática Humana; R4: ribonucleasa 4; ANG: angiogenina. Figura reproducida de Rosenberg and Dyer (1995).

Otros papeles fisiológicos para estas ribonucleasas radican en la modulación de respuestas inmunológicas o en general del desarrollo de otros tipos celulares, como es el caso de la angiogenina, el caso de la EDN o de la RNasa 3/ECP.

Otro estudio evolutivo de Zhang, Rosenberg y colaboradores (2002), refrendado por la revisión de Wang y colaboradores (2007), de los ancestros evolutivos de la EDN y la RNasa 3/ECP, indicaron la participación de la Arg132 y la Phe64 en el incremento de la actividad ribonucleasa para EDN.

En relación a los estudios evolutivos de las RNasas de eosinófilo en mamíferos es necesario mencionar las EAR's (*eosinophil associated ribonucleases*). Entre las RNasas de eosinófilo (EAR), características de especies roedoras, existe un grado de divergencia interespecie muy elevada (Fig. 3a) (Zhang & Rosenberg 2002). Por otra parte, encontramos RNasas bien

diferenciadas en filums lejanos que también se encuentran implicadas en la defensa inmune innata (Cho et al, 2005).

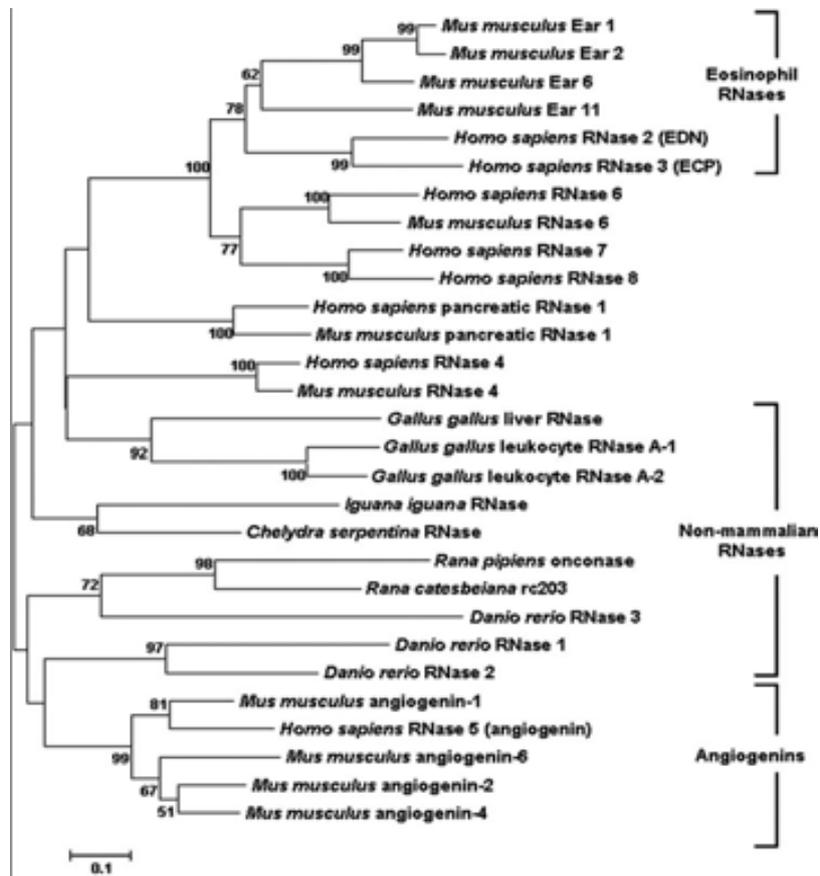


Figura 3a. Árbol filogenético que presenta las relaciones entre RNAsas de diferentes linajes, generado por el software Mega 4.0 Evolutionary Genetics software (<http://www.megasoftware.net/>) Extraído de Zhang & Rosenberg 2002

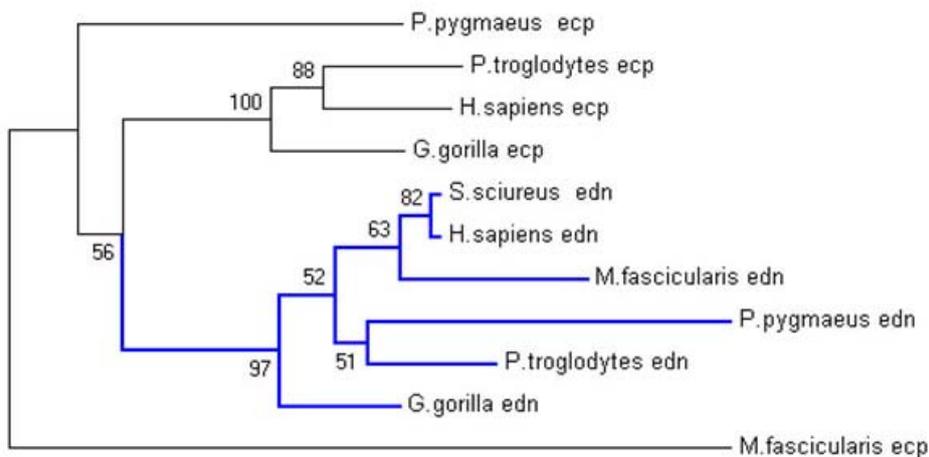


Figura 3b. Árbol filogenético más detallado dentro de la evolución de los primates. Extraído de Wang et al (2007).

## 2.2 Ribonucleasas con actividad antibacteriana

La RNasa 3, denominada también RNasa 3/ECP (*eosinophil cationic protein*) y la RNasa 7 (*skin derived ribonuclease*) son ribonucleasas de la superfamilia de la Ribonucleasa A con una identidad de secuencia del 37% (Fig. 4). Ambas poseen una actividad antibacteriana de similares características (Torrent et al, 2009a). Ambas proteínas tienen una actividad catalítica sobre el enlace 3'5'fosfodiéster del RNA. La RNasa 3 comparte ancestro común e identidad de secuencia elevada con la Ribonucleasa 2 o EDN (*eosinophil derived neurotoxin*), aunque esta última no presenta una capacidad antibacteriana significativa (Boix & Nogués, 2007).

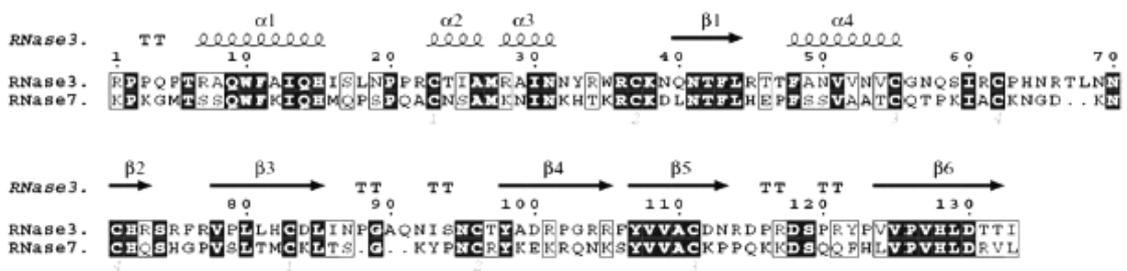


Figura 4. Comparación de alineamiento de secuencias entre la RNasa 3 y RNasa 7 con indicación de las estructuras secundarias para la RNasa 3 (Torrent et al, 2009a)

A lo largo de la evolución, en los primates, se postula que los genes para estas proteínas surgieron de duplicaciones de un gen ancestral común de la superfamilia de la ribonucleasa A (Rosenberg et al 2008, Zhang et al 2002). Dichas duplicaciones acumularon independientemente una serie de mutaciones que se traducirían en un alto número de aminoácidos catiónicos en la superficie, ya fuera lisinas como en el caso de la RNasa 7 o argininas como en el caso de la RNasa 3/ECP. Este proceso proporcionó probablemente una actividad antibacteriana, antihelmíntica y citotóxica por interacciones físicas con la pared de las bacterias y otros patógenos que presentan en su superficie una carga negativa neta, así como ocurre con las células cancerígenas. Esta propiedad catiónica resultó ser más importante para la función de la proteína que la propia actividad ribonucleasa en cuanto a su actividad citotóxica y por ello esta

propiedad habría sido seleccionada favorablemente a lo largo de la evolución. El carácter catiónico de estas proteínas es *per se* un rasgo biofísico distintivo compartido con numerosos péptidos antimicrobianos (Andreu & Rivas 1998), lo cual parece indicar que existe una evolución confluyente en este aspecto y que el mecanismo molecular de acción sobre las bacterias pudiera ser parecido. Esto constituirá una de las hipótesis de trabajo para realizar la investigación con péptidos provenientes de la fragmentación de la RNasa 3/ECP. El mecanismo molecular de su acción bactericida aún no se conoce completamente a pesar de su identificación ya en los años 70 (Olsson et al 1972) y el estudio de su actividad RNasa (Gullberg et al, 1983). Tampoco se han podido dilucidar totalmente los pormenores sobre la implicación de la actividad ribonucleasa en su función antibacteriana o cual es el mecanismo preciso para saltar las barreras de las diferentes envueltas bacterianas como es el caso de la cubierta de lipopolisacáridos en las bacterias Gram-negativo. Para poder analizar la contribución de las diferentes envueltas de la célula procariota, se presentará un breve repaso de sus propiedades, así como los estudios previos de interacción de las dos RNasas con la pared bacteriana.

### **2.3 Otras propiedades antipatógenas de las ribonucleasas**

En esta sección se resumirá los efectos citotóxicos de las dos ribonucleasas sobre otros patógenos, tanto frente a parásitos de tipo helmíntico, como protozoos y virus. Este planteamiento, anticipa el hecho de que las ribonucleasas atacan un amplísimo rango filogenético de patógenos de manera más o menos inespecífica lo cual la hace apta para aparecer dentro del arsenal inmunológico de la respuesta innata. La actividad citotóxica frente a organismos procariotas se detallará en una sección posterior.

#### **2.3.1 Actividad antiparasitaria**

Esta actividad es una de las propiedades biológicas de la RNasa 3/ECP mejor caracterizadas, dados los numerosos datos experimentales y de hecho los más tempranos en la literatura, habiéndose iniciado por los trabajos con eosinófilos de McLaren y colaboradores (1977). Dichos autores demostraron que los

eosinófilos podían matar parásitos del género *Schistosoma*. La muerte que provocan a los parásitos, como se demostró en estudios con *Brughia* (Hamann 1990b), requiere una activación de los eosinófilos que se traduciría en liberación de factores (lo que comportaría una degranulación) inducida por la presencia de inmunoglobulinas.

McLaren y colaboradores (1978) demostraron que las proteínas catiónicas de eosinófilos eran las implicadas de manera equimolar, en lesionar y matar *S. mansoni*, cosa que acontecía con mayor virulencia que otros fármacos específicos para este tipo de patología.

Es destacable que la sensibilidad de estos parásitos a las ribonucleasas catiónicas depende de su estadio de desarrollo, siendo el estadio temprano, el más susceptible a la RNasa 3/ECP. En ese estado la proteína ataca la membrana del tegumento. Estudios posteriores, como el del grupo de Ackerman y colaboradores (1985), demostraron una mortalidad de los parásitos de 8 a 10 veces mayor cuando se trataba con RNasa 3/ECP que con cualquiera de las otras proteínas catiónicas de eosinófilo (con concentraciones de 0.3 a 2  $\mu$ M) a pesar de que la proteína MBP (*major basic protein*), también presente en los gránulos de secreción, es mayoritaria en las secreciones de los eosinófilos.

En lo que respecta a protozoos, el género *Trypanosoma* es susceptible de ser atacado por eosinófilos por dos vías: la internalización de las proteínas catiónicas de eosinófilo en el fagolisosoma del tripanosoma o la adhesión directa del eosinófilo a la superficie del parásito. Según el trabajo de Molina y colaboradores (1988) se pueden discernir dos mecanismos diferentes en la acción sobre los parásitos en función de las inhibiciones que se pueden dar: la inhibición de los efectos de la RNasa 3/ECP y MBP por polianiones indicaría un mecanismo electrostático mientras que el inhibidor de ribonucleasas (RI) suprime los efectos de la proteína EDN (*eosinophil derived neurotoxin*), deduciéndose que es la actividad ribonucleasa de esta última proteína, la principal característica para realizar su acción antiparasitaria.

Otros estudios sitúan a la RNasa 3/ECP como proteína citotóxica más potente que la EDN en el caso de *Trichinella spiralis*, *Schistosoma mansoni*, *Brugia Pahangi* y *Brugia malayi* (Hamann et al 1990b, Mc Laren et al 1986). Estos trabajos mostraron la incapacidad del inhibidor de ribonucleasas para eliminar la toxicidad de la molécula, y la eficacia de los polianiones como agentes bloqueantes. Esto lleva a la conclusión de que los grupos catiónicos de la RNasa 3/ECP interaccionan con la superficie electronegativa de los parásitos como inicio de su mecanismo molecular de acción antiparasitaria.

### 2.3.2 Actividad antifúngica

Se conocen ampliamente una familia de proteínas denominadas ribotoxinas (Kao et al 1995) que son capaces de penetrar en varios tipos celulares y lisarlos en función de su actividad ribonucleasa sobre el RNA ribosómico, la cual cosa inhibe la síntesis de proteínas. Las ribotoxinas comparten además la particularidad de atravesar membranas de forma inespecífica. Sin embargo, en la superfamilia de la RNasa A sólo se ha descrito actividad antifúngica para la RNasa 7 (Huang et al, 2007).

### 2.3.3 Actividad antivírica

La actividad contra virus, en células infectadas, está ampliamente establecida, ya desde el trabajo de Domachovske y colaboradores (1998) en el que se utiliza el modelo de infección del virus del sincitio pulmonar sobre células Hep-2. Para ese fin se expresó la proteína por transfección mediante baculovirus en células de insecto, esto se hizo así para asegurar la expresión de la proteína recombinante con las modificaciones postraduccionales lo más parecidas posibles a las modificaciones en las células humanas, principalmente en relación a las glicosilaciones. Los resultados probaron una actividad antivírica moderada de la RNasa 3/ECP (con respecto a la EDN) capaz de reducir el título vírico más de 6 veces. Dicha actividad era totalmente dependiente de la actividad ribonucleasa, tanto por paralelismo entre ambas actividades como por silenciamiento de la actividad antivírica con la inhibición de la actividad ribonucleasa.

## 2.4 Citotoxicidad frente a células del huésped

Está ampliamente establecido que los eosinófilos están implicados en procesos inflamatorios patológicos, llegando incluso a provocar reacciones exacerbadas con lesión de células del propio organismo huésped (Koh et al, 2007). Esto ocurre en el asma o en las infecciones por parásitos. También se ha observado su participación en otras patologías como los procesos patológicos digestivos (Garcia-Rubio et al, 2007). Estos eventos de lesión al propio organismo están mediados por las proteínas de sus gránulos de secreción.

Estudios inmunohistoquímicos han demostrado una gran correlación entre los niveles de RNasa 3/ECP y las necrosis de diferentes órganos afectados de inflamación mediada por eosinófilos (corazón, intestino, piel y vejiga urinaria) como indica la revisión de Fredens y colaboradores (1991).

Los experimentos de Tai y colaboradores (1982) con sobrenadantes de extracciones de eosinófilos (pero no de neutrófilos) demostraron toxicidad sobre cultivos de células cardíacas de rata y el efecto era inhibido por la heparina. Ese efecto se explicó por un aumento en la absorción de oxígeno, inducido por un aumento anómalo de la permeabilidad de las membranas. Podía establecerse una relación de los efectos citotóxicos de la RNasa 3/ECP con sus efectos biofísicos sobre las membranas.

Otros estudios (Molina & Kierszenbaum, 1988) encontraron depósitos de las proteínas catiónicas de eosinófilo en mioblastos lesionados tras incubarlos con eosinófilos y *Trypanosoma cruzi*. También se encuentra daño cardiovascular asociado a la hipereosinofilia crónica, asociado a su vez a las secreciones de eosinófilos (Tai et al 1982).

Una lesión celular que requiere especial interés es la neurotoxicidad descrita ya en 1933 por Gordon. Se inyectó un extracto de nódulos linfáticos de la enfermedad de Hodgkin a conejos, los cuales presentaron descoordinación, ataxia y luego muerte. Posteriormente, en 1938 Turner y colaboradores

atribuirían este efecto (denominado efecto Gordon) a los eosinófilos, describiéndolo como una afectación de las células de Purkinje y degeneración de la sustancia blanca del cerebelo, lo cual afectaría dramáticamente a la función motora. El efecto Gordon sería reproducido en un trabajo de Fredens y colaboradores (1988) con un mínimo de 0.1 µg de RNasa 3/ECP y un mínimo de 3.5 µg para la EDN. A pesar de no aparecer dicho efecto en situaciones fisiológicas, sí que se han constatado anomalías neurológicas secundarias que han sido provocadas por una eosinofilia previa (Chusid et al 1975) o casos en los que se encuentran niveles altos de RNasa 3/ECP en líquido cerebroespinal en casos de desórdenes neuronales (Hällgren et al 1983).

Por otra parte, comentar que existen efectos sobre el desarrollo y la división celular de la RNasa 3/ECP sobre algunos tipos celulares, como es el caso de la inhibición sobre el crecimiento células de mamífero que han descrito Maeda y colaboradores (2002) o como el trabajo de Carreras et al (2005) en el cual se estudia la contribución de los residuos de superficie de la proteína en la inhibición del crecimiento de células de mamífero en cultivo, siendo los catiónicos de importancia crítica. No obstante otros efectos pueden ser estimuladores de la actividad inmunitaria y desencadenan la respuesta inflamatoria (Venge, 2004). El último trabajo al respecto de efectos sobre células propias corresponde a Zagai y colaboradores (2009). Los autores se preguntaban que efectores podían ser los que estaban induciendo la migración que normalmente se da en fibroblastos para generar las fibrosis características en los procesos asmáticos. Teniendo en cuenta el hecho de que los eosinófilos están implicados en el proceso consideraron la hipótesis de que estuviese implicada la RNasa 3/ECP. Pudieron observar que la RNasa 3/ECP estimulaba la migración de los fibroblastos, además de inducir algunos cambios morfológicos. Para contrastar estos resultados probaron además como el secuestro de la RNasa 3/ECP por anticuerpos específicos inhibía sus efectos quimiotácticos sobre los fibroblastos.

El peso específico del papel de la RNasa 3/ECP en la defensa inmunológica en general, resulta difícil de establecer dado que no es producida por el principal tipo celular leucocítico. Por otra parte, no queda claro contra qué

tipo de infección los eosinófilos están presentes en niveles significativos y tienen un rol más relevante. Según los primeros trabajos ya comentados, parecía que la actividad que podía conferir principal protagonismo a la RNasa 3/ECP podría ser la antihelmíntica. Sin embargo, numerosos estudios desde el trabajo de Lehrer y colaboradores (1989) han ido consolidando las propiedades antibacterianas de la RNasa 3/ECP (Rosenberg 1995, Carreras et al 2003). Uno de los últimos trabajos, (Yousefi et al, 2008), describe una nueva capacidad antibacteriana del eosinófilo en el que estaría implicada de manera crucial la RNasa 3/ECP así como el DNA mitocondrial del eosinófilo. Dicho DNA, que sería literalmente catapultado hacia la infección (de hecho el mecanismo se dispara por señales inmunológicas asociadas) serviría de matriz en la que las proteínas de los gránulos de secreción tendrían un acceso facilitado a las bacterias objetivo de su actividad. Por otra parte esa “malla” de DNA facilita también procesos de fagocitosis sobre las bacterias.

Otro estudio que confiere una importancia cada vez mayor a la acción bactericida es el publicado por Svenson y Wenneras (2005) en el que se relaciona la activación diferencial de los eosinófilos en función del taxón bacteriano que esté infectando, más concretamente la producción y activación de la RNasa 3/ECP aumenta en respuesta a la presencia de bacterias Gram-negativo. Es importante citar el hecho de que donde se da mayoritariamente este tipo de respuestas es en mucosas y particularmente en mucosas y epitelios gástricos. Es probable que la extravasación de eosinófilos a otros tejidos donde actúan pueda ser más importante que su presencia en sangre. De hecho, los autores describen como el epitelio gástrico puede tapizarse de este tipo celular.

Otro peso específico, en esta ocasión más hipotético que contrastado, en la defensa inmunológica mediada por RNasa 3/ECP, se sugirió ya en el artículo de Lehrer y colaboradores (1989). Se refieren a que alguna de las acciones de la RNasa 3/ECP pudieran ser a nivel endógeno, fusionándose los gránulos de los eosinófilos con los fagolisosomas (Lehrer et al, 1989) para lisar bacterias que consigan internalizarse en los eosinófilos. En el trabajo más reciente de Ulrich y colaboradores (2008) la hipótesis de la acción endógena vuelve a esgrimirse como una posibilidad que venga además favorecida por los efectos de la

nitración de las proteínas de eosinófilos y el pH ácido de los gránulos de secreción.

### RNasa 3/ECP como marcador inflamatorio y alérgico.

La RNasa 3/ECP es utilizada como un buen marcador pronóstico del asma y de la inflamación de vías respiratorias y se correlaciona bien con parámetros ventilatorios siendo incluso más sensible que éstos para el seguimiento de la evolución de la enfermedad. Pudiéndose cuantificar los niveles en suero, plasma, esputo, saliva y lavados broncoalveolares (Koh et al, 2007). Específicamente la evaluación del esputo de vías respiratorias es un marcador más sensible de la severidad del asma que parámetros ventilatorios clásicos (y más incluso que el recuento de eosinófilos que se venía haciendo de los lavados broncoalveolares). No obstante, la recolección de muestras y condiciones de la prueba diagnóstica deben de estar muy estandarizadas y ser cuidadosas ya que parecen depender de factores como edad, fármacos, hábitos del paciente, variación estacional y otros.

## **2.5 Mecanismo de acción de las ribonucleasas antimicrobianas**

### 2.5.1 Acción a nivel de las membranas celulares

Como entidad celular, todas las bacterias (tanto Gram-positivo como Gram-negativo) poseen una bicapa lipídica con una composición particularmente más rica en fosfolípidos cargados negativamente que las eucariotas. Las bacterias Gram-negativo presentan una bicapa lipídica adicional externa a su envuelta de mureína, denominada membrana externa. Esta bicapa es mucho más permeable que la membrana interna. Dicha envuelta posee unas proteínas transmembranas denominadas porinas, que formando un complejo entre ellas forman canales pasivos. Estos canales no permiten el paso de péptidos mayores de 5000 Da (Boix & Nogués, 2007).

En lo que respecta a la capacidad de interacción de la RNasa 3/ECP con la membrana citoplasmática se han realizado estudios con liposomas modelo de membrana procariota, donde se da una íntima interacción con la superficie de la bicapa lipídica que incluye la penetración de la proteína a una determinada profundidad de la membrana (Torrent et al 2007). Este hecho, que podría explicar el inicio de la desorganización de la membrana bacteriana, es lo que fundamentará uno de los mecanismos de acción antibacteriana de la RNasa 3 y probablemente de la RNasa 7 (Torrent et al 2009a; Torrent et al., 2010). Una vez producida esa interacción íntima con la membrana de forma masiva, se produce un fenómeno de desestructuración de la membrana, incluyendo una afectación a las curvaturas de la bicapa, que llevaría al colapso de la membrana. Este mecanismo se conoce como “*carpet-like*” o “pseudo-alfombra”, un mecanismo descrito ya hace años para la acción de varios péptidos antimicrobianos helicoidales, en el cual dichas moléculas recubren la membrana provocando tensiones en su superficie (Fig. 5) (Oren et al 1998) . Se explicará el proceso en mayor extensión en el apartado relativo a la RNasa 3.

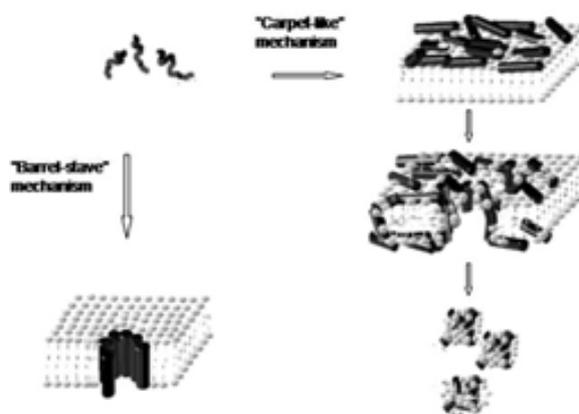


Figura 5. Dibujo esquemático de los dos mecanismos propuestos para la permeabilización de membranas por parte de péptidos antimicrobianos: “barrel stave” o “carpet-like” en el cual las hélices anfipáticas de los péptidos se disponen paralelas a la superficie de la membrana. Extraído de Oren et al (1998).

### 2.5.2 Acción a nivel de la pared celular bacteriana

En este apartado presentamos un resumen de lo conocido respecto a las estructuras que componen la pared celular bacteriana como objetivos de las ribonucleasas de nuestro estudio.

#### Mureína

La mureína o pared celular bacteriana es una estructura exclusiva de procariotas y está formada por peptidoglicanos que forman un biopolímero que cubre a toda la bacteria. Los peptidoglicanos se componen a su vez de cadenas peptídicas unidas de forma covalente a la N-acetil-glucosamina y al ácido N-acetil-murámico, entrelazadas entre ellas. La estructura general de esta envuelta y su dinámica siguen en discusión y varían entre grupos y especies de bacterias. No obstante los estudios actuales apuntan a que se forma un entramado perpendicular a la bicapa lipídica en una disposición romboidal siendo las esquinas de dichos rombos los ejes de las cadenas de glicanos y los lados de los rombos los péptido que entrelazan cada cadena (Fig. 6). La distancia entre cadenas de glicanos que precisamente dejan los puentes de péptidos, suele ser entre 30 y 40 nm, por lo que el espacio de la luz es más que suficiente para que penetre una proteína del tipo de las ribonucleasas de nuestro estudio. A pesar de que esta característica haría pensar en un paso facilitado y limpio de las ribonucleasas hacia la membrana plasmática, el entramado imbricado que presenta y la observada interacción de la RNasa 3/ECP con los peptidoglicanos (Torrent et al 2008) podrían suponer un obstáculo o en todo caso un freno para la acción directa de las ribonucleasas sobre la membrana plasmática que queda cubierta por la capa de mureína.

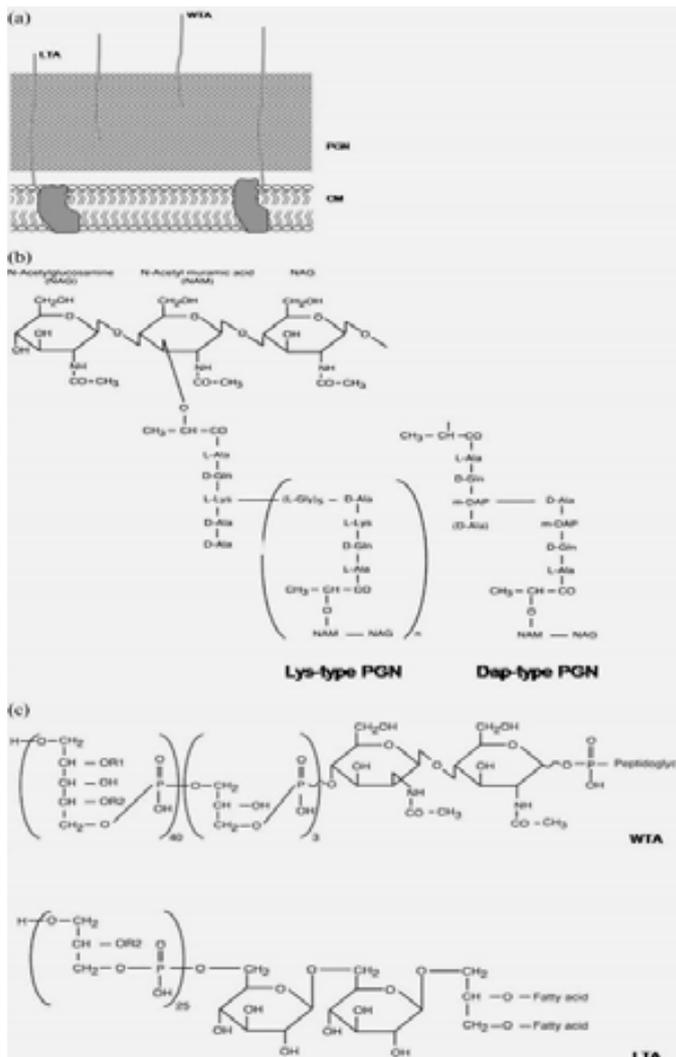


Figura 6. a) Representación gráfica de la arquitectura general común de la pared celular de las bacterias Gram-positivo. LTA (ácido lipoteicoico), WTA (ácidos teicoicos de la pared), PGN (peptidoglicanos) y CM (membrana citoplásmica). b) Representación en detalle de la estructura del peptidoglicano. c) Detalle de los ácidos teicoicos de la pared (WTA) y de los ácidos lipoteicoicos (LTA). Modificado de Fournier y colaboradores (Boix & Nogués 2007)

Este biopolímero bacteriano presenta una estructura que puede contraerse o distenderse en función de remodelaciones de la propia pared (en división celular durante la fase logarítmica de crecimiento) o de procesos de resistencia a osmosis. Este hecho hace que aumente o disminuya la luz del entramado de la estructura del peptidoglicano, confiriéndole cierta dinámica, pero en lo que se refiere a su comportamiento molecular, al estar constituido por una sola molécula es tremendamente rígido (Dimitriev et al 2004). De ahí que en la fase de crecimiento estacionario asociada a una rigidez de la mureína, las bacterias puedan ser más resistentes a la RNasa 3/ECP (Lehrer et al, 1989).

Tras estudios realizados con *Staphylococcus sp* (Dimitriev et al, 2004), a la mureína se le ha atribuido un modelo estructural tridimensional (lo que se denominaría su estructura terciaria) que se caracteriza por explicar tres características básicas:

-Un alto grado de entrecruzamiento covalente (“*cross-linking*”) entre unidades de formación de dicha envuelta.

-Una alternancia en planos consecutivos (que según el modelo al que se alude presentan un giro de 60° respecto una trama de otra).

-Un crecimiento aposicional durante el cierre del septo centrípeto.

En todo caso este modelo en bacterias Gram-positivo no sigue una estructura similar a la quitina como se ha creído hasta ahora sino que forma largas hebras cilíndricas paralelas a la membrana, formadas por hélices dextrógiras de glicanos en los que los puentes peptídicos se disponen paralelos a la membrana. Este modelo se denomina de “contrachapado” (*plywood*) (Dimitriev et al 2004) (Fig. 7). No presenta a la mureína como una estructura sencilla que repite el mismo esquema simplemente aumentando el grosor, todo al contrario, en el caso de las bacterias Gram-positivo al espesor de la pared se le suma una mayor complejidad por el número de capas superpuestas y los entrecruzamientos producidos. Es perfectamente plausible que la dificultad de paso de una molécula de tamaño considerable sea mucho mayor de lo esperado en una hipótesis asentada en la simple adición de espesor de capa.

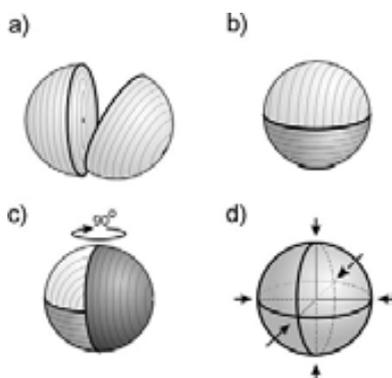


Figura 7. Relaciones entre las direcciones de los planos de división y la orientación de las cadenas de glicanos. (a) La célula de estafilococo tras la primera división. El plano de división va a través del anillo ecuatorial, y las hebras de glicanos corren concéntricamente hasta el final en ambos hemisferios. (b) La célula tras la segunda división con la subsiguiente alternancia de planos de división. (c) La célula tras la tercera división con la subsiguiente alternancia de planos de división. La flecha alrededor indica que para ver un nuevo hemisferio la imagen debe girarse 90°. (d) Tres anillos ecuatoriales producidos por alternancia de planos de división. La flecha indica la orientación vertical de las cadenas de glicanos en el modelo. (Dimitriev et al, 2004).

### 2.5.3 Particularidades de las especies bacterianas Gram-negativo y Gram-positivo

#### Lipopolisacáridos

Los lipopolisacáridos (LPS) son exclusivos de las bacterias Gram-negativo (Fig. 8). Su parte lipídica está constituida por lípidos anclados (esta parte de la molécula se denomina genéricamente el lípido A) en la membrana lipídica externa de este grupo de bacterias. El lípido A se halla interconectado al resto de las cadenas glucídicas mediante un enlace  $\beta$  1->6 a una N-acetil-glucosamina. Esta es la parte más antigénica de la molécula. Presenta hacia el exterior una serie de cadenas de glúcidos unidos también de forma covalente. En ocasiones existe un núcleo de 8 unidades de disacáridos repetitivos, llamado núcleo-O y después ramificaciones consecutivas de oligosacáridos. Esta estructura retiene muchas moléculas de agua además de quelar gran cantidad de cationes bivalentes que al mismo tiempo confieren la rigidez a esta envuelta (Boix & Nogués, 2007).

En parte por la dificultad de crear modelos para su estudio y en parte por los pocos datos disponibles, no se sabía como podrían traspasar esta barrera las ribonucleasas antibacterianas. Se puede hipotetizar que la RNasa 3/ECP, dado su carácter catiónico, puede competir con los cationes bivalentes de la propia envuelta de LPS, desplazándolos y llegando a desestabilizar la propia estructura de esta envuelta. Este es un mecanismo postulado para algunos péptidos catiónicos y por eso mismo, para la RNasa 3/ECP que tiene un carácter altamente catiónico, podría resultar muy plausible.

Cabe decir que los LPS al ser moléculas altamente antigénicas (eso implica que por si mismas pueden inducir reacciones tan severas como el choque séptico) es necesario que sean arrestada de alguna manera y de ahí que el estudio de los antibióticos catiónicos como los péptidos de origen fisiológico, los antibióticos peptídicos o la misma RNasa 3/ECP, con gran afinidad por dichas estructuras, tenga un importante potencial farmacológico en función de las posibilidades para abrir nuevas vías para el diseño de antibióticos e inhibidores de la acción del lípido A.

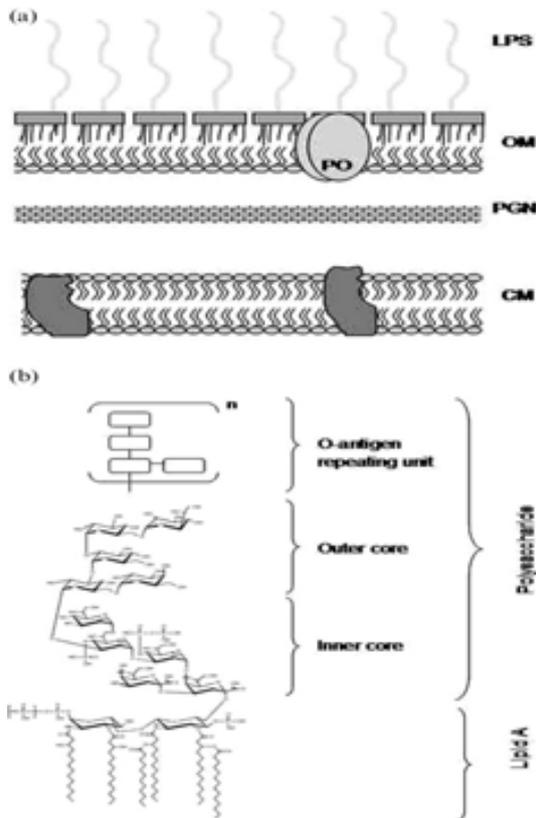


Figura 8. Representación gráfica de la arquitectura general de la pared de una bacteria Gram-negativa. LPS (lipopolisacáridos), OM (membrana externa), PGN (peptidoglicanos), CM (membrana citoplásmica) y PO (proteína porina). B. Estructura del Lipopolisacárido. Las estructuras del núcleo y el lípido A se tomaron de una porción de LPS de *E. coli* K-12. (Boix & Nogués 2007)

### Ácidos teicoicos

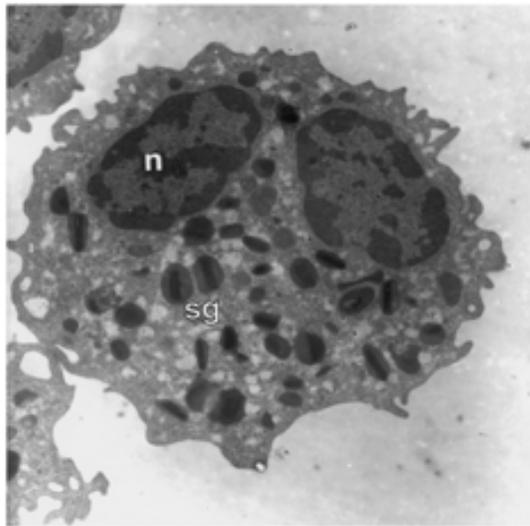
Los ácidos teicoicos, que se encuentran únicamente en las bacterias Gram-positivo, constituyen una estructura elongada variable de poliglicerolfosfato y polialcoholes que se encuentran anclados a la pared de la mureína o en la membrana interna, extendiéndose hacia el interior de la pared. Pueden constituir otra barrera considerable a la RNasa 3/ECP y la RNasa 7 por el hecho de que su presencia modifica las propiedades electromecánicas de la pared de peptidoglicano, debido a su carácter polielectrolítico.

## **2.6 RNasa 3 o Proteína Catiónica de eosinófilos (RNasa 3/ECP)**

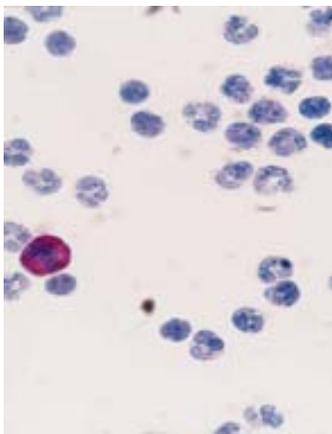
### 2.6.1 Localización y expresión

La RNasa 3/ECP se expresa principalmente en eosinófilos. Cuando es expresada, existe un mecanismo de almacenamiento en gránulos de secreción que viene dirigido por un péptido señal en el extremo N-terminal de la proteína naciente. Localizada en los gránulos específicos de eosinófilos (Figs. 9 y 10) su secreción depende de la degranulación de los eosinófilos y viene desencadenada

por mediadores como la histamina. El contenido de los gránulos es heterogéneo pero todas las proteínas de su interior comparten el carácter catiónico; de hecho la RNasa 3/ECP se encuentra compartiendo espacio con la EDN o la MBP (*major basic protein*). Las vías de degranulación son muy variadas así como la composición de los gránulos que liberan su contenido al exterior, perfilándose tras extensivos estudios que pudiera ser un proceso específico de especie (Boix & Nogués, 2007). El interior del gránulo tiene un carácter ácido que podría inducir una conformación diferente a la conformación nativa y funcional de la RNasa 3/ECP. Por otra parte, se piensa que alguna de sus modificaciones postraduccionales pueden ayudar a estabilizar a la proteína en su interior (como se comentará más adelante en el apartado de propiedades de la RNasa 3/ECP). También debería tenerse en cuenta que antes de la secreción la proteína aún se encuentra con su péptido señal, lo que comporta un pI menor y por lo tanto propiedades probablemente diferentes.



*Figura 9. Micrografía electrónica de un eosinófilo humano de circulación periférica, con un lóbulo en el núcleo (n) y dos de los muchos gránulos específicos (sg). Micrografía electrónica preparada por Egesten (Lund University, Suecia) extraído de Rosenberg & Dyer, 1995 .*



*Figura 10. Tinción inmunohistoquímica de células sanguíneas con el anticuerpo anti-RNasa 3/ECP EG2. Se puede ver una tinción diferencial del eosinófilo respecto al resto de células. Los dos neutrófilos próximos al eosinófilo muestran la misma tinción. Extraído de Rosenberg & Dyer, 1995 .*

## 2.6.2 Propiedades, estructura génica y modificaciones postraduccionales.

. La RNasa 3/ECP (nomenclatura enzimática: [3.1.26.3](#)) es una proteína de 15500 Da de masa relativa que puede variar ampliamente en función del grado de modificaciones postraduccionales que pueda presentar (hasta 21000 Da). El gen que codifica para dicha proteína se encuentra en el cromosoma 14, brazo (14q24), (Figs. 11 y 12). Se trata de un gen con 1 exón no codificante y otro codificante que produce una proteína naciente de 165 aminoácidos (incluyendo péptido señal) (Hamann et al 1990a). Ambos exones se encuentran separados por un intrón tal como se muestra en la figura 11. Tanto la secuencia del exón no codificante como la del intrón 1 potencian la actividad del promotor. En la evolución del linaje de la RNasa 3/ECP ocurrió una delección de una secuencia de 34 nucleótidos en el promotor ocurrida en primates del viejo mundo y homínidos; dicha delección se relaciona con un descenso de la actividad transcripcional (Wang et al 2007). En la activación transcripcional del gen, se postula la intervención de factores de diferenciación de eosinófilos como la proteína de unión al potenciador CCAAT, NFAT-1 y PU.1. La implicación de estos factores pueden ayudar a entender parte del papel de la RNasa 3/ECP en las funciones del eosinófilo.

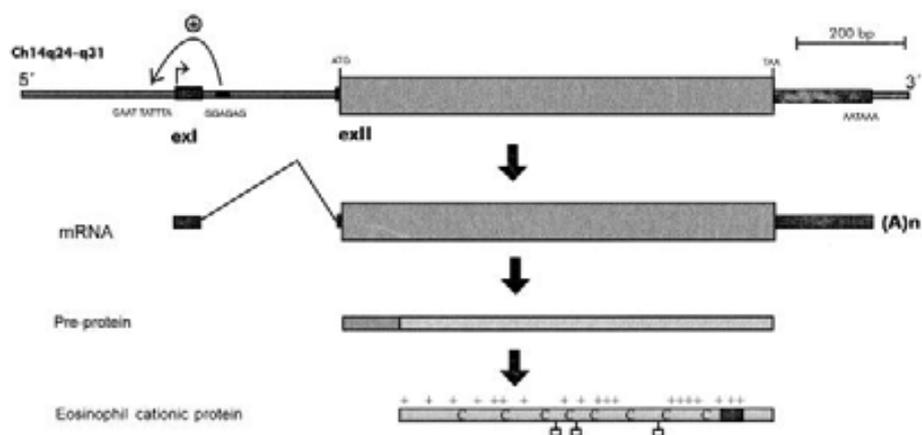


Figura 11. Representación de la estructura génica del gen de la RNasa 3/ECP humana. Extraído de Venge et al (1999). Gen localizado en el cromosoma 14, presentando dos exones, exI y exII. Un elemento en el intrón refuerza el promotor. Se indican con + los aminoácidos básicos. Las cajas indican lugares de glicosilación y las posiciones C, las de cisteínas.

Localización cromosómica: [14q24-q31](#)

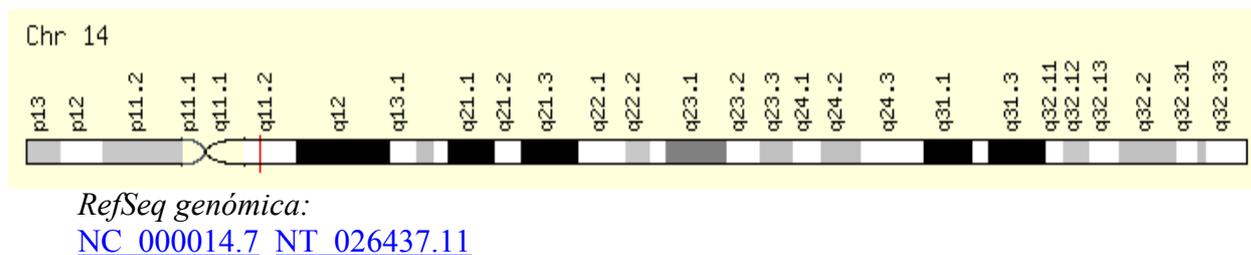


Figura 12 Descripción y localización citogenética del gen de la RNasa 3/ECP.

Como se ha avanzado en el párrafo anterior, se han descrito una serie de polimorfismos genéticos que afectarían al peso molecular de la proteína, además de poder modificar sus propiedades. Actualmente el único polimorfismo identificado en la secuencia codificante es el polimorfismo Arg97Thr (Venge et al, 1999), dicho polimorfismo introduce una secuencia de potencial glicosilación. Este hecho puede afectar a su función antibacteriana, como se explicará más adelante.

Para resumir, las principales propiedades de la RNasa 3/ECP se presenta a continuación la tabla 1.

Propiedades estructurales	Propiedades funcionales	Identidad de estructura primaria	Localizaciones
<p>Masa molecular 15500 (hasta 22000 por mod. postraduccionales.) (Venge et al, 1999)</p> <p>165 aminoácidos con péptido señal (Rosenberg et al, 1989)</p> <p>Punto isoeléctrico 11.4 (Zhang et al., 2003)</p>	<p><math>K_{cat}/K_m</math> :8500 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> con ácido oligouridílico ((Up)<sub>4</sub> U&gt;P) (Boix et al, 1999a)</p> <p>Concentración mínima inhibitoria (MIC) = 0.3-0.5 μM (Torrent et al, 2009b)</p>	<p>RNasa A: 33 %</p> <p>RNasa 7: 40 %</p> <p>RNasa 2 (EDN): 67 %</p>	<p>Eosinófilos a 0.4–17 pg/eosinófilo (Pronk &amp; Bartels 2001)</p> <p>Neutrófilos (Monteseirín et al 2007)</p>

Tabla 1. Algunas de las propiedades principales características de la RNasa 3/ECP

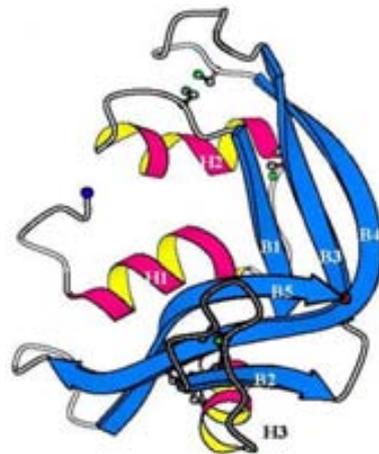
Como se ha comentado anteriormente, la proteína catiónica de eosinófilos se sintetiza con un péptido señal para la vehiculización celular. La proteína se expresa en eosinófilos y se acumula en los gránulos de secreción que son liberados por estas células como parte de los mecanismos moleculares de respuesta inmunológica innata. No obstante se ha podido comprobar que la RNasa 3/ECP se expresa en otros tipos celulares del sistema inmunitario, como los neutrófilos (Monteseirín et al, 2007) lo cual indica que puede actuar como molécula de defensa en los tejidos en los que se ha producido una infección.

Respecto al mencionado grado de glicosilación de la RNasa 3/ECP, podría tratarse de un mecanismo por el cual la proteína puede variar su citotoxicidad. Se observa como las formas más glicosiladas son las menos citotóxicas (Trulson et al 2007). El diseño de este mecanismo de activación puede tener relación con la inhibición de la toxicidad que presenta la RNasa 3/ECP para la propia célula, de manera que hasta que no se desprenda de las glicosilaciones por la actividad glicosilasa endógena y no sea secretada al exterior permanece menos activa (Trulson et al, 2007). Es de mencionar que varios artículos publicados utilizan en sus experimentos RNasa 3/ECP extraída directamente de eosinófilos, molécula funcional y estructuralmente diferente de la RNasa 3/ECP que se expresa en *E. coli* sin glicosilaciones por tecnología de ADN recombinante, como es el caso del presente trabajo.

En las últimas aproximaciones para el análisis de la heterogeneidad de especies moleculares de la RNasa 3/ECP, consecuencia de las modificaciones postraduccionales, se ha utilizado la técnica SELDI-TOF, basada en un reconocimiento antigénico de la RNasa 3/ECP previo a la espectrometría de masas que potencia la resolución de la misma (Eriksson et al, 2007). Con este método se han diferenciado siete especies moleculares diferentes. Se ha comprobado que mayoritariamente estas variantes dependen de glicosilaciones en las que se ha visto que interviene el ácido siálico, la galactosa y la N-acetilglucosamina. Dichas modificaciones pueden variar en función del estado inmunológico del individuo, dado que la glicosilasa que podría escindir las glicosilaciones de la RNasa 3/ECP *in vivo* se activa por señales inmunológicas.

### Estructura tridimensional

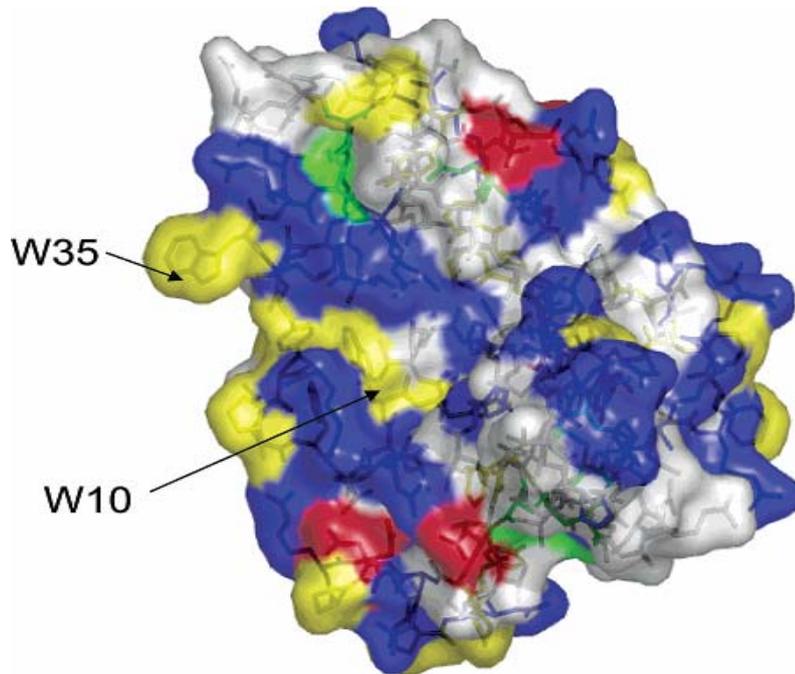
La RNasa 3/ECP consta de una cadena polipeptídica única de 165 aminoácidos (Rosenberg et al, 1989), cuyos 27 primeros del N-terminal corresponden al péptido señal. La estructura de la RNasa 3/ECP la forman tres hélices alfa y seis laminas beta conectadas por giros (“*coiled coils*”) (Mallorquí-Fernández et al, 2000, Boix et al, 1999b) en el siguiente orden: N-terminal-  $\alpha$ 1- giro-  $\alpha$ 2- giro- $\beta$ 1-  $\alpha$ 3- giro- $\beta$ 2 giro- $\beta$ 3- giro- $\beta$ 4- giro- $\beta$ 5- giro- $\beta$ 6 giro- $\beta$ 7, conformando una estructura general en forma de V (Fig. 13).



*Figura 13. Diagrama esquemático de la estructura tridimensional de la RNasa 3/ECP, extraído de Boix et al (1999b)*

Se forman varios puentes disulfuro que estabilizan la estructura, entre los siguientes pares de cisteínas: 23 con 83, 37 con 96, 55 con 111 y 62 con 71 siendo los pares 55- 111 y 23-83 los principales que permiten que la proteína tome su forma en V característica acercando residuos lejanos para formar el centro activo. A pesar de las mutaciones que dieron lugar a la cationización de la proteína y a otras numerosas sustituciones, estos puentes de cisteína se han mantenido a lo largo de la evolución, indicando la importancia estructural que tienen. Tal como se comentó, la proteína presenta expuestas al exterior un alto número de argininas (Fig. 14), en concreto 19, lo cual caracteriza su naturaleza catiónica, tanto es así que el estudio de superficie de Conelly confiere a toda la proteína una elevada carga neta positiva, con un punto isoelectrónico cercano a 11,

similar al de algunos péptidos antimicrobianos catiónicos (Andreu & Rivas, 1998).



*Figura 14. Representación molecular de la superficie de la RNasa 3/ECP. Figura diseñada de acuerdo con las coordenadas de la estructura cristalográfica de la RNasa 3/ECP, código de entrada PDB 1QMT (Boix et al 1999b). En esta representación los residuos hidrofóbicos, básicos, ácidos y cisteínas están en amarillo, azul, rojo y verde respectivamente. Se indican las localizaciones de los residuos W10 y W35. La figura se creó con el programa Pymol (DeLano Scientific LLC).*

#### Polimorfismos y modificaciones postraduccionales

Los primeros estudios que evidenciaron la heterogeneidad de la RNasa 3/ECP viene del grupo de Per Venge y colaboradores (Olsson & Venge, 1972) cuando separaron y purificaron por primera vez la RNasa 3/ECP mediante cromatografía de intercambio catiónico (Fig. 15). Tras llevar a cabo una evaluación de la heterogeneidad de la RNasa 3/ECP, pudieron dilucidar que se debían al grado de glicosilación.

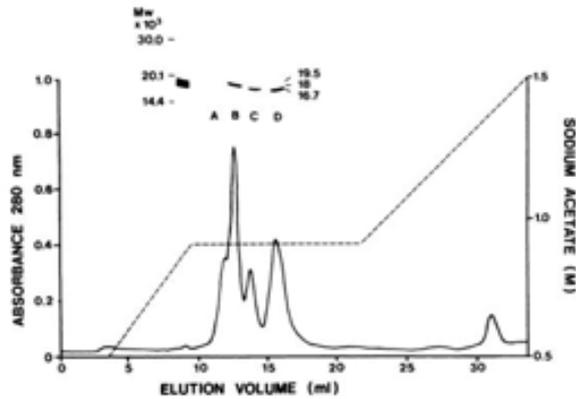


Figura 15. RNasa 3/ECP purificada de leucocitos, mediante una cromatografía preparativa. Se muestra la de intercambio catiónico por elución con acetato sódico pH 5.0. La electroforesis SDS-PAGE muestra la RNasa 3/ECP eluida en diferentes picos (de A a D). Extraído de Olsson y colaboradores (1972).

Este grupo encontró el vínculo entre esta heterogeneidad debida a las glicosilaciones y uno de los polimorfismos más notables de la RNasa 3/ECP en la población humana. En el trabajo publicado por Eriksson, Venge y colaboradores (2007) este grupo estudio extensivamente las características en cuanto a heterogeneidad del gen de la RNasa 3/ECP y entre ellas, la mutación 434 (G>C) que se encuentra en el 8% de la población escandinava. El trabajo no sólo consiguió identificar dicho polimorfismo sino que pudieron asignarlo a un pico diferencial en la separación cromatográfica de la RNasa 3/ECP en muestras de individuos con la variante correspondiente, pudiendo evaluar que además de existir diferencias moleculares también existían diferencias a nivel de sus propiedades biológicas.

Esta isoforma relativa a la mutación del nucleótido 434, se trataba de una sustitución de Arginina por Treonina en el aminoácido 97, que creaba una nueva secuencia susceptible de ser glicosilada (NXT). La proteína correspondiente (RNasa 3/ECP Arg97Thr) mostraba efectivamente un mayor grado de glicosilación. La actividad citotóxica también variaba, quedando mermada. No obstante la deglicosilación de esta isoforma permitía recuperar la actividad al mismo nivel que la ECPArg97, sin que se afectase para ello la actividad ribonucleasa. Lo cual viene a redundar el hecho de que la actividad citotóxica radica o viene condicionada por interacciones con sus aminoácidos de superficie. Una de las cuestiones clínicas asociadas al hallazgo de la isoforma ECPThr97 es que debido a su menor actividad se correlaciona con una menor predisposición a síntomas alérgicos y/o asmáticos, como así lo demuestra también el estudio poblacional.

Asimismo el estudio refiere una fuerte asociación con las defensinas, ya que en el proceso de extracción y purificación aparecían asociadas como bandas de 3KDa, que luego fueron identificadas como tales por espectrometría de masas. Otra persistencia en cuanto a divergencias de peso molecular fue la aparición persistente de bandas de 10 y 5 KDa que correspondían a fragmentos de la propia RNasa 3/ECP. Por espectrometría de masas se pudo constatar que eran fragmentos a raíz de una escisión en el aminoácido 92. Esto demuestra una susceptibilidad a una proteólisis específica que pudiera tener relación con funciones biológicas.

Finalmente lo más sorprendente del trabajo de este grupo sueco, fue que la mayor parte del *pool* de RNasa 3/ECP lo encontraron funcionalmente menos activo, lo cual parecía tener una correlación directa con la predominancia de la población de RNasa 3/ECP glicosilada. Este hecho podría relacionarse con los resultados que se obtienen de muestras de extracción directa del plasma de sujetos normales, cuyos eosinófilos no estarían *a priori* activados. El último estudio del grupo de Venge y colaboradores (Woschnagg et al, 2009), en el que se trabaja con el polimorfismo 434 (G>C), el cual determina la sustitución de la arginina 97 por una treonina, se describe como esta sustitución afecta negativamente a la citotoxicidad sobre una línea celular y que es independiente de su actividad RNasa, y no afecta significativamente a la capacidad de estimular a los fibroblastos. Esto, además de establecer una independencia de las funciones biológicas de la RNasa 3/ECP, indica que la glicosilación debe jugar un papel importante en la citotoxicidad sobre membranas plasmáticas de eucariotas. No obstante estos efectos de la glicosilación de la RNasa 3/ECP no se han comprobado experimentalmente para la actividad antibacteriana, pero teniendo en cuenta la importancia de las interacciones electrostáticas entre la proteína y la carga neta negativa de los lípidos expuestos de las membranas bacterianas, se esperaría a priori que podrían ser diferentes. La independencia de la actividad RNasa para la citotoxicidad en ciertas líneas celulares tampoco excluiría una hipotética contribución de la actividad RNasa en el conjunto de los efectos antibacterianos de la proteína.

El grupo de Venge en un último trabajo (Woschnag et al 2009) mostró además que la estimulación de los eosinófilos con citoquinas o partículas opsonizadas, podrían inducir no sólo la secreción de los gránulos sino también la deglicosilación de la RNasa 3/ECP, lo cual la haría hábil para ejercer su función citotóxica defensiva. Por otra parte demostraron que dicha deglicosilación se da durante el proceso de secreción de la proteína mientras que la forma intracelular se mantenía invariable cualquiera que fuese el estímulo externo.

Una última referencia respecto al polimorfismo 434G->C, de gran interés clínico es el trabajo realizado por Pereira y colaboradores (2009) en el cual llevan a cabo una asociación de esta variante de RNasa 3/ECP con el carcinoma de célula escamosa y a su vez con la eosinofilia asociada a tumores. Encuentran dicha asociación y postulan que una actividad citotóxica mayor de la RNasa 3/ECP en esta variante puede estar vinculada precisamente con una incidencia menor de dicho cáncer.

Otra de las modificaciones postraduccionales que se puede dar en la RNasa 3/ECP, según relaciona el trabajo de Ulrich y colaboradores (2008) es la nitración de tirosinas. Este proceso es muy común en procesos inflamatorios y en general en procesos que cursan con estrés oxidativo, donde precisamente suele darse la degranulación de eosinófilos y liberación de la RNasa 3/ECP. Pero curiosamente, según este trabajo, la nitración de tirosinas de la RNasa 3/ECP depende específica y únicamente de la Peroxidasa de Eosinófilo (EPO) (Fig. 16) mientras que otras peroxidases de leucocitos no llevan a cabo esta función y además este proceso se produce en condiciones fisiológicas normales durante la maduración del eosinófilo. Por estos motivos, parece que a priori no dependería de procesos inflamatorios clásicos, aunque sí que se verían acrecentados en caso de inflamación. Así lo demuestran experimentos tanto de ratones *knock out* para la EPO como de inhibición, en los que se anula totalmente la presencia de la nitración de la RNasa 3/ECP. Por otra parte, la estimulación de transcritos en modelos celulares inflamatorios de EPO activa paralelamente la aparición de RNasa 3/ECP nitrada. Por otra parte tampoco se encuentra una sobreexpresión o activación de NO sintasas cuando se da la nitración de la RNasa 3/ECP. Los autores realizaron el estudio tanto para la RNasa 3/ECP como la EDN

resolviendo que la nitración en la RNasa 3/ECP ocurre en la Tirosina 33. La actividad biológica no quedó realmente dilucidada pero puede ser plausible una modificación de sus interacciones con otras proteínas al contrarrestar con esa carga negativa su alto carácter catiónico. Esto pudiera tener una probable función biológica en la interacción con posibles proteínas acompañantes que coadyuvasen en su función antibacteriana o en cualquiera de las otras funciones contra patógenos.

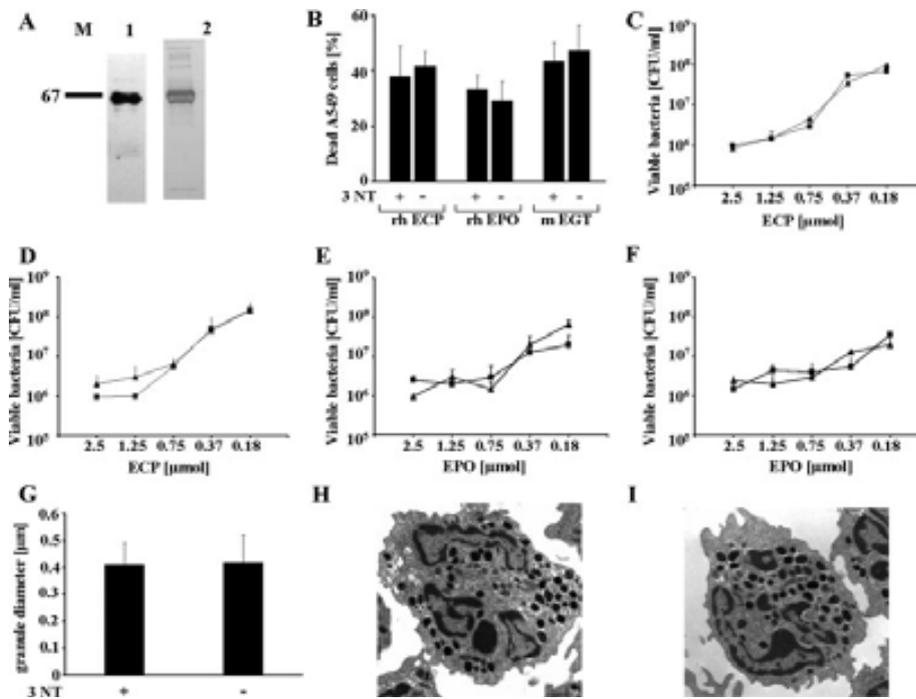


Figura 16. A y B, Citotoxicidad de las proteínas de eosinófilo nitradas versus no nitradas (3NT + o - respectivamente) y las rEPO o rECP nitradas versus su contrapartida no nitrada. Se ensayaron en incubaciones de cultivos monocapa de células A549s. Tras 24 h de incubación, la viabilidad de las células se determinó por fluorescencia. C–F, las actividades bactericidas de rEPO o rECP no nitradas y su contrapartida nitrada se testaron en incubaciones de 24 horas sobre *S. aureus* o *E. coli*, de las que se determinó un recuento en placa. G, el tamaño de los gránulos de eosinófilo, llenos de toxinas nitradas o no nitradas, se determinó utilizando microscopía electrónica de transmisión de los respectivos eosinófilos (H e I). Extraído de Ulrich et al (2008).

### Actividad frente al propio huésped

Además de responder a infecciones de helmintos, bacterias y resultar citotóxicas para las células cancerígenas, las RNasas de eosinófilos se ven implicadas en otros procesos de los eosinófilos como son las reacciones alérgicas y las inflamaciones en general, de ahí que se haya constituido en marcador idóneo para el asma y otros procesos alérgicos (Koh et al, 2007). También la RNasa 3/ECP se ha visto implicada en otras patologías como la encefalopatía, supuestamente por reacciones inmunitarias exacerbadas. A pesar de todos estos hechos el papel fisiológico de esta proteína queda aún oscuro al conocimiento, dado que los eosinófilos que lo producen son una población minoritaria dentro de los leucocitos por lo que no queda claro si constituye un grueso importante en las moléculas de defensa en la respuesta inmune innata. Por otra parte se han identificado nuevos tipos celulares capaces de producir RNasa 3/ECP como son los neutrófilos (Monteseirín et al, 2007) o los monocitos (Venge 2004, review). En cualquier caso la liberación de RNasa 3/ECP tanto ante la activación del eosinófilo por IgG o IgE como ante la presencia de LPS y su correspondiente parte antigénica (lípidos A) (Plötz et al, 2001, Takanaski et al, 1994) indican su implicación tanto en los procesos de inmunidad innata como en los de inmunidad adquirida o reacción alérgica.

### Actividad RNasa

El centro catalítico de la RNasa 3/ECP conserva la estructura característica de la RNasa A, por este motivo en la identificación de los subsitios de interacción con el RNA se ha utilizado la misma nomenclatura que la RNasa A (Richards & Wyckoff 1971). En la RNasa 3/ECP la tríada catalítica la componen la His15, la His128 y la Lys38, mientras que en la RNasa A las posiciones homólogas son la His12, la His119 y la Lys41 (Fig. 17).

Sin embargo, a partir de los trabajos de Boix y colaboradores (1999b.) y Mohan y colaboradores (2002) se identificaron diferencias para los centros secundarios de unión al sustrato, como por ejemplo las interacciones de los subsitios  $b_2p_2$ , más tenues o ausentes en la RNasa 3/ECP. Entre algunos de los

cambios implicados y a modo de ejemplo: en el bolsillo de interacción con purinas, la posición Asn70 en la RNasa 3/ECP está separada y no ejerce una acción de interacción como residuo del subsitio B2, a diferencia de la posición Asn71 en la RNasa A. Por otra parte la cadena de la Asn112 en la RNasa 3/ECP es incapaz de llevar a cabo interacciones con la adenina del sustrato del mismo modo que interaccionaba el Glu111 de la RNasa A. Otra deficiencia determinante es la falta de residuos equivalentes a la Lys7 y la Arg10, que en la RNasa A constituyen el subsitio p<sub>2</sub>. Un análisis estructural de la RNasa 3/ECP apuntó hacia la existencia de una región nueva de interacción con el sustrato, por la región 5' del P-05' del enlace fosfodiéster hidrolizado, análoga a p<sub>-1</sub>, B<sub>0</sub> y P<sub>0</sub>. En la siguiente figura 17 se indican las comparaciones entre el centro catalítico de la RNasa 3/ECP y la Ribonucleasa A.

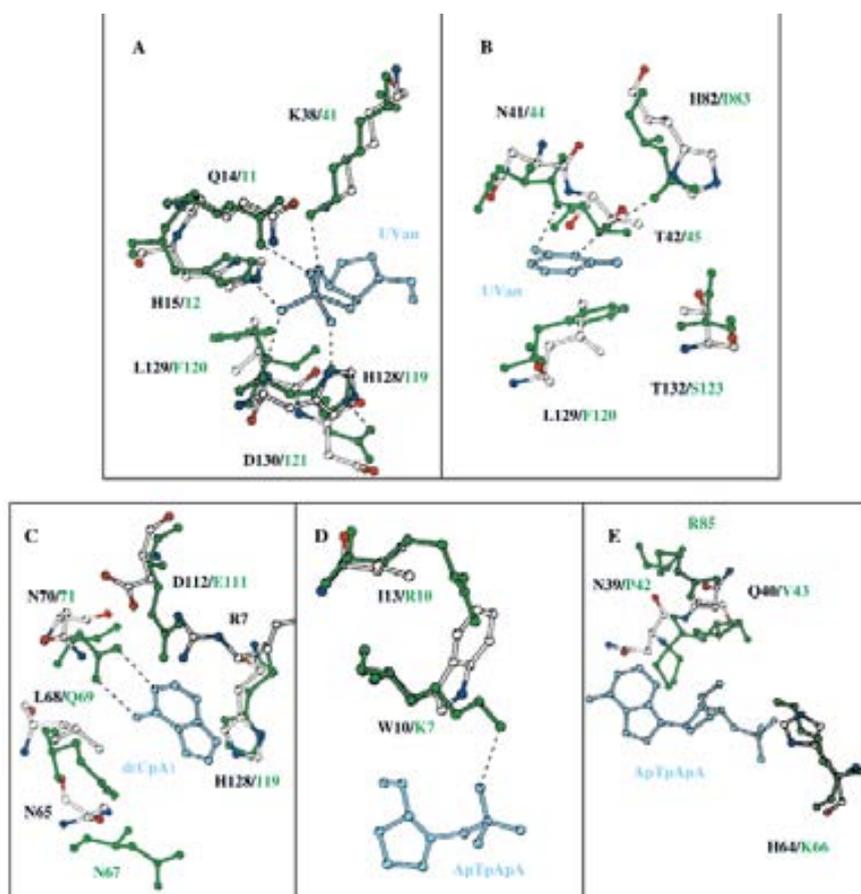


Figura 17. Complejos de los análogos de sustrato [UVan, d(CpA) y d(ApTpApA)] y la RNasa A y superposición de la estructura de la ECP mostrando los subsitios p<sub>1</sub> (A), B<sub>1</sub> (B), B<sub>2</sub>, (C), p<sub>2</sub> (D) y por último B<sub>0</sub>/P<sub>0</sub>/P<sub>-1</sub> (E). Se muestran en azul las porciones de los análogos de sustrato. Los residuos de la RNasa 3/ECP están marcados con los colores estándar (azul para el nitrógeno, rojo para el oxígeno y gris para el carbono) mientras los de la RNasa A aparecen en verde. Las líneas discontinuas representan los puentes de hidrógeno en la RNasa A. Extraído de Boix et al (1999b).

Respecto a la actividad enzimática menor de la RNasa 3/ECP con respecto a otras ribonucleasas de la superfamilia, un reciente artículo sobre el estudio del primer bucle flexible de 12 residuos en la ribonucleasa A (Doucet et al 2009), que no aparece en la RNasa 3/ECP, revela que éste es necesario en la RNasa A para el acceso del sustrato así como la salida del producto. En este trabajo produjeron una proteína quimérica sustituyendo este bucle flexible de 12 residuos por el bucle análogo en la RNasa 3/ECP de 6 residuos. Este cambio produjo un efecto de disminución de la actividad enzimática. Otras aproximaciones, realizadas por otros autores y utilizando estudios teóricos de dinámica molecular (Sanjeev & Vishveshwara, 2005) concuerdan con la representada en la figura 17.

La RNasa 3/ECP además de tener una actividad catalítica menor que la EDN y que la RNasa A, muestra una preferencia de sustrato típica de más afín a menos afín, como sigue: ssRNA > poli U > poli C, según los trabajos de Slifman y colaboradores (1986). Por otra parte, los autores no detectaron actividad significativa ante dsRNA, UpG (dinucleósido monofosfato) ni poli A. Trabajos de Gullberg et al (1986) y Boix et al (1999a) analizaron también las actividades catalíticas para los distintos sustratos. La deficiencia en el proceso de degradación de poli A podría radicar en la dificultad de desestabilización de las estructuras secundarias formadas.

En lo que respecta a su actividad ribonucleasa, el trabajo de Boix y colaboradores (1999a) describen la predominancia de la actividad exonucleasa respecto a la actividad endonucleasa, en contraste con su homólogo referente de la familia de proteínas, la ribonucleasa A. Esto es así debido a la ausencia o modificación de los subsitios de anclaje para el RNA. Esto dificulta y modifica la posición de anclaje de los ribonucleótidos y por consiguiente el punto de escisión del enlace fosfodiéster del RNA. Así pues, estas diferencias pueden explicar la menor eficiencia catalítica de la RNasa 3/ECP en relación a la RNasa A.

La ausencia o modificación del subsitio p<sub>2</sub> en RNasa 3/ECP determina una actividad exonucleasa preferente como presenta el mutante K7Q de la RNasa A

para este subsitio. Esta disminución de la capacidad ribonucleasa ha ocurrido en paralelo, con los cambios de aminoácidos que afectan a la carga electrostática de la superficie, que han tenido lugar durante la historia evolutiva de la RNasa 3/ECP. Las consecuencias del aumento de carga positiva en la superficie determinan una capacidad catalítica baja al impedir el correcto alineamiento del sustrato en el centro activo y facilitar las interacciones no productivas. Por ello, se considera que la reducción de la actividad RNasa habría sido paralela al incremento de la actividad antibacteriana de la RNasa 3/ECP.

### Estabilidad

Considerando la elevada toxicidad de la RNasa 3/ECP sobre varios tipos celulares, se pensó que dicha capacidad podría venir dada en parte por la elevada estabilidad de la proteína. Por este motivo el grupo de Maeda y colaboradores (2002) llevó a cabo un estudio de la estabilidad de la proteína en comparación con otras RNasas humanas. Se comparó la RNasa 3 con las RNasas humanas homólogas, RNasas 1, 2, 4 y 5. Se pudo constatar que la energía libre para la desnaturalización de la RNasa 3/ECP era notablemente mayor que el resto. La clave para dicha estabilidad en toda la superfamilia de la Ribonucleasa A radica, en parte, en la conservación de sus puentes disulfuro, y en concreto en el caso de la RNasa 3/ECP por la adición de numerosas argininas en el exterior que confiere una solvatación muy favorable en medio acuoso lo cual consolida enormemente su estabilidad.

La RNasa 3/ ECP tiene una estabilidad térmica mayor en relación a la RNasa A según el trabajo de Nikolovski y colaboradores (2006). No obstante el proceso de desnaturalización térmica en RNasa 3/ECP se demuestra que es un proceso irreversible que conduce a la formación de agregados de proteína del tipo no amiloideo. Un análisis de los datos obtenidos en este trabajo por calorimetría diferencial de barrido (DSC), espectroscopia de infrarrojo (FTIR) y dicroísmo circular (UV-CD) y un estudio computacional, concluye que la región iniciadora de este proceso se encuentra entre los aminoácidos 45 y 55 lo cual abarcaría de la lámina  $\beta$ -1 hasta la hélice  $\alpha$ -3. Esta estabilidad térmica nos indica que la proteína posee una gran flexibilidad molecular, sostenida asimismo por

gran cantidad de interacciones débiles. Esta flexibilidad general sobre otras ribonucleasas de la superfamilia, según los autores, afectaría al centro activo y explicaría en parte las deficiencias en la actividad ribonucleasa, dado que no podría mantener la rigidez necesaria de una interacción enzima-sustrato. En otro modelo de una ribonucleasa afín a la familia de la RNasa A, la onconasa, se ha llegado a la misma conclusión (Notomista et al, 2000). Otros estudios con la RNasa 3/ECP llegan a una conclusión similar sobre su estabilidad en base a su flexibilidad, utilizando como elemento desestabilizante el cloruro de guanidina (Maeda et al, 2002).

### 2.6.3 Propiedades relacionadas con la actividad antibacteriana.

En este apartado se comentan las propiedades moleculares de la proteína que están directa o indirectamente relacionadas con su actividad bactericida: la capacidad de interacción con moléculas de las envueltas bacterianas, la carga positiva de la superficie de la proteína y la actividad ribonucleasa. Esta última aún en tela de juicio, por los resultados aún no consolidados al respecto.

El estudio pionero de Lehrer y coautores (1989) detalló la dependencia de la acción antibacteriana de la RNasa 3/ECP de la fuerza iónica de los electrolitos en el medio de cultivo (Fig. 18). Se observó que la proteína perdía dicha acción en concentraciones salinas por encima de NaCl 140 mM, lo cual hacía suponer un mecanismo electrostático de la proteína en su actividad, o en presencia de 1mM de  $Ca^{2+}$ , lo cual se explicaba por el bloqueo de las superficies electronegativas de las bacterias con la RNasa 3/ECP. Trabajos anteriores (Young et al, 1986) que mostraban la afectación del potencial de membrana por acción de la RNasa 3/ECP apuntaban y consolidaban la hipótesis de un mecanismo electrostático sobre la membrana. Sin embargo, este estudio inicial sugería la presencia de poros formados por la RNasa 3/ECP, que hasta la fecha no se han vuelto a confirmar. Otro hecho, descrito en el trabajo de Lehrer, que permiten suponer la afectación de las estructuras de la membrana fue la mayor sensibilidad de los cultivos bacterianos cuando se encuentra en fase de crecimiento logarítmico (Fig. 19), donde se sucede una mayor tasa de

remodelación de las estructuras de la envuelta bacteriana. Lo mismo sucede cuando, estando el cultivo en fase estacionaria establecida, se inducen cambios en la membrana por la presencia de nuevos nutrientes en el medio; en este estadio, la bacteria resulta más susceptible a la acción bactericida de la RNasa 3/ECP. Dicha afectación en *E. coli*, alcanza tanto la membrana interna como la externa, según los resultados de experimentos de permeabilidad por métodos indirectos (liberación de marcadores típicos de espacio periplásmico o del interior de la célula).

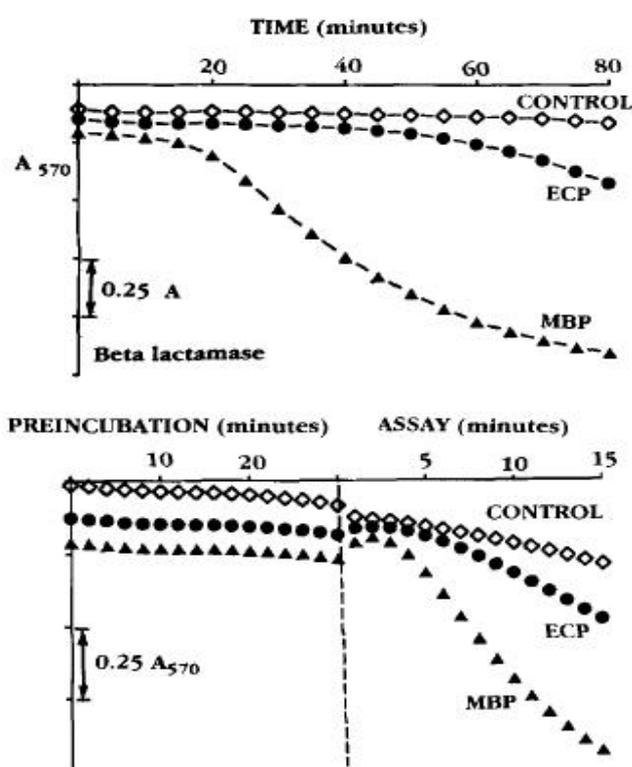


Figura 18. Permeabilización de la membrana externa bajo condiciones de privación. *E. coli* ML-35p a aproximadamente  $2 \times 10^6$  cfu/ml se incubaron a 37°C en NAPB (ver abreviaturas) que contenían 50 pg/ml ya sea de RNasa 3/ECP (círculos) o MBP (triángulos). Controles (diamantes). La permeabilización de la membrana exterior se asiste por un declive en la doble flecha cuya longitud corresponde a 0.25 unidades de absorbancia. Figura inferior. Permeabilización de la membrana exterior por RNasa 3/ECP y MBP en presencia de nutrientes. La fase estacionaria (18 h) fue previa (línea punteada). 5,0 pg/ml de RNasa 3/ECP o MBP se añadieron durante 30 min a 37°C en NAPB-TSB con nutrientes. El inicio de la permeabilización ocurre de 3 a 4 min. Extraído de Lehrer et al (1989).

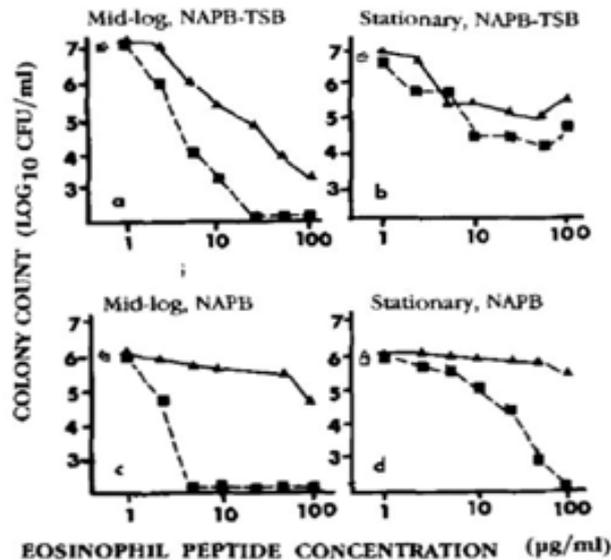


Figura 19. Efecto de la fase de crecimiento y las condiciones de incubación sobre la susceptibilidad de *E. coli* ML-35 a MBP y RNasa 3/ECP. Aproximadamente  $1 \times 10^6$  CFU/ml de células de *E. coli* en fase semi-logarítmica o estacionaria, se incubaron durante 2h con las concentraciones indicadas de MBP (cuadros) o de RNasa 3/ECP (triángulos). Todos los experimentos se realizaron en B-TSB o NAPB (ver apéndices-Abreviaturas). Extraído de Lehrer et al, 1989.

En el siguiente subapartado se resumen los trabajos más importantes en lo que se refiere a la potencial implicación de la actividad RNasa, en la actividad bactericida de la RNasa 3/ECP.

Uno de los primeros estudios de la implicación potencial de la actividad RNasa en la actividad bactericida de la RNasa 3/ECP, es el trabajo de Rosenberg (1995). Por otra parte es el trabajo en que se describe por vez primera la clonación y la expresión de la RNasa 3/ECP recombinante en *E. coli*. En dicho trabajo se constata dicha expresión tanto por secuenciación de proteínas como por identificación por *Western Blot*, a la vez que se describe tanto la toxicidad con adición de proteína al cultivo, como con la expresión endógena mediante inducción por IPTG. No obstante es de mencionar que los datos presentados para la toxicidad exógena sean de cfu's y los de la toxicidad endógena por medición de la turbidez del cultivo (absorbancia a 600 nm) que, por cuestiones teóricas ya comentadas es menos fiable por depender de efectos de agregación

de las bacterias. Tras realizar una mutación en el centro activo (H128N + K38R), y la inducción de la expresión mediante IPTG de la proteína mutada (Fig. 20), se pudo observar que se comportaba prácticamente igual que la forma nativa. Por lo cual se puede deducir que la actividad ribonucleasa no es esencial para llevar a cabo la función antibacteriana.

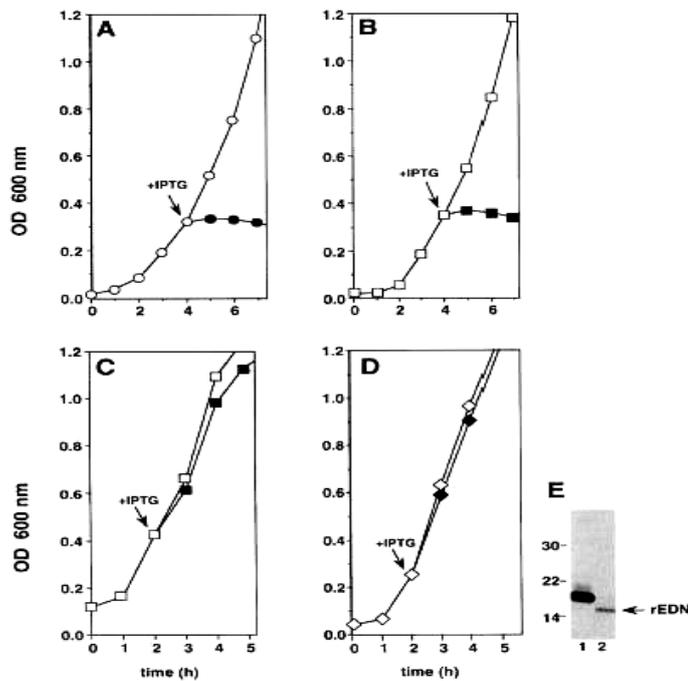


Figura 20. Crecimiento de cultivos bacterianos transformados. hECP#7 (rECP nativa) B hECP#2 (Lys38 a Arg y His128 a Asn), C sólo vector, D: hEDN#1 (EDN). IPTG (0.1 mM) se añadió a los cultivos en fase exponencial de crecimiento en los tiempos indicados por la flecha. El crecimiento de los cultivos no inducidos se indica con símbolos vacíos. El crecimiento de los cultivos inducidos con IPTG se indica con símbolos llenos. E: Western Blot revelado con M2 mAb conteniendo un extracto celular total (carril 1) y una extracción de espacio periplásmico (carril 2) de los transformantes hEDN#1 inducidos con IPTG. Extraído de Rosenberg 1995.

No obstante, se observa que cuando el experimento se realiza por cfu's, la diferencia entre la forma nativa y el mutante de centro activo, es casi significativa en el caso de la dosis de  $1\mu\text{M}$  (Fig. 21). Por lo que podría sugerirse que sí contribuye en cierta medida la actividad RNasa. De todas maneras, los datos no son estadísticamente sólidos (la autora se basa en una media de dos experimentos y los compara entre grupos) y cabría la posibilidad de plantearse experimentos adicionales para reforzar la hipótesis de la contribución de la actividad RNasa. Por otra parte, las referencias bibliográficas anteriores respecto

a inhibición total y directa de la actividad ribonucleasa de la RNasa 3/ECP relacionada con otras actividades antipatógenas, son escasas y no demasiado concluyentes (Molina et al, 1998). Por este motivo el campo de trabajo al respecto requiere más experimentación y contraste de las hipótesis actuales.

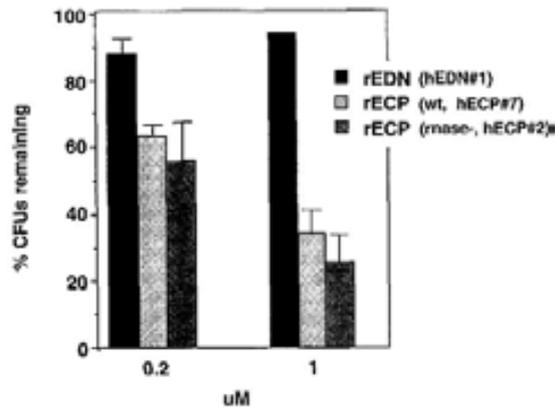


Figura 21. Resultados de los experimentos de viabilidad por recuento de cfu's en *S.aureus* 502A. rEDN se refiere a la EDN recombinante, de igual manera que rECP es la forma recombinante para dicha proteína. La rECP RNasa- es el mutante de RNasa 3/ECP para centro activo. Extraído de Rosenberg, 1995

Respecto a la actividad RNasa en ribonucleasas afines a la RNasa A, como la onconasa de anfibio (*Rana pipiens*), podemos citar el estudio de Saxena y colaboradores de 2002, en el que se describe la degradación selectiva del tRNA en células de reticulocitos (figura 22). Por otra parte, se evidencia experimentalmente que la actividad RNasa es necesaria para ejercer la citotoxicidad. En el apartado de discusión se volverá a mencionar el tema con mayor profundidad para comparar estos datos con los resultados obtenidos con la RNasa 3/ECP y la RNasa 7.

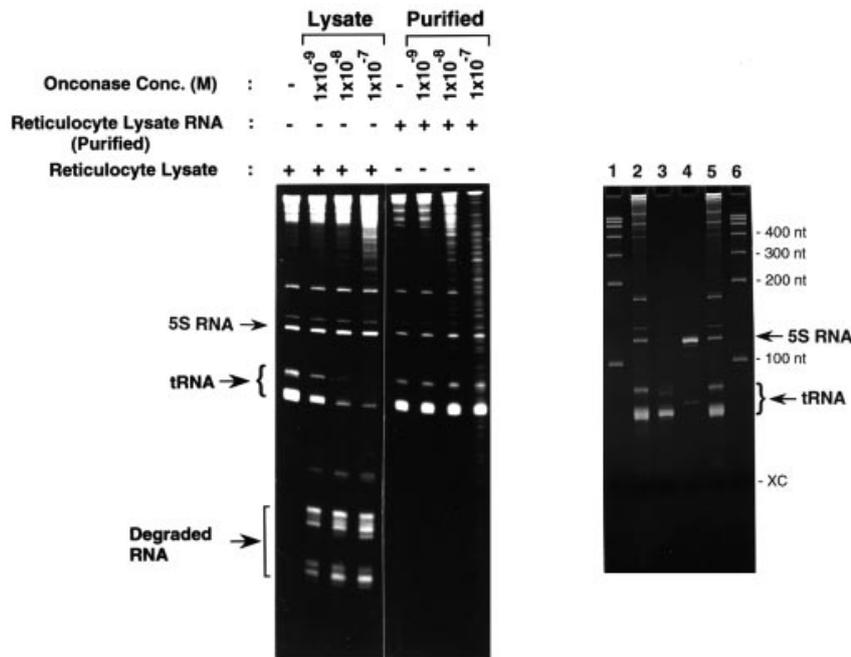


Figura 22. Especificidad de lisado de tRNA por la onconasa en el reticulocito. El lisado de reticulocito de conejo (35  $\mu$ l) o la cantidad equivalente de RNA purificado a partir de un lisado de reticulocito de conejo, se incubaron con la concentración especificada de onconasa (de  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^7$  M) en 50  $\mu$ l de mezcla de la reacción que contiene PBS. Después de la incubación a 30  $^{\circ}$ C durante 15 min, el ARN total se aisló usando RNazol, y el sedimento de ARN se disolvió en 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA. A, 1.5  $\mu$ g de ARN total se analizó en gel de poliacrilamida al 10% al 7.5 M de urea. RNA purificado de lisado de reticulocito de conejo (carriles 2 y 5), marcador de ARN (carriles 1 y 6), tRNAPhe purificado (carril 3) y 5 S ARN (carril 4).

### Identificación de residuos de la RNasa 3/ECP directamente relacionados con la actividad antibacteriana

Seguidamente se pasa a resumir los trabajos que tratan de las propiedades de la RNasa 3/ECP que están directamente relacionadas con su actividad antibacteriana, así como su capacidad de interacción con la pared bacteriana.

A partir del análisis de resultados estructurales por difracción de rayos X de la RNasa 3/ECP (Boix et al, 1999b) se identificaron los residuos potencialmente implicados en la actividad y se generaron los respectivos mutantes. Gracias al análisis de esos modelos estructurales se pudieron identificar residuos catiónicos o hidrofóbicos expuestos en la superficie de la RNasa 3/ECP. Por otra parte, sustituyendo la secuencia de la RNasa 3 por la correspondiente en la EDN, se estudió el *loop* entre los residuos

115 y 122 de la RNasa 3/ECP. El trabajo incluyó la generación de los siguientes mutantes de la RNasa 3/ECP: W10K, W35A+R36A, R75A+F76A, R101A+R104A, R121A, R121A+Y122A, (115-122EDN)-RNasa 3/ECP y  $\Delta$ 115-122.

Se evaluó la capacidad de disrupción de membrana evaluada por goteo (“leakage”) de liposomas como modelo de bicapa lipídica rica en lípidos aniónicos. Por otro lado, se analizó la viabilidad de las bacterias por recuento de cfu’s (tanto en *Staphylococcus aureus* como en *Escherichia coli*) (Carreras et al 2003). Los resultados indicaron que los aminoácidos que se exponen en la superficie de la proteína son de importancia crítica, dado que los mutantes para estos residuos perdían significativamente parte de su actividad bactericida (Fig. 23).

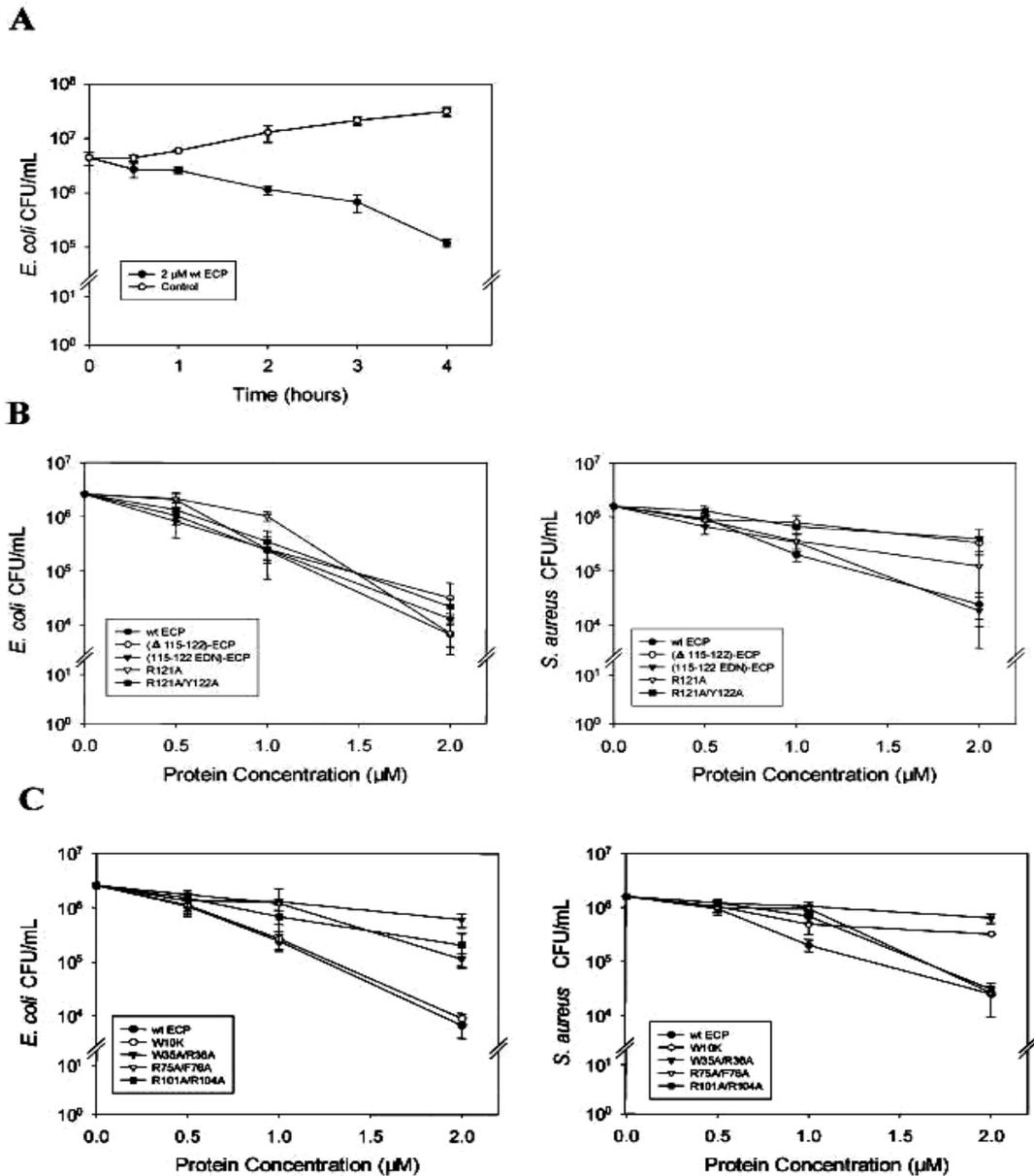


Figura 23. Actividad bactericida de ECPwt y mutantes frente a *S. aureus* y *E. coli*: expresada como porcentaje de CFU/mL en función de la concentración de proteína. (A) Cinética de actividad bactericida de rECP (2  $\mu$ M) frente a *E. coli*. (B) Efecto de los residuos del giro D115-Y122. (C) Efecto de cambios en residuos localizados en la superficie de la proteína. Cultivos de *S. aureus* o *E. coli* en la fase estacionaria se incubaron con 0.5, 1, y 2  $\mu$ M de RNasa 3/ECP o con el mismo volumen de tampón (control) durante 5 h a 37 °C. Significación estadística:  $p < 0.02$  para W35A/R36A -,  $p < 0.05$  para R101/R104 -, y  $p < 0.01$  para R75A/F76A-RNasa 3/ECP para la actividad bactericida contra *E. coli* con respecto a RNasa 3/ECP y  $p < 0.01$  para W35A/R36A -,  $p < 0.001$  para W10K -, y  $p < 0.02$  para  $\Delta$ 115-122)-RNasa 3/ECP contra *S. aureus*. Extraído de Carreras et al. 2003.

En lo que concierne al mecanismo molecular de su acción antibacteriana, a partir de la interacción de la proteína con la membrana se produce una perturbación que lleva a su desestabilización. Como se ha comentado, los estudios iniciales (Young et al, 1986) referían a la formación de poros. Sin embargo, los estudios posteriores parecen descartar ese mecanismo. Las perturbaciones de potencial de membrana observadas por esos autores deberían explicarse por otros mecanismos de desestabilización de membrana.

El trabajo de Torrent y colaboradores (2007) identifica mediante experimentos de extinción de la señal de fluorescente intrínseca de triptófanos de superficie, la preferencia de RNasa 3/ECP por lípidos aniónicos, probablemente debido a la abundancia de residuos catiónicos en la superficie de la proteína. El estudio se realiza utilizando modelos de liposomas que en el caso de estar compuestos de lípidos de membrana de *E.coli*, presentan mucha más afinidad que liposomas compuestos por di-oleil-fosfatidil-colina y di-oleil-fosfatidil-glicerol (DOPC/DOPG) a relación 3:2. La topografía de los residuos triptófanos 10 y 35 fue estudiada por sus contribuciones en la fluorescencia intrínseca de la proteína dependiendo del entorno en el que se encontrase. Según los resultados, se pudo establecer una clasificación del entorno en el cual se encontraban cada uno de los dos triptófanos. El Trp10 se encuentra en un entorno más profundo en la proteína y por lo tanto menos expuesto al solvente, mientras que el Trp35 se encuentra más expuesto. El análisis estructural sugería la participación del Trp35 en la interacción con las membranas. En el mismo trabajo subsiguientes experimentos de extinción de la fluorescencia de los triptófanos por lípidos brominados a distintas profundidades así lo demuestran: la RNasa 3/ECP al internalizarse en las membranas sufre extinción de la señal fluorescente correspondiente al Trp35. Al utilizar el mutante W35A esta extinción se anula. De este estudio se deduce que la RNasa 3/ECP se internaliza solo parcialmente en la bicapa lipídica (hasta una profundidad de aproximadamente 8 angstroms) pero en ningún caso es capaz de atravesarla o perforarla. Esto da solidez a una hipótesis de mecanismo del tipo alfombra o “*carpet like*”.

### Afinidad de la RNasa 3/ECP por lipopolisacáridos (LPS) y peptidoglicanos

Como se ha mostrado anteriormente, existen una serie de barreras constituidas por las envueltas de la célula bacteriana, por lo que es necesario saber si la RNasa 3/ECP interacciona con ellas y en qué grado. LPS, peptidoglicanos y ácidos teicoicos serían los componentes más externos en bacterias Gram-negativo y Gram-positivo respectivamente.

La alta afinidad de la RNasa 3/ECP por el lípido A del lipopolisacárido de *E.coli* quedó demostrada en el trabajo de Torrent y colaboradores (2008). Se comparó con un antibiótico modelo de unión a lipopolisacárido, denominado polimixina B (PMB) y se pudo contrastar una afinidad mayor de la RNasa 3/ECP al lípido A, porción antigénica de la molécula de LPS (Fig. 8 de esta sección), pero menor para los LPS en conjunto. Por otra parte, en el mismo trabajo se definieron en experimentos de unión de la RNasa 3/ECP con fragmentos insolubles de peptidoglicano, que la RNasa 3/ECP se localizaba siempre en fracciones del precipitado, lo cual indicaba la interacción con el peptidoglicano. Posteriormente se analizó dicha interacción calculando constantes de inhibición mediante experimentos de titulación de la proteína marcada con un fluoróforo. Finalmente se confirmaba por microscopía electrónica de barrido y de transmisión que la lesión ocasionada a la pared bacteriana era menos visible en el caso de *S. aureus* que para *E. coli* (Figs. 24 y 25). Todos estos datos resultaban paralelos a la despolarización de la membrana.

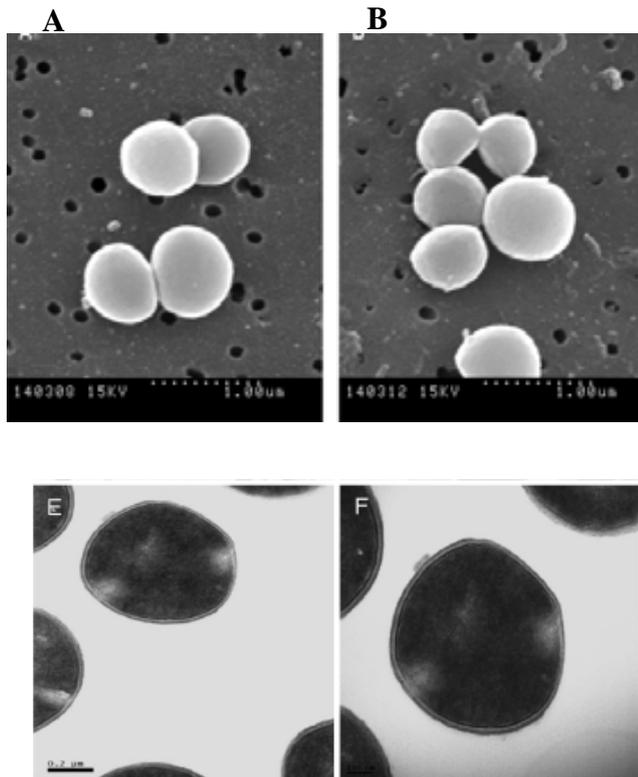


Figura 24. Micrografías electrónicas de barrido(A-B) y de transmisión (E-F) de *S. aureus* incubados en ausencia (A y E) y presencia (B y F) de 4  $\mu$ M de RNasa 3/ECP durante 4 horas (caso de fotos de barrido) y 3 horas en las de transmisión. La escala de magnificación se indica en el pie de cada micrografía. Extraído de Torrent et al 2008.

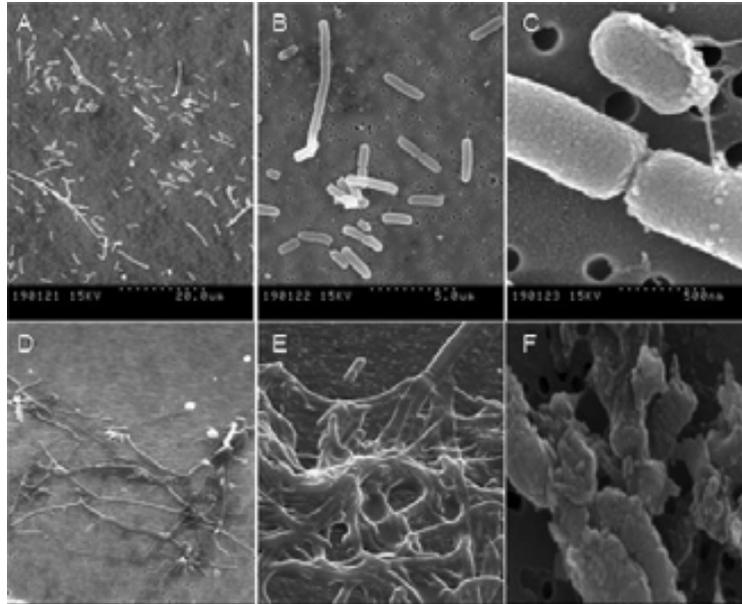


Figura 25. Micrografías electrónicas de barrido de cultivos de *E. coli* incubados en ausencia (A-C) y presencia (D-F) de 4  $\mu$ M de RNasa 3/ECP durante 45 min. La escala de magnificación se indica en el pie de cada micrografía. Extraído de Torrent et al (2008).

## Interacciones proteína-proteína

Hasta la fecha actual se han descrito muy pocas interacciones proteína-proteína, que pudieran aportar información sobre el posible mecanismo de acción de la RNasa 3/ECP sobre las envueltas de las bacterias y otros tipos celulares. Se ha llevado a cabo un estudio de interacción de proteínas por el ensayo *Two Hybrid* con el cDNA de células neuroendocrinas (Wu et al 2004) y se ha podido confirmar una pareja de interacción con la RNasa 3/ECP: la carboxipeptidasa E (CPE). Esta es una proteína transmembrana que se encarga principalmente de digerir precursores hormonales y neuropéptidos de alto peso molecular para permitir su entrada en células endocrinas, ejerciendo una función clave en procesos de bucle autocrino. Aunque el rastreo inicial se lleva a cabo en los mismos cultivos de expresión de *Saccharomyces cerevisiae*, se han comprobado y confirmado en el mismo modelo neuroendocrino (línea celular GH3) del cual se ha extraído. Lo más notable de este hallazgo es que precisamente la interacción y la acción proteolítica de la carboxipeptidasa E son necesarias para la internalización de la proteína en la célula y su posterior acción. Asimismo se llevaron a cabo estudios de interacción con RNasa 3/ECP utilizando mutantes de la CPE para las zonas potencialmente implicadas en la misma interacción. Los autores consiguieron delimitar una zona entre los aminoácidos 318 y 397, que era totalmente necesaria para dicha interacción. Este estudio puede servir de referencia para posteriores análisis de regiones de interacción. En la discusión de esta tesis se hará una disertación al respecto.

### 2.6.4 Péptidos con actividad antimicrobiana

A partir de los estudios realizados en los años 60 con el tratamiento de la Ribonucleasa A por la subtilisina S, se pudo obtener un péptido específico resultante de la digestión específica que el enzima bacteriano realizaba. Dicho producto consiste en el fragmento N-terminal de la Ribonucleasa A desde el aminoácido 1 al 20. Este péptido tiene la característica de poder reasociarse y recuperar la actividad ribonucleasa (hablamos entonces de la RNasa S). Posteriormente se ha utilizado extensivamente en investigación proteómica y en

el estudio en general de las interacciones proteína-proteína. Se le han atribuido también propiedades antibacterianas, que estarían relacionadas a priori con su carácter altamente catiónico como la mayoría de péptido antibacterianos. Trabajos posteriores han demostrado que su péptido retro (es decir, sintetizado en sentido contrario) puede tener implicaciones estructurales de interés (Pal-Bhowmick et al, 2007) y proporcionar nuevas propiedades a péptidos de pequeño tamaño, que puedan tener interés farmacológico (Andreu & Rivas, 1998).

Por todos estos motivos comentados podría ser de interés emular en la RNasa 3 la generación de un péptido N-terminal de similar longitud a raíz de diferentes estrategias para escindir la proteína en esa región. De ahí se extrae parte de la motivación para llevar a cabo las digestiones que se harán con la RNasa 3 en el presente trabajo. Por otra parte la secuencia del N-Terminal de la RNasa 3/ECP comparte características claves de los péptidos antimicrobianos en general: incluyen una hélice- $\alpha$  anfipática, son claramente catiónicos y son ricos concretamente en Arginina, Prolina o Triptófano (Andreu & Rivas, 1998). En nuestro laboratorio (Torrent et al, 2009c) se ha diseñado un método de cribado bioinformático de proteínas antimicrobianas utilizando un sistema en el que se asigna un valor de propensión bactericida para cada aminoácido, utilizando como referencia el péptido lineal bactenicina. Este método se ha aplicado para la identificación de secuencias potencialmente activas en la RNasa 3/ECP. A partir de las regiones identificadas, se diseñaron péptidos sintéticos en el segmento 1-45 confirmando los resultados experimentales.

Otro motivo para estudiar esta zona N-terminal en la RNasa 3/ECP son los antecedentes obtenidos con los resultados del análisis de esa misma zona para la onconasa, otro enzima afín a la superfamilia de la Ribonucleasa A (Boix et al, 1996). Los estudios cristalográficos previos habían advertido una gran proximidad del extremo N-terminal al centro activo por lo que se decidió diseccionar su papel en la funcionalidad de la molécula. Al modificar (construyendo quimeras) el N-terminal, no sólo se lograba cambiar las preferencias catalíticas del enzima sino además el potencial citotóxico y la susceptibilidad al inhibidor de ribonucleasas. Aunque el modelo celular difiere

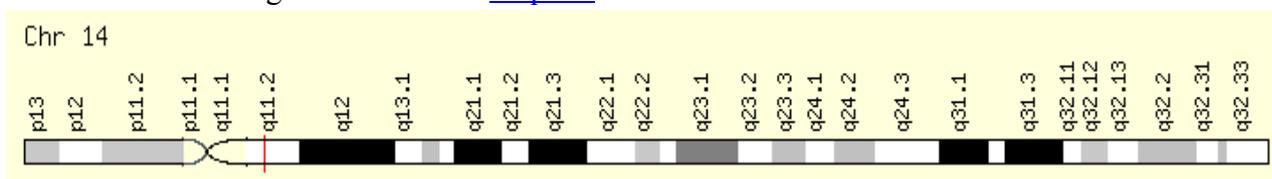
mucho del utilizado en el presente trabajo, existen ciertas similitudes como es de nuevo la proximidad de residuos del N-terminal al centro activo. No obstante, en el caso de la onconasa, al quedar afectada la eficiencia catalítica, si se muta esta zona, la citotoxicidad que depende más de su actividad ribonucleasa, se ve también alterada.

## **2.7 RNasa 7 o RNasa derivada de epidermis**

### **2.7.1 Propiedades y estructura génica.**

La RNasa 7 es un enzima de la misma superfamilia de la Ribonucleasa A y presenta un 38% de identidad con respecto a la RNasa 3 y de 38 % respecto a la ribonucleasa pancreática bovina (RNasa A) que es el miembro de referencia de la familia de las RNasas de secreción de vertebrados. La RNasa 7 presenta un grado de cationización similar a la 3, y se piensa que evolucionó a partir de un precursor común con la ribonucleasa 8 y la ribonucleasa 6, pero con una evolución convergente con respecto a la RNasa 3/ECP, como así lo sugiere el hecho de que tengan prácticamente el mismo número de residuos catiónicos de superficie, pero siendo en el caso de la RNasa 3/ECP argininas mientras en la RNasa 7 lisinas (18 para la RNasa 7 ) (Zhang et al, 2003). Su expresión se encuentra mucho más extendida que la RNasa 3, como se demostró mediante la técnica de Northern Blot. El gen se encuentra igualmente en el cromosoma 14 (Fig. 26). Encontraron expresión positiva en hígado, riñón, músculo esquelético y cardíaco, pulmón leucocitos y placenta, además de observarse su expresión en tejido epidérmico (Zhang et al 2003, Harder et al 2002). Según Zhang y colaboradores, se predice un péptido señal de 28 aminoácidos, por lo que la proteína madura queda en 128 aminoácidos. El peso molecular de la proteína sin modificaciones postraduccionales por expresión recombinante en *E. coli* según el trabajo de Harder y colaboradores (2007), se determinó en 14546 Da por espectrometría de masas.

Banda citogenética *Entrez* : [14q11.2](#)  
 Banda citogenética *Ensembl*: [14q11.2](#)  
 Banda citogenética *HGNC*: [14q11.1](#)



*RefSeq genomic assemblies:*  
[NC\\_000014.7](#) [NT\\_026437.11](#)

Figura 26. Representación de resultado de la búsqueda del gen de la RNasa 7 (RNAsA7) en Ensembl y localización del mismo en su cromosoma

Propiedades estructurales	Propiedades funcionales	Identidad de estructura primaria	Localizaciones
Masa molecular 14546 Da (Harder et al 2002)	0.021 pmol RNA/s x pmol de enzima (sobre tRNA de levadura) (Zhang et al 2003)	RNasa 3/ECP: 38 % de identidad	Queratinocitos, epitelios (traquea, faringe, lengua) y otros tejidos (riñón) (Harder et al 2002)
Secuencia de 156 aminoácidos con péptido señal, 128 aa en proteína madura (Harder et al, 2002)	$K_{cat}/K_M=2.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) sobre tRNA de levadura (Harder et al, 2002)	RNasa 6: 66% de identidad	Riñón y otros tejidos (pulmón, piel, estómago,...) (Zhang et al 2003)
Punto isoeléctrico 10.5 (Zhang et al, 2003)	1 $\mu\text{M}$ para 50% de letalidad en bacterias ( <i>E.coli</i> ) (Huang et al 2007)	RNasa 8: 78% de identidad	

Tabla 2. Resumen de algunas de las principales características de la RNasa 7

La estructura del gen es la típica de la superfamilia de la ribonucleasa A, compuesto de dos exones y un intrón, siendo uno de los exones no codificantes, según Zhang y colaboradores (2003).

Un artículo posterior de Huang y colaboradores (2007), siguiendo el razonamiento de que el carácter catiónico está implicado en la actividad antibacteriana (de la misma forma que lo está en los péptidos antimicrobianos conocidos), abordó el estudio de los grupos de aminoácidos catiónicos en la proteína. Por este motivo se analizaron los grupos de lisinas por “racimos” o “clusters” de lisinas próximas en el espacio, situadas en la superficie. Este trabajo es el estudio más completo hasta la fecha sobre la relación de la composición y la función de la proteína, dado que también relaciona la dependencia a la temperatura y si los cambios de conformación pudieran afectar a la actividad bactericida. Tras el análisis por NMR de la estructura proteica, se establecieron los siguientes “clusters” de lisinas:

K1, K3, K111 y K112

K32 y K35

K96, R97 y K100

Para ello los autores trabajaron con mutantes relativos a estas zonas con los respectivos controles, como sigue: K1A del primer grupo de lisinas, H15A relativo al centro activo que se testa a fin y efecto de constatar si la actividad ribonucleasa tuviese o no algún efecto, K32N/K35N del segundo grupo, K96A/R97A/K112Q del tercer grupo, K111Q/K112Q del primer grupo y por último la delección de los cuatro primero aminoácidos del N-terminal: KPKG.

Los resultados de este trabajo demostraron que el grupo realmente determinante para la actividad bactericida es el de K1, K3, K111 y K112. No solamente en cuanto a la actividad en sí, sino además a las atribuciones biofísicas necesarias para dicha actividad antibacteriana tal como se demostró en los resultados de permeabilidad de membrana en *Pseudomonas aeruginosa* por experimentos de internalización de un marcador fluorescente impermeable a membranas lipídicas (SYTOX).

La resolución de la estructura tridimensional por NMR de la proteína confirmó la topología  $\alpha + \beta$ , que adopta globalmente una forma de V similar a la de la RNasa 3 y común a otros miembros de la superfamilia de la RNasa A (Fig. 27), con 3 hélices  $\alpha$  y 2 hojas  $\beta$  antiparalelas. La estructura se encuentra

estabilizada por 4 puentes disulfuro entre cisteínas, de características análogas a los de la RNasa 3/ECP y en posiciones equivalentes. Estas son: C23-C81, C55-C106, C37-C91, C62-C69. (ver la comparación de secuencia en la figura 4).

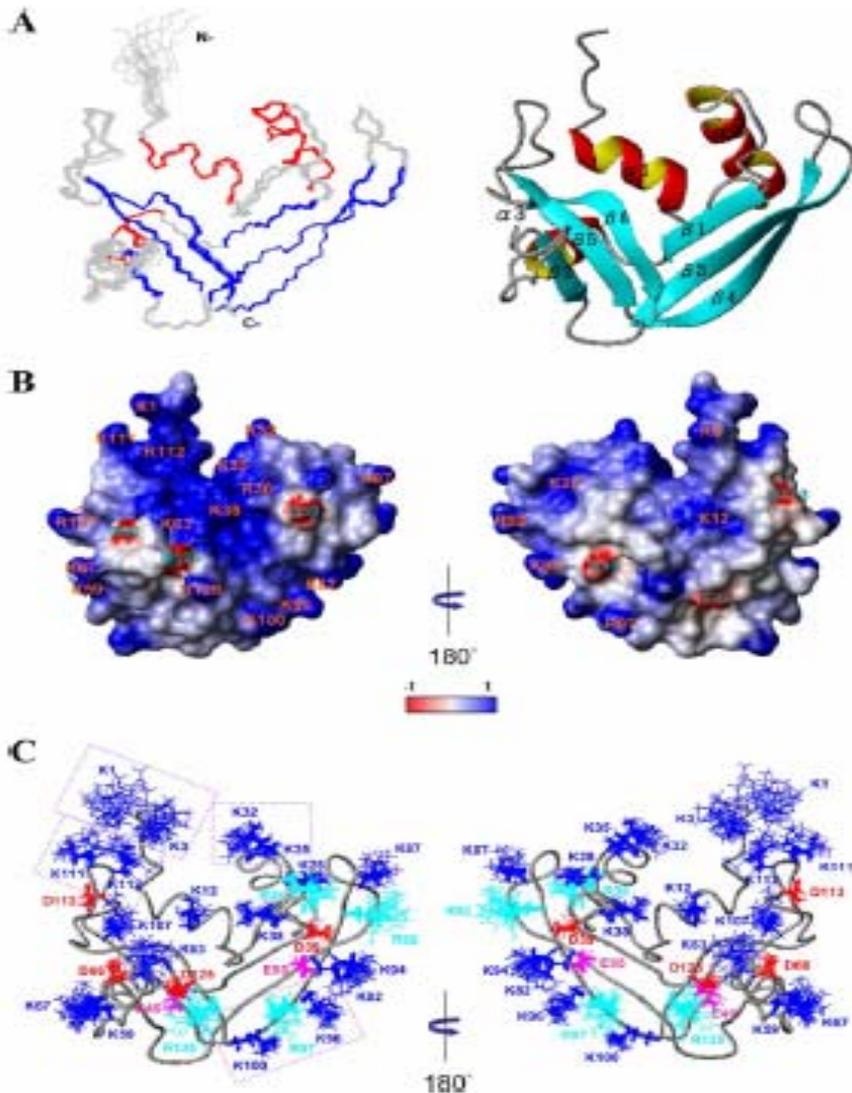


Figura 27. Estructura de la RNasa 7. Estructura en solución por RMN. A la izquierda se muestra el conjunto de estructuras. Las estructuras  $\alpha$ -helicoidales se muestran en rojo, las  $\beta$ -plegadas en azul, y las otras estructuras secundarias en gris. Derecha, representación en cintas de la estructura de RMN energéticamente más favorable. La hRNasa 7 está compuesta de tres hélices- $\alpha$  (rojo) y dos  $\beta$ -hojas antiparalelas de triple hebra (azul verdoso). B, la estructura de la superficie de hRNasa 7 se presenta con una rotación de  $180^\circ$ , mostrando residuos cargados positivamente y negativamente en azul y rojo, respectivamente. C, estructuras de cadenas laterales con todos los residuos cargados: Lys, (K) azul, Arg (R) en azul verdoso, Asp (D) en rojo, y Glu (E) en rosa. Las 15 estructuras de RMN de la hRNasa7 se presentan con una rotación de  $180^\circ$ . Extraído de Huang et al (2007).

Adicionalmente probaron la actividad antibacteriana sobre varios microorganismos (Figs. 28 y 29) resultando tóxica para distintas especies bacterianas y levaduras.

Un aspecto coincidente con los hallazgos de Rosenberg (1995), para la RNasa 3, que describe de forma similar pero con diferente enfoque el grupo de Huang (2007), para la RNasa 7, es la independencia e incluso la irrelevancia de

la actividad ribonucleasa en sus efectos antibacterianos. Esto lo demuestra, con el ensayo de viabilidad por recuento de cfu's bajo diferentes concentraciones de RNasa 7 para un cultivo de *E. coli* (Fig. 28). En el artículo se trabaja a unas concentraciones lo suficientemente bajas como para permitir detectar cierta diferencia entre mutantes, pero con una considerable dispersión de resultados. Por otra parte, las diferencias del eje de ordenadas son logarítmicas y no se muestra ninguna significación estadística en la publicación. Por ello, no puede descartarse que la diferencia con el mutante de centro activo sí que pueda ser significativa. Por ello, es necesario llevar a cabo un análisis más exhaustivo de la implicación de la actividad RNasa en los efectos antibacterianos.

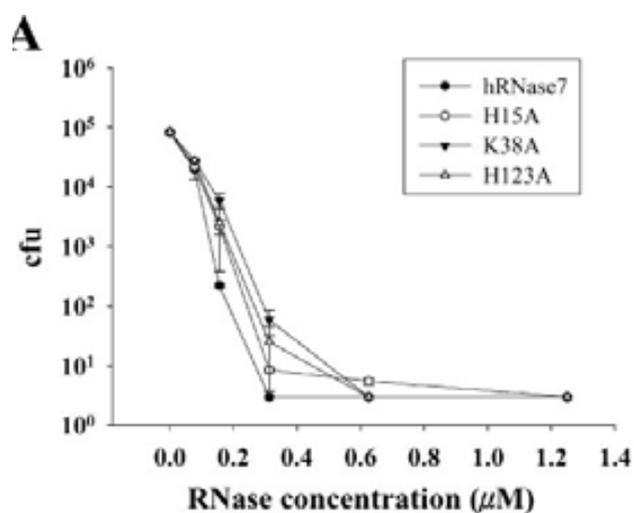


Figura 28 Gráfica de la viabilidad de cultivos de *E. coli* por recuento de cfu's bajo incubación de la RNasa 7 en las concentraciones indicadas en el eje de abscisas. Los mutantes de centro activo son H15A y H123A. El tiempo de incubación para todas las concentraciones, fue de 3 horas en cultivos en fase logarítmica. Extraído de Huang et al (2007).

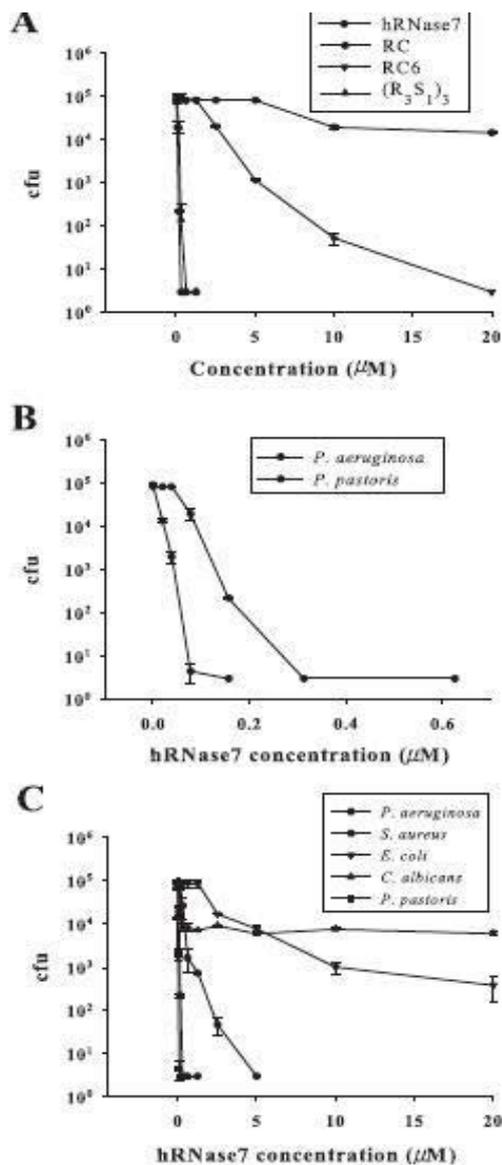


Figura 29. Actividades antimicrobianas de RNasas y oligopéptidos. A Ensayo dosis-dependiente de actividades antimicrobianas de RNasas y oligopéptidos contra *P. aeruginosa*. B y C, espectro antimicrobiano de hRNasa 7 contra varios microbios. Se diluyeron los cultivos de noche (1:100) en 10 mM de fosfato de sodio, pH 7.4. Aliquotas de 45 μl, 5-10x10<sup>4</sup> cfu de suspensiones de bacteria/levadura se incubaron con varias concentraciones de RNasa/oligopéptido (5μl) a 37°C. Se muestra RNasa 7, RNasa RC, RNasa RC6, todas humanas, RNasa6-RC de oocitos de rana toro, y (R<sub>3</sub>S<sub>1</sub>)<sub>3</sub> (un oligopéptido sintético que contiene tres argininas y una serina tres veces repetidas). Se utilizaron para el ensayo las bacterias *P. aeruginosa*, *S. aureus*, y *E. coli* DH5a., además de las levaduras *C. albicans*, y *P. pastoris*. (Huang et al, 2007)

### 2.7.2 Localización tisular y presencia en patologías.

La RNasa 7 se aisló por primera vez de tejido dérmico, por Harder y colaboradores (2002), cuyo tipo celular principal en su producción es el queratinocito. De hecho, la piel, por ser la primera barrera contra organismos patógenos, es una fuente importante de proteínas y péptidos bactericidas. En situaciones patológicas se observa un incremento de los niveles de dichas moléculas. Esta ha sido, la hipótesis de trabajo del grupo de Harder para utilizar modelos animales de psoriasis para extraer la colección de moléculas peptídicas con actividad defensiva y entre ellas la RNasa 7. Los autores muestran que los niveles de RNasa 7 son constitutivos, pero que ante patologías como la psoriasis

aumentan notablemente, por lo que se supone entonces un mecanismo inducible en la expresión de la proteína. Los autores citan que precisamente los niveles de expresión responden a activación por IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ . También se tienen evidencias de la regulación negativa de su expresión génica por parte de TNF- $\alpha$ .

Prácticamente al mismo tiempo que el grupo de Harder y colaboradores (2002), el grupo de Helene Rosenberg (Zhang et al, 2003) identificó el gen de la RNasa 7, y caracterizó su actividad antimicrobiana (Fig. 30). Estudió asimismo su distribución tisular, refiriendo el carácter ubicuo de la proteína. Este hecho llevaba al grupo a sugerir que la diferencia de patrones de expresión con respecto a la RNasa 3/ECP puede hacer suponer una diferencia de los patógenos para los cuales va destinada su acción antibacteriana. Realizaron además, pruebas de inducción de la expresión endógena por IPTG, tras transformar a la bacteria con un plásmido incluyendo la RNasa 7, (Fig. 30) demostrando su alta capacidad bactericida.

La publicación de los resultados del grupo de Harder (Harder et al, 2002) y de Rosenberg (Zhang et al, 2003) dio como resultado dos secuencias génicas como se detalla en la sección de Resultados. Sin embargo, ninguno de los dos grupos advirtió que estaban trabajando con secuencias nucleotídicas que codificaban para proteínas con discordancia en dos aminoácidos.

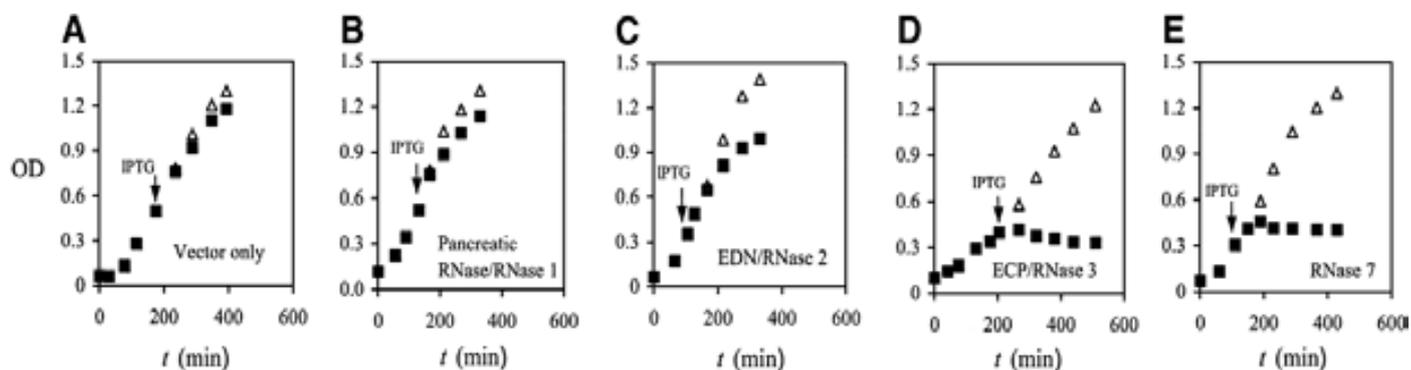


Figura 30. Crecimiento de cultivos bacterianos de *E. coli* transformantes. (A) Vector sólo. (B) RNasa/RNasa 1 pancreática humana. (C) EDN/RNasa 2 humana. (D) RNasa 3/ECP humana. (E) RNasa 7 humana. La OD (600 nm) se registró a  $t = 0$  y a cada hora. Cuando el crecimiento alcanzó la fase exponencial, se añadió hasta 0.1 mM de IPTG finales al medio de cultivo para inducir la producción de proteína recombinante. Los cuadrados sólidos, indican valores tras la inducción de IPTG, los triángulos abiertos, sin IPTG. Extraído de Zhang et al. (2003).

### Descripciones en modelos fisiopatológicos

Eberhard y colaboradores (2008) han publicado un trabajo referente a las implicaciones fisiopatológicas de la RNasa 7 en modelos epiteliales odontológicos. El modelo implica la implantación de un *biofilm* microbiano, en pacientes con vida normal, mediante un disco de un polímero fibroso y se analizan los niveles de expresión de la RNasa 7. Se encontró que la transcripción aumenta inicialmente de 3 a 13 veces respecto a las condiciones control, los niveles bajan inmediatamente al segundo día. Estos hallazgos demuestran que la RNasa 7 es una proteína de primera respuesta y por lo tanto implicada en la defensa inmune innata. Por otra parte el uso de *biofilms* con alta heterogeneidad en la composición bacteriana, permitió ver si había o no correlación entre la presencia de determinadas especies y los niveles de expresión. Dado que no fue así, se puede inferir que la expresión de la RNasa 7 debería inducirse por un mediador de la infección y no por moléculas específicas de distintas especies bacterianas. Los estudios del grupo prosiguieron con *biofilms* de diferentes especies en concreto estudiando la expresión en células gingivales. Se pudo observar que la RNasa 7 se estimulaba y actuaba en respuesta a invasiones de *Streptococcus mutans* y *S. mitis* que constituyen los microorganismos principalmente responsables de caries y otras patologías dentarias (Eberhard et al 2009).

Otro trabajo ha demostrado la asociación de la expresión y presencia de la RNasa 7 (Glasser et al 2009) con la actividad de la respuesta inmune innata en la piel. El modelo experimental utilizaba la radiación UV como sistema de ablación de la respuesta adquirida y precisamente en ese estadio, en el que la respuesta inmune innata se potencia también se sobreexpresa la RNasa 7 al mismo tiempo que todas las proteínas clásicas de la respuesta inmune innata. Otras patologías epiteliales también, como ya describieron desde el grupo de Harder con la psoriasis, también cursan con aumento de la expresión de la RNasa 7, como es el caso del liquen esclerótico, patología inflamatoria esclerótica de la piel asociadas a enfermedades autoinmunes con activación de células T (Gamblicher et al, 2009).

En uno de los últimos artículos del grupo de Harder (Abtin et al, 2009) se ha realizado un hallazgo de importancia crucial en la actividad antibacteriana de la RNasa 7. El estudio de estos investigadores reafirma el hecho de la inducción de la expresión del gen de la RNasa 7 por la presencia de microorganismos patógenos. Pero además describe que también se dan aumentos de la expresión durante la maduración del queratinocito (es el modelo utilizado) acompañado de aumentos proporcionales y acompasados de la expresión de RNasa 5 y del inhibidor humano de RNasas (RI). Esta paridad puede llevar a la conclusión de que el RI esté ejerciendo una acción silenciadora sobre las RNasas que solo actuarán cuando se dé una amenaza de infección bacteriana.

Los estudios *in vitro* de este trabajo apoyan esta hipótesis, ya que una inhibición de la actividad RNasa por parte del inhibidor RI aborta al mismo tiempo la actividad bactericida. Suponiendo que para la liberación de la RNasa 7 es necesaria la proteólisis del RI, se hicieron experimentos en los que la inhibición de la proteólisis del RI mantenía la inhibición de la actividad RNasa y de la actividad antibacteriana.

## 2.8 Similitudes entre la RNasa 3/ECP y la RNasa 7.

### Experimentos en modelos de membrana

En cuanto a otras similitudes entre la RNasa 3/ECP y la RNasa 7 un trabajo de nuestro grupo ha establecido por primera vez una comparación entre la actividad de ambas proteínas en modelos de membrana (Torrent et al, 2009a). Los estudios realizados se basaron en pruebas *in vitro* con liposomas modelo. Constituían en resumen en la detección cuantitativa de la liberación de una sonda fluorescente si la estabilidad y/o estructura de la bicapa lipídica quedaban comprometidas. Los resultados describieron un comportamiento de las dos proteínas muy similar, de hecho las dos dependían de su naturaleza catiónica para ejercer su acción sobre las membranas. A pesar de una identidad de secuencia de solamente del 38% el mecanismo es muy parecido y comparte áreas de similar carácter catiónico. También en este trabajo se descartó que la RNasa 3/ECP pudiera formar poros. Sin embargo, en el caso de la RNasa 7 sí se observaron desestabilizaciones locales de la bicapa lipídica que permitían liberar marcadores de bajo peso molecular, pero no moléculas de un tamaño superior.

A pesar de estas similitudes importantes el estudio describió una serie de diferencias en el mecanismo molecular de su acción contra las membranas (Fig. 31): de entrada la RNasa 7 es más potente en su acción dado que bastaba una relación proteína/lípido en la incubación con liposomas de 1/900 para ejercer los mismos efectos que se consigue con la RNasa 3/ECP con una relación 1/300. Otra característica crucial de la RNasa 7 es que la cronología de su proceso de disrupción de las membranas es diferente del de la RNasa 3/ECP. En cuanto a la RNasa 7, ésta primero desestabiliza la membrana de los liposomas modelo y luego es cuando los agrega, inversamente a la RNasa 3/ECP. Se pudo describir precisamente como una relación del mismo tipo que la descrita pero a la inversa: una relación proteína/lípido para la incubación de liposomas, en el caso de la RNasa 7 era de 1/400 para conseguir la misma agregación que se veía con la RNasa 3/ECP a una ratio menor de 1/1000, lo que respecta a la pérdida de contenido vesicular (*leakage*) parece funcionar a la inversa: en RNasa 3/ECP requiere una ratio proteína/lípido de 1/300 mientras que en la RNasa 7 es de

1/900. Finalmente se observa una etapa final de disrupción-agregación de las membranas.

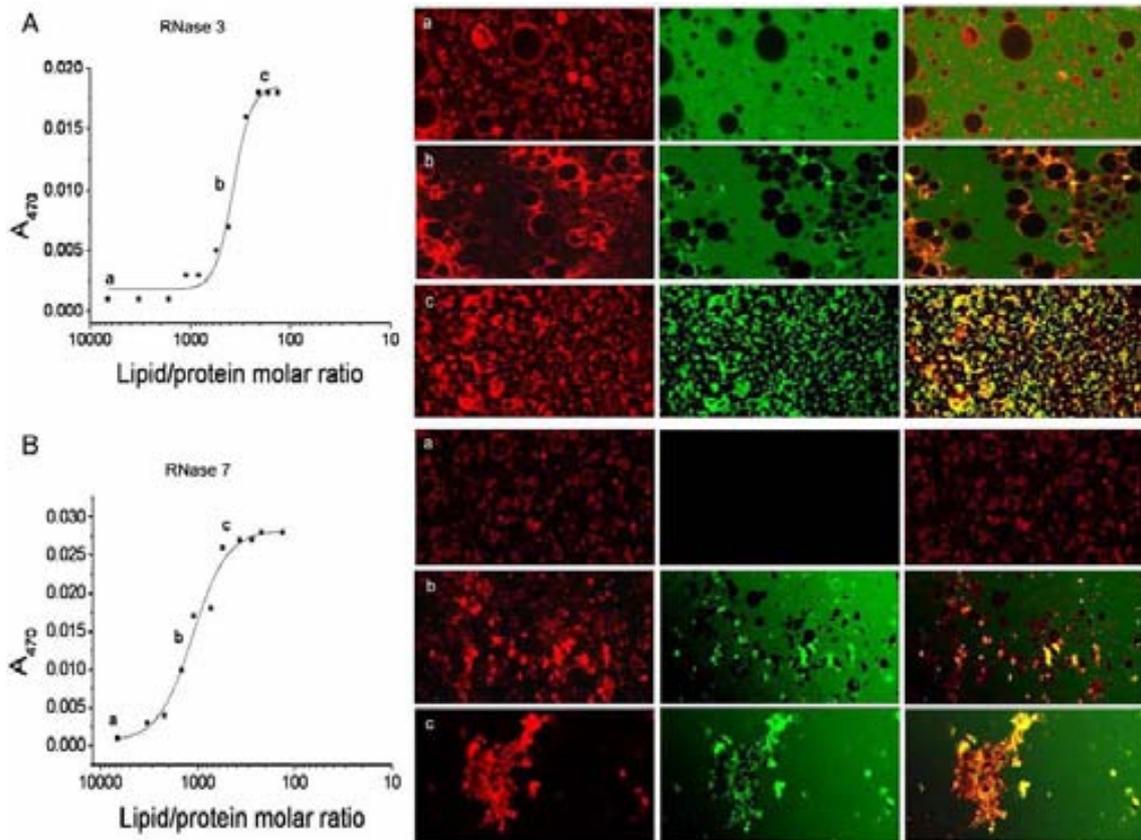


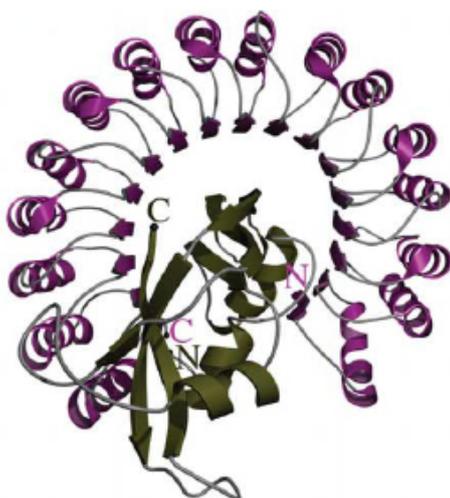
Figura 31. Estudio en el proceso de agregación de liposomas por la RNasa 3/ECP (A) y RNasa 7 (B). El proceso de agregación de liposomas se siguió por visualización de morfología del liposoma mediante microscopía confocal en incubación de 40 min. Las proteínas marcadas con Alexa Fluor 488 (verde) fueron excitadas utilizando un láser de argón de 488 nm (se registró la emisión de 515-540 nm) y DiI Vibrante (rojo) fue el utilizado para marcar los lípidos excitando con diodo anaranjado (registrada la emisión de 588-715 nm). Tres relaciones molares proteína/lípido representativas fueron escogidas para la comparación de los pasos distintos del proceso de agregación de vesículas lipídicas, mientras se tomó como referencia el perfil registrado del aumento de absorbancia a 470 nm. A) RNasa 3/ECP: a) 1  $\mu$ M (proporción lípido/proteína 1600); b) 2  $\mu$ M (lípido/proteína proporción 800) y c) 4  $\mu$ M (lípido/proteína proporción 400). B) RNasa 7: a) la ausencia de proteína; b) 5  $\mu$ M (lípido/proteína proporción 200) y c) 10  $\mu$ M (lípido/proteína proporción 100).

Un último artículo de Torrent y colaboradores (2010) en el que se compara igualmente la RNasa 3/ECP y la RNasa 7 para la misma característica de agregación pero sobre células bacterianas (*E. coli* y *S. aureus*), corrobora la mayor capacidad agregante de la RNasa 3/ECP

respecto a la RNasa 7 en la cepa Gram -negativo, lo cual podría depender de la alta afinidad de la RNasa 3/ECP por la molécula de lipopolisacárido (LPS). Por tanto, la actividad bactericida no solamente depende de la capacidad de la proteína de alterar las membranas.

## 2.9 Inhibidor proteico de Ribonucleasas

El inhibidor de ribonucleasa (RI) de la placenta humana (Fig. 32) fue inicialmente extraído y caracterizado por el grupo de Blackburn en 1977. Se ha utilizado extensivamente en los estudios con la Ribonucleasa A (Murthy et al, 1996) pero no se conocen en detalle sus efectos sobre las propiedades biológicas de otras ribonucleasas de la familia. El inhibidor de Ribonucleasa humano es una proteína de 55000 Da con una estructura en forma de herradura predominante por su exterior en alfa hélice (Fig32) (Iyer et al 2005). Este es un inhibidor de tipo no competitivo y se ha podido evaluar constantes de inhibición de manera indirecta para algunas RNasas ( $K_i = 67$  fM para la RNasa A,  $K_i = 0.7$  fM para la RNasa 5/Angiogenina,  $K_i = 0.2$  fM para la RNasa2/EDN) (Iyer et al, 2005). En cualquier caso se ha constatado que la proporción molecular entre el inhibidor y la ribonucleasa inhibida ha de ser de una ratio mínima de 1:1 para que tenga lugar.



*Figura 32 Diagrama esquemático del inhibidor placentario humano en complejo con la RNasa 2 (Extraído de Iyer et al, 2005)*

Hasta la fecha no existen estudios estructurales sobre la interacción de RI con la RNasa 3/ECP. Sí se conocen la estructura y las interacciones moleculares de la RNasa A y el RI, a partir de los estudios de Kobe y Diefenbach (1996) en el que resuelven la estructura molecular por difracción de rayos X del complejo RNasa A-RI. El último complejo descrito es el de Iyer y colaboradores (2005) del complejo RNasa2-RI. Como ya se ha comentado, este inhibidor se une con alta afinidad a otras RNasas de la familia con poca identidad de secuencia con la RNasa A humana. Esto lo consigue el inhibidor por dos características principales: es capaz de ajustarse a conformaciones menores para adaptarse a diferentes ligandos y su larga superficie de interacción puede crear un microentorno de alta afinidad. Sin embargo, el RI no es capaz de unirse a ninguna de las RNasas de rana, que comparten una homología considerable pero que se diferencian en aminoácidos críticos para la unión del inhibidor con el enzima. De los 144 contactos por fuerzas débiles que se dan entre la Ribonucleasa A y el RI, los aminoácidos clave en dicha interacción son los que se relacionan a continuación, con su posible equivalente en la RNasa 3 si hubiese lugar: K41 con 9 contactos (que equivale al residuo a K38 de la RNasa 3/ECP), K7 con 9 contactos, R39 con 14 contactos con RI (ésta podría tener un equivalente en la posición de la arginina 36 en la RNasa 3/ECP), G88 con 7 contactos con RI (posición que se conserva como G89 en la RNasa 3/ECP) y E111 con 14 contactos con RI y S89 con 9 contactos con RI. Unas conclusiones más detalladas y coincidentes con estas equivalencias para la RNasa 3 se extrajeron del trabajo de Suzuki y colaboradores (1999) en el cual la construcción de una quimera en la G89 de la RNasa 2, reducía la interacción con el Inhibidor de Ribonucleasa, indicando la importancia de dicho residuo en la interacción con el mismo.

### **3. Objetivos**

Esta tesis tiene como objetivo general dilucidar aspectos determinantes de los mecanismos moleculares de las ribonucleasas 3 y 7 en su actividad antibacteriana. Para ello nos hemos marcado unos objetivos concretos y hemos seleccionado metodologías específicas:

#### **Objetivo n°1**

Identificar regiones determinantes de la actividad bactericida mediante fragmentación proteolítica de la RNasa 3/ECP.

Estudio de la importancia de secuencias y residuos concretos de la zona N-terminal de la RNasa 3/ECP ya sea por utilización de mutantes de aminoácidos clave de esta zona como de péptidos derivados de la misma. Para ello se plantean dos etapas previas:

Proteólisis de la RNasa 3/ECP por Lys-endoproteasa, proteasa que presenta un único punto de corte en la secuencia (Lys 38), que permite aislar el fragmento N-terminal 0-38, de potencial interés, caracterizándose por vez primera, su actividad antibacteriana.

Escisión limitada de la RNasa 3/ECP por bromuro de cianógeno y posterior separación de los péptidos por cromatografía.

Comparación de la actividad de los fragmentos producto de escisión de la proteína con los péptidos sintéticos correspondientes también a regiones N-terminal de interés potencial.

Análisis de mutantes de la RNasa 3/ECP de la región N-terminal y los efectos derivados mediante la expresión endógena de proteína recombinante en su forma soluble en la cepa de *E. coli Rosetta Gami*.

**Objetivo 2:**

Desarrollo y optimización del protocolo de expresión, purificación y caracterización de la RNasa 7 recombinante.

Generación por mutagénesis dirigida de la variedad (P75Y93) de la RNasa 7 aislada en queratinocitos, a partir de la secuencia de cDNA obtenida de riñón (A75H93), así como de los mutantes parciales correspondientes.

Estudio comparativo de la actividad antibacteriana y RNasa de las dos variantes de la RNasa 7, y su comparación con las propiedades de la RNasa 3/ECP.

**Objetivo 3:**

Caracterización de la actividad antimicrobiana de la RNasa 7 y de la RNasa 3/ECP, y variantes respectivas, utilizando *Escherichia coli* BL21 y *Staphylococcus aureus* A504 como especies de referencia Gram-negativo y Gram-positivo. Se compararán los parámetros de viabilidad celular bacteriana por cuantificación de ATP celular, la degradación de RNA total y la liberación del contenido intracelular de las bacterias por lisis.

**Objetivo 4:**

Se estudiará la potencial relación entre la actividad RNasa de la RNasa 3/ECP y su actividad antibacteriana. La hipótesis de trabajo se basa en la acción potencial de las RNasas a distintos niveles: pared bacteriana, membrana citoplasmática y RNA como diana intracelular. Se analizará la susceptibilidad del RNA a la degradación por la RNasa y mutantes del centro activo.

## **Objetivos metodológicos**

Para llevar a cabo los objetivos anteriormente detallados, ha sido necesario paralelamente diseñar y optimizar los siguientes protocolos:

Optimización del protocolo de expresión y purificación de la RNasa 7 recombinante.

Puesta a punto de un sistema de evaluación de la viabilidad bacteriana, independiente de los eventos de agregación celular, basada en la cuantificación de los niveles de ATP como indicador del número de células viables.

Puesta a punto de un protocolo para un test de la evaluación del RNA celular bacteriano frente a la incubación con las RNasas 3 y 7.

Establecimiento de nuevas condiciones de cristalización para la RNasa 3/ECP y la RNasa 7 para su posterior estudio por difracción de rayos X.

## 4 Materiales y Métodos

En este apartado se describen los métodos, protocolos, reactivos y sistemas para la consecución de los experimentos que confirmarían nuestras hipótesis de trabajo. Se detallarán los aspectos clave para la reproducción de estos experimentos con éxito, así como algunos comentarios de su puesta a punto y la referencia bibliográfica de partida. El orden de redacción irá de los métodos más comunes a los más específicos, estableciéndose una parte de métodos en Biología Molecular, una parte para de estudios funcionales de las propiedades biológicas de las RNAsas estudiadas y una última para métodos del ámbito de la química e ingeniería de proteínas. Algunos detalles más específicos se describirán en el apéndice.

### 4.1 Métodos en Biología Molecular

#### 4.1.1 Métodos básicos

Tanto para la expresión de los mutantes de manera endógena en la cepa *Rosetta Gami* de *E.coli*, como para las preparaciones y chequeos de la mutagénesis dirigida, y el traspaso de un plásmido a otro, se utilizan una serie de técnicas básicas en Biología Molecular (Sambrook et al., 2001) que pueden incluir variaciones según cada experimento. Se detallan a continuación:

#### Preparaciones de DNA plasmídico en *E.coli* (“minipreps”).

El DNA plasmídico se extrae normalmente de *E.coli* cepa XL1blue, Novablue o RosettaGami. Desde un cultivo crecido hasta OD<sub>600nm</sub> de 0.6-0.8 se centrifuga en condiciones suaves (4 min a 6000 g) para resuspenderlo en 400 µl de una solución I (50 mM Glucosa, 25 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) proveída en el mismo kit de preparaciones, seguidamente 400 µl de solución II (0.2 N NaOH, 1% SDS) para la lisis incubados durante 3 min y por último 400 µl de solución III (3M Acetato potásico, 5M acético glacial) para detener la lisis. La mezcla se centrifuga 10 min a 9500 g. El sobrenadante se

pasa por una columna de hidroxapatita mediante varias centrifugaciones a 13500 g durante 1 minuto con tampones de lavado. En la última centrifugación debe de aplicarse 50µl de agua DNAsa *free*.

### Determinación y control de calidad de ácidos nucleicos

Tanto las preparaciones de DNA plasmídico como otras disoluciones de ácidos nucleicos se cuantifican mediante absorbancia a 260 nm y su calidad mediante la ratio 260/280. La cuantificación de los ácidos nucleicos responde a la siguiente equivalencia:

1 OD<sub>260nm</sub> = 50 µg/ml de DNA (o 40 µg/ml en el caso del RNA)

Para los cálculos ulteriores se tienen en cuenta la dilución del ácido nucleico (estandarizado siempre a 1/10) y el volumen de la disolución. Se minimiza la cantidad de muestra a cuantificar utilizando una cubeta de cuarzo para un volumen de 50 µl.

En cuanto a la calidad de los ácido nucleicos, se pretende que sea de una ratio 260/280 entre 1.7 y 2 para considerarlo de una calidad aceptable. Por encima se puede considerar que existe una contaminación de fenoles y por debajo de esos valores puede suponerse contaminación proteica, aunque puede también deberse a degradación del mismo.

### Digestión y otras reacciones de DNA

El DNA se digiere con el fin de comprobar los fragmentos resultantes o para extraer insertos en plásmidos y así generar fragmentos para realizar las posteriores ligaciones a otro plásmido. El volumen de enzima de restricción añadido debe estar por debajo de una proporción 1/20 del volumen total de reacción, con el fin de evitar que el glicerol que los conserva interfiera en la misma reacción (normalmente provocando reactividades *star* en los enzimas de restricción, es decir, inespecificidad en el corte de la restrictasa). Las adiciones tanto para la digestión como para cualquier otro tipo de reacciones en Biología

Molecular, se suceden en este orden: DNA, H<sub>2</sub>O, tampón de reacción y enzima de restricción, siempre agitando suavemente con el dedo y acabando con un pulso de centrifuga. Los tubos y las puntas de pipeta utilizadas son siempre autoclavadas para conseguir que sean DNAsa *free*, así como el agua en la que se llevan a cabo las reacciones. Las que se utilizan para RNA no son autoclavadas sino que son *RNase free* certificadas y siempre que se utilicen se hace en ambiente *RNase free* y en según que circunstancias se rocía ligeramente con RNaseZAP™, líquido preventivo contra contaminación de RNAsas (ver apéndice).

#### Detección de ácidos nucleicos por electroforesis en gel de agarosa:

Este tipo de electroforesis de rutina en Biología Molecular, permite separar a los ácidos nucleicos por su masa molecular y detectarse por la fluorescencia del bromuro de etidio que queda intercalado en los ácido nucleicos. El gel se prepara fusionando una dilución de agarosa en polvo en un volumen adecuado de tampón TAE (Tris, Acetato, EDTA). Para la mayoría de detecciones se realiza la dilución al 1% (p/v), aunque para la detección de fragmentos pequeños se puede optar por 1.5%. El gel fusionado y atemperado, se mezcla con bromuro de etidio (aproximadamente 5 µl por 50 ml de gel), luego se dispensa en una cubeta estanca que será su molde, se inserta el peine que dará forma a los pocillos de muestra y se deja solidificar. Las muestras se aplican con un tampón de carga en proporción 1/5, dicho tampón contiene (glicerol 30%, 100 mM EDTA pH 8, azul de bromofenol 30% w/v). La electroforesis se ejecuta normalmente a 80-90 voltios durante aproximadamente 90 min y se detectan las bandas por irradiación en lámpara de ultravioleta. La imagen se toma mediante un sistema de captación de imágenes de la casa BIORAD. En caso de correr geles para RNA se debe de utilizar tampones diluidos en agua *RNase free* y añadiendo formaldehído al 10% en el mismo gel.

### Extracción de bandas de DNA a partir de un gel de agarosa

Con el fin de aislar y purificar fragmentos para inserción en plásmido, se separan por gel de agarosa al porcentaje adecuado y se extraen cuando son visualizados por tinción con bromuro de etidio e iluminación con luz ultravioleta. A continuación el proceso sigue con la utilización de tampones y reactivos de la casa QIAGEN:

- 1) Se extraen cuidadosamente con una hoja de bisturí DNAsa *free* (estéril) y se pesa para calcular el volumen de tampón de dilución, en función del peso de agarosa que contiene el DNA a extraer.
- 2) Se mezcla con 3 volúmenes de tampón QX1 (3  $\mu$ l/mg de peso de agarosa) de la casa Qiagen.
- 3) Se añaden 30  $\mu$ l de tampón QIAEXII. Luego se incuba a 50 °C durante 10 min. Vórtex 30 s.
- 4) Centrifugar la solución 30 s al máximo. Descartar cuidadosamente el sobrenadante. Lavar con 500  $\mu$ l de QX1, repitiendo la operación.
- 5) Repetir un lavado con tampón PE (nombre comercial).
- 6) Dejar secar el sedimento entre 10-15 min o hasta que se visualice el mismo de color blanquecino.
- 7) Resuspender con un volumen de agua DNAsa *free* de aproximadamente 20  $\mu$ l. Acto seguido volver a incubar a 50°C durante 5 min. Dejar atemperar.
- 8) Volver a centrifugar 30 s al máximo y recoger el sobrenadante donde estará el DNA.
- 9) Cuantificarlo, evaluarlo y guardarlo a -20°C.

## Transformación de *E.coli* con DNA plasmídico

Los plásmidos se deben transformar en las correspondientes cepas, ya sea para conseguir expresión de proteína recombinante, o bien conseguir amplificación del gen que lleva inserto ese mismo plásmido. La transformación se lleva a cabo con una ligera variación del protocolo descrito por Sambrook et al., 2001:

Aproximadamente 20 ng de DNA plasmídico (volumen variable según concentración de plásmido, pero siempre inferior a 2µl) se introducen en el fondo de un tubo de 10 ml depositado en hielo. Se incuba con una suspensión de bacterias competentes XL1blue, BL21(DE3) o *Rosetta Gami* durante 20-30 min. en hielo. Acto seguido se procede al choque térmico que provocará la permeabilidad de las envueltas de la bacteria al DNA, este choque térmico se consigue mediante la incubación durante 45 s a 42°C. Seguidamente se incuba en hielo durante dos min para luego añadir un volumen de cultivo líquido TB diez veces superior al inicial (a 50 µl de suspensión de células se añaden 450µl de TB) con el que dejar 1 hora en crecimiento a 37°C. Dependiendo de la eficiencia de transformación de la cepa (por ejemplo BL21 es poco hábil en relación a XL1blue) se puede optar por dos alternativas: en caso de que la eficiencia de transformación sea baja, centrifugar todo el cultivo para llevarlo a un volumen final de 100 µl y sembrarlo, o si la transformación es eficiente y fiable dispensar 100 µl de los 500 µl crecidos durante la incubación. El sembrado se lleva a cabo por dispersión con asa de Digralski en placa de Petri de LB+antibiótico de selección para el plásmido. Al día siguiente se seleccionan las bacterias que han transformado por selección en dicha placa, para propagarlas por cultivo o almacenarlas.

Preparación de células competentes:

La obtención de bacterias competentes para la transformación se realizó también en nuestro laboratorio mediante el lavado en CaCl<sub>2</sub> de un cultivo crecido hasta OD<sub>600</sub> nm de 0.6. Por dos sucesivas centrifugaciones suaves (4000 rpm's que corresponden a 3500 g, durante 10 min) resuspendiendo en

CaCl<sub>2</sub> 50 mM e incubando a 4°C en esa solución, se obtienen células competentes para utilizarse en el acto o para ser guardadas a -80°C si se mezclan con un 15% de glicerol, según indica el método de Sambrook et al. 2001.

#### 4.1.2 Mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida es el método utilizado para obtener proteínas mutantes con sustituciones en uno o varios aminoácidos mediante una mutación nucleotídica específica en un codón. Esto se consigue mediante la amplificación de vectores plasmídicos por PCR, utilizando *primers* que cubren el área donde está el codón a modificar pero que presentan un desapareamiento (o “*missmatch*”) justo en la base nucleotídica que determinará ese cambio (un *primer* para cada una de las dos hebras del plásmido). Al amplificarse el plásmido por la acción de una DNA polimerasa (con función *Proof Reading*), ese desapareamiento queda conservado como molde válido para la siguiente amplificación y de esta manera queda amplificado cambiando totalmente la base deseada. En nuestro caso, al necesitar una proteína mutada en dos aminoácidos este proceso se realiza en dos tandas con un *primer* diferente para mutar el siguiente codón.

Para este fin se ha escogido el kit Quick-Change de Stratagene®. Este sistema permite clonar desde cualquier vector plasmídico de DNA de doble cadena y genera mutantes con una eficiencia teórica por encima del 80%. La polimerasa utilizada en el kit es la PfuTurbo. Al acabar la amplificación se incuba el DNA amplificado con la endonucleasa DpnI que es específica únicamente para el DNA metilado o hemimetilado. Así es como se encuentra el DNA plasmídico parental, proveniente de la miniprep de *E.coli* quedando degradado por la acción de esta enzima. Con ello se evita que del resultado de la PCR se conserve el plásmido parental que aún no presenta las mutaciones de interés. En la tabla 3 se relaciona el protocolo para la PCR que se llevaría a cabo según instrucciones del proveedor.

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	30 s
2	16	95°C	30s
		55°C	1 min
		68°C	1min /Kb de plásmido.

Tabla 3. Esquema de protocolo de ciclos para la PCR por mutagénesis dirigida

La mezcla de reacción se compuso de:

5 µl de tampón de reacción x10

1 µl de DNA molde de doble cadena (plásmido) comprendiendo 50 ng del mismo.

1 µl de primer 1 comprendiendo 125 ng del mismo.

1 µl de primer 2 comprendiendo 125 ng del mismo.

1 µl de mezcla de dNTPs.

H<sub>2</sub>O miliQ hasta volumen final de 50 µl. Justo antes de la reacción se añade 1µl de la DNA polimerasa Pfu turbo. Existe una reacción de control positivo suministrada por el fabricante, en la que se amplifica en un plásmido pWhitescript mediante dos primers de una secuencia específica también suministrados en el mismo kit. La reacción de control negativo se lleva a cabo sustrayendo el DNA molde.

## 4.2 Métodos de caracterización de proteínas

### 4.2.1 Expresión recombinante de las RNasas 3 y 7 en *E.coli* BL21 (DE3) y purificación de las proteínas a partir de los cuerpos de inclusión.

Las ribonucleasas de este estudio son expresadas a escala de miligramos por tecnología de DNA recombinante en la cepa BL21 (DE3) de *Escherichia coli*. Para este fin se utilizan bacterias que hayan sido transformadas con el plásmido pET11c + el gen de la RNasa de interés. Por razones de estabilidad del plásmido y con el fin de minimizar cualquier eventual mutación espontánea es preferible transformar las bacterias antes de cada expresión. En cualquier caso,

un glicerinado antiguo portando dicho plásmido no es recomendable para una expresión eficaz. Se seguirá el método descrito en Boix (2001).

#### Medios y reactivos:

Medio de cultivo TB: (componentes para 2 litros) Triptona 12g, Extracto de levadura 24 g, glicerol 4 ml, estos componentes se disuelven en 1800 ml de agua mili Q, se ajusta el volumen a 1900 ml y por último se autoclavan (preferentemente en dos volúmenes iguales). A parte se prepara una disolución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.17 M más  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.72 M que se autoclavará por separado. Esta preparación para dos litros supone 2.31g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 12.54g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  disueltos en 100 ml de agua mili Q. Una vez autoclavados el medio y el tampón fosfato, se añade uno al otro y se agita minutos antes de su utilización.

IPTG : 100 mM en  $\text{H}_2\text{O}$ , filtrado.

Medio de cultivo LB: (componentes para 2 litros) Triptona 10 g, extracto de levadura 5 g y NaCl 10 g en 1900 ml de agua mili Q. Luego se ajusta el volumen a 2 litros una vez disuelto y por último se autoclava. En caso de utilizar este medio para la confección de placas mezclarla con 13 g de agar.

Antibióticos: stocks de Ampicilina y Carbenicilina 10 mg/ml

*E.coli* BL21 (DE3) + pET11c-ECPwt o pET11c-RNasa 7 (y variedades mutantes).

Tampón 1: (resuspensión): Tris/HCl 10 mM, pH 8, EDTA 2 mM.

Tampón 2: Tris/HCl 10 mM, pH 8, EDTA 2 mM, NaCl 300 mM.

Tampón 3 (desnaturalización): Cloruro de Guanidinio 6M, Tris/Acetato 100 mM, pH 8.5, EDTA 2 mM.

Tampón de replegamiento: Tris/Acetato 100 mM, pH 8.5, L-arginina 0.5 M, glutatión oxidado 0.2 mM (a añadir en el momento de la utilización).

Acetato sódico 150 mM, pH 5.0.

### Materiales e infraestructuras

- Agitadores magnéticos
- Incubador-agitador a 37°C a 180 rpm's de agitación, con capacidad para matraces de 2 litros.
- Centrifuga Beckman Coulter ( mod. Avanti J26-XP) con capacidad para llegar a 16000 g y rotores JA-14 y JA-20.
- Cámara fría (4°C)
- Salida de N<sub>2</sub> (presión controlable a una presión diferencial de 0.25 atm)
- Concentrador (Millipore) Master Flex I/P.
- Sonicador Branson Sonifier 450 (Afora).

### Procedimiento:

a) Se realiza un preinóculo de cepa de *E.coli* transformada con pET11c ECPwt o RNasa7wt, a partir de una colonia en placa tras transformar, o de un raspado por asa de Kolle al rojo vivo en glicerinado de -80°C. Se deja crecer hasta confluencia a 37°C en cultivo de noche en LB.

b) Se inocula el cultivo en condiciones de esterilidad como sigue:

A 900 ml de TB estériles (autoclavados recientemente) se les añade 100 ml de tampón de fosfatos. Se agita y se le añade seguidamente 4 ml de ampicilina (10 mg/ml). Se vuelve a agitar y se inoculan 10 ml de preinóculo. Se dejan incubar hasta que el cultivo haya crecido hasta una OD<sub>600nm</sub> de 0.6-0.7 para la expresión de RNasa 3/ECP y de alrededor de 0.8 para RNasa 7. Se decide esta modificación del protocolo, tras haber puesto a punto el método para la RNasa 7 dado que es preferible inducir con un mayor número de células, por lo que se deja incubar a tiempos mayores antes de la inducción, debido a la mayor actividad bactericida de la RNasa 7.

- c) Se induce la expresión de la proteína con IPTG a una concentración final de 1 mM (10 ml de 100 mM en 1000 ml normalmente). Se agita y se vuelve a incubar a 37°C durante 4 horas para la RNasa 3/ECP y 3 horas para la RNasa 7. Se extrae una alícuota de 1 ml que servirá para evaluar la expresión de la proteína por gel SDS-PAGE.
- d) Se centrifuga el cultivo a 15000 g durante 15 min a 4°C (10000 rpm's en centrifuga Beckman con rotor JA-14). Se descarta el sobrenadante. En este paso se puede decidir congelar el sedimento resultante.
- e) Resuspensión del sedimento en 40 ml (por cada 1000 ml de cultivo) de Tris/HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 2 mM. La resuspensión se efectúa con volúmenes progresivos y evitando la formación de espuma. En este momento es conveniente subdividir el volumen en 4 de 50 ml tubos para hacer más manejable la muestra en los procesos que siguen.
- f) Choques térmicos: para facilitar la lisis de las bacterias se llevan a cabo tres ciclos de congelación-descongelación. Se congelan los tubos con la suspensión de bacterias en nitrógeno líquido y se descongelan incubándolos en un baño de agua a 50°C.
- g) Sonicación de la resuspensión. Se realiza en el sonicador con el siguiente programa: “*duty cycle*”: 50, “*intensity*”: 8, lo cual significaría una potencia de aproximadamente 70W. La sonicación (pulsátil) se realiza en todo momento con el recipiente rodeado de hielo en 3 o 4 tandas de 20 min (para cada uno de los 4 tubos). Regularmente y sobre todo al final de las tandas de sonicación, se chequea el cambio de color de la suspensión bacteriana hacia un marrón ligeramente oscuro (habiendo partido de una suspensión de tono lechoso).
- h) Se centrifuga el cultivo a 20000 g durante 15 min a 4°C (10000 rpm's en centrifuga Beckman con rotor JA-14). Se descarta el sobrenadante. En este

paso se puede decidir congelar el sedimento resultante. Resuspensión del sedimento en Tris/HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 2 mM, NaCl 300 mM.

- i) Se centrifuga el cultivo a 20000 g durante 15 min a 4°C (10000 rpm's en centrifuga Beckman con rotor JA-14). Se descarta el sobrenadante. Resuspensión del sedimento en el tampón 6M de Cloruro de Guanidina, Tris 100 mM, EDTA 2 mM. La resuspensión se lleva a cabo en tandas sucesivas, evitando la formación de espuma a 10 ml por cada litro de cultivo.
- j) Añadir glutatión reducido a una concentración final de 80 mM. La cantidad se añade paulatinamente sobre la disolución del sedimento en agitación y mientras, se tampona añadiendo empíricamente con Tris en polvo, para corregir las variaciones de pH ajustando finalmente a 8.5.
- k) Incubación de la suspensión bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, durante 2 horas en agitación. El recipiente, envuelto con parafilm y con una salida para evacuar el gas se somete a un soplado de N<sub>2</sub> desde una salida a presión (alrededor de un diferencial de 0.3 atm).
- l) Centrifugación de la dilución reducida a 16000 g durante 30 min a 4°C (10000 rpm's en centrifuga Beckman con rotor JA-20). Se recupera el sobrenadante.
- m) Dilución del sobrenadante en un volumen 100 veces superior de tampón Tris 100 mM, L-Arginina 0.5 M, glutatión oxidado 0.2 mM (específicamente añadido en este momento). La preparación de dicho tampón representa aproximadamente un volumen de 2 L y debe estar previamente enfriado en la cámara de 4°C. La adición del sobrenadante con la RNasa 3/ECP desnaturalizada, debe ser: en frío, lenta, gota a gota (5 ml cada 10 min aprox.), en agitación muy suave y revisando continuamente la disolución total en cada tanda. Dejar en agitación aproximadamente 48 horas a 4°C.

- n) Centrifugación de la dilución previa a 14000 g durante 30 min a 4°C (10000 rpm's en centrifuga Beckman con rotor JA-14). Se recupera el sobrenadante y se deshecha el *pellet*.
  
- o) Concentración de la proteína utilizando un concentrador con membrana de polietersulfone (Modelo: PTJK Prep/Scale™ TFF 2.5TF2 High flux 10k de Millipore). Previamente el cartucho de retención se ha empapado con el tampón final, dejando pasar aproximadamente 1.5 litros de Acetato sódico 150 mM, pH 5. Inicialmente se concentra la muestra a 250 ml aproximadamente y a continuación se realiza el cambio de tampón mediante el paso de un volumen de 2.5 litros de este tampón para conseguir el cambio efectivo del tampón a pH 5, dicho volumen se añade cuidadosamente en tandas de 500 ml. El volumen final tras concentrar es el mínimo posible y alcanza aproximadamente los 125 ml. El protocolo hasta ahora se ha probado que es útil tanto para la RNasa 3/ECP como la RNasa 7. Lo único que variará es el tiempo de retención de las proteínas en la FPLC.
  
- p) Purificación de la proteína por FPLC mediante columna Resource S. El criterio de separación es el intercambio catiónico y por ello el tampón para llevar a cabo el gradiente es Acetato sódico 150 mM pH 5.0, NaCl 2M, que irá de 0 a 2M, dicho gradiente se detallará en el apartado donde se detalla la técnica para la FPLC.

Para ulteriores utilidades que requieran más pureza de la proteína, se pasaría a una cromatografía HPLC de fase reversa en columna C4 (Vydac) con separación por gradiente de acetonitrilo. En el caso de la formación de cristales de proteínas es necesario conseguir esa pureza. Las condiciones de la cromatografía HPLC se detallarán extensivamente en el apartado de métodos cromatográficos.

#### 4.2.2 Expresión recombinante a pequeña escala en forma soluble de las RNasa 3/ECP, RNasa 7 y variantes en *E. coli* Rosetta Gami®

La expresión recombinante en la cepa *Rosetta Gami* de *E.coli* es una expresión a baja escala a nivel endógeno de la proteína plegada en forma soluble. Esta cepa comercial de *E.coli* es una modificación genética de la cepa BL21 (pLys) que permite la traducción de codones de eucariota, y un plegamiento teóricamente correcto al tener la deshidrogenasa de puentes disulfuro silenciada (ver apéndice sobre cepas bacterianas). La cepa *Rosetta Gami* potencia la expresión de proteínas por la incorporación de siete codones raramente utilizados por *E.coli*, estos son AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA, y CGG. Por otra parte la mutación en los genes *trxB* y *gor* provocan ablaciones de la actividad de la tioredoxina reductasa y la glutatión reductasa respectivamente, permitiendo una correcta formación de los puentes disulfuro de las proteínas y en consecuencia un correcto plegamiento de las mismas.

El método implica la activación de la expresión meramente por inducción por IPTG, tal como se da con la cepa BL21, pero tras una optimización del protocolo, se estableció que una inducción a bajo nivel permitiría una expresión viable. Dicho nivel de inducción quedó establecido en 0.4 mM de IPTG. El protocolo es como sigue:

- 1) Se prepara un cultivo confluyente en medio líquido LB (con ampicilina a 100 µg/ml finales) de la bacteria transformada con el plásmido de interés que crecerá durante una noche a 37°C en agitación (200 rpm's aprox.).
- 2) Se extraen 50 µl para inocularlos, bajo condiciones estériles, en 5 ml de TB con ampicilina en la misma concentración que el paso anterior y se deja crecer el cultivo hasta una OD a 600nm de 0.6-0.7 (aproximadamente 2h). Mismas condiciones de temperatura y agitación que en paso 1)
- 3) Llegados a este punto del crecimiento, inducir la expresión con la adición de IPTG a una concentración final de 0.4 mM a partir de un stock de 100 mM.

- 4) Incubar en las mismas condiciones que (1) durante 1-2 horas (dependiendo del mutante de RNasa 3/ECP o RNasa 7 puede variar). Los experimentos a realizar posteriormente se dedicarían a la detección de la proteína (Western Blot, EF-SDS-PAGE o zimograma) o a métodos de evaluación de sus efectos (OD<sub>600nm</sub>, recuento de cfu's, viabilidad por cuantificación de los niveles de ATP o degradación del RNA) pero nunca se realizarán procesos de purificación y/o separación por encontrarse a niveles demasiado bajos de expresión y no ser expresamente secretada al medio extracelular.

#### 4.2.3 Desnaturalización irreversible de la RNasa 3/ECP.

Este proceso asegura la desnaturalización total de la RNasa 3/ECP además de su irreversibilidad por la carboximetilación de las cisteínas, impidiendo que se vuelva al estado nativo, aunque se cambie el tampón de desnaturalización por otro adecuado para el replegamiento de la proteína. Por otra parte, se evitará que en el caso de digestión enzimática o química, cualquiera de los fragmentos con cisteína pueda volver a formar puentes disulfuro. El protocolo es como sigue:

- 1) Una alícuota de RNasa 3/ECP purificada de la expresión en *E.coli* BL21, cuya cantidad no sea inferior a 1 miligramo, se liofiliza totalmente.
- 2) La proteína liofilizada se disuelve hasta una concentración aproximada de 10 mg/ml en tampón de desnaturalización ( 0.1 M Tris/HCl, pH 8, EDTA 2 mM, Cloruro de Guanidina 6 M). Esta solución como las siguientes deben estar atemperadas a temp. ambiente (el almacenamiento a 4°C precipitaría parte de la muestra).
- 3) Se incuba a 37°C durante 1 hora, en oscuridad (preferentemente en un baño de agua).
- 4) Se añade el volumen de ditiotreitól (DTT) 1 M necesario para llegar a una concentración de 25 mM final con nuestra proteína. Se incuba en las mismas condiciones durante 90 min. Este paso reduce todos los

extremos sulfhidrilos (-SH) de las cisteínas rompiendo los puentes disulfuros.

- 5) Se adiciona seguidamente iodoacetamida 1M (stock preparado), llegando a una concentración final de 250 mM. Se incuba también a 37°C durante 1 hora. Este paso consigue la carboximetilación de las cisteínas, de manera que no se vuelvan a formar los puentes disulfuro.
- 6) Se lava todo el volumen de la reacción en un sistema de filtración por centrifugación (Amicon de la casa Millipore) con exclusión de masa molecular de 3000 Da. Para dicho lavado se procede como sigue:

6.1) El montaje de centrifugación es un tubo falcon de 15 ml con filtro interno que debe de lavarse con agua mili Q por centrifugación a 4000 rpm's durante 15 min.

6.2) La muestra se centrifuga adicionada en el filtro de exclusión junto con 1 ml de agua mili Q. Se centrifuga a 4000 rpm's en centrífuga Heraeus durante 30 min.

6.3) Se descarta el eluido y se repite dos veces más la dilución con agua mili Q con sus correspondientes centrifugaciones. La proteína en este momento ha quedado totalmente precipitada en el fondo del filtro del tubo falcon.

6.4) Recuperación del precipitado: este proceso es clave para la recuperación y reconstitución de la disolución de RNasa 3/ECP. Se debe de añadir un volumen de alrededor de 400 µl de agua mili Q y resuspender al máximo posible ese precipitado aunque quede como una suspensión turbulenta y lechosa.

6.5) Luego, gota a gota, añadir una solución de Acético 1M, hasta que la solución se vuelve nítida por redisolución de la RNasa 3/ECP.

Este paso es esencial para que la proteína recupere su solubilidad bajando el pH de la muestra. Debido a lo impracticable de controlar el pH en volúmenes tan pequeños se debe de añadir el acético de manera empírica hasta que se vea la solución virar de turbia a nítida.

6.6) Ahora la proteína se debe de liofilizar para, o bien someterla a los procesos de digestión, o para ser utilizada directamente en los ensayos. En cualquier caso, el proceso de liofilización eliminara el acético y permitirá rediluir la proteína a una concentración adecuada.

#### 4.2.4 Escisión química y enzimática de la RNasa 3/ECP.

Los siguientes subapartados describirán tanto la proteólisis enzimática como la escisión química de la RNasa 3/ECP y la separación de los productos resultantes. Se utilizará como muestra de partida la proteína desnaturalizada y carboximetilada.

##### 4.2.4.1 Proteólisis de la RNasa 3/ECP por Lys-endoproteasa

La Lys-endoproteasa es un enzima proveniente de *Pseudomonas aeruginosa* (ver Apéndice-Enzimas) capaz de efectuar proteólisis específicamente en el C-terminal de las lisinas de las proteínas (Watanabe et al, 1990). La digestión se da por una simple incubación en un tampón adecuado compuesto por Tris 10 mM pH 7.8, con un volumen final de 10  $\mu$ l con 0.2 mg de proteína liofilizada disuelta, se añade 1  $\mu$ l de enzima y se incuba a 25°C (temperatura ambiente) hasta un máximo de 3 horas.

Se preparó una solución a 0.1 U/ $\mu$ l de Lys endoproteasa en el mismo tampón de incubación. Considerando que la definición de unidad enzimática para este enzima (definición suministrada en el prospecto de SIGMA) es de una unidad capaz de degradar 1  $\mu$ mol de proteína en 100 min y que las cantidades de

trabajo en disolución de la RNasa 3/ECP eran de 0.3  $\mu$ moles. Por tanto, se estima que 0.1 unidades de enzima, podrían degradar en 200 min esa cantidad. Es decir, 1  $\mu$ l en 2 o 3 horas podrían haber digerido más de un 60% de la cantidad inicial de proteína, teniendo en cuenta que durante este tiempo el enzima podría perder parte de su actividad. Los resultados mostraron que quedaba un remanente mínimo de proteína sin digerir y que la aproximación realizada fue útil para nuestros propósitos.

Se opta por no detener la reacción más que por la misma congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ , hasta reanudar los procesos de separación posteriores de los que se obtiene un único fragmento de digestión (péptido 0-38) como se detallará en la sección de Resultados.

#### 4.2.4.1.1. Separación y purificación de péptidos resultantes de la proteólisis

El péptido N-terminal (0-38) resultante se separó del resto de la proteína por un proceso de filtración selectiva. Se escogió este método tras haber experimentado previamente pérdidas en los procesos de liofilización, intercambios de tampón y cromatografía de HPLC y por la propia fragilidad del péptido resultante, se utilizó por tanto un proceso rápido de filtros de exclusión de masa molecular que permitirá separar el péptido del resto de la proteína del cual ha sido escindido.

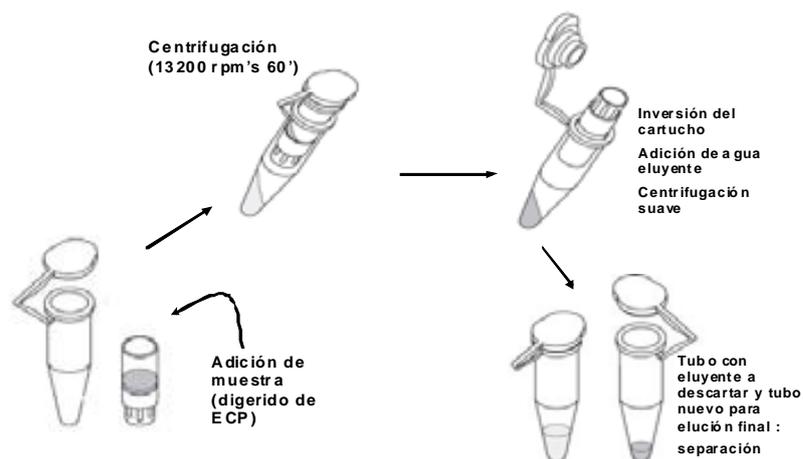
Los filtros utilizados son los Microcon de la casa Milipore (Fig. 33) y el proceso es como sigue:

- 1) Se centrifugan los filtros Microcon previamente con agua miliQ, para lavar la matriz de filtrado que hay dentro del cartucho de filtrado, dentro de su tubo accesorio a velocidad máxima en microcentrífuga de sobremesa durante 15 min.
- 2) Se aplica la muestra, en un volumen no superior a 500  $\mu$ l en la parte superior del cartucho de exclusión molecular de 10000 Da y se centrifuga a 13200 rpm's en centrifuga de sobremesa (12000 g). En este paso el

fragmento ha pasado al volumen eluido, mientras el fragmento grande ha quedado retenido. El volumen resultante (50-100  $\mu$ l) se recoge.

- 3) Se aplica el volumen eluido en un nuevo cartucho con su tubo accesorio pero en esta ocasión de exclusión molecular de 3000Da. Se centrifuga en las mismas revoluciones que en el paso anterior pero durante 60 min. El fragmento que es de 4200 aproximadamente queda retenido en la matriz del cartucho. Adicionalmente se puede repetir el proceso añadiendo agua mili Q para su lavado.
- 4) Invertir el tubo encajándolo en un nuevo tubo accesorio y añadir un volumen de 40-80  $\mu$ l de tampón para la elución final de nuestro péptido de interés. Centrifugar a 8000 rpm's durante 10-15 min. En este paso se consigue invertir el sentido de la elución y recuperar por inversión la molécula retenida en la matriz.
- 5) Se recomienda guardar 20  $\mu$ l de cada elución (excepto 10 en el caso del último eluido) y así poder analizarlo mediante SDS-PAGE. Se recomienda asimismo alicuotar y liofilizar lo antes posible el péptido resultante de la elución.

NOTA: en todo momento se utiliza agua mili Q y la muestra queda disuelta en la misma, dado que ha de continuar con una liofilización o en cualquier caso pasa al servicio de proteómica donde es necesario que no existan sales en la disolución.



*Figura 33. Diagrama esquemático del proceso de purificación mediante los tubos Microcon para filtración por centrifugación.*

#### 4.2.4.2. Digestión con bromuro de cianógeno de la RNasa 3/ECP

Teóricamente cualquier proteína puede ser escindida por el extremo C-terminal de las metioninas cuando se trata por BrCN en medio ácido (Huang et al, 1983). No obstante también se han descrito escisiones en el extremo C-terminal de triptófanos en algunas proteínas. Esta escisión puede ocurrir mediante una oxidación del núcleo indólico del triptófano promovida por halógenos (Boulware et al 1985), los átomos de halógenos presentes en la reacción pueden ser los átomos de yodo de la iodoacetamida que intervendrá en la carboximetilación que se da para evitar la renaturalización de la RNasa 3/ECP, y aunque la iodoacetamida se puede haber eliminado casi totalmente en el proceso de lavado previo a la reacción con BrCN, la oxidación puede haber ocurrido previamente durante el proceso de carboximetilación.

Para una escisión limpia y efectiva, se trabajará con la proteína desnaturalizada y carboximetilada, en consecuencia, desplegada total e irreversiblemente. El método consiste en una simple incubación a temperatura ambiente en una relación molar adecuada tal como se indica en el siguiente protocolo:

- a) Disolución de la proteína carboximetilada liofilizada, a una concentración de 10 mg/ml en HCl 0.1 M.

- b) Adición de BrCN a una concentración inicial de 45 mg/ml disuelto en HCl 0.1 M sobre la RNasa 3/ECP, con una relación molar de 100:1 con la misma. En concreto se partió de 2 mg de proteína liofilizada (0.1286  $\mu$ moles de RNasa 3/ECP) y se incubaron con 12.86  $\mu$ moles de BrCN.
- c) Incubación con agitación leve durante 24h en campana de extracción.
- d) Liofilización de la mezcla de digestión (liofilización por separado de cualquier otra muestra debido a la generación de trazas de cloro gaseoso y otros compuestos tóxicos).

Todos los procesos deben realizarse en campana de extracción con las máximas medidas de seguridad: bata, guantes (dobles a ser posible), gafas de seguridad y mascarilla, dado que el BrCN es extremadamente tóxico. No obstante en soluciones acuosas y pasadas 24 horas, Merck informa que más del 75% se habría degradado reduciendo al máximo la toxicidad.

Una vez obtenido el liofilizado, puede congelarse a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización, en la que será disuelto en la solución inicial de muestra para HPLC ( $\text{H}_2\text{O}$  + TFA 0.1%) para ejecutar la separación y purificación de los péptidos resultantes por cromatografía HPLC de fase reversa.

#### 4.2.4.2.1 Separación cromatográfica de los fragmentos de escisión de la RNasa 3/ECP con BrCN

Los productos de la escisión de la RNasa 3/ECP mediante la reacción con BrCN se analizaron siguiendo una modificación del método de McFarland & Borer (1979) como se describe:

A) Inyección de 100  $\mu$ l de una mezcla de reacción en una columna de HPLC de fase reversa (Symmetry C18) equilibrada previamente durante 30 min con 10%

de solvente B (95.5% acetonitrilo (v/v) + 0.05% ácido trifluoroacético) y 90% de solvente A (95.5% agua + 0.05% ácido trifluoroacético).

B) La elución se llevo a cabo con un flujo de 1 ml/min con un lavado inicial de 10 min y un gradiente linear de 100 min como se ilustra en la tabla 4. Tras cada ejecución el sistema se lavó con agua miliQ desgasada durante 30 min y finalmente se pasa por la columna 20% de metanol en agua miliQ desgasada, solución que será la de conservación de la columna. El producto de elución se monitorizó y cuantificó con absorbancias a 280 nm y 214 nm. En un ensayo previo se realizó esta separación utilizando la columna C4-Vydac con el protocolo que se muestra en la tabla 5, aunque no obtuvo la separación óptima que sí se consigue con la Symmetry-C18.

C) Las fracciones eluidas fueron recuperadas a intervalos de tiempo de 2 min, a menos que diferentes picos se hubiesen detectado dentro de dichos intervalos, entonces en ese caso los picos se colectan independientemente.

D) Las fracciones recogidas tras una medida de la absorbancia se liofilizan para concentrar el péptido resultante.

E) Al tubo de liofilización (que suele ser el mismo tubo de colección de la cromatografía) se le da un pulso de centrifuga para recoger el polvo, luego se añade un volumen de agua adecuado (en función de la medida estimada de la absorbancia), se agita vigorosamente el tubo en vórtice y se recoge todo el líquido por centrifugación en centrífuga Heraeus para tubos Falcon a 4000 rpm's durante 5 min.

	Time	Flow	%A	%B
1		1.00	100.0	0.0
2	5.00	1.00	100.0	0.0
3	85.00	1.00	65.0	35.0
4	86.00	1.00	0.0	100.0
5	94.00	1.00	0.0	100.0
6	100.00	1.00	100.0	0.0

*Tabla 4 Condiciones de la ejecución del gradiente para el protocolo de la columna Symmetry  
A= H2O+TFA 0.05% B= Acetonitrilo +TFA 0.05%*

	Time	Flow	%A	%B
1		0.50	100.0	0.0
2	15.00	0.50	100.0	0.0
3	65.00	0.50	30.0	70.0
4	70.00	0.50	0.0	100.0
5	80.00	0.50	0.0	100.0
6	85.00	0.50	100.0	0.0
7	90.00	0.50	100.0	0.0

*Tabla 5 Condiciones de la ejecución del gradiente para el protocolo de la columna Vydac  
A= H2O+TFA 0.05% B= Acetonitrilo +TFA 0.05%*

Las especificaciones para cada columna fueron las siguientes:

Columna C4 de fase reversa (Vydac)

Dimensiones: 0.46cm Ø x 25 cm largo

Tamaño de partícula: 5 µm

Flujo máximo: 1ml/min

Columna C18 de fase reversa (Symmetry)

Dimensiones: 0.46cm Ø x 15 cm largo

Tamaño de partícula: 5 µm

Flujo máximo: 1ml/min

Para la purificación de fragmentos resultantes de la fragmentación de RNasa 3/ECP la columna más apropiada resultó ser la Symmetry C18.

#### 4.2.5 Métodos cromatográficos de separación y purificación de las proteínas recombinantes.

##### 4.2.5.1 Cromatografía de intercambio catiónico para la purificación de las RNasas 3 y 7

En el proceso de obtención de las proteínas por expresión, se purifica la proteína mediante una cromatografía cuyo criterio de separación aprovecha el carácter altamente catiónico de nuestras proteínas. Para este fin, se utiliza un sistema integrado de FPLC con una columna de intercambio catiónico Resource S (Pharmacia).

La muestra viene del proceso de concentración de la proteína hasta un volumen entre 120 y 160 ml y es succionada por el sistema de FPLC a un flujo de 1ml/min. El tampón de elución inicial es A = Acetato sódico 150 mM pH 5, para conseguir el gradiente de separación se utiliza un tampón B = Acetato sódico 150 mM pH 5 + NaCl 2 M (ambos desgasados). El gradiente llega a 2M de NaCl en una rampa en dos tramos de 30 min en total.

Para ambos protocolos cromatográficos, el aparato equilibra la columna con tampón A en unos 20-30 min a un flujo de 1 ml/min. Luego, la muestra de partida que no supera los 175 ml de volumen y es succionada por el sistema evitando absorber aire. El sistema ejecuta una colección de fracciones a 2ml por tubo y hasta 45 tubos.

La RNasa 3/ECP queda eluida típicamente al 29% de tampón B, lo que representa la elución a una conductancia de 61.7 mS/cm, mientras que la RNasa 7 eluye al 27%, que se traduce en una conductancia de 60 mS/cm. La proteína queda eluida en una fracción de 8 ml que posteriormente se congelará para su ulterior liofilización.

Eventualmente el sistema puede ser utilizado tanto para repurificar muestras que han pasado por una primera purificación de FPLC, previo desalado.

#### 4.2.5.2 Cromatografía de fase reversa para la purificación de la RNasa 3/ECP o la RNasa 7

Este método se utilizará sobre purificaciones previas mediante el método de FPLC de intercambio catiónico, en cualquiera de las dos proteínas de esta tesis, con el fin de obtener proteínas totalmente purificadas y con la seguridad de estar libres de sales. Este propósito final tiene dos intenciones claras: la máxima pureza para obtener cristales de ambas proteínas con las que se pretenderá obtener espectros de difracción de rayos X y obtener muestras de una pureza tal que aseguren tanto la secuenciación N-terminal como el análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF. El protocolo seguido fue el siguiente:

A) Inyección de 100 µl de una mezcla de reacción (disuelta en agua + 0.05% ácido trifluoroacético) en una columna de HPLC de fase reversa (Vydac C4) equilibrada previamente durante 30 min con 10% de solvente B (95.5% acetonitrilo (v/v) + 0.05% ácido trifluoroacético) y 90% de solvente A (95.5% agua + 0.05% ácido trifluoroacético).

B) La elución se llevo a cabo con un flujo de 0.5 ml/min con un lavado inicial de 10 min y un gradiente linear de 70 min como figura en la tabla 6.

	Time	Flow	%A	%B
1		0.50	90.0	10.0
2	20.00	0.50	90.0	10.0
3	60.00	0.50	20.0	80.0
4	70.00	0.50	0.0	100.0
5	80.00	0.50	0.0	100.0
6	85.00	0.50	90.0	10.0

Tabla 6. Condiciones de la ejecución del gradiente para el protocolo de la columna Vydac en el caso de purificación de RNasa 3/ECP y la RNasa 7 (A= H2O+TFA 0.05% y B= Acetonitrilo +TFA 0.05%).

#### 4.2.5.3 Análisis final de las muestras

Tras realizar las diferentes cromatografías, los siguientes pasos de análisis e identificación (secuenciales o alternativos) son la espectrometría de masas y/ o la secuenciación aminoacídica del N-terminal. Ambos procesos se realizarían en el *Servicio de Proteómica y Bioinformática* del *Instituto de Biotecnología y Biomedicina* adscrito a la UAB.

Para suministrar la muestra, se estimó previamente su concentración a partir de su valor de absorbancia. Se realiza también una electroforesis SDS- PAGE, para comprobar que la muestra sea pura. En el caso de los péptidos cuando se ha podido efectuar previamente la secuenciación, se puede deducir su coeficiente de extinción y entonces evaluar la concentración. En cualquier caso, la fracción que se lleva al servicio debe ser del orden de 20-50 nanogramos y se aporta disuelta en agua mili Q. En caso de prever un período de espera mayor de tres días en dicho servicio, entonces la muestra se suministra en polvo liofilizado (en el mismo tubo *eppendorf* que se entrega).

#### 4.2.6 Electroforesis de proteínas

La separación de proteínas en geles de poliacrilamida nos es de utilidad crucial para identificar las proteínas de interés cuando queremos comprobar que la muestra es pura y para chequear las diferentes digestiones que se producen en la RNasa 3/ECP y la RNasa 7. También es el paso previo para otro tipo de técnicas como serían el zimograma o el *Western blot* o simplemente la transferencia a membranas de PVDF para análisis proteómicos (Bollag et al, 1996). Es una técnica basada en la movilidad diferencial en un entramado molecular de poliacrilamida (cuya densidad de entramado podrá separar con mayor definición) como resultado de la aplicación de una corriente eléctrica en proteínas colmatadas de cargas negativas por interacción del SDS. Con esa premisa, las proteínas corren en función de su volumen, que a efectos teóricos se simplifica en su tamaño que está relacionado con su masa molecular. Dicha movilidad es función del inverso del logaritmo del peso molecular de la proteína.

Las electroforesis se realizan en geles del 15% de poliacrilamida, dado que resulta en la mayor definición para el rango de pesos moleculares de las ribonucleasas. No obstante cuando se desea detectar péptidos más pequeños resultantes de la degradación química o enzimática, se opta por un porcentaje superior (por ejemplo del 20%). Como es habitual precede a la separación de las proteínas, el paso por una parte del gel que es apiladora, invariablemente es un gel del 7%. La composición de los geles separadores de poliacrilamida es la siguiente:

Solución A (acrilamida al 50%) 2.5 ml

Solución B (Tris HCl pH 8.8) 1.25 ml

H<sub>2</sub>O 1.25 ml

TEMED 6 µl

Solución D (Persulfato amónico al 10%) 45 µl

Y esta es la composición de los geles apiladores o “stacking”:

Solución A (acrilamida al 30%, bis-acrilamida al 0.8%) 0.5 ml

Solución B (Tris/HCl 0.5 M pH 6.8, 0.4% de SDS) 0.75 ml

Solución C (Tris/HCl 0.5 M pH 6.8, 0.4% de SDS) 0.75 ml

H<sub>2</sub>O 1.9 ml

TEMED 6 µl

Solución D (Persulfato amónico al 10 %)

El orden de adición de los ingredientes del gel es el mismo en el que se muestran, con el fin de que no se dé polimerización prematura del gel. La polimerización nivelada del gel separador se asegura añadiendo un volumen de isopropanol que cubra el gel y el gel apilador polimeriza bajo el peine insertado que dará molde a los pocillos de aplicación.

La aplicación de las muestras sigue el siguiente protocolo:

Las muestras se aplican en una cantidad no menor a los 5 µg en un volumen total no mayor de 20 µl, teniendo en cuenta que el tampón de carga está en una proporción 1/5 respecto al volumen final. La muestra se aplica siguiendo

estos pasos: se calienta previamente a 100 °C durante 5 min (en su tubo eppendorf) y luego se conserva en hielo hasta su aplicación. Previamente se aplica un pulso de centrifuga para recoger el líquido condensado en el tubo.

La composición del tampón de carga es la siguiente: glicerol (30%), SDS (9%),  $\beta$ -mercaptoetanol (15%), azul de bromofenol (0.05%) disueltos en tampón Tris/HCl 180 mM, pH 6.8.

La composición del tampón de recorrido (*running buffer*) es la siguiente para 1 litro de tampón x10: 30.3 g de Tris, 144 g de glicina, 10 g de SDS y agua destilada hasta el volumen final. Se diluye en agitación hasta x1 en el momento de su uso.

La ejecución de la electroforesis ocurre a 125-135V durante el apilamiento y de 150-170 V para la separación. Luego pueden escogerse varios métodos de tinción de las proteínas separadas o continuar con ulteriores procesos analíticos. Las dos tinciones más utilizadas en nuestro laboratorio fueron las tinciones de Azul de Coomassie y la de nitrato de plata. Tanto en el proceso de la electroforesis para la simple separación y detección de proteínas como para ulteriores fines como el zimograma o el Western Blot, el sistema utilizado fue el kit MiniProtean II® de Bio-Rad© y la fuente de alimentación eléctrica fue el modelo PowerPac 200 o 300 de la misma compañía.

#### 4.2.6.1 Tinción de *Coomassie*

Es la tinción de rutina para la detección de proteínas en gel. Se basa en la afinidad por el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 por las proteínas.

- a) Extraer el gel cuidadosamente del montaje de electroforesis, es aconsejable hidratarlo con agua destilada en la misma acción.
- b) Sumergir el gel en tinción de Coomassie durante 5 min con agitación.
- c) Decolorarlo con solución de destinción (metanol acético agua) (50:12:38) durante 20 o 30 min o alternativamente en agua destilada durante un día entero.

d) La sensibilidad de detección es de alrededor de 1-2  $\mu\text{g}$  y aunque no es el método más sensible tiene la ventaja de ser reversible dejándolo unas 48 horas en la misma solución de destinción.

#### 4.2.6.2 Tinción con nitrato de plata

Esta tinción permite detectar las proteínas de forma más sensible aunque exige más tiempo y el uso de campana de extracción al utilizarse sustancias volátiles tóxicas. Cuando se extrae el gel se deben de fijar las proteínas con una incubación previa en acético/metanol/agua (50:12:38) más 450  $\mu\text{l}$  de formaldehído para un volumen final de 100 ml. Se recomienda que la incubación sea mayor de 2 horas, pudiéndose dejar hasta *overnight*. Después se sigue con este protocolo:

a) Incubar el gel en etanol al 50% durante 10 min.

b) Transferir e incubar el gel en una disolución al 0.02% de tiosulfato sódico en agua. Dicha disolución se debe preparar fresca en la misma ejecución de la técnica.

c) Lavar con agua destilada tres veces durante 10 min en leve agitación. Vaciar el último lavado para permitir la adición de la siguiente solución.

d) Impregnar el gel en una disolución de  $\text{AgNO}_3$  (12 ml de  $\text{AgNO}_3$  de 0.1 M para un volumen de 100 ml y 70  $\mu\text{l}$  de formaldehído), durante 1 hora aproximadamente. Agitarlo periódicamente. Durante esta incubación el gel debe tornarse ligeramente amarillento.

e) Lavar con agua destilada tres veces durante breves min en leve agitación. Vaciar el último lavado para permitir la adición de la siguiente solución.

f) Aplicar la solución reductora que revelará las bandas ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 3% (w/v) + 1 cristal de tiosulfato sódico + 45  $\mu\text{l}$  de formaldehído para 100 ml de volumen

final). Incubar hasta el desarrollo de la tinción, aproximadamente a los 5 min, visionándolo en el proceso evitando que el gel se torne pardo con la adición de solución tamponadora.

g) Aplicar la solución de detención del revelado sobre todo el volumen de revelado (50% de metanol v/v y 12 % de ácido acético v/v). Se formarán burbujas de CO<sub>2</sub>. Sustituir este volumen con agua destilada para captar la imagen.

#### 4.2.6.3 Zimograma

El zimograma es una técnica que se basa en una electroforesis de poliacrilamida para proteínas, en cuya matriz se haya un sustrato para el grupo de enzimas que se pretende detectar. Cuando el enzima ha degradado o convertido el sustrato, se visualizan por tinción negativa las áreas de degradación con respecto al resto del gel. En el caso que nos ocupa se utiliza la policitidina (poli-C) o el poliuracilo (poli-U) para la detección de RNasas. El método aprovecha la capacidad de las ribonucleasas para renaturalizarse en las condiciones de incubación del gel SDS-PAGE después de la separación de las proteínas, por sucesivos lavados en tampones, que consiguen extraer su detergente (SDS).

El gel tiene la misma composición que cualquier gel de poliacrilamida en la fase de separador pero con 3 mg de sustrato (poliuracilo o policitidina) por los 5 ml necesarios para la confección rutinaria de este gel. Para la disolución total del sustrato se añade previamente el agua mili Q con la cantidad deseada, se calienta a 55° C durante 5 min y cuando se ha añadido el tampón B y el C (detallados ya en el protocolo de electroforesis) se vuelve a calentar a dicha temperatura durante 1-2 min. Preparar inmediatamente el gel. La carga de muestra se realiza con un tampón sin β-mercaptoetanol, con una proporción 2:1 con la muestra y se calientan a 37° C durante 5 min. No se cargan más de 15 µl en los pozos del gel de electroforesis.

Cuando el gel ha corrido (en las mismas condiciones que el gel de poliacrilamida rutinario) se lleva a cabo la detección como sigue:

- a. Se lava dos veces durante 15 min en una solución fría de Tris/HCl 10 mM pH 7.5 con 20 % de isopropanol frío (con una incubación a 4° C previa del tampón). De esta manera se consigue eliminar el SDS del gel.
- b. Se elimina el isopropanol, lavando dos veces durante 15 min con Tris/HCl 10 mM pH 7.5.
- c. Incubar el gel a temperatura ambiente en tampón de Tris/HCl 100 mM pH 7.5. Durante 60-90 min en caso de detecciones rutinarias y en el caso de detecciones que requieran alta sensibilidad se pueden incubar hasta el día siguiente.
- d. Incubar 15 min con Tris/HCl 10 mM pH 7.5.
- e. Teñir el gel con azul de toluidina, que se une a los ácidos nucleicos, (0.2 % azul de toluidina en Tris/HCl 10 mM pH 7.5) durante 5-10 min en agitación.
- f. Desteñir el gel con agua destilada en agitación, hasta obtener un contraste entre el fondo azulado que ha conservado el sustrato e interacciona con el colorante, con las bandas “transparentes” porque el enzima presente ha degradado dicho sustrato. Este proceso exige recambio del agua diluyente y/o un período de destinción “*overnight*”. A partir de aquí el gel se puede conservar en agua destilada varios días sin perder la tinción de fondo.

#### 4.2.6.4 Western Blot

Este método permite la detección específica y sensible mediante el reconocimiento antigénico de una proteína en un extracto total extendido en un gel de electroforesis de SDS-PAGE.

Los ensayos de Western blot se inician mediante una electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Bollag et al, 1996), que podría ser de 10 o 12% de poliacrilamida en función del tamaño de las moléculas a separar. Las proteínas cargadas en el gel, provenían de procesos de lisis específicos para bacteria: pellets de cultivos eran vorteados en solución de lisis (ver apartado 4.3 “lisis de bacterias”). Posteriormente eran cuantificadas (por el método Bradford de BIORAD) para ajustar en todas la misma cantidad de proteína y finalmente se mezclaban con una solución de azul de bromotimol. La electroforesis se corría a amperaje constante 30 mA/ gel, luego este gel de poliacrilamida se transfiere mediante una cámara para la electrotransferencia a membrana PVDF (previamente activada con metanol). El protocolo específico para Western Blot sigue este proceso:

- a) Transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a la membrana a 90V constante durante 1h.
- b) La membrana transferida se bloquea con soluciones de bloqueo variables (TBS-T+BSA 0.5% o leche descremada en polvo 2% o mezclas de ambas) durante 1h a temp. amb. en agitación.
- c) Incubación con anticuerpo primario a una dilución 1/500 (disuelto en la solución bloqueante) normalmente “*overnight*” a 4°C en agitación (ver características de dicho anticuerpo en Apéndice-Anticuerpos).
- d) Lavado del anticuerpo sobrante en TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 137 mM a pH 7.5 + 0.1% de Tritón X-100) en lavados de 10’x 3 + 15’x2.

e) Incubación de la membrana con el anticuerpo secundario a una dilución de 1/10000-1/15000 (Goat anti-mouse) en el mismo tampón, durante 1h a temp. amb. en agitación y finalmente se lava de la misma manera relacionada.

f) Lavado del anticuerpo sobrante en TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 137 mM a pH 7.5 + 0.1% de Tritón X-100) en lavados de 10'x 3 + 15'x2.

g) Detección de la señal lumínica del enzima HRPO conjugado con el secundario en la membrana mediante reacción del luminol como sustrato. Este reactivo es de origen comercial (SIGMA). El reactivo previamente mezclado en sus dos constituyentes, se impregna sobre la membrana durante 1 minuto.

h) Por último se monta la membrana en un cassette oscuro de revelado (con dos plásticos transparentes emparedándolo) y se lleva a cabo la exposición de film fotográfico (Amersham) a tiempos variables para acabar revelando con los líquidos de revelado. Tanto el proceso de manipulación de los films como todo el proceso de revelado se realizó en una cámara oscura.

#### 4.2.7 Determinación de la concentración de proteína

##### 4.2.7.1 Método espectrofotométrico

Este método consiste en la detección espectrofotométrica de la absorbancia en el rango de luz ultravioleta, a 280 nm. Dicha absorbancia depende principalmente de los triptófanos y en menor grado de tirosinas y fenilalaninas y la correlación de la absorbancia con la concentración de proteína depende de la ley de Lambert-Beer:

$$\text{Abs} = c \epsilon_0 l$$

Siendo  $\epsilon_0$  el coeficiente de extinción molar típico de la sustancia que se detectará,  $c$  la concentración en molar y  $l$  el paso de luz que es 1 cm por estandarización de las cubetas. Debido a la variedad en el contenido de residuos

aromáticos de cada grupo de proteínas, se puede afinar la precisión del método calculando el coeficiente de extinción molar específico para una proteína en concreto según su secuencia. Este cálculo se efectúa con el programa online ProtParam de la página web de Swissprot. Este método se lleva a cabo para la cuantificación rutinaria de preparaciones de una sola proteína. Para determinar la pureza además puede efectuarse un barrido de longitud de onda desde el ultravioleta profundo hasta 320 nm.

#### 4.2.7.2 Método de Bradford

Este método se basa en la reacción de los aminoácidos aromáticos con el ácido fosfórico, establecido por Bradford en 1976 y comercializado por BIORAD, es un método rápido y sencillo aunque no estrictamente cuantitativo. Su rango de sensibilidad va de 25 a 200  $\mu\text{g/ml}$ . En nuestro laboratorio se utiliza con una dilución de 2  $\mu\text{l}$  de la muestra en 200  $\mu\text{l}$  de agua mili Q finales. Luego se añaden 800  $\mu\text{l}$  de reactivo de Bradford (diluido 1/5 en agua desde la solución comercial) y se espera entre 2 y 5 min hasta desarrollo de color, que es un color azul más intenso cuanto más alta sea la concentración de proteína. Para cuantificar dicho color se lee la absorbancia a 595 nm (espectrofotómetro Cary 400). No obstante hemos constatado que este método no es de una exactitud fiable para la cuantificación de las RNAsas. Se prepara asimismo una recta patrón utilizando BSA.

#### 4.2.7.3 Método de *MicroBCA*

Este método es una variación del método de Lowry. En este método el ácido bicinquinónico (BCA) reacciona sobre el  $\text{Cu}^{1+}$  que proviene del  $\text{Cu}^{2+}$ , como resultado de la reducción que sufre el  $\text{Cu}^{2+}$  por parte de los enlaces peptídicos en un entorno alcalino. Por la quelación de un  $\text{Cu}^{1+}$  por dos moléculas de BCA se forma un compuesto de color púrpura que tiene un pico de absorbancia a 562 nm. El reactivo de trabajo es una mezcla ya estipulada por el fabricante de un reactivo A, un reactivo B y otro reactivo C en proporciones 50:48:2. En el primero se encuentra el ácido bicinquinónico y en el segundo se encuentra sales de carbonato que estabilizan el compuesto cromóforo. La

estructura macromolecular y otro tipo de enlaces, como los puentes disulfuro, influyen en el resultado final y por eso no es simplemente suma de enlaces peptídicos y a concentraciones moderadamente altas, el método queda saturado y fuera de la linealidad.

El límite de sensibilidad es de 0.5 µg/ml por lo que es de elección para la detección de concentraciones de péptido en muy baja concentración. El protocolo para placas de 96 pocillos (variante del original) es como sigue:

- a) 100 µl de muestra (normalmente se trata de una dilución estimada de la original) se mezclan en el pocillo con 100 µl de reactivo de trabajo, para cada muestra.
- b) Mezclar intensivamente en la placa de 96 pocillos durante 30 s, cubrir la placa e incubar a 37°C durante 2 horas.
- c) Enfriar la placa y leer la absorbancia a 562 nm en un lector de placas (Victor, Perkin Elmer).

El sistema viene con una solución de BSA para realizar la recta patrón (que deberá ejecutarse en paralelo para cada ensayo). Las concentraciones a preparar son: 200, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1, 0.5 µg/ml. Se recomienda encarecidamente realizar triplicados tanto de los puntos de la recta patrón como de las muestras. Se utiliza BSA como proteína patrón.

### **4.3 Estudio de la actividad antibacteriana**

#### **4.3.1 Cultivo y crecimiento de las cepas de *E. coli* y *S. aureus***

El cultivo bacteriano es una metódica de rutina en los laboratorios de Biología Molecular (Sambrook et al., 2001). Brevemente se resume las consideraciones para el crecimiento de bacterias en nuestro laboratorio:

Para crecer una especie bacteriana mientras no sea para fines de expresión de proteína se utiliza medio LB estéril en el cual se inoculará en condiciones estériles (trabajo a la llama) un preinoculo saturado en un volumen 100 veces menor al volumen final, en todo caso si hay variaciones de OD del preinóculo inicial utilizamos la fórmula extraída de la ecuación logística:

$$V \text{ inóculo} = \frac{\text{OD final}}{\text{OD inicial}} \times \frac{\text{Vol. final}}{2^n}$$

Siendo n el número de generaciones sucedidas en el tiempo de incubación que en el caso de *E.coli* es t/ 25min dado que cada 25 min se produce una nueva generación. Para *Staphylococcus aureus* que es la especie Gram-positivo seleccionada en nuestro estudio, el tiempo de duplicación es de 30 min por lo que los períodos de incubación siempre serán ligeramente mayores.

Para la mayoría de experimentos se trabaja con el cultivo en fase logarítmica del crecimiento por lo que la OD a 600 nm se espera que estará entre 0.6 y 0.8, lo cual tras contrastarse por sembrado en placa representa  $6 \times 10^5$  cfu's/ ml (cfu: unidad formadora de colonia). En el caso de realizar experimentos con cultivos en fase de saturación (de interés por presentar la célula un estado metabólico diferente) se suele llegar a O.D a 600 nm de alrededor de 2-3. En cualquier caso, los volúmenes de trabajo para detectar OD o realizar pruebas de viabilidad se diluyen dado que a estas densidades igualmente las mediciones han perdido linealidad. El hecho de diluir y realizar el ensayo inmediatamente no debe perturbar el estado morfológico y metabólico de manera perceptible.

Para sembrar en placas de Petri se utilizarán medios LB con agar y aditivos si son necesarios. En el caso de necesitar antibióticos, para la selección de un plásmido transformante, la concentración de antibiótico en la placa será de 100 µg/ml y normalmente no tendrán una longevidad mayor de un mes para evitar degradaciones inadvertidas del antibiótico. El volumen de sembrado es de 100 µl siempre y se realizará igualmente en condiciones de esterilidad (a la llama). La dispersión se realiza por asa de Digrafsky previamente esterilizada.

#### 4.3.2 Ensayos de viabilidad bacteriana

Se describen aquí los métodos con cultivos bacterianos en medio líquido o en placa de Petri para determinar su viabilidad.

##### 4.3.2.1 Ensayo por recuento de unidades formadoras de colonias

Para el ensayo de viabilidad, se ha dispuesto un cultivo en crecimiento líquido de LB, en agitación orbital continua de aproximadamente 200 rpm's a 37 °C (normalmente el volumen no supera los 10 ml y se incuba en tubos de 50 ml Falcon en posición vertical). Luego, para la cuantificación en este ensayo se ha utilizado el clásico banco de diluciones de un cultivo bacteriano en medio líquido. El cultivo se diluyó  $10^6$  veces aplicando 1  $\mu$ l de cultivo en 1000  $\mu$ l de tampón PBS estéril y luego de esta dilución 1  $\mu$ l de nuevo en 1000  $\mu$ l de tampón PBS estéril. Preferentemente pueden realizarse diluciones previas sucesivas de 1/10-1/100. Como se viene estandarizando en el laboratorio se emplacan 100  $\mu$ l en placas LB que se dejan en incubación toda la noche hasta aparición de las colonias. Si las cfu's aparecidas no superan el número de 500 se realiza un recuento total, en el caso de que el número sea mayor se divide la placa en ocho secciones iguales y se cuentan dos de ellas que morfológicamente representen a toda la placa. Luego se calcula la media de los recuentos y se multiplica por 4 por la relación de secciones contadas respecto a las totales. El método no resultó ser demasiado correlativo con la densidad óptica a 600 nm, pero sí moderadamente con la viabilidad celular bacteriana por cuantificación de ATP, como se mostrará más adelante en la sección de Resultados (Fig. 76).

##### 4.3.2.2. Ensayo por cuantificación de ATP (*BacTiterGlo*)

La actividad antimicrobiana se ensayó mediante una modificación del protocolo descrito por Hilpert y colaboradores (2005), utilizando el kit de viabilidad microbiana *BACTiterGlo*© (Promega). Se siguió este protocolo:

A) Cultivos “*overnight*” (o/n) de *E.coli* BL21DE3 fueron utilizados para inocular cultivos LB líquidos frescos. Los cultivos inoculados crecieron hasta fase logarítmica con una O.D<sub>600nm</sub> de 0.6. El volumen de cultivo estandarizado es de 5 ml en tubos de 50 ml estériles, con un inóculo de 50 µl del citado cultivo (o/n).

B) La RNasa 3/ECP o la RNasa 7 o sus mutantes se añadieron a una concentración final de 4 µM (normalmente en volúmenes de 100 µl para que sean manejables) y se siguió el crecimiento bacteriano a 37°C hasta un máximo de 24h.

C) La viabilidad de las células bacterianas se evaluó mediante el ensayo BacTiter Glo®, basado en la luminiscencia producida por el sistema de luciferasa dependiente de ATP. El cultivo celular se diluyó 1/10 en 50 µl de LB fresco y estéril y se añadió una cantidad igual de reactivo BacTiter A+B recompuesto.

D) Las mediciones se tomaron como medidas arbitrarias de luminiscencia, registradas por un luminómetro en placa de 96 pozos (Victor-Perkin Elmer). El ensayo, al medir el contenido celular de ATP es medida directa de viabilidad. El ensayo se testó para concentraciones de ATP conocidas de forma que lo pudiésemos validar y transformar los valores de la fluorescencia en cantidad de ATP. Para este fin se confeccionó una recta patrón con los siguientes puntos: 10 pM, 0.1 nM, 1 nM, 0.01 µM, 0.1 µM y 1 µM.

Los resultados de viabilidad celular bacteriana se calcularon como porcentaje en relación al valor de referencia de luminiscencia máxima, relativo al control interno de cada experimento, a partir de un cultivo no tratado. Asimismo, se calculó el valor de letalidad, como porcentaje de reducción del valor total de ATP.

#### Análisis de proteínas en cultivos de bacterias (*E.coli* y *S. aureus*)

Para la detección de proteínas en los cultivos bacterianos se procede con el siguiente protocolo de lisis:

1) Centrifugación en microcentrífuga a 12000 g (13200 rpm's) durante 1 min. Se descarta el sobrenadante.

2) Resuspensión total del sedimento en tampón de lisis (volumen aproximado de 400 µl de Tris/HCl 10mM pH 7.5, SDS 10%, EDTA 2 mM).

3) Sonicación pulsada a intensidad media en baño de hielo, durante 2 tandas de 10 s.

4) Centrifugación en microcentrífuga a 12000 g (13200 rpm's) y a 4° C durante 1 min.

Si se desea detectar proteínas secretadas:

4a) Se recupera un volumen de sobrenadante adecuado a la cantidad de proteína requerida o se cargan 12 µl, que se utilizarán para estimarla por electroforesis SDS-PAGE.

Si se desea detectar proteínas agregadas en cuerpos de inclusión o proteínas solubles endógenas:

4b) Se recupera el sedimento y se mezcla con 10 µl de tampón de carga de electroforesis, para llevarlo a temperatura de 100°C durante 5 min. En el proceso conviene remover la mezcla y cargar el gel de poliacrilamida (12% SDS-PAGE) cuando aún esté caliente (y fluido).

En ciertos casos, cuando se quiere conservar la funcionalidad de la proteína, la extracción debe ser más suave. Esta suavidad no la proporciona en ningún caso la sonicación, ni el calentamiento a 100°C con agentes como el ditiotretitol o el β-mercaptoetanol. Para una extracción de estas características, adecuada para utilizar en el zimograma, o en el Western Blot, utilizamos la lisis mediante el tampón comercial de lisis de pared bacteriana Bug Buster™, de la casa Novagen. El protocolo es como sigue:

- e) Centrifugación del cultivo bacteriano (entre 200 y 400  $\mu$ l dependiendo de la cantidad de material necesario) a 9000 g durante 1'. Descarte del sobrenadante.
- f) Resuspensión en 600  $\mu$ l de BugBuster (o menos en el caso de necesitar una concentración de ciertas proteínas, el mínimo testado es de 200  $\mu$ l).
- g) Incubación en agitación a 37°C durante aproximadamente 20 min.
- h) Centrifugación a 13000 rpm's en centrífuga de sobremesa, y recuperación del sobrenadante. Esta disolución ya está lista para mezclar con tampón de carga y utilizarse en SDS-PAGE al porcentaje de rutina.

#### **4.4 Estudio de la actividad RNasa**

##### **4.4.1 Obtención del RNA bacteriano.**

La extracción y manipulación de RNA requiere una atención y tratamiento especial al ser una molécula extremadamente lábil, que además puede ser objeto de degradación de la ribonucleasa epitelial que se encuentra en la más mínima descamación de piel, pelo y uñas, además de las que puedan existir en cualquier germen en aerosoles. Por ello el material además de estar autoclavado se ha tratado con dietilpírocarbonato (DEPC), inhibidor eficaz de RNasas que después se elimina fácilmente, por hidrólisis, en el propio proceso de autoclavado. En lo que se refiere a las puntas de pipeta para asegurar totalmente una ausencia de contaminaciones, se usan con filtro, lo cual exige que sean suministradas con certificación *RNase free* por el fabricante. El RNA siempre es almacenado a -80°C, aunque sea temporalmente en cajas *RNase free*. A continuación se explica el proceso de extracción en sí:

Cultivos de *E.coli* BL21 a una densidad óptica a 600 nm del orden de 0.6 se incuban a 37°C en baño termostatzado con las respectivas concentraciones y

tipos de RNAsas para comprobar sus efectos sobre el RNA de la bacteria a diferentes tiempos. Para proteger el RNA bacteriano debido a su carácter extremadamente lábil, se añade el doble de volumen del reactivo *RNA Protect Bacteria Reagent*© de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante (normalmente se trabaja con 200-300 µl de cultivo, por lo que el volumen final queda en 800 -1200 µl). Dicho reactivo contiene como elemento activo bromuro de tetradeciltrimetilamonio que constituye además de un inhibidor parcial de algunas RNAsas, un precipitante del RNA (Dahle 1993). Seguidamente se centrifuga el cultivo a 9000 g durante 10 min para obtener un sedimento del que extraer el RNA. En la elección del método de extracción es necesario que se garantice la extracción del RNA total incluyendo tRNA y las especies de RNA más pequeños. No obstante, es crucial que al mismo tiempo se inhiban con total seguridad y de manera inmediata cualquier RNasa. Los métodos convencionales de extracción comprendían lisis previas de las bacterias ya fuera por acción de la lisozima, por disrupción mecánica o por sonicación, pero estos métodos suponían que la liberación del RNA de la bacteria se da en un medio donde la RNasa aún estaba presente y muy probablemente activa. Esto es así incluso sustituyendo el medio o el tampón de resuspensión por sucesivos centrifugados y lavados, porque las RNAsas pueden quedar íntimamente adheridas a las envueltas de las bacterias tal como se ha comentado previamente en la introducción y como demuestran otros trabajos (Torrent et al 2008). Los métodos de extracción basados en la separación fenol-cloroformo, no son del todo eficientes en comparación con los métodos por adsorción en columna y probablemente pueda perderse alguna población de RNA, sobre todo la de los RNA's pequeños. Pero el primero será el método de elección debido a la inmediata desnaturalización de cualquier tipo de proteína, la cual cosa conlleva la inhibición total de las RNAsas con las cuales se ha realizado el experimento.

Una vez se obtiene el sedimento del cultivo protegido con *RNA protect bacteria Reagent*, se procede con este protocolo (según instrucciones del fabricante se añade la mitad del volumen de cultivo inicial del cual se extraerá el RNA).

- 1) Se añaden 250 µl de Qiazol, reactivo que contiene fenol-cloroformo, (de la casa Qiagen) y se agita por vórtex al máximo durante 15 s, se deja reposar 10 min.
- 2) Se centrifuga a 12000 g a 4°C durante 15 min, se extrae la fase acuosa (superior) y se dispensa en nuevos tubos *RNase free*.
- 3) Se añaden 200 µl de cloroformo y se agita por vortex unos 10 s. Se deja en reposo 5 min.
- 4) Se centrifuga a 12000 g a 4°C durante 15 min, se extrae el sobrenadante superior evitando no absorber la fase orgánica de color rosa. Se transfiere el líquido a un tubo nuevo, manteniendo tanto el material como el entorno en condiciones de *RNase free* en todo momento.
- 5) Se añaden 200 µl de isopropanol y se agitan 10 s. Luego se centrifugan a 12000 g a 4°C durante 30 min, se extrae el sobrenadante. En este momento se puede llegar a ver el sedimento de RNA que puede ser conspicuo y con aspecto de gel.
- 6) Se añade un volumen de etanol al 75%, se resuspende y se centrifuga 15 min a 12000 g a 4°C. Al finalizar se extrae el sobrenadante cuidando no tocar el sedimento. Se deja secar a temperatura ambiente con el tapón del tubo abierto y en posición horizontal.
- 7) Se resuspende el sedimento con agua *RNase free*, dejándolo durante unos min a temperatura ambiente. Nunca resuspender con vórtice.

Llegados a este punto se podría refinar la purificación mediante una columna de purificación basadas en hidroxipatita. Las que se utilizan habitualmente son las columnas RNeasy™ de Qiagen con la que se obtienen rendimientos de aproximadamente el 95% del RNA añadido en la columna. Este paso es de interés porque asegura que la muestra esté totalmente libre de fenoles y cualquiera de los otros disolventes orgánicos utilizados. En el estudio del rendimiento de los medios y

para disponer de un RNA sin tratamientos también fue de interés disponer de este método. El protocolo del fabricante es básicamente el siguiente:

- 1) Adición de la muestra con RNA y centrifugación a 10000 g 20 seg, se descarta el eluido.
- 2) Adición de tampón RWT1 (disolución de sales de lavado en etanol composición no descrita por la casa comercial), idéntica centrifugación y descartado.
- 3) Adición de tampón RPE (disolución de sales de lavado en etanol, composición no descrita por la casa comercial), idéntica centrifugación y descartado. Este paso se repite dos veces.
- 4) Transferencia a un tubo nuevo para recoger el eluido.
- 5) Adición de agua *RNase free*, incubación de 1' y centrifugación a 12000 g durante 1' (el volumen de elución es de 45  $\mu$ l).

Este método por sí solo es incapaz de limpiar totalmente las trazas de proteínas, tal como se demuestra en la electroforesis SDS-PAGE (Fig. 34) por tinción con nitrato de plata, aunque se obtenga mayor cantidad de RNA y buena calidad si no hay RNasas. Precisamente si no incubásemos con RNasas sería el método de elección, no obstante al acompañar de trazas de RNasas en todo momento siempre tendríamos degradación como se comprobó sobradamente en los ensayos preliminares.

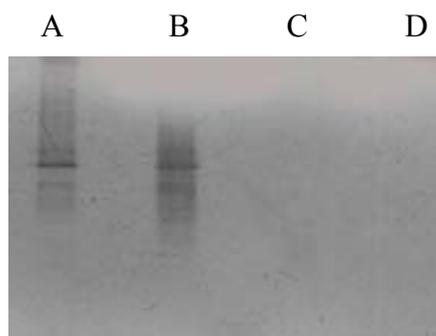


Figura 34 Gel SDS-PAGE al 15% y tinción con  $\text{AgNO}_3$  de dos extracciones de RNA bacteriano (*E. coli*) mediante el método RNeasy de Qiagen. A y B representan dos muestras de bacteria incubada con RNasa 3/ECP a  $4\mu\text{M}$  y a crecimientos de  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  de 0.6 y 1 respectivamente: se pueden observar la aparición de bandas de proteínas en los carriles con incubaciones. C y D son controles negativos, el primero es con agua RNase free pasada por la columna y D es agua RNase free cargada directamente.

#### 4.4.2 Digestión del RNA

El RNA puede llegar a digerirse a partir de la acción de las RNasas de nuestro estudio desde el exterior de las células, es decir, por simple incubación sobre los cultivos bacterianos. Para las incubaciones con la RNasa 3/ECP y RNasa 7 y sus variantes sobre cultivos líquidos, los volúmenes finales fueron de  $125\ \mu\text{l}$ , la densidad óptica para dichos cultivos fue de 0.8 y las RNasas fueron incubadas a una concentración de  $4\ \mu\text{M}$ .

La digestión de RNA comercial (tanto tRNA como rRNA) se realiza en concentraciones finales de aproximadamente  $200\ \text{ng}/\mu\text{l}$  y se trabaja en volúmenes de  $125\text{-}200\ \mu\text{l}$ . Estos volúmenes serán necesarios básicamente para diluir los componentes que se incluyen en los tampones de suministro y pudieran interferir en el proceso. El RNA total extraído de los cultivos bacterianos, aunque se obtiene a concentraciones muy similares, debido a limitaciones de la cantidad disponible, exige que se trabaje a volúmenes de reacción mucho menores (entre  $20$  y  $10\ \mu\text{l}$ ) y no requiere la dilución de los RNA comerciales dado que ya viene disuelta en agua RNase free. El tampón de reacción de digestión es Tris/HCl  $10\ \text{mM}$  pH 7.5 RNase free y las RNasas se añaden desde una concentración  $1\ \mu\text{M}$  hasta  $0.01\ \mu\text{M}$  finales ( $1\ \mu\text{l}$  en  $100\ \mu\text{l}$  por ejemplo). Las digestiones se llevan a cabo a  $37^\circ\text{C}$  en tiempos no superiores a  $30\ \text{min}$ , y se detienen por congelación inmediata a  $-20\ ^\circ\text{C}$ . El orden de

adición en reacciones sin inhibidor es: RNA, tampón, RNasa. Para la muestra control con inhibidor el orden será de: tampón, RNasa, inhibidor y por último RNA.

En cuanto a la adición de inhibidor de Ribonucleasas (RI), nunca debe ser inferior a una dilución de 1/20 en el volumen de reacción final, debido a los aditivos que contiene su tampón de dilución. La relación molar con la RNasa 3/ECP debiera ser 1:1 para conseguir una inhibición efectiva. Sin embargo, el RI comercial se suministra en unidades de U/ $\mu$ l. A pesar de desconocer la relación molar, se mantuvo una relación entre las unidades de inhibición y el sustrato según la indicación por el fabricante de la concentración de inhibidor de 45 U/ $\mu$ l (una unidad de inhibición de RI inhibe la actividad de 5 nanogramos de la RNasa A al 50%, tal como indica el suministrador). Asumiendo que RI ejerce su efecto inhibitorio con la misma relación molar 1:1 con cualquier RNasa homóloga a la RNasa, el decremento de actividad sería el mismo aunque fuese la RNasa 3/ECP o RNasa 7. Se hicieron los cálculos estimando un 75% de inhibición.

En el caso de RNA extraído o RNA comercial la incubación fue equivalente, tal como se detalla a continuación:

Los volúmenes finales en el caso de RNA total fueron de 20  $\mu$ l, y la concentración final de RNasa 3/ECP se optimizó a 0.01  $\mu$ M. En el caso del rRNA y del tRNA el volumen de reacción fue de 20 o 50  $\mu$ l ya que las soluciones stock tenían una concentración tan alta como 4000 ng/ $\mu$ l, los tampones para el rRNA y el RI, utilizado en los experimentos de inhibición, requerían conseguir una adecuada dilución con el fin de evitar interferencias de las sales con la ejecución de la electroforesis microfluídica. La incubación se hizo por lo general a estos tiempos: 0, 5, 10, 15 y 20 min y se incubaron en tubos independientes para evitar así contaminaciones. La reacción se detuvo por congelación inmediata a -20°C en un bloque frío y a la vez almacenaje en congelador (alternativamente y para mayor seguridad, se puede congelar a -80°C). Luego 1 $\mu$ l de cada reacción se transfirió a un tubo *RNase free* de 0.2  $\mu$ l para componer la mezcla necesaria para ejecutar la electroforesis microfluídica (ver apartado más arriba). Los resultados reiterativos a tiempo 0 demuestran que

este procedimiento puede detener la actividad eficientemente sin necesidad de utilizar compuestos que pudieran interferir en posteriores análisis.

#### 4.4.3 Electroforesis microfluídica para análisis de RNA.

El RNA extraído de las bacterias se debe analizar tanto cualitativamente como cuantitativamente para obtener información de la cantidad y calidad del RNA y de qué población de RNA ha sido principalmente afectada por eventuales tratamientos con cualquiera de las RNasas y sus mutantes. Tradicionalmente existe la posibilidad de realizar electroforesis en geles de agarosa a porcentajes adecuados (1%) con tampones *RNase free* y con formaldehído en su composición (0.1%) para inhibir eventuales actividades RNasa contaminantes (Sambrook et al., 2001) o electroforesis de poliacrilamida que son más resolutivas para el RNA (Saxena et al, 2002). Sin embargo ambos métodos representan una preparación farragosa y demasiado expuesta a degradaciones y contaminaciones eventuales de RNasas (se adjunta imagen de prueba de un gel realizado en condiciones *RNase free* y un “gel” mediante la técnica de electroforesis microfluídica en la figura 35). Por otro lado, la resolución de las bandas nunca suele ser la óptima para distinguir diferentes poblaciones de RNA y su estado. La electroforesis microfluídica con el paso del gel transportador por un gel capilar proporciona una resolución óptima.

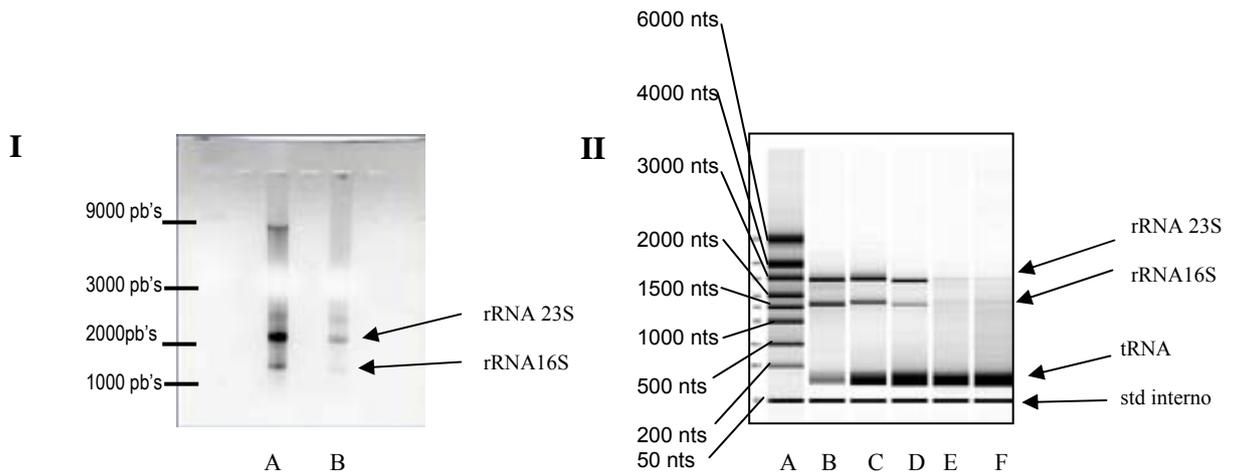


Figura 35. Comparación visual entre un gel de agarosa para RNA (I) y EF microfluídica (II). A y B (I) son dos muestras de RNA a diferente concentración, para II: A es el marcador de peso molecular (interno, B es una preparación de RNA de *E. coli* sin tratamiento, de C a F son preparaciones tras incubación con RNasa 3/ECP 4 μM a 0, 5, 15 y 30 min respectivamente.

Por estos motivos hemos escogido el método de la electroforesis microfluídica, ya que es capaz tanto de discriminar los distintos RNAs celulares como de estimar las concentraciones y la relación de RNA 23S/16S que indica específicamente la calidad del RNA (Robinson & Wade 1968, Cammack et al 1970). La técnica permite visualizar cualquier RNA de manera precisa como pico de señal de fluorescencia, con una resolución similar a la de HPLC. Por otra parte, se sabe que el método ha demostrado no verse afectado por eventuales contaminación de fenol ni etanol ni del reactivo Qiazol que se utiliza en la misma extracción del RNA.

En lo que respecta a la relación 23S/16S es necesario hacer un inciso sobre su significado. La relación teórica de 2 viene de la composición molar de las subunidades 30S y 50S que componen los ribosomas. Esta relación es constante aunque aumente o disminuya la cantidad total de rRNA a causa de cambios metabólicos de la bacteria. De cada subunidad se deriva, tras desproteinización, las moléculas de RNA ribosómico 23S y 16S que comprenden las mismas relaciones equimolares. Por otra parte la asociación con ribonucleoproteínas hace la fracción de rRNA más estable en comparación con el mRNA y el tRNA por lo que es mejor indicador de la calidad del proceso de extracción en sí. No obstante existen eventos tanto en la extracción como en los procesos experimentales previos que pueden modificar la relación artificialmente (efecto Jhonston-Ogston, por ejemplo, que consiste en un fenómeno en la sedimentación de reparto de fases de especies poliméricas de peso molecular y concentraciones parecidas) y por ello se recurre a veces a procesos de integración matemática de otras poblaciones del RNA (como el cálculo del área del RNA degradado) o una inspección y comparación cualitativa.

El fundamento de la técnica de electroforesis microfluídica se basa en la movilidad electroforética por una serie de microcapilares rellenos de un fluido separador. La muestra se halla impregnada de un marcador fluorescente que permite su identificación y cuantificación al paso por un detector. El sistema separa por masa molecular en función del tiempo de arrastre, luego el *software* transforma ese tiempo en distancia y el pico de la señal fluorescente por

intensidad de color y de esta manera puede generar “geles virtuales” para hacerlos comparativos a los geles de agarosa o poliacrilamida tradicionales.

Se ha escogido el sistema *Experion* de la casa BioRad (Fig. 36), y consta de varios módulos tanto para el cebado del circuito de la electroforesis con el gel, como aparato para generar la corriente y a la vez detectar el paso de las moléculas marcadas, así como de un *software* para el análisis. Esta técnica ya ha tenido experiencias positivas referenciadas, entre ellas el chequeo y análisis del RNA para PCR real time (Fleige & Pfaffl, 2006).

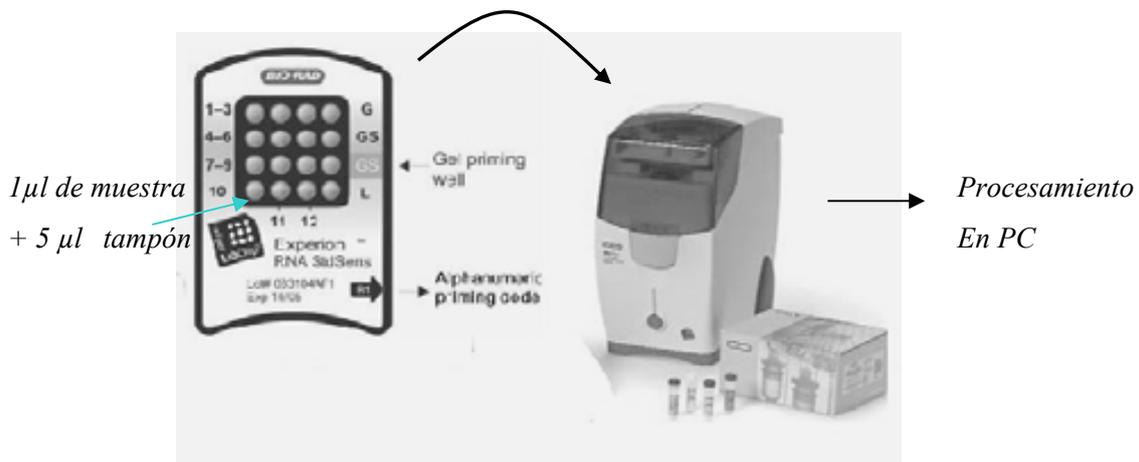


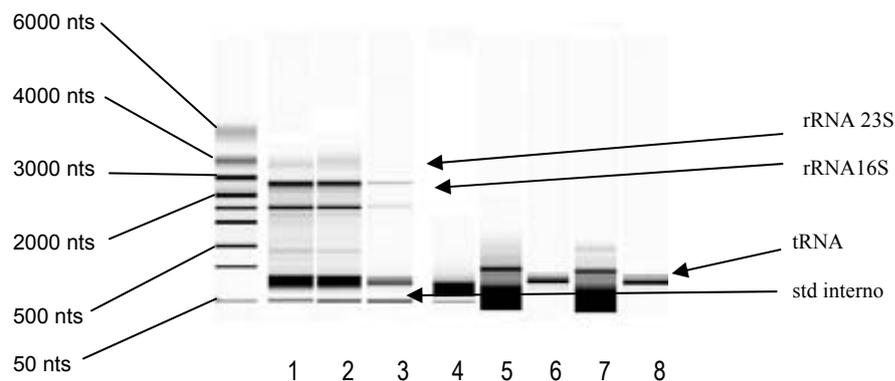
Figura 36. Chip de aplicación de muestras para RNA y sistema *Experion*. El chip se rellena (priming) de un gel que contiene el marcador fluorescente para RNA y arrastra todas las muestras que se separan electroforéticamente.

Las muestras deben ser tratadas previamente según este protocolo:

- 1) El RNA se calienta 2 min a 70°C con el fin de deshacer estructuras secundarias, se da un pulso de centrifuga para recoger la condensación en el tubo y se deposita en hielo.
- 2) Se añade 5 µl de tampón de carga para *Experion* por cada microlitro de muestra, se agita en vortex 10 s. Este tampón contiene el compuesto fluorescente para detectar el RNA y un marcador de peso inferior que eluye a los 20 s y permite calibrar el “ladder” de patrones de peso molecular.
- 3) Se vuelve a dar un pulso de centrifuga, se deposita en hielo.

- 4) El gel de electroforesis ha de ser reciente y parte de él se mezcla en el mismo momento de la electroforesis con el marcador fluorescente en una proporción de volumen 65 gel/1 marcador. Se mantiene en la oscuridad.
- 5) Se aplican los 6 µl de preparación de la muestra en el “chip” Experion, junto con los marcadores y se introduce agua en los pocillos donde no se tenga muestra.
- 6) El sistema comprueba la ausencia de burbujas en el circuito (que no permitirían la correcta marcha de electroforesis).
- 7) La electroforesis en el sistema Stds RNA bacteriano dura 70 s y se realiza a un voltaje estandarizado por el aparato para este fin.

La evaluación del RNA obtenido se presta al análisis de la calidad, cantidad y poblaciones de RNA. La calidad viene indicada por la relación de los picos del rRNA 23S sobre el 16S, siendo las relaciones óptimas las que sean próximas al 2. Esta relación es la esperada en una extracción de rRNA de las bacterias y por lo tanto si ha habido una ausencia de degradación la debe de conservar. Como se puede observar en la figura 37 se evalúa la conservación de dicha relación. El sistema dispone de su propio marcador de peso molecular que queda calibrado a partir del tiempo de elución (Fig. 38).



*Figura 37 Gel virtual de electroferograma mostrando preparaciones de RNA de bacteria (carriles 1 y 2 preparaciones no tratadas, 3 y 4 incubadas con RNasa 3/ECP durante 5 y 10 min respectivamente) y preparaciones de RNA comercial en los carriles 5 al 8 (5 rRNA, 6 tRNA, 7rRNA y 8 tRNA). El estándar interno es una banda de RNA del mismo peso molecular mínimo contenido en el tampón de aplicación.*

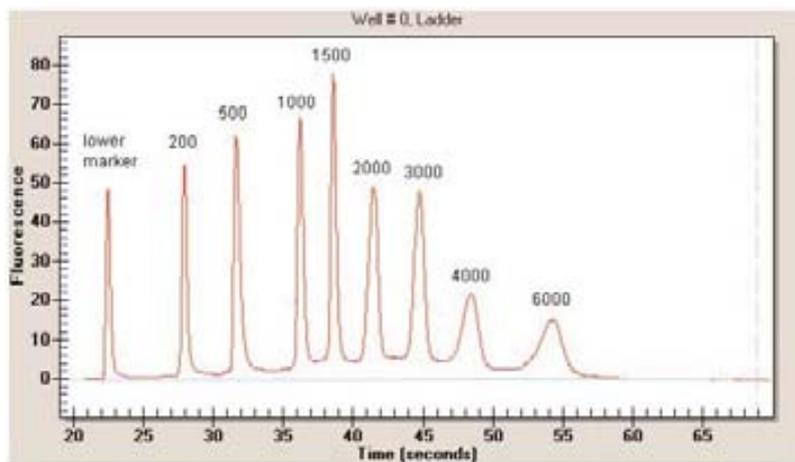


Figura 38. Electroferograma del marcador de nucleótidos para RNA (incluido en el propio kit del sistema de electroforesis microfluidica Experion). Corresponde con los que se muestran en las figuras 35, 37, 39 y 40.

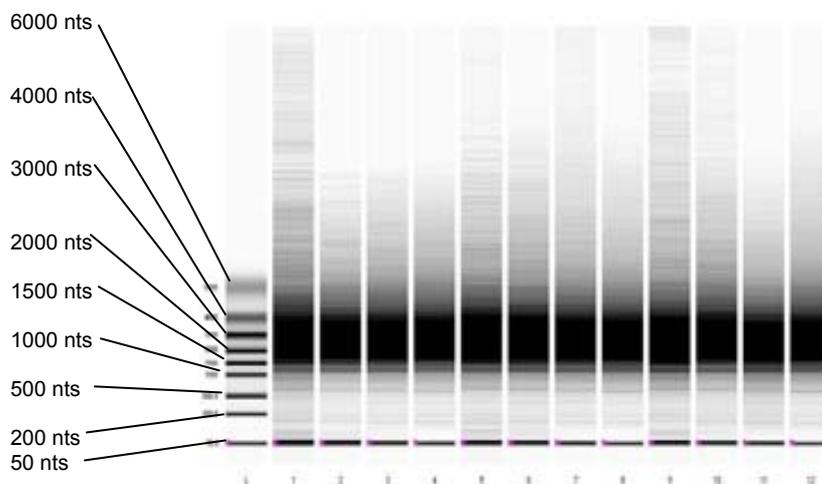
La intensidad de la señal de fluorescencia obtenida se compara con la de un marcador de masas moleculares incluido en el propio kit, que sirve para calibrar tanto las posiciones de los picos como la cantidad esperada, el tampón de carga para cada muestra contiene además una marca del peso molecular más bajo (Standard interno de la figura 37) con el fin de relacionar todas las electroforesis con el tiempo de duración de la de los estándares de peso molecular. El método es de entrada más sensible y específico que las determinaciones a 260 nm (dada la independencia de la presencia de etanol o fenol) siempre y cuando no haya contaminaciones de DNA genómico. De todas maneras, en caso de presencia de DNA genómico, el sistema permite también su identificación.

Las diferentes poblaciones de RNA se pueden detectar por la ubicación de los picos de fluorescencia en el tiempo de electroforesis. Tras repeticiones continuas en nuestra experimentación y tal como viene descrito según protocolos y muestras del fabricante (Fig. 38) sabemos que a 37 s aparece el pico correspondiente al rRNA 16S y a 46 s el del rRNA 23S. A 24 s aparece el rRNA 5S y a 27 s el RNA de transferencia. El RNA mensajero aparecería como una paulatina elevación del “ruido de fondo” de la fluorescencia desde los 27 s en adelante, pero diferenciándose del RNA degradado, y su aparición no afectaría a la relación de calidad 23S/16S (Robinson & Wade 1968) ni a la

aparición del resto de picos ni su altura (intensidad de señal). El RNA degradado se distingue por concentrar su señal dispersa en los primeros segundos, por estar ausente de picos notables y por aminorar los picos convencionales de RNA's. El DNA genómico que resultaría en una contaminación en este método, puede ser identificado según el tratamiento recibido, pero si está degradado se encontraría al nivel del tRNA sin afectar la relación 23S/16S y si no estuviese degradado se encontraría entre los dos picos de estos dos RNA's ribosómicos.

Para estandarizar la aparición de algunos de los RNA's, se realizaron electroforesis microfluídicas de cantidades conocidas de RNA de muestras comerciales.

Dada la poca literatura al respecto de esta técnica, para seguir un patrón de calidad máxima, el propio software del sistema, presenta una serie de ejemplos de referencia que se presentan en las figuras 39 y 40.



*Figura 39. Gel virtual de un electroferograma modelico para análisis de mRNA, el protocolo de corrimiento difiere del de extracción de RNA total por un voltaje de ejecución superior. Los marcadores de peso molecular son, de arriba abajo: 6000, 4000, 2000, 1500, 500, 200 y 50 nucleótidos.*

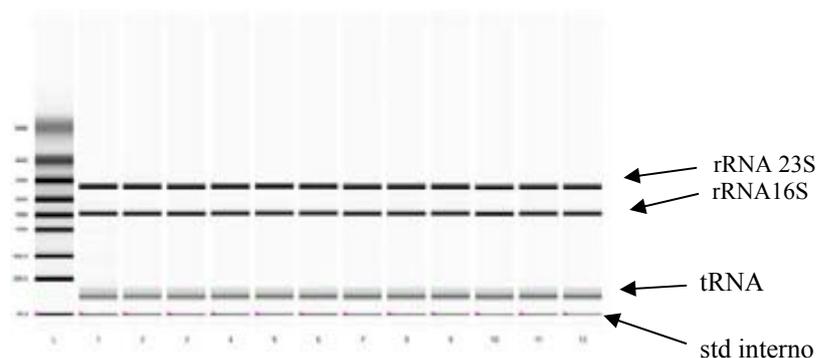


Figura 40. Gel virtual que se obtiene de un electroferograma modélico para análisis de las poblaciones de RNA total procariota standard. Los marcadores de peso molecular son, de arriba abajo: 6000, 4000, 2000, 1500, 500, 200 y 50 nucleótidos (mismo marcador que el que se detalla en figuras 37 y 39).

#### 4.5 Cristalización de proteínas para estudios estructurales por difracción de rayos

##### X

En nuestro grupo se preparan cristales de las proteínas de trabajo para poder realizar estudios de difracción de rayos X que permitan resolver estructuras tridimensionales. Esta información es de vital importancia para conocer qué aminoácidos, estructuras e interacciones pueden ser claves en sus funciones principales y de esta forma establecer las estrategias para el diseño de fármacos. Para obtener un espectro de difracción de rayos X interpretable es necesario trabajar con cristales regulares. Dichos cristales deben ser de un mínimo tamaño y calidad para poder obtener una buena señal de difracción y deducir la estructura tridimensional de las proteínas. Para la obtención de cristales la muestra de proteína debe ser de una pureza superior al 90% y libre de sales. Esta pureza se puede conseguir cuando la proteína ha sido doblemente purificada, primero por el paso por la columna de intercambio iónico mediante FPLC y luego por la cromatografía HPLC por fase reversa C4 Vydac. Las condiciones para estas cromatografías ya han sido explicadas en apartados anteriores.

La técnica de cristalización se basa en la formación de estructuras ordenadas y simétricas de la proteína en las tres direcciones del espacio mediante soluciones de precipitantes y deshidratantes, que junto a la incubación

en condiciones de temperatura y humedad controladas lleva a la formación de los cristales.

La cristalización es básicamente un proceso de precipitación controlada en el que es necesario llegar a unas condiciones próximas a la precipitación, y conseguir que las proteínas se organicen en un cristal tridimensional regular. Es necesario que inicialmente se formen centros de nucleación de la cristalización. Durante el proceso de crecimiento de un cristal tenemos 3 etapas principales:

Fase de nucleación: unas pocas moléculas forman un agregado estable.

Fase de crecimiento: se añadirán ordenada y regularmente más moléculas.

Fase final: el proceso de crecimiento se detiene.

Factores que influyen:

- pH
- Fuerza iónica (reduciendo “*salting in*” o incrementando “*salting out*” la fuerza iónica)
- Temperatura 4°C, 16 °C, temperatura ambiente (20°C)
- Precipitante:
  - Sales inorgánicas
  - Solventes orgánicos
  - Moléculas orgánicas
  - Aditivos (iones, ligandos)
- Concentración de proteína (10-50 mg/ml)
- La proteína a cristalizar debe encontrarse inicialmente en una concentración próxima a la saturación.
- A continuación modificamos muy lentamente las condiciones hacia la sobresaturación.
- Frecuentemente utilizamos sales inorgánicas o moléculas orgánicas muy solubles, de forma que podemos incrementar mucho su concentración sin desnaturar la proteína; por ejemplo moléculas como sales de  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , o

polímeros (PEG) que compiten por el agua y reducen la solubilidad de la proteína.

#### 4.5.1 Metodología de la gota colgante (*hanging drop*)

El protocolo consiste en equilibrar paulatinamente una gota de la proteína con una concentración de precipitante determinada. Para eso se cierra un sistema con una gota colgante de concentración de precipitantes menor que la final y se llega al equilibrio por incubación con un volumen de soluciones de precipitación vecino a la gota, dicho volumen lo denominamos reservorio (Figs. 41 y 42).

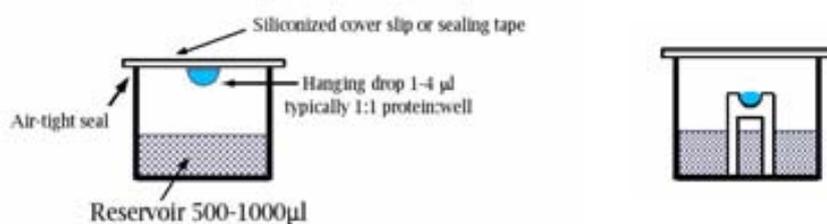


Figura 41. Esquema de la disposición de reservorio y gota con proteína para su cristalización. En la izquierda el sistema “hanging drop” y en la derecha el sistema “sitting drop”.

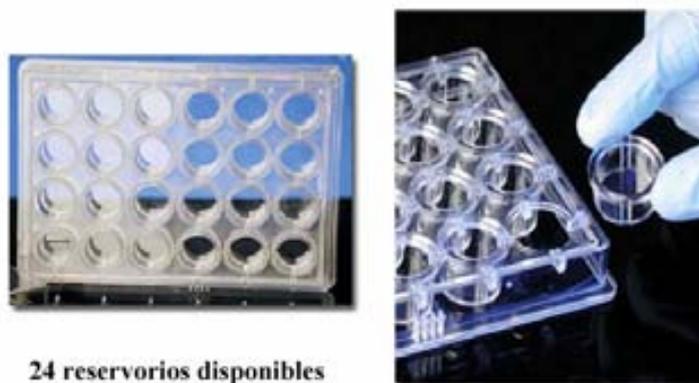


Figura 42. Imagen de las placas utilizadas para la formación sistemática de cristales en diferentes condiciones.

El montaje se realiza como sigue:

- 1) Placas de plástico con pocillos para test (6x 4 de 1 cm de diámetro) se llenan con 1 ml de reservorio. El borde de los pocillos se impregna con vaselina, esto permitirá un cierre hermético.
- 2) En un cubreobjetos circular de 1cm de diámetro se aplica una gota de 1µl de la proteína a cristalizar, para la ECPwt la concentración óptima para el proceso será de 10 mg/ml.
- 3) Rápidamente, evitando evaporaciones de tan pequeño volumen, se aplicará 1µl de reservorio, con un suave pipeteo sin llegar a los topes, se asegurará la mezcla.
- 4) Tapar el pocillo de test con el cubre preparado con gotas, dándole la vuelta al cubre, de tal manera que la gota quede boca abajo y colgando en la luz del pocillo.
- 5) Presionar levemente en sentido circular, con una punta de pipeta para que se cierre el sistema. Se debe observar una ligera perfusión de la vaselina y como se ocupa cualquier eventual burbuja de aire por la misma.
- 6) Incubar a 16 °C en un incubador de precisión, libre de vibraciones, dado que las vibraciones pueden perturbar la nucleación de los cristales.

Precipitantes utilizados (concentraciones iniciales en el stock):

Citrato sódico 0.1 M (final) pH 5.2, ajustado con NaOH (a partir de stock 1M)

Jefamina (M-600 polieteramina) en un rango del 6 al 8% (a partir de un stock al 100%)

Cloruro férrico 1 mM (a partir de un stock 1M)

Isopropanol 50%

Hepes 0.1 M a pH's 7 y 8 (a partir de un stock 1M)

Polietilenglicol 6000 al 25% (a partir de un stock al 50%)  
Polietilenglicol 4000 al 25% (a partir de un stock al 50%)  
Cloruro de Zinc 10 mM final (a partir de un stock de 1M)  
Sulfato de Magnesio 10 mM final (a partir de un stock de 1M)

Los experimentos también se han llevado a cabo para lograr la cocrystalización con ligandos eventuales de la RNasa 3/ECP: fosfatos, N-acetil-glucosamina, N-acetil- murámico, disacárido de heparina, que se incluyen en la muestra previa cristalización a una concentración entre 5 y 10 mM. En el caso de realizar impregnaciones de cristales se utilizarán concentraciones entre 50 y 100 mM.

#### 4.5.2 Metodología de la gota sentada “*sitting drop*”

Esta metodología es prácticamente la misma pero en vez de utilizar una gota colgante, se utiliza un sistema en el que depositar las gotas boca arriba en una especie de “silla” que encaja en el interior del pocillo. Con unas pinzas se ajusta la silla en el interior del pozo de la placa. A continuación se prepara la muestra directamente en la “silla”. Por encima de la silla el sistema requiere igualmente el sellado con un cubreobjetos circular, que en esta ocasión no requiere que esté siliconado.

Para ambos métodos se requiere un seguimiento de la evolución de la formación de cristales con periodicidad semanal mediante observación directa mediante lupas binoculares de 50x aumentos (Leyca). En cualquiera de los casos, el cristal de proteína que se obtenga ha de ser suficientemente grande y se distingue por presentar un reflejo iridiscente que cambia de tonos en cuanto se cambia la polaridad de la luz con el filtro de la lupa binocular.

## 5 Resultados

La presentación de los resultados obedece a los siguientes proyectos experimentales:

- 1) Los procesos que llevan a la obtención de péptidos de actividad antibacteriana potencial a partir de la región N-terminal de la RNasa 3/ECP, los cuales incluyen: a) la expresión y purificación de la RNasa 3/ECP b) su desnaturalización c) los procesos de escisión enzimática y química, d) la purificación y caracterización de los fragmentos obtenidos y por último e) la identificación de los fragmentos con actividad bactericida.
- 2) La clonación y mutagénesis dirigida de la RNasa 7 para la obtención de la variedad mayoritaria P75Y93, expresada en queratinocitos, a partir de la variedad A75H93 expresada en riñón. Finalmente se analiza la actividad bactericida de las dos variantes, junto con las correspondientes formas de sustitución individual (A75Y93 y P75H93).
- 3) Comparación de la actividad antibacteriana de las RNasa 3/ECP y RNasa 7, los mutantes de RNasa 3/ECP y las variantes de RNasa 7.

4) Estudio del efecto de las RNasas sobre el RNA celular bacteriano.

### 5.1 Caracterización de la RNasa 3/ECP

#### 5.1.1 Expresión y purificación de la RNasa 3/ECP recombinante.

La expresión de RNasa 3/ECP se realizó en *E.coli* BL21 transformada con pET11c-ECPwt, crecida en medio TB e inducida con una concentración final de IPTG de 1 mM. Los resultados de rendimiento que se indican en la tabla 7 se refieren a la proteína una vez purificada de la cromatografía de intercambio iónico (FPLC) y se obtuvieron por medición de la absorbancia a 280 nm. Se observa un mayor rendimiento cuando la cepa de *E. coli* BL21 se ha transformado recientemente con el plásmido pET11c-ECPwt.

Cantidad (mg)	Conc. post purif. (mg/ml)	Vol. Cultivo (L)	Rendimiento mg/l cultivo
5.93	25	2	2.965
0.66	15	1	0.66
3.68	24	2	1.84
3.84	26	2	1.92
7.6	24	2	3.8
8.69	26	2	4.345

Tabla 7. Rendimiento de la expresión de RNasa 3/ECP recombinante.

Los gels SDS-PAGE dieron constancia de la expresión diferencial tras la inducción por IPTG (Fig. 43).

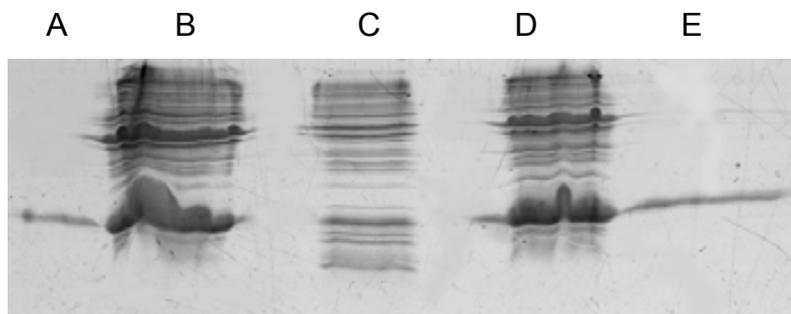


Figura 43. Gel SDS-15% PAGE (tinción de Coomassie) con 15 µl por pozo de extracto de *E. coli* BL21 transformante para ECPwt, proveniente de 1 ml de cultivo. A: RNasa A, B: extracto post inducción por IPTG (3 horas) C: extracto pre inducción por IPTG D: extracto post inducción por IPTG (2 horas) E: RNasa 3/ECP como marcador (4µg).

Se puede apreciar un incremento relativo de la proteína al mismo nivel que la RNasa 3/ECP purificada, con respecto a la no inducida, por lo que se puede deducir que la inducción por IPTG ha provocado la expresión de la RNasa 3/ECP. Es interesante destacar también el incremento relativo de lo que podría ser el dímero de la RNasa 3/ECP dado que a una altura que representa aproximadamente el doble del peso molecular de la RNasa 3/ECP aparece otra banda que responde de igual manera a la inducción IPTG.

A los procesos de expresión siguieron una serie de pasos de solubilización y renaturalización, necesarios para la obtención de la RNasa 3/ECP dado que la proteína expresada se agrega en cuerpos de inclusión. En los procesos siguientes de purificación se ha realizado primero una cromatografía de

intercambio catiónico, utilizando la columna *Resource S* mediante el sistema FPLC (Fig. 44) y luego se realizará una cromatografía de fase reversa mediante HPLC (Fig. 45). Analizando cada paso por SDS-PAGE se pudo observar el decremento de bandas contaminantes respecto a la banda principal de RNasa 3/ECP (Fig. 46).

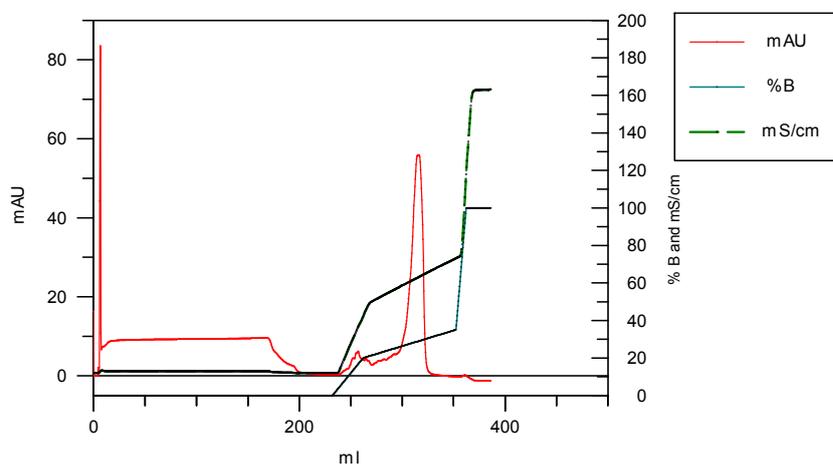


Figura 44. Cromatograma de FPLC por intercambio iónico de la RNasa 3/ECP. El flujo de la columna fue de 2 ml/min. Se muestra el porcentaje del tampón (Acetato Sódico 150 mM, pH 5, NaCl 2M, además de la conductividad (mS/cm) y la absorbancia (mAU). La columna es una Resource S de Pharmacia Biotech, el volumen de muestra fue de 250 ml. Se representan los datos sin procesar del detector (Raw data) extraídos en modo ASCII en el programa Grafit.

El siguiente paso de purificación es la cromatografía de fase reversa por HPLC, ya explicada en Materiales y Métodos. En la figura 45 se muestra a continuación un perfil rutinario de purificación de la RNasa 3/ECP. La fracción con el pico de absorción mayoritario es la que es obtenida y separada.

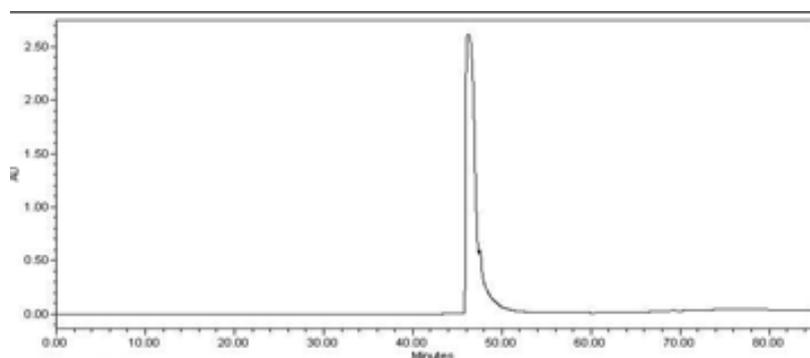


Figura 45. Perfil de la cromatografía de fase reversa (HPLC con columna Vydac C4) de la RNasa 3/ECP. Se representa el perfil de elución en función del tiempo, apareciendo un único pico asignable a la RNasa 3/ECP. El volumen de muestra es de 100µl de H<sub>2</sub>O+ 0.05% TFA con 1mg de proteína disuelta. Se representan los datos sin procesar del detector (Raw data) extraídos en modo ASCII en el programa Grafit.

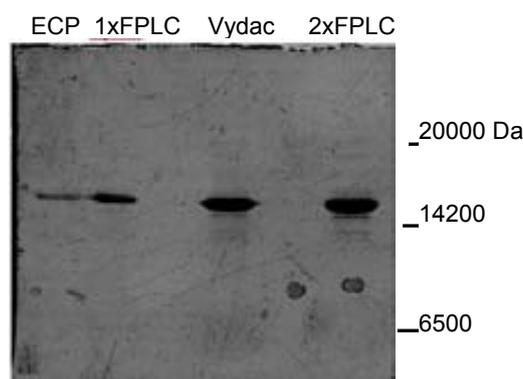


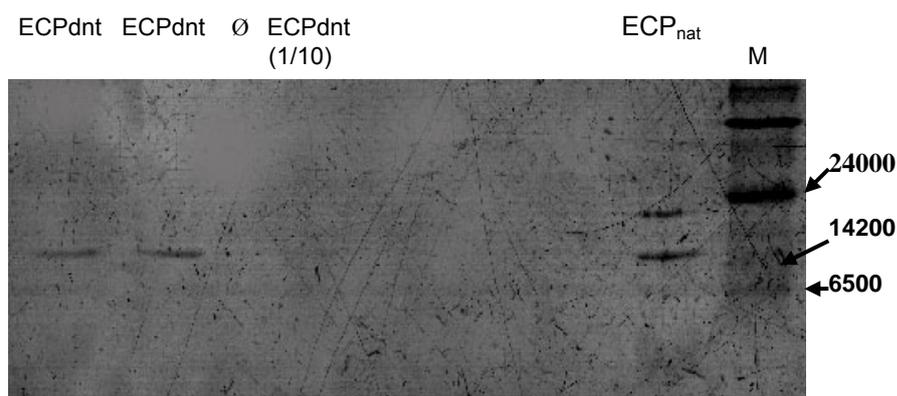
Figura 46. Gel SDS-15%PAGE de las sucesivas cromatografías para la purificación de RNasa 3/ECP en comparación con la RNasa 3/ECP previamente purificada utilizada como marcador de peso molecular. El volumen cargado fue de 10  $\mu$ l y la concentración aproximada de 1mg/ml para el caso de los dos carriles de la derecha y de 0.5 mg/ml para los dos carriles de la izquierda.

### 5.1.2 Desnaturalización de la RNasa 3/ECP

Se realizó el proceso de desnaturalización de la RNasa 3/ECP como un paso previo obligado para los procesos de fragmentación realizados, de forma que se expusiese toda la proteína desplegada facilitando dicha digestión. Asimismo, se planteó en este apartado la posibilidad de que la RNasa 3/ECP desnaturalizada pudiera retener la actividad antimicrobiana.

La desnaturalización de la RNasa 3/ECP es un proceso que debe hacerse de manera irreversible, dado que la RNasa 3/ECP por sí misma podría experimentar procesos de renaturalización reversible, como ya se ha venido documentando en publicaciones previas sobre las ribonucleasas de esta superfamilia, como es el caso de la ribonucleasa A (Gutte & Merrifield 1969, Janolino et al 1985). El proceso se lleva a cabo según el protocolo ya establecido en nuestro laboratorio y modificado de Huang y colaboradores (1983). La irreversibilidad del proceso se consigue gracias a la carboximetilación de las cisteínas mediante la reacción con iodoacetamida. De esta forma se consigue además evitar la formación de puentes disulfuro entre fragmentos resultantes de una ulterior digestión de la proteína. La desnaturalización se lleva a cabo con una cantidad de aprox. 1 mg de proteína, presentando una pérdida de material en

el proceso no mayor del 25%. En primer lugar se confirma el peso molecular de la RNasa 3/ECP desnaturalizada (ECPdnt) (Fig. 47) confirmando la ausencia de actividad enzimática al desnaturalizar la proteína mediante el análisis por zimograma (Fig. 48). También se analizará la actividad bactericida de la RNasa 3/ECP nativa y la desnaturalizada irreversiblemente mediante el método de estimación del número de células viables por cuantificación de la concentración de ATP (Fig. 49).



*Figura 47. Gel SDS-PAGE mostrando la RNasa 3/ECP desnaturalizada (ECPdnt). En el carril de la ECP nativa (ECPnat), que es la RNasa 3/ECP sin desnaturalizar aparecen como en otras ocasiones el dímero que forma la RNasa 3/ECP, que se mantiene en presencia de SDS. El volumen añadido es de 5 $\mu$ l y la concentración aproximada es de 0.5 mg/ml.*

#### 5.1.2.1 Confirmación del proceso de desnaturalización.

Se confirma la desnaturalización de la RNasa 3/ECP por la ausencia de la actividad catalítica de la misma, que en caso de desnaturalización debe ser total. Esa característica se evalúa en el zimograma con sustrato de ácido poliurídílico, (Fig. 48).

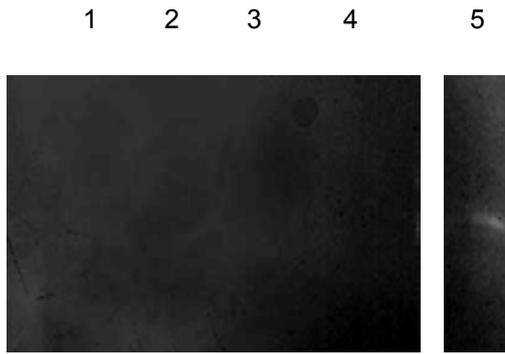


Figura 48. Zimograma en gel SDS-15%PAGE con poly(U) de la RNasa 3/ECP desnaturalizada en comparación con ECP nativa (ECPnat). 1-4 son los carriles que contienen RNasa 3/ECP desnaturalizada de 4  $\mu$ M a 0.8  $\mu$ M final y el carril 5 es la ECP nativa (ECPnat), con 15 ng aprox.

Por lo tanto, la RNasa 3/ECP al quedar desnaturalizada anula totalmente su actividad RNasa, como confirma la técnica del zimograma de valoración de la actividad RNasa.

#### 5.1.2.2 Estudio de la actividad antibacteriana.

Nos planteamos confirmar la pérdida de capacidad antibacteriana de la proteína nativa por desnaturalización. Dicha confirmación era necesaria teniendo en cuenta que existen en la bibliografía referencias de proteínas antimicrobianas que retienen su actividad cuando se desnaturalizan. Por este motivo se ensaya la viabilidad de las bacterias frente a la RNasa 3/ECP desnaturalizada (Fig. 49). Posteriores consideraciones se discutirán en el apartado de Discusión.

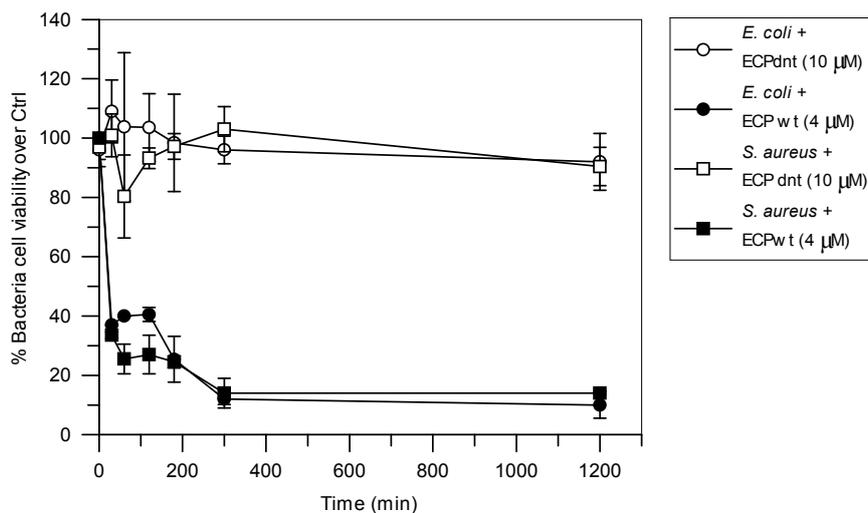


Figura 49. Gráfica de la viabilidad bacteriana evaluada por el método BacTiterGlo, determinando ATP intracelular de la cepa *E. coli* BL21 y corregido respecto a valores de control. El control suponía la medición de ATP intracelular de un cultivo que partía de un crecimiento a  $OD_{600nm}$  de 0.6. A partir de ese momento se determinaba la viabilidad en función del tiempo.

### 5.1.3 Escisión química y enzimática de la RNasa 3/ECP

Se describen a continuación los procesos y resultados de las proteólisis de RNasa 3/ECP, tanto enzimáticamente por la Lisina-endoproteasa como por BrCN. Se analizará la actividad antibacteriana de los fragmentos generados por ambos métodos.

#### 5.1.3.1 Proteólisis de la RNasa 3/ECP por Lys-endoproteasa

La RNasa 3/ECP es susceptible de proteólisis específica por el enzima Lys-endoproteasa con una diana única, la lisina 38. La RNasa 3/ECP quedará digerida por su única lisina en la posición 38 por su extremo carboxilo, lo cual se aprovechará para obtener el fragmento desde el principio del N-terminal al residuo 38. Por provenir este péptido de una proteína recombinante en cuyo proceso de expresión introduce una metionina como aminoácido N-terminal la secuencia final será 0-38.

## Desnaturalización y proteólisis

Tanto para facilitar el proceso de proteólisis al encontrarse la proteína desplegada, como para evitar reordenamientos por la formación de nuevos puentes disulfuro entre los fragmentos obtenidos, se procede a desnaturalizar irreversiblemente la proteína. Esto se consigue carboximetilando las cisteínas. Tal proceso se detalló en el apartado 4.2.3 del capítulo Materiales y Métodos y los resultados se detallaron justo en el apartado anterior. A continuación se indican los cálculos para determinar la cantidad del enzima necesaria para la proteólisis: partiendo de una muestra stock de RNasa 3/ECP desnaturalizada a una concentración de 588  $\mu\text{M}$  (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).

El enzima de la digestión queda disuelto a una concentración recomendada de 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , con una actividad de 0.01 U/ $\mu\text{l}$ . 0.01 unidades digieren teóricamente 1  $\mu\text{mol}$  de proteína en 100 min (según el prospecto del fabricante). Si trabajamos con 10  $\mu\text{l}$ , tenemos 0.0625  $\mu\text{moles}$  de RNasa 3/ECP. La mezcla de reacción será finalmente de 10  $\mu\text{l}$  de RNasa 3/ECP desnaturalizada + 1  $\mu\text{l}$  de enzima Lys-endoproteasa (0.01 U/ $\mu\text{l}$ ) + 9  $\mu\text{l}$  de tampón Tris/HCl 20 mM pH 7.7. La digestión se llevó a un tiempo de digestión de dos horas, tiempo superior al sugerido para asegurar suficiente cantidad de producto de digestión.

### 5.1.3.1.1 Separación de los fragmentos producidos en la digestión

Una vez digerida la proteína con la lisina-endoproteasa se comprueba su proteólisis, mediante una electroforesis SDS-PAGE. Como resultado de la optimización del protocolo, se adjunta la figura 50 en la que se puede observar el progreso de la lisis a diferentes tiempos.

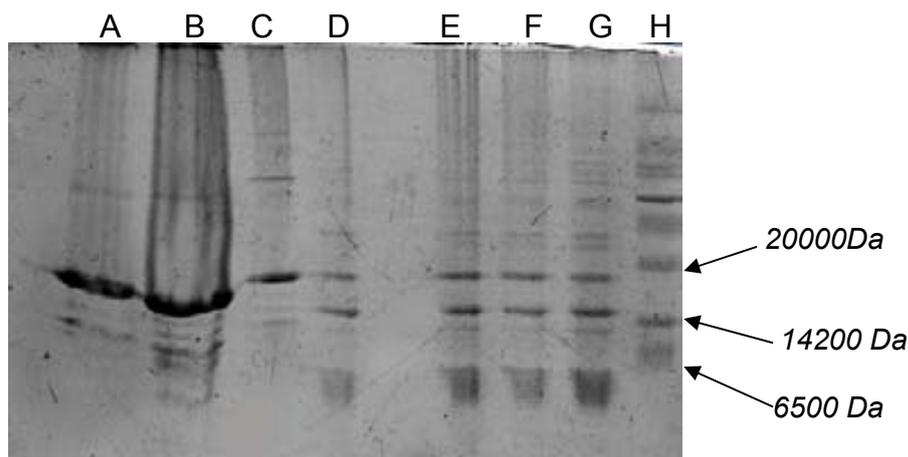


Figura 50. Electroforesis SDS-15%PAGE para la detección de digestiones de la RNasa 3/ECP desnaturalizada a diferentes tiempos por Lys-endoproteasa. A: RNasa 3/ECP, B: RNasa 3/ECP desnaturalizada, C: digestión a 0', D: 20' E: 40' F: 1hora G: 2 horas H: marcador.

Se observa la banda correspondiente a la proteína sin digerir y una banda de menor masa molecular relativa que correspondería al fragmento de los residuos 39 al 133. Por otra parte aparece paralelamente un fragmento menor, inferior a 6500 Da, que correspondería al fragmento N-terminal de la proteína del residuo 0 al 38.

#### Recuperación por filtros de exclusión molecular

El fragmento menor de la proteólisis de la RNasa 3/ECP, el N-terminal 0-38, se recupera mediante filtración diferencial con filtros de exclusión molecular, tras seguir el proceso descrito en Materiales y Métodos (sección 4.2.4.1). Se extrajeron 20  $\mu$ l del volumen retenido en el filtro de exclusión de 3000 Da, donde estaría el fragmento de interés y con 3  $\mu$ l se llevaría a cabo una electroforesis SDS-PAGE para detectar el producto de la separación, por tinción con nitrato de plata.

La electroforesis, a pesar de la baja resolución de la toma de la foto, representa la total separación del fragmento N-terminal 0-38 de RNasa 3/ECP (Fig. 51). Esta baja señal de intensidad es por otra parte característica de las especies químicas de peso molecular bajo separadas por electroforesis SDS-PAGE.

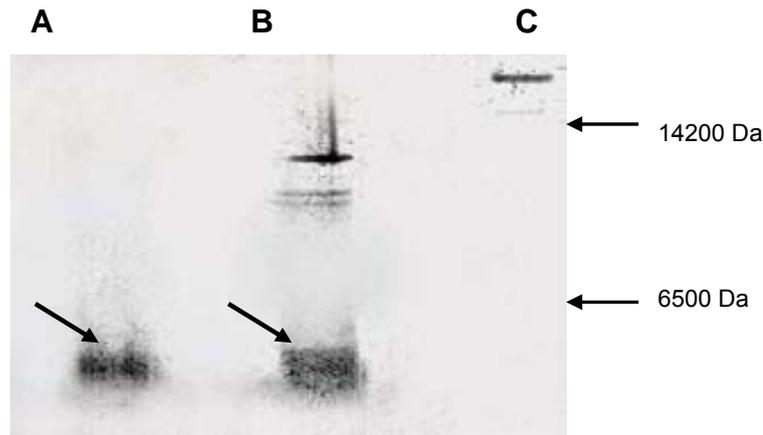


Figura 51. Imagen ampliada de un gel de electroforesis SDS-18%PAGE, teñido con  $\text{AgNO}_3$ . A: fragmento 0-38 separado, B: la RNasa 3/ECP digerida por Lys endoproteasa, C: ECPdnt sin digerir. Volumen de 15  $\mu\text{l}$  de muestra con una estimación aproximada de cantidad de 1 $\mu\text{g}$ .

Al volumen retenido por exclusión molecular se cuantifica la concentración de proteína por absorbancia a 280 nm, determinándose en 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de proteína (con un volumen total de 200  $\mu\text{l}$ ). El proceso total ha supuesto la pérdida de un 30% de proteína.

Un posterior análisis por secuenciación del péptido N-terminal del fragmento mayor de la RNasa 3/ECP permitió confirmar la correcta escisión por la Lys-endoproteasa al obtenerse la secuencia NQNTFLR, que identifica el inicio de dicho fragmento a partir de la secuencia desde el residuo 38 de la RNasa 3/ECP como resultado de su proteólisis. El esquema representado en la figura 52 muestra la obtención del péptido 0-38 tras la proteólisis de la Lisina-endoproteasa.

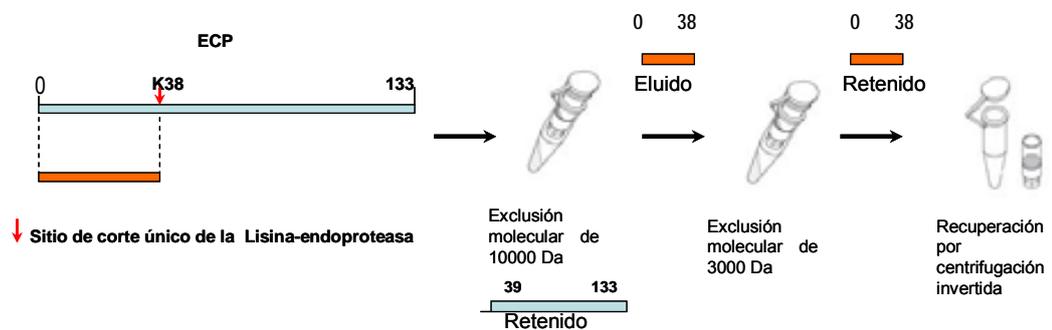


Figura 52. Esquema de la proteólisis de la RNasa 3/ECP por Lys endoproteasa y su posterior separación por filtros de exclusión de masa molecular. En el primer paso se retiene el fragmento de 39 a 133 y se eluye el fragmento 0-38, en el segundo se pasa el anterior eluido y se retiene el fragmento pequeño, permitiendo además lavarlo de sales e impurezas. En el último paso se recoge el fragmento con una centrifugación invertida.

### 5.1.3.2 Escisión de RNasa 3/ECP con BrCN

La proteólisis con BrCN resulta interesante por los mismos motivos que se ha realizado la proteólisis por Lys-endoproteasa: producir fragmentos de potencial interés antimicrobiano. Teniendo en cuenta que se pueden generar múltiples fragmentos concentrados en el N-terminal de la RNasa 3/ECP, el análisis de los fragmentos resultará muy informativo. La proteólisis con BrCN teóricamente escinde cualquier proteína por el extremo C-terminal de las metioninas. Sin embargo tanto los resultados preliminares en este laboratorio llevado a cabo por Esther Carreras como nuestros resultados, muestran escisiones adicionales por extremos C-terminal de triptófanos por el motivo ya comentado en Materiales y Métodos, en el que se implica la oxidación previa del grupo indólico. La digestión produciría entonces la colección de fragmentos que se relaciona en el esquema representado (Fig. 53). Es necesario aclarar que nuestra proteína al ser recombinante introduce una metionina en el extremo N-terminal por lo cual una nomenclatura apropiada de los péptido debería empezar por el 0 tal como se refleja en la misma figura 53. Por otra parte, recalcar que en las condiciones del ensayo no se ha observado una escisión de la metionina N-terminal de la proteína recombinante resultante de la expresión.

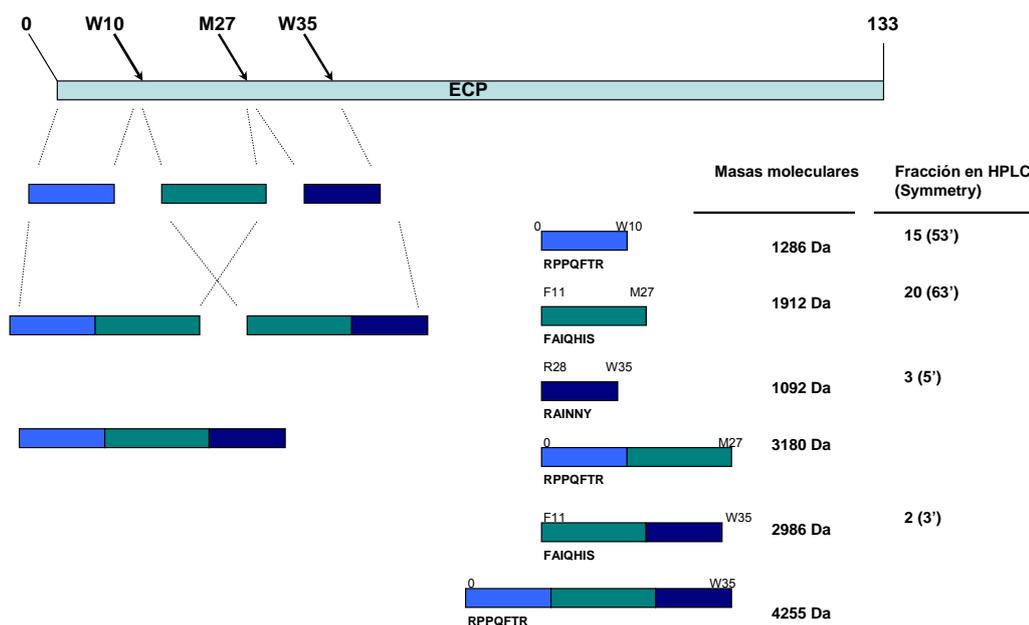


Figura 53. Diagrama esquemático de los fragmentos esperados tras escisión de la RNasa 3/ECP con BrCN, teniendo en cuenta la secuencia de la RNasa 3/ECP. Se muestran datos de la separación por HPLC así como resultados de la secuenciación del N-terminal que identifica el péptido obtenido. En la segunda columna se indican los tiempos de elución en las cromatografías de fase reversa, entre paréntesis se indica la correspondencia con picos de la cromatografía de fase reversa Vydac.

#### 5.1.3.2.1 Separación y detección de fragmentos por HPLC

Siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos, para la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con la columna de fase reversa C4 Vydac se ejecutó una separación de la mezcla de reacción de la proteólisis con BrCN, que previamente se había liofilizado y disuelto en el tampón inicial para la cromatografía HPLC (H<sub>2</sub>O+ TFA 0.05%). La cromatografía no fue totalmente separativa (Fig. 54). Por este motivo, a las fracciones principales se les aplicó una segunda cromatografía de fase reversa (en esta ocasión con la columna C18 Symmetry) para conseguir una mayor separación de los picos obtenidos, pero los resultados tampoco fueron satisfactorios. Los péptidos resultantes una vez purificados son altamente lábiles, por lo que deberán congelarse a -80°C y liofilizarse para evitar su hidrólisis. En la tabla 8, junto con los péptidos

sintéticos que también se testarán en esta tesis, se indica el cálculo teórico de su estabilidad, además de otros parámetros de interés para cálculos de concentración, según las herramientas online de la web *Expasy*.

Péptido	Origen	Masa molecular	$\epsilon_0$ a 280 nm	pI	Estabilidad
1-19	Sintético	2196	5500	12	61.77 ++ inest.
1-45	Sintético	4514	12490	11.88	50.67 ++ inest.
24-45	Sintético	2873	6990	10.86	44.78 + inest.
0-38	Dig. Enzimática	5516	12490	11.71	55.26 ++ inest.
0-35	Dig BrCN	4254	12490	11.83	44.78 + inest
11-35	Dig BrCN	2986	6990	10.76	56.88 ++ inest.
28-35	Dig BrCN	1092	6990	10.84	49.21 + inest.
11-27	Dig BrCN	1912	0	8.26	-15.59 estable

*Tabla 8. Parámetros principales calculados a partir de Prot Param para los péptidos producto de escisión y péptidos sintéticos utilizados. El número de estabilidad es un parámetro de unidades arbitrarias de Swiss prot (II) que estima una vida media en diferentes organismos o en solución.*

La separación de los fragmentos mediante columna Vydac (C4) no fue óptima (Fig. 54). Por lo cual para mejorar la separación y el rendimiento, con una nueva reacción de la RNasa 3/ECP desnaturalizada con BrCN, se procedió a realizar una cromatografía de fase reversa utilizando la columna C18 Symmetry, que presenta un grado de compactación mayor que la Vydac C4. También se estableció una correspondencia de los péptidos que estaban saliendo en las fracciones por cromatografía de la columna Vydac con respecto a los que se separaban por la cromatografía con la columna Symmetry (Fig. 55). La cromatografía se muestra junto con los valores de actividad antibacteriana, mediante la estimación del porcentaje de letalidad para identificar las fracciones más activas (Figs. 56 y 57).

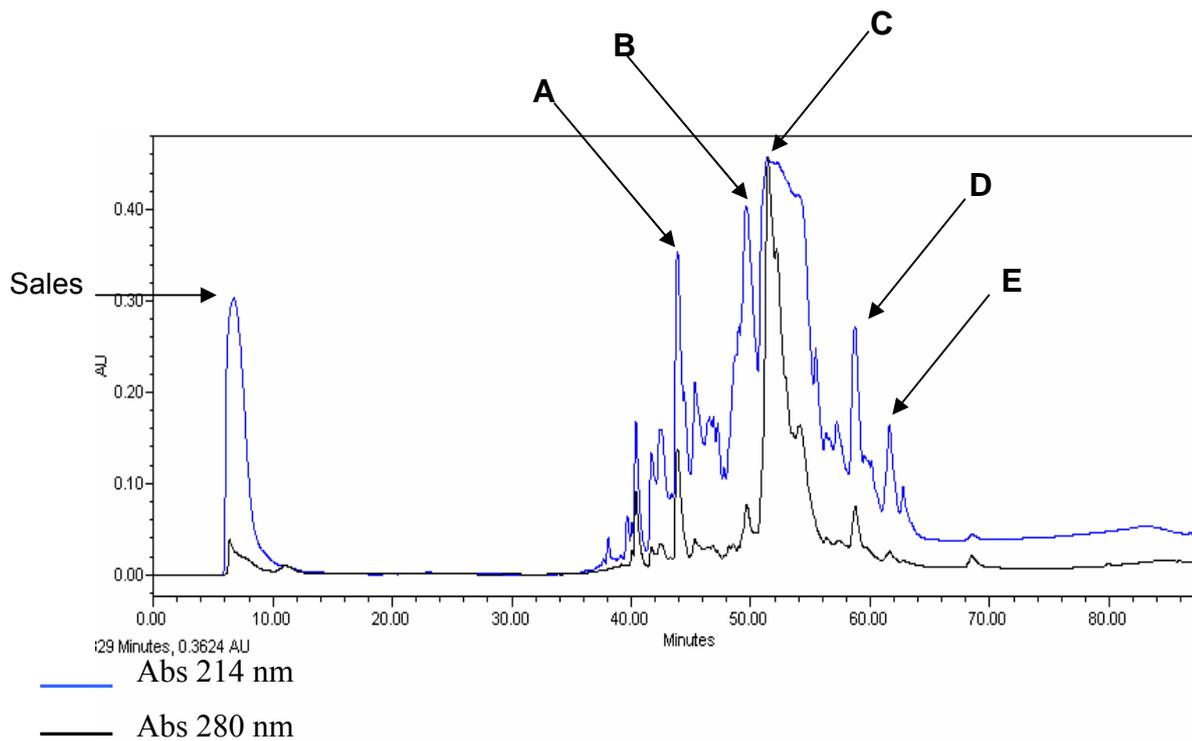


Figura 54. Perfil de la cromatografía HPLC con la columna C4 Vydac. Se indica el tiempo correspondiente a cada fracción. A: Fracción 2 (39'); B: Fracción 6 (42'); C: Fracción 10 (54'); D: Fracción 13 (57'); E: Fracción 15 (62').

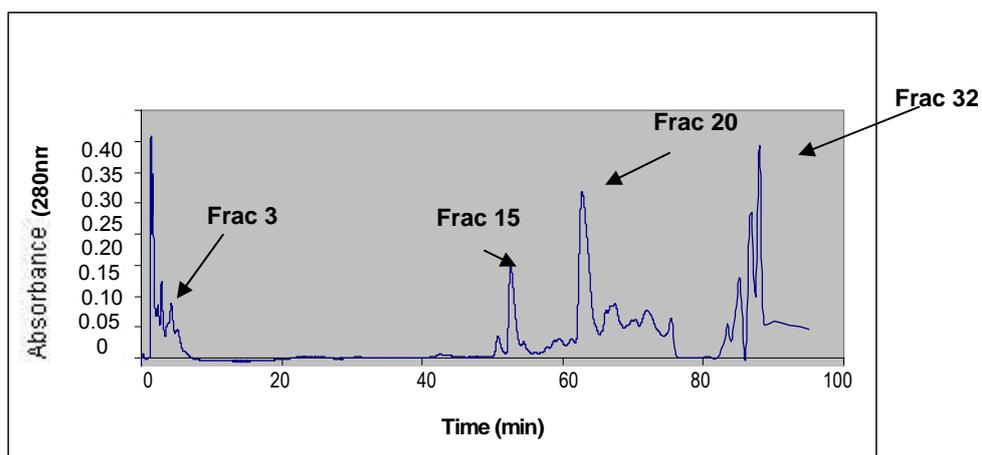


Figura 55a. Gráfica del perfil cromatográfico de la digestión con BrCN de la RNasa 3/ECP, tras pasar por la columna C18 Symmetry, el perfil es el correspondiente a la absorbancia a 280 nm. Las fracciones 3, 15, 20 y 32 tienen la correspondencia en la tabla 9.

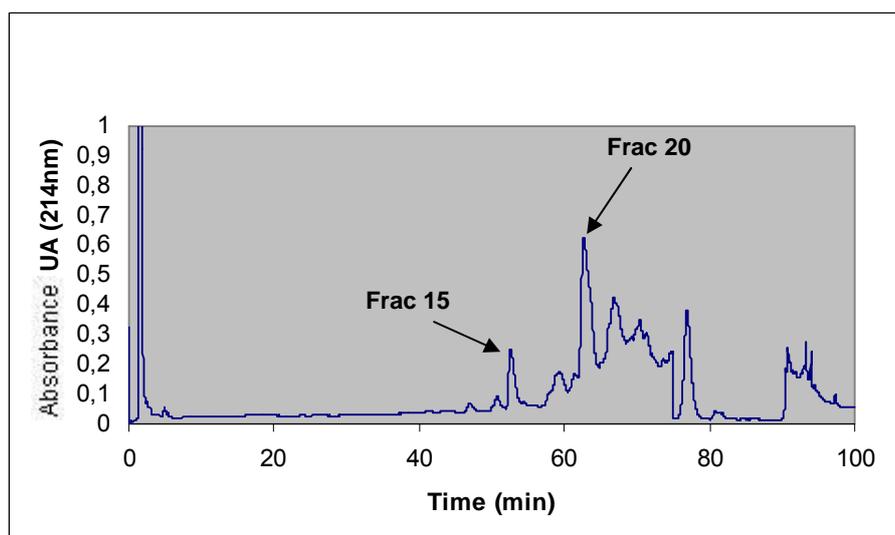


Figura 55b. Gráfica del perfil cromatográfico de la digestión con BrCN de la RNasa 3/ECP, tras pasar por la columna C18 Symmetry, el perfil es el correspondiente a la absorbancia a 214 nm.

Los resultados diferenciales a 214 nm y a 280 nm nos pueden dar una idea de los picos que corresponden a péptidos con aminoácidos aromáticos. Tomando como ejemplo el pico significativo de 53 min y el de 63 min (correspondencia con el pico C de la cromatografía C4 Vydac), se comprueba que tienen una señal a 280 nm similar a la señal a 214 nm, indicando que deben existir péptidos con residuos aromáticos. Esto nos permite hacer una aproximación del tipo de péptido que podría haber en la fracción estudiada.

Luego sabremos que en efecto contienen péptidos con triptófanos. La señal a 53 min es la fracción 15 en la cromatografía por Symmetry y la de 63 min es la 20 extraída por dicha columna (de la cual en efecto se constatará que posee un triptófano como se deduce de la existencia de señal a 280 nm). En ambas fracciones se comprobará que contienen péptidos bactericidas.

La cromatografía se realiza a un flujo de 1 ml/min y las fracciones se recogieron a intervalos de 2 min (lo que representa un volumen de 2 ml por fracción). Cuando se observa la aparición de más de un pico dentro del intervalo de una fracción de 2 ml, dicha fracción se separaría en las necesarias para obtener la máxima resolución para cada pico. Asimismo, algunas fracciones quedarían unificadas si no se detecta aparición de una absorbancia mínimamente significativa. Para ilustrar estos resultados se relaciona en la tabla 9 la distribución de volúmenes por cada fracción en el perfil obtenido para la separación con columna C18 Symmetry.

Nº fracción	Volumen (ml)	Abs 280nm	Nºfracción	Volumen (ml)	Abs 280nm
1	0-2	0.36	16	54-56	0.02
2	2-4	0.135	17	56-58	0.07
3	4-6	0	18	58-60	0.031
4	6-8	0	19	60-62	0.01
5	8-14	0	20	62-64	0.042
6	14-20	0	21	64-66	0.1
7	20-22	0	22	66-68	0.04
8	22-26	0.002	23	68-70	0
9	26-30	0.001	24	70-72	0.06
10	30-38	0	25	72-76	0.04
11	38-42	0.003	26	76-78	0
12	42-48	0.004	27	78-80	0.06
13	48-50	0.006	28	80-84	0.55
14	50-52	0.031	29	84-85	0.130
15	52-54	0.165	30	85-87	0.236
			31	87-90	0.6
			32	90-92	0.45

Tabla 9. Asignación de fracciones colectadas en la cromatografía HPLC Symmetry.

Con las fracciones más representativas se realizó un ensayo de viabilidad celular en cultivos de *E. coli* y *S. aureus*, mediante la cuantificación de los niveles de ATP, tal como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados más significativos se representaron conjuntamente con el perfil del cromatograma de HPLC (Fig. 56). Para llevar a cabo el test se tomó una alícuota de 5  $\mu$ l (a partir de una resuspensión de liofilizado en 100  $\mu$ l) de cada fracción, al suponer un volumen suficiente como para detectar la actividad bactericida.

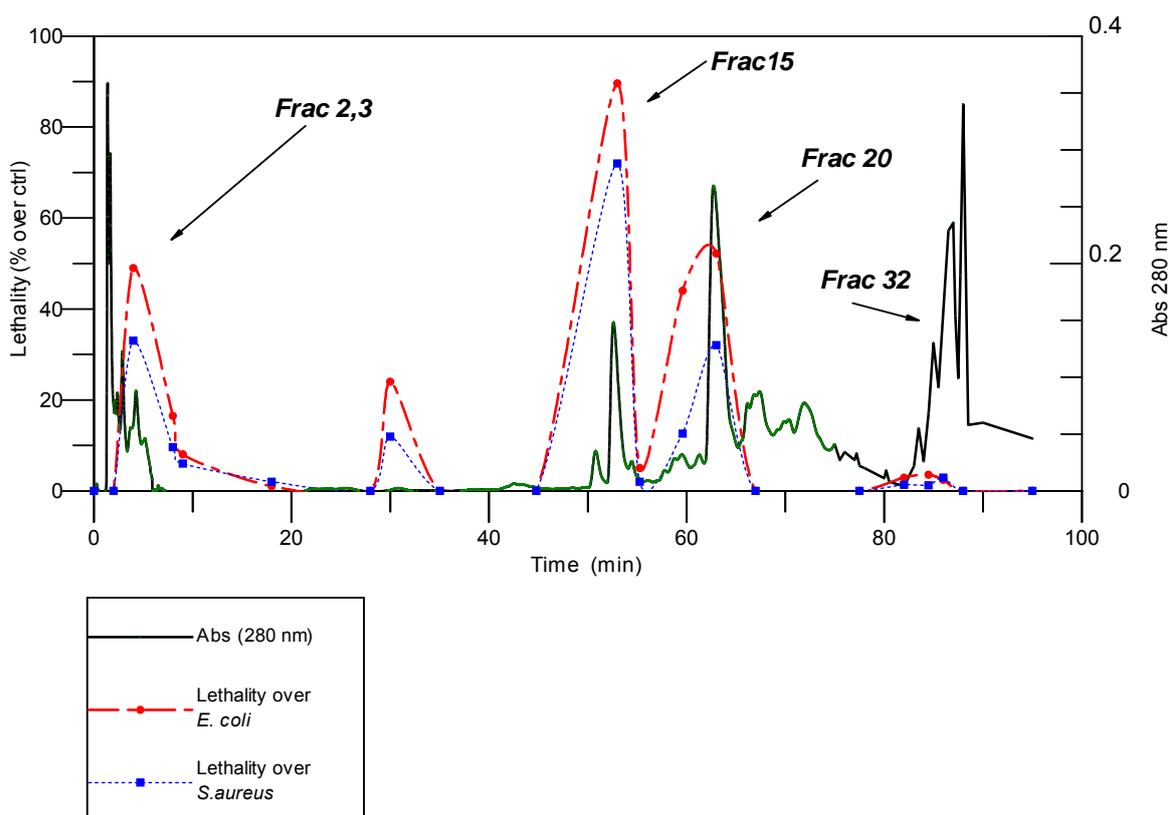


Figura 56. Perfil de HPLC general para la ECPdnt y digerida con BrCN. Se indica el porcentaje de letalidad, medido como núm. de células no viables respecto al control, tanto para *E. coli* (rojo) como para *S. aureus* (azul). Se detalla el número de fracción asignada en las que corresponderán con fragmentos de RNasa 3/ECP identificables.

A continuación, los resultados que presentamos muestran con el detalle de cada fracción separada por HPLC, los ya representados en continuo en la figura 56. Son los resultados de los diversos análisis de la viabilidad con las fracciones de la separación por HPLC “Symmetry” de la RNasa 3/ECP fragmentada por BrCN. Se ensayó un volumen de 15  $\mu$ l para cada fracción que correspondía aproximadamente a

una OD a 280 nm de 0.15 total para toda la muestra. De esta manera sabiendo por fin la concentración, se podrían corregir los resultados por la cantidad de péptido existente, que son los resultados finales que se presentan en la gráfica conjunta con el perfil de HPLC. En las figuras 57 y 58 se presentan las gráficas de los resultados de letalidad de las principales fracciones de esta cromatografía, tanto para *E. coli* como para *S. aureus* respectivamente. Se han obviado numerosas fracciones en las que no había una absorbancia detectable, siendo testadas dos de ellas como muestra de control negativo. Se asume que con una absorbancia inferior a 0.01 no se puede tener ninguna cantidad de péptido mínima para producir efecto sobre las bacterias (como se comprueba en las fracciones 1 y 4-6 de la gráfica 57).

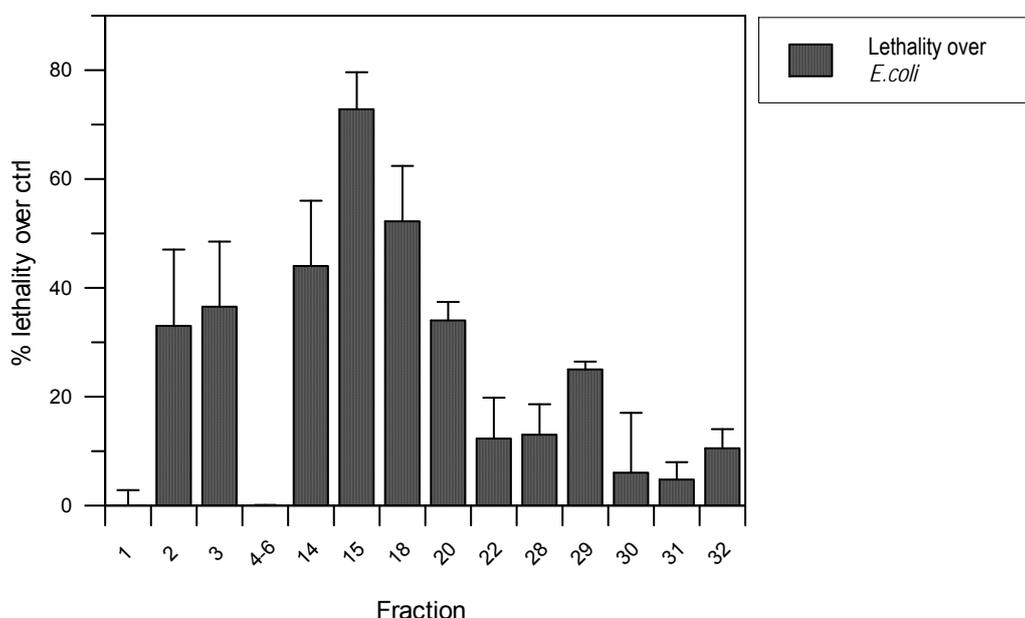


Figura 57. Experimento de viabilidad de *E.coli* ante diferentes fracciones de HPLC Symmetry de ECPdnt digerido mediante BrCN. Las barras de error corresponden a desviaciones típicas de tres experimentos, mientras que la altura es la media de los mismos. En el eje de abcisas aparecen fracciones progresivas de la separación cromatográfica.

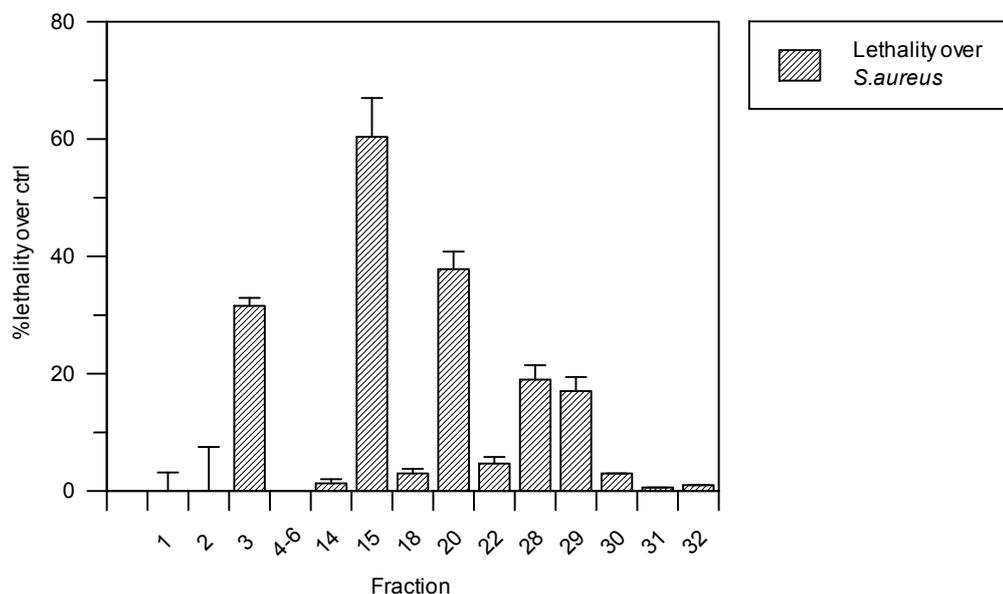


Figura 58. Letalidad de las diferentes fracciones de HPLC (Symmetry) de RNasa 3/ECP-BrCN corregida por cantidad de proteína, sobre *S. aureus*. Los cultivos crecidos hasta  $OD_{600nm}$  de 0.6 se incubaron con volúmenes aproximados de 15 $\mu$ l de cada fracción, aproximando por una OD de 0.17, que luego se corrigió por cantidad de proteína (resultados de la gráfica conjunta con el perfil de HPLC). Tras incubación de 20 min se cuantificó la viabilidad por cuantificación de ATP (BacTiterGlo). Los puntos representan media de dos experimentos así como los errores su desviación estandar.

#### 5.1.3.2.2 Análisis de fracciones por SDS-PAGE

Para asegurar los resultados y principalmente para descartar eventuales contaminaciones de fragmentos grandes del C-terminal (de tamaño mucho mayor) en las fracciones separadas, se practican una serie de electroforesis SDS-PAGE convencionales con un porcentaje de poliacrilamida del 18% (Fig. 59 A, B y C). Los geles resultantes se tiñeron con nitrato de plata, para conseguir una sensibilidad mayor que el Coomassie e intentar detectar el péptido N-terminal separado en cada fracción. Sin embargo, los péptidos inferiores a 5000 daltons a la concentración a la que los obtenemos no son detectables con buena resolución mediante este tipo de electroforesis.

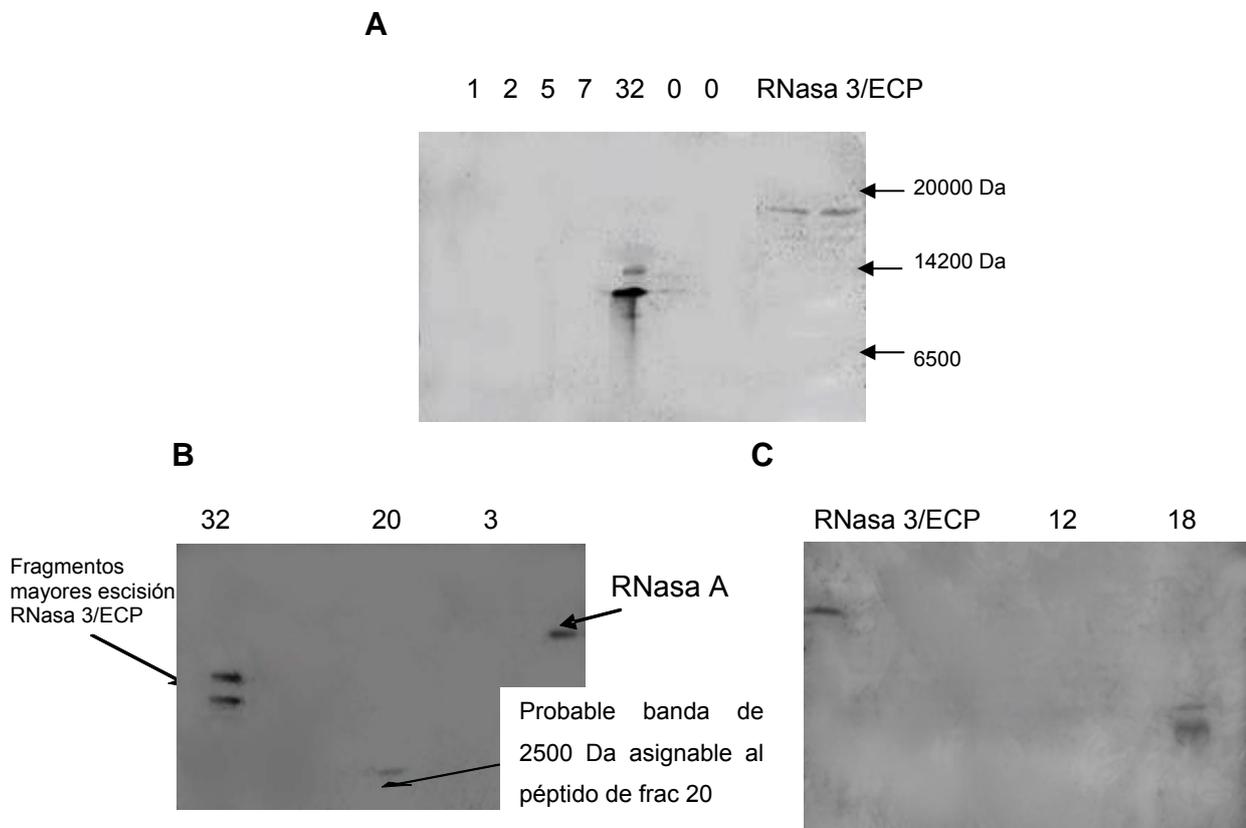


Figura 59. Tinción en  $\text{AgNO}_3$  de electroforesis SDS-PAGE para las diferentes fracciones de HPLC Symmetry. Se indica el núm. de cada fracción en los carriles correspondientes. Se confirma la ausencia de bandas de peso molecular elevado, lo que se corresponde con los resultados de MALDI-TOF. Las electroforesis SDS-PAGE se realizaron en geles de poliacrilamida al 15 % en A y al 18 % para B y C.

Las fracciones fueron posteriormente analizadas por espectrometría de masas MALDI-TOF y secuenciación N-terminal para confirmar su pureza. Se muestran en el grupo de imágenes de la figura 59 diferentes geles resultantes en los que sistemáticamente no se detectan contaminaciones de fragmentos grandes para fracciones donde se espera encontrar algún péptido fragmentado del tratamiento de la RNasa 3/ECP con BrCN. Podemos por tanto concluir que en las fracciones 15 y 20 no hay contaminación de fragmentos grandes de la proteólisis de la RNasa 3/ECP.

### 5.1.3.2.3 Identificación de los fragmentos de escisión

Se realizó, en el servicio de Proteómica de la UAB, una espectrometría de masas MALDI-TOF de las fracciones purificadas. Este proceso permite distinguir todas las especies moleculares presentes y su masa atómica exacta. Se presenta en las figuras 60 y 61 los perfiles correspondientes a las fracciones 15 y 20 respectivamente. Las secuenciaciones de los fragmentos se efectúan hasta el 7° residuo desde el N-terminal, lo cual permitirá una identificación específica de nuestras RNasas. Los resultados se presentan en la tabla 10.

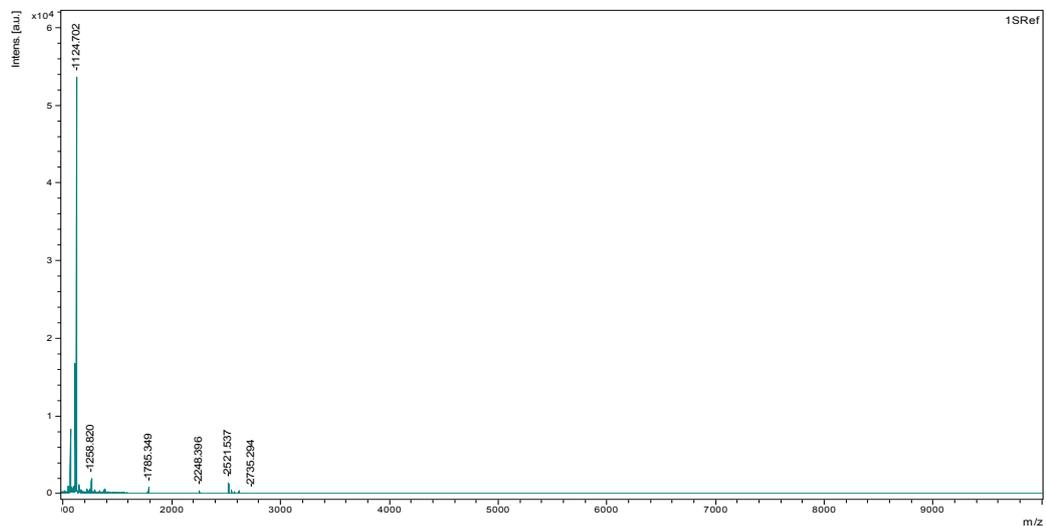


Figura 60. Perfil de la espectrometría de masas presentando el pico 1124.7 Da como el que representa principalmente a la fracción 15.

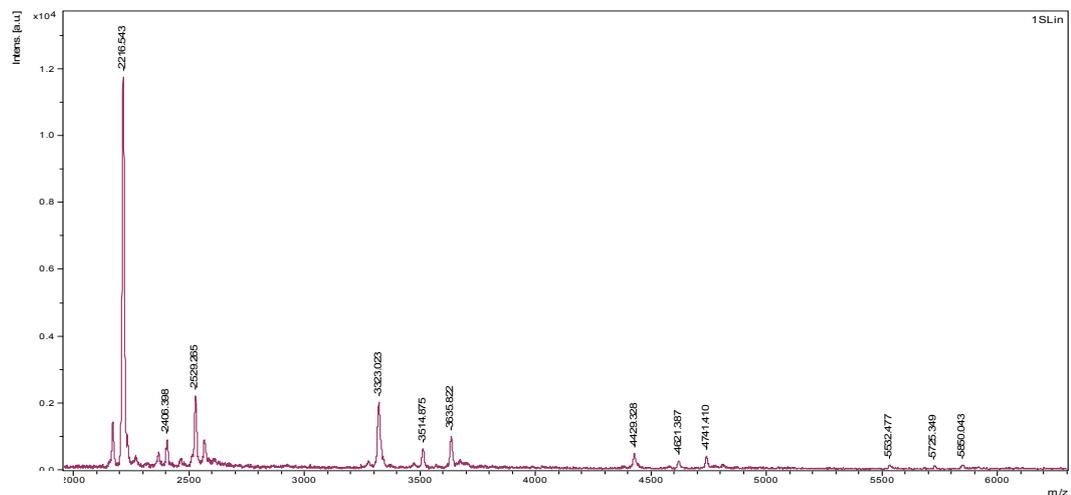


Figura 61. Perfil de la espectrometría de masas presentando el pico 2216.7 Da como el que representa principalmente a la fracción 20.

Fragmento	Secuencia N-ter (exp)	Masa Molecular observada	pl estimado	Cont. Banda pesada <sup>3</sup>	Letalidad <sup>4</sup>	Frac Symmetry <sup>5</sup>
 FAIQHIS	FAIQ	1921	8.26	-	+	Nº 3
 RAINNY	RAINNY	1124	11.27	-	+++	Nº 15
 RPPQFTR	YLIQFT	3049	10.84	-	-	Nº 5 (Vydac)
 FAIQHIS	FAIQ	2216	10.76	-	++	Nº 4 (Vydac) Nº 20 (symmetry)
 RPPQFTR	n.e. <sup>1</sup>	5247	11.83	-	-	No encontrado
 ECP-Cterminal <sup>2</sup>	n.e. <sup>1</sup>	n.e. <sup>1</sup>	~9.65	+	-	Nº 32

<sup>1</sup> n.e : no efectuada

<sup>2</sup> Las diferentes escisiones de la ECP en el extremo C-terminal no aparecen diferenciadas

<sup>3</sup> La banda a la que se hace referencia se comprobó mediante SDS-PAGE y tinción por AgNO<sub>3</sub>

<sup>4</sup> Los símbolos de letalidad corresponden aproximadamente a un 25% de letalidad sobre el control

<sup>5</sup> Por defecto el nº de fracción corresponde a la HPLC con columna Symmetry

*Tabla 10 Panel de resultados de la escisión de la RNasa 3/ECP por BrCN. Se muestra: secuencia N-terminal experimental, masa molecular por MALDI-TOF, pl estimado, presencia o ausencia de bandas de peso molecular alto (evaluado por SDS-PAGE), letalidad por experimentos de viabilidad (cada signo positivo representa 25% de letalidad).*

Se concluye por lo tanto que en las fracciones identificadas no hay contaminación de fragmentos de alto peso molecular provenientes de la porción C-terminal escindida de la RNasa 3/ECP. Se confirma así la pureza de los fragmentos correspondientes a péptidos N-terminales que tienen actividad bactericida destacable. Teniendo en cuenta el hecho de que la RNasa 3/ECP al ser una proteína recombinante incorpora una metionina en el extremo N-terminal, se ha asignado el núm. 0 a este residuo. Dicha metionina podría escindirse en el proceso de digestión por BrCN, no obstante el proceso de escisión es menos efectivo con las metioninas N-terminales y en nuestro caso la masa molecular corresponde a los fragmentos que mantienen dicho residuo.

#### 5.1.4 Actividad antibacteriana de péptidos producto de digestión y péptidos sintéticos de la RNasa 3/ECP

Para continuar con la disección de la actividad antibacteriana del N-terminal de la RNasa 3/ECP se han dispuesto de una serie de péptidos originados por proteólisis en nuestro propio laboratorio como se ha mostrado en los apartados anteriores, y de péptidos de origen sintético. La región N-terminal es de carácter altamente catiónico y varios de sus residuos (triptófanos) han sido establecidos como claves en la propia actividad bactericida de la RNasa 3/ECP, por estudios de mutagénesis (Carreras et al, 2003). Por este motivo, intentamos determinar nuevas zonas de relevancia y aseverar la importancia de los residuos ya conocidos. Una aproximación fue la generación de péptidos por escisión con BrCN, dado que la única metionina de la secuencia se encuentra en una zona próxima al N-terminal de la RNasa 3/ECP. Otro péptido N-terminal generado en nuestro laboratorio ha sido el que llega hasta el residuo 38 por digestión de la RNasa 3/ECP por Lys-endoproteasa. La otra aproximación, por péptidos sintéticos, venía de un análisis previo de la capacidad antibacteriana de ciertas regiones de la RNasa 3/ECP realizado por Torrent y colaboradores (2009b) también refrendado en los estudios teóricos bioinformáticos (Torrent et al, 2009c).

Los péptidos 1-19, 24-45 y 1-45 fueron sintetizados por el servicio de síntesis peptídica del Dr. David Andreu del laboratorio de Proteómica de la Universitat Pompeu Fabra (Barcelona). Los estudios de sus propiedades biofísicas (Torrent et al, 2009b) confirmaron la aproximación teórica inicial por predicción bioinformática (Torrent et al, 2009c). Estos estudios confirmaron la capacidad de desestabilización de membranas modelo y aglutinación de bacterias para el péptido 1-45. La desestabilización de membranas se conservaba en el péptido 1-19, mientras que la acción bactericida se atribuyó principalmente a la región 24-45.

#### 5.1.4.1 Análisis de la viabilidad celular bacteriana

Los efectos de todos los péptidos tanto producidos por digestión de la proteína en nuestro laboratorio, como los obtenidos por síntesis química en el laboratorio del Dr. David Andreu, se evaluaron en sus efectos sobre la viabilidad celular bacteriana, para identificar con mayor precisión la principal región de actividad antibacteriana del segmento N-terminal de la RNasa 3/ECP.

La viabilidad, como ya se describió en Materiales y Métodos, se mide por cuantificación del ATP intracelular bacteriano, lo cual nos permite estimar el número de células metabólicamente viables. Se ha evaluado el efecto de los péptidos resultantes y de la RNasa 3/ECP en función del decremento del número de células viables, o alternativamente, en función del parámetro inverso, denominándolo letalidad.

Se han podido aislar una serie de péptidos resultantes de la escisión de la RNasa 3/ECP (ver tabla 10) con una actividad bactericida notable. Tras su identificación se comprueba que son los péptidos que comprenden las zonas N-terminal más importantes en la actividad antibacteriana de la RNasa 3/ECP (residuos 35 y 36) en coincidencia con estudios previos con mutantes de dicha zona (Carreras et al, 2003) y otros estudios paralelos en nuestro laboratorio, con péptidos sintéticos relativos a la misma región N-terminal (Torrent et al, 2009b). Previamente se hizo una comparativa entre el péptido 0-38 y la RNasa 3/ECP en un rango de concentraciones para determinar su concentración efectiva antibacteriana (Fig. 62) y comparar la actividad con la de los otros péptidos (Fig. 63).

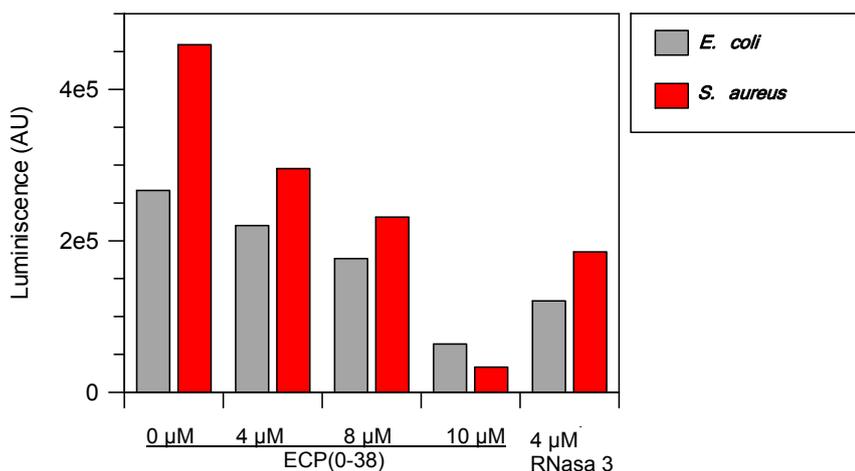


Figura 62. Gráfica comparativa de los niveles de ATP de un cultivo bacteriano incubado con un rango de concentraciones del péptido ECP(0-38) tanto sobre *E. coli* como *S. aureus* y en comparación con la RNasa 3/ECP nativa.

Los resultados muestran una actividad bactericida del péptido 0-38 (de la proteólisis de RNasa 3/ECP) tanto en *E.coli* como en *S.aureus* en dependencia directa de la concentración. De nuevo se distingue una resistencia ligeramente superior al efecto bactericida en la especie Gram-positivo. El efecto bactericida del péptido a la misma concentración que la proteína (4 μM) es comparable.

En el esquema que se describe en la tabla 11 se incluyen los péptidos utilizados en trabajos previos del grupo (Torrent et al, 2009b), junto con el generado en nuestro laboratorio por digestión con Lisil-endoproteasa indicándose sus propiedades. En las figuras 63 y 64, se incluyen los resultados comparativos respecto a la actividad bactericida, en las especies *E. coli* y *S. aureus*.

Esquema de péptidos de la ECP por síntesis y por proteólisis

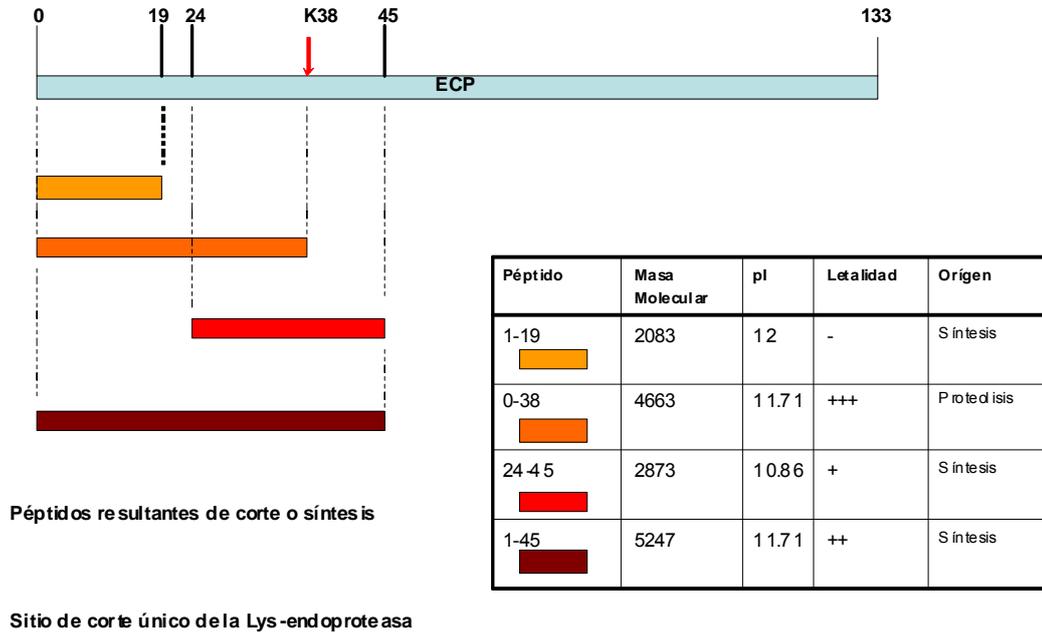


Tabla 11. Tabla de péptidos sintetizados y producto de proteólisis enzimática.

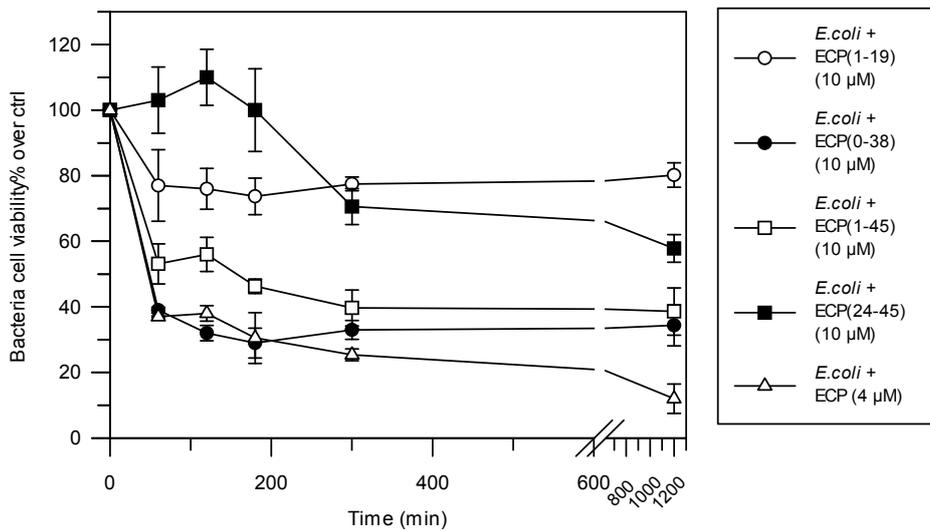


Figura 63. Gráfica conjunta de viabilidades evaluadas mediante el sistema de detección de ATP intracelular en *E. coli* (BL21) tras incubación con diferentes péptidos, con la corrección respecto a control negativo. Los péptidos se incubaron a 10 µM en el medio de cultivo, mientras que ECPwt fue incubada a 4 µM de concentración final. La barra de error es de tres experimentos independientes.

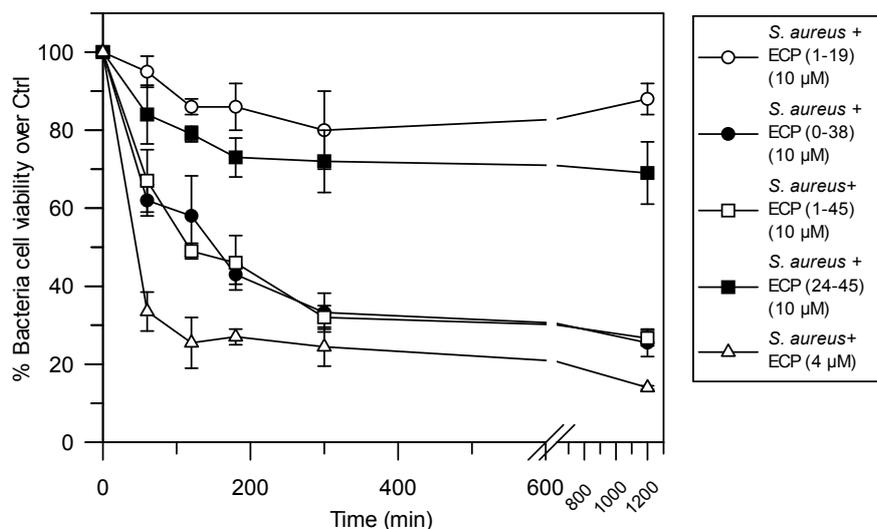


Figura 64. Gráfica conjunta de viabilidades en *S. aureus* respecto al control negativo. Los péptidos se incubaron a 10  $\mu\text{M}$  en el medio de cultivo. La barra de error es de tres experimentos independientes.

Se observa una actividad bactericida significativamente mayor para los péptidos 0-38 y 1-45, comparable con la RNasa 3/ECP. Los péptidos 1-19 y 24-45 en cambio muestran una actividad muy baja, tal como se describió previamente (Torrent et al, 2009b).

## 5.2 Caracterización de la RNasa 7

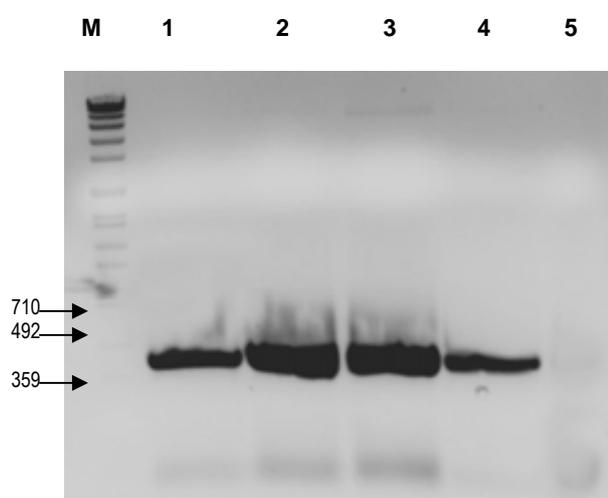
### 5.2.1 Clonación del gen de la RNasa 7 humana

La secuencia codificante para la RNasa 7 nos fue cedida amablemente por la Dra. Helene Rosenberg, (NIH Bethesda (MD-USA)) insertada en el plásmido pFTCs. Para transferir el gen al plásmido de expresión en *E.coli*: se amplificó el gen desde el mismo pFTCs y se realizó una digestión con enzimas de restricción (NdeI y BamHI) para aislar el fragmento y luego ligarlo al plásmido pET11c (ver Apéndice-Plásmidos).

Posteriormente se obtuvo por mutagénesis dirigida la otra variedad de la RNasa 7, descrita por Harder y colaboradores, variedad caracterizada en queratinocitos que se distingue por las sustituciones A75P y H93Y (Harder et al, 2002).

Nuestro sistema de expresión de proteínas en el laboratorio está basado en las variantes del plásmido pET, en este caso se ha utilizado el plásmido pET11c, cuya descripción aparece en el apartado “Plásmidos” del Apéndice. Se procede como se describe a continuación:

Amplificación por PCR desde el plásmido pFTCS. Para esta PCR se utilizaron los *primers* universales del plásmido y una cantidad de DNA molde (pFTCS+ RNasa 7) de aproximadamente 50 ng en 2  $\mu$ l. Los resultados de dicha PCR se visualizaron por electroforesis de agarosa (Fig. 65).



*Figura 65. Gel de agarosa al 1.5% p/v para detección de amplicones de la RNasa 7. Carriles: 1 amplificación de PCR desde plásmido pET11c para el gen de la RNasa 7 insertado tras ligación, 2 y 3 representan amplificaciones desde plásmido original pFTCS (con doble de cantidad de plásmido como DNA molde en el 2). M es el marcador de peso molecular (ver apéndice). 5 es el control negativo (solución de PCR con primers sin DNA molde).*

Posteriormente el resultado de la amplificación sería digerido por los extremos con las restrictasas NdeI y BamHI para proporcionar extremos cohesivos con el plásmido abierto por los mismos extremos de corte.

La ligación del fragmento amplificado se lleva a cabo teniendo en cuenta los pesos moleculares experimentales:

Plásmido (pET11c) 6500 pb's

Inserto (RNasa 7 cDNA) 400 pb's

La relación de masa molecular inserto/plásmido es de 16.25. Para llegar a una relación de 5 que es la necesaria para favorecer la reacción de ligación se debe de añadir 3.25 veces menos cantidad de inserto que de plásmido ( $3.25 = 16.25/5$ ). Se procedió ligando entonces 1  $\mu\text{g}$  de plásmido con 0.308  $\mu\text{g}$  de inserto. 2  $\mu\text{l}$  de ligación se utilizarían para transformar en *E.coli* Novablu con resultados positivos en clones portadores de la ligación, en los que el número de cfu's óptimos fue de 13. Dicha ligación se acompañó del control positivo para el proceso de transformación (pUC18) y negativo (medio LB).

El análisis final consistió en la digestión con los mismos enzimas que permitieron la generación de los fragmentos cohesivos (NdeI + BamHI) (Fig. 66).

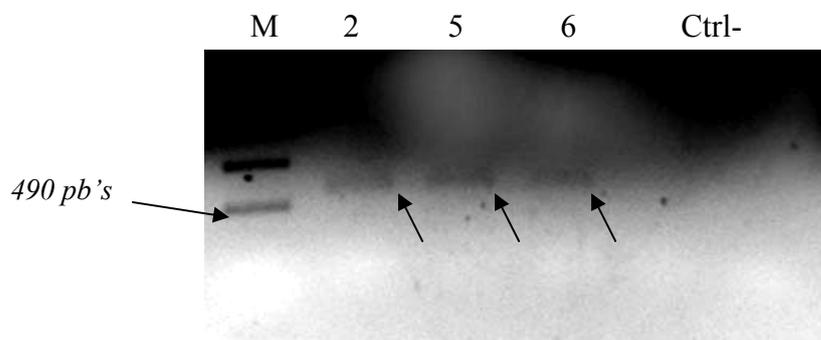


Figura 66. Gel de agarosa al 1.5% p/v, de los productos de digestión por Nde I y BamHI que liberan el fragmento de aproximadamente 400 pb's, cada número (2, 5 y 6) corresponde a una preparación de plásmido del n° de clon testado.

#### 5.2.1.1 Mutagénesis dirigida para la generación de la variedad de RNasa 7 (P75Y93)

La mutagénesis dirigida se lleva a cabo de manera secuencial y en paralelo, es decir, que dos mutaciones necesarias para obtener la variante de la RNasa 7 se hacen una después de la otra y cada una de ellas por separado, para llegar al mismo resultado superponiéndose entre las dos. Esta estrategia viene representada en la figura 67.

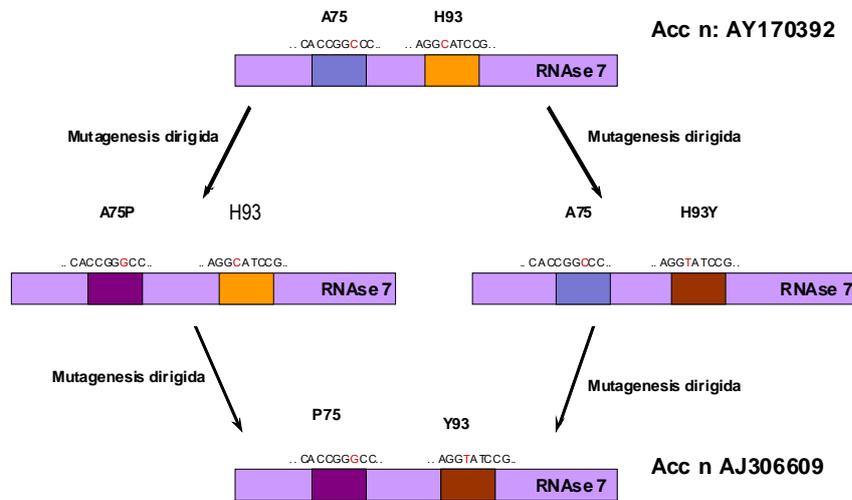


Figura 67. Diagrama del proceso general de mutagénesis dirigida llevado a cabo para la obtención de la RNasa 7 variedad (P75Y93) a partir de la variedad (A75H93).

Una de las mutaciones es la que origina la sustitución P75A en la proteína que viene generada por los siguientes *primers*: *Primers forward* y *reverse* (presentado en sentido inverso).

5'-CACCAGAGCCA CGGG G CCGTGCCCTGACC-3'  
 3'-GTGGTCTCGGTGCC G GGCACAGGGACTGG-5'

La otra mutación da como resultado la sustitución H93Y y viene generada por estos *primers*:

5'-CTCACCTCA GG A AG A TAGGCTTGACGTCCA-3'  
 3'-GAGTGGAGTCCCTTCC A TAGGCTTGACGTCCA-5'

El diseño de estos *primers* se realizó teniendo en cuenta la secuencia a amplificar y buscando la longitud más adecuada para aumentar la eficiencia del proceso. Se analizó la posibilidad de autoformar horquillas o dímeros mediante el programa PRIMER. Los *primers* tenían un longitud de 45 pb's y comprendían los cambios: A75P y H93Y de la RNasa 7.

Tras la mutagénesis se digieren con el enzima DpnI que destruye las cadenas parentales, eliminando los falsos positivos. 2  $\mu$ l del proceso final se utilizan para transformar *E.coli* X1Lblue con resultados positivos y asegurados por sus controles positivo y negativo. Para comprobar que realmente se encuentran los genes de la RNasa 7, se lleva a cabo una PCR desde las preparaciones de DNA plasmídico con nuestro gen mutado, resultando la amplificación positiva (Fig. 68).

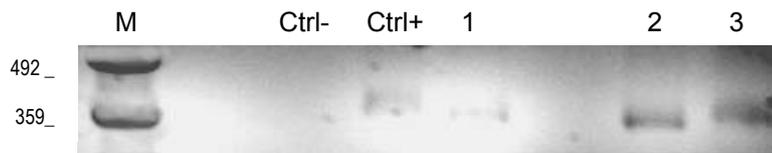


Figura 68. Gel de agarosa al 1.5% de la amplificación por PCR de los insertos mutados, aparecen las bandas esperadas de amplificación. Los controles positivos son plásmidos pFTCS con el gen de la RNasa 7. El carril 1 representa la amplificación del gen de RNasa7 (A75H93), el carril 2 para el gen del mutante parcial de la RNasa 7 (A75Y93) y 3 para el de la variedad (P75H93).

#### 5.2.1.2 Análisis del resultado y secuenciación de DNA.

La secuenciación se ha realizado en el servicio de secuenciación de la Universidad Autónoma de Barcelona utilizando los *primers* de la secuencia T7, que se encuentran flanqueando al MCS (lugar de multiclonación). El plásmido en el que se secuencia es el mismo por el que se procederá a realizar la expresión (pET11c) dando resultados positivos. Como se muestra en los siguientes apareamientos:

Alineamiento: RNS7(AY) vs secuenciación T7RV (promotor de la hebra reversa).

Score = 665 bits (346), Expect = 0.0 Identities = 352/355 (99%), Gaps = 0/355 (0%)  
Strand=Plus/Minus

```

Query 85 AAGCCCAAGGGCATGACCTCATCACAGTGGTTTAAAATTCAGCACATGCAGCCCAGCCCT
      |||
Sbjct 364 AAGCCCAAGGGCATGACCTCATCACAGTGGTTTAAAATTCAGCACATGCAGCCCAGCCCT 305

Query 145 CAAGCATGCAACTCAGCCATGAAAAACATTAACAAGCACACAAAACGGTGCAAAGACCTC
      |||
Sbjct 304 CAAGCATGCAACTCAGCCATGAAAAACATTAACAAGCACACAAAACGGTGCAAAGACCTC 245

Query 205 AACACCTTCTGCACGAGCCTTTCTCCAGTGTGGCCGCCACCTGCCAGACCCCCAAAATA 264
      |||
Sbjct 244 AACACCTTCTGCACGAGCCTTTCTCCAGTGTGGCCGCCACCTGCCAGACCCCCAAAATA 185

Query 265 GCCTGCAAGAATGGCGATAAAAACTGCCACCAGAGCCACGGGCCCGTGTCCCTGACCATG 324
      |||
Sbjct 184 GCCTGCAAGAATGGCGATAAAAACTGCCACCAGAGCCACGGGCCCGTGTCCCTGACCATG 125

Query 325 TGTAAGCTCACCTCAGGGAAGTATCCGAACTGCAGGTACAAAGAGAAGCGACAGAACAAG 384
      |||
Sbjct 124 TGTAAGCTCACCTCAGGGAAGCATCCGAACTGCAGGTACAAAGAGAAGCGACAGAACAAG 65

Query 385 TCTTACGTAGTGGCCTGTAAGCCTCCCCAGAAAAGGACTCTCAGCAATCCACC 439
      |||
Sbjct 64 TCTTACGTAGTGGCCTGTAAGCCTCCCCAGAAAAGGACTCTCAGCAATCCACC 10

```

Como se ejecutan dos secuenciaciones para asegurar la identificación, también se obtiene otra secuencia desde el primer T7 reverso.

Alineamiento: secuencia del gen RNS7 (variedad AJ306609) vs secuenciación T7RV (primer universal del promotor de T7 de la hebra reversa “RV” del plásmido).

Score = 669 bits (348), Expect = 0.0, Identities = 354/357 (99%), Gaps = 0/357 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query 115 TTTAAAATTCAGCACATGCAGCCCAGCCCTCAAGCATGCAACTCAGCCATGAAAAACATT 174
      |||
Sbjct 8 TTTAAAATTCAGCACATGCAGCCCAGCCCTCAAGCATGCAACTCAGCCATGAAAAACATT 67

Query 175 AACAAAGCACACAAAACGGTGCAAAGACCTCAACACCTTCTGCACGAGCCTTTCTCCAGT 234
      |||
Sbjct 68 AACAAAGCACACAAAACGGTGCAAAGACCTCAACACCTTCTGCACGAGCCTTTCTCCAGT 127

Query 235 GTGGCCGCCACCTGCCAGACCCCCAAAATAGCCTGCAAGAATGGCGATAAAAACTGCCAC 294
      |||
Sbjct 128 GTGGCCGCCACCTGCCAGACCCCCAAAATAGCCTGCAAGAATGGCGATAAAAACTGCCAC 187

Query 295 CAGAGCCACGGGCCCGTGTCCCTGACCATGTGTAAGCTCACCTCAGGGAAGTATCCGAAC 354
      |||
Sbjct 188 CAGAGCCACGGGCCCGTGTCCCTGACCATGTGTAAGCTCACCTCAGGGAAGCATCCGAAC 247

Query 355 TGCAGGTACAAAGAGAAGCGACAGAACAAGTCTTACGTAGTGGCCTGTAAGCCTCCCCAG 414
      |||
Sbjct 248 TGCAGGTACAAAGAGAAGCGACAGAACAAGTCTTACGTAGTGGCCTGTAAGCCTCCCCAG 307

```

Asimismo cuando la secuencia de la mutación se compara con la secuencia de la RNasa 7 descrita por el grupo de Harder, mediante el alineamiento que ejecuta la herramienta online BLAST, se llega a una identificación positiva para este polimorfismo génico.

Alineamiento: RNS7 (AJ306609) vs secuenciación T7RV (promotor de la hebra reversa “RV”).

Score = 671 bits (349), Expect = 0.0  
Identities = 351/352 (99%), Gaps = 0/352 (0%) Strand=Plus/Minus

```

Query 31  GGAATTGCTGAGAGTCCTTTTCTGGGGAGGCTTACAGGCCACTACGTAAGACTTGTTCCT 90
          |||
Sbjct 436  GGAATTGCTGAGAGTCCTTTTCTGGGGAGGCTTACAGGCCACTACGTAAGACTTGTTCCT 377

Query 91  GTCGCTTCTCTTTGTACCTGCAGTTCGGATGCTTCCCTGAGGTGAGCTTACACATGGTCA 150
          |||
Sbjct 376  GTCGCTTCTCTTTGTACCTGCAGTTCGGATACTTCCCTGAGGTGAGCTTACACATGGTCA 317

Query 151  GGGACACGGGCCCGTGGCTCTGGTGGCAGTTTTTATCGCCATTCTTGCAGGCTATTTTGG 210
          |||
Sbjct 316  GGGACACGGGCCCGTGGCTCTGGTGGCAGTTTTTATCGCCATTCTTGCAGGCTATTTTGG 257

Query 211  GGGTCTGGCAGGTGGCGGCCACACTGGAGAAAGGCTCGTGCAGGAAGGTGTTGAGGTCTT 270
          |||
Sbjct 256  GGGTCTGGCAGGTGGCGGCCACACTGGAGAAAGGCTCGTGCAGGAAGGTGTTGAGGTCTT 197

Query 271  TGCACCGTTTTGTGTGCTTGTTAATGTTTTTCATGGCTGAGTTGCATGCTTGAGGGCTGG 330
          |||
Sbjct 196  TGCACCGTTTTGTGTGCTTGTTAATGTTTTTCATGGCTGAGTTGCATGCTTGAGGGCTGG 137

Query 331  GCTGCATGTGCTGAATTTTAAACCACTGTGATGAGGTCATGCCCTTGGGCTT 382
          |||
Sbjct 136  GCTGCATGTGCTGAATTTTAAACCACTGTGATGAGGTCATGCCCTTGGGCTT 85

```

### 5.2.2 Expresión y purificación de la RNasa 7

En este apartado se describen los detalles de los protocolos de expresión de la RNasa 7. En el caso de la RNasa 7 será la primera vez que se realiza en nuestro laboratorio. Se mostrará la comprobación de la expresión de las proteínas mediante electroforesis en SDS-PAGE.

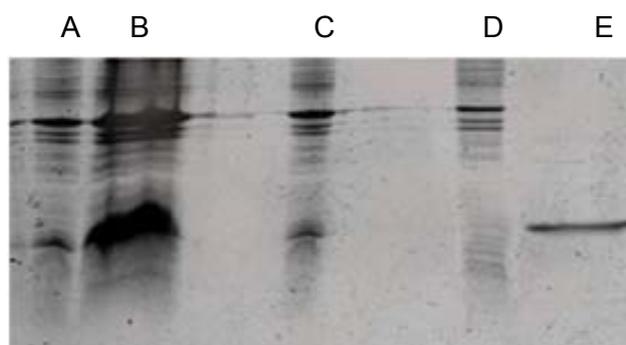
Para la expresión de la RNasa 7 se hizo la respectiva puesta a punto para cada una de las variantes con las que trabajamos, comprobando que el rendimiento es el mismo en todos los caso. Una forma será denominada “Rosenberg” o variedad A75H93 (Zhang et al, 2003), extraída inicialmente de riñón, la otra es la denominada “Harder” (Harder et al, 2002), que hace

referencia a la proteína que se extrajo inicialmente de queratinocitos, con la variación aminoacídica P75Y93. Se relaciona en la tabla 12 los rendimientos de expresión recombinante en *E.coli* BL21 transformada con pET11c-RNasa 7 de las distintas variedades.

Variedad de la RNasa 7	Cantidad (mg) post FPLC	Concentración Post FPLC mg/ml	Vol. Cultivo (L)	Rendimiento mg/l cultivo
A75H93	3.19	2.89	2	1.45
A75H93	1.22	2.56	1	1.28
P75Y93	1.88	2	2	0.9
P75Y93	4.79	2.78	2	2.56

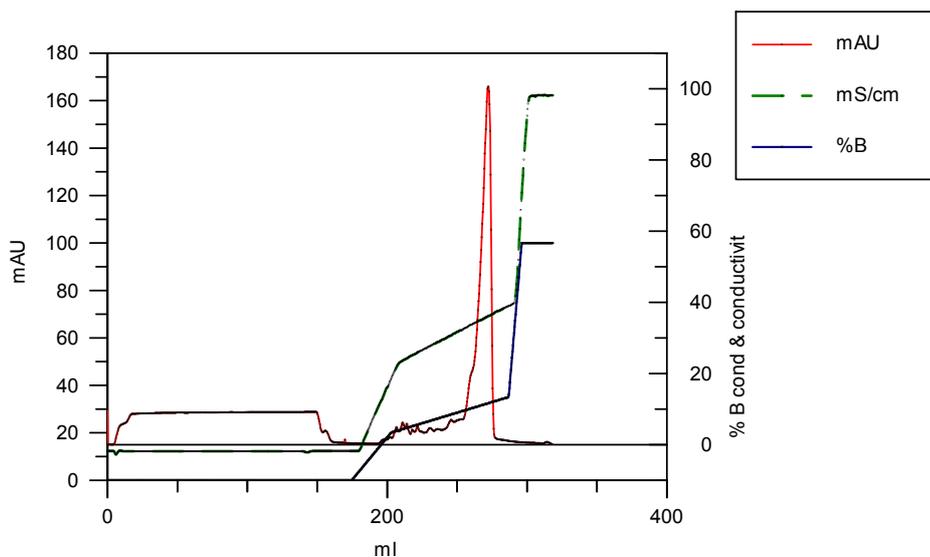
*Tabla 12 Rendimientos de expresión de las distintas variedades de la RNasa 7. Post FPLC se refiere tras la purificación en la etapa de cromatografía de intercambio catiónico utilizando la columna Resource S.*

En la figura 69, de igual manera se muestra el gel SDS PAGE, para comprobar la expresión en respuesta a la inducción por IPTG.



*Figura 69. Gel SDS-PAGE de lisados de E.coli BL21 en el proceso de inducción de la RNasa 7 (variedad P75Y93 “Rosenberg”). A: post IPTG 3h (dil 1/5) B: post IPTG 3h C: post IPTG 1h30 min, D: preIPTG, E: RNasa 3/ECP como marcador de banda molecular. La inducción por IPTG se hizo con una concentración de 1mM final, el volumen de cultivo procesado fue de 1 ml y la OD<sub>600 nm</sub> fue de 0.6 en pre IPTG y hasta 6 a las 3 horas.*

El siguiente paso de la purificación es la cromatografía de intercambio catiónico, que sigue el mismo proceso que con la RNasa 3/ECP. Lo único que varía es el tiempo de elución de la proteína, debido al valor de pI ligeramente diferente respecto al de la RNasa 3/ECP. En la figura 70 se muestra el perfil de dicho cromatograma.



*Figura 70. Cromatograma de FPLC por intercambio iónico de la RNasa 7. El flujo de la columna fue constante (2 ml/min) por lo que el tiempo de elución es una variable equivalente al tiempo. Se muestra el porcentaje de la condición B, que representa el gradiente hasta NaCl 2M en el tampón de Acetato Sódico 150 mM, pH5, además de la conductividad (mS/cm) y la absorbancia (mAU). La columna es una Resource S de Pharmacia Biotech, el volumen de muestra fue de 250 ml. Se representan los datos crudos del aparato (Raw data) extraídos en modo ASCII en el programa Grafit.*

En todos los casos se procedió a realizar una posterior cromatografía de fase reversa C4 Vydac en el sistema de HPLC (Fig. 71). De esta forma se obtendría proteína mucho más pura. El rendimiento obtenido de estos procesos viene relacionado en la tabla 12 y es muy similar para las dos variantes. Finalmente con 10  $\mu$ l de la solución de RNasa 7 en agua se lleva a cabo una electroforesis SDS-PAGE (figura 72). Se observa posteriormente en la EF SDS-PAGE que no aparecen fracciones de degradación y se evalúa un buen grado de purificación.

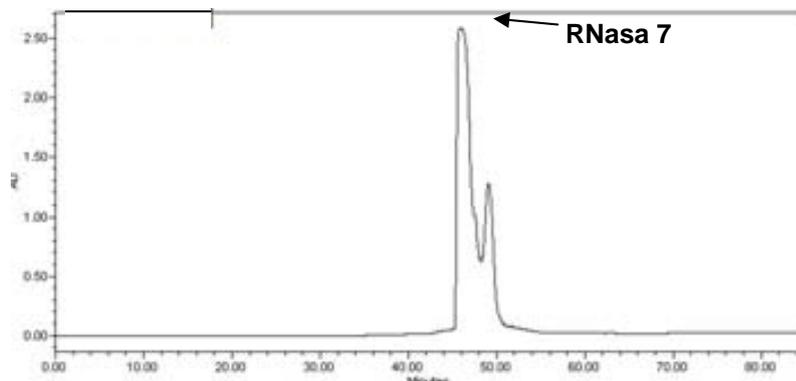


Figura 71. Perfil de la cromatografía de fase reversa (HPLC con columna Vydac C4) de la RNasa 7. Se representa el perfil de elución en función del tiempo, apareciendo un pico mayoritario asignable a la RNasa 7 cuya fracción se analizará posteriormente. El volumen de muestra es de 100 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O 95%+0.05% TFA con 1mg de proteína disuelta. Se representan los datos crudos del aparato (Raw data) extraídos en modo ASCII en el programa Grafit.

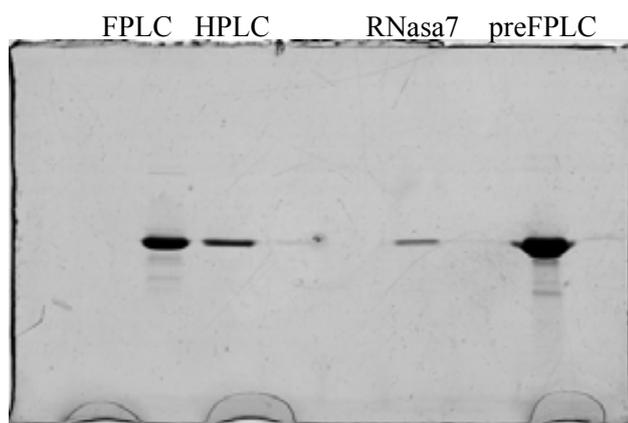
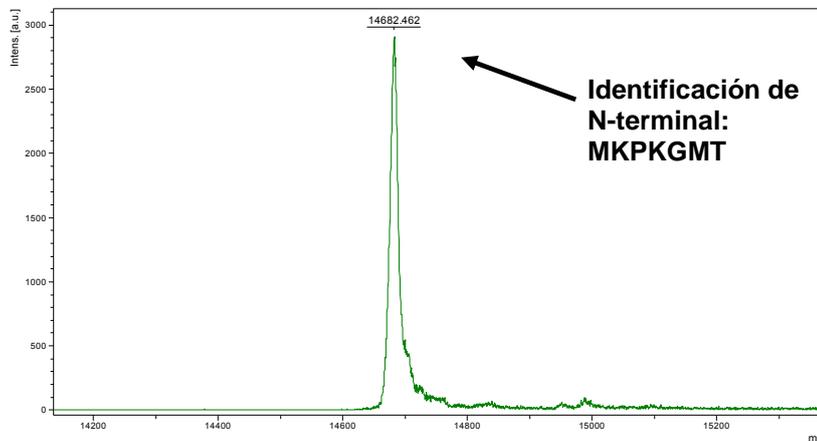


Figura 72. Electroforesis SDS-15%PAGE para la separación y detección de la RNasa 7 purificada en función de las cromatografías aplicadas (FPLC: intercambio catiónico con columna Resource S, HPLC: fase reversa con Vydac C4).

Es necesaria una revisión de la identidad de la proteína purificada dado que se trata de la primera expresión de la RNasa 7 que hemos realizado en el sistema de expresión procariota utilizando el plásmido pET11. Por este motivo se lleva a cabo una espectrometría de masas MALDI-TOF, además de una secuenciación de los siete primeros residuos del N-terminal (Fig. 73). La primera prueba además de asegurarnos la pureza de la muestra, nos informa de la concordancia de su peso molecular experimental con el esperado de tratarse de la RNasa 7, la segunda prueba se trataría de la identificación prácticamente

segura de nuestra proteína. Se obtuvo la secuencia de los 7 residuos N-terminales coincidiendo en todos ellos a la secuencia teórica de la RNasa 7. En la figura 73 se muestra el perfil de la espectrometría de masas y en el recuadro de texto, su identificación, partiendo de la misma muestra.



*Figura 73. Perfil de la espectrometría de masas MALDI-TOF de identificación de la muestra de RNasa 7. El peso molecular es muy próximo al esperado por cálculo con herramientas de ExPASy-Swissprot (14500 Da). Tras confirmación de la identidad de la proteína por secuenciación del N-terminal se puede asignar la secuencia al pico representado.*

### 5.2.3. Caracterización de las dos variantes de la RNasa 7

Se compararon las dos variantes de la RNasa 7 por su acción bactericida, tanto exógena como endógena, así como la actividad de degradación del RNA. No se obtuvieron diferencias significativas entre los resultados para las dos variantes. Los resultados detallados se encuentran en cada una de las secciones correspondientes. Se seleccionó la variante P75Y93 (“Harder”) para los estudios comparativos.

## 5.3 Estudio de las propiedades de las RNasas 3 y 7

### 5.3.1 Análisis de la actividad bactericida de las RNasas recombinantes en cultivos de *E.coli* BL21 y en *S.aureus* A502

En este apartado se relacionará los efectos de las proteínas recombinantes RNasa 3/ECP y RNasa 7, expresadas en nuestro laboratorio, sobre las especies bacterianas *Escherichia coli* como modelo de Gram-negativo y *Staphylococcus aureus* como modelo de Gram-positivo. El efecto se ha comprobado analizando

la viabilidad, mediante la determinación de la OD, del recuento de cfu's y mediante viabilidad celular bacteriana por detección de los niveles intracelulares de ATP. El estudio representa la primera comparación directa de las dos RNasas.

#### 5.3.1.1 Análisis de la actividad bactericida de la RNasa 3/ECP por adición (efecto exógeno).

##### a) Estudio de la forma RNasa 3/ECP nativa

Se estudió el efecto de la RNasa 3/ECP añadida al medio de cultivo bacteriano. En primer lugar, se determinó el margen de concentraciones adecuado y acorde con la literatura para analizar el efecto bactericida de dicha proteína. Para establecer ese rango se realizaron unos experimentos iniciales de crecimiento de cultivo en LB líquido y medición de la OD<sub>600nm</sub>. Los resultados en el recuento de cfu's, apuntaron a que 4 µM resulta ser una concentración de trabajo adecuada (Fig. 74), siendo además apropiada para los estudios comparativos (Torrent et al, 2009b, 2010). A continuación se repitió el experimento comparando las dos especies modelo Gram-positivo y Gram-negativo e incubando durante un tiempo superior (Fig. 75). Una vez establecida la concentración de RNasa 3/ECP a 4 µM se realizaron medidas a diferentes tiempos a partir de un crecimiento bacteriano en LB a una OD<sub>600nm</sub> de 0.6. Dichas mediciones de cfu's se realizaron a partir de diluciones 10<sup>5</sup> en PBS estéril. Se sembraron 100 µl de dicha dilución en placas LB sin antibióticos. Al mismo tiempo para cada tiempo se realizó la evaluación de la viabilidad tanto por OD<sub>600nm</sub>, como por la determinación de ATP intracelular por fluorescencia indirecta. La figura 76 muestra la viabilidad celular en función del tiempo comparada mediante los tres métodos.

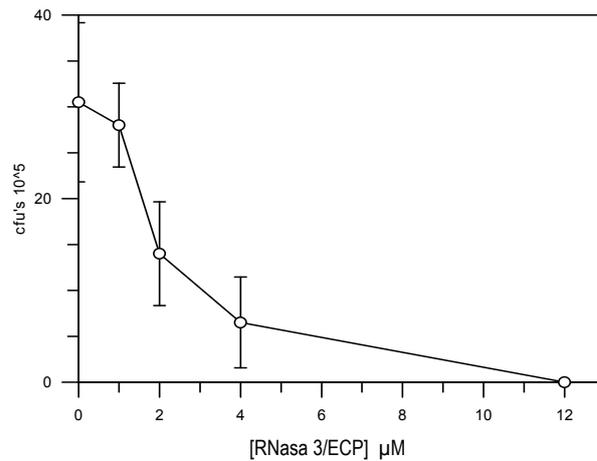


Figura 74. Efecto de la [RNasa 3/ECP] sobre el crecimiento de *E. coli* a un tiempo de 45 min. Evaluado mediante el recuento de cfu's.

La viabilidad se evaluó también a partir de la cuantificación de la cantidad de ATP intracelular bacteriano (método comercial BacTiter Glo). En este caso la concentración de RNasa 3/ECP ya quedaría fijada a 4  $\mu\text{M}$ . Se observa un descenso a 30 min de aproximadamente el 45% y a 60 min llega a provocar la letalidad máxima, mantenida durante varias horas.

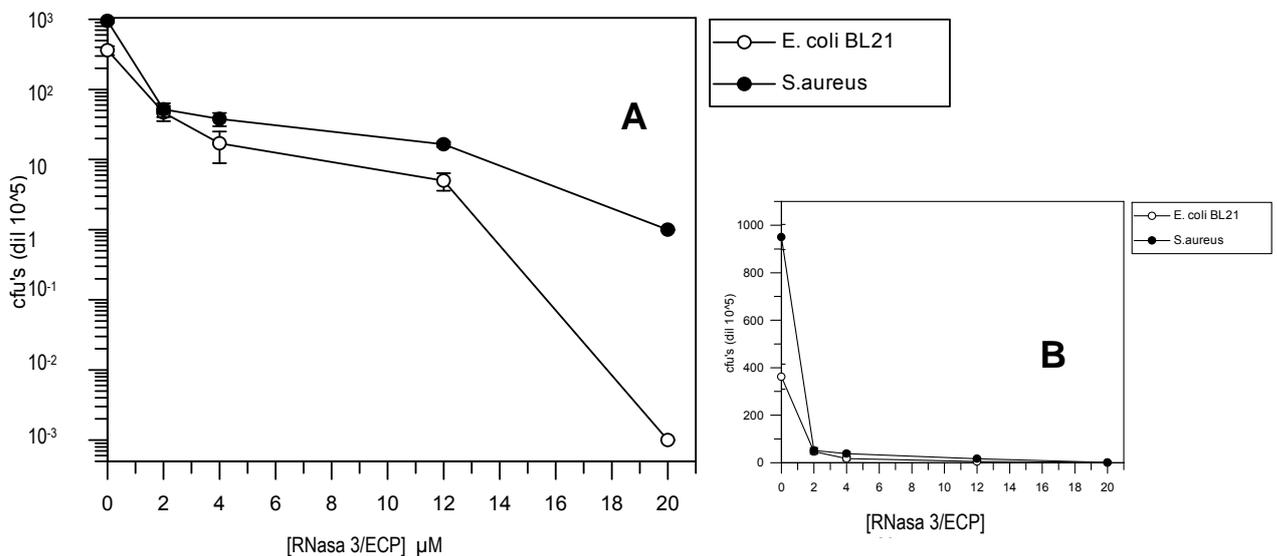


Figura 75. Recuentos de cfu's tras incubación de la RNasa 3/ECP en *E. coli* y *S. aureus* durante 90 min a diferentes concentraciones. El cultivo tenía una  $OD_{600nm}$  de 0.6, el volumen sembrado fue de 100  $\mu\text{l}$  y se incubaron las placas overnight. Los puntos son media de duplicados y la barra de error su desviación típica. Se representa en A mediante escala logarítmica, mientras que en B es en escala lineal.

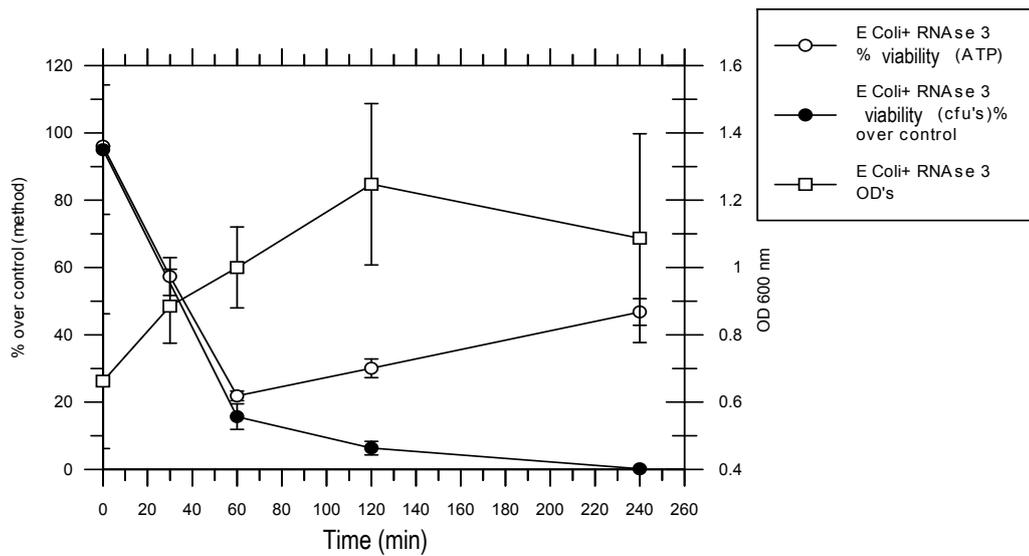


Figura 76. Gráfica comparativa entre tres métodos diferentes de evaluación de la letalidad de la ECP a  $4 \mu\text{M}$ , los puntos son medias y las barras de error desviaciones típicas de dos experimentos. La  $OD_{600\text{nm}}$  a la que se añadió la RNasa 3/ECP fue de 0.6. Los valores de viabilidad por ATP y recuento de cfu's se expresan como porcentaje sobre el control, los de OD se representaron con la variable en el eje de ordenadas a la derecha como valores absolutos.

En la evaluación de un método u otro para la determinación de la viabilidad tuvo que sopesarse la rapidez del proceso, la resolución entre tiempos cortos y los parámetros estadísticos que podían informarnos de las bondades de la medición. En la figura 76 se muestra la comparación de métodos y en la tabla 13 se muestran los parámetros estadísticos. Entre los tres métodos se ha observado que la determinación de la viabilidad, mediante medición de los niveles de ATP es un método más resolutivo en cuanto a tiempos, fácil y rápido de ejecutar, con un coeficiente de variación muy aceptable y con buena correlación con el método de referencia (recuento de cfu's).

Método	Tiempo	CV %	Corr entre Magnitudes
Viabilidad por recuento de cfu's	30'	20.26	rATP: 0.96
	60'	24.25	rOD :0.31
	240'	31.75	
Viabilidad por fluorescencia (determinación de ATP)	30'	9.77	rcfu :0.96
	60'	6.64	rOD : 0.52
	240'	8.51	
Crecimiento por densidad óptica (OD <sub>600nm</sub> )	30'	12.43	rATP : 0.52
	60'	19.25	rcfu : 0.31
	240'	28.52	

*Tabla 13. Comparativa de medidas estadísticas entre métodos para evaluar la viabilidad. Cuando se habla de rcfu, rATP, rOD, se refiere a las correlaciones del método de la fila correspondiente con cada uno de los otros dos hechos con cuatro puntos de evolución en el tiempo (0, 30, 60, 240 min), CV es el coeficiente de variación de cada valor medio. Las medidas se hicieron a tres tiempos diferentes tal como se indica en la columna Tiempo.*

Dado que estos resultados de dispersión dependen de la técnica y a priori no de la especie bacteriana, se cogió como modelo el comportamiento de *E. coli*. Por otra parte, una serie de pruebas preliminares en la optimización del método nos mostraron que la tendencia de *S.aureus* era la misma. Como se verá en los resultados posteriores, la dispersión de valores en la evaluación del crecimiento microbiano por OD<sub>600nm</sub> es bastante similar.

Independientemente de la técnica se ha podido apreciar un ligera subida del orden del 10% al final de la evolución del cultivo a lo largo del tiempo, que podría ser debido a la incubación en LB, lo cual permite al cultivo recuperarse (al contrario de lo que podría suceder en un tampón de mantenimiento), gracias a la degradación de la ribonucleasa a lo largo del tiempo (supuestamente por proteasas de la bacteria).

#### 5.3.1.1.1 Estudio de la potencial implicación de la actividad catalítica de la RNasa 3/ECP en su actividad bactericida mediante el mutante de centro activo ECPH128N

A pesar de que los estudios previos de la bibliografía indican que la actividad catalítica RNasa no participa en el mecanismo de acción bactericida (Rosenberg 1995, Carreras et al 2003) nos propusimos analizar si dicha actividad RNasa podría desempeñar algún papel secundario dependiendo de las condiciones de ensayo. Por otra parte la descripción en bibliografía de otras proteínas antimicrobianas con múltiples niveles de acción (Abtin et al, 2009), nos sugiere que en el caso de las RNasas antimicrobianas podría darse un fenómeno similar.

En la evaluación de los efectos de la incubación de la RNasa 3/ECP se enfocó con una estrategia comparativa con el mutante recombinante expresado en *E. coli* RNasa 3/ECP-H128N generado en nuestro laboratorio (Fig. 77 para *E. coli* y Fig. 78 para *S. aureus*), con dos objetivos:

- 1) Evaluar el potencial efecto de la deficiencia de actividad enzimática en el mutante sobre su actividad antibacteriana, lo cual podría indicar la importancia relativa de la actividad enzimática en la actividad bactericida.
- 2) Constatar la importancia necesaria de las propiedades de superficie de la RNasa 3/ECP (carga catiónica) compartidas entre la proteína nativa y el mutante ECPH128N.

Se han realizado dos aproximaciones metodológicas: 1) medida de crecimiento por OD<sub>600nm</sub> y 2) viabilidad por cuantificación de ATP intracelular. En esta segunda técnica se puede apreciar una leve subida ya comentada para la RNasa 3/ECPwt, que obedecería a efectos de recuperación del cultivo.

El mutante RNasa 3/ECP H128N incluye la sustitución de un aminoácido (H128N) que pertenece al centro activo (compuesto por la tríada H128, H15 y K41). Esta variante se obtiene a un nivel de expresión adecuado en *E.coli* (BL21), de ahí que se ha utilizado para comparaciones funcionales. Se observa una actividad ribonucleasa aminorada inferior al 25% de la nativa. En estudios posteriores de expresión endógena se estudió el doble mutante RNasa 3/ECP H128NH15N, el cual consigue abolir casi totalmente la actividad catalítica. Sin embargo, este mutante no se ha podido expresar y purificar como proteína recombinante al nivel de la RNasa 3/ECP H128N, debido probablemente a problemas de repliegamiento y estabilidad de la proteína.

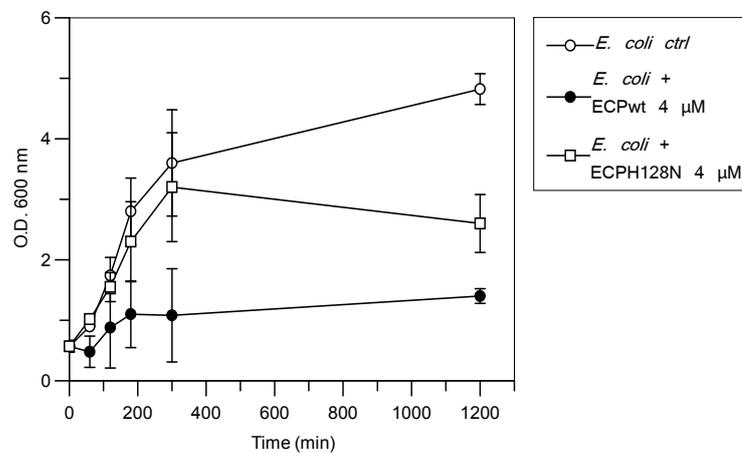


Figura 77. Efectos de la ECPwt y RNasa 3/ECP-H128N, en relación a la densidad de crecimiento ( $OD_{600nm}$ ) para *E. coli* BL21. Los puntos representan medias de tres experimentos independientes así como las barras de error sus desviaciones típicas. Se incubaron las bacterias a partir de una  $OD_{600nm}$  de aproximadamente 0.7.

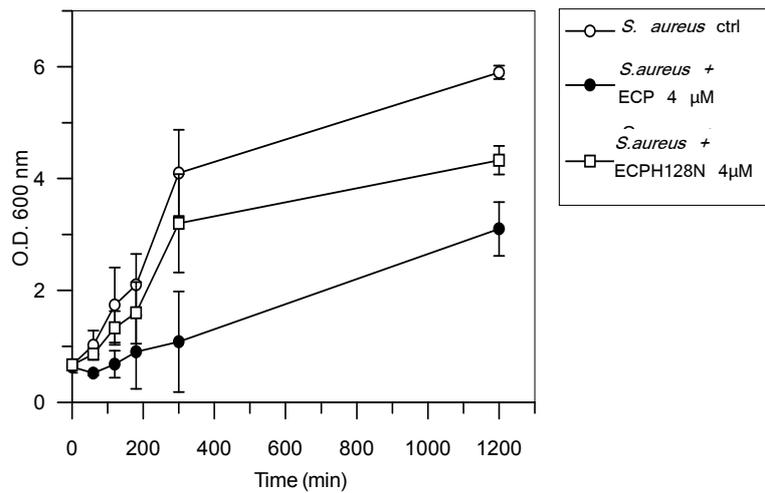


Figura 78. Gráficas de los efectos de la ECPwt en comparación con la RNasa 3/ECP-H128N, en cuanto a la densidad de crecimiento ( $OD_{600nm}$ ) para *S. aureus*. Los puntos representan medias de tres experimentos independientes así como las barras de error sus desviaciones típicas. Se incubaron las bacterias a partir de una  $OD_{600nm}$  de aproximadamente 0.7.

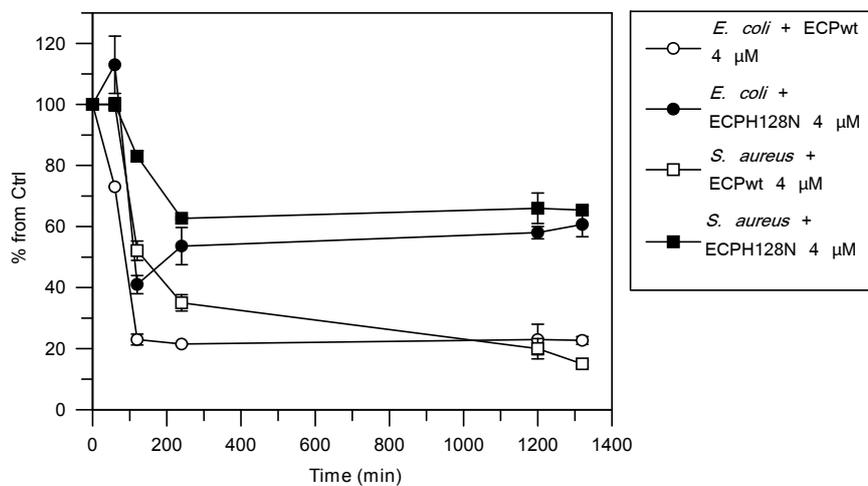


Figura 79. Efectos comparativos de la RNasa 3/ECP y la RNasa 3/ECP-H128N, tanto en *E. coli* como en *S. aureus* para la viabilidad bacteriana evaluada por recuento de cfu's. Los valores son el resultado de las medias de 2 experimentos independientes así como las barras de error las respectivas desviaciones típicas. Se muestran los valores para cada tiempo como porcentajes respecto a su control interno.

Los resultados obtenidos para los mutantes de centro activo RNasa 3/ECP-H128N (Fig. 77) y para RNasa 3/ECP H15N/H128N a nivel endógeno, en comparación con la RNasa 3/ECP nativa, permiten constatar que ambas variantes afectan

parcialmente a la actividad antibacteriana de la RNasa 3/ECP y por lo tanto se deduce que la actividad RNasa podría estar parcialmente implicado en dicha capacidad. Es necesario discernir dentro de la actividad antibacteriana de la RNasa 3/ECP, la aportación de sus propiedades de superficie sobre las envueltas bacterianas de la actividad ribonucleasa. Por eso se ha hecho necesario el enfoque que da la evaluación de los efectos a nivel endógeno, más dependientes de dicha actividad ribonucleasa. Otra causa que podría explicar la capacidad bactericida mermada respecto a la forma nativa podría ser una afectación a la estructura general de la proteína de este mutante.

Los resultados de la tabla 14 muestran el efecto de los dos mutantes de centro activo en comparación con otro mutante con el centro activo intacto. El primero, RNasa 3/ECP-H128N permite comparar actividad endógena con la incubación, el segundo RNasa 3/ECP- H15N/H128N con la actividad RNasa totalmente anulada nos permite saber si una total delección de la actividad RNasa puede aportar un grado mayor en la incapacidad de ejercer su actividad antibacteriana. El tercer mutante es RNasa 3/ECP-W35AR36A, con una actividad catalítica equivalente a ECP nativa pero con una actividad bactericida claramente reducida (Carreras et al, 2003). Este mutante nos permitirá comparar el impacto de una mutación que no afecta al centro activo.

	Efecto Endógeno	Efecto Exógeno
RNasa 3/ECP wt	43% $\pm$ 0.8	49% $\pm$ 0.7
RNasa 3/ECP-H128N	13% $\pm$ 1.7	12% $\pm$ 0.9
RNasa 3/ECP * H128NH15N	11%	ND
RNasa 3/ECP @ W35AR36A	21%	$\geq$ 40% *

*Tabla 14 Porcentajes de letalidad a los 120 min de incubación en E. coli en medio de cultivo LB. El efecto endógeno se consiguió por inducción de la cepa E. coli Rosetta Gami, transformada con el plásmido correspondiente, mientras que el efecto exógeno se consiguió por incubación de E. coli con proteína purificada a 4  $\mu$ M. Los valores son media de dos experimentos. ND: no se dispone de resultados debido a la dificultad de obtención de proteína recombinante. \*Valor estimado a partir de los resultados de Carreras y colaboradores (2003).*

La diferencia de la letalidad del mutante RNasa 3/ECP-H128N con respecto a ECPwt a nivel endógeno no es significativamente diferente de la misma diferencia a nivel

exógeno, por lo cual se podrían sugerir que no existen causas diferentes para explicar el descenso de la actividad bactericida de RNasa 3/ECP-H128N tanto a nivel exógeno como a nivel endógeno y estas causas deben residir parcialmente en la mutación de centro activo tal como se deduce de la comparación con el otro mutante que mantiene el centro activo intacto.

### 5.3.1.2 Análisis de la actividad bactericida de la RNasa 7 por adición (efecto exógeno).

Se describe a continuación el estudio de la actividad bactericida de la RNasa 7, tanto por evaluación del crecimiento bacteriano ( $OD_{600nm}$ ) como por viabilidad por ATP, repitiendo así el procedimiento que ya se ha llevado a cabo para la RNasa 3/ECP. No se detectaron diferencias significativas en lo que respecta a la actividad antibacteriana de las dos variantes analizadas (Fig. 80).

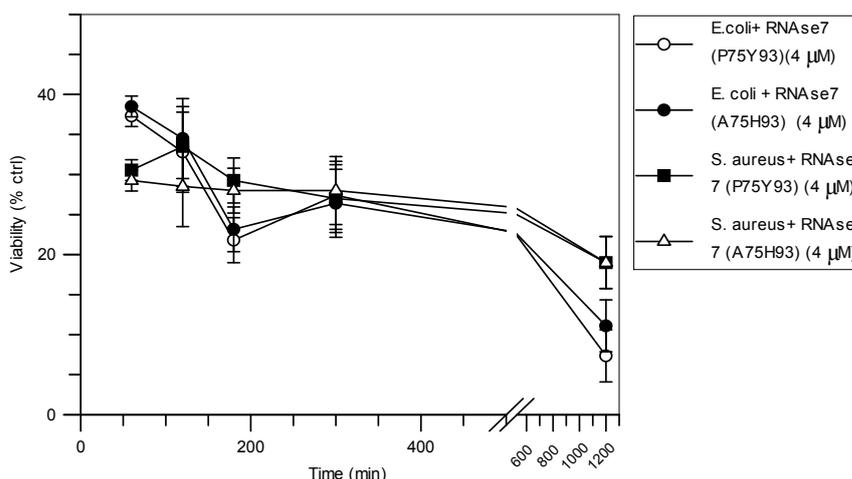


Figura 80. Cinéticas de evaluación de la viabilidad de las dos variantes de la RNasa 7, sobre las especies bacterianas *E. coli* y *S. aureus*, utilizando el método de detección de ATP intracelular (*BacTiter Glo*). Los puntos representan medias de dos experimentos así como las barras de error su desviación típica.

Una vez establecida la equivalencia a nivel del efecto bactericida de las dos variantes de la RNasa 7 y las correspondientes substituciones parciales, los ensayos siguientes se realizaron con la variedad P75Y93 (“Harder”). Se ha analizado la viabilidad por cuantificación de ATP intracelular en función de la concentración de RNasa 7 a fin de encontrar una concentración de trabajo idónea. Se determinó que la concentración de 4 μM presentaba un efecto bactericida de orden similar al observado para la RNasa 3/ECP, facilitando la comparación de ambas (Figs. 81 y 82).

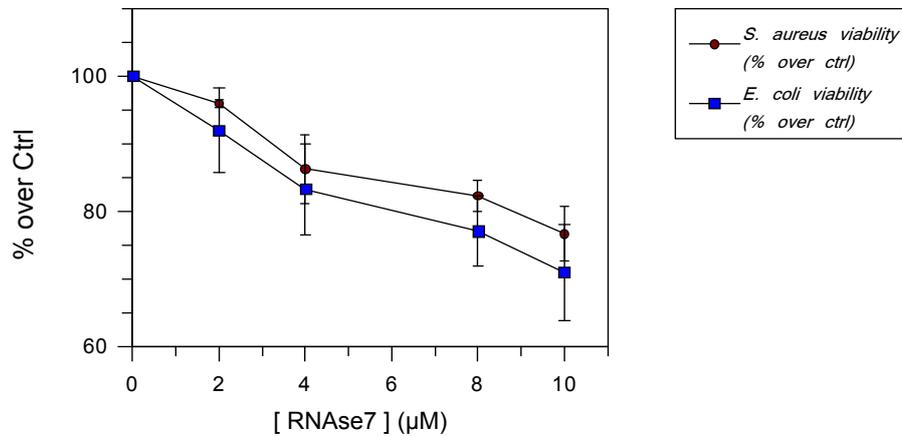


Figura 81 Efectos de concentraciones crecientes de la RNasa 7 en la viabilidad de *E. coli* y *S. aureus*, evaluada por la determinación de ATP intracelular (variedad "Harder" P75Y93). Tiempo de incubación de 30 min. Los resultados y sus desviaciones representadas por la barra de error corresponden a tres experimentos independientes.

Para las dos especies de nuestro estudio también se ha determinado la OD<sub>600nm</sub> como medida del crecimiento microbiano tras incubaciones de los cultivos bacterianos en presencia de la proteína a una concentración final de 4 µM. Tal como se esperaba, el crecimiento queda mermado (Fig. 83) en las dos especies.

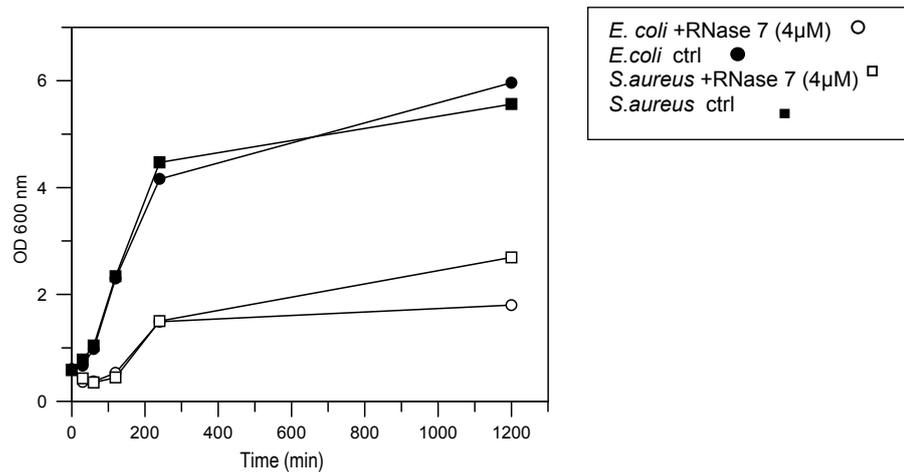


Figura 82. Gráfica de actividad de la RNasa 7 mediante registro de la densidad de crecimiento por evaluación de la absorbancia a 600 nm, para *E. coli* y *S. aureus*, en comparación con los respectivos controles de crecimiento normal.

La figura 83 muestra la comparativa del efecto de la RNasa 3/ECP y la RNasa 7 en experimentos paralelos con el mismo cultivo y en las mismas condiciones. Se confirma una letalidad de la RNasa 7 ligeramente superior respecto a la RNasa 3/ECP.

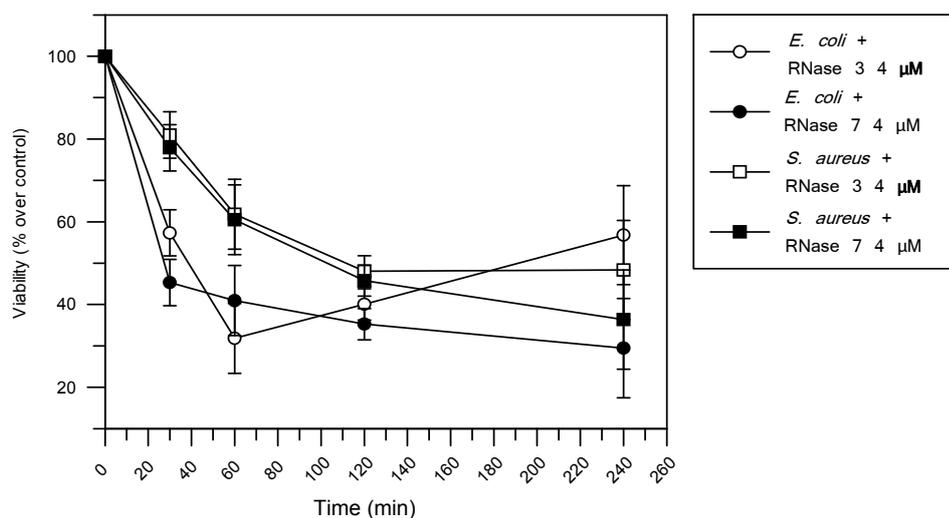


Figura 83. Cinética del efecto de la RNasa 3/ECP y la RNasa 7 en la viabilidad, utilizando el método de detección de ATP por fluorescencia (BacTiter Glo). Los valores representan medias de dos experimentos independientes así como las barras de error su desviación típica.

### 5.3.1.3 Análisis de la lisis celular por detección de la liberación de RNasa bacteriana endógena por zimograma.

La técnica del zimograma permite la detección de proteínas con actividad enzimática en cantidades muy bajas (del orden de nanogramos) utilizando ácido policitídílico o ácido poliuridílico como sustratos para las ribonucleasas. Este método puede dar nueva información respecto a la actividad lítica de la RNasa 3/ECP y la RNasa 7 sobre las bacterias, al liberarse la RNasa I bacteriana. Dicha RNasa se detecta en el zimograma como banda de actividad a un peso molecular de 30000 Da. Con este enfoque metodológico, consolidamos los resultados de las demás técnicas para evaluar la actividad bactericida de las RNasas.

Previamente a la presentación de resultados que conciernen a los efectos de las RNasas sobre bacterias, haremos referencia a la banda de actividad RNasa que aparece en el zimograma de extractos de cultivos de *E. coli* con un peso molecular de alrededor de 30000 Da. Esta banda, como hemos comentado, coincide en masa molecular con la RNasa I intracelular de *E. coli*, pero también es muy similar al peso molecular de los dímeros de RNasa 3/ECP o RNasa 7 que eventualmente pueden formarse, pudiendo enmascarar los resultados. Para ello realizamos un experimento preliminar donde únicamente se da una liberación de dicha RNasa I por lisis bacteriana, en ausencia de RNasa 3/ECP o RNasa 7, de forma que se pueda identificar la banda de RNasa I de *E. coli* inequívocamente. Con este fin se probaron dos métodos de lisis: la sonicación y el método comercial BugBuster®, que se contiene un agente detergente. Se escogió finalmente el método mediante adición de detergente lo cual permite unas condiciones de ruptura suave de las células. Probablemente dicho detergente esté ejerciendo un efecto de disgregación de las posibles agregaciones proteicas que pueden activarse a partir del proceso de lisis. El resultado final ha sido una identificación inequívoca de la RNasa I que se puede observar en la figura 84.

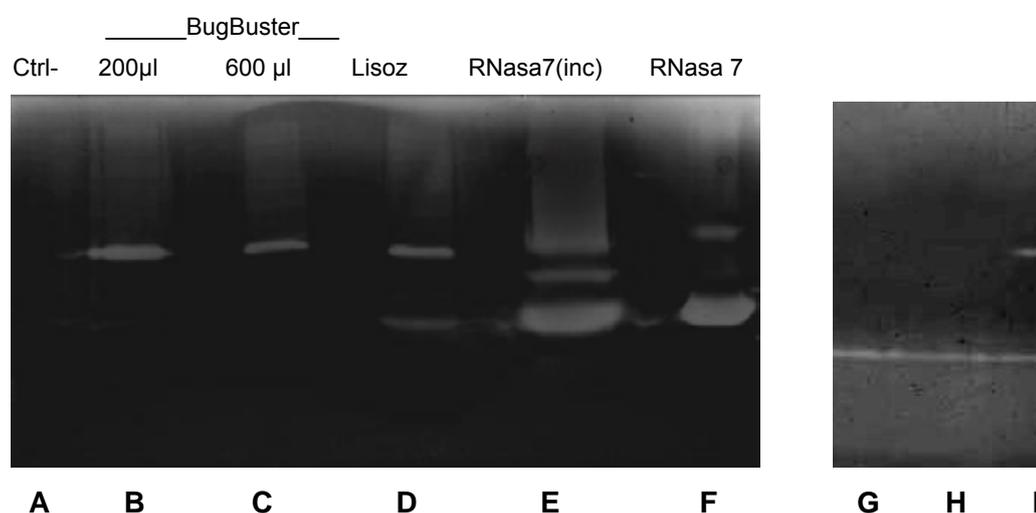
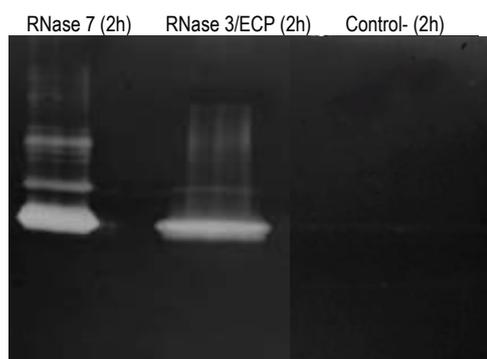


Figura 84. Zimograma en SDS-15% PAGE preparado con ácido poliuridílico a 0.12 mg/ml, de sobrenadantes de lisis de *E. coli* con diferentes agentes: A Ctrl- B: Tampón BugBuster de Novagen durante 30' con un volumen de 200 µl sobre 200 µl de cultivo C: idem con un volumen de 600 µl D: incubación con 1 mg/ml de Lisozima (aprox 90 µM) E: incubación de RNasa 7("inc" de incubada) a 4 µM, F: RNasa 7 (aprox 5 ng). G: sonicación durante un minuto de un cultivo de *E. coli* en idénticas condiciones que en A-F. H: sonicación durante 5 min. I: sonicación con RNasa 3 ECP incubada a 4 µM.

Se utilizó asimismo el lisozima como mecanismo adicional capaz también de provocar la liberación de una actividad ribonucleasa I al exterior de la célula como consecuencia de la lisis. El lisozima facilita la lisis celular y se observa también la aparición de una banda a 30000 Da.

Utilizando el zimograma se comparan los efectos por adición en el cultivo bacteriano de las ribonucleasas 3 y 7 (Fig. 85).



*Figura 85. Zimograma en SDS- 15% PAGE con ácido poliuridílico a 0.12 mg/ml, de diferentes sobrenadantes tras incubación de E. coli a tiempos largos (2 horas) con RNasas y controles.*

Se vuelve a observar, esta vez a tiempos largos, una actividad lítica de las RNasas 3/ECP y RNasa 7, como se puede deducir de la aparición de la banda a la altura de la RNasa I.

Asimismo, se comparó la actividad bactericida de ambas RNasas por determinación de la liberación creciente de RNasa I (como resultado de la lisis bacteriana) a distintos periodos de incubación (Fig. 86). Con esta misma técnica, se realizó otro experimento que permitiese evaluar en detalle actividad en función del tiempo (Fig. 87). De esta manera se pudo observar que a tiempos cortos existe una leve liberación de la RNasa I.

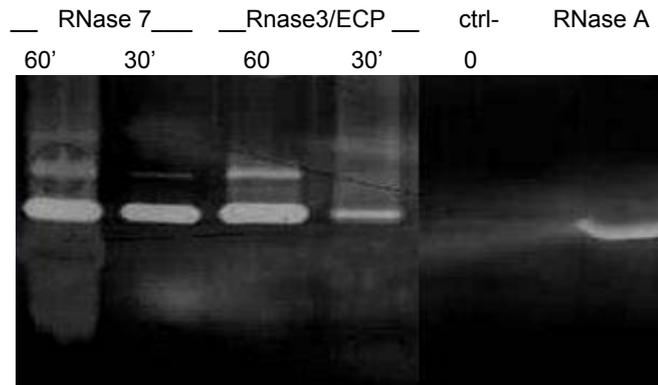


Figura 86. Zimograma en SDS- 15% PAGE con 0.12 mg/ml de ácido poliuridílico, de sobrenadantes de *E.coli* BL21 tras incubación con RNasas sobre cultivos de *E. coli* y los respectivos controles. Los carriles con incubación de RNasa 7 a tiempos 60 y 30 min, se comparan con los de incubación a los mismos tiempos para ECP, ambas proteínas a 4  $\mu$ M. Se acompañan carriles a tiempo 0, y un carril a tiempo final de control negativo. El carril RNasa A se cargó con aproximadamente 50 ng de dicha proteína como control positivo.

Los resultados de la actividad de lisis celular de la RNasa 7 (por tanto liberación de RNasa I bacteriana) son ligeramente superiores que los de la RNasa 3/ECP, en paralelo con los resultados previos de viabilidad por cuantificación de ATP intracelular (mostrados en la sección anterior). Por otra parte, Torrent y colaboradores (2009a, 2010) describen unos efectos en las membranas modelo y en las bacterias, más tempranos para la RNasa 7 que la RNasa3 lo cual puede tener cierto paralelismo con nuestras observaciones.

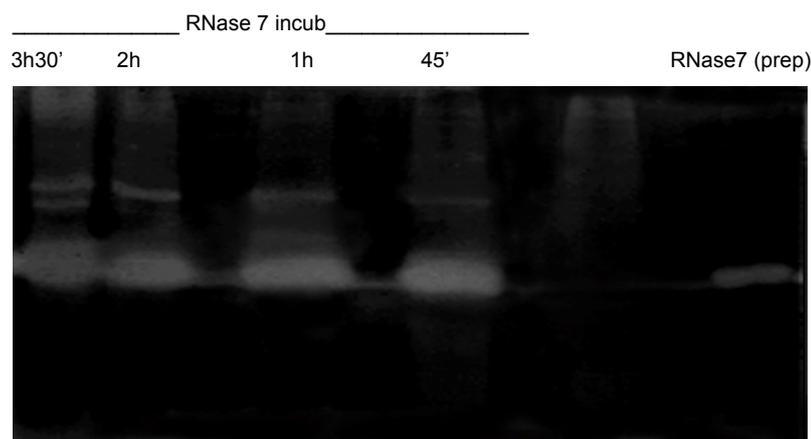
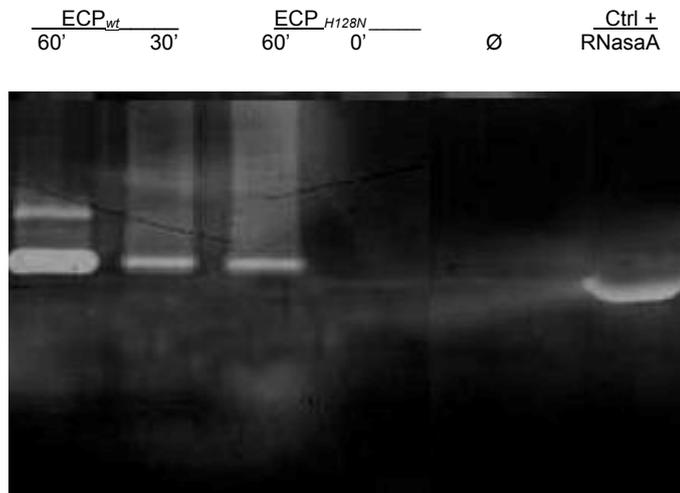


Figura 87. Zimograma en SDS- 15% PAGE con 0.12 mg/ml de poli U como sustrato, de las incubaciones de RNasa 7 sobre cultivos de *E. coli* (RNasa7 inc): A: 3h 30' B: 2h C: 1h D: 45' E: control negativo G: RNasa 7 "prep" de proteína purificada (2 ng aprox.). La RNasa se incubó a 4  $\mu$ M en cultivos con  $OD_{600nm}$  de 0.7 en volúmenes de 400  $\mu$ l. Dichas muestras se centrifugan y el sobrenadante contendría las proteínas resultantes de la lisis de las bacterias. Se cargan 6  $\mu$ l de dicho sobrenadante en cada carril.

En el zimograma mostrado (Fig. 87) se ha podido apreciar la dependencia de la intensidad de la banda de RNasa 7 con respecto al tiempo de incubación. Por otra parte, se constata cierta dificultad en reproducir exactamente la misma intensidad de bandas con actividad RNasa.

#### 5.3.1.3.1 Estudio comparativo entre la RNasa 3/ECP nativa y la variante RNasa 3/ECP-H128N.

Mediante la técnica del zimograma se analizaron cultivos bacterianos incubados con la RNasa 3/ECP y el mutante RNasa 3/ECP-H128N (Fig. 88).



*Figura 88. Zimograma con gel de SDS-15%PAGE y con ácido poliuiridílico a 0.12 mg/ml, de diferentes sobrenadantes tras incubación de E. coli BL21 con RNasas y controles. Los carriles con incubación a tiempos 60 y 30 min, se comparan con los de incubación a los mismos tiempos para ECPwt y RNasa 3/ECP-H128N a 4μM. Se acompañan los carriles a tiempo 0 de cada proteína, junto con un carril a tiempo final para el control negativo. El carril de RNasa A se cargó con aproximadamente 50 ng como control positivo de la técnica y marcador de peso molecular. Ø corresponde a un carril sin cultivo celular.*

Esta imagen de zimograma nos revela dos hechos de importancia, el primero, que la actividad del mutante H128N de la RNasa 3/ECP mutante sigue siendo detectable mediante la técnica del zimograma tal como se demuestra en la banda de actividad RNasa que se encuentra al mismo nivel en el gel que la de la RNasa 3/ECP wt aunque la banda de actividad indica que la actividad residual del mutante no superaría al 25% de

la actividad de la proteína nativa. Tal como se estima por densitometría, esto se correlacionaría con el 24.5% de reducción de la capacidad antibacteriana que se muestra en la tabla 14. Por otra parte, se observa una reducción significativa de la actividad lítica sobre los cultivos bacterianos medida en el zimograma que no dependería de los residuos catiónicos o de superficie que no han sido substituidos en el mutante ECPH128N. Se muestra por tanto una menor afectación al estado general de las membranas de las bacterias al no liberar significativamente su actividad RNasa endógena. Esto podría hacer suponer que la actividad RNasa pudiera contribuir en la lisis de las bacterias, tal como se mencionó previamente. Por otra parte, como se detalla en los posteriores experimentos de degradación del RNA, se comprobó como la actividad RNasa del mutante quedaba muy aminorada, en mediciones a tiempos cortos, inferiores a 30 min.

### 5.3.2 Análisis de la actividad bactericida mediante la expresión de la RNasa 3/ECP a nivel endógeno en *E.coli Rosetta Gami*

El protocolo de expresión a nivel endógeno de la forma nativa de la RNasa 3/ECP en la cepa *E.coli Rosetta Gami* nos ha proporcionado un sistema de cribado rápido para la comparación de distintas variantes de la proteína. También es interesante el hecho de que a partir de la expresión endógena, la proteína puede acabar liberándose al exterior de la célula y permitir el análisis de la exposición exógena de las RNasas de interés sobre las bacterias.

Se detalla a continuación la estrategia y los resultados de dicha expresión a nivel endógeno. De nuevo la expresión se basa en la utilización del plásmido pET11c. Es importante mencionar que el sistema de expresión está optimizado para evitar una sobreexpresión de nuestra proteína, que podría conllevar un proceso de formación de cuerpos de inclusión. Para este fin se ha llevado a cabo una selección de las cepas de *E.coli* disponibles comercialmente que permitieran expresar de forma soluble la proteína nativa recombinante y tuvieran un sistema de expresión finamente regulado por concentración de IPTG. La elección recayó sobre la cepa *Rosetta Gami*, proveniente de la modificación de la *E. coli* BL21 (DE3). Se trata de una cepa que es capaz de reconocer codones del código genético de mamífero (de ahí el pseudónimo comercial de Rosetta) y posee una modificación génica consistente en la mutación en los genes *trxB* y *gor*. Dichas

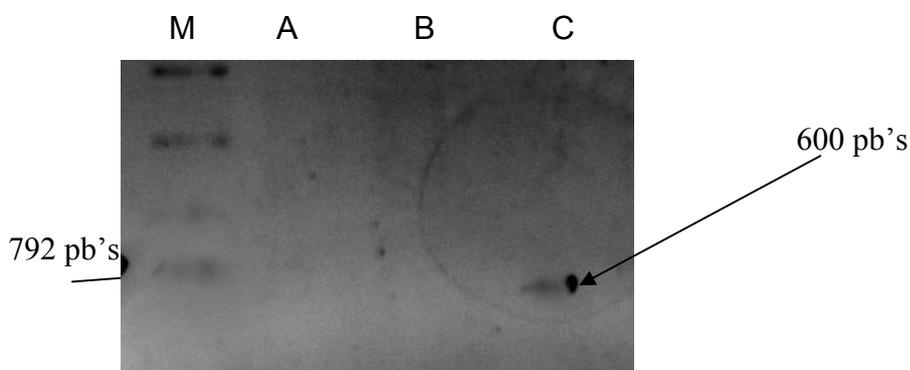
modificaciones provocan la supresión de la actividad de la tiorredoxina reductasa y la glutatión reductasa respectivamente, permitiendo la formación y conservación de los puentes disulfuro que se dan en proteínas de eucariotas y en consecuencia facilitan el correcto plegamiento de las proteínas de este sistema de expresión.

Algunos de los mutantes estudiados en esta tesis habían sido obtenidos y caracterizados previamente (Carreras et al, 2003). Dichos mutantes se refieren a la aportación principal de los aminoácidos catiónicos de superficie y a los aromáticos potencialmente implicados en la actividad antibacteriana: Trp35, Arg36, Phe76, Arg101, Arg104, Arg121. Asimismo se testaron los mutantes para los residuos del centro activo His15 y His128: ECP-H128N y el doble mutante ECP-H15NH128N, que suprime totalmente la actividad RNasa residual que se ha descrito en el mutante simple. Por otra parte se probó un mutante del cual no se tenía ninguna información experimental hasta el momento, se trata de ECP-D130N, que teóricamente podría afectar a la estructura e indirectamente a la actividad de la proteína por la supresión de la formación de un puente de hidrógeno H64-D130 en la proteína nativa. La sustitución D130N puede alterar la estabilidad del centro activo por modificación del pKa de la His64, y por otra parte se piensa que este enlace pueda estabilizar la estructura general de la proteína. También se hicieron algunos pruebas con un mutante de superficie, que sumaría su efecto al carácter catiónico de la RNasa 3/ECP, se trata de la variante ECP-R77A.

#### 5.3.2.1 Selección de los clones.

Se transformó la cepa bacteriana *Rosetta Gami* de *E. coli* con el plásmido pET11c-RNasa 3/ECPwt o las distintas variantes de la RNasa 3/ECP. Inicialmente, se analizó la transformación positiva del plásmido conteniendo el gen de ECPwt en la cepa de *E. coli Rosetta Gami*. La confirmación se realizó por digestión del plásmido extraído de *Rosetta Gami*© con digestiones en las dianas del MCS que precisamente permitían la inserción del gen (ver mapa del MCS en apéndice) y dichas dianas fueron las específicas para los enzimas NdeI

y EcoRV. El resultado esperado sería un fragmento de 660 pb's y precisamente se demuestra la aparición de una banda de ese peso molecular (Fig. 89).



*Figura 89. Gel al 1.5% de agarosa para detección de DNA. Se observa un fragmento de 600 pb's en el caso de la digestión NdeI + EcoRV a partir de pET11c-ECPwt. Carril A: control negativo B: carril B clon sin éxito en la digestión C: clon con digestión exitosa del fragmento que lleva ECPwt. Se observa dicho fragmento a la altura indicada según el marcador de peso molecular de la izquierda.*

### 5.3.2.2 Western Blot para la detección de la proteína.

Para confirmar la expresión de la proteína en el sistema *E.coli Rosetta Gami* pET11c/ECPwt se procede a realizar la técnica de Western Blot (Fig. 90). Se propone utilizar un rango de concentraciones de IPTG para evaluar la inducción de la expresión de proteína y de esta manera trabajar con la concentración óptima. El proceso requirió su optimización, dado que no se había realizado el reconocimiento de los anticuerpos (anticuerpo EG2 que reconoce la ECP, ver Apéndice) en extractos bacterianos previamente.

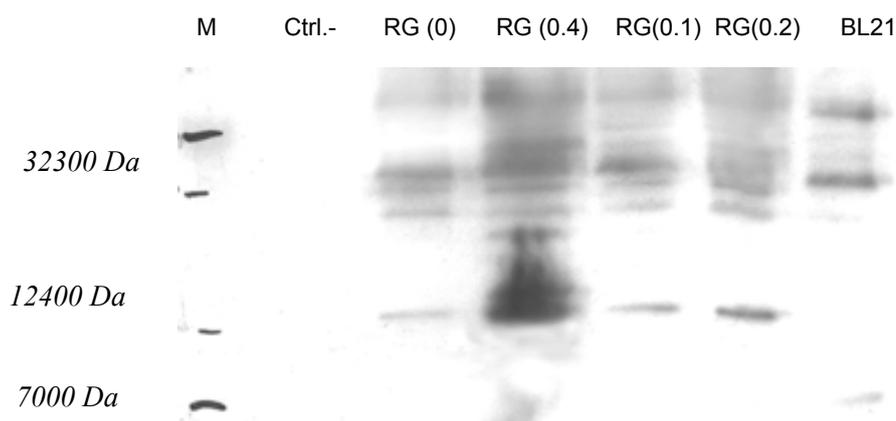


Figura 90. Western Blot de extractos de bacteria *E. coli* Rosetta Gami, carga de 5 ng de proteína para cada carril tras lisis descrita en Materiales y Métodos. RG es Rosetta Gami y entre paréntesis aparece la concentración de IPTG a la cual se ha inducido. BL21 representa la cepa BL21 de *E.coli*. A la izquierda se indica el marcador Mr, donde se han marcado las bandas teñidas en la membrana de PVDF.

A pesar de la baja especificidad del anticuerpo se puede observar la aparición de una banda de bajo peso molecular coincidente con la RNasa 3/ECP wt que aparece sólo en el caso de la correspondiente inducción por IPTG, mostrando asimismo una clara relación inducción/expresión. También se puede establecer que la concentración óptima de IPTG para inducir la expresión de RNasa 3/ECP wt es de 0.4 mM (Fig. 90), tras haber realizado una serie de pruebas previas hasta 1mM de IPTG. Hay que recalcar que la señal del anticuerpo tiene muy baja especificidad, aunque responda bien a los aumentos de inducción. Esto es así porque el anticuerpo primario EG2 es de baja sensibilidad, y es necesario utilizar altas concentraciones de anticuerpo primario para una detección tangible, este aumento de la concentración incrementa la señal de “ruido de fondo” en otras bandas.

### 5.3.2.3 Zimograma para la confirmación de la actividad ribonucleasa.

A pesar de haber identificado positivamente la proteína, cabría la posibilidad de que su plegamiento no fuese correcto y pudiese verse afectada su actividad ribonucleasa. Para descartar esta posibilidad y deducir así que los efectos observados dependen de la expresión de RNasa 3/ECP o sus variantes, se procedió a realizar un test de actividad por gel o zimograma (Fig. 91). Tomando

como referencia el tiempo de inducción de 2 horas, según las indicaciones de Promega para la cepa de *E.coli* se llevan a cabo extracciones tal y como se relaciona en la sección de Materiales y métodos para ejecutar el ensayo de zimograma. Por otra parte, la lisis de las bacterias a causa de las expresiones crecientes de la RNasa 3/ECP inducidas por IPTG, provoca la liberación de la RNasa I de *E. coli* intracelular. Dicha ribonucleasa liberada se detecta como una banda intensa a unos aprox. 30000 Da y aparece por encima de la RNasa 3/ECP.

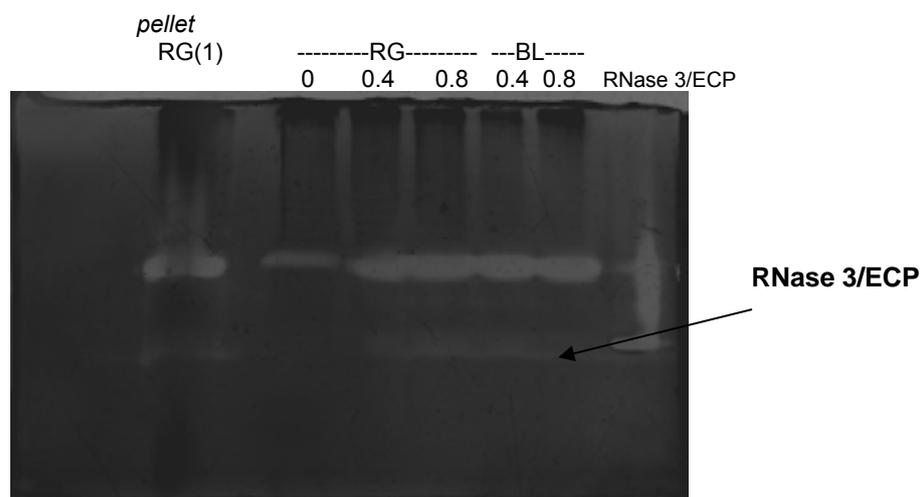


Figura 91. Zimograma de sobrenadantes de cultivos de *E.coli* Rosetta Gami (RG), transformantes para pET11c-ECPwt y de *E.coli* BL21(BL) con la misma transformación, inducidas para la expresión de RNasa 3/ECP con diferentes concentraciones mM de IPTG (abajo). El carril de sedimentación RG se trata de una prueba positiva del sedimento de bacterias lisado, donde se confirma la presencia de RNasa I de *E. coli*. La electroforesis SDS-15%PAGE contenía 0.12 mg/ml de poli(U) y la detección se llevó a cabo tras incubación overnight del gel en solución Tris/HCl 100 mM, pH 7.5.

#### 5.3.2.4 Efectos de las proteínas a nivel endógeno

Una vez asegurada la presencia y la actividad de la RNasa 3/ECP en *E.coli* Rosetta Gami, se procede a comprobar el efecto sobre la densidad óptica a OD<sub>600nm</sub> como primera aproximación a la caracterización de la viabilidad de la bacteria ante la expresión de la proteína. Se cuantificará también el ATP intracelular como evaluación de la viabilidad celular bacteriana.

### 5.3.2.4.1 Densidad de crecimiento del cultivo bacteriano

Se espera que la RNasa 3/ECP expresada reduzca los valores de OD<sub>600nm</sub>, como resultado de la actividad bactericida. Se registró la OD<sub>600nm</sub> a lo largo del tiempo con respecto a la bacteria sin expresión (sin plásmido para la expresión de RNasa 3/ECP). La figura 92 así lo muestra, destacando que se produce mayor efecto con mayor inducción por aumento de la concentración de IPTG. En este caso de expresión endógena en la cepa *Rosetta Gami* el efecto de la proteína sería prácticamente directo dado que lo está ejerciendo desde el primer momento desde el interior de la célula. Otro efecto de interés cualitativo en este tipo de expresión, útil para realizar los tests de cribado con mutantes, es el efecto de la ribonucleasa liberada por la célula que lo produce. Asumimos que por secreción de la RNasa 3/ECP y sus variantes al medio extracelular, podemos tener un efecto a nivel externo en la población de bacterias que será similar a un efecto en condiciones fisiológicas pero diferentes de un efecto únicamente endógeno.

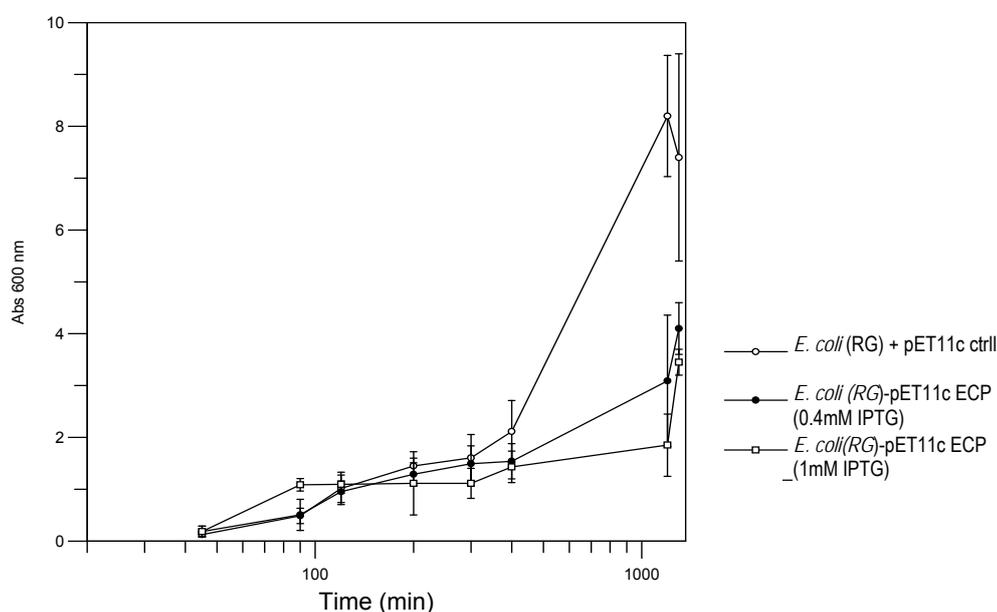


Figura 92. Representación gráfica de OD<sub>600nm</sub> en función del tiempo de la cepa *Rosetta Gami* (RG) de *E. coli.*, transformada con el plásmido pET11c-ECPwt a partir del momento de inducción. Entre paréntesis la concentración en milimolar de IPTG a la que ha sido inducida. La barra de error representa la desviación standard con 3 experimentos independientes.

#### 5.3.2.4.2 Viabilidad celular bacteriana por cuantificación de ATP

Por los ensayos comparativos previamente realizados entre métodos se ha optado por evaluar la viabilidad celular bacteriana por una medida asociada a la viabilidad metabólica, que es el contenido de ATP (Fig. 93).

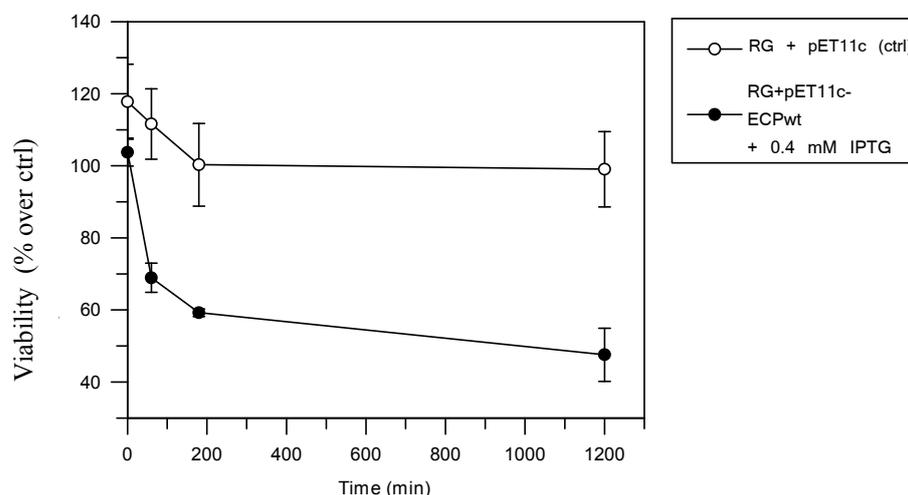


Figura 93. Viabilidad celular por detección de niveles de ATP de la cepa Rosetta Gami (expresada con las abreviaturas RG) tras expresión inducida por IPTG 0.4 mM a diferentes tiempos. Se compara la cepa con el plásmido vacío y con el plásmido conteniendo RNasa 3/ECP wt. Los puntos son las medias de dos experimentos, así como las barras de error son sus desviaciones típicas.

Los efectos son claramente paralelos a lo observado en densidad de crecimiento bacteriano. Por otra parte se demuestra que la viabilidad no se ve afectada por la transformación de la cepa con el plásmido vector sin el gen para la RNasa 3/ECP.

### 5.3.3 Cribado de mutantes de RNasa 3/ECP y variantes de la RNasa 7 a nivel de expresión endógena en la cepa Rosetta Gami de *E. coli*

#### 5.3.3.1 Expresión y actividad antibacteriana de la RNasa 3/ECP y sus mutantes en la cepa Rosetta Gami de *E. coli*.

El método de inducción de la expresión de la RNasa 3/ECP a bajo nivel, nos permite cribar los efectos diferenciales de los mutantes de RNasa 3/ECP. Se procede por lo tanto a estudiar los efectos de varios mutantes de RNasa 3/ECP generados previamente mediante mutagénesis dirigida (Carreras et al, 2003)

juntamente con otros mutantes posteriores generados por E. Carreras y S. Navarro en nuestro laboratorio (resultados no publicados). El método permitirá una comparación cualitativa rápida de la actividad de las distintas variantes. En este apartado de Resultados se ofrecen las gráficas que compilan una serie de experimentos (Figs. 94 a 96), en comparación con los respectivos datos de control interno sin inserto: con controles de *E. coli Rosetta Gami* transformados con pET11c sin inserto:  $2.01 \times 10^9$  cfu's (dilución  $10^6$ ). En la misma representación aparecen los mutantes de centro activo además de los que han sido referidos en el trabajo Carreras y colaboradores (2003). También se muestra el mutante H128N, que afecta a una de las histidinas del centro catalítico pero que no consigue una pérdida total de la actividad RNasa, y el doble mutante H128NH15N que sí conlleva una ablación total de la actividad RNasa. Hemos creído conveniente representarlos en conjunto para comparar la contribución de estos últimos con respecto a los que modifican la superficie de la célula, sugiriendo así que la contribución que pudiera tener la actividad ribonucleasa en el total de la acción bactericida de la RNasa 3/ECP no es despreciable.

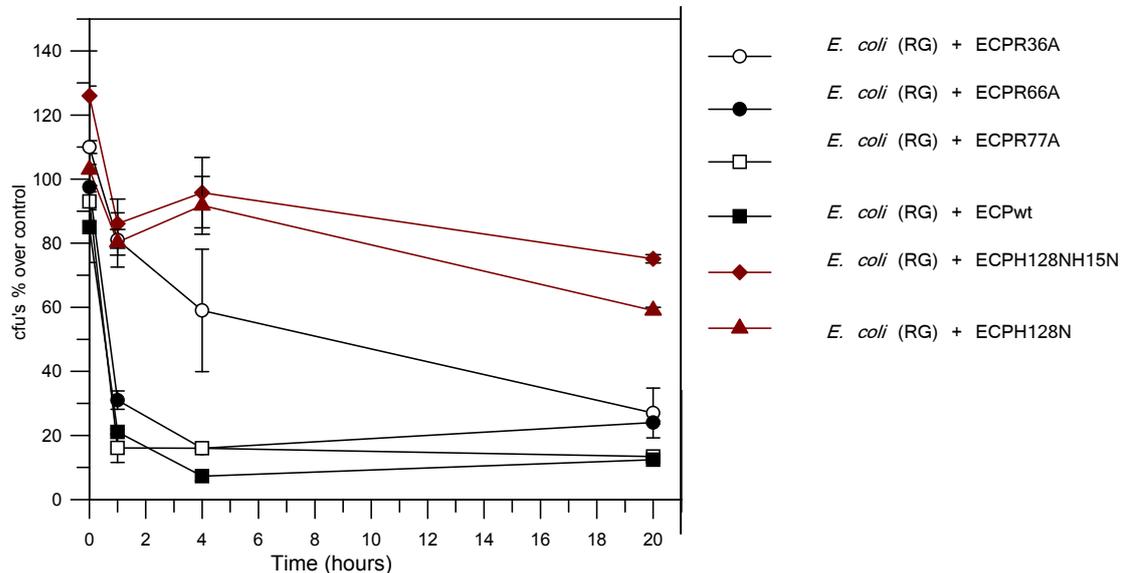


Figura 94. Recuentos de cfu's de diferentes mutantes de RNasa 3/ECP a lo largo del tiempo, corregidos con respecto al control de cada grupo de experimentos. Los puntos son medias de dos experimentos y las barras de error son sus respectivas desviaciones típicas. La incubación tanto de los cultivos líquidos como de las placas sembradas se hizo a 37°C.

Se hicieron experimentos de evaluación de la viabilidad por determinación del ATP (BacTiter Glo) a diferentes tiempos tras la inducción por IPTG de la cepa *Rosetta Gami* transformada con el plásmido pET11c correspondiente a las distintas variantes. Los resultados se han agrupado por tipos de mutantes (Figs. 94-97). Se muestran los resultados para los mutantes de la díada de los residuos 35 y 36 en comparación con la proteína nativa y otros mutantes estudiados: acción de un residuo aromático de superficie (F76A), residuo del centro activo (H128N) y de superficie en la región N-terminal (W35AR36A) de tipo catiónico. Se analiza también el mutante D130N, que presenta una reducción importante de la actividad antibacteriana, junto con una comparativa con un mutante de efecto conocido sobre el carácter catiónico de la proteína (R77A).

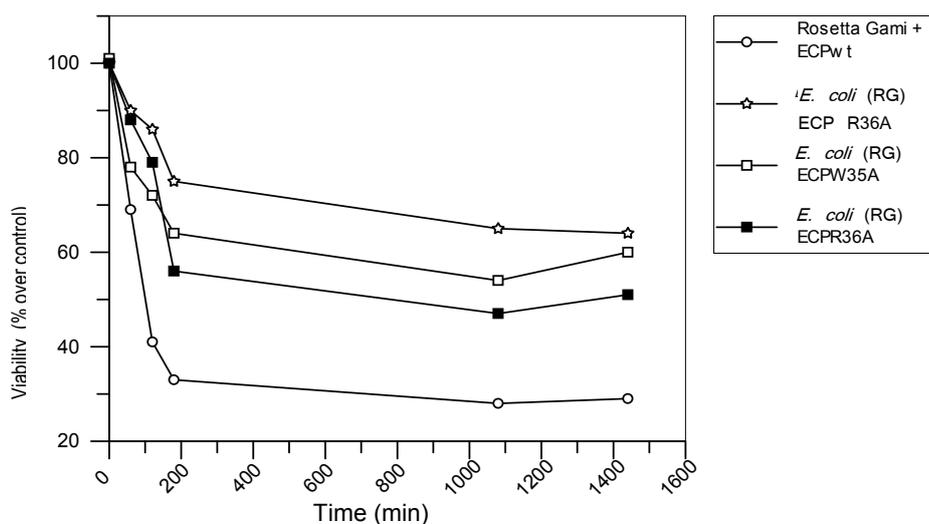


Figura 95. Viabilidad con los mutantes de RNasa 3/ECP W35A, R36A y W35AR36A expresados en *E.coli* Rosetta Gami © (RG). Experimento realizado a 37°C y con inducción de IPTG de 0.4 mM a partir de  $t=0$ , cuando el cultivo llega a 0.6-0.8 de  $OD_{600\text{ nm}}$ . Evaluado mediante detección de ATP (método BacTiter Glo) y corregido respecto al control (*Rosetta Gami* con plásmido vacío).

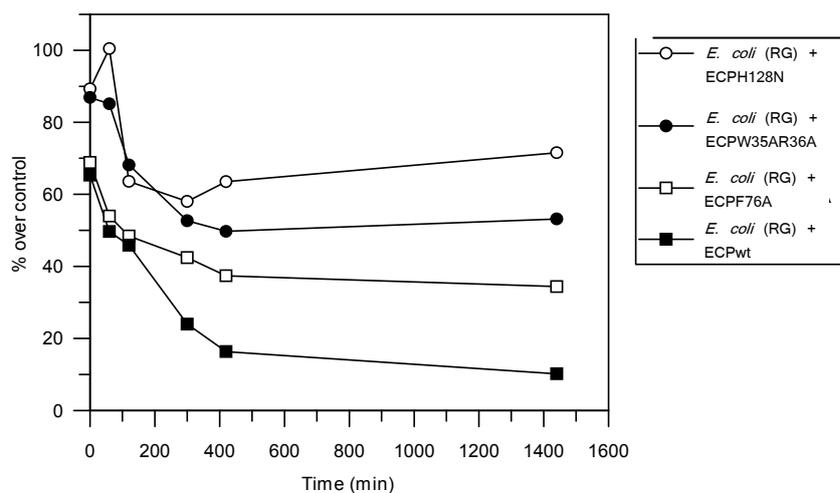


Figura 96. Viabilidad de diferentes mutantes de RNasa 3/ECP: F76A, W35R36A y H128N comparados con RNasa 3/ECP expresados en *E.coli* Rosetta Gami © (RG). Experimento realizado a 37°C y con inducción de IPTG de 0.4 mM a partir de  $t=0$ , cuando el cultivo llega a 0.6-0.8 de  $OD_{600\text{ nm}}$ . Evaluado mediante detección de ATP (método BacTiter Glo) y corregido respecto al control (Rosetta Gami con plásmido vacío).

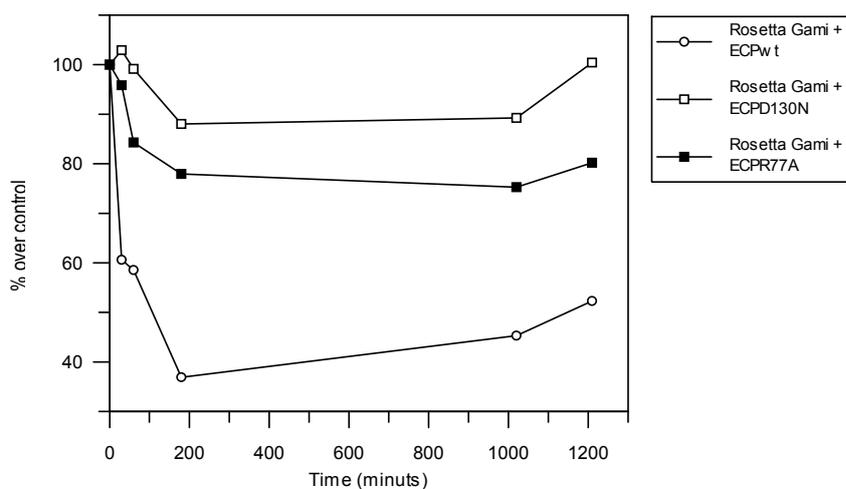


Figura 97. Viabilidad con los mutantes de RNasa 3/ECP R77A y D130N expresados en *E.coli* Rosetta Gami © comparado con la misma cepa expresando ECPwt. Experimento realizado con inducción de IPTG de 0.4 mM a partir de  $t=0$ , cuando el cultivo llega a 0.6-0.8 de  $OD_{600\text{ nm}}$ . Evaluado mediante detección de ATP (método BacTiter Glo) y corregido respecto al control (Rosetta Gami con plásmido vacío).

En la figura 95 se puede apreciar como el mutante combinado W35AR36A es el que presenta una diferencia respecto a RNasa 3/ECP nativa, más importante en la actividad antibacteriana, más que cualquiera de las dos mutaciones por separado, mutantes W35A y R36A, e incluso que su efecto sumado. Por lo tanto, estos residuos podrían tener una cooperación sinérgica en

la actividad bactericida de la RNasa 3/ECP dado que pierden en mayor medida esta propiedad, cuando están mutados a la vez. En la serie de comparación de la figura 96, el mutante F76A es el mutante para residuos de superficie que mayor impacto tiene, dado que su actividad bactericida es la que más se aparta de RNasa 3/ECP nativa. Los resultados refrendan los obtenidos por Carreras y colaboradores (2003) volviendo a asignar la contribución importante de una serie de aminoácidos de superficie. Por último, comentar que los resultados con el D130N son notables en cuanto a su capacidad de aminorar la actividad antibacteriana respecto a ECPwt. Esto puede sostener un hecho experimental preliminar para posterior investigación sobre si es más importante su implicación sobre la estructura, sobre el centro activo o sobre si afecta a otra característica de la RNasa 3/ECP.

Como el sistema de expresión aseguraba teóricamente una ausencia de expresión basal constitutiva, y así lo comprobamos con el crecimiento previo a la inducción, la viabilidad del cultivo desde el momento de la inducción con IPTG nos permite realizar un estudio comparativo. En conclusión, este método ha sido útil como cribado rápido de diferentes mutantes de RNasa 3/ECP dado que permite una expresión reducida e inducible. Se asume que los niveles de expresión pueden haber sido similares a los que se hayan detectado para RNasa 3/ECP nativa, dadas las características de la cepa *Rosetta Gami* en cuanto a la expresión de proteínas recombinantes (ver Apéndice). En cualquier caso, el estudio cualitativo debe confirmarse mediante expresión y purificación de la proteína a mayor escala.

#### 5.3.3.2 Expresión y actividad antibacteriana de la RNasa 7 y sus variantes en la cepa *Rosetta Gami* de *E.coli*

Dada la utilidad en el cribado de actividades antibacterianas de la cepa *Rosetta Gami*, se aplicó a la expresión de RNasa 7 en sus dos variantes y las dos mutaciones intermedias entre la variante A75H93 y la P75Y93, es decir el mutante A75P con respecto a la variante “Rosenberg” y el mutante H93Y con respecto a esa misma variante de partida. Los resultados que se muestran a continuación en la figura 98 muestran diferencias muy leves entre las diferentes

variantes, aunque parece que la A75H93 (variedad “Rosenberg”) pueda ser ligeramente más activa.

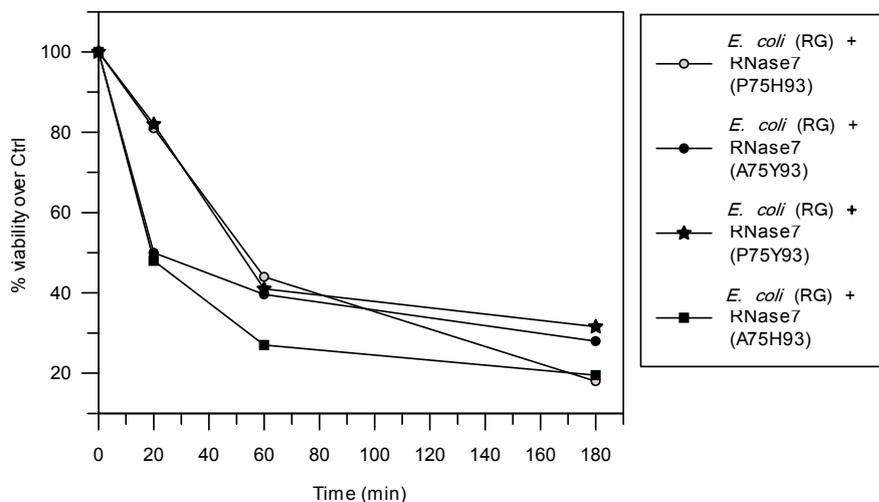


Figura 98. Gráfica de la viabilidad por cuantificación de niveles de ATP intracelular (BacTiter Glo) tras la expresión en Rosetta Gami de la RNasa 7 en sus dos variedades y en los intermedios de mutagénesis dirigida. La inducción se hizo con 0.4 mM de IPTG. El tiempo 0 es el momento de la inducción.

### 5.3.4 Estudios de la degradación del RNA por las Ribonucleasas.

Como ya se ha comentado en la introducción, existen razones para considerar una posible contribución de la actividad catalítica de la RNasa 3/ECP en la actividad antibacteriana:

- a) El hecho de que la actividad ribonucleasa en otras proteínas homólogas sí que se encuentra conservada y directamente relacionada con su acción citotóxica ( por ejemplo, en el caso de la RNasa 2).
- b) La propia conservación evolutiva de la arquitectura del centro catalítico en la RNasa 3/ECP.
- c) La necesidad de confirmar los resultados de las publicaciones previas que descartan la contribución de la función RNasa (Huang et al 2007, Rosenberg et al 1995) en la actividad

antibacteriana (tanto de la RNasa 3/ECP como la 7) que probablemente necesiten un estudio más profundo.

En este apartado se relacionarán los experimentos realizados para la detección, cuantificación y análisis del RNA en función de las diferentes exposiciones a las proteínas expresadas en este trabajo. Estas proteínas comprenderían la RNasa 3/ECP, su mutante para el centro activo RNasa 3/ECP-H128N, y la RNasa 7 en las dos variantes que pretendemos caracterizar (la descrita en queratinocitos, variedad P75Y93 (Harder et al, 2002) y la descrita proveniente de riñón, variedad A75H93 (Zhang et al, 2003). También y a modo de control se expondrían los cultivos bacterianos a la Lisozima (como control negativo de la actividad RNasa y control positivo de la actividad bactericida). Los experimentos se realizarían en cuatro modalidades diferenciadas: incubación de los cultivos bacterianos con las RNasas (actividad exógena), expresión endógena a bajos niveles (mediante inducción por IPTG en la cepa de *E. coli Rosetta Gami*), incubación con RNasas *in vitro* (de RNA previamente extraído o comercial) y además, experimentos *in vitro* en presencia del inhibidor de placenta humana de RNasa.

#### 5.3.4.1 Consideraciones metodológicas:

Se estudió el patrón de degradación de RNA celular bacteriano por las RNasas 3 y 7 y sus variantes, mediante electroforesis microfluídica como ya se comentó en Materiales y Métodos. En este tipo de análisis hay que tener en cuenta que es necesario identificar los distintos tipos de RNA y cuantificar el grado de degradación del RNA. Como ya se ha comentado en Materiales y Métodos, el método de separación y detección depende principalmente del tamaño. Sin embargo, las estructuras secundarias del RNA provocan también cambios en la movilidad dando un tamaño aparente distorsionado, por lo que es necesario un control interno del proceso de extracción de RNA y de la calidad del RNA purificado.

En primer lugar, se observó que la degradación del RNA monocatenario correspondiente al mRNA rinde una serie de productos que presentan señal en la misma zona, coincidiendo también con otros RNA's de pequeño tamaño, por

lo que no es el componente más idóneo para evaluar la degradación total. Pudieron identificarse en cambio unívocamente las fracciones correspondientes a tRNA y rRNA.

La determinación de la relación de calidad del rRNA 23S/16S (para RNA procariota) nos proporcionó un control positivo para cada experimento, facilitando la comparación entre distintas muestras. En la metodología (sección 4.1) se detalla el papel de la relación rRNA 23S/16S como control del proceso de extracción del RNA celular. Hay que añadir que en función del tratamiento del RNA con RNasas, esta relación también presenta variaciones por lo cual debe ser evaluada en el experimento.

Las extracciones de RNA se hicieron partiendo de un cultivo crecido hasta una OD<sub>600nm</sub> de 0.8, valor que se llegó a optimizar tras una puesta a punto con crecimientos en fase exponencial. Por ese motivo, el material de partida puede asumirse como idéntico para todas las extracciones, salvando la diferencia entre especies bacterianas ya considerada. Previamente se pretende establecer el análisis en una situación normal o sin tratamiento alguno, en las que lógicamente la calidad y concentración del RNA analizado debieran ser las óptimas. De esta manera, probamos el método de extracción y el sistema de análisis, estableciendo nuestro máximo de referencia.

Las primeras extracciones de RNA se realizaron utilizando directamente el kit *RNeasy* de Qiagen, sin ningún paso añadido. Este sistema, como se ha comentado en Materiales y Métodos, permite una extracción de mayor cantidad de RNA, pero se ha podido constatar que persiste cierta contaminación proteica. Por ello se optó por el método *Qiazol* basado en extracción fenol-cloroformo. Las extracciones en condiciones basales (sin tratamiento) mediante el reactivo *Qiazol* de Qiagen, se muestran en las tablas 15 y 16. Estos resultados se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento y condiciones que lo indicado por los fabricantes, por lo que podemos comparar los valores óptimos esperados que se indican en los prospectos con nuestros propios resultados, obteniendo así una medida de eficiencia. Por otro lado, la técnica basada en la extracción clásica de ácidos nucleicos por el método del fenol-cloroformo (Sambrook et al., 2001) permite una extracción en la que las proteínas han sido desnaturalizadas irreversiblemente y por lo tanto desde el momento en que se ha comenzado la

obtención del RNA no cabe esperar ninguna actividad RNasa que no pueda evitarse trabajando en condiciones *RNase free*. En las tablas 15 y 16, ya comentadas, se puede observar además una comparativa de eficiencias en la extracción de RNA para establecer la diferencia entre los dos métodos.

Qiazol				RNeasy			
Abs 260	ng/μl	260/280	μg	Abs 260	ng/μl	260/280	μg
0.54	130	1.78	13	1.34	670	1.67	20.8
Rendimiento respecto max esperado*			43%	Rendimiento respecto max esperado			83%

*Tabla 15 Medias comparativas entre las extracciones Qiazol y RNeasy para E. coli BL21. La extracción se realizó de manera estandarizada en 500 μl de cultivo con una OD<sub>600nm</sub> de 0.8. \*El máximo teórico de RNA extraído es de 30 μg, según prospecto del fabricante.*

Qiazol				RNeasy			
Abs 260	ng/μl	260/280	μg	Abs 260	ng/μl	260/280	μg
0.25	100	1.66	4	0.54	280	1.32	11.2
Rendimiento respecto max esperado			13.3%	Rendimiento respecto max esperado			37.3%

*Tabla 16 Medias comparativas entre las extracciones Qiazol y RNeasy para S.aureus. La extracción se realizó de manera estandarizada en 500 μl de cultivo que llega a una OD<sub>600nm</sub> de 0.8. \*El máximo extraído sería también 30 μg. según prospecto del fabricante.*

A pesar de los datos previos y los métodos aceptados, hemos querido evaluar los diferentes parámetros del análisis del RNA por electroforesis microfluídica, a fin y efecto de seleccionar el protocolo óptimo. Por ello en las cinéticas de degradación se compararon varios parámetros para las dos RNAs estudiadas como se puede apreciar en la figura 99. El parámetro escogido fue el pico de señal fluorescente correspondiente a la cantidad de rRNA 23S. Este fue escogido por representar el rRNA más protegido y por lo tanto más indemne a procesos de extracción y de los cuales se tiene una relación fija, por la relación equimolar de 2 que hay con el 16S, que da una idea de la calidad de un RNA intacto. En dicho experimento se incubaron cultivos de *E. coli* BL21 a OD<sub>600nm</sub> a 0.8 (en fase logarítmica final se rinde mejor y mayor cantidad de RNA) con las ribonucleasas a la concentración de 4 μM, luego en el mismo proceso de extracción basado en el método de fenol-cloroformo la reacción quedaba

detenida. Los picos de 23S parecen denotar una diferencia entre actividades ribonucleasa bastante sensibles, por lo que sería el parámetro de elección.

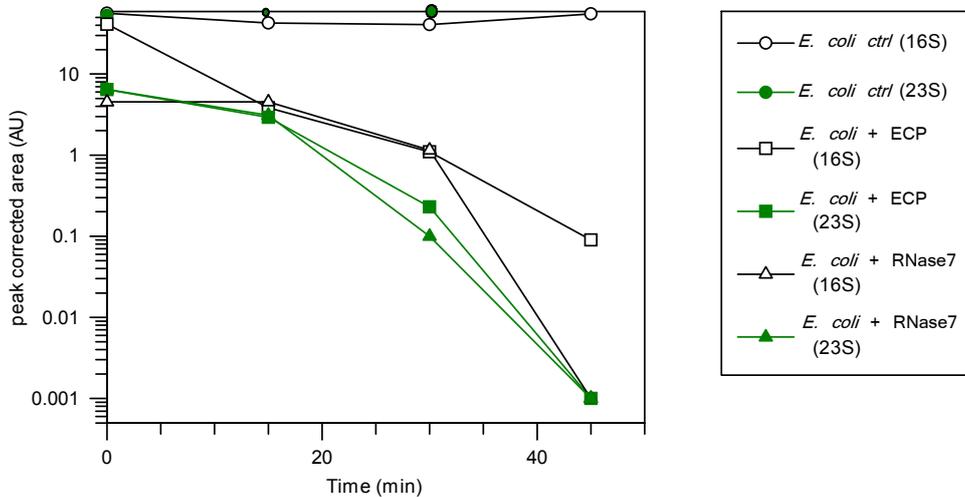
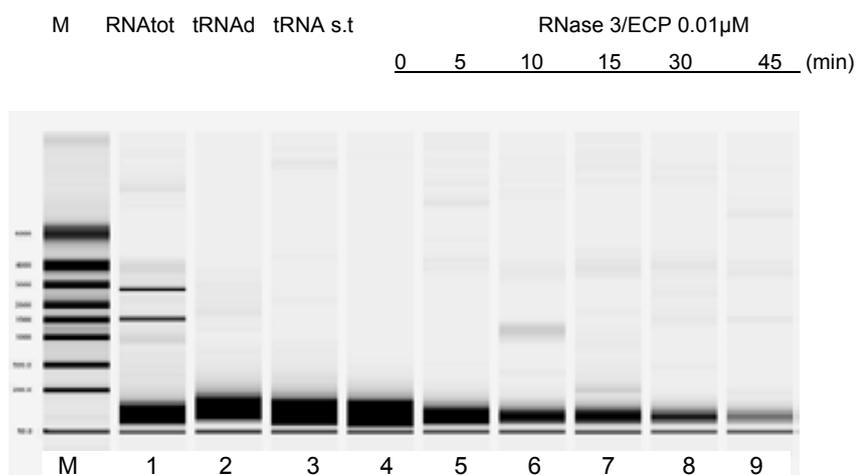


Figura 99. Gráfica de las cinéticas de área de dos diferentes picos en la determinación del RNA en función de su degradación. Picos obtenidos por análisis de electroforesis microfluidica.

Como se extrae de los resultados de la gráfica 99, el parámetro más sensible a la incubación de RNasas (RNasa 3/ECP como modelo), y por tanto a la degradación del RNA, es la cuantificación de la banda de rRNA 23S. La ratio con el rRNA 16S queda distorsionada respecto al valor teórico de 2 en la degradación dependiente de RNasas como es inherente de un RNA degradado enzimáticamente y en sí no puede constituir un parámetro de cantidad. Es posible que exista cierta afinidad diferencial por una subunidad u otra del rRNA y que eso esté dando sensibilidad a la detección de la degradación tal como se nos ha presentado experimentalmente. Por todos estos motivos se toma como valor representativo de la degradación general y cuantitativa del RNA, el descenso de la señal correspondiente al rRNA 23S.

Como se comentó anteriormente, la opción de analizar la fracción de mRNA fue estudiada. Sin embargo, pudimos comprobar que era difícil de cuantificar con la técnica electroforética empleada. Hay que apuntar que tampoco se realizaba una extracción exclusiva del mRNA sino del RNA en general. En cuanto a la detección y cuantificación del tRNA, el gel virtual no puede tampoco aportar información detallada sobre las degradaciones por las RNasas estudiadas, aunque sí permite un análisis cualitativo. Mientras que los gels de

poliacrilamida con urea son capaces de discernir el tRNA específicamente (Saxena et al, 2002) en nuestro método la banda del tRNA queda parcialmente solapada por áreas de RNA's degradados (Fig. 100). Debido a ello, el análisis para el tRNA se restringe al pico de fluorescencia que se observa a los 26 s de la electroforesis. Dicho pico se ha comprobado y calibrado repetidas veces para ese tiempo de elución (distancia de movilidad electroforética) con tRNA's comerciales puros (Fig. 100).



*Figura 100. Gel virtual de la electroforesis microfluidica para muestras de tRNA degradado a diferentes tiempos por la RNasa 3/ECP, además de RNAtot (total), tRNAd (diluido en TE 1/2 y sin tratamiento) tRNAs.t (sin tratamiento, como control negativo). La aparición de bandas de peso molecular más alto, las podemos atribuir a la formación de superestructuras de los digeridos de tRNA, dado que la intensidad del pico específico para un tRNA nativo se encuentra disminuido.*

Péptido ECP(0-38) como control negativo de péptido antimicrobiano sin actividad RNasa.

Se seleccionó el péptido ECP(0-38), producto de la disección del extremo N-terminal de la RNasa 3/ECP con actividad bactericida. Este nos proporcionó un control negativo de la actividad RNasa, pero con actividad antimicrobiana. Se realizó una incubación a una concentración de 10 µM sobre cultivos de *E. coli* a una OD a 600nm de 0.6. Teóricamente el péptido no tiene actividad degradativa sobre el RNA celular. No podemos descartar, sin embargo,

posibles efectos secundarios de su actividad bactericida, que podría entre otros efectos activar las propias RNasas bacterianas. La acción sobre la pared celular bacteriana podría desencadenar algún proceso de muerte celular programada. Se analizó en un periodo y a una concentración equivalente a la que se había previamente valorado la actividad bactericida de las RNasas mediante registro de la densidad de crecimiento de las bacterias. El experimento se realizó por duplicado (Fig. 101). El resultado sugiere que no hay una disminución significativa.

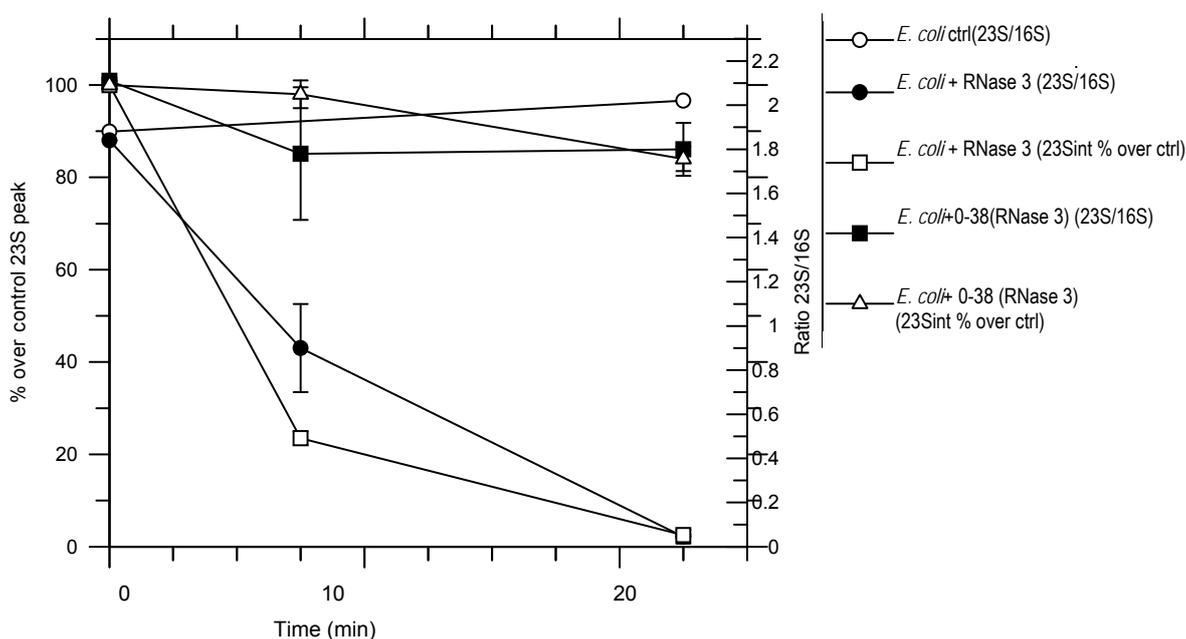


Figura 101. Gráfica comparativa de los parámetros de calidad y cantidad entre la RNasa 3/ECP y el péptido 0-38 de RNasa 3/ECP. Sobre cultivo bacteriano líquido a  $OD_{600nm}$  de 0.7 el péptido se incubó a  $10 \mu M$ , y la RNasa 3/ECP se incubó a  $4 \mu M$ . Se cuantificó tanto la calidad del RNA por ratio 23S/16S como la cantidad (señal del pico del rRNA 23S corregido con respecto a su control). Los valores de cantidad de RNA se referencian al eje Y de la izquierda como porcentaje, mientras que los de la relación 23S/16S están a la derecha como valores absolutos. Los puntos son medias de dos experimentos así como las barras de error la desviación típica.

Más adelante, en el apartado de la discusión se compararán estos resultados de extracción y análisis del RNA con los análisis en paralelo que se hicieron con zimogramas y experimentos de viabilidad. Dichos experimentos se ejecutaron con alícuotas de la misma incubación para la extracción de RNA, pero con otros fines analíticos como la viabilidad celular bacteriana por cuantificación de niveles de ATP.

#### 5.3.4.1.1 Experimentos con el inhibidor proteico de placenta humana de RNAsas.

Se planteó utilizar el inhibidor de placenta humana de RNAsas (RI) como método para inactivar la actividad RNasa de las proteínas de este estudio. Este inhibidor es capaz de inhibir diversas ribonucleasas de la superfamilia de la RNasa A como son las RNasas 1, 2, 3 y 5 (Kobe & Diesenhofer, 1996, Iyer et al, 2005). Recientemente se han publicado datos de la inhibición de la actividad RNasa de la RNasa 7 por el RI (Abtin et al, 2009). En este trabajo, los autores muestran una apreciable inhibición de la actividad RNasa asociada a una disminución de la actividad bactericida. Esto se comentará más en profusión en el apartado de Discusión. Nuestros experimentos con inhibidor placentario confirmaron que podía inhibir también nuestras ribonucleasas en las condiciones de ensayo, (Figs. 102 y 103). Estos ensayos podrían ser de utilidad para establecer un método de inhibición de la degradación de RNA que permitiera parar la reacción de forma rápida. Sin embargo, para conseguir alcanzar una inhibición total de las RNasas 3 y 7 sería necesaria una cantidad muy elevada de inhibidor y por tanto no sería viable para nuestro ensayo.

Dado que para conseguir un buen nivel de inhibición se requieren cantidades elevadas de RI, y considerando la concentración inicial de “stock” de inhibidor, es necesario una adición de una cantidad considerable del tampón en el que está disuelto (llegando a concentraciones finales en el experimento de 2.5 mM de KCl y del 2.5% en el caso del glicerol). Para comprobar en qué medida nos pueden estar afectando estas concentraciones de solutos, se realizaron una serie de experimentos independientes de incubación del RNA con RI. Los resultados se muestran en una gráfica de barras (Fig. 102).

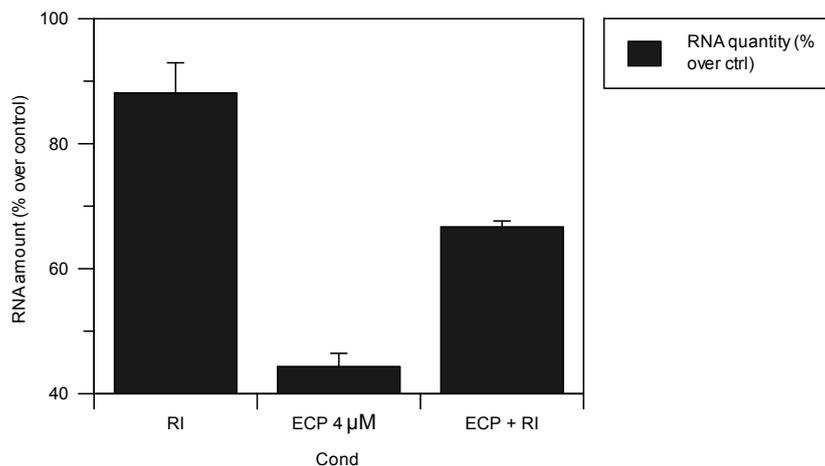


Figura 102. Gráfico de barras de la cantidad de RNA (como porcentaje de la intensidad de 23S respecto al control interno). La RNasa 3/ECP fue incubada a una concentración de 0.01 μM, sobre un RNA total previamente extraído (200 ng/l). La reacción se dio en 15 min, el RI añadido de 60 unidades a una dilución total de 1/20. Los valores son medias de tres experimentos independientes así como las barras de error fueron las desviaciones estándar.

Los resultados de la gráfica nos están mostrando que el inhibidor y el tampón en el que se encuentra disuelto pudieran tener un ligero efecto sobre la estabilidad de RNA, que no parece exceder un 5% de la cantidad del RNA total. Sin embargo su efecto inhibitorio en tratamientos con RNasa 3/ECP paralelos es mucho más potente y harían despreciables los efectos comentados.

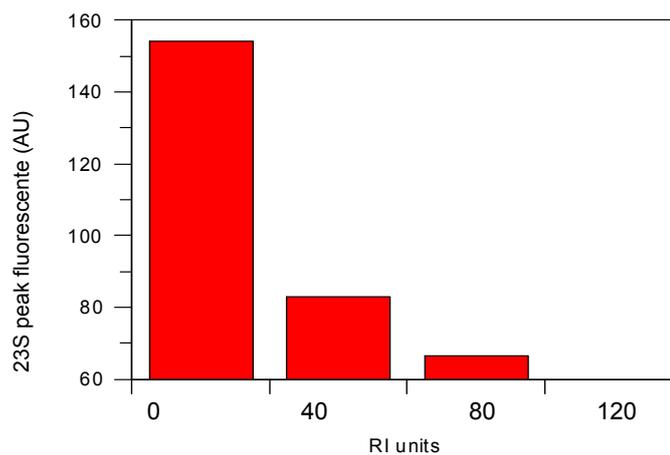
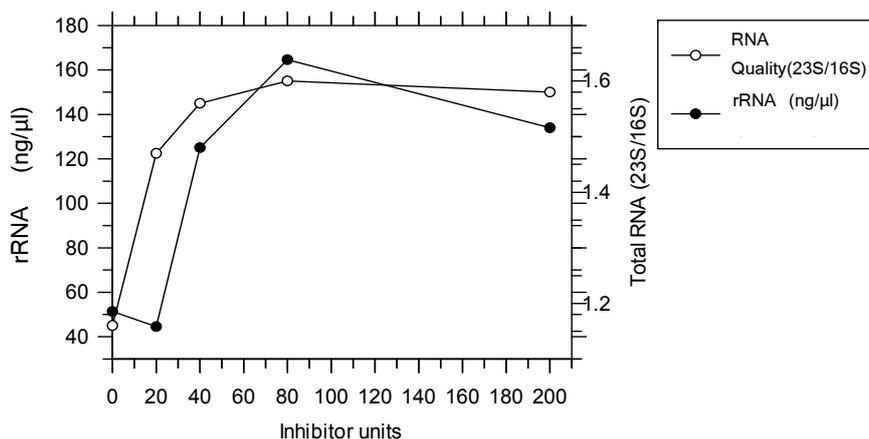


Figura 103. Gráfica de la inhibición de la RNasa 3/ECP por el RI (inhibidor de RNasas de placenta humana). Se representa en eje Y, la fluorescencia del pico del rRNA 23S, para cuatro concentraciones de inhibidor. La RNasa 3/ECP se incubó a 0.01 μM y el volumen final de reacción fue de 50 μl. La concentración de partida de RI comercial era de 40 U/μl, el tiempo de incubación fue de 15 min.

Se valoró el proceso de degradación del rRNA por parte de la RNasa 3/ECP. El experimento que a continuación se muestra se realizó con el rRNA 23S-16S libre de proteínas, suministrado por Roche, incubado con RNasa 3/ECP a la concentración que se ajustó para este tipo de experimentos (0.01  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 104).



*Figura 104. Inhibición de la degradación del rRNA comercial por parte del RI sobre la RNasa 3/ECP, la RNasa 3/ECP se incubó a una concentración final de 0.01  $\mu\text{M}$  de un stock de 1  $\mu\text{M}$  y el volumen final de reacción fue de 50  $\mu\text{l}$ . Las concentraciones de inhibidor utilizadas son los valores representados en el eje de abscisas. El tiempo de incubación fue de 15 min.*

Una de las cuestiones metodológicas que se nos planteaban era si el RI podía inhibir de igual manera la RNasa 3/ECP y la RNasa 7, por lo que se probó el RI con estas dos RNasas, a diferentes cantidades de RI (Fig. 105).

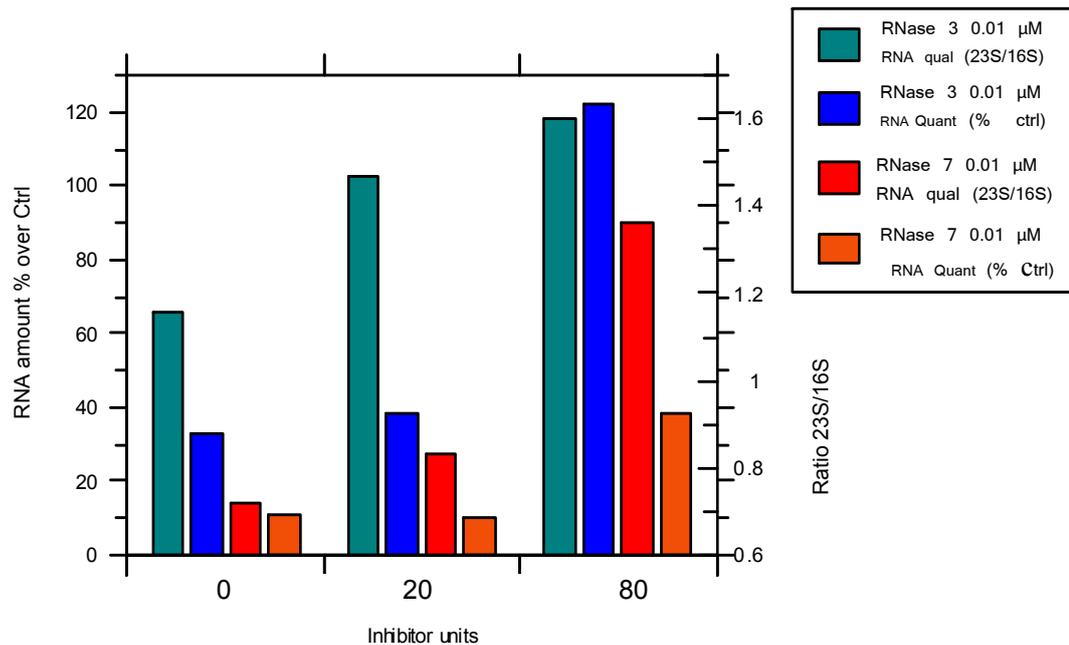


Figura 105. Gráficas de barras, representando la inhibición de la RNasa 7 y la RNasa 3/ECP, a dos cantidades de RI (20 y 80 unidades). Se incubó la RNasa con el RI durante 5 min y luego se añadió RNA total a una concentración de 200 ng/μl con tiempo de incubación de 10 min. Las RNasas se incubaron a 0.01 μM y el volumen final de reacción fue de 50 μl. Se representa tanto la cantidad de RNA (como % respecto control) como la calidad del RNA por la relación 23S/16S.

Con estos resultados se observa que la RNasa 3/ECP es inhibida con mayor facilidad por el RI que la RNasa 7 (Fig. 105 y 106) y cómo la actividad remanente de la RNasa 7 es mayor que la de la RNasa 3/ECP.

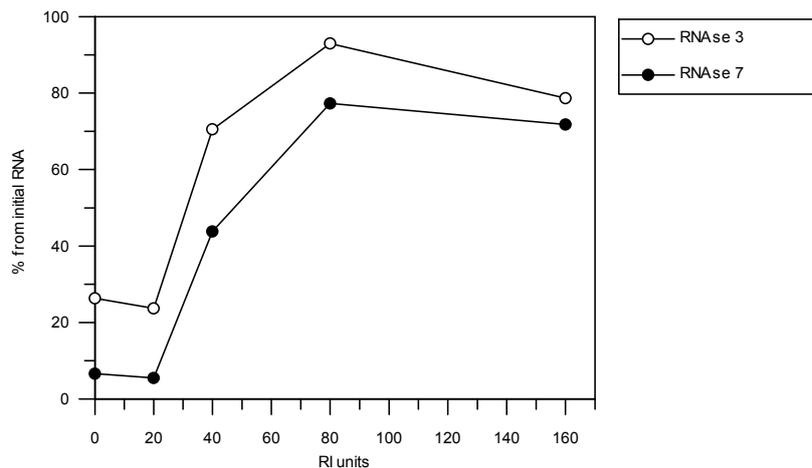


Figura 106. Gráfico de inhibición de RNasas. La reacción se estandarizó como sigue: 0.01μM de RNasa 3/ECP o 7 digirieron 180 ng /μl (cantidad inicial para el cálculo de porcentaje digerido) en un tiempo de 15 min. El inhibidor (RI) se agregó al substrato con una concentración inicial de 40 U, el volumen final de reacción fue de 50 μl.

Los resultados muestran una inhibición superior al 80% de la actividad de la RNasa de la RNasa 3/ECP y de alrededor del 70% para RNasa 7. No obstante, no pudimos alcanzar la inhibición total debido a las limitaciones metodológicas, como era el volumen necesario de adición, previamente comentado.

#### Inhibición de actividad RNasa y viabilidad celular bacteriana

Adicionalmente, se hizo un breve experimento con RI e incubación de RNasa 3/ECP evaluando la viabilidad celular bacteriana. Se pretendía valorar si la presencia del inhibidor modificaba la actividad bactericida de la RNasa 3/ECP. En la gráfica de resultados se puede observar como la presencia del inhibidor reduce la actividad bactericida. Sin embargo, dado el tamaño del inhibidor RI con respecto a la RNasa 3/ECP (Mr 55000 versus 15000 Da) y, teniendo en cuenta el complejo de unión que forman (ver Fig. 32), se podría proponer que la simple interacción entre ambas proteínas esté enmascarando residuos catiónicos críticos de la RNasa para su actividad antibacteriana y por lo tanto, los efectos observados pudieran ser debidos más a esa obstrucción que a la inhibición de la actividad RNasa.

En el experimento realizado se incubaron cultivos bacterianos con RNasa 3/ECP sola a 4  $\mu$ M o con RNasa 3/ECP (misma concentración) + RI, la cantidad de RI fue la optimizada previamente por inhibición de la RNasa (se escogieron 135 unidades que correspondería a un porcentaje de inhibición superior al 80%). Los experimentos se realizaron sobre *E. coli* en crecimiento logarítmico ( $OD_{600nm}$  de 0.8). Se muestran los resultados en la siguiente figura 107.

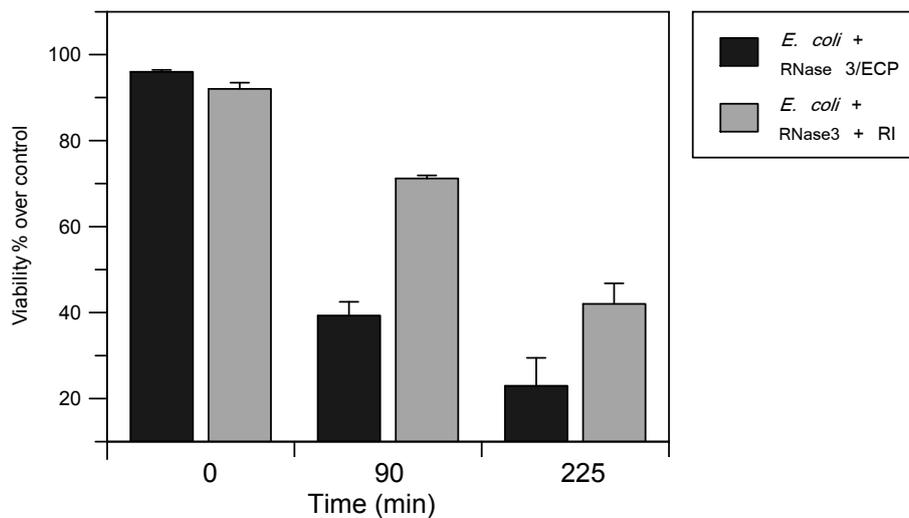


Figura 107. Viabilidad por el método de detección de ATP intracelular, bajo incubación de RNasa 3/ECP y RNasa 3/ECP + Inhibidor de Ribonucleasa. Los cultivos crecieron hasta una  $OD_{600nm}$  de 0.8 y la RNasa 3/ECP se incubó a  $4 \mu M$ . El RI se incubó a 135 unidades en un volumen total de  $40 \mu l$ , de los cuales  $5 \mu l \times 2$  fueron recolectados para el ensayo BacTiter Glo a cada uno de los tiempos indicados en la gráfica. Los puntos son las medias de los duplicados realizados así como las barras de error sus desviaciones típicas.

Estos experimentos han mostrado que existe un comportamiento paralelo entre la inhibición de la actividad RNasa y la misma actividad antibacteriana de la RNasa 3 tal como se ve en la comparativa de tres tiempos con y sin inhibidor, en las que se evalúa la viabilidad bacteriana. Dado el mecanismo de interacción del inhibidor con la RNasa 3/ECP se considera la posibilidad de que RI esté secuestrando a la Ribonucleasa y envolviéndola. Por ello no podemos afirmar que la disminución de la actividad antibacteriana por RI dependa de la inhibición de la actividad RNasa.

#### 5.3.4.2 Estudios del efecto de la adición exógena de la RNasa 3/ECP y la RNasa 7 sobre el RNA intracelular bacteriano

Una aproximación experimental de interés sobre la actividad ribonucleasa de la RNasa3/ ECP o la RNasa 7 es su efecto directo *in vivo* sobre el RNA de las bacterias. En primer lugar se estudió el comportamiento de la RNasa 3/ECP (Fig. 108). Los resultados se compararan con los valores de viabilidad celular bacteriana por medición de los niveles de ATP. Se valorará el

efecto sobre el RNA celular tras una hipotética internalización de las RNasas que se añaden al medio de cultivo bacteriano. Gracias al proceso de desestabilización de la membrana, las RNasas podrían acceder al contenido intracelular. Se plantea también la posibilidad de que las RNasas se internalicen en el citoplasma de la célula bacteriana por formación de aperturas locales que no induzcan la muerte celular.

#### 5.3.4.2.1 Actividad degradativa sobre el RNA celular bacteriano de la RNasa 3/ECP

Al optimizar las condiciones de ensayo se fijó la concentración de trabajo con la RNasa3/ECP a la ya estandarizada de 4  $\mu\text{M}$ , de forma que se pudiese comparar con los análisis de viabilidad previamente realizados. Se pudo observar que, a partir de los 45 min de incubación con la RNasa3/ECP, se produce una degradación prácticamente total del RNA en todos los ensayos realizados (Figs 108 y 109).

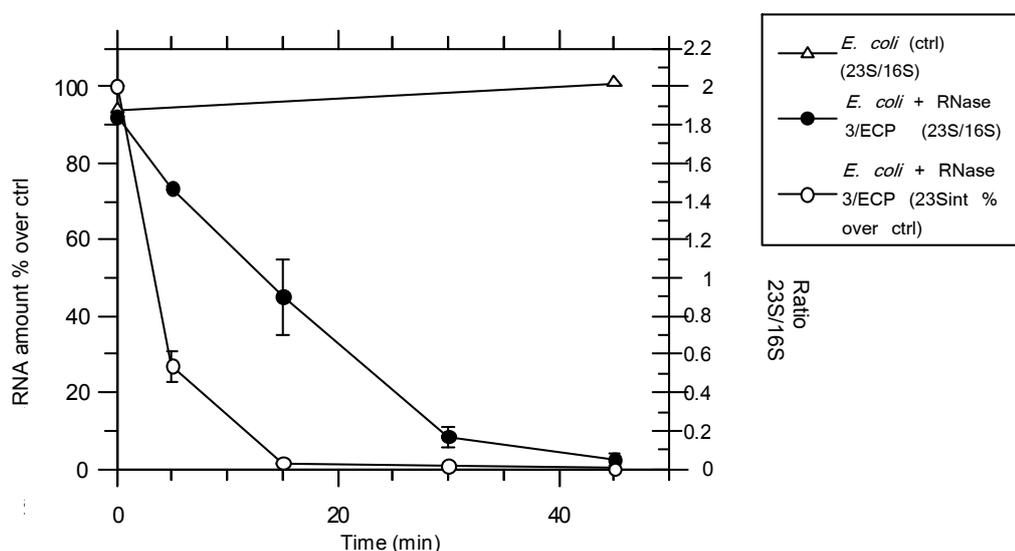


Figura 108. Gráfica de la degradación de RNA celular de *E. coli* en función del tiempo por la RNasa 3/ECP, a 4  $\mu\text{M}$  finales. Las incubaciones se dieron en cultivos en LB crecidos hasta  $OD_{600nm}$  de 0.8, en volúmenes de 125  $\mu\text{l}$  y extracción por el método Qiazol. Los valores de intensidad del pico de 23S, se corrigieron con respecto al control para permitir comparaciones entre experimentos. Se incluyen dos puntos inicio y final para la ratio 23S/16S de cultivos sin tratar para confirmar que no existe un decremento espontáneo.

Tal como se demostró en la gráfica de la figura 99, la intensidad de la banda 23S, por sí sola, es más sensible a la degradación por parte de la RNasa 3/ECP que la banda 16S. En la figura 108 se observa cómo el decremento de la señal 23S es superior a la ratio 23S/16S. La relación 23S/16S de rRNA reflejaría en el control negativo que la extracción se ha hecho correctamente y en la incubación con RNasas que se está produciendo una degradación con cierta especificidad como se ha comentado en “consideraciones metodológicas”.

Los mismos experimentos realizados con *E.coli* fueron ejecutados con la especie *S. aureus*. Se realizaron con la intención de demostrar las mismas hipótesis iniciales con una especie modelo de bacteria Gram-positivo. Debido a las particularidades de la extracción del RNA se realizó en grupos de experimentos independientes de los realizados para *E. coli*.

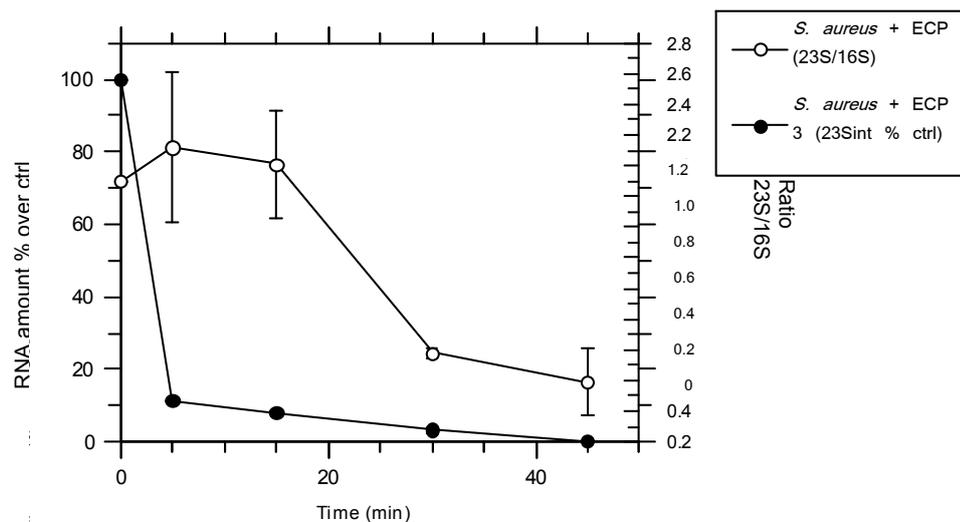


Figura 109. Gráfica de la degradación de RNA por la RNasa 3/ECP sobre *S. aureus*, a  $4 \mu\text{M}$  en función del tiempo. Las incubaciones se dieron en cultivos en LB crecidos hasta  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  de 0.8, volúmenes de  $125 \mu\text{l}$  y extracción por el método Qiazol. Los valores de intensidad del pico de 23S, se corrigieron con respecto al control para permitir comparaciones entre experimentos. Los puntos son medias de tres experimentos así como las barras de error su desviación típica.

En los resultados de la degradación del RNA en el caso de *S. aureus* (Fig. 109) nos encontramos un comportamiento similar con respecto a *E. coli*, en cuanto a la degradación general del rRNA 23S y de la relación 23S/16S. Se

constata, que los tiempos en los que el RNA celular bacteriano empieza a verse afectado, tanto en *E. coli* como en *S. aureus*, son muy tempranos con respecto a los que se evaluaba un efecto de viabilidad celular bacteriana disminuida.

#### 5.3.4.2.2 Efecto comparativo de la RNasa 3/ECP nativa y la variante de la RNasa 3/ECP defectiva en el centro activo (ECP-H128N) sobre el RNA

El mutante RNasa 3/ECP-H128N presenta un gran interés en el estudio de la degradación del RNA por la substitución de uno de los aminoácidos principales del centro activo afectando su capacidad catalítica. Se incubó el mutante a una concentración de 4  $\mu$ M sobre cultivos bacterianos crecidos a OD de 0.8, en las mismas condiciones que los experimentos anteriores. Este mutante es de gran interés porque en función de una capacidad degradativa del RNA mermada, permitiría discernir si sus efectos sobre las bacterias pueden o no depender de la actividad RNasa. La degradación de RNA también pudiera darse de alguna forma inducida por sistemas de respuesta de la propia bacteria, inducidos por el deterioro de la membrana plasmática bacteriana, gracias a la capacidad de desestabilización de la bicapa que aun conserva el mutante RNasa 3/ECP-H128N. Sin embargo, esta hipótesis podría descartarse si consideramos los resultados obtenidos con el péptido antimicrobiano utilizado como control. Los experimentos se realizaron comparando con resultados de RNasa 3/ECP nativa y se midieron para cada tiempo de incubación (Fig. 110 a y b). Es necesario, tener en cuenta que el mutante conserva una actividad catalítica residual, que como se ha detallado previamente no supera al 25% respecto a la proteína nativa.

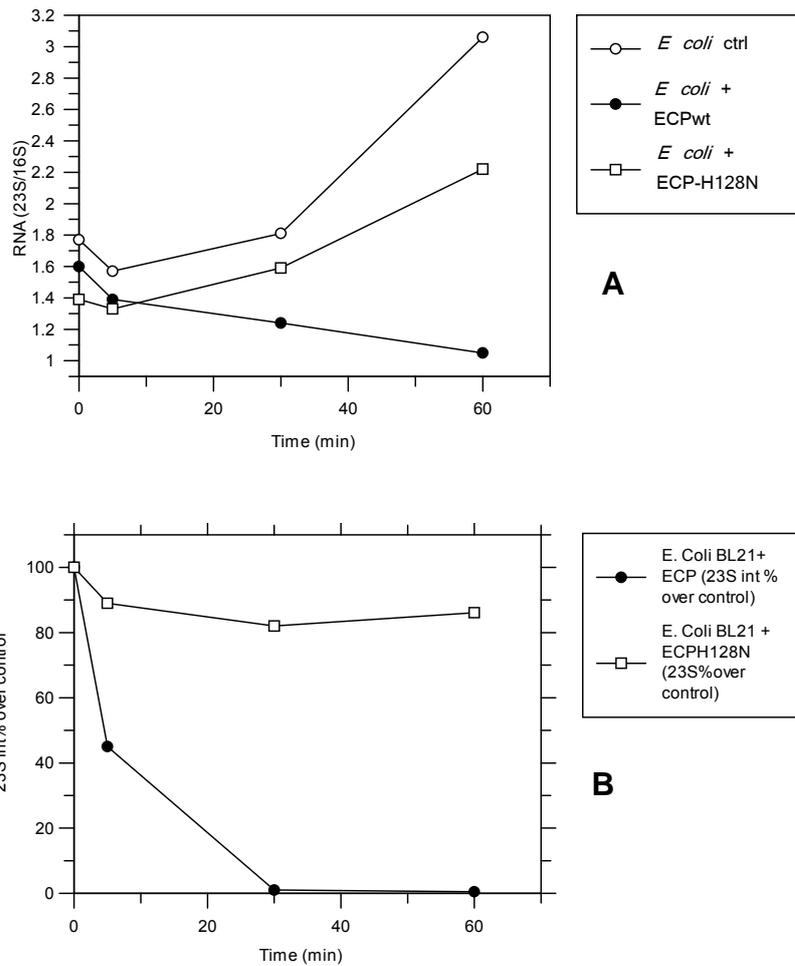


Figura 110 a y b Gráficas comparativas entre RNasa 3/ECP y RNasa 3/ECP-H128N de la degradación de RNA tras incubación sobre los cultivos a la concentración de 4  $\mu\text{M}$ . Los cultivos crecidos a una  $OD_{600\text{ nm}}$  de 0.7, se sometieron a la incubación los tiempos de la cinética y seguidamente se extrajo y analizó el RNA. En la gráfica A consta los valores de rRNA (23S/16S) y en B de cantidad total de rRNA 23S.

Se confirma que la actividad RNasa de RNasa 3/ECP-H128N está en efecto mermada respecto a la observada en la ECPwt, y que en los procesos de incubación y extracción de RNA no parece que hubiera degradación por parte de las RNasas bacterianas, ya que con el control y la RNasa 3/ECP-H128N se da una buena conservación de la cantidad de RNA y de la relación 23S/16S.

### 5.3.4.2.3 Actividad degradativa de la RNasa 7 sobre el RNA celular bacteriano

Los experimentos para describir la actividad degradativa de la RNasa 7 sobre el RNA a nivel exógeno (adición de la proteína en cultivos bacterianos), fueron replicas de los experimentos de RNasa 3/ECP. Es esperable que para los mismos tiempos, se encuentre una degradación mayor, debido a que la actividad ribonucleasa de la RNasa 7 es mayor que la de la RNasa 3/ECP (Harder et al, 2002). En todos los experimentos se utilizó la variedad P75Y93, de la referencia Harder y colaboradores (2002).

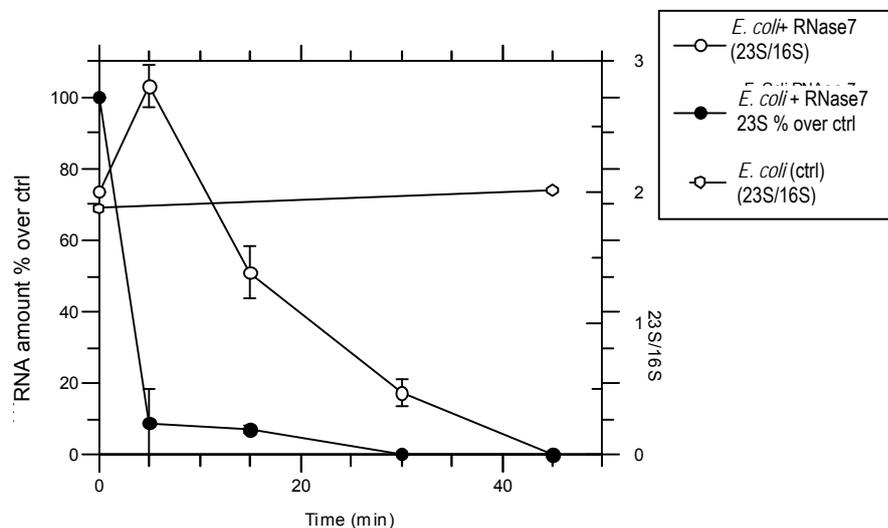


Figura 111. Efectos de la incubación con RNasa 7 (variedad P75Y93 “Harder”) sobre cultivos de *E.coli* BL21 a 4  $\mu$ M, sobre el RNA total. Medidas de cantidad (intensidad del pico 23S con corrección respecto al control) y de calidad (ratio 23S/16S). Los puntos y las barras de error son media y desviación típica de 2 experimentos, respectivamente.

Los experimentos contaron con la fiabilidad de la ratio 23S/16S en el control negativo siempre en torno a 2, mientras que con la degradación de RNasa 7 la relación decae en función del tiempo de incubación.

### 5.3.4.3 Experimentos comparativos mediante expresión endógena de las RNasa 3/ECP y RNasa 7

Los experimentos con expresión endógena se realizaron con la cepa comercial de *E. coli Rosetta Gami*®. Se realizó un proceso de extracción de RNA equivalente al descrito anteriormente para la cepa BL21, sin variaciones apreciables entre ambas cepas. Los experimentos de expresión fueron los mismos que se realizaban con inducción de la expresión mínima para el cribado de mutantes de RNasa 3/ECP, es decir, se indujeron a 0.4 mM de IPTG. No obstante, dados los resultados preliminares de degradación a tiempos cortos con incubación, decidimos estudiar el proceso en periodos que no superasen una hora después de la inducción de la expresión, ya que nos interesaba evaluar los efectos inmediatos de la proteína expresada sobre el RNA de la bacteria.

#### 5.3.4.3.1. Comparación de la RNasa 3/ECP y la variante H128N

Se comparó inicialmente la ECP/RNasa 3 nativa y el mutante de centro activo (RNasa 3/ECP-H128N), (Figs. 112 y 113). Paralelamente se hicieron inducciones en cultivos no transformados con el plásmido correspondiente a la proteína a expresar, como control negativo.

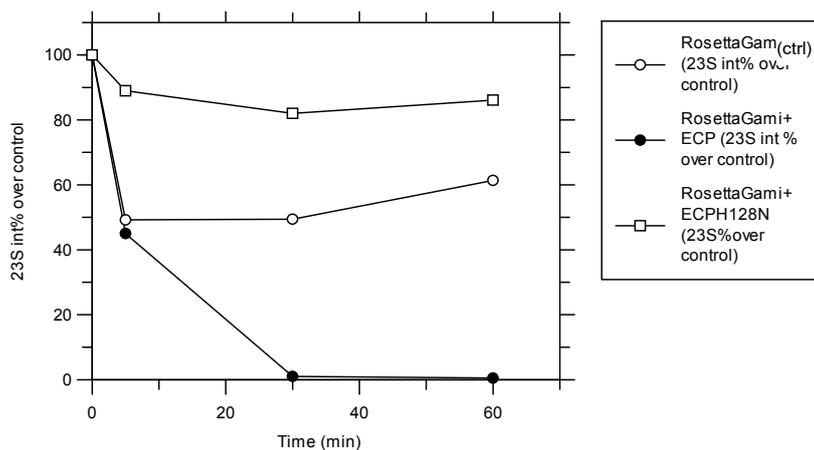


Figura 112 Grafica de la extracción de RNA a diferentes tiempos tras la inducción de RNasa 3/ECP, e inducción de control negativo con 0.4 mM de IPTG, el cultivo se llevó a OD<sub>600nm</sub> de 0.8 para su inducción. El volumen de cultivo fue de 250 µl y se extrajo el RNA mediante el método de fenol-cloroformo Qiazol®. Medidas de cantidad (intensidad del pico 23S con corrección respecto al control).

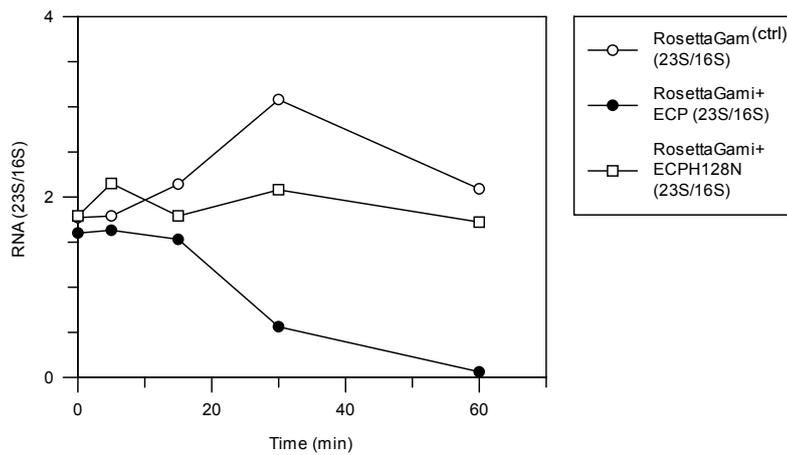


Figura 113. Grafica de la extracción a diferentes tiempos de RNA tras la inducción de RNasa 3/ECP-H128N e inducción de control negativo con 0.4 mM de IPTG, el cultivo se llevó a  $OD_{600nm}$  de 0.8 para su inducción. El volumen de cultivo fue de 250  $\mu$ l y se extrajo el RNA mediante el método de fenol-cloroformo Qiazol®. Medidas de calidad del rRNA (ratio 23S/16S).

Se confirma que en el estudio estamos visualizando la actividad de las proteínas expresadas sobre el RNA interno. Asimismo, se confirma la baja actividad del mutante RNasa 3/ECP-H128N sobre el RNA.

#### 5.3.4.3.2. Estudio de la RNasa 7 y sus variantes

Respecto a las dos RNasas 7, la generada por mutagénesis dirigida variedad P75Y93 (Harder et al 2002) y la adquirida desde el plásmido pFTCS transferida al pET11c, variedad A75H93 (Zhang et al, 2003) se hicieron dos cinéticas para poder evaluar posibles diferencias en la degradación de RNA cuando se expresa a nivel intracelular. En la figura 114 se representa una gráfica en la que no se observan grandes diferencias. Al mismo tiempo se acompaña un gel virtual a partir del electroferograma de los mismos experimentos (Fig. 115).

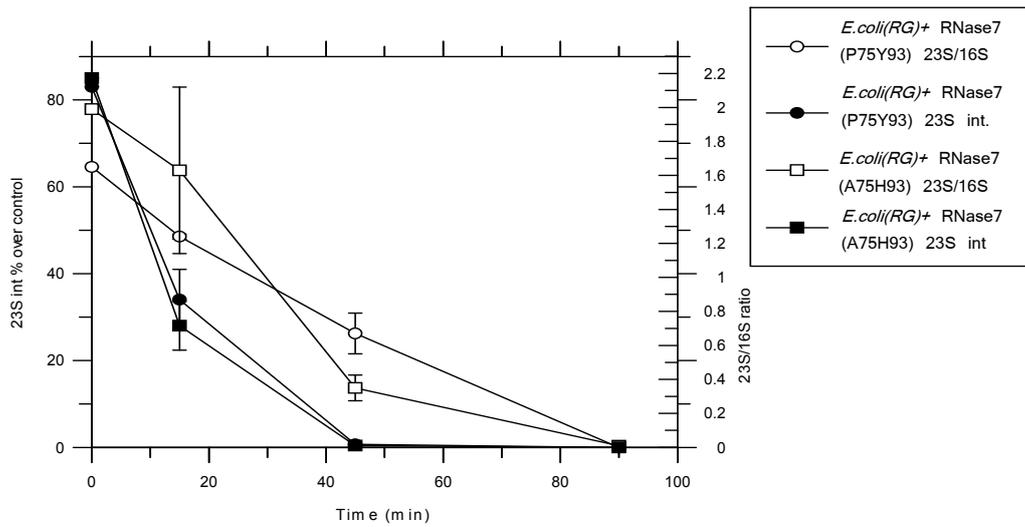


Figura 114. Gráfica de degradación de RNA tras expresión por inducción por IPTG 0.4 mM en *E. coli* Rosetta Gami. Evaluación de magnitudes de cantidad y calidad de RNA. El cultivo se indujo a  $OD_{600nm}$  de 0.8 y la extracción de RNA siguió el método Qiazol. Los puntos son media de dos experimentos y barra de error su desviación típica.

Se concluye que para ambas RNasas no existen diferencias de actividad significativas a tiempo final. Sin embargo, se observa una mayor degradación del rRNA total a tiempos cortos en la variedad de queratinocitos (variedad P75Y93 descrita por Harder y colaboradores, 2002) (Fig. 115). A nivel comparativo y visual se presentan los RNA's totales extraídos tras inducir la expresión de las RNasas 7 en *E. coli* Rosetta Gami.

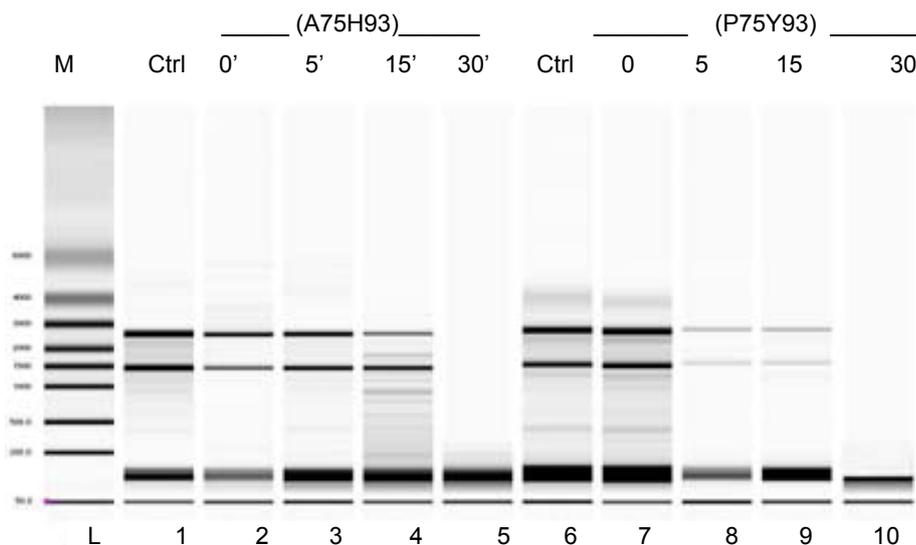


Figura 115. Gráfica de gel virtual a partir del electroferograma comparativo de las RNasas 7 Carril 1: Control positivo Rosetta Gami sin inducción. Carriles 2 a 5 : degradación por la RNasa 7 (A75H93) (inducido por IPTG 0.4 mM) a 0, 5, 15 y 30 min Carril, 6 Control positivo Rosetta Gami sin inducción con 7 a 10 idem para la RNasa 7 (P75Y93) (0, 5, 15 y 30 min).

Estos resultados confirman que las variantes de la RNasa 7 tienen una actividad similar entre ellas, con una ligera actividad superior para la variedad P75Y93, y superior ambas a la RNasa 3/ECP.

#### 5.3.4.4 Experimentos con preparaciones de RNA

En esta sección de la experimentación con RNA comparamos la susceptibilidad de los distintos RNA's, tanto los obtenidos por extracción de RNA celular como los de origen comercial. Por este motivo analizaremos en primer lugar la degradación del tRNA comercial (comparando el de *E.coli* con el de *S. cerevisiae*, ver Apéndice-sección Reactivos) y a continuación el rRNA.

Para describir la susceptibilidad del RNA a la degradación por parte de la RNasa 3/ECP y la RNasa 7, previamente se estudiaron los efectos de distintos rangos de concentración de cada ribonucleasa. Esto es de importancia crítica para la degradación de RNA's extraídos o RNA's puros de origen comercial. También debe establecerse una concentración óptima de degradación para las RNasas sobre RNAs comerciales, libres de proteínas y otras moléculas. Por otra parte, determinar el rango óptimo nos puede suponer saber si dicho rango, está por debajo de la concentración de rutina en los experimentos de viabilidad. Como ya se ha descrito anteriormente, se evalúa el tRNA a partir de su pico de elución en la electroforesis microfluídica, que aparece a los 26 s (Fig. 116).

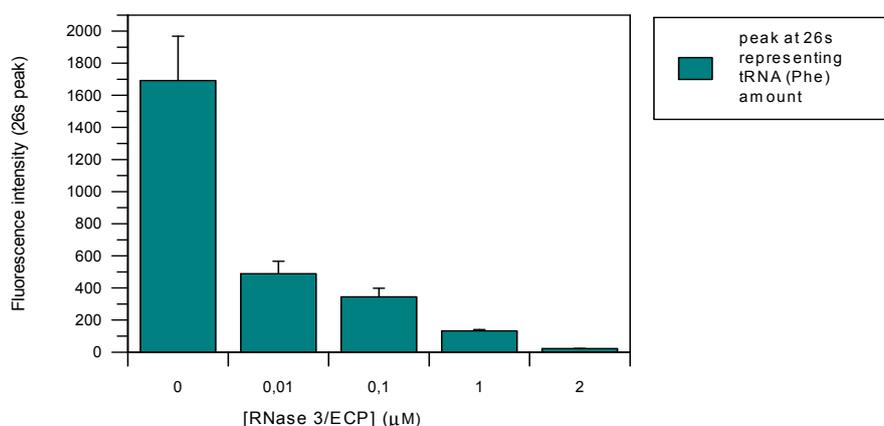


Figura 116. Digestión de tRNA (Phe) de *E. coli* de origen comercial, con un rango de concentraciones de RNasa 3/ECP. La digestión se llevó a cabo a 37°C en Tris/HCl pH 7.5 10 mM (RNase free). El RNA de partida estaba a 250 μg/ml y la digestión se realizó en un tiempo de 20 min.

Para validar nuestros resultados con respecto a previos resultados del laboratorio y a los referenciados en la literatura fue necesario probar que la degradación del tRNA de levadura que es en numerosos casos el que se utiliza como sustrato de las RNasas (ver Apéndice –Reactivos) fuese equivalente al de *E. coli* utilizado en nuestro caso. Aunque teóricamente no debería esperarse una diferencia realmente significativa, se comparó la capacidad de degradación de la RNasa 3/ECP para ambos tRNA's (Fig. 117), con resultados comparables.

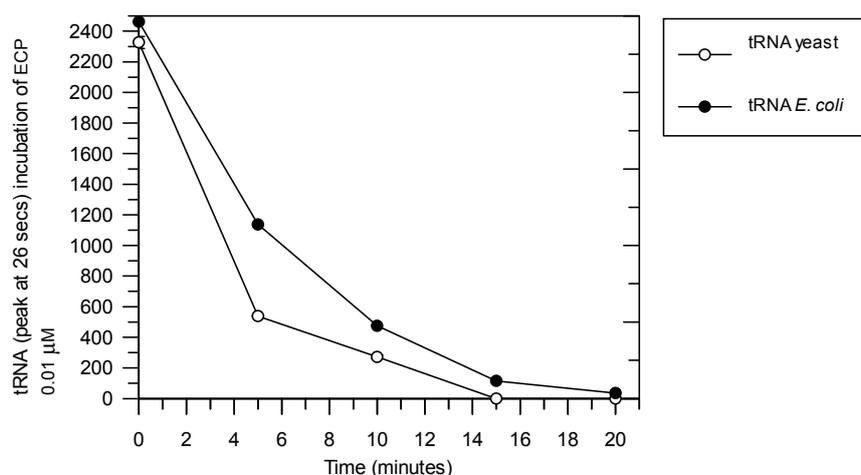


Figura 117. Gráfica de la degradación en función del tiempo del tRNA de levadura y de *E. coli* de origen comercial, por la RNasa 3/ECP. La concentración de la RNasa 3/ECP fue de 0.01 μM y los volúmenes de trabajo se describen en materiales y métodos. Se compara el decremento en medición fluorimétrica del pico correspondiente al tRNA con el porcentaje de descenso respecto al control.

#### 5.3.4.4.1 Determinación de rangos de concentración de trabajo y cinéticas comparativas para la RNasa 3/ECP

La concentración de proteína utilizada para las incubaciones sobre cultivos bacterianos de 4 μM es excesiva para la utilización con las preparaciones de RNA de bacteria extraído o RNA comercial, debido a que estas moléculas de RNA se encuentran libre de cualquier protección (asociaciones a proteínas, membranas, estructuras celulares). En consecuencia, la concentración de RNasa debió de ser optimizada. Tras una serie de experimentos, se ajustó la concentración a 0.01 μM, concentración en la que cualquier RNA podría ser degradado a lo largo de un tiempo suficientemente apreciable como para distinguir una cinética, si bien algunos RNAs podrían presentar una degradación

gradual con concentraciones mayores de RNasa 3/ECP (caso del tRNA con una concentración de RNasa 3/ECP de 0.025  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 118). El RNA total venía de una extracción previamente preparada. Su concentración era de 922 ng/ $\mu\text{l}$  y su ratio de calidad 260/280 (ver Materiales y Métodos, sección de Biología Molecular) de alrededor de 1.78, era óptima para su uso.

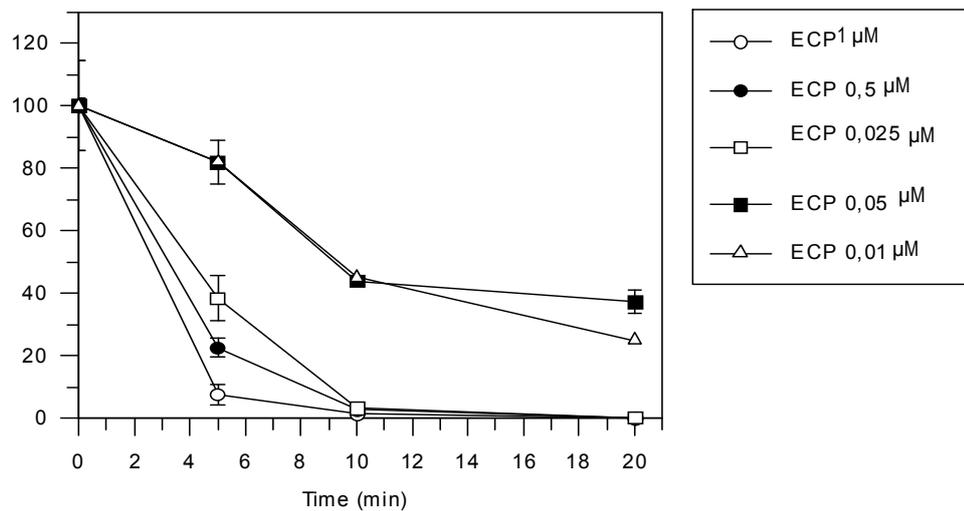


Figura 118 Gráfica de la degradación de tRNA por la RNasa 3/ECP a diferentes concentraciones, la barra de error es de la desviación de dos experimentos así como los puntos son sus medias. Las RNasas se testaron sobre el RNA en una solución 10 mM Tris pH 7.5. La magnitud de degradación del tRNA viene indicada por porcentaje respecto al control.

Cuando se ha procedido a trazar cinéticas de degradación para el rRNA hemos encontrado un problema metodológico: este rRNA de origen comercial, debido probablemente a la alta concentración de sales en la que se suministra o probablemente a la formación de estructuras supersecundarias, no dio buenos resultados de visualización en electroforesis microfluídica. Una electroforesis en gel de agarosa *RNase free*, parecía dar solidez a la posibilidad de la formación de estructuras supersecundarias (Fig. 119). Se realizó otra prueba, en la que se filtró el rRNA de sus sales, mediante filtros de exclusión molecular de 3000 Da Microcon© e incluso se cambió el disolvente de agua a TE. Sin embargo, el resultado fue el mismo (Fig. 120).

Sin embargo, los valores de concentración de dicho RNA comercial (coincidentes con la concentración indicada por el fabricante) y de calidad son los esperados (oscilando la relación 260/280 nm siempre entre 1.8 y 1.9), a pesar

de la movilidad electroforética anómala tanto en geles de agarosa como en electroforesis microfluídica (Figs. 119-121). Al mismo tiempo, el nivel de degradación por las RNasas es repetitivo. Por estos motivos, obviando el extraño comportamiento electroforético, tomamos los valores numéricos de cantidad de este rRNA para todos los análisis. Con estos experimentos se descartó que la utilización de agua RNasa free en vez de TE pudiese representar una distorsión de los resultados.

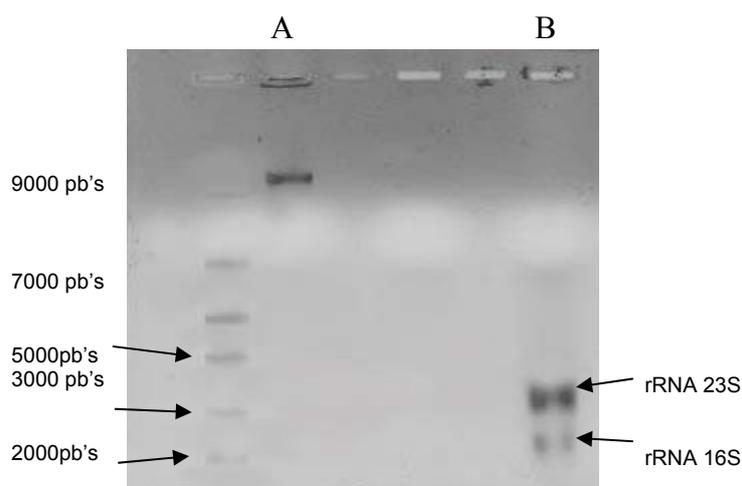


Figura 119. Gel de agarosa RNase free al 1% con 0.1% de formaldehído. El carril A presenta el RNA ribosómico comercial a 2 µg y el carril B es una preparación de RNA total. Se puede observar que la preparación de RNA comercial no se ubica en las bandas 23 S y 16 S, pero tampoco se puede percibir ningún tipo de degradación.

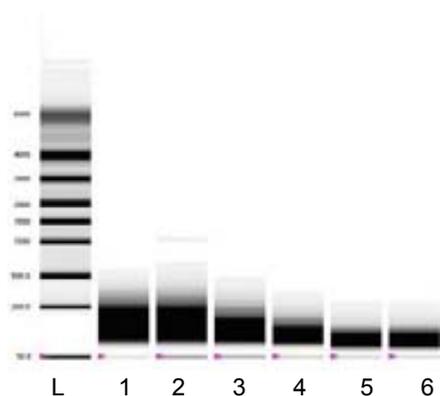


Figura 120. Electroforesis microfluídica del rRNA disuelto en TE o en H<sub>2</sub>O. Carriles: 1(rRNA en H<sub>2</sub>O), 2(rRNA en TE), 3 (rRNA digerido por RNasa 3/ECP en 2' sin TE), 4 (rRNA digerido por RNasa 3/ECP en 15' sin TE), 5 (rRNA digerido por RNasa 3/ECP en 2' con TE), 6 (rRNA digerido por RNasa 3/ECP en 15' con TE).

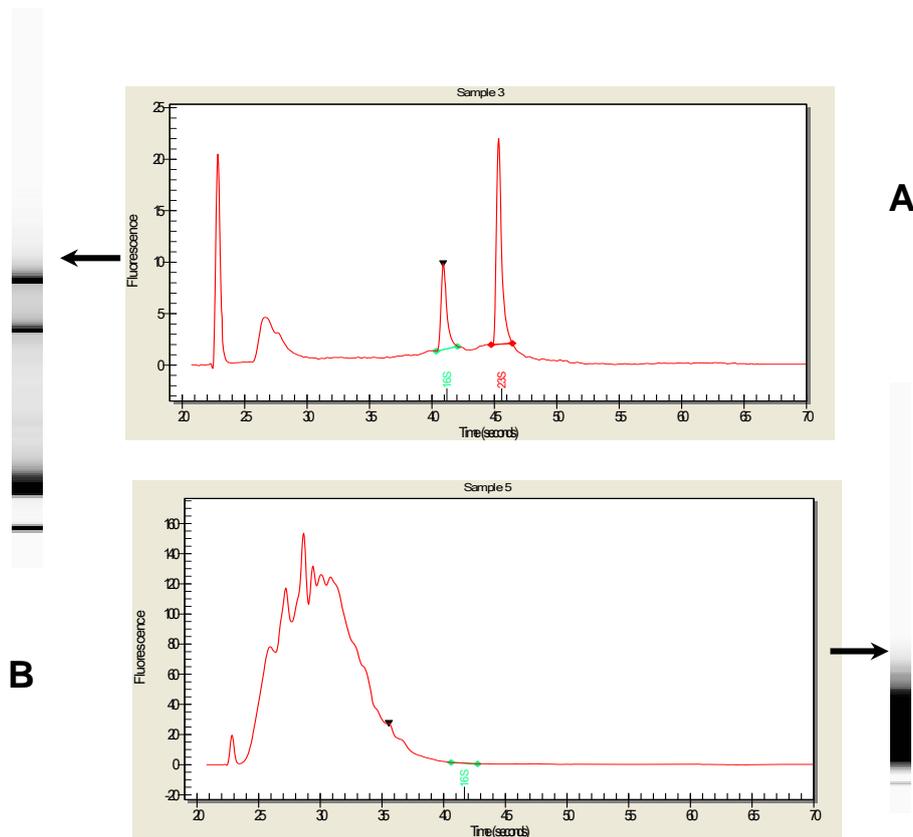


Figura 121. Electroferogramas comparativos a partir de un RNA extraído de *E.coli* (A) sin ningún tratamiento (relación 23S/16S = 1.68, ratio260/280= 1.80) y (B) de una dilución de rRNA de origen comercial (relación 23S/16S = 0.7 valor distorsionado que el software calcula de manera automática, ratio260/280= 1.9).

El comportamiento de este rRNA comercial ante la incubación con RNAsas siempre ha sido claramente diferenciado en cuanto a señal de fluorescencia y distribución con respecto al no tratado con RNAsas, por lo que se han podido trazar cinéticas coherentes desde un punto de vista cuantitativo (Fig. 122).

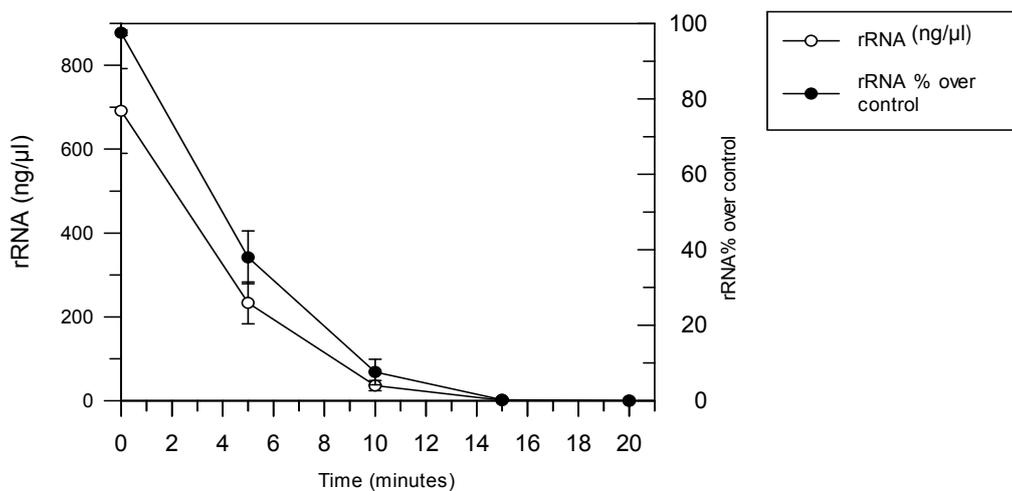


Figura 122. Grafica de la degradación en función del tiempo del rRNA de *E.coli* de origen comercial, por la RNasa 3/ECP. La concentración de la RNasa 3/ECP fue de  $0.01 \mu\text{M}$  y los volúmenes de trabajo se describen en materiales y métodos. Se compara el decremento de la cantidad total en medición fluorimétrica con el porcentaje de descenso respecto al control.

#### 5.3.4.4.2 Comparativa entre la RNasa 3/ECP y la RNasa 7 en su actividad degradativa sobre el RNA

Para comparar la eficiencia degradativa entre la RNasa 7 y la RNasa 3/ECP, se preparó el mismo tipo de experimento cinético con una muestra de RNA total celular. Se tomó siempre como referencia la variante P75Y93 (Harder et al. 2002). Los experimentos permitirán por primera vez hacer una estimación de la preferencia de las dos RNasas por alguna población de RNA. En la figura 123 se muestra el correspondiente gel virtual de la electroforesis microfluídica.

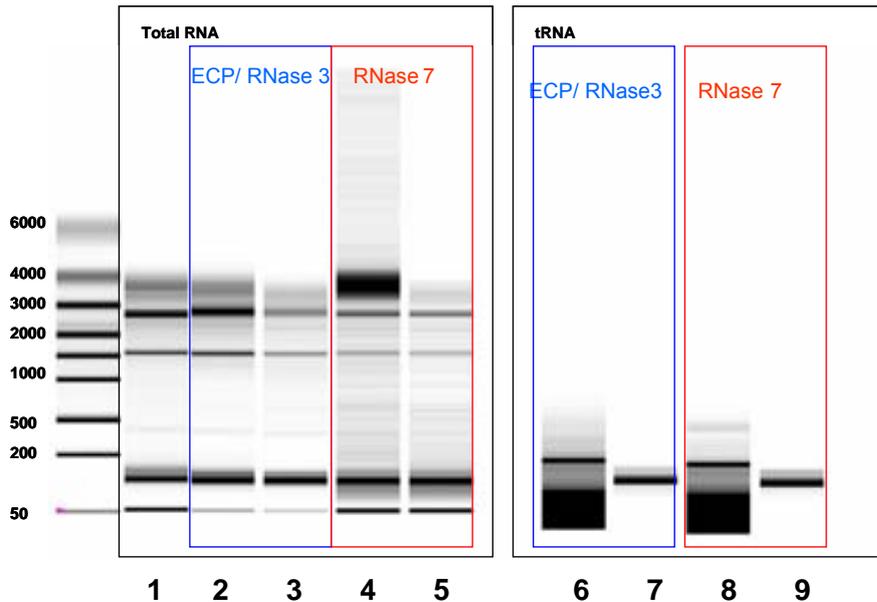


Figura 123. Gel virtual comparativo para las actividades de RNasa 3/ECP y RNasa 7 añadidas a los cultivos bacterianos a la concentración de 4  $\mu$ M. Carriles: 1: muestra de RNA no tratada, del carril 2 al 5 la RNasa 3/ECP es incubada a 2: t=0', 3: a t=10', la RNasa 7 es incubada a 4: t=0', 5: a t=10'. En carriles 6 y 7 grupo de experimentos con RNasa 3 y tRNA: 6 t=0', 7: t=10'. En carriles 8 y 9 grupo de experimentos con RNasa 7 y tRNA: 8 t=0', 9: t=10'.

Hay que tener en cuenta que la imagen del gel virtual de la electroforesis microfluídica sólo permite una interpretación cualitativa. En cualquier caso, la degradación en mayor o menor grado siempre es superior en las incubaciones con la RNasa 7 con respecto a la RNasa 3/ECP, si bien, a tiempos finales los resultados son similares para las dos RNasas.

Se muestra una cinética de degradación por la RNasa 7 (Fig.124) y su correspondiente comparativa con la RNasa 3/ECP en su representación en forma de gel virtual (Fig.125). Se puede observar claramente como para la RNasa 7 la degradación del RNA es prácticamente inmediata. También se puede observar que tiene una preferencia ligeramente superior por el rRNA respecto al tRNA, aunque serían necesarios análisis adicionales. Respecto a la comparativa del descenso del RNA total con respecto los tRNA y rRNA, parece que en conjunto existe un descenso de la señal más importante en la degradación por la RNasa 7. Comparativamente, en los perfiles del gel se pudo comprobar que los RNAs de menor tamaño y las áreas de RNA degradado (en la parte inferior de los geles), experimentaban un aumento de su densidad mayor que el decremento de las bandas de rRNA. Esto se podría explicar por una preferencia

de la RNasa por RNAs de mayor tamaño y la acumulación de productos de degradación menores.

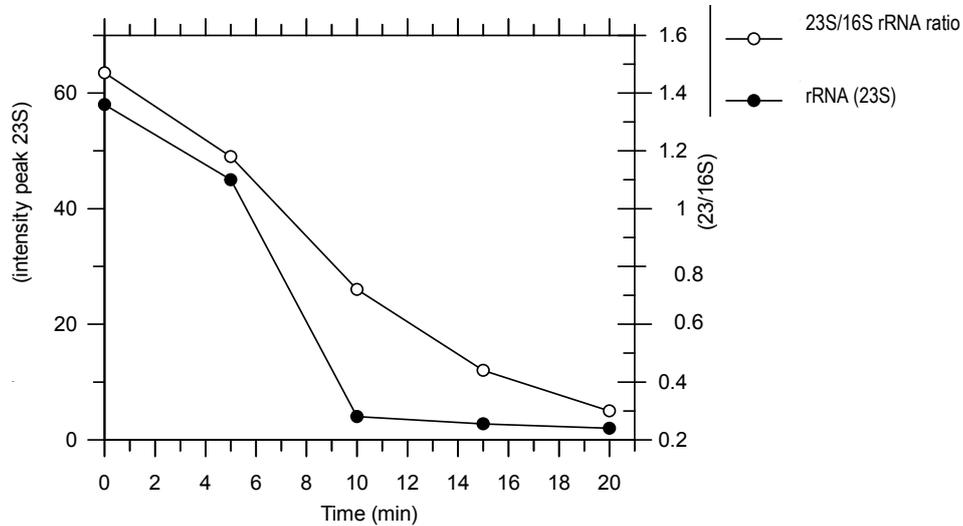


Figura 124. Cinética de la degradación de RNA total (extraído de *E.coli*) para la RNasa 7. La degradación se realizó con la RNasa 7 a una concentración de  $0.01 \mu\text{M}$ , la concentración del RNA fue de alrededor de  $240 \text{ ng}/\mu\text{l}$ . No aparece barra de errores al ser único experimento de esta clase.

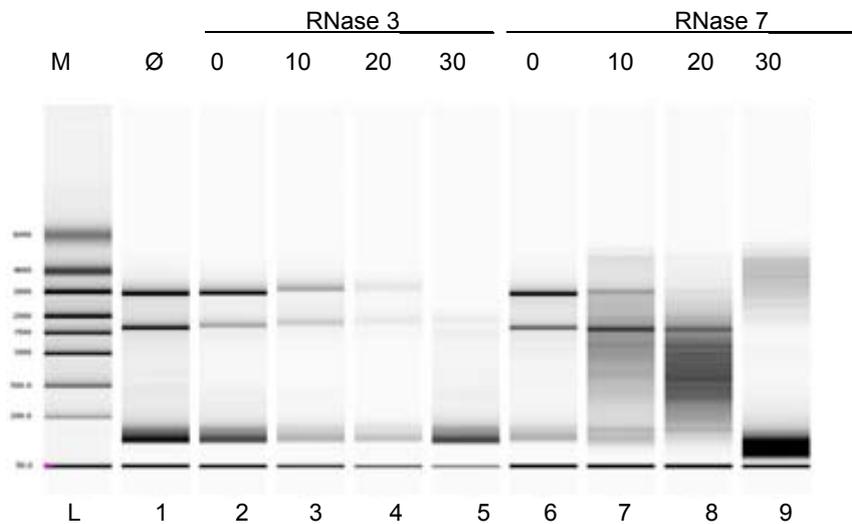


Figura 125. Gel virtual comparativo de actividades de la RNasa 3/ECP y la RNasa 7 (incubación exógena). Las concentraciones de RNA y RNasas se indican en la fig. 124. Carriles: 1:RNA sin tratar, del carril 2 al 5 la RNasa 3/ECP incubada a 2:  $t=0'$ , 3: a  $t=10'$ , 4: a  $t=20'$ , 5: a  $t=30'$ . Del carril 6 al 9: RNA sin tratar para exp con RNasa 7, a diferentes tiempos (0,10, 20 y 30 min respectivamente).

Una vez se estableció cual podía ser la concentración de RNasas más adecuada para observar un transcurso en el tiempo de la degradación de RNA's purificados, se realizaron los experimentos que describirán de manera independiente las diferentes sensibilidades a degradación de cada uno de los

diferentes tipos de RNA's principales, mediante incubaciones con RNasas por separado. Los experimentos se llevaron a cabo tanto por la RNasa 3/ECP como la 7, en las mismas condiciones. Estos resultados se representan entre las gráficas 126 y 127.

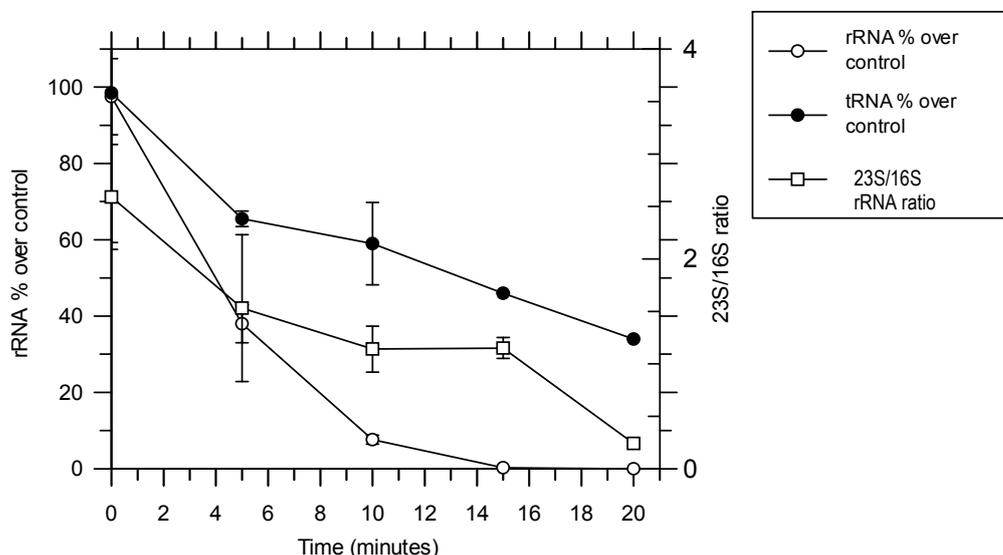


Figura 126. Gráfica de las cinéticas de degradación de la RNasa 3 sobre diferentes RNA sustrato a partir de RNA total extraído (tRNA y rRNA). Las magnitudes de medición para el tRNA y el rRNA fueron diferentes por lo que se expresan como porcentaje de su control respectivo. La concentración de la RNasa en el ensayo fue de 0.01  $\mu\text{M}$ , la concentración de todos los RNA's fue de 240 ng/ $\mu\text{l}$  y el tampón de reacción fue el Tris/HCl 10 mM, pH 7.5 (RNase free). Los puntos y barras de error son, respectivamente, media y desviación típica de 2 experimentos independientes.

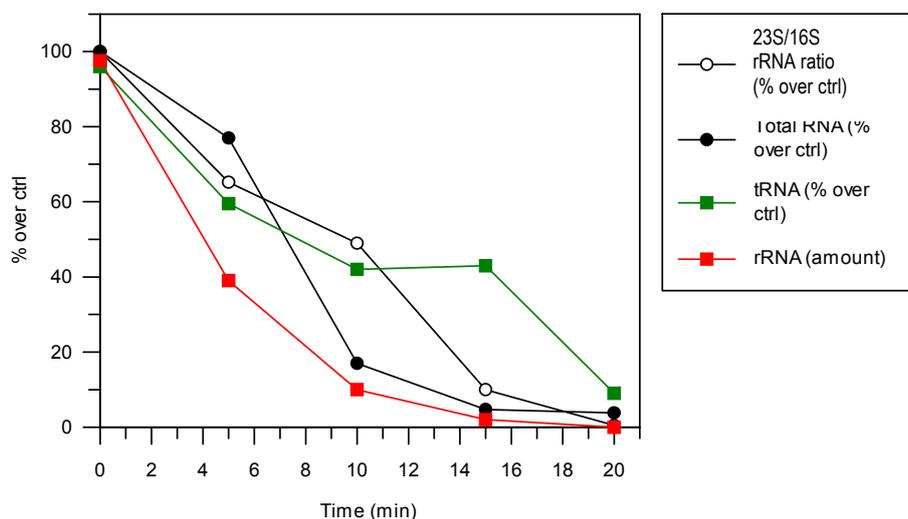
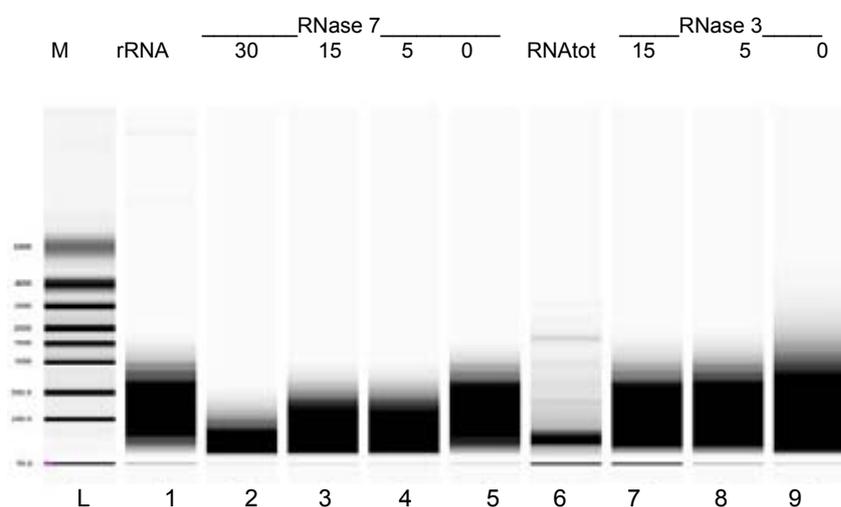


Figura 127. Gráfica de las cinéticas de degradación de la RNasa 7 sobre diferentes RNA sustrato (RNA total extraído, tRNA y rRNA) las magnitudes de medición para el tRNA y el rRNA fueron diferentes por lo que se corrigen como porcentaje de su control respectivo. La concentración de la RNasa en el ensayo fue de 0.01  $\mu\text{M}$ , la concentración de todos los RNA's fue de 240 ng/ $\mu\text{l}$  y el tampón de reacción fue el Tris/HCl 10 mM, pH 7.5 (RNase free). Los valores son media de 2 experimentos independientes.

Desde el punto de vista de un resultado cualitativo, se puede observar como el rRNA sufre una degradación ligeramente más rápida en el caso de la RNasa 7 que en el de la RNasa 3/ECP (a 15 min los decrementos son del orden del 10% sobre la RNasa 3/ECP) . Los resultados parecen indicar que hay una preferencia por el rRNA, a pesar de que el tRNA sufra también una degradación temprana. La cuantificación numérica y su estadística corroborará la degradación diferencial del rRNA sobre el tRNA y sobretodo la repetitividad de los resultados (con la cual se ha podido realizar las replicas ya mostradas en las gráficas). La figura 128 incluye el gel virtual comparativo.



*Figura 128. Gel virtual comparativo del análisis de digestión del rRNA standard utilizado. El carril 1 muestra un rRNA comercial sin digerir, mientras que el 6 es el de una muestra de RNA total. Esta imagen muestra como el rRNA comercial utilizado no es útil para la distinción de las dos bandas típicas. 2, 3, 4 y 5 son digestiones por la RNasa 7, de 7 a 9 son digestiones por la RNasa 3.*

#### 5.3.4.4.3 Zimogramas para el estudio comparativo de los procesos de lisis celular bacteriana y de degradación de RNA

Se hicieron una serie de zimogramas para poder valorar el proceso de lisis celular bacteriana de forma paralela al estudio de la degradación del RNA total celular bacteriano. Se valoró la liberación de RNasa I de las bacterias

(como señal de lisis bacteriana) paralelamente, tomando los mismos tiempos de referencia que en los experimentos de degradación de RNA. Este método nos permitiría estimar el grado de lisis celular de las bacterias incubadas, ya sea por RNasa 3/ECP o RNasa 7. A los tiempos de ensayo de los análisis de la degradación del RNA celular por las RNasas (inferiores a 30 min) no se ha podido detectar ningún tipo de liberación de la RNasa bacteriana. En el zimograma no apareció ninguna banda más que la de RNasa 3/ECP utilizada de marcador en su respectivo carril. Se confirma por tanto que durante el periodo de estudio del proceso de degradación del RNA no se dio lisis celular.

#### 5.3.4.5 Experimentos comparativos según la fase de crecimiento bacteriano y otras condiciones de ensayo

Considerando la diferente susceptibilidad de las bacterias en diferentes estadios de crecimiento frente a la actividad bactericida de la RNasa 3/ECP descrita anteriormente (Lehrer et al, 1989) nos planteamos analizar si podrían existir diferencias en cuanto al nivel de degradación del RNA. La estrategia para dilucidar si el estado de crecimiento bacteriano logarítmico pudiera ser más susceptible de sufrir la degradación del RNA, precisamente por ser más sensible a la acción de las RNasas, consistió en una serie de experimentos con incubaciones exógenas de las ribonucleasas con las bacterias en fase estacionaria o en fase logarítmica. Para poder interpretar mejor los resultados, se utilizó la lisozima como control positivo de proteína con actividad bactericida pero sin actividad RNasa. Se estudió el proceso de degradación del RNA por la RNasa 3/ECP como ejemplo de ribonucleasa antibacteriana. El crecimiento estacionario, se caracteriza por una población bacteriana de menor capacidad de división y por lo tanto con menos cambios dinámicos en la pared, lo que le confiere una mayor rigidez. Como modelo de esta fase de crecimiento, se utilizaron incubaciones saturadas en las que la cinética de crecimiento ya ha llegado a un “plateau”. Se escogieron cultivos bacterianos de *E. coli* que llegaron a una OD<sub>600nm</sub> de 1.2 aplicándole el mismo protocolo de incubación con la proteína y extracción. La incubación con RNasas se ajustó por dilución del cultivo bacteriano a una OD<sub>600nm</sub> de 0.8. No obstante, para evitar errores en cuanto a la cantidad de RNA con respecto a las muestras de crecimiento

logarítmico por la cantidad de células presentes, previo al análisis por Experion™, se igualó la concentración de RNA en todas las muestras (aproximadamente 190 ng/μl). En las figura 129 y 130 (la primera para evaluación de la cantidad de RNA y la segunda para la calidad) se constatan y se comparan degradaciones del RNA que se pueden producir por el efecto de un agente externo bactericida, sin actividad RNasa, utilizando el lisozima como control. Se observa una sensibilidad mayor a la degradación del RNA en el estadio de crecimiento logarítmico con respecto al estacionario (Fig. 129). Adicionalmente se incluyó en el mismo experimento, la RNasa 7 observando un comportamiento similar.

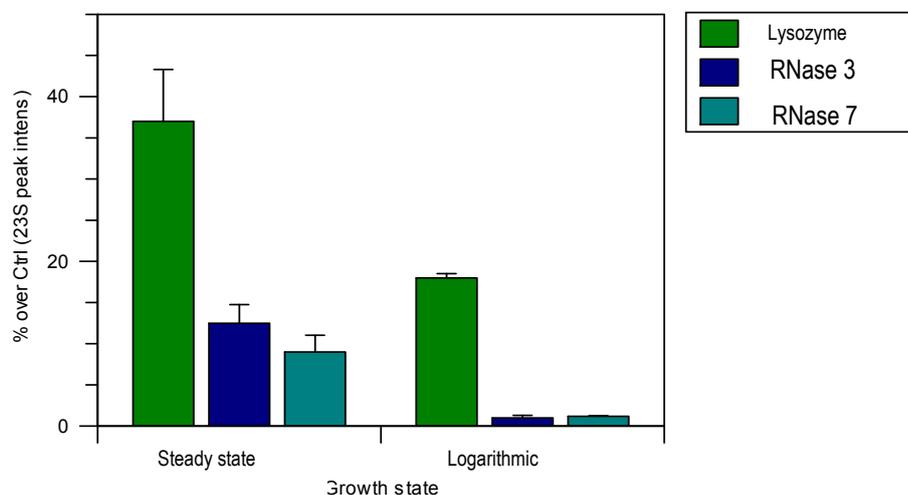


Figura 129. Gráfica de las intensidad del pico a 23S como medida de la cantidad de rRNA (corregida como porcentaje del control) para los dos estados de crecimiento de *E. coli*, con las ribonucleasas 3 y 7 y la lisozima (las ribonucleasas se incubaron a 4 μM, mientras que la lisozima se adicionó a una concentración de 1 mg/ml. (aprox 90 μM) adecuada para la lisis celular según la bibliografía. El tiempo de incubación para todos los enzimas fue de 15 min. La barra de error es de una desviación típica de 3 experimentos.

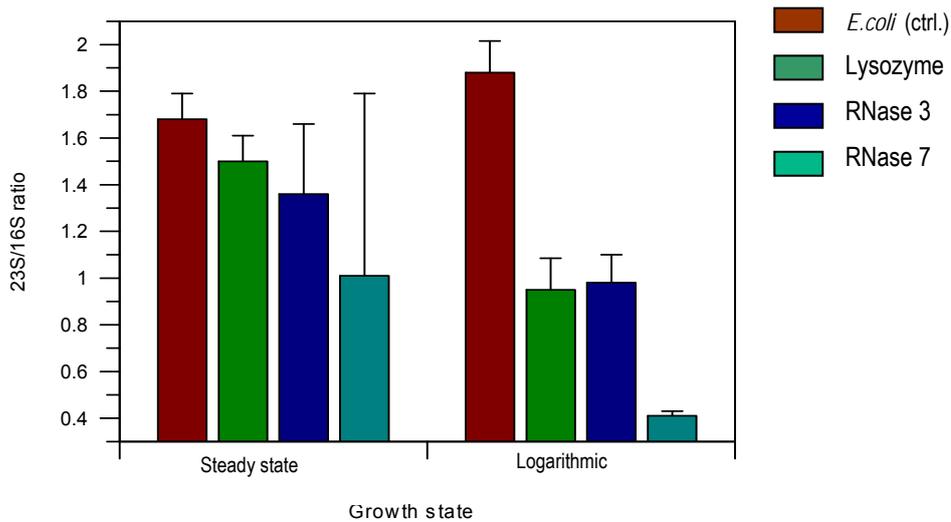


Figura 130 Gráfica de las relaciones 23S/16S como medida de la calidad de RNA para los dos estados de crecimiento de *E. coli*, para las ribonucleasas 3 y 7 y la lisozima (todas las condiciones son idénticas a la gráfica anterior dado que corresponde al mismo experimento).

La gráfica 129 muestra una degradación del rRNA mayor si el cultivo está en fase logarítmica, de forma paralela para todas las RNAsas, así como para la lisozima. La gráfica 130 muestra como control de que se ha producido degradaciones dependientes de la acción de las RNAsas añadidas y no de procesos potenciales durante el proceso de degradación.

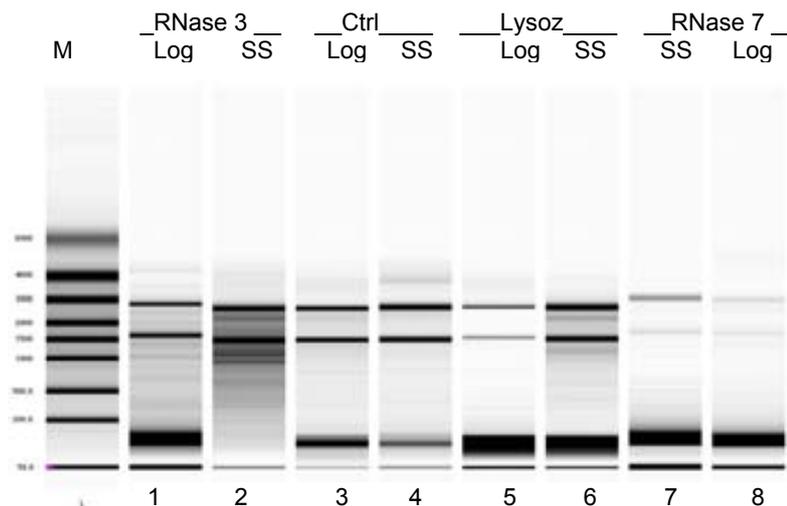


Figura 131. Gel virtual a partir del electroferograma comparativo de los estadios de crecimiento estacionario (SS) y logarítmico (log). 1 RNasa 3/ECP 4 $\mu$ M (log) 2 RNasa 3/ECP 4 $\mu$ M (SS) 3 Ctrl (log) 4 Ctrl (SS) 5 Lisozima (log) 6 Lisozima (SS) 7 RNasa 7 4 $\mu$ M(SS) 8 RNasa 7 4 $\mu$ M (log).

Los eventos moleculares que puedan acontecer posteriormente a la acción directa de las RNAsas pueden ser muy diversos y no son objeto de esta tesis (activación de autolisinas, cambios osmóticos, actividad de las RNAsas bacterianas, etc...). Podemos asumir que existe un comportamiento paralelo de degradación del RNA, entre nuestras RNAsas y la lisozima, que depende del estado de las envueltas de las bacterias, teniendo en cuenta por supuesto, que en el caso de las RNAsas existe un efecto añadido de degradación directa del RNA. Dicho estado de las envueltas se ve precisamente más comprometido en la fase logarítmica y es allí donde se observa mayor degradación de RNA. Este grupo de experimentos establece a la lisozima como un control de la dependencia de la estabilidad del RNA con el estado de la pared bacteriana y en general de las envueltas de las bacterias. Sus efectos indirectos sobre el RNA se muestran en el gel virtual de la figura 131 y en los resultados mostrados en las figuras 129 y 130. El experimento con lisozima fue una simple incubación a una concentración de lisis estandarizada (una concentración típica descrita para procesos de extracción de ácidos nucleicos) de 1 mg/ml (90  $\mu$ M) durante 15 min en agitación.

Se realizaron otros controles según las condiciones de ensayo. Por un lado, se realizó un control de lisis celular mediante un proceso de rotura mecánica de las células. Este método ha sido la lisis mediante sonicación. Para este fin se utilizaron cultivos de *E. coli* crecidos hasta una OD<sub>600nm</sub> de 0.6, sedimentados por centrifugación brevemente y resuspendidos en tampón de lisis para someterlos a una sonicación breve (5 s) o larga (diez s, tres veces). Dichos datos se pueden observar también en el gel virtual de la figura 132 y los resultados representados en la figura 133.

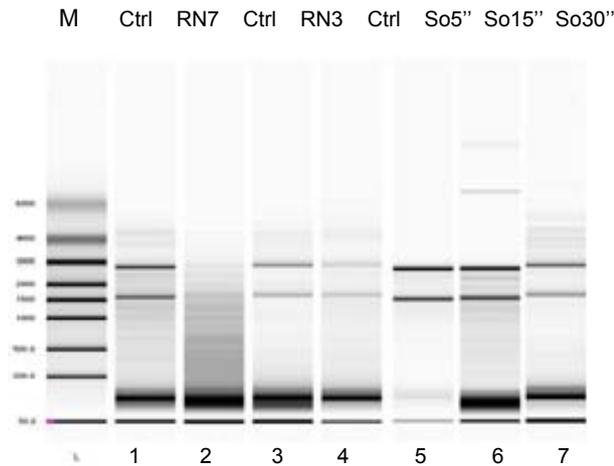


Figura 132. Gel virtual (y comparativo) de las electroforesis microfluidicas de muestras de RNA, tras incubar las bacterias en diferentes condiciones Carriles: 1(RNA control A, 2:RNA control A con RNasa 7 10', 3: RNA control B, 4: RNA control B con RNasa 7 10', 5: RNA Control C, 6: Control C sonificado 5'', 7: control C sonificado 30''.

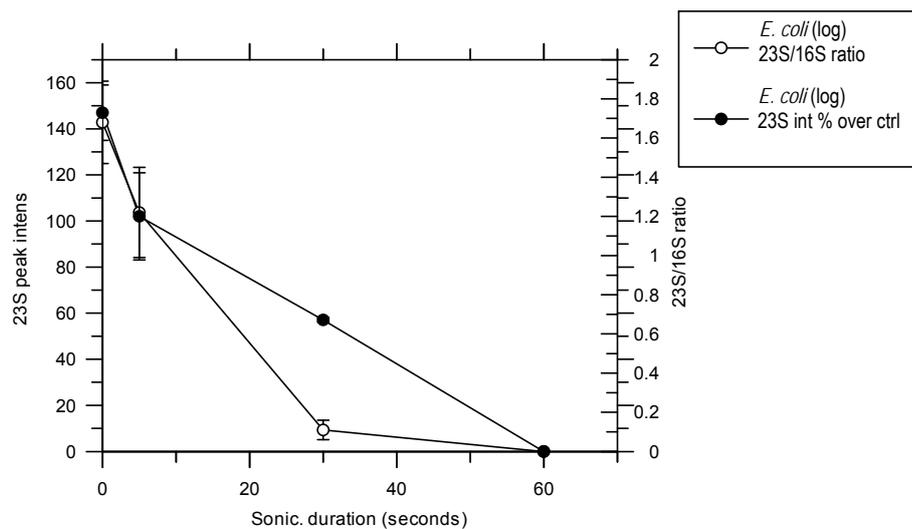


Figura 133. Gráfica de registro de la degradación del rRNA (medido a partir de la intensidad del pico de 23 S) y de la relación 23S/16S respecto a las sonicaciones a diferentes tiempos. Las barras de error corresponden a desviaciones típicas de dos experimentos así como los puntos a sus respectivas medias.

Tras los experimentos realizados, se observa que la sonicación es un método que a tiempos cortos supone la fragmentación del RNA o su degradación asociada al proceso de disrupción celular.

Asimismo, como control adicional, se evaluó la fracción del sobrenadante obtenida durante el protocolo de separación de la fracción celular. A nivel de procedimiento podría cuestionarse si la manipulación del cultivo (como por ejemplo la centrifugación) o cualquier evento ocurrido durante el crecimiento bacteriano podría producir una pérdida de RNA, que quedaría en la fracción del sobrenadante. Si así fuese, estaría enmascarando todos nuestros resultados. Para descartar esta posibilidad, se diseñó un experimento de extracción y análisis del RNA de los cultivos bacterianos sin incubación de RNasas, comparando el sobrenadante previo a la extracción del medio de cultivo con el sedimento (*pellet*) de bacterias que normalmente es el material de partida utilizado para cualquier extracción (muestra A). Se comparará este resultado con un experimento de degradación del RNA en cultivo con incubación de RNasas utilizando el mismo procedimiento (muestra B).

Si se diese alguna degradación del RNA independiente de la incubación con RNasas el sobrenadante de la muestra A presentaría una cantidad considerable de RNA degradado. En cambio la muestra B mostrará en el sobrenadante una cantidad menor de RNA, o moléculas de menor tamaño, producto de la degradación. Por otra parte se probará con esta estrategia si después de la digestión con la RNasa 3/ECP, el RNA que se cuantifica pudiera estar infravalorado porque se hubiera parcialmente expelido al medio extracelular. En la figura 134, se muestran los resultados obtenidos que sugieren que no ha tenido lugar la degradación y liberación del RNA en ausencia de RNasas. La cantidad de RNA que puede existir en el medio, a pesar de la manipulación correcta, es del orden de cinco veces menor de lo que puede encontrarse en el sedimento (*pellet*) rica en células.

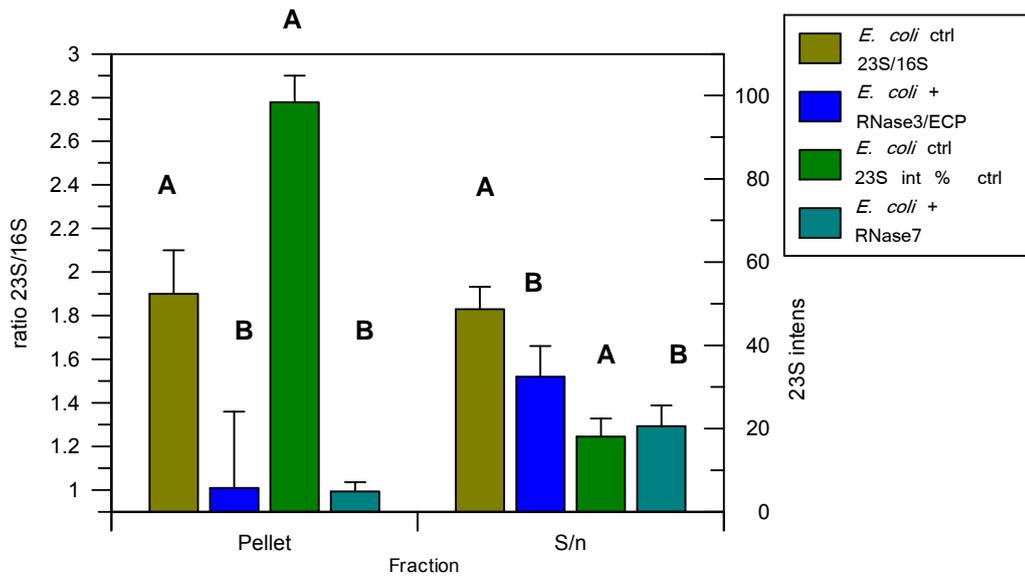


Figura 134. Diagrama de barras en el que se muestran las diferencias de parámetros en la evaluación del RNA entre sobrenadantes y pellets, en control e incubación con las dos RNasas a 4  $\mu$ M (en cultivo de *E. coli* crecido hasta 0.7). Para las incubaciones con RNasas sólo se muestra cantidad de RNA, para el control hay una barra con la relación 23S/16S). Se muestra la letra A o B que relaciona el tipo de experimento indicado en el texto. Las alturas son medias de dos experimentos así como las barras de error su desviación típica .

#### 5.3.4.6. Comparación de la actividad RNasa en cultivos bacterianos y en extracciones de RNA celular purificado

De todos los resultados obtenidos se ha podido establecer una comparativa interesante respecto a la degradación de los RNAs por parte de las RNasas del estudio cuando se da extracelularmente (RNA celular que ha sido previamente extraído y se incuba con RNasas) o dentro de la célula (RNA que se extrae para conocer su estado tras incubación de las bacterias con las RNasas). Se observa cómo cuando el RNA se encuentra fuera de la bacteria la preferencia por el rRNA es mucho mayor que cuando esta dentro. Estos resultados pueden tener una explicación paralela a la que encuentran otros autores para modelos eucariotas (Saxena et al, 2002): que las proteínas y otros componentes intracelulares protegen algunos RNAs celulares, principalmente el rRNA (Fig. 135).

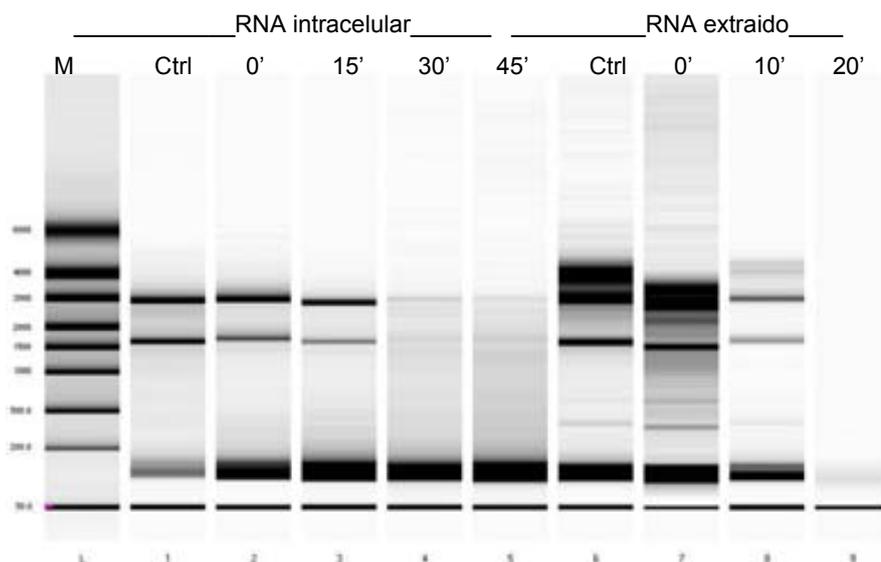


Figura 135. Gel virtual de electroferograma comparativo de la degradación del RNA bacteriano en cultivos y en muestras de RNA celular purificado en función del tiempo. Carriles: Dentro de la célula de 1 a 5: 1 (control), 2 (0'), 3(15'), 4(30') 5 (45') Fuera de la célula de 6 a 9: 6 (control), 7(0'), 8 (10'), 9 (20') Las incubaciones con cultivo (1 a 5) se realizaron con RNasa 3/ECP 4  $\mu$ M mientras que las de preparaciones de RNA total purificado se realizaron con RNasa 3/ECP 0.01  $\mu$ M. El "RNA intracelular" es el RNA dentro de la célula (con incubación de RNasas) y el "RNA extraído" se obtuvo mediante preparaciones en el laboratorio de cultivos celulares bacterianos.

#### 5. 4 Resultados de la cristalización de proteínas

Se describen a continuación las condiciones optimizadas para la cristalización de proteínas objeto de estudio. Se indica asimismo, en el caso que los cristales hayan difractado con éxito, la información relativa a los datos recolectados de imágenes de difracción de rayos X en una estación de sincrotrón.

1) RNasa 3/ECP nativa (cocristales con N-acetil glucosamina-1- fosfato)

Solución de cristalización: 6% Jefamina, Citrato sódico 0.1 M pH 4.5, FeCl<sub>3</sub> 10 mM

Ligando: N-acetilglucosamina-1-fosfato 10 mM

Concentración de proteína: 6 mg/ml

Temperatura de cristalización: 16 °C

El ligando no aparece unido a la proteína en el co-cristal, pero se obtiene una resolución óptima para la difracción de los cristales de la ECP. El ligando ha facilitado el proceso de cristalización.

DIFRACCIÓN: Estación Daresbury X13, espectro con 1.8-1.9 Å de resolución

2) RNasa 3/ECP nativa (cocrystalización con N-acetil glucosamina, NAG)

Solución de precipitación : 5 y 6% Jefamina, pH 5.2 Citrato sódico 0.1 M, FeCl<sub>3</sub> 10 mM

Ligando: NAG 50 mM

Concentración de proteína: 7.5 mg/ml

Temperatura de cristalización: 16 °C

El ligando no aparece unido a la proteína en el co-cristal, pero se obtiene una resolución óptima para la difracción de los cristales de la ECP. El ligando ha facilitado el proceso de cristalización.

DIFRACCIÓN: Estación Daresbury X13, espectro con 1.8-1.9 Å de resolución

3) RNasa 3/ECP nativa

Solución de precipitación : 5% y 6% de Jefamina, Citrato sódico 0.1 mM, pH 4.5, FeCl<sub>3</sub> 10 mM

Concentración de proteína: 6 mg/ml

Temperatura de cristalización: 16 °C

Se adjunta la imagen de los cristales resultantes de la RNasa 3 (Fig. 136).

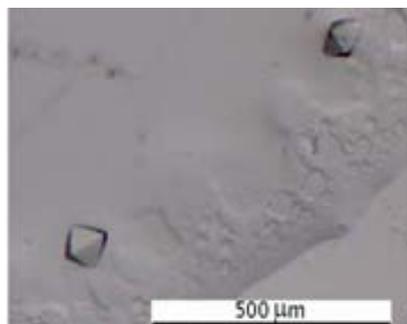


Figura 136. (A) Cristales de RNasa 3/ECP obtenidos por la metodología de la gota colgante. Observados en lupa binocular. Condiciones de cristalización: 0.1M Citrato de sodio pH 5.2 (titulado con HCl 1M) 6% Jefamina M-600 y 10 mM FeCl<sub>3</sub>. Nótese la escala en el margen de la fotografía.

## 6. Discusión

### 6.1 Identificación de la región N-terminal con actividad antimicrobiana

En este apartado se discutirán todos los procesos que conducen a la separación de fragmentos con potencial actividad antimicrobiana de la región N-terminal, junto con su caracterización y discusión sobre su potencial contribución en la función antimicrobiana de la proteína.

#### Desnaturalización de la RNasa 3/ECP

Los procesos de proteólisis y escisión química de la RNasa 3/ECP se realizaron con la proteína desnaturalizada y carboximetilada. Por otra parte, existe un interés en contrastar la hipótesis de que la RNasa 3/ECP pudiera tener alguna capacidad bacteriana en su forma desnaturalizada. Existen ejemplos experimentales publicados de actividad bactericida tras el paso por procesos de desnaturalización proteica, como es el caso de la BPI (*Bacterial Permeability Increasing Protein*) recombinante (Domingues et al 2009) o la misma lisozima (Ibrahim et al, 2001). Estos ejemplos pueden sugerir mecanismos similares para la RNasa 3/ECP. En cualquier caso, los experimentos nos muestran una ausencia total de actividad antibacteriana para la RNasa 3/ECP desnaturalizada (Fig. 49).

#### 6.1.1 Digestión enzimática y química de la ECP/RNasa 3

La escisión de la RNasa 3/ECP con BrCN representa una estrategia para la identificación de la región o regiones con potencial actividad bactericida de la proteína. El método utilizado por adición de BrCN, ha permitido la escisión por el extremo carboxiterminal de los residuos de metionina. No obstante, también se observa la escisión tras los residuos de triptófano. Esta escisión adicional se ha observado anteriormente para otras proteínas y se considera que depende de las condiciones de ensayo (Boulware et al, 1985). En el caso de la RNasa 3/ECP, los puntos de corte esperados serán: W10, M27 y W35.

Se ha obtenido un perfil general de péptidos, producto de la escisión de la RNasa 3/ECP y se han podido identificar la mayoría de fragmentos, algunos de ellos con una considerable actividad bactericida. En concreto se obtiene un fragmento, resultante de la escisión a nivel de la metionina 27 y del triptófano 35. Este péptido se ha encontrado en la fracción nº 15 (minuto 53 de la elución) de la cromatografía de fase reversa HPLC con columna C18 Symmetry. Estos resultados hacen coincidir en la misma zona de la proteína, entre los residuos 24 y 45 del N-terminal, el papel de la actividad bactericida que también se ha observado para los péptidos sintéticos 1-45 y 24-45 (Torrent et al., 2009b). Estos resultados son también paralelos y se consolidan con las deficiencias de actividad de los mutantes de la RNasa 3/ECP W35 y R36, situados de nuevo en la misma zona.

También aparece otro péptido con actividad bactericida, producto de la escisión desde el aminoácido 11 al 35, que se situaría en la fracción 20 de la cromatografía Symmetry (67 min de elución de la cromatografía de fase reversa HPLC con columna C18 Symmetry (Fig. 137).

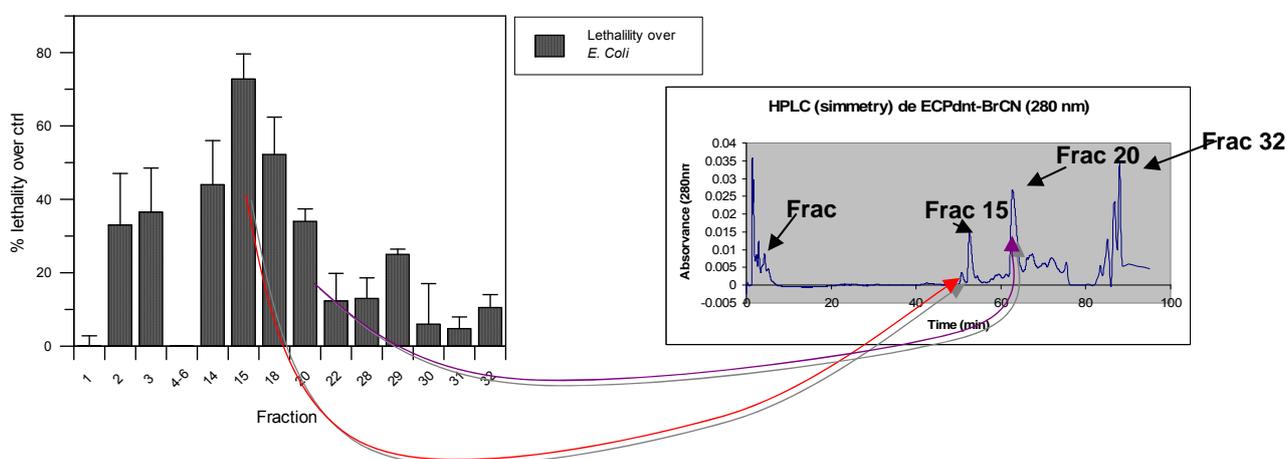


Figura 137 Comparativa de las figuras 57 y 55a mostrando el perfil de actividad bactericida y los picos de la separación cromatográfica a los cuales corresponden.

Asimismo, la escisión conseguida mediante la proteólisis con Lisina-Endoproteasa por su única diana en la RNasa 3/ ECP (K38) proporciona el péptido 0-38 que presenta una alta capacidad antibacteriana.

## Estabilidad de péptidos

Uno de los aspectos que ha podido enmascarar e incluso aminorar el poder antibacteriano de un péptido es su propia estabilidad. Podemos encontrarnos péptidos potencialmente bactericidas dado su pI altamente catiónico, pero muy lábiles, que quizás se hidrolicen antes de que puedan ejercer efectos notables. En este caso hemos aplicado herramientas informáticas *online* para estimar su estabilidad (ver tabla 8 de la sección de resultados). En concreto el péptido 0-38 es bastante inestable. Sin embargo, tiene una elevada actividad bactericida. En el hipotético caso de que fuese un péptido escindido en condiciones naturales, sería necesario saber si el entorno en que se halle o la asociación con otras moléculas podría hacerlo más efectivo al quedar protegido.

### 6.1.2 Actividad antibacteriana de los fragmentos N-terminales de la ECP y relación con los mutantes de la región N-terminal

En el siguiente subapartado se van a detallar los resultados que describen la actividad antibacteriana del péptido obtenido por proteólisis y de los péptidos sintetizados que representan las áreas del fragmento N-terminal de la RNasa 3/ECP. Los resultados de actividad bactericida de los péptidos se comparan con los ensayos de actividad bactericida de los mutantes de residuos de la misma región N-terminal.

#### Péptidos de la región N-terminal

Los fragmentos N-terminales estudiados nos permitieron determinar las zonas de más relevancia en la actividad antibacteriana de la proteína. El segmento N-terminal es rico en aminoácidos catiónicos y en aminoácidos aromáticos (entre ellos los triptófanos 10 y 35) implicados en la actividad antibacteriana de la RNasa 3/ECP (Carreras et al 2003, Torrent et al, 2007). Por otra parte esta región fue identificada por un programa de predicción (Torrent et al, 2009c).

## Efectos sobre la viabilidad celular bacteriana de los diferentes péptidos de escisión de la región N-terminal de la RNasa 3/ECP

El primer ensayo realizado, es el que se ha hecho sobre la viabilidad bacteriana desde el punto de vista metabólico (ensayo *BacTiter Glo*), complementado con la medición de OD<sub>600nm</sub> o con el recuento del número de colonias. Para estos ensayos todas las concentraciones se ajustaron a 10 µM tras haber comprobado que era una concentración a la cual se podía asegurar una letalidad de los péptidos con menor efecto antibacteriano y a la vez comparable con los péptidos de efectos más notables.

Uno de los péptidos de interés que presentó más actividad bactericida ha sido el generado por la proteólisis enzimática del extremo carboxil de la lisina 38 de la RNasa 3/ECP recombinante, que resultó en el péptido 0-38 (0 por la metionina añadida en el N-terminal como proteína recombinante). Dicho péptido contiene varias argininas que le confieren un carácter catiónico. Con este péptido hemos demostrado ampliamente su actividad por ensayos de viabilidad por cuantificación de ATP. Es destacable que la RNasa 3/ECP haya conservado esa única lisina, siendo así una diana de proteólisis por lisina-endoproteasas. Pensamos que existe la posibilidad de que la generación de un péptido de este tipo, por proteólisis de la ECP/RNasa 3, pudiera darse de forma natural en los procesos de defensa de los eosinófilos frente a bacterias así como por eventos de contradefensa de las propias bacterias. Estos eventos pueden darse por liberación de proteasas al medio extracelular. Existen otros ejemplos de proteínas con actividad bactericida dependiente de proteólisis, que establecen un precedente que apoyaría esta hipótesis. Encontramos así proteínas que tienen una actividad bactericida dependiente de su proteólisis extracelular: la lactoferrina cuya proteólisis da lugar a la lactoferricina, las proteínas del complemento o la BPI *bactericidal/permeability increasing protein* (Ooi et al 1987). Dicha proteína, producida por los leucocitos polimorfonucleares, experimenta una proteólisis facilitada por proteasas. Tal proteólisis desprende un fragmento N-terminal con un pI del péptido de 8.75 que es el responsable casi total de la actividad antibacteriana de la proteína.

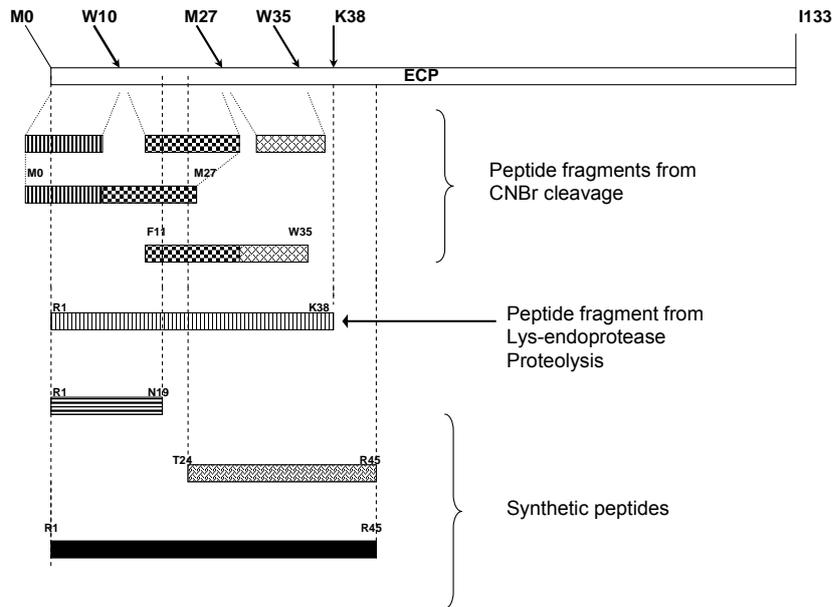
Teniendo en cuenta los ejemplos análogos descritos, nos planteamos la hipótesis de que pudiese existir una Lisil endoproteasa humana que confiriese la capacidad de digerir a la RNasa 3/ECP para liberar el fragmento N-terminal con actividad bactericida. Para abordar esta cuestión establecimos una estrategia de búsqueda BLAST en la base de datos SWISSPROT esperando encontrar una proteína homóloga. Tras dicha búsqueda se concluyó que en humanos no existe ninguna proteína conocida que tenga una homología significativa. Tampoco se describe en la bibliografía la existencia de alguna lisilendoproteasa de origen humano que pudiera originar *in vivo* esa proteólisis en los propios tejidos.

Otra posibilidad de proteólisis extracelular viene del hecho de que la proteasa que hemos utilizado experimentalmente (Lys-endoproteasa), aunque de origen comercial, la producen de forma natural bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* por lo que una escisión podría ser esperable en condiciones fisiopatológicas (en infecciones bacterianas). Se podría sugerir la hipótesis de que la conservación evolutiva de la lisina 38, como única y exclusiva diana para producir un péptido N-terminal de capacidad bactericida, hubiera podido ser efecto adaptativo ante infección bacteriana. Por esa coincidencia, hemos pensado que sería interesante realizar una búsqueda de lisil endoproteasas en films bacterianos, con la misma herramienta informática, lo cual es lógico y esperable por homología entre especies. El resultado de la búsqueda fue la identificación de otras Lys-endoproteasas en otras especies bacterianas, incluyendo patógenos (ejemplos: peptidasas en *Lysobacter enzymogenes* o *Achromobacter lyticus*, cuyos géneros son patógenos para el ser humano) (Fig. 138).

Accession <sup>+</sup>	Entry name	Protein names <sup>+</sup>	Organism <sup>+</sup>	Status	Local alignment	Length <sup>+</sup>	Identity (%) <sup>+</sup>	Score <sup>+</sup>	E-value <sup>+</sup>
Q7M135	LYSC_LYSEN	Lysyl endopeptidase (EC 3.4.21.50) (Lys-C)	Lysobacter enzymogenes	★		269	100	559	1 e-157
P15636	APL_ACHLY	Protease 1 (EC 3.4.21.50) (Protease 1) (AP...)	Achromobacter lyticus	★		653	77	445	1 e-123
Q9AQR5	Q9AQR5_SGAMM	Lysyl endopeptidase	Lysobacter sp. B1-3374	☆		671	77	445	1 e-123
Q9GQ20	Q9GQ20_SGAMM	Lysyl endopeptidase	Lysobacter sp. B1-3374	☆		670	74	433	1 e-119
B1KL75	B1KL75_SHEWM	Lysyl endopeptidase	Shewanella woodyi (strain ATCC 51508 / MS32)	☆		823	50	259	2 e-67
AMV62	ASAV62_HERA2	Lysyl endopeptidase	Hepatosiphon aurantiacus (strain ATCC 23779 / DSM 785)	☆		868	49	255	3 e-66
Q2S239	Q2S239_SALRD	Lysyl endopeptidase	Salinibacter ruber (strain DSM 13855)	☆		677	36	174	6 e-42
Q1V502	Q1V502_SFLOD	Lysyl endopeptidase	Psychrobacter torques ATCC 700755	☆		758	37	165	4 e-39
ASER94	ASER94_SBACT	Lysyl endopeptidase	unidentified eubacterium SCB49	☆		552	36	150	1 e-34

Figura 138. Listado BLAST de proteínas homólogas con actividad lisilendoproteasa.

A continuación se comparó la actividad del péptido proteolítico 0-38 con los péptidos sintéticos obtenidos previamente en nuestro laboratorio: 1-19, 24-45 y 1-45. El primero de ellos tiene una actividad muy baja por lo que debemos descartar los aminoácidos que lo componen como realmente críticos en su aportación a la actividad bactericida total de la RNasa 3/ECP. Respecto a las siguientes zonas del extremo del N-terminal de la RNasa 3/ECP que se definen con los péptidos sintéticos que las reproducen, se puede observar que existe una zona clave entre los aminoácidos 24 al 38. El péptido que comprende los aminoácidos del 24 al 45 presenta menor actividad bactericida que el péptido ya mencionado 0-38, esto nos sugiere la participación de residuos de la región 24-38. Otra serie de datos que refrendan la importancia de la zona 24-38 son los extraídos del análisis con mutantes para esta zona expresados de manera endógena en la cepa *Rosetta Gami*. Principalmente el descenso de la actividad bactericida en los mutantes ECP R36A, ECP W35A y el doble mutante ECP W35AR36A (Fig. 139), se relacionan inversamente con la alta efectividad de péptidos sintéticos que contienen estos aminoácidos en la secuencia, por lo cual se puede pensar que podrían estar críticamente implicados en la toxicidad. Adelantando algunas conclusiones que arrojan más luz a la importancia de la zona 24-38, se añade a este hecho: el aislamiento del péptido 28-35 como el más activo de los obtenidos por el fraccionamiento de la RNasa 3/ECP con BrCN, volviendo a ubicar esa zona como clave en la acción bactericida.



Esquema comparativo de los péptidos utilizados en el estudio (Sánchez et al., 2010).

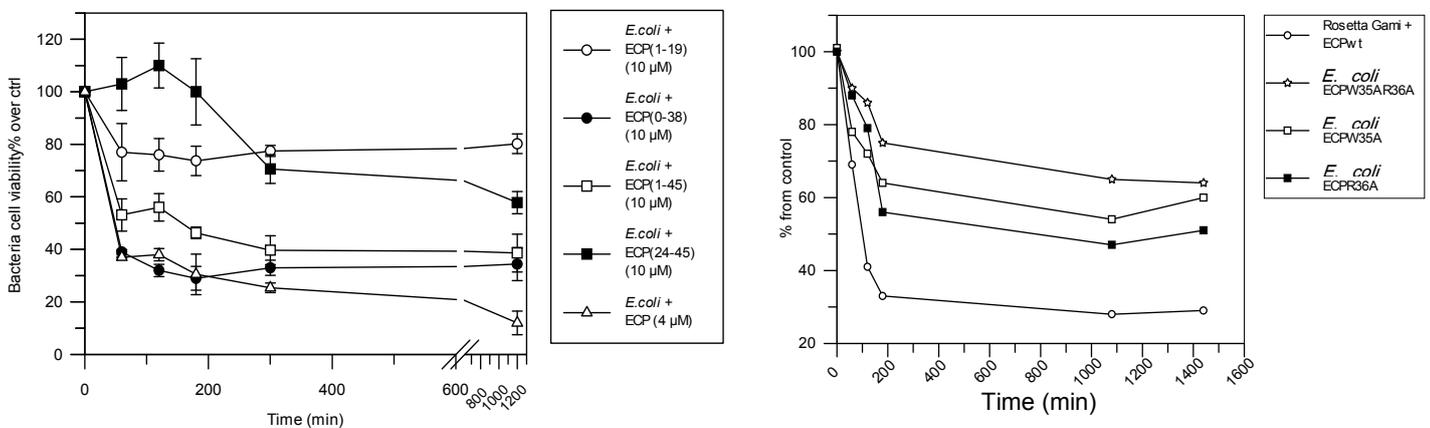
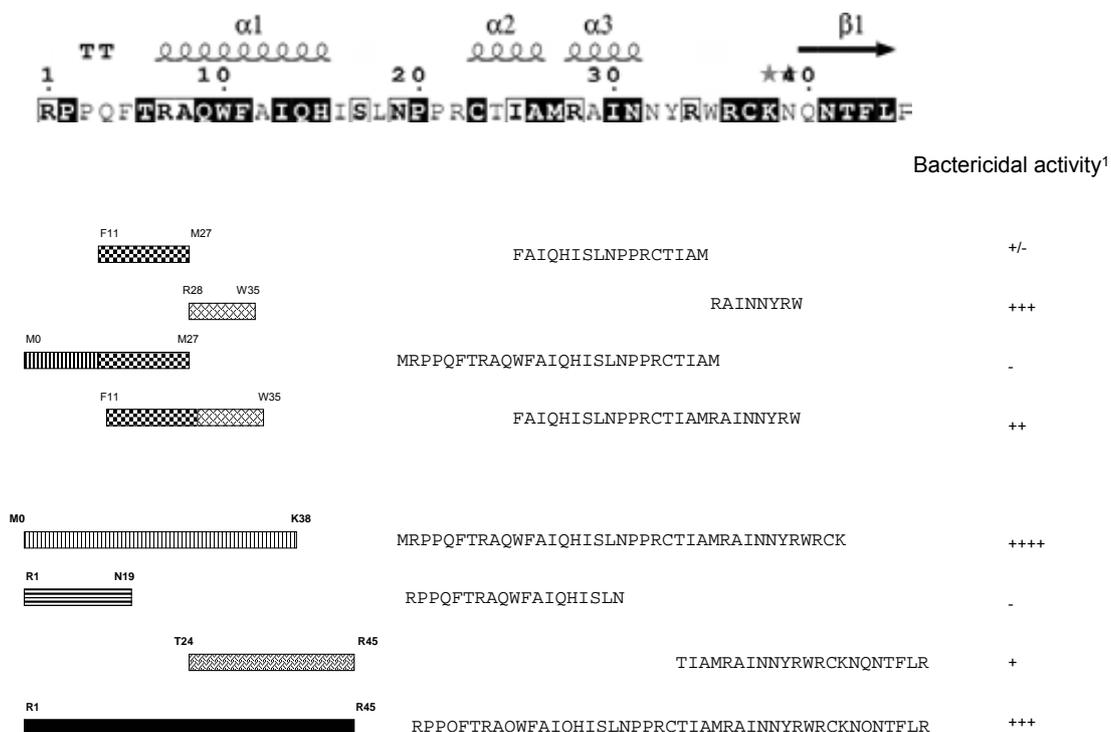


Figura 139. Comparativa de las figuras 63 y 95 en las que se muestran las actividades de los péptidos N-terminales y de los mutantes con sustituciones en residuos situados en la misma región.

En relación a la menor eficiencia del péptido 24-45 respecto a otros péptidos, suponemos como previamente hemos mencionado, que podría deberse a la ausencia de residuos anteriores a la Thr24 que pueden ser críticos para la actividad antimicrobiana.

Otra conclusión a comentar de la actividad parecida entre los péptidos 0-38 y 1-45, es que en la zona 39 a 45 no debe haber residuos importantes dado que en esa elongación de siete residuos respecto a la secuencia 0-38, no se gana en actividad bactericida.



*Esquema comparativo de la actividad bactericida de los distintos fragmentos de la RNasa 3/ECP estudiados, y la correspondiente estructura primaria y secundaria de la proteína (Sánchez et al., 2010).*

### 6.1.3 Relación del cribado de mutantes de RNasa 3/ECP por su actividad antibacteriana en Rosetta Gami y de las sustituciones en la región N-terminal.

Uno de los motivos del uso de la cepa *Rosetta Gami* de *E. coli* para cribar los mutantes de RNasa 3/ECP, ha sido la posibilidad de análisis rápido de varios mutantes. De todos modos, el ensayo se realiza como estudio preliminar para la selección de mutantes de potencial interés. En ese caso, los mutantes deberían expresarse con el sistema de rendimiento elevado para su posterior purificación. Se estudiaron los mutantes clave de la zona N-terminal: W35A, R36A y

W35AR36A. En el análisis se utilizaron varios de los métodos para evaluar la viabilidad de forma que se pudiera discernir siempre si simplemente se estaba detectando un efecto de agregación de las bacterias o realmente de muerte celular. Los mutantes para residuos catiónicos e hidrofóbicos del N-terminal ya comentados presentaron una actividad bactericida aminorada respecto a la proteína nativa, mediante evaluación de la viabilidad bacteriana por determinación de la cantidad de ATP intracelular, reforzando así por otra vía experimental los resultados ya publicados de Carreras y colaboradores (2003).

Aunque se han presentado datos de recuento de cfu's que podrían verse afectados por la agregación de las bacterias, en el caso de la expresión a nivel endógeno, no se espera que la liberación al medio extracelular de la proteína recombinante sea tan importante como para afectar a la determinación de la viabilidad por recuento de cfu's. Otra cuestión a tener en cuenta en este tipo de ensayo sería la afectación que puede llegar a tener desde dentro de la célula. Por lo tanto, debemos considerar la contribución potencial tanto de su actividad RNasa sobre el RNA celular como el efecto desde el reverso interno de la bicapa lipídica de la célula bacteriana.

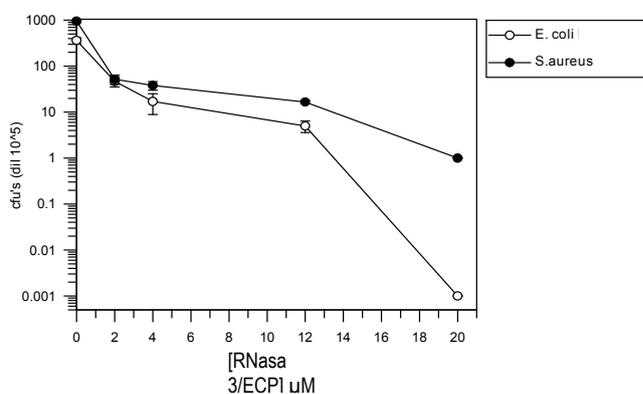
En el caso de los mutantes con substituciones ubicadas en la región N-terminal (de la cual hemos realizado el estudio por digestión y análisis de péptidos), hemos constatado una clara implicación de los residuos W35 y R36. También se constata una clara acción sinérgica entre ambos residuos en la acción antimicrobiana dado que el doble mutante presentaba una deficiencia respecto a la proteína nativa mucho mayor que la suma de las deficiencias de los mutantes parciales.

## **6.2 Caracterización de la actividad antibacteriana de la RNasa 3/ECP .**

### **6.2.1 Viabilidad celular bacteriana**

Se ha realizado un estudio detallado de la actividad antibacteriana de la RNasa 3/ECP frente a las especies Gram-negativo y Gram-positivo de referencia (*E. coli* y *S. aureus* respectivamente). Los resultados óptimos de

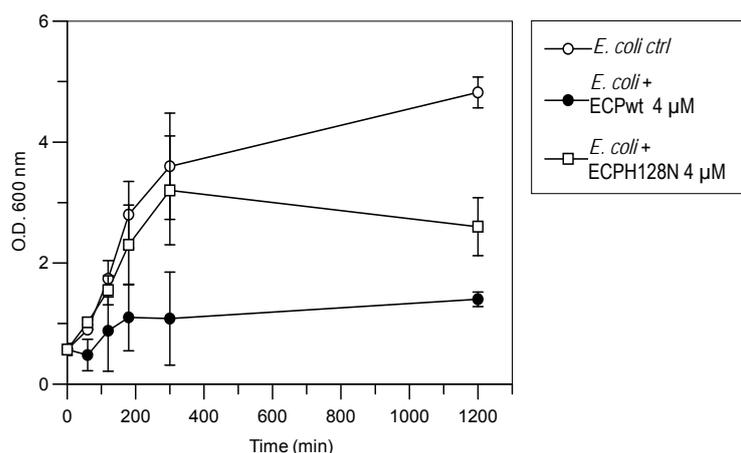
actividad antibacteriana para su valoración con los distintos métodos se obtienen con una concentración de 4  $\mu\text{M}$  sobre cultivos bacterianos en fase logarítmica ya sea para *E. coli*, como para *S. aureus*. Como referencia, la literatura indica que concentraciones de 1  $\mu\text{M}$  o inferiores reducen significativamente la viabilidad de los cultivos bacterianos (Lehrer et al 1989, Carreras et al, 2003). De hecho los valores de MIC estimados recientemente en nuestro laboratorio indican un rango entre 0.3 y 0.5  $\mu\text{M}$  (Torrent et al., 2009b). En nuestros estudios hemos trabajado a una concentración de 4  $\mu\text{M}$ , concentración adecuada para la evaluación de la viabilidad celular bacteriana por medición de los niveles de ATP y, como se muestra en la repetición de la figura 75 adjunta, su comparación con el método de evaluación de la viabilidad celular por recuento de cfu's.



*Se observa la actividad bactericida valorada como disminución de unidades de cfu en función de la concentración de RNasa 3/ECP.*

En lo que respecta a la evaluación de la viabilidad utilizaremos principalmente la que facilita la detección del ATP por el método *BacTiter Glo*, gracias a su validación en este trabajo de tesis. Aunque en ocasiones podamos utilizar tanto la densidad óptica como el recuento de cfu's, ambas metodologías se verían afectadas por la potencial agregación de las bacterias por la acción de la ECP/RNasa 3. La validez del método de viabilidad bacteriana medida por ATP queda demostrada en los resultados relativos a la figura 76 y la tabla 13 del apartado Resultados. Si observamos la bajada de densidad óptica del cultivo anterior con respecto a la disminución de la viabilidad por niveles de ATP, deducimos que la agregación inducida por la RNasa 3/ECP, ocurre antes que la muerte celular, como se ha observado también en nuestro laboratorio mediante otras metodologías. (Torrent et al. 2009b y 2010).

Finalmente, hemos podido observar un efecto antibacteriano más reducido de las RNasas analizadas en este estudio sobre cultivos bacterianos en la fase estacionaria de crecimiento bacteriano en comparación con la logarítmica, tanto en bacterias Gram-positivo como en Gram-negativo. Este hallazgo está en concordancia con la literatura (Lehrer et al, 1989). El resultado se sostiene teóricamente en el hecho de que durante el proceso de división se está sintetizando nueva pared bacteriana y por tanto habría regiones de la superficie de la membrana plasmática más accesibles mientras que en la fase estacionaria el dinamismo de la pared bacteriana se ve reducido por la ausencia de división celular. Otro aspecto de la recuperación de la viabilidad de los cultivos en periodos largos puede radicar en la degradación de la RNasa 3/ECP y en general cualquier RNasa por sistemas proteolíticos de defensa de la propia bacteria.



### Comparativa con el mutante de centro activo RNasa 3/ECP-H128N

La comparativa que se ha hecho entre la RNasa 3/ECP y su mutante RNasa 3/ECP-H128N tiene dos objetivos importantes: observar si existe una diferencia por tener el centro activo afectado y analizar en qué grado se retiene la actividad bactericida en este mutante, por la conservación de sus propiedades catiónicas de superficie.

Los resultados muestran reiteradamente que el mutante de centro activo RNasa 3/ECP-H128N tiene una actividad bactericida aminorada, que se observa tanto

por medición del crecimiento bacteriano como por registro de la viabilidad metabólica bacteriana. Es interesante ver que para este mutante, la sensibilidad de la especie Gram-negativo es mayor que la del Gram-positivo, sobre todo en periodos largos (Fig. 140).

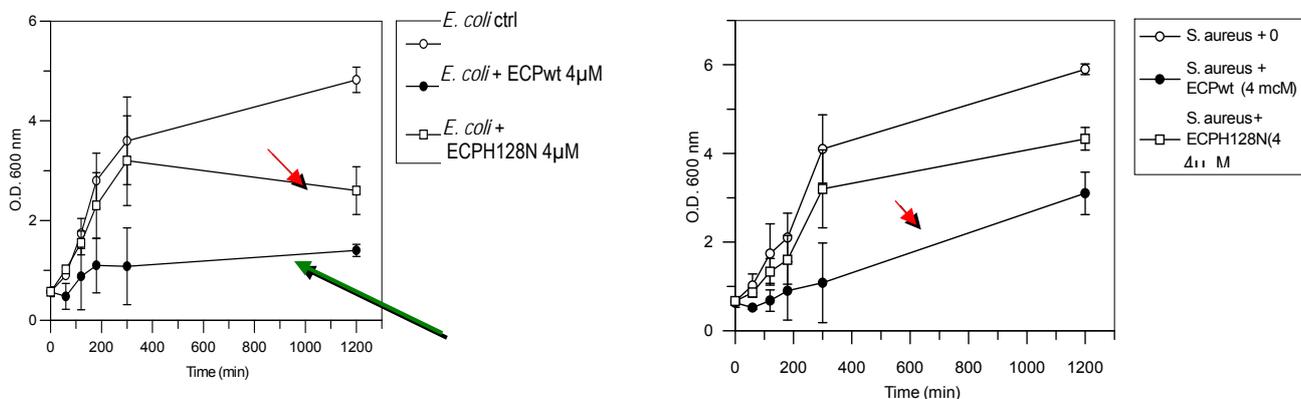


Fig. 140. Comparación de las figuras 77 y 79 en las que se aprecia la recuperación paulatina de los cultivos a tiempos largos (flecha verde), tras exposición a RNasa 3/ECP y la diferencia de resistencia de *S. aureus* respecto a *E. coli* (flechas rojas cortas).

La cinética mostrada para *E. coli* en presencia de 4 μM de ECP/RNasa 3 nos muestra una bajada de la densidad de crecimiento en función del tiempo y como el mutante ECP-H128N presenta una clara deficiencia en su actividad bactericida. Se observa una reducción de similares características para el crecimiento bacteriano para la especie Gram -positivo.

### 6.2.2 Agregación celular bacteriana

La agregación de las células bacterianas es un efecto comprobado de la RNasa 3/ECP, como se ha comentado previamente. Esta agregación ya ha sido descrita en resultados de nuestro grupo y contribuye en la actividad citotóxica de la proteína (Torrent et al, 2009b). Este efecto tiene unas consecuencias a nivel macroscópico que se pueden inferir de la diferencia entre los valores de turbidez (OD<sub>600nm</sub>) y viabilidad celular (detección de ATP intracelular).

En relación a los resultados previamente comentados de registro de la turbidez como medida del crecimiento de los cultivos (medición de la densidad óptica a 600 nm), se pudo observar cierta diferencia en comparación con los resultados de viabilidad, que pueden atribuirse a un proceso de agregación de las

bacterias. La agregación hace disminuir la turbidez del cultivo pero inicialmente no conlleva la muerte de las bacterias (ver Fig. 76 de la sección de Resultados).

### 6.2.3 Efectos de la expresión endógena de la RNasa 3/ECP y mutantes estudiados.

Los resultados de la expresión recombinante endógena a bajo nivel de la RNasa 3/ECP, son claramente letales para la bacteria transformada (*E. coli Rosetta Gami*) con el plásmido que contiene el gen para dicha proteína. Se utiliza como control la misma cepa transformada con el plásmido vacío (ver las figuras 92 y 93). La identificación que se realiza en los experimentos de *Western Blot* y zimograma confirman la dependencia de ese efecto con la presencia de la proteína. Los efectos son notables desde el primer momento en que se induce la expresión de la proteína. Esta afectación de la viabilidad tan temprana lleva a la conclusión que la RNasa 3/ECP también está realizando una acción bactericida desde el interior de la célula. En posteriores apartados se podrá discernir si depende únicamente de sus propiedades sobre la desestabilización de la membrana o también de su actividad RNasa.

La posibilidad de expresión endógena a baja escala se ha utilizado con éxito para expresar una colección de mutantes de la RNasa 3/ECP y realizar un cribado en cuanto a la afectación de la actividad bactericida de cada uno de ellos. Se asume que con la expresión a baja escala y las condiciones que facilitan el plegamiento en la cepa *Rosetta Gami* se podrá obtener la proteína soluble en estado nativo. Se ha valorado que la relevancia de cada mutante será mayor en función de cuanto disminuya su acción bactericida con respecto a la observada para la RNasa 3/ECP nativa. Obviamente el método sólo permite un cribado inicial de los mutantes pero no permite discernir cuál es el mecanismo de acción, que puede depender tanto de la actividad RNasa como una actividad bactericida dependiente de la superficie de interacción de la proteína. Para un estudio extensivo de cada mutante, es necesaria sin embargo su expresión a gran escala y posterior purificación.

Se ensayaron los mutantes de RNasa 3/ECP indicados a continuación:

Relacionados con el centro activo: H128N, H128NH15N

Relacionados con la región N-terminal: W35A, R36A, W35AR36A,

Relacionados con aminoácidos de superficie, catiónicos y aromáticos: R66A, R76A y R77A.

Relacionados con la región C-terminal: D130N .

Los resultados presentan cierta discrepancia entre los que se obtienen por cfu's y los que se obtienen por determinación de ATP, deduciéndose que pueden existir un efecto agregante diferencial de ciertos mutantes sobre las bacterias. En el recuento de cfu's su actividad queda muy aminorada mientras que por viabilidad el decremento no es tan importante. En general, observamos que en los mutantes de centro activo, la variación respecto a la proteína nativa es importante, se verá más adelante si esto puede ser debido a una actividad RNasa aminorada o anulada. No obstante, respecto a los mutantes de centro activo se hablará más detenidamente en los apartados relacionados tanto con la actividad RNasa como con la actividad antibacteriana.

Los mutantes relacionados con la región N-terminal tienen un efecto considerable y sinérgico en su mutación combinada. También se compararon los resultados en relación al análisis de péptidos derivados de la región N-terminal.

Los mutantes de argininas estudiados parecen estar implicados en la actividad antibacteriana, pero la sustitución individual de dichas argininas no es determinante en la actividad final, como es el caso de la posición R77 o la R66, indicando que cada carga de superficie tiene un efecto aditivo con los otros residuos pero que individualmente no producen un efecto importante. Es destacable que el mutante doble (ECPW35AR36A) tiene un efecto muy superior a los efectos independientes de cada mutación. Los resultados previos del grupo (Torrent et al, 2007) indicaron como el residuo W35, expuesto al exterior, facilita la interacción con las membranas.

Por otra parte, el mutante que más se aleja de la actividad de la proteína nativa es el D130N. Hipotetizamos que probablemente, la sustitución que representa, tenga efectos a nivel estructural y/o pueda afectar indirectamente la actividad RNasa, ya que se sabe que no es un residuo que participe directamente en el centro activo ni de las propiedades catiónicas de superficie que son los dos factores más importantes para explicar la actividad citotóxica de la RNasa 3/ECP. Se deduce de la estructura de la proteína que este residuo de aspártico del extremo C-terminal de la RNasa 3/ECP puede estar implicado en la estabilización del centro activo con la probable interacción con la His64.

#### 6.2.4 Efectos sobre el RNA celular bacteriano

Aunque la RNasa 3/ECP tenga una actividad muy reducida en relación con la ribonucleasa A en los sustratos ensayados (Boix et al, 1999a), su capacidad para degradar el RNA es significativa. Así se ha mostrado también en los resultados de esta tesis, tanto si se expresa de forma endógena en la cepa *Rosetta Gami* como en la exposición exógena por incubación de cultivos bacterianos. A partir de la comparación de la degradación del RNA con la actividad bactericida (Figs. 141 a y b para *E. coli* y *S. aureus* respectivamente) observamos un paralelismo entre degradación de RNA y la actividad bactericida, sin poder establecer, sin embargo, si existe una dependencia directa.

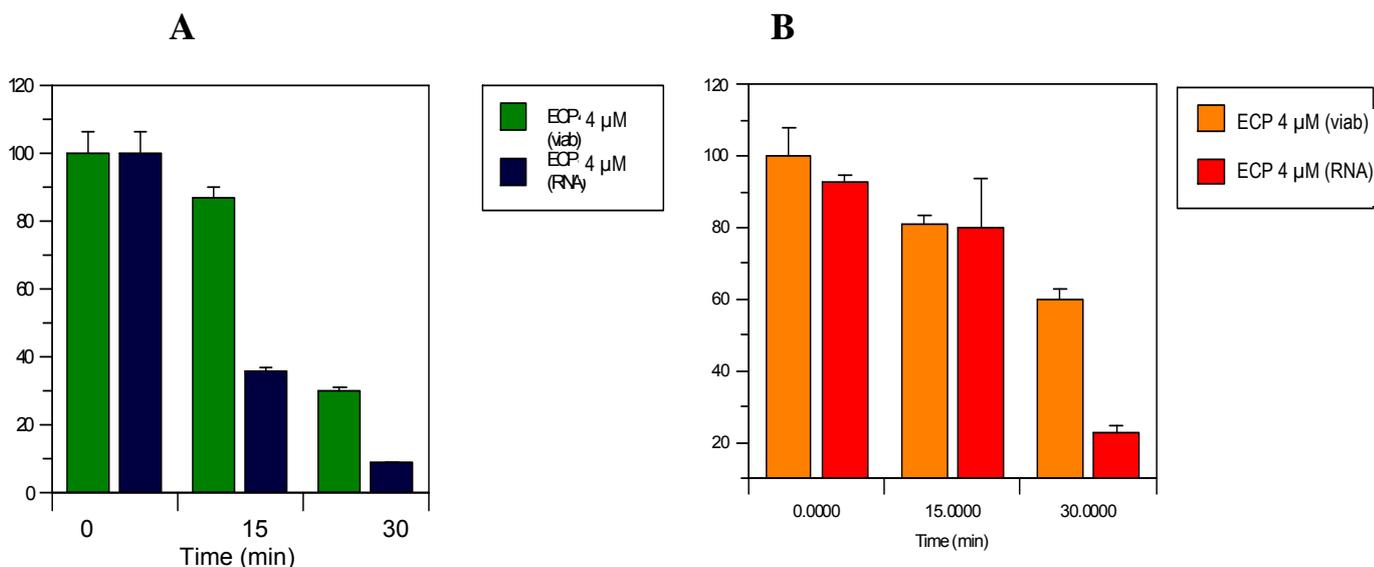


Figura 141. Gráfica comparativa entre la degradación de RNA y la viabilidad de *E. coli* (gráfica A) y *S. aureus* (gráfica B) por incubación con RNasa 3/ECP. El nivel de degradación del RNA se cuantificó a partir del pico de intensidad de la banda 23S de rRNA, y la viabilidad mediante registro de los niveles de ATP por luminiscencia, ambas corregidas como porcentajes respecto a sus controles. La RNasa 3/ECP se incubó a 4  $\mu$ M en cultivos crecidos a una OD<sub>600nm</sub> de 0.7 y luego el RNA se extrajo por el método de Qiazol o medida de la viabilidad. Los valores son media de dos experimentos y la barra de error su desviación standard.

Los experimentos con el mutante para el centro activo (RNasa 3/ECP-H128N) muestran una reducción drástica de los efectos de degradación del RNA por parte de la RNasa 3, tanto a nivel exógeno como expresada de manera endógena en la cepa *Rosetta Gami* de *E. coli*. Los resultados nos llevan a descartar que los citados efectos degradativos sobre el RNA puedan ser principalmente debidos a efectos subsidiarios a la desestabilización de la membrana que pueda ejercer la RNasa 3/ECP, (Figs. 112 y 113). Se descartaría por tanto que el efecto observado de la degradación del RNA fuera principalmente consecuencia de la acción de las RNasas endógenas bacterianas.

Un interesante aspecto de la actividad catalítica de la RNasa 3/ECP sobre el RNA es que se detecta a tiempos relativamente cortos de incubación de los cultivos con la proteína. Esto es así incluso cuando la actividad bactericida de la proteína no es significativa. En cambio, la degradación del RNA es significativa en una etapa previa al proceso de lisis celular bacteriana.

Finalmente comentar que la inhibición de la RNasa 3/ECP por el RI placentario humano, parece proporcionar un efecto protector de la viabilidad celular bacteriana. Este hecho podría interpretarse como una posible afectación de la viabilidad celular bacteriana dependiente de la actividad RNasa, pero los resultados no son completamente determinantes, dado que podría existir un efecto de enmascaramiento espacial de la RNasa 3/ECP por parte de RI, dado el mayor tamaño de este último con respecto a la RNasa 3. También debe considerarse su mecanismo de interacción, en el que el inhibidor envuelve parcialmente a la RNasa.

#### 6.2.5 Aproximaciones teóricas sobre potenciales interacciones de la RNasa 3/ECP.

Hasta la fecha, sólo se ha descrito una interacción funcional proteína-proteína para la RNasa 3/ECP. Dicha interacción podría aportar información sobre su mecanismo de acción bactericida. Un estudio de la bibliografía de interacción de proteínas *Two Hybrid* con el cDNA de células neuroendocrinas (Wu et al 2004) ha podido identificar una pareja de interacción con la RNasa 3/ECP: la carboxipeptidasa E (CPE). Esta es una proteína transmembrana que se encarga principalmente de digerir precursores hormonales y neuropéptidos de alto peso molecular para permitir su entrada en células endocrinas, ejerciendo una función clave en procesos de bucle autocrino. Aunque el rastreo inicial se llevó a cabo en los mismos cultivos de expresión de *Saccharomyces cerevisiae*, se ha vuelto a probar y a confirmar en el mismo modelo neuroendocrino (línea celular GH3) del cual se ha extraído el cDNA. Lo más notable de este hallazgo es que precisamente la interacción y la acción proteolítica de la carboxipeptidasa E son necesarias para la internalización de un fragmento de la RNasa 3/ECP en la célula y su posterior acción. Asimismo se llevaron a cabo estudios de interacción con RNasa 3/ECP utilizando mutantes de la CPE para las zonas potencialmente implicadas en la misma interacción. Los autores consiguieron delimitar una zona entre los aminoácidos 318 y 397 de la carboxipeptidasa, que era indispensable para dicha interacción.

La información que se ha podido obtener a partir del artículo de Wu y colaboradores (2004) nos ha permitido realizar una aproximación teórica en la presente tesis. Se pretende mostrar una homología de una zona de interacción de la RNasa 3/ECP con su *partner*, en otras proteínas de *Escherichia coli* o de otras especies potencialmente patógenas. Esto se hizo, contrastando con la secuencia 318-397 de la carboxipeptidasa frente al proteoma de la bacteria mediante la herramienta online BLAST (*Basic Local Alignment Strategy Tool*) en dicho organismo. No se encontró apareamiento alguno. También se ejecutó esa búsqueda de apareamiento de secuencias, entre la secuencia identificada de la CPE (318-397) frente a proteoma de *E. coli* por entero, para conocer si habría una peptidasa similar. Se encontraron correlaciones muy débiles de apareamiento con la mureinaminidasa de la superfamilia M13 y varias homólogas a proteasas, entre ellas la murein peptidasa A. Los valores de E-value indican la significación estadística del alineamiento, es decir, la probabilidad de que el apareamiento resultante de la búsqueda sea al azar. Pueden empezarse a considerar significativos valores a partir de 0.001. Las homólogas encontradas no presentaban una significación estadística apreciable y por lo tanto se sugiere que sería descartable como posible par de interacción. Aunque siempre sería necesaria una confirmación experimental. Por otra parte, la presencia de esa región única no debería ser exclusiva para la interacción en otras regiones de una hipotética proteasa en procariotas de parecidas características a la CPE. Precisamente, se encontraron también por herramienta BLAST una serie de homología con E-values muy significativos, entre la CPE descrita y zinc-carboxipeptidasas bacterianas.

No obstante, si el análisis de homología de esta proteína se lleva a cabo confrontándolo con el proteoma humano (tanto la secuencia de interacción como la de la proteína entera), se podían encontrar otras proteasas de la misma familia que sí pudieran presentarse como posibles pares de interacción dada su alto grado de identidad, homología y significación estadística (Fig. 142), sugiriéndose que pudieran ser proteasas de la ECP/RNasa 3 en otros entornos fisiológicos en el propio huésped. Entre estas proteínas cabría destacar la Carboxipeptidasa N, que como la RNasa 3/ECP se puede encontrar en plasma (Kuoppala et al, 2000). Sugerimos que la escisión de la RNasa 3/ECP que

podiera producirse en este entorno fisiológico pudiera facilitar la internalización de fragmentos proteolíticos.

**Sequences producing significant alignments:**

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value
<a href="#">NP_001864.1</a>	carboxypeptidase E preproprotein [Homo sapiens]	846	846	100%	0.0
<a href="#">NP_001299.1</a>	carboxypeptidase N catalytic chain precursor [Homo sapiens]	404	404	93%	8e-113
<a href="#">NP_003643.2</a>	carboxypeptidase Z isoform 2 precursor [Homo sapiens]	395	395	93%	3e-110
<a href="#">NP_001014448.1</a>	carboxypeptidase Z isoform 3 [Homo sapiens]	395	395	93%	3e-110
<a href="#">NP_001014447.1</a>	carboxypeptidase Z isoform 1 [Homo sapiens]	395	395	93%	3e-110
<a href="#">NP_001295.2</a>	carboxypeptidase D precursor [Homo sapiens]	386	887	93%	2e-107

*Figura 142. Alineamiento mediante BLAST de la secuencia aminoacídica del fragmento 319-397 de la CPE con el proteoma humano, los E value son óptimos al encontrarse muy por debajo de un valor de corte de  $10^{-4}$ . Todas las secuencias tuvieron una etiqueta G, que representa una secuencia con acceso GenBank (es un gen bien documentado). El mismo blast con la secuencia entera de la proteína dio resultados prácticamente idénticos apareciendo las mismas proteínas candidatas.*

En conclusión, la región de interacción 319-397 de la CPE humana con RNasa 3/ECP no se encuentra en proteínas bacterianas, ni existe apreciable homología de secuencia con ninguna proteína bacteriana utilizando toda la secuencia de la CPE humana. Por otra parte con los hallazgos de homología encontrados sobre proteoma humano, entre los que se encuentran otras carboxipeptidasas presentes en plasma, se puede sugerir la hipótesis de una proteólisis de la RNasa 3/ECP que pudiera potenciar la internalización celular de fragmentos resultantes de la proteólisis y su actividad citotóxica.

### 6.3 Caracterización de la actividad antibacteriana de la RNasa 7

Se ha caracterizado la actividad bactericida de la RNasa 7 expresada en nuestro laboratorio (Torrent et al, 2010), realizando un estudio comparativo con la RNasa 3/ECP mediante las técnicas detalladas en Materiales y Métodos.

Previamente se realizó una comparación de las dos variedades identificadas como se describe en la siguiente sección.

#### 6.3.1 Análisis de las variedades P75Y93 y A75H93 de la RNasa 7

Al iniciar nuestro trabajo con la RNasa 7, en el momento de comprobar la secuencia de clonaje procedente del gen cedido por la Dra. Helene Rosenberg

(NIH, Bethesda MD) hallamos una secuencia genética distinta de la publicada previamente por el grupo del Dr. Jurgen Harder (Universidad de Kiel, Alemania). Encontramos así que existían dos variantes de la misma proteína por comparación de las secuencias de DNA. Tal diferencia no había sido comentada o advertida previamente. La secuencia del grupo de Harder tiene el número de acceso de GenBank AY170392 mientras que la variedad descrita por Rosenberg y colaboradores tiene el número de acceso AJ306609. La diferencia consistía en dos sustituciones: de una alanina en la posición 75 para la variedad “Rosenberg” por una prolina en la variedad “Harder”, y una histidina en la posición 93 en la variedad “Rosenberg” por una tirosina en la del grupo de Harder. La RNasa 7 del grupo de Rosenberg se mostró con una alta expresión en riñón, dados los resultados publicados en los que muestran un experimento de *Southern*. Por otra parte la secuencia identificada por Harder y colaboradores procede de la proteína purificada de queratinocitos. En nuestro laboratorio obtuvimos satisfactoriamente la variedad P75Y93 “Harder” mediante mutagénesis dirigida de los dos residuos ya comentados, a partir del cDNA suministrado por el grupo de la Dra. H. Rosenberg. Como la mutagénesis dirigida se hizo de manera secuencial, es decir, una reacción de PCR para una primera mutagénesis y después la otra sobre la secuencia de DNA ya mutada, también obtuvimos “variedades parciales” como etapas intermedias del proceso (variantes A75P y H93Y a partir de la secuencia descrita por Rosenberg y colaboradores). Estas variedades nos permitieron evaluar la aportación de cada uno de los aminoácidos sustituidos por separado a las propiedades generales de la proteína. Al comprobar que ni la doble sustitución, ni ninguna de las sustituciones parciales modifican significativamente la actividad bactericida de la RNasa 7 no se consideró relevante estudiar con más detalle cada una de las variantes individualmente.

Se analizó un estudio comparativo teórico a partir de la estructura tridimensional obtenida por RMN (Huang et al., 2007). A priori, la sustitución A75P podría considerarse un cambio de residuo bastante drástico. Nos propusimos trabajar teóricamente con la hipótesis de que este cambio podría comportar algún cambio conformacional en la proteína, sobre todo al comprobar que, mediante el análisis de la estructura tridimensional, la prolina

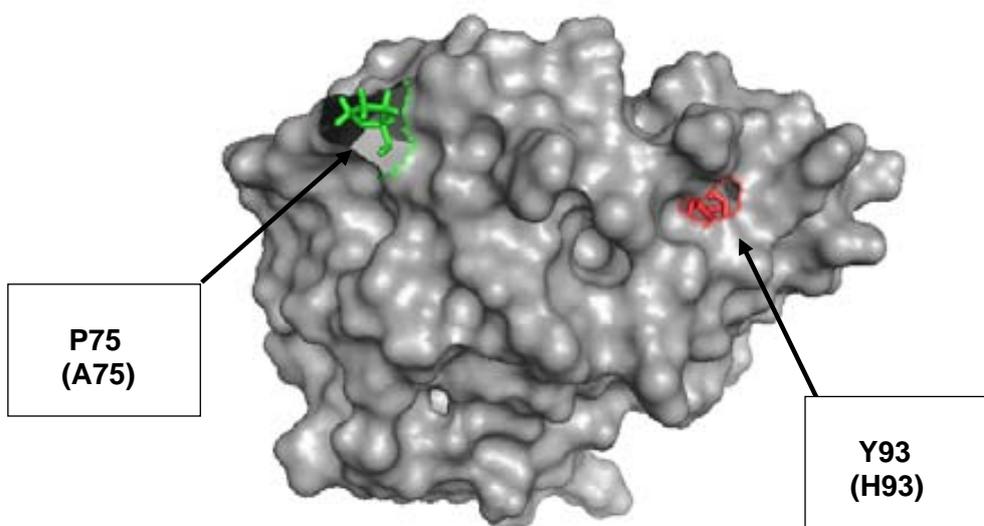
se encuentra en posición *cis*. Esto supone que es un residuo con mayor restricción estérica que si estuviese en *trans* y esto a su vez podría tener consecuencias sobre la vecina Arginina 77 que está implicada en la actividad bactericida. Sin embargo, no se observan diferencias significativas experimentalmente. Otro dato que se extrae al observar los resultados estructurales de RMN para la RNasa 7 (Huang et al, 2007) es la exposición de este aminoácido hacia el exterior por lo que no parece probable que afecte a la conformación de la proteína. Mediante un análisis previo de predicción de la estructura secundaria por el programa online JPred (Cole et al, 2008) se observó su ubicación, en un bucle entre una hélice- $\alpha$  y una lámina beta (Fig. 144). Dicho bucle aparece orientado hacia el exterior, dato que confirmaron los resultados por RMN (Huang et al, 2007).

La sustitución H93Y, estéricamente no parece comportar ninguna diferencia importante, pero representa un cambio de aminoácido polar a aminoácido aromático. En este sentido, es de destacar que el anillo imidazol de la histidina es protonable mientras que el grupo hidroxilo de la tirosina no es probable que se ionice en condiciones fisiológicas. Gracias a la representación obtenida con el programa JPred (Fig. 144) y a partir de la estructura tridimensional publicada por Huang y colaboradores (2007) podemos ubicar el residuo 93 en mitad de la lámina- $\beta$ 4. Aunque los resultados funcionales indicasen que el cambio entre la histidina y la tirosina no debiera suponer un cambio drástico en las propiedades de la proteína, era necesario un análisis detallado para resolver la ubicación y orientación dichos residuos en la estructura. Utilizando el programa Pymol de representación molecular (Fig. 143), pudimos visualizar cómo en ambas variantes los aminoácidos en la posición 93 tienen sus cadenas laterales hacia el interior de la proteína. A continuación, con el programa *pdviewer* se analizó si la histidina o la tirosina pudieran estar implicadas en la formación de puentes de hidrógeno. El análisis de los modelos tridimensionales indicó que no había proximidad de otros residuos susceptibles de establecer puentes de hidrógeno (estableciendo una distancia mínima de 3.4 Å). Se comprobó también la vecindad de cualquier residuo a distancias de Van der Waals con el mismo análisis de modelos moleculares mediante el programa *pdviewer*. Los resultados indicaron que, entre las dos variantes de la RNasa 7 (ya fuera la que

presenta una histidina en esa posición o una tirosina) analizando las distancias a los aminoácidos vecinos, sólo se observa una diferencia en un único residuo:

Residuos a distancia de Van der Waals de Y93	Residuos a distancia de Van der Waals de H93
M27	R92
K82	K82
L83	L83

Así, comparando la posibilidad de interacciones de Van der Waals con residuos vecinos se identifica un único aminoácido distinto. Por tanto, se concluye que no parecen haber variaciones significativas en el entorno y la diferencia estructural no es relevante. El análisis estructural explicaría la ausencia de diferencias significativas en las pruebas que se realizaron posteriormente, tanto de actividad antibacteriana, como de actividad RNasa para las dos variantes de la RNasa 7.



*Figura 143. Esquema de superficies moleculares para la RNasa 7 generado por el programa pymol, a partir de las coordenadas depositadas en el protein data bank (pdb) Huang et al (2007). Se han identificado y reseñado las posiciones aminoacídicas que constituyen la variedad de queratinocitos (P75Y93) (Harder et al., 2002) y entre paréntesis las correspondientes sustituciones en la variedad de riñón (A75H93) (Zhang et al., 2003).*

**Secondary structure:**

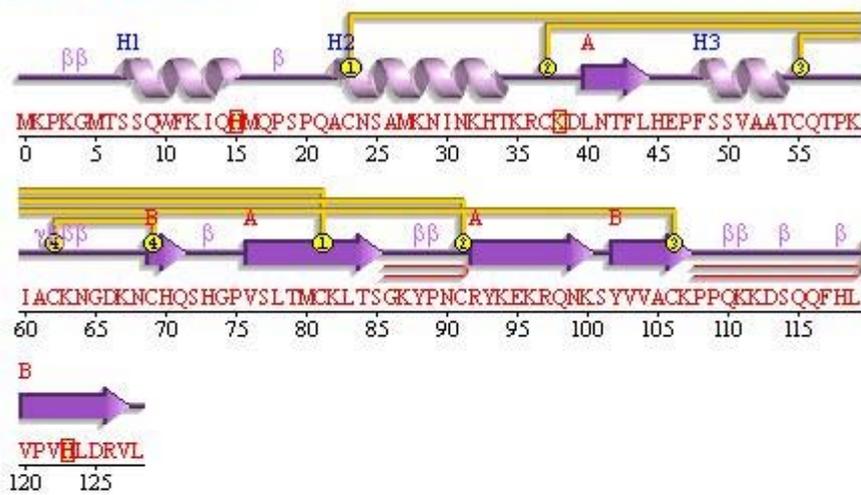


Figura 144.  
Representación esquemática de las estructuras secundarias predichas mediante el programa JPred para la secuencia de la RNasa 7.

Concluyendo que no existen diferencias significativas entre las dos variantes se utilizó la variedad Harder (P75Y93) para realizar la mayoría de experimentos comparativos con la RNasa 3.

Por otra parte, se realizó un análisis de las secuencias de las proteínas de la superfamilia de la ribonucleasa A con la intención de comparar la secuencia de la RNasa 7 con sus homólogos más cercanos (Ribonucleasas 6 y 8, según estudios de Dyer & Rosenberg, 2006). En este análisis se pudo comprobar que las posiciones 75 y 93 corresponden a Prolina y Tirosina respectivamente en las ribonucleasas más homólogas (Fig. 145), coincidiendo en las mismas posiciones con la variedad P75Y93 (“Harder”) de la RNasa 7. Este hecho parece indicar que esta variedad es la que correspondería al genotipo más antiguo y que la variedad A75H93 (“Rosenberg”) pudiera consistir en un polimorfismo o variedad de tejido menos frecuente.

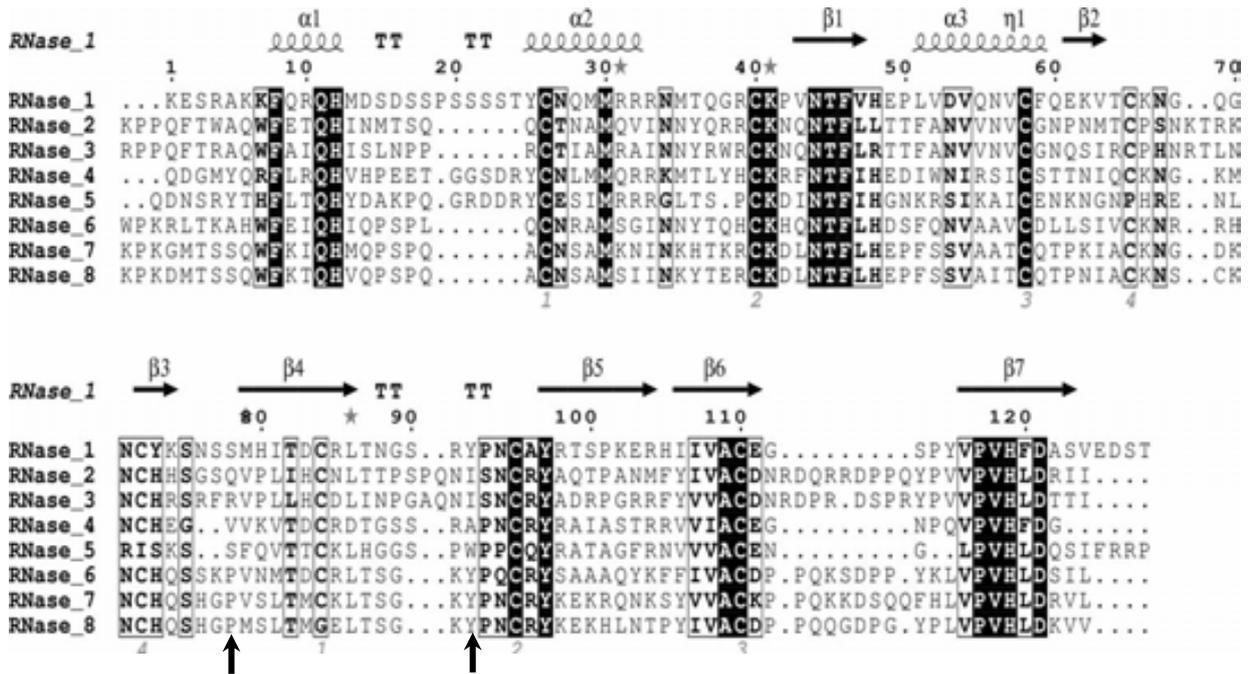
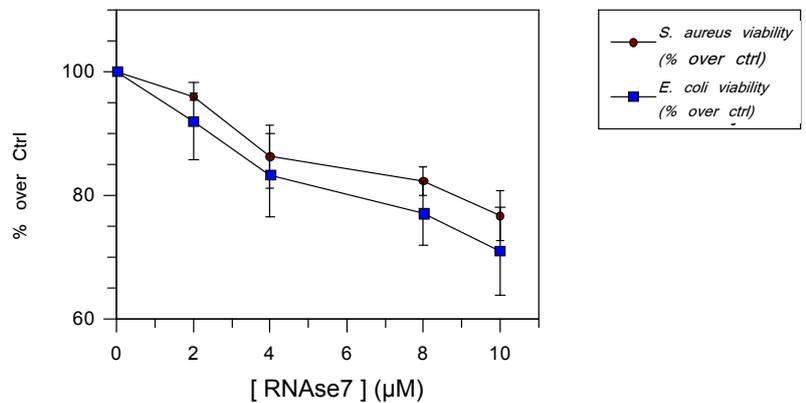


Figura 145. Representación comparativa de las secuencias aminoacídicas de las RNasas humanas de la superfamilia de la RNasa A. En estas secuencias puede notarse (flechas verticales) la conservación de la tirosina en la posición 93 y prolina en la 75, para la RNasa 7. Extraído de Boix et al, 2008.

Todos los estudios comparativos entre las RNasas 3 y 7 se realizaron por tanto con la variedad de queratinocitos (P75Y93).

Se estudió la actividad bactericida a diferentes concentraciones de RNasa 7 en cultivos bacterianos en fase logarítmica, tanto para *E. coli* como para *S. aureus*, mediante el método de viabilidad celular bacteriana por detección de niveles de ATP intracelular. Por este método, se ha valorado actividad bactericida de la RNasa 7 en un intervalo de concentraciones hasta 10  $\mu\text{M}$ , tal como se muestra en la gráfica (Fig. 81 de la sección de Resultados).



Finalmente se constata que para cualquiera de las condiciones y pruebas realizadas, la actividad bactericida de la RNasa 7 fue siempre ligeramente superior que la RNasa 3/ECP. Por otra parte, decir que otros experimentos preliminares de evaluación del crecimiento bacteriano por medición de la densidad óptica (no presentados) dieron resultados paralelos.

Estudios en modelos de liposomas proponen una diferencia en el mecanismo de acción bactericida de las dos RNasas. La explicación radica en el hecho de que la RNasa 7 puede tener un efecto desestabilizador local en las membranas de las células por un mecanismo diferente al de la RNasa 3/ECP (Torrent et al, 2009a). Otra explicación que hipotetizamos aquí, podría radicar en que la actividad ribonucleasa más elevada en la RNasa 7 esté ejerciendo un efecto determinante en la toxicidad de la proteína. Esta afirmación podría rebatir los resultados de Huang y colaboradores (2007), referencia apoyada en la hipótesis de la independencia de la actividad RNasa de la actividad bactericida de las RNasas. Los autores realizan un experimento con mutantes de centro activo en el que concluyen que la actividad bactericida no se ve afectada. Sin embargo, en el gráfico mostrado por dichos autores (Fig. 28 de Introducción) sí que podría considerarse una diferencia significativa entre la proteína nativa y los mutantes de centro activo a concentraciones muy bajas ( $0.1 \mu\text{M}$ ), que coincide con nuestro rango de concentraciones de trabajo.

En la figura 146 se muestra la relación entre la actividad ribonucleasa y la actividad antibacteriana. Se realizó el mismo análisis gráfico con correcciones de magnitudes con respecto a su control que se hizo para la RNasa 3/ECP. En las gráficas 147 a y b se incluye una comparación detallada.

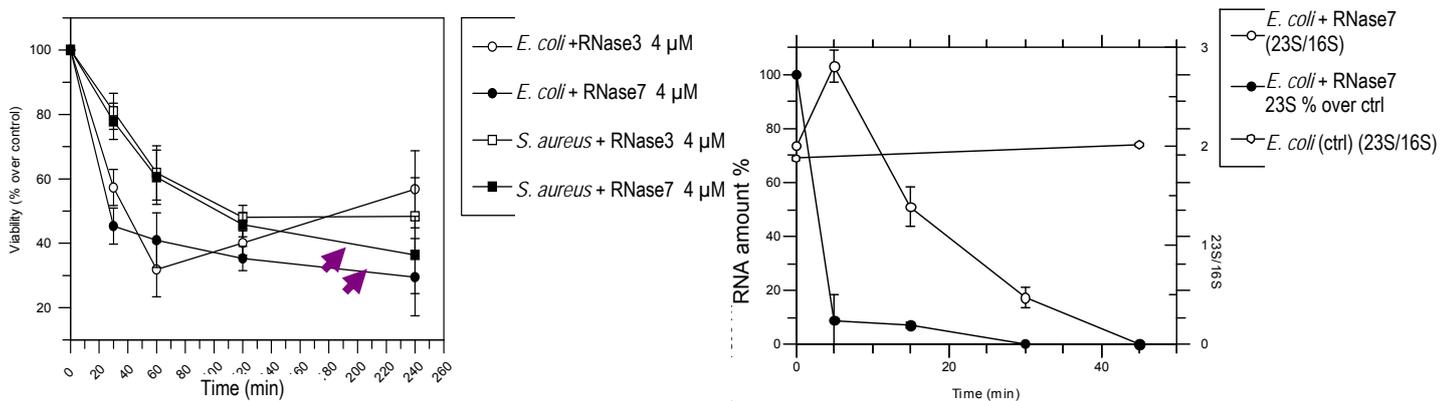


Fig. 146. Comparación de la actividad de viabilidad (izquierda) y de degradación de RNA (derecha) (Figs. 83 y 111 de Resultados respectivamente) contrastando la letalidad con respecto a la eficiencia de degradación de la RNasa 7. Las flechas púrpura indican la actividad bactericida a tiempos finales de la RNasa 7.

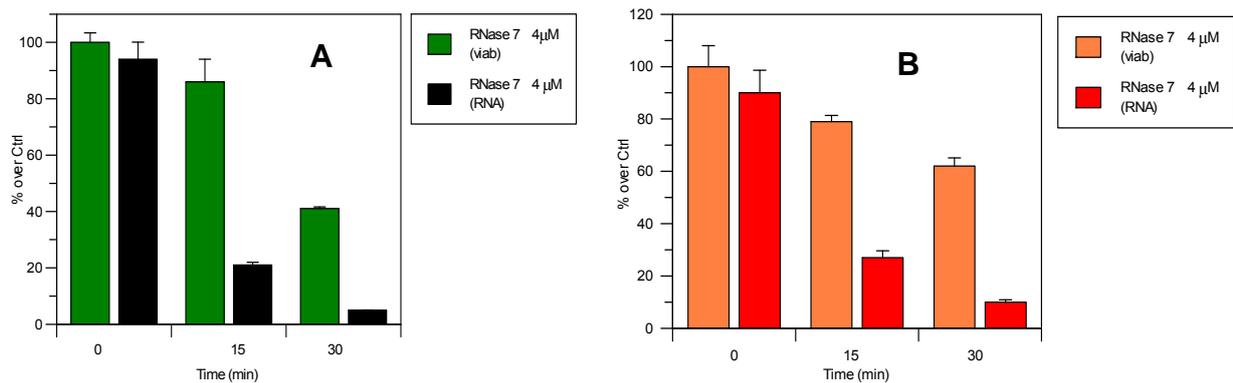


Figura 147. Gráfica comparativa entre la degradación de RNA y la viabilidad celular bacteriana, tanto para cultivos de *E. coli* (A) como de *S. aureus* (B) incubados con RNasa 7. La cuantificación de RNA proviene del pico de intensidad de la banda 23S del rRNA, y la viabilidad de la medida de ATP por luminiscencia indirecta, ambas corregidas como porcentajes respecto a sus controles. La RNasa 7 se incubó a 4 μM en cultivos crecidos a una OD<sub>600nm</sub> de 0.7 y a continuación el RNA se extrajo por el método de Qiazol. Los valores son media de dos experimentos y la barra de error su desviación standard.

Es interesante comprobar como el efecto bactericida a tiempos largos de la RNasa 7 es ligeramente mayor en relación a la RNasa 3/ECP, así como su actividad de degradación del RNA. Se puede especular que la menor actividad catalítica de la RNasa 3/ECP comprometería en menor grado la viabilidad de la

célula a tiempos largos, dado que los RNA's implicados en la supervivencia de la célula no estarían tan afectados como en las células incubadas con la RNasa 7. Según esta hipótesis podría considerarse que la primera etapa de interacción con la pared celular y disrupción de la membrana citoplasmática sería más rápida y posteriormente vendría una fase en la que la degradación del RNA podría comprometer la viabilidad de las bacterias a medio y largo plazo.

#### **6.4 Papel potencial de la actividad ribonucleasa de la RNasa 3/ECP y la RNasa 7 en su actividad antibacteriana**

Una vez descritos los efectos de la RNasa 3/ECP y la RNasa 7 y sus variantes, tanto sobre la viabilidad celular bacteriana como la actividad de degradación del RNA celular, se puede realizar ciertas deducciones que nos llevan a reconsiderar el concepto de que la actividad de las ribonucleasas no es importante para la actividad antibacteriana de estas proteínas. Esta hipótesis está prácticamente asentada en la bibliografía pero en realidad se sostiene en datos experimentales poco concluyentes (Rosenberg 1995, Huang et al 2007). En los resultados experimentales de esta tesis, hemos podido asociar un descenso de la actividad ribonucleasa a un descenso de la letalidad (modesto según el método de detección) y una letalidad mayor de una ribonucleasa (RNasa 7), con una actividad ribonucleasa asociada mayor. Esta relación se ha podido observar reiteradamente en diversos experimentos ya fuera con los experimentos de densidad óptica de crecimiento en los que el mutante de centro activo era el RNasa 3/ECP-H128N, o ya fuera por algunos resultados (recuento de cfu's) con el doble mutante RNasa 3/ECP H15NH128N (resultados preliminares). Los resultados han mostrado una actividad bactericida aminorada respecto a la RNasa 3/ECP nativa. Esta deficiencia la podemos atribuir al descenso de la actividad enzimática de la ribonucleasa ya que la sustitución de Histidina por Asparagina no debería alterar la estructura de la proteína respecto a la proteína nativa. Por otra parte, los resultados de la actividad enzimática residual del mutante ECP H128N (mediante análisis por zimograma) parecen sugerir un plegamiento correcto de la proteína, como deducción de la conservación del entorno espacial del centro activo. Sin embargo, sería necesario un estudio

estructural para confirmar que las estructuras tridimensionales son comparables a la proteína nativa.

Para dilucidar la importancia de la actividad ribonucleasa en la actividad bactericida de la RNasa 3/ECP fueron clave los estudios realizados con el mutante de RNasa 3/ECP para el centro activo H128N en los que se constató un déficit de la actividad ribonucleasa paralelo a una actividad antibacteriana claramente aminorada (Figs. 148 a y b). Estos resultados preliminares nos sugieren que la actividad ribonucleasa sí tiene un papel en la actividad antibacteriana. Los experimentos de RNA y viabilidad para el mutante simple de centro activo ECP-H128N se hicieron utilizando la cepa *Rosetta Gami*® de inducción a bajo nivel y pudieron compararse con el mismo tipo de experimentos con incubación de ECP-H128N purificada sobre los cultivos bacterianos. Por otra parte, ocurre un efecto similar, en experimentos de densidad de crecimiento y viabilidad, para ECP-H128N H15N, doble mutante para las histidinas implicadas en el centro activo. Sin embargo, con el doble mutante el bajo rendimiento de expresión no permitió hacer comparaciones al mismo nivel que el mutante ECP-H128N.

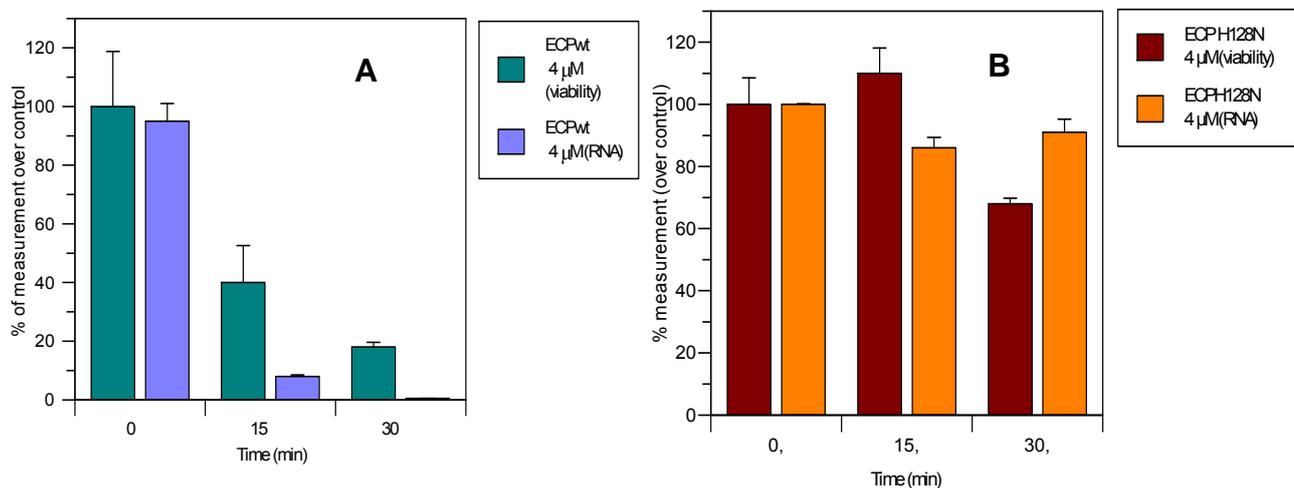


Figura 148. Gráficas de barras de comparación entre la degradación del RNA y la viabilidad de ECP/RNasa 3 wt(A) y ECP/RNasa 3 H128N (B) sobre *E. coli* por adición de la proteína en cultivo bacteriano (acción exógena). Se relacionó como medida de la degradación del RNA, la intensidad de señal de la banda 23S del rRNA, y para la viabilidad celular los niveles de ATP intracelular, ambas medidas referidas como porcentajes respecto a sus controles. La RNasa 3 y la variante mutante se incubaron a 4 μM sobre cultivos a una  $OD_{600nm}$  de 0.7. Los valores son media de dos experimentos y las barras de error su desviación standard.

Tiempo (min)	ECP wt 4µM (viabilidad)	RNasa 3/ECP-H128N 4 µM (viabilidad)	ECPwt 4 µM (RNA)	RNasa 3/ECP-H128N 4 µM (RNA)
0	100±18.7	100 ± 8.5	95 ±	100 ± 0.2
15	40 ± 12.6	110 ± 8.15	8 ± 0.5	86 ± 3.4
30	18 ± 1.77	68 ± 1.6	0.5 ± 0.03	91 ± 4.2

Tabla 17 Resultados numéricos de las barras de las gráficas de la figura 148 (porcentajes respecto a su control para cada medición ya fuera viabilidad celular bacteriana o degradación de RNA bacteriano). Se pueden destacar diferencias significativas, tanto de la viabilidad como de degradación del RNA celular bacteriano, entre la RNasa 3/ECP-H128N y RNasa 3/ECP nativa.

Asimismo, se observa una correlación entre la actividad bactericida y la capacidad de degradación del RNA a nivel endógeno. Esto se demuestra con el mutante ECP-H128N cuyos clones transformantes para el plásmido que lo expresa muestran una viabilidad celular a lo largo del tiempo siempre superior que los clones que expresan RNasa 3/ECP nativa.

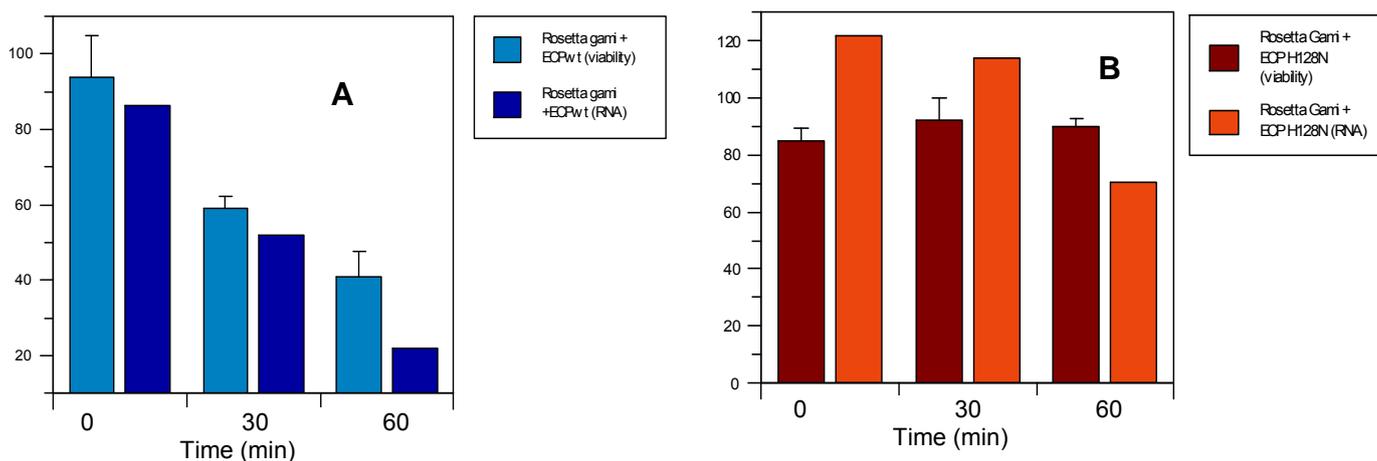


Figura 149. Gráficas de comparación entre la degradación de RNA y viabilidad de RNasa 3 wt (gráfica A) y RNasa 3-H128N (gráfica B) en *E. coli* Rosetta Gami después de la expresión endógena inducida. El RNA fue cuantificado como intensidad de la banda 23S del rRNA, y la viabilidad por cuantificación de los niveles de ATP intracelular. Se corrigieron ambos como porcentaje de su control. La expresión se indujo con 0.4 mM de IPTG en la cepa comercial de *E. coli* Rosetta Gami (crecida a un  $OD_{600nm}$  de 0.6, como está descrito en Materiales y Métodos. Los valores son medias de dos experimentos y la barra de error, su desviación estándar.

Tiempo (min)	<i>Rosetta Gami</i> + ECPwt (viabilidad)	<i>Rosetta Gami</i> + RNasa 3/ECP-H128N (viabilidad)	<i>Rosetta Gami</i> + ECPwt (RNA)	<i>Rosetta Gami</i> + RNasa 3/ECP-H128N (RNA)
0	94 + 11.05	85 + 4.24	86.4 + 0.2	121.5 + 0.1
30	59 + 3.23	92 + 7.75	52.1 ± 0.4	113 ± 0.8
60	41 + 6.47	90 + 2.67	22 ± 0.5	70.2 + 0.9

Tabla 18 Resultados numéricos de las barras de las gráficas de la figura 149 (porcentajes respecto a su control para cada medición ya fuera viabilidad celular bacteriana o degradación de RNA bacteriano). Se pueden apreciar también ciertas diferencias, tanto de la viabilidad como de degradación del RNA celular bacteriano, entre la RNasa 3/ECP-H128N y RNasa 3/ECP nativa.

Los experimentos de expresión a baja escala del mutante de centro activo RNasa 3/ECPH128N complementan los experimentos de adición exógena de proteína y sugieren un efecto colaborador de la actividad ribonucleasa en la actividad bactericida total. Dicho mutante de centro activo está presentando una capacidad bactericida, aminorada respecto a la proteína nativa, que se correlaciona con la actividad RNasa, también aminorada. Si bien el hecho de que estos experimentos estén teniendo un efecto desde el interior de la bacteria nos impide concluir cual sería el efecto en condiciones fisiológicas (condiciones en las que la acción de la RNasa 3/ECP se da exclusivamente desde el exterior de la bacteria). Debemos hacer hincapié en el hecho que los experimentos de expresión endógeno fueron diseñados inicialmente como metodología preliminar rápida de cribado de mutantes. Sin embargo, los resultados con la proteína purificada adicionada al cultivo celular también muestran una afectación de ambas actividades.

#### 6.4.1. Análisis del proceso de degradación del RNA celular por la actividad ribonucleasa

Todos los tipos de RNA probados fueron degradados en mayor o menor medida por las RNasas de este estudio. Los RNA's que se testaron fueron el RNA total extraído de bacteria (*E. coli* BL21), el tRNA (Phe) de *Saccharomyces cerevisiae* de origen comercial, el tRNA de *E. coli* (cepa MK 400, ver apéndice) de origen comercial, y el rRNA de *E. coli* también de origen comercial (ver apéndice). El rRNA resultó ser más sensible a la degradación que el tRNA, como se ha

mostrado en la sección de Resultados y como se relaciona en las figuras que comparan dichos resultados (Fig. 150).

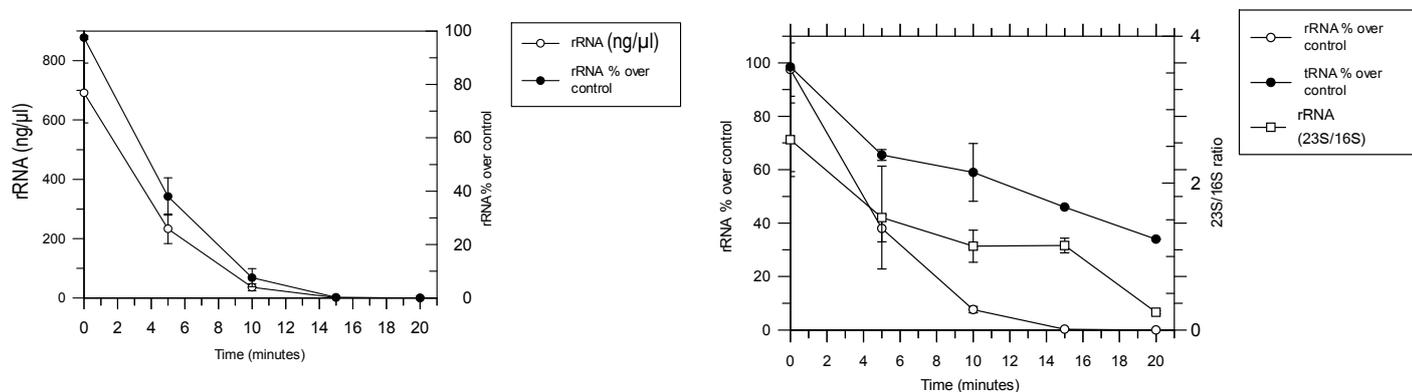


Figura 150 Comparativa de las figuras 122 y 126 , a la izquierda se ensaya la degradación del rRNA comercial (aislado) por la RNasa 3/ECP mientras que a la derecha se trata de experimentos en los que se evalúa el rRNA tras incubación de las RNasa 3/ECP a una concentración de 4  $\mu$ M sobre cultivos bacterianos.

Es interesante destacar que las muestras de RNA total extraído de células bacterianas incubadas con RNasa 3/ECP o RNasa 7, mantienen durante cierto tiempo las bandas de RNA ribosómico relativamente indemnes a la degradación de las RNasas en comparación con el mismo RNA ribosómico libre de proteínas (comercial) que es degradado con mayor facilidad. En este mismo grupo de experimentos el tRNA demostró ser también relativamente resistente, más cuando se halla en extracciones de RNA total que aislado en solución comercial, y a la vez, el tRNA aislado parece aguantar mejor la degradación que el rRNA aislado, (Figs. 122 y 126 ). Por otra parte, los experimentos con incubaciones de RNasas sobre cultivos bacterianos, respecto a los experimentos de incubaciones sobre preparaciones puras de RNA total o RNA's comerciales, parecen mostrar también una protección mayor del RNA a la degradación. Esto se puede explicar por la protección que puedan conferir las proteínas intracelulares que pueden estabilizar el RNA. Por este mismo motivo se podría explicar la mayor susceptibilidad, en el caso de las muestras puras comerciales, del rRNA a ser degradado con respecto al tRNA, dado que este último no requiere de proteínas para estabilizar su estructura, mientras que el ribosómico sí y desproteinizado pudiera presentarse desestructurado en parte y por ello de fácil acceso a las RNasas.

Por otra parte, no se han observado diferencias significativas en cuanto a los dos tipos de tRNA utilizados (*E. coli* y *S. cerevisiae*) que se caracterizan por presentar estructuras secundarias y terciarias similares.

#### Análisis de la degradación de RNA dependiente de las condiciones experimentales

Respecto a la manipulación, es importante descartar en todo momento que tenga lugar una degradación del RNA dependiente de la lisis espontánea de las bacterias y por lo tanto que los efectos observados sean fruto de la degradación del RNA celular por las propias RNasas bacterianas por activación de un proceso de autólisis de la célula bacteriana. Para descartar esta posibilidad se realizó como ya se ha comentado una serie de experimentos en los que se analizaba el RNA después de incubar las células con un agente antimicrobiano desprovisto de actividad RNasa, como el péptido antimicrobiano (ECP 0-38).

Por otra parte, el análisis de los sobrenadantes de cultivo muestra que tras la incubación con RNasas no se detectan cantidades apreciables de RNA en esta fracción. La fracción celular correspondiente al sedimento o *pellet* celular contiene todo el RNA incluso después de la incubación con RNasas. Se deduce entonces que el RNA degradado en los experimentos con incubación de RNasas depende directamente de la actividad RNasa y no proviene de un proceso indirecto activado por lesiones en la membrana plasmática. Al mismo tiempo, como los efectos de lisis bacterianas no son tan inmediatos como la degradación del RNA (véanse los resultados de zimograma y los de viabilidad celular bacteriana por detección de ATP) puede pensarse que la actividad RNasa sea un factor temprano en la actividad antibacteriana de la RNasa 3/ECP. Sin embargo, desconocemos si podría darse un mecanismo de internalización de la proteína sin previa lisis celular, por desestabilización local y reparación de la pared bacteriana. Es de especial interés que la liberación de proteínas intracelulares, evaluada mediante zimograma, indica que este proceso es bastante posterior al inicio de la degradación del RNA celular. Así, se deduce de los tiempos de incubación necesarios para detectar por zimograma cualquier liberación de contenido intracelular (por ejemplo a 20 min la detección de RNasas

intracelulares de *E. coli* aún no se da claramente cuando el RNA se encuentra ya en proceso de degradación (Fig. 151). Es importante poder comparar el proceso de degradación del RNA intracelular con uno de los mutantes de centro activo, porque los resultados con dicho mutante descartan que se esté produciendo una degradación del RNA por efectos indirectos solamente atribuibles a desestabilización de las envolturas celulares bacterianas.

Por último reseñar que la degradación del RNA por RNasa 3/ECP y RNasa 7, se ve influida por el estado de crecimiento. En fase logarítmica las membranas se encuentran más expuestas, al no estar totalmente constituida la pared celular durante los procesos de división celular (Lehrer et al, 1989).

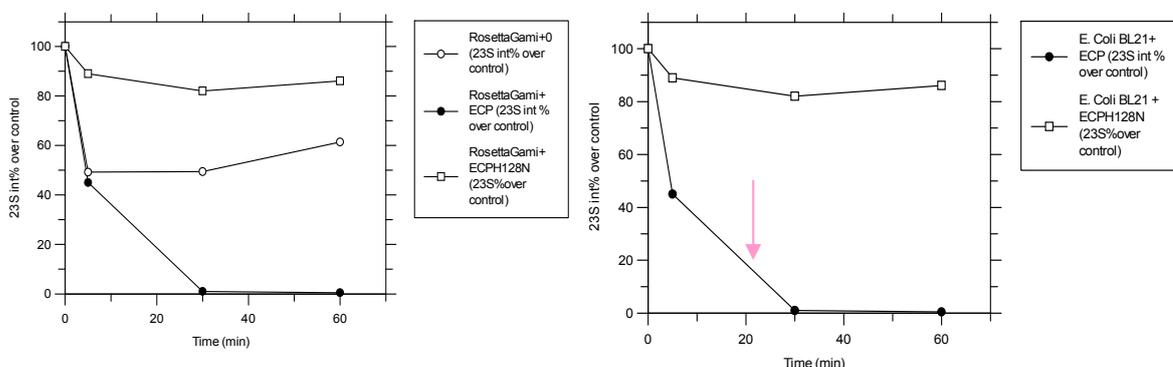


Figura 151. Comparativas de las figuras 112 y 110B, indicando como en un mismo tiempo tanto posterior a la inducción de la expresión endógena, como de incubación de RNasa 3/ECP exógena (4  $\mu$ M), se tiene un efecto detectable sobre el RNA mientras que con el mutante de centro activo ECPH128N la reducción de RNA no es significativa. El tiempo de 20 min se indica como tiempo en el que la lisis de bacterias no se observa por zimograma y la reducción de viabilidad bacteriana es moderada.

Se podría describir un escenario hipotético tal como se esquematiza en la figura 152: los efectos sobre la viabilidad bacteriana dependerían principalmente de sus características catiónicas de la RNasa 3/ECP y de la RNasa 7 y de su interacción con las envolturas de la bacteria, que tras su efecto disruptor sobre la membrana plasmática (mecanismo *carpet like*) permitiría su entrada en la bacteria. Este efecto es sin duda el inmediato y suficiente para conferir la actividad bacteriana a la proteína, pero la actividad RNasa es sin duda, una causa coadyuvante del efecto final bactericida de la RNasa 3/ECP y la RNasa 7, que al parecer se produce en estadios tempranos de este proceso, probablemente en

cuanto una desestabilización local de la pared bacteriana haya permitido el paso de dichas RNAsas.

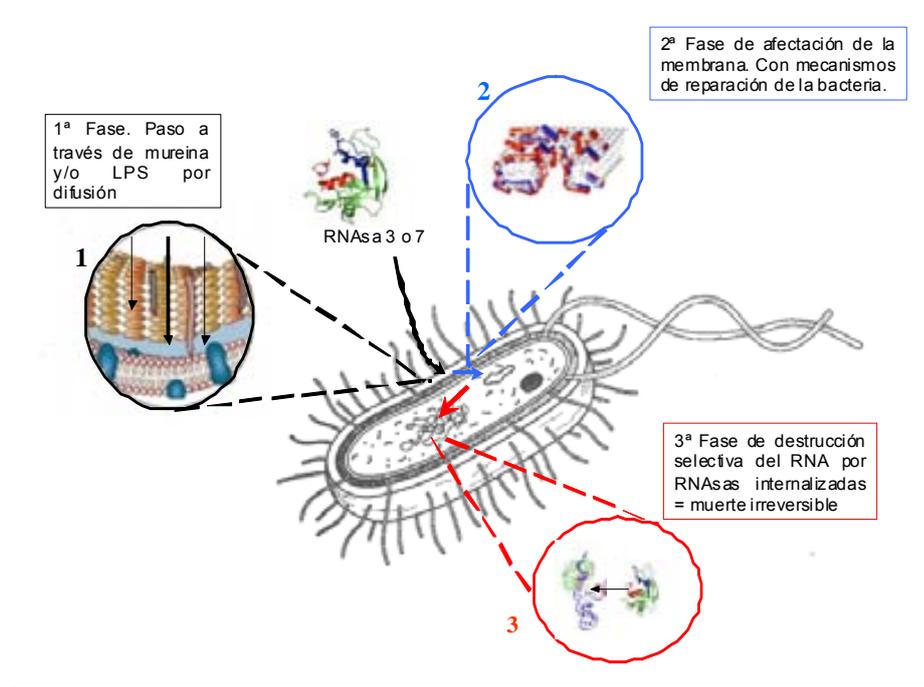


Figura 152 Esquema de la secuencia de eventos propuesta para la acción bactericida de las RNAsas 3 y 7.

Existe otra posibilidad que los resultados preliminares no parecen apoyar, pero que requeriría más experimentos para descartarse totalmente: el proceso de desestabilización de la membrana plasmática por parte de la RNasa 3/ECP (y probablemente también de la RNasa 7 pudiera incrementar la expresión de autolisinas (Lewis, 2000). Mediante transducción de su señal, independientemente de la actividad ribonucleasa de las RNAsas estudiadas, se podría producir una autodegradación del RNA en la bacteria y en cierta medida podría ser un componente más en la causa de las degradaciones de RNA que se dan de forma tan temprana. De todos modos, nuestros resultados parecen descartar una implicación importante de esta vía de muerte bacteriana.

En lo que se refiere específicamente a la RNasa 7, teóricamente, los efectos podrían llegar a ser más evidentes debido a que la actividad RNasa es mayor que en la RNasa 3/ECP. Por otra parte, se observan diferencias entre ambas RNAsas en su mecanismo de acción a nivel de las membranas (Torrent et al, 2009a). Se observa para la RNasa 7, a partir de estudios en liposomas, la

habilidad de producir lisis en las membranas liberando el contenido del liposoma antes que su agregación (Torrent et al, 2009a). Este mecanismo difiere del observado para la RNasa 3/ECP, en el que se da una agregación de los liposomas previa a su lisis. Como ha podido comprobarse experimentalmente la concentración necesaria de RNasa 3/ECP y RNasa 7 *in vitro*, es considerablemente baja (del orden de nanomolar) para obtener una degradación en poco tiempo del RNA. Se puede deducir por tanto que si una pequeña porción de la RNasa que se encuentre en el medio extracelular pudiera internalizarse, sería suficiente para dar lugar a la degradación del RNA celular. Es de destacar que el rango de concentración de RNasa para muestras de RNA purificado es del orden de 0.01  $\mu$ M. Por tanto, la degradación del RNA podría producirse hipotéticamente antes de que la estabilidad de la membrana esté totalmente comprometida, con una pequeña porción de RNasas internalizadas. Este escenario sería factible dado que ante agresiones y disrupciones locales de su membrana, las bacterias pueden reaccionar y oponer mecanismos de reparación para sus membranas plasmáticas, tal como lo muestran varias líneas de investigación que describen una resistencia y reparación ante otro tipo de moléculas que ejerce un efecto desestabilizante en la membrana (como por ejemplo disolventes orgánicos) (Sardessai et al, 2002). Otras líneas de estudio sobre los efectos de los péptidos antimicrobianos, postulan que existen mecanismos de reparación de membrana adicionales a los que se dan en las envueltas de mureína de las bacterias, necesarios, dado que éstas pueden presentar una tolerancia y reparación a las lesiones producidas en sus membranas (Brogden et al, 2005). Por tanto, las bacterias podrían hacer frente a una desestabilización de la pared y la membrana por parte de una molécula como la RNasa 3/ECP y contrarrestar su efecto. No obstante los experimentos publicados por Torrent y colaboradores (2010) no muestran una recuperación de las bacterias tras sufrir los mismos efectos de agregación y *leakage*. En este artículo se describe la evolución de los cultivos bacterianos de *E. coli* y *S. aureus* durante un periodo de hasta tres horas, donde efectivamente no se observa una recuperación. Sin embargo, los resultados de esta tesis sí registran recuperaciones en la viabilidad en periodos de incubación largos que sugieren la necesidad de nuevos estudios.

Sobre la RNasa 7, ha aparecido recientemente otro argumento que podría apoyar la hipótesis de que la acción bactericida de la RNasa 7 pueda depender en parte a la actividad RNasa (Abtin et al 2009). En dicho trabajo se describió como la RNasa 7 se expresa en los queratinocitos epidérmicos junto con el inhibidor de RNasas (RI). Experimentalmente se probó que la asociación entre ambas proteínas afecta negativamente a la actividad, tanto catalítica como antimicrobiana de la RNasa 7. Luego comprobaron *in vivo* que en el estrato corneo, donde precisamente la RNasa 7 ejerce su efecto biológico (actividad citotóxica frente a *Enterococcus faecium* y *Candida albicans*), el RI ya no se detectaba al haber sido degradado. En un experimento se previno su degradación con inhibidores de proteasas y como consecuencia de ello, la RNasa 7 quedaba inhibida por el RI sin poder así ejercer su efecto biológico. De lo cual se deduce que en condiciones fisiológicas es necesaria la proteólisis de RI para que la RNasa 7 tenga efectos antimicrobianos. En este estudio no se dilucida la posibilidad de que la inhibición del bloqueo de la actividad bactericida pueda venir de un impedimento estérico dado que el RI como ya se ha comentado, tiene una estructura que podría envolver a la RNasa en gran parte de su superficie. Según esa hipótesis inhibir la actividad RNasa no sería el efecto intrínsecamente necesario para inhibir su actividad antimicrobiana, pero tampoco se descarta que dicha actividad colabore en el mecanismo bactericida.

### **6.5 Optimización de las condiciones de cristalización de la RNasa 3/ECP**

Se realizaron estudios de optimización de las condiciones de cristalización de la RNasa 3/ECP. Se evaluó la influencia del pH del tampón, así como la concentración del solvente orgánico Jefamina. Las concentraciones más adecuadas para incrementar el tamaño y resolución de los cristales fueron: 6% Jefamina, Citrato sódico 0.1 mM, pH entre 4.5 y 5.2, para 10 mg/ml de RNasa 3/ECP nativa. Se obtuvieron cristales de tamaño adecuado para poder ejecutar la difracción de rayos X a alta resolución (hasta 1.6 Å).

Los experimentos de cocrystalización con N-acetilglucosamina-1P o con fosfatos facilitaron el proceso de cristalización pero no se observó la unión del ligando a la molécula de RNasa 3/ECP.

## **7. Conclusiones**

### **Conclusiones respecto a la RNasa 3/ECP**

#### **Conclusiones respecto al estudio por proteólisis enzimática y escisión química de la RNasa 3/ECP.**

1. Se ha identificado el fragmento 0-38 de la zona N-terminal de la RNasa 3/ECP como determinante en la actividad antibacteriana, mediante experimentos de proteólisis limitada con lisina endoproteinasa.
2. Se ha conseguido obtener por digestión mediante BrCN de la RNasa 3/ECP desnaturalizada y carboximetilada, los fragmentos N-terminales: 11-27, 11-35 y 28-35, caracterizando su capacidad bactericida, e identificando el fragmento 28-35, como el de mayor actividad. El protocolo optimizado implica la escisión por el extremo C-terminal de metioninas y triptófanos.
3. Se ha descartado que la RNasa 3/ECP desnaturalizada irreversiblemente pueda ejercer efecto antibacteriano alguno.
4. La comparación de los productos de digestión con los péptidos sintéticos ECP(1-19), ECP(24-45) y ECP(1-45) indica que el péptido ECP(0-38) presenta una actividad equiparable al péptido sintético ECP(1-45).
5. Se concluye, a partir de los resultados anteriores, que la región principal del extremo N-terminal en cuanto a su actividad bactericida se encuentra entre los residuos 27 y 38.

## **Conclusiones respecto a la caracterización de la actividad antibacteriana de la RNasa 3/ECP**

6. Se ha confirmado la actividad bactericida de la RNasa 3/ECP, en concordancia con los estudios descritos en la literatura tanto para *E. coli* como para *S. aureus*. En este trabajo se ha completado la información previa, introduciendo la puesta a punto del análisis de la viabilidad celular bacteriana por la detección de ATP intracelular, mediante su cuantificación indirecta por luminiscencia. Se ha comprobado que el método es más fiable que el recuento de colonias. Dichos valores informan directamente de la viabilidad metabólica de las células bacterianas.
7. Se ha analizado la actividad de lisis celular bacteriana de la RNasa 3/ECP mediante la valoración de la liberación de RNasa I endógena de *E. coli* como marcador intracelular.
8. Se ha puesto a punto un sistema de expresión utilizando la cepa comercial de *E. coli*, *Rosetta Gami* que facilita la evaluación directa de la viabilidad de las bacterias por inducción con IPTG de la expresión de la RNasa 3/ECP y sus mutantes. El método permite la comparación directa y rápida de variantes de la RNasa 3/ECP a pequeña escala, por análisis de la actividad de las proteínas expresadas en forma soluble.
9. Se ha resuelto mediante un cribado de varios mutantes de la RNasa 3/ECP con la cepa *Rosetta Gami*, que los mutantes W35AR36A, R36A y D130N son los que más disminuyen la actividad bactericida respecto a la proteína nativa, correspondiéndose con zonas de los extremos N y C-terminal, señalando su importante contribución en la actividad bactericida total.
10. Se ha estudiado la potencial contribución de la actividad RNasa en la actividad bactericida utilizando los mutantes para el centro activo ECP-H128N y ECP-H15N/H128N. Los experimentos preliminares por expresión endógena indican la pérdida de la actividad antibacteriana, lo cual sugiere la implicación de la actividad RNasa en la actividad antibacteriana. Experimentos adicionales mediante purificación del mutante H128N y adición al medio de cultivo celular confirman la reducción de la actividad bactericida, principalmente en periodos largos de

incubación. La potencial contribución de la actividad catalítica en el mecanismo de acción antimicrobiana deberá confirmarse en posteriores estudios.

### **Conclusiones respecto a la actividad antibacteriana de la RNasa 7**

11. Se han identificado por primera vez para la RNasa 7 dos formas variantes. Se ha obtenido mediante mutagénesis dirigida a partir de la variante descrita en riñón (A75H93), la variante de la RNasa 7 descrita y purificada de queratinocitos (P75Y93). Asimismo, se ha conseguido la expresión recombinante en *E. coli* de ambas variantes de RNasa 7, así como la de los respectivos mutantes parciales.

La comparación entre las dos variantes de la RNasa 7 (A75H93 y P75Y93) así como sus mutantes parciales (P75H93 y A75Y93) no muestran diferencias destacables a nivel de actividad bactericida, coincidiendo con el análisis teórico estructural de ambas variantes.

12. Se ha seleccionado como referencia la variante de queratinocitos de la RNasa 7 (P75Y93) para los estudios posteriores comparativos con la RNasa 3. En el análisis de la actividad antibacteriana tanto en *E. coli* como en *S. aureus* en comparación con la RNasa 3/ECP, se observa una actividad ligeramente superior para la RNasa 7.

### **Conclusiones respecto al papel potencial de la actividad ribonucleasa de la RNasa3/ECP y la RNasa 7 en su actividad antibacteriana**

13. Se describe por primera vez un protocolo para extraer el RNA total de bacterias y analizar la degradación del RNA celular tras incubación con la RNasa 3/ECP y la RNasa 7.

14. Se compara el proceso de degradación del RNA celular bacteriano por adición de RNasa 3/ECP y RNasa 7 (efecto exógeno).

15. Se confirma la degradación de RNA a nivel endógeno para la cepa de *E. coli*, *Rosetta Gami* al inducirse la expresión de la RNasa 3/ECP y la RNasa 7.

16. Se describe por primera vez el patrón de degradación del RNA total celular tras incubación con la RNasa 3/ECP y RNasa 7 tanto sobre cultivos de *E.coli* como de *S. aureus*.
17. Se compara la sensibilidad del RNA total y de dos diferentes tipos de RNA purificado (rRNA y tRNA) bajo la acción degradativa de la RNasa 3/ECP y la RNasa 7. Se comparan los experimentos de preparaciones totales de RNA y preparaciones de RNA comercial. Se establece una degradación prioritaria para el rRNA en relación al tRNA.
18. Se constata una diferencia de la susceptibilidad del RNA celular bacteriano a la degradación por RNasa 3/ECP, dependiente de la fase de crecimiento. Comparando las fases logarítmica exponencial y estacionaria se observa mayor resistencia en cultivos en fase estacionaria. Esta diferencia podría explicarse por la menor protección de la membrana celular durante el proceso de división celular.
19. Se describe que la degradación del rRNA es inferior en los experimentos *in vivo*, probablemente debido a la protección que le confieren las proteínas a las que está normalmente acompañado. Esto se deduce de la comparación entre experimentos con preparaciones de RNA (RNA total purificado de bacterias) e incubaciones de cultivos bacterianos con las RNasas y análisis posterior del RNA celular.
20. Se describe una actividad RNasa para la RNasa 7 superior a la de la RNasa3/ECP y que es paralela a su mayor actividad antibacteriana.
21. Se realiza un estudio preliminar de la inhibición de las RNasas 3 y 7 por el inhibidor celular de placenta (RI) estimándose las concentraciones necesarias de inhibidor para preservar completamente el RNA total y los distintos tipos de RNA.
22. De los apartados anteriores se puede inferir un mecanismo de afectación de la viabilidad bacteriana basado en el proceso de degradación del RNA. Este mecanismo dependería de la entrada de las RNasas en el interior de la célula. Aunque el proceso se diese en una etapa muy temprana, los efectos podrían hacerse

patentes a medio plazo, al afectar al RNA intracelular y probablemente al rRNA como diana principal, induciendo finalmente un proceso de muerte bacteriana.

### **Conclusiones respecto a la cristalización de proteínas**

23. Se establece como necesaria la máxima purificación de las proteínas para la cristalización de la RNasa 3/ECP, mediante HPLC de fase reversa tras FPLC de intercambio iónico.
  
24. Se han conseguido condiciones idóneas para la cristalización de la RNasa 3/ECP y resolución de la estructura tridimensional por difracción de rayos X con una resolución de hasta 1.6 Å. Se ha analizado la cocrystalización con varios ligandos, que han favorecido la cristalización de RNasa 3/ECP pero que no han permitido la formación de un complejo de unión con la proteína. Incluso en experimentos de impregnación con 100 mM de distintos ligandos de tipo glucosaminoglicanos no se ha dado formación de complejos, probablemente debido al bloqueo de los centros de unión por el empaquetamiento de las moléculas de proteína en el cristal.

## 8. Bibliografía

**Abtin A, Eckhart L, Mildner M, Ghannadan M, Harder J, Schröder JM, Tschachler E.**

Degradation by Stratum Corneum Proteases Prevents Endogenous RNase Inhibitor from Blocking Antimicrobial Activities of RNase 5 and RNase 7.

*J Invest Dermatol.* (2009) v129 n9 pp2193-201

**Ackerman SJ, Gleich GJ, Loegering DA, Richardson BA, Butterworth AE**

Comparative toxicity of purified human eosinophil granule cationic proteins for schistosomula of *Schistosoma mansoni*.

*Am J Trop Med Hyg.* (1985) v34 n4 pp735-45.

**Andreu D & Rivas J**

Animal Antimicrobial peptides, an overview

*Biopolymers* (1998) v47 n6 pp 5-33

**Beintema JJ, Gaastra W, Lenstra JA, Welling GW, Fitch WM.**

The molecular evolution of pancreatic ribonuclease.

*J Mol Evol.* (1977) v20;10 n1 pp49-71.

**Beintema JJ, Fitch WM, Casara A**

Molecular evolution of pancreatic type ribonucleases

*Mol. Biol. Evol.* (1986) n3 pp 262-275

**Blackburn P, Wilson G, Moore S.**

Ribonuclease inhibitor from human placenta. Purification and properties.

*J Biol Chem.* (1977) v252 n16 pp5904-10.

**Boix E, Wu Y, Vasandani VM, Saxena SK, Ardelt W, Ladner J, Youle RJ.**

Role of the N terminus in RNase A homologues: differences in catalytic activity, ribonuclease inhibitor interaction and cytotoxicity.

*Journal of Mol Biol.* (1996) v257 n5 pp992-1007

**Boix E, Nikolovski Z, Moiseyev GP, Rosenberg HF, Cuchillo CM, Nogués MV**

Kinetic and product distribution analysis of human eosinophil cationic protein indicates a subsite arrangement that favors exonuclease-type activity.

*J Biol Chem.* (1999a) v274 n22 pp15605-14.

**Boix E, Leonidas DD, Nikolovski Z, Nogués MV, Cuchillo CM, Acharya KR.**

Crystal structure of eosinophil cationic protein at 2.4 Å resolution.

*Biochemistry.* (1999b) v 38 n51 pp16794-801

**Boix, E.**

Eosinophil cationic protein.

*Methods Enzymol.* (2001) n341, pp 287–305.

**Boix E, Nogues MV**

Mammalian antimicrobial proteins and peptides: overview on the RNase A superfamily members involved in innate host defence.

*Mol Biosyst.* (2007) v3 n5 pp 317-35. Review.

**Boix E, Torrent M, Sánchez D, Nogués MV**

The antipathogen activities of eosinophil cationic protein.

*Curr Pharm Biotechnol.* (2008) v 9 n3 pp141-52. Review

**Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ**

Protein Methods

*John & Wiley & sons Inc. Publication* (1996)

**Boulware DW, Goldsworthy PD, Nardella FA, Mannik M**

Cyanogen Bromide cleaves Fc fragments of pooled human IgG at both methionine and tryptophan residues.

*Molecular Immunology* (1985) n22 v12 pp1317-1322

**Brogden KA**

Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?

*Nature Microbiology* (2005) v3 pp238-250

**Cammack KA, Miller DS, Grinstead KH.**

Physical properties of ribosomal ribonucleic acid isolated from bacteria deficient in ribonuclease I.

*Biochem J.* (1970) n117 v4 pp:745-55.

**Carreras E, Boix E, Rosenberg HF, Cuchillo CM, Nogues MV**

Both aromatic and cationic residues contribute to the membrane-lytic and bactericidal activity of Eosinophil cationic protein.

*Biochemistry* (2003) n 42 pp 6636-6644

**Carreras E, Boix E, Navarro S, Rosenberg HF, Cuchillo CM, Nogues MV**

Surface-exposed aminoacids of eosinophil cationic protein play a critical role in the inhibition of mammalian cell proliferation

*Molecular and Cellular Biochemistry* (2005) n 272 pp 1-6

**Cole C, Barber JD and Barton GJ**

The Jpred 3 secondary structure prediction server

*Nucleic Acids Research* (2008) Vol. 36, Web Server issue W197–W201

**Cho S, Beintema JJ, Zhang J**

The ribonucleaseA superfamily of mammals and birds: identifying new members and tracing evolutionary histories

*Genomics* (2005) n 85, pp 208-220

**Chusid MJ, Dale DC, West BC, Wolff SM**

The hypereosinophilic syndrome: analysis of fourteen cases with review of the literature.

*Medicine* (1975) v54 n1 pp1-27. Review.

**Dahle CE, Macfarlane DE.**

Isolation of RNA from cells in culture using Catrimox-14 cationic surfactant.  
*Biotechniques* (1993) v15 n6 pp1102-5.

**Doucet N, Watt ED, Loria JP**

The flexibility of a distant loop modulates active site motion and product release in Ribonuclease A.  
*Biochemistry* (2009) v48 n30 pp7160-8

**Dmitriev B, Toukach F, Ehlers S**

Towards a comprehensive view of the bacterial cell wall  
*Trends in Microbiology* (2002) v13, n 12, pp 569-574

**Dmitriev B, Toukach F, Holst O, Rietschel ET, Ehlers S**

Tertiary structure of *Staphylococcus aureus* cell wall murein  
*Journal of Bacteriology* (2004) v186 n 21

**Domachovske JB, Dyer KD, Adams AG, Leto TL, Rosenberg HF**

Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNaseA-family ribonuclease with direct antiviral activity.  
*Nucleic Acid Research* (1998) v 26, n 14 pp 3358-3363

**Domingues MM, Lopes SC, Santos NC, Quintas A, Castanho MA.**

Fold-unfold transitions in the selectivity and mechanism of action of the N-terminal fragment of the bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI(21)).  
*Biophysics J.* (2009) n 96 v3 pp987-96.

**Dyer KD Rosenberg HF**

The RNase A superfamily: Generation of diversity and innate host defense  
*Molecular Diversity* (2006) n10, pp 585-597

**Eberhard J, Menzel N, Dommisch N, J. Winter, S. Jepsen S, R. Mutters**

The stage of native biofilm formation determines the gene expression of human b-defensin-2, psoriasin, ribonuclease 7 and inflammatory mediators: a novel approach for stimulation of keratinocytes with in situ formed biofilms.  
*Oral Microbiology Immunology* (2008) n23 pp 21–28

**Eberhard J, Jepsen S, Dommisch N**

The immune response of oral epithelial cells induced by single-species and complex naturally formed biofilms.  
*Oral Microbiology Immunology* (2009) n24 pp325–330

**Eriksson J, Woschnagg C, Fernvik E, Venge P**

A SELDI-TOF MS study of the genetic and post-translational molecular heterogeneity of eosinophil cationic protein.  
*Journal of Leukocyte Biology* (2007) v82 n6 pp1491-500

**Fredens K, Dybdahl H, Dahl R, Baandrup U**

Extracellular deposit of the cationic proteins RNasa 3/ECP and EPX in tissue infiltrations of eosinophils related to tissue damage.

*APMIS*. (1988) v96 n8 pp 711-9.

**Fleige S, Pfaffl MW**

RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance.

*Mol Aspects Med*. (2006) n(2-3) pp126-39. Review.

**Fredens, K., Dahl, R., and Venge, P.**

In vitro studies of the interaction between heparin and eosinophil cationic protein.

*Allergy* (1991) n46, pp 27–29

**Gambichler T, M. Skrygan, C. Tigges, S. Kobus, R. Glaßer\* and A. Kreuter**

Significant upregulation of antimicrobial peptides and proteins in lichen sclerosus

*British Journal of Dermatology* (2009) v161 n5 pp1136-42

**Garcia-Rubio I, Martinez-Cocera C, Zayas L.**

Eosinophil cationic protein in feces: reference values in healthy and atopic individuals and patients with digestive diseases.

*Allergy Asthma Proc*. (2007) v28 n4 pp468-71.

**Glasser R, Navid F, Schuller W, Jantschitsch C, Harder J, Schro JM, Schwarz A, Schwarz T**

UV-B radiation induces the expression of antimicrobial peptides in human keratinocytes in vitro and in vivo.

*J Allergy Clin Immunol* (2009) v123 n5 pp1117-23

**Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM.**

The biology of the eosinophilic leukocyte.

*Annu Rev Med*. (1993) v44 85-101. Review.

**Gordon MH**

Hodgkins disease: a pathogenic agent in the glands and it application in diagnosis

*Br. Med Journal* (1933) n1 641-64

**Gross E, Witkop B**

Nonenzymatic cleavage of peptide bonds: the methionine residues in bovine pancreatic ribonuclease.

*Journal of Biological Chemistry* (1962) n 237 pp 1856-1860

**Gullberg U, Widegren B, Arnason U, Egesten A, Olsson I. Biochem**

The cytotoxic eosinophil cationic protein (RNasa 3/ECP) has ribonuclease activity.

*Biophys Res Commun*. (1986) v139 n3 pp1239-42.

**Gutte B, Merrifield RB.J**

The total synthesis of an enzyme with ribonuclease A activity.

*J Am Chem Soc*. (1969) v91 n2 pp501-2.

**Hällgren R, Terent A, Venge P**

Eosinophil cationic protein (RNase 3/ECP) in the cerebrospinal fluid.  
*J Neurol Sci.* (1983) v58 n1 pp57-71.

**Hamann KJ, Gleich GJ, Checkel JL, Loegering DA, McCall JW, Barker RL**

Structure and chromosome localization of the human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein genes: evidence of intronless coding sequences in the ribonuclease.

*Genomics* (1990) n7 v14 pp 535-546

**Hamann KJ, Gleich GJ, Checkel JL, Loegering DA, McCall JW, Barker RL**

In vitro killing of microfilariae of *Brugia pahangi* and *Brugia malayi* by eosinophil granule proteins.

*Journal of Immunology* (1990), v 144 n8 pp 3166-3173

**Harder J, Schroder JM**

RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin  
*Journal Biological Chemistry* (2002) v 277, n 48, pp 46779-46784

**Harder J, Schroder JM**

Psoriatic scales: a promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins.

*Journal of Leukocyte Biology* (2005) v77 n4 pp476-86

**Hilpert K, Volkmer-Engert R, Walter T, Hancock RE.**

High-throughput generation of small antibacterial peptides with improved activity.  
*Nat Biotechnol.* (2005) v23 n8 pp1008-12.

**Huang YC, Lin YM, Chang TW, Wu SJ, Lee YS, Chang MDT, Chen C, Wu SH, Liao YD**

The flexible and clustered Lysine residues of Human Ribonuclease 7 are critical for membrane permeability and antimicrobial activity.

*Journal Biological Chemistry* (2007), v 282, n 7, pp 4626-4633

**Huang HV, Bond MW, Hunkapiller MW, Hood LE.**

Cleavage at tryptophanyl residues with dimethyl sulfoxide-hydrochloric acid and cyanogen bromide.

*Methods in Enzymology* (1983) n91 pp 318-324

**Ibrahim HR, Thomas U, Pellegrini A.**

A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action.

*J Biol Chem.* (2001) v276 n47 pp 43767-74.

**Iyer S, Holloway DE, Kumar K, Shapiro R, Acharya KR**

Molecular Recognition of Human Eosinophil-derived Neurotoxin (RNase 2) by Placental Ribonuclease Inhibitor

*J. Mol. Biol.* (2005) n347 pp 637-655

**Janolino VG, Swaisgood HE, Horton HR**

Renaturation of soluble and immobilized ribonuclease: are the polypeptide folding pathways for structure formation the same for soluble proteins and for proteins associated with a surface?

*J Appl Biochem.* (1985) v7 n1 pp 33-7.

**Kao R, Davies**

Fungal ribotoxins: a family of naturally engineered targeted toxins?

*J. Biochem Cell Biol.* (1995) v73 n11-12 pp1151-9. Review.

**Kobe B, Deisenhofer J**

Mechanism of Ribonuclease Inhibition by Ribonuclease Inhibitor Protein based on the Crystal structure of its complex with Ribonuclease A.

*Journal of Molecular Biology* (1996) n 264 pp 1028-1043

**Koh GCH, Shek LPC, Goh DYT, Van Bever H, Koh DSQ**

Eosinophil cationic protein: Is it useful in Asthma? A systematic review

*Respiratory Medicine* (2007) n 101 pp 696-705

**Kuoppala A, Lindstedt KA, Saarinen J, Kovanen PA & Kokkonen J**

Inactivation of bradykinin by angiotensin-converting enzyme and by carboxypeptidase N in human plasma.

*Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2000) v278 pp1069–1074

**Lehrer RI, Szklarek D, Barton A, Ganz T, Hamann KJ, Gleich GJ**

Antibacterial properties of Eosinophil Major protein and Eosinophil Cationic Protein

*Journal of Immunology* (1989) v 142, n 12, pp 4428-443

**Lewis K.**

Programmed death in bacteria.

*Microbiol Mol Biol Rev.* (2000) v 64 n3 :503-14. Review.

**McFarland GD, Borer PN**

Separation of oligo-RNA by reverse-phase HPLC

*Nucleic Acids Res.* (1979) v25 n7(4) pp1067-80

**McLaren DJ, Mackenzie CD, Ramalho-Pinto FJ.**

Ultrastructural observations on the in vitro interaction between rat eosinophils and some parasitic helminths *Schistosoma mansoni*, *Trichinella spiralis* and *Nippostrongylus brasiliensis*).

*Clin Exp Immunol.* (1977) Oct;30 n1 pp105-18.

**Maeda T, Kitazoe M, Futaami J, Tada H, Seno M, de Llorens R, Salomón DS, Ueda M, Yamada H**

Growth inhibition of mammalian cells by Eosinophil Cationic Protein

*Eur. J. Biochem* (2002) n269 pp 307-316

**Maeda T, Mahara K, Kitazoe M, Futaami J, Takidani A, Kosaka M, Tada H, Seno M, Yamada H**

RNAse3 (ECP) is an extraordinary stable protein among human pancreatic-type RNAses.

*Journal of Biochemistry* (2002) n 132 pp 737-742

**Mallorquí-Fernández G, Pous J, Peracaula R, Aymamí J, Maeda T, Tada H, Yamada H, Seno M, de Llorens R, Gomis-Rüth FX, Coll M.**

Three-dimensional crystal structure of human eosinophil cationic protein (RNase 3) at 1.75 Å resolution.

*J Mol Biol.* (2000) 28;300(5):1297-307.

**Mohan CG, Boix E, Nikolovski Z, Evans HR, Cuchillo CM, Nogues MV, KR Acharya**

The crystal structure of Eosinophil Cationic Protein in complex with 2', 5'-ADP at 2.0 Å Resolution reveals the details of the ribonucleolytic active site.

*Biochemistry* (2002) n 41 pp 12100-12106

**Molina HA, Kierszenbaum F, Hamann KJ, Gleich GJ**

Toxic effects produced or mediated by human eosinophil granule components on *Trypanosoma cruzi*.

*Am J Trop Med Hyg.* (1988) v38 n2 pp327-34.

**Monteseirín J, Vega A, Chacón P, Camacho MJ, El Bekay R, Asturias JA, Martínez A, Guardia P, Pérez-Cano R, Conde J**

Neutrophils as a novel source of eosinophil cationic protein in IgE-mediated processes.

*J Immunol.* (2007) v179 n4 pp2634-41.

**Murthy BS, De Lorenzo C, Piccoli R, D'Alessio G, Sirdeshmukh R.**

Effects of protein RNase inhibitor and substrate on the quaternary structures of bovine seminal RNase.

*Biochemistry* (1996) v 2;35 n13 pp3880-5.

**Nikolovski Z, Buzón V, Ribó M, Moussaoui M, Vilanova M, Cuchillo CM, Cladera J, Nogués MV**

Thermal unfolding of eosinophil cationic protein/ribonuclease 3: a nonreversible process.

*Protein Sci.* (2006) v15 n12 pp 2816-27.

**Notomista E, Catanzano F, Graciano G, Dal Piaz F, Barone G, D'Alessio G, Di Donato A**

Onconase: An Unusually Stable Protein

*Biochemistry* (2000) v39, pp8711-8718

**Ooi CE, Weiss J, Elsbach P, Frangione B, Mannion B**

A 25-kDa NH<sub>2</sub>-terminal fragment carries all the antibacterial activities of the human neutrophil 60 kDa Bactericidal/Permeability-increasing protein.

*Journal of Biological Chemistry* (1987) v. 262 n. 31 pp 14891-14894

**Olsson I, Venge P**

Cationic proteins of human granulocytes. I. Isolation of the cationic proteins from the granules of leukaemic myeloid cells.

*Scandinavian Journal of Haematology* (1972) n9 v 3 pp 204-214

**Olsson I., Persson A. M. and Winqvist I.**

Biochemical properties of eosinophil cationic protein and demonstration of its biosynthesis in vitro in marrow cells from patients with eosinophilia.

*Blood* (1986) n67 pp 498–503

**Oren Z, Shai Y.**

Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides.

*Biopolymers* (1998) v47 n6 pp451-63. Review.

**Pal-Bhowmick I, Pati Pandey R, Jarori GK, Kar S, Sahal D**

Structural and functional studies on Ribonuclease S, retro S and retro-inverso S peptides.

*Biochemical and Biophysical Research Communications* (2007) n 364 pp 608-613

**Pereira MC, Oliveira DT, Olivieri EH, Rogatto SR, Carvalho AL, Landman G, Kowalski LP.**

The 434(G>C) polymorphism in the eosinophil cationic protein gene and its association with tissue eosinophilia in oral squamous cell carcinomas.

*J Oral Pathol Med.* (2010) v39 n1 pp56-62

**Plötz SG, Lentschat A, Behrendt H, Plötz W, Hamann L, Ring J, Rietschel ET, Flat HD, Ulmer AJ**

The interaction of human peripheral blood eosinophils with bacterial lipopolysaccharide is CD14 dependent.

*Blood* (2001) Vol 97 n1 pp 235-241

**Pronk-Admiraal CJ, Bartels PCM**

Total amount of ECP per eosinophil as indicator for the activity state of eosinophils  
*Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* (2001) V 61, n 6 pp 453-457

**Ramos AL, Discipio RG, Ferreira AM**

Eosinophil cationic protein damages protoscoceles in vitro and is present in the hydatid cyst.

*Parasite Immunology* n28, pp 347-355

**Richards FM, Wyckoff HW**

Bovine pancreatic ribonuclease at “The enzymes”

*Academic Press New York* (1971) pp 647-806

**Robinson HK, Wade HE.**

The preparation of ribosomal ribonucleic acid from whole bacteria.

*Biochem J.* (1968) v106 n4 pp897-903.

**Rosenberg HF, Ackerman SJ, Tenen DG**

Human Eosinophil Cationic Protein. Molecular Cloning of a Helminthotoxine with Ribonuclease Activity.

*J Exp Medicine* (1989) v170 pp 163-176

**Rosenberg HF, Dyer KD**

Eosinophil cationic protein and eosinophil-derived neurotoxin. Evolution of novel function in a primate ribonuclease gene family.

*J Biol Chem.* (1995) v15;270 n37 pp21539-44

**Rosenberg HF**

Recombinant human Eosinophil cationic protein. Ribonuclease activity is not essential for cytotoxicity.

*Journal of Biological Chemistry* (1995) v 270, n14, pp 7876-7881

**Rosenberg HF**

RNAse A ribonucleases and host defense: an evolving story

*Journal of Leukocyte Biology* (2008) v83 n5 pp1079-87

**Rubin J, Zagai U, Blom K, Trulson A, Engström A, Venge P**

The coding RNAsa 3/ECP 434(G>C) gene polymorphism determines the cytotoxicity of RNAsa 3/ECP but has minor effects on fibroblast-mediated gel contraction and no effect on RNAse activity.

*Journal of Immunology* (2009) v1;183 n1 pp445-51

**Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T**

*Molecular Cloning: A laboratory manual.*

Cold Spring Harbor Laboratory Press Ed . 3<sup>rd</sup> ed. (2001)

**Sanjeev BS, Vishveshwara S**

Dynamics of the Native and ligand-bound structures of Eosinophil cationic protein: network of hydrogen bonds at the catalytic site.

*Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* (2005) v 22 n 6

**Sardesai Y, Bhosle S**

Tolerance of bacteria to organic solvents.

*Res Microbiol.* (2002) v153 n5 pp263-8. Review.

**Saxena SK, Sirdeshmukh R, Ardel W, Mikulski SM, Shogen K, Youle RJ.**

Entry into cells and selective degradation of tRNAs by a cytotoxic member of the RNAse A family.

*J Biol Chem.* (2002) v26 n277 (17) pp15142-6.

**Scharga HA**

Structural studies of pancreatic ribonucleases

*Fed. Prot* (1967) n 26 pp1380.139

**Slifman NR, Loegering DA, McKean DJ, Gleich GJ.**

Ribonuclease activity associated with human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein.

*J Immunol.* (1986) v1;137 n9 pp 2913-7.

**Suzuki M, Saxena SK, Boix E, Prill RJ, Vasandani VM, Ladner JE, Sung C, Youle RJ**

Engineering receptor-mediated cytotoxicity into human ribonucleases by steric blockade of inhibitor interaction.

*Nat Biotechnol.* (1999) v17 n3 pp265-70.

**Svensson L, Wennerås C.**

Human eosinophils selectively recognize and become activated by bacteria belonging to different taxonomic groups.

*Microbes Infect.* (2005) v7 n4 pp 720-8.

**Takanashi S, Nonaka R, Xing Z, O'Byrne P, Dolovich J, Jordana M.**

Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils.

*J Exp Med.*(1994) v1;180 n2 pp711-5.

**Tai PC, Hayes DJ, Clark JB, Spry CJ,**

Toxic effects of human eosinophil products on isolated rat heart cells in vitro.

*Biochem J.* (1982) v204 n1 pp75-80.

**Torrent M, Cuyas E, Carreras E, Navarro S, Lopez O, de la Maza A, Nogués MV, Reshetnyak YK, Boix E**

Topography studies on the membrane interaction mechanism of the eosinophil cationic protein.

*Biochemistry* (2007) n46, pp 720-733

**Torrent M, Navarro S, Moussaoui M, Nogués V, Boix E**

Eosinophil Cationic Protein high-affinity binding to bacteria-wall lipopolysaccharides and peptidoglycans.

*Biochemistry* (2008) n 47, pp 3544-3555

**Torrent M, Sánchez D, Nogués V, Cladera J, Boix E**

*Comparison of the membrane interaction mechanism of two antimicrobial RNAses: RNase 3 and RNase 7.*

*Biochimica et Biophysica Acta* (2009a) v1788 n5 pp1116-25

**Torrent M, De la Torre BG, Nogués MV, Andreu D, Boix E**

Bactericidal and membrane disruption activities of the eosinophil cationic protein are largely retained in an N-terminal fragment.

*Biochemical Journal* (2009b) n 421 pp 425-434

**Torrent M., Nogués M.V. and Boix E.**

A theoretical approach to spot active regions in antimicrobial proteins.

*BMC Bioinformatics* (2009c).n10 pg 373

**Torrent M, Badia M, Moussaoui M, Sánchez D, Nogués V, Boix E**  
Comparison of human RNase 3 and RNase 7 bactericidal action at the Gram-negative and Gram-positive bacteria cell wall.  
*FEBS Journal* (2010) n277 pp 1713-1725.

**Trulsson A, Brystom J, Engstrom A, Larsson R, Venge P**  
The functional heterogeneity of eosinophil cationic protein is determined by a gene polymorphism and post-translation modifications.  
*Clinical and Experimental Allergy* (2007) n37, pp 208-218

**Ulrich V, Petre A, Youhnovski N, Prohmm F, Schirle M, Schumm M, Pero RS, Doyle A, Checkel J, Kita H, Thiyagarajan N, Ravi Acharya K, Schmid-Grendelmeier P, Hans-Uwe Simon HU, Schwarz H, Tsutsui M, Shimokawa H, Bellon G, Lee JJ, Przybylski M, Döring G**  
Post-translational Tyrosine Nitration of Eosinophil Granule Toxins Mediated by Eosinophil Peroxidase.  
*The Journal of Biological Chemistry* (2008) vol. 283, n. 42, pp. 28629–28640

**Venge P.**  
Monitoring the allergic inflammation.  
*Allergy*. (2004) v59 n1 pp26-32. Review.

**Venge, P., Bystrom, J., Carlson, M., Hakansson, L., Karawacjzyk, M., Peterson, C., Seveus, L., and Trulsson, A.**  
Eosinophil cationic protein (RNase 3/ECP): Molecular and biological properties and the use of RNase 3/ECP as a marker of eosinophil activation in disease.  
*Clin. Exp. Allergy* (1999) n29 pp1172–1186.

**Wang HY, Chang HT, Pai TW, Wu CI, Lee YH, Chang YH, Tai HL, Tang CY, Chou WY, Chang DT**  
Transcriptional regulation of human eosinophil RNases by an evolutionary-conserved sequence motif in a primate genome.  
*BMC Molecular Biology* (2007) v 8 n 8

**Watanabe H, Naitoh A, Suyama Y, Inokuchi N, Shimada H, Koyama T, Ohgi K, Irie M.**  
Primary structure of a base non-specific and adenylic acid preferential ribonuclease from *Aspergillus saitoi*  
*J Biochem.* (1990) v108 n2 pp303-10.

**Woschnagg C, Rubin J, Venge P**  
Eosinophil Cationic Protein (RNase 3/ECP) Is Processed during Secretion  
*Journal of Immunology* (2009) v15;183 n6 pp3949-54

**Wu CM, Chang HT, Chang MDT**  
Membrane-bound carboxypeptidase E facilitates the entry of Eosinophil cationic protein into neuroendocrine cells.  
*Biochem Journal* (2004) n 382 pp 841-848

**Young JD, Peterson CGB, Venge P, Cohn ZA**

Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein.

*Nature* (1986) v 321, n 5 pp613-616

**Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, Schmid I, Straumann A, Reichenbach J, Gleich GJ, Simon HU**

Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense.

*Nat Med.* (2008) v14 n9 pp949-53.

**Zagai U, Lundahl J, Klominek J, Venge P, Sköld CM**

Eosinophil cationic protein stimulates migration of human lung fibroblasts in vitro.

*Scand J Immunol.* 2009 v69 n4 pp 381-6.

**Zhang J, Dyer KD, Rosenberg HF**

Human RNase 7: a new cationic ribonuclease of the RNase A superfamily

*Acid Nucleic Research* (2003) v 31 n12 pp602-607

**Zhang J, Rosenberg HF**

Complementary advantageous substitutions in the evolution of an antiviral RNase of higher primates.

*PNAS* (2002) v 99 n 8 pp 5486-5491

## **Sitios web consultados**

**PubMed**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>

**BLAST**

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

**ProtParam-Expasy**

<http://expasy.org/tools/>

<http://expasy.org/tools/protparam.html>

**Ensembl Genome Browser**

[www.ensembl.org/](http://www.ensembl.org/)

**Protocols Online**

<http://www.protocol-online.org/>

**Protocolos, guiones y recursos en Biología Molecular y Bioquímica**

<http://biowww.net/>

## 9. Apéndice

En este apartado se relacionan los materiales y reactivos que tienen una composición específica predeterminada ya sea por cesión de otros laboratorios o por adquisición de casas comerciales. En este caso quedarían compendiados plásmidos, cepas bacterianas, enzimas de restricción y péptidos.

### Plásmidos

#### PFCTS

Este plásmido es el portador del gen RNS7, cedido por la Dra. Helen Rosenberg. Permite la expresión con una cola peptídica FLAG que permite su reconocimiento inmunológico y/o purificación. En la figura se muestra el esquema del plásmido así como su MCS (*multiple cloning site*).

El vector de expresión pFLAG-CTS es un vector de expresión de 5403 bp de *Escherichia coli* usado para la expresión periplásmica de un marco de lectura abierto propiamente insertado como un proteína de fusión con C-término FLAG. El epítipo FLAG es una etiqueta de 8 aminoácidos pequeña, hidrófila (DYKDDDDK) de detección sensible y purificación de calidad alta habitual en los productos de ANTI-FLAG.

La región promotor-regulador del promotor tac fuerte (un híbrido de los *trp* y promotores del lac de la *E.coli*) permiten una transcripción de estructuras de fusión de ORF-FLAG. El control de transcripción se regula por la presencia de las sucesiones del lacO e inclusión del gen represor lac (*lacI*) en el plásmido. La presencia de la secuencia señal ompA resulta en la secreción al espacio periplásmico de la proteína de fusión.

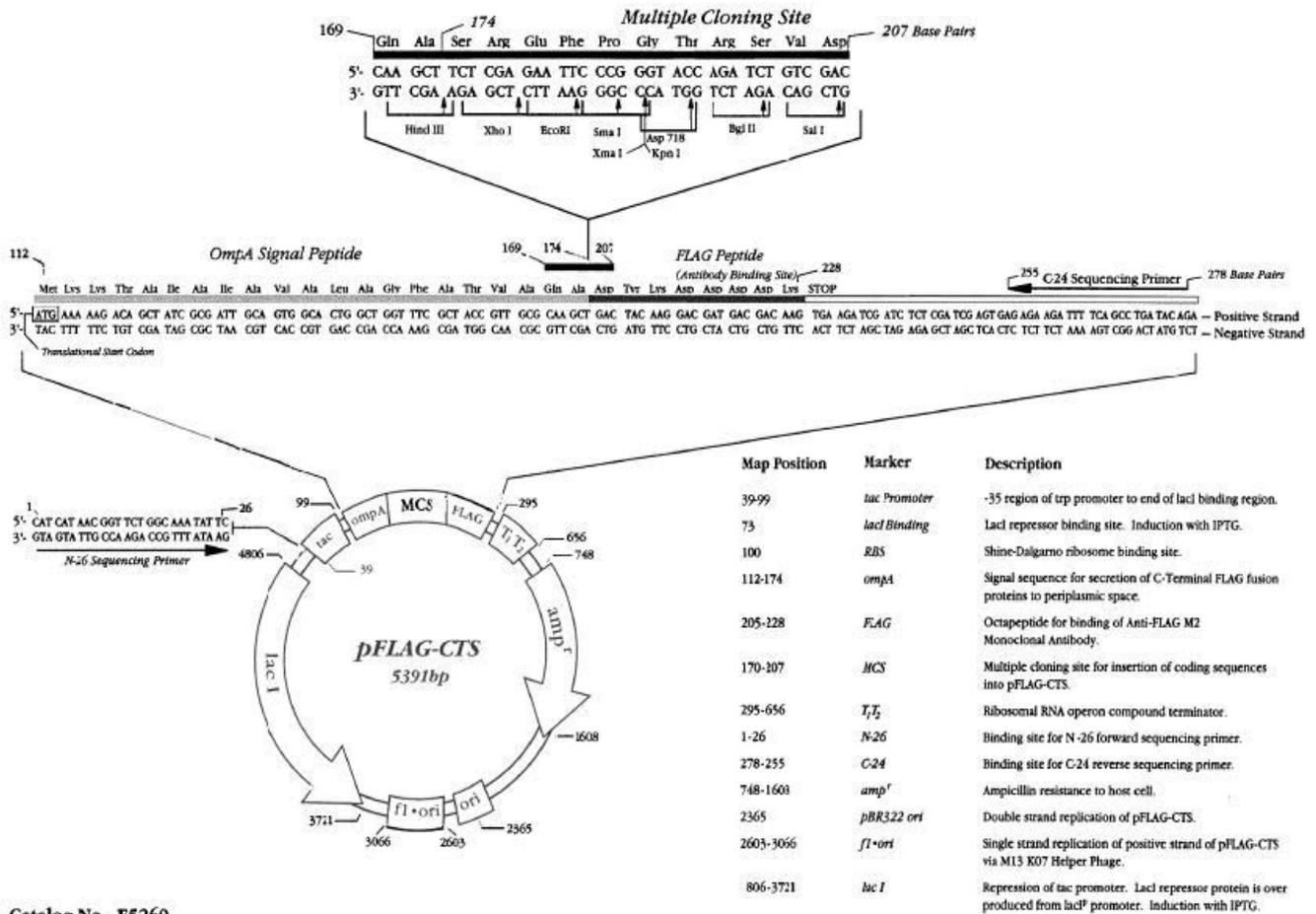


Figura 153 Esquema del plásmido y mapa del MCS del plásmido pFTCS

### pET11c

El plásmido pET11c es un plásmido de la serie pET11 de la casa Novagen, uno de los plásmidos de expresión más fuerte disponibles comercialmente que permite la expresión sin péptido señal a niveles elevados. La expresión del gen objetivo se encuentra bajo el promotor T7, este promotor puede generar una expresión de la proteína recombinante tal que puede llevar al 50% de la proteína total de la bacteria. La proteína expresada tiende a agregarse formando cuerpos de inclusión. Este plásmido permite además una expresión modulada en función de la concentración de inductor (IPTG) por un promotor en el genoma de la bacteria (*lacUV5*) que modula la síntesis de la RNapolimerasa del fago T7. Este promotor presenta un silenciamiento de los genes recombinantes si no hay inductor.

El plásmido presentado es el de rutina en la expresión de RNAsas en nuestro grupo y que se encuentra disponible por amplificación en la cepa de *E. coli* que lo contiene, este plásmido se describe a continuación en sus características principales:

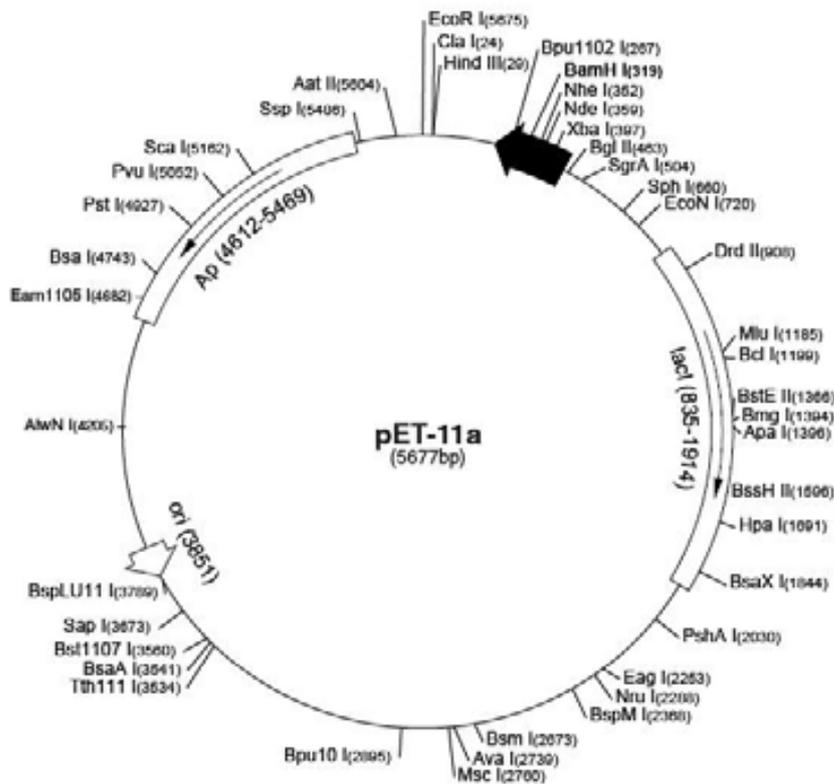


Figura 154 Mapa del plásmido pET-11a genérico para los a, b y c

- T7 promotor 432-448
- T7 inicio de transcripción 431
- T7•Tag secuencia codificante 328-360
- T7 terminador 213-259
- lacI secuencia codificante 835-1914
- pBR322 origen 3851
- bla secuencia codificante 4612-5469

Los mapas para pET-11b, pET-11c y pET-11d son los mismos que para pET-11a (mostrado) con las siguientes excepciones: pET-11b

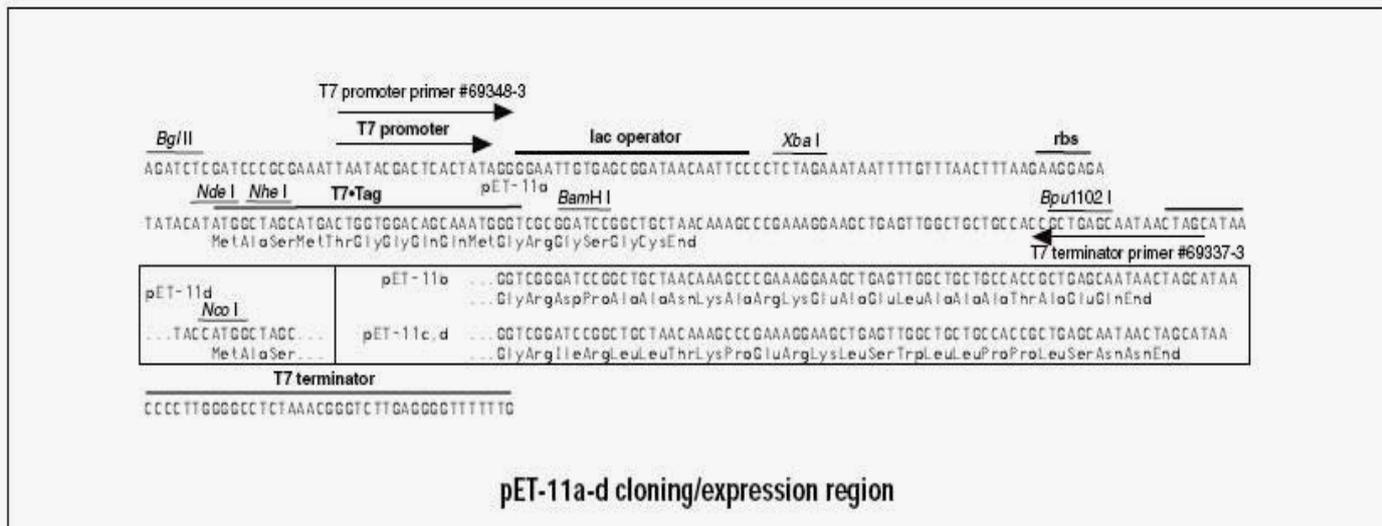


Figura 155 Mapa detallado de la zona del polilinker y origen de expresión en el plásmido pET11

## Reactivos

Bromuro de cianógeno (BrCN):

Reactivo distribuido exclusivamente por la casa Merck, reactivo responsable de la escisión química de las proteínas por el extremo carboxiterminal de Metioninas, y en ciertas condiciones experimentales también romper por triptófanos.

*RNA protect bacteria:*

Reactivo compuesto principalmente por bromuro de tetradeciltrimetilamonio suministrado exclusivamente por la casa Qiagen bajo este nombre.

*Bactiter Glo:*

Reactivo de luminiscencia, de la casa CalBioChem, para los ensayos de viabilidad compuesto por dos componentes para dar un reactivo de trabajo. Un reactivo A que es el tampón de reconstitución y un reactivo B compuesto por un liofilizado en la que se encuentra la luciferasa de luciérnaga.

tRNA de levadura:

tRNA para la codificación de la fenilalanina proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*, adquirido de la casa SIGMA con referencia R4018-1MG. Polvo liofilizado, quedó disuelto a 250 ng/μl en agua *RNase free*.

#### tRNA de bacteria

tRNA de *E. coli* para la codificación de la fenilalanina. 500 mg de polvo liofilizado. Los stocks de trabajo se diluyeron en agua mili Q *RNase free* a una concentración de 4000 ng/μl. Extraído de la cepa MRE-600 de *E. coli*. N° de catálogo: 10109541001.

#### rRNA de bacteria

rRNA 23S y 16S proveniente de *E. coli* de la casa Roche en 10 mM Tris pH 7.8, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM a una concentración de 4000 ng/μl. Extraído de la cepa MRE-600 de *E. coli*. N° de catálogo: 10206938001.

#### Luminol (SIGMA) n° ref CPS-1-60:

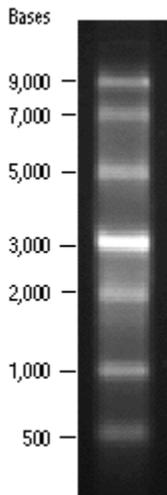
Es un sustrato de peroxidasa que puede utilizarse para la detección de alta sensibilidad de material marcado con peroxidasa en toda las variedades de Western blotting. Este sustrato es un luminol mejorado con un tampón que lleva una solución de peróxido de hidrógeno estabilizado. La sensibilidad puede llegar al picogramo. El producto consiste en una solución A y otra B a mezclar en proporción 1:1.

#### Marcadores de peso molecular para proteínas (SIGMA):

Miosina (músculo de conejo).....	205000
β-galactosidasa ( <i>E. coli</i> ).....	116000
Fosforilasa B (músculo de conejo).....	97000
Fructosa-6-P-fosfato kinasa (músculo de conejo)....	84000
Albumina (serum bovina).....	66000
Glutamato deshidrogenasa.....	55000
Ovoalbúmina (huevo de gallina).....	45000
Gliceraldehido-3P-deshidrogenasa (m. conejo).....	36000
Anhidrasa carbónica (eritrocito bovino).....	29000
Tripsinógeno (páncreas bovino).....	24000
Inhibidor de tripsina (soja).....	20000
α-lactalbúmina (leche bovina).....	14200
Aprotinina (pulmón bovino).....	6500

Resulta en ocho bandas de proteína teñidas por Coomassie Blue exhibiendo: aprotinina,  $\beta$ -lactalbumina, inhibidor de tripsina, tripsinógeno, anhidrasa carbónica, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, ovoalbúmina y albúmina en 100  $\mu$ l de agua desionizada en una solución que contiene 2-3.5 mg de proteína por ml. Junto con un tampón Tris-HCl, pH 6.8, 1 mm EDTA, 4% sacarosa, 0.5% ditioneitol, 2% SDS, y 0.0005% azul del bromofenol.

### Marcador de peso molecular para ss RNA



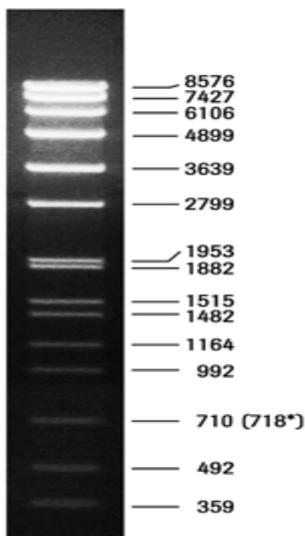
*Fig. 156. El marcador de peso molecular de ssRNA es un grupo de 7 moléculas de RNA producidas por transcripción in vitro de una mezcla de 7 moldes de DNA's. Los tamaños del marcador son: 9000, 7000, 5000, 3000, 2000, 1000 y 500 bases.*

*El fragmento de 3000 bases es de doble intensidad para servir como banda de referencia. Concentración: 500  $\mu$ g/ml  
Condiciones de almacenaje: Acetato potásico 20 mM pH 4.5  
T<sup>o</sup> 25°C -70°C*

### DNA Molecular Weight Marker VII

No ref Roche : 11209264001

50  $\mu$ g (1 A<sub>260</sub> unit)



**Fuente:** SPP1 DNA, digested with *Eco* R I

*Fig. 157. Fragmentos en el marcador: 81, 359, 492, 710, 718, 992, 1164, 1482, 1515, 1882, 1953, 2799, 3639, 4899, 6106, 7427, 8576 bp (17 fragmentos en total)*

Inhibidor de RNasa : *RNasin Plus Inhibitor* de Promega

Inhibidor no competitivo de las RNasas, 49905 Da, pI 4.6, 40 unidades/ $\mu$ l en 20 mM Hepes pH 7.6, 50 mM KCl, 8 mM DTT, 50% glicerol, termorresistente por encima de 50°C

## **Anticuerpos**

El único anticuerpo primario utilizado en este trabajo es el que ha reconocido la RNasa 3/ECP en las preparaciones de proteínas de bacteria y estas son sus características:

Anti-RNasa 3/ECP Anticuerpo monoclonal

Tipo: EG2

Origen: ratón

Objetivo: humano

Casa comercial : Pharmacia Upjohn

Dilución de trabajo: 1/1000- 1/500

El anticuerpo secundario utilizado para el reconocimiento de los lugares de reconocimiento del primario, es el anticuerpo “goat anti-mouse HRPO”. Precisamente lleva conjugada la peroxidasa de rábano para dar señal luminiscente en cuanto se da la oxidación del luminol como sustrato. Estas son sus características:

Goat Anti-mouse (H+L)- HRPO conjugado

Origen: cabra (“goat”)

Objetivo: ratón

Casa comercial BIO-RAD laboratorios nº ref 170-6516

Dilución de trabajo: 1/3000

## **Enzimas**

Se describen brevemente tanto los enzimas para proteínas como los utilizados para procesos del RNA:

Los enzimas de restricción utilizados fueron adquiridos de la casa New England Biolabs, excepto en DpnI y fueron los siguientes:

### **NdeI**

Diana de restricción



Fuente:

Cepa de *E. coli* portadora del gen de BamHI de *Bacillus amyloliquefaciens* H (ATCC 49763). Reactivos suministrados: NEBuffer 3 (10X) y BSA (100X)

### **BamHI**

Diana de restricción

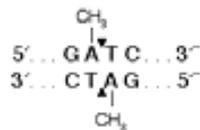


Fuente:

Cepa de *E. coli* portadora del gen de BamHI de *Bacillus amyloliquefaciens* H (ATCC 49763). Reactivos suministrados: NEBuffer 3 (10X) y BSA (100X)

### **DpnI**

Diana de restricción



Fuente:

Cepa de *E. coli* portadora del gen de DpnI gene from *Diplococcus pneumoniae* G41  
Casa suministradora: Stratagene (Merck).

**Taq polimerasa:** para las reacciones de PCR que no fueran para mutagénesis dirigida realizaron con el enzima **Pfu** Taq polimerasa de la casa Biotools, sus características son estas:

La Taq polimerasa para mutagénesis dirigida venía incluida en el kit de la casa Stratagene y se trata de una polimerasa con actividad exonucleasa 5'-3' deleccionada.

La ligasa en reacciones de ligación del DNA se había adquirido a la casa Roche y era originaria del fago T3. Breve descripción: la ligasa de DNA T4 cataliza la formación de los enlaces fosfodiéster entre los grupos vecinos finales 3'-hidroxilo y 5'-fosfato de extremos de doble hebra de DNA. Fuente: *E. coli* NM989.

### **Lys- endoproteasa:**

Enzima proteolítico que escinde específicamente por el extremo C-terminal de Lisinas endógenas adquirido a la casa SIGMA. El enzima define sus unidades como la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1  $\mu\text{mol}$  de N-p-tosyl-Gly-Pro-Lys p-nitroanilida por minuto a un pH de 7.7 a 25 °C. En el vial adquirido se encuentran 3 unidades (a 150 unidades por miligramo). Proveniente de *Lysobacter enzymogenes*.

### **Ribonucleasa A**

Ribonucleasa pancreática bovina, Ribonucleasa I, Ribonucleato 3'-pirimidinooligonucleotido hidrolasa, RNasa A. RNasa A pancreática que escinde específicamente los enlaces fosfato en el extremo 3' de pirimidinas (uracilo o citosina).

Tipo II.A (Sigma).

Número de la Comisión de Enzimas (EC) : 3.1.27.5

### **Cepas bacterianas**

Las cepas bacterianas utilizadas en los experimentos y en los procesos de propagación y almacenamiento de plásmidos han sido éstas:

*Escherichia coli* BL21 DE3, con el genotipo:  $F^- ompT hsdSB (r_B^- m_B^-) gal dcm met$  (DE3)

*Escherichia coli* Novablue (cepa comercial de *E.coli* para propagación y preparación de plásmidos). Su genotipo es:  $endA1 hsdR17 (r_{K12}^- m_{K12}^+) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA^+ B^+ lacI^q Z\Delta M15::Tn10]$  (Tet<sup>R</sup>) Su capacidad de transformación teórica es de  $2 \times 10^6$  células transformantes por 0.2 ng de plásmido en 20  $\mu\text{l}$  de bacterias

*Escherichia coli* BL21 DE3 pLys Rosetta Gami©, propiedad de la casa Promega. Su genotipo es este:  $\Delta ara-leu 7697 \Delta lacX74 \Delta phoAPvuII phoR araD139 galE galK rpsL F' [lac^+ (lacI^q)pro] gor522::Tn10(Tc^R) trxB::kan$  (DE3) pLysSRARE (argU, argW, ileX, glyT, leuW, proL) (Cm<sup>R</sup>). Su capacidad de transformación teórica es de  $2 \times 10^6$  células transformantes por 0.2 ng de plásmido en 20  $\mu\text{l}$  de bacterias

*Staphylococcus aureus*

La cepa utilizada de esta especie es la A502, su descripción genotípica sería *wild type* con el gen *agr*<sup>+</sup> (ATCC 14117):

### **Primers**

Los primers o cebadores que se indicaron en materiales y métodos para realizar la mutagénesis dirigida fueron encargados a la casa comercial Roche y se pidieron con unas específicas características:

Pureza: Purificación por columna cromatográfica HPR3 (pureza Standard en el servicio de síntesis)

Presentación: DNA liofilizado

Escala molar: 0.02 µM

Primers forward y reverse (presentado en sentido inverso) para la mutagénesis dirigida de RNasa 7 A75P :

5'-CACCAAGAGCCACGGG C GGCACAGGGACTGG-3'

3'-GTGGTCTCGGTGCCC G GGCACAGGGACTGG-5'

Primers forward y reverse (presentado en sentido inverso) para la mutagénesis dirigida de RNasa 7 H93Y :

5'-CTCACCTCAGGAAG A TAGGCTTGACGTCCA-3'

3'-GAGTGGAGTCCCTTCC A TAGGCTTGACGTCCA-5'

## 10. Abreviaturas

Abs: Absorbancia

ASCII: Código de datos informáticos alfanumérico.

ATP: adenosín trifosfato

BCA: Acido Bincomicrinómico

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA: *Bovine Serum Albumin*. Albúmina de suero bovino.

CCAAT: secuencia del promotor para la transcripción y por extensión factores de transcripción que se adhieren a dichas secuencia.

Cfu's: *Colony forming units*. Unidades formadoras de colonias

CV: Coeficiente de Variación

DNA: Acido desoxirribonucleico

DOPC: Dioleil- fosfatidil colina

DOPG: Dioleil- fosfatidil glicerol

Dnt: Desnaturalizado/a

DSC *Differential scanning calorimetry*: calorimetría diferencial de barrido

DTT: Ditiotreititol

ECP : *Eosinophil cationic protein* /Proteína catiónica de eosinófilo (RNasa 3/ECP).

EDN: *Eosinophil derived neurotoxin* /Neurotoxina derivada de eosinófilo (RNasa 2)

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EF: Electroforesis

EPO: *Eosinophil peroxidase*. Peroxidasas de Eosinófilo

FPLC: *Fast protein liquid chromatography* Cromatografía líquida rápida para proteínas.

FVC : *Forced vital capacity*. Capacidad vital forzada. Volumen espiratorio máximo forzado en pruebas neumológicas.

FTIR : *Fourier Transformed Infra Red*. Infrarrojo por transformada de Fourier.

HPLC: *High Pressure Liquid Chromatography*. Cromatografía Líquida de alta presión.

IPTG: isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside

LB: Luria Bertrani medium. Medio de crecimiento microbiano Luria-Bertrani

LPS: Lipopolisacáridos.

MALDI-TOF: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization –Time of flight* Técnica de ionización para Espectrometría de masas, con detector de iones por tiempo de vuelo.

MCS: *Multiple Cloning Site*. Sitio de Clonación multiple.

NAG: N-Acetilglucosamina

NAM: N-Acilmurámico

NAPB(-TSB): sodium phosphate buffer. Tampón sodio-fosfato. (*tripticase soy broth solution*) solución de medio tripsinizado de soja

NFAT: *Nuclear factor of activated T-cells*. Factor nuclear de células T activadas, familia de factores de transcripción implicados en respuesta inmune

NMR: *Nuclear Magnetic Resonance*. Resonancia Magnética Nuclear.

OD : *Optical density*. Densidad óptica.

PBS : *Phosphate Buffer Saline*. Tampón de fosfato salino.

PCR : *Polymerase Chain Reaction*. Reacción en cadena de la Polimerasa (técnica clásica de amplificación de DNA/RNA)

PEG : Polietilenglicol

PU.1: proteína reguladora de expresión génica en respuesta inmune

R: Coeficiente de regresión

RI : *Ribonuclease Inhibitor*. Inhibidor de la Ribonucleasa.

RNA: *Ribonucleic acid*. Acido Ribonucléico.

SDS: Sodio Dodecil Sulfato

SDS-PAGE: *SDS- PolyAcrilamide Gel Electrophoresis*. Electroforesis de Gel de poliacrilamida-SDS

SELDI-TOF: Surface Enhanced Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry

SYTOX: Sonda fluorescente impermeable a membranas integras de células vivas.

T. amb. : Temperatura ambiente.

TAE : *Tris-Acetic-EDTA*. Tampón de recorrido de electroforesis para ácidos nucleicos (composición en Materiales y Métodos).

TB : *Terrific Broth*. Medio de cultivo enriquecido para la expresión de proteínas (y otros usos en Biología Molecular). Composición en Materiales y Métodos.

TBS(-T) : *Tris buffered saline-Tween*. Tampón salino de Tris-Tween (detergente)

TE : Tris-EDTA, tampón para disolución de ácidos nucleicos.

TEMED : N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

TFA : Acido trifluoroacético.

U : unidades.

UA : unidades arbitrarias

UV : Ultravioleta

UV-CD : dicroísmo circular en el ultravioleta

Wt : *wild type* « tipo nativa » forma nativa, original o silvestre de un gen o producto génico



## **11. ANEXOS**



## 11.1. PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS:

Boix E, Torrent M, **Sánchez, D** and Nogués MV  
Mechanism of action of Eosinophil Cationic Protein antimicrobial activity  
*Current Pharmaceutical Biotechnology* (2008) 9, 141-52

Torrent M, **Sánchez D**, Buzón V, Nogués MV, Cladera J and Boix E.  
Comparison of the membrane interaction mechanism of two antimicrobial RNases:  
RNase 3/ECP and RNase 7.  
*Biochim Biophys Acta* (2009) n1788 v5 pp1116-25

Torrent M, Badia M, Moussaoui M, **Sanchez D**, Nogués MV and Boix E.  
Comparison of human RNase 3 and RNase 7 bactericidal action at the Gram-negative  
and Gram-positive bacterial cell wall.  
*FEBS J.* (2010) v277 n7 pp1713-25.

**Sánchez D**, Moussaoui M, Carreras E, Torrent M, Nogués V and Boix E  
Mapping the Eosinophil Cationic Protein antimicrobial activity by chemical and  
enzymatic proteolysis.  
*Biochimie.* (2010) n 93 pp 331-338



## **11.2. PUBLICACIÓN PRINCIPAL DE LA TESIS**





## Research paper

# Mapping the eosinophil cationic protein antimicrobial activity by chemical and enzymatic cleavage

Daniel Sánchez, Mohammed Moussaoui, Esther Carreras, Marc Torrent, Victòria Nogués, Ester Boix\*

Dpt. Bioquímica i Biologia Molecular, Fac. Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Cerdanyola del Vallès, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 30 July 2010

Accepted 8 October 2010

Available online 15 October 2010

## Keywords:

Antimicrobial peptides

Host defense

Proteolysis

Chemical cleavage

Eosinophil cationic protein

## ABSTRACT

The eosinophil cationic protein (ECP) is a human antimicrobial protein involved in the host immune defense that belongs to the pancreatic RNase A family. ECP displays a wide range of antipathogen activities. The protein is highly cationic and its bactericidal activity is dependant on both cationic and hydrophobic surface exposed residues. Previous studies on ECP by site-directed mutagenesis indicated that the RNase activity is not essential for its bactericidal activity. To further understand the ECP bactericidal mechanism, we have applied enzymatic and chemical limited cleavage to search for active sequence determinants.

Following a search for potential peptidases we selected the Lys-endoproteinase, which cleaves the ECP polypeptide at the carboxyl side of its unique Lys residue, releasing the N-terminal fragment (0–38).

Chemical digestion using cyanogen bromide released several complementary peptides at the protein N-terminus. Interestingly, ECP treatment with cyanogen bromide represents a new example of selective chemical cleavage at the carboxyl side of not only Met but also Trp residues. Recombinant ECP was denatured and carboxyamidomethylated prior to enzymatic and chemical cleavage. Irreversible denaturation abolishes the protein bactericidal activity.

The characterization of the digestion products by both enzymatic and chemical approaches identifies a region at the protein N-terminus, from residues 11 to 35, that retains the bactericidal activity. The most active fragment, ECP(0–38), is further compared to ECP derived synthetic peptides. The region includes previously identified stretches related to lipopolysaccharide binding and bacteria agglutination. The results contribute to define the shortest ECP minimized version that would retain its antimicrobial properties. The data suggest that the antimicrobial RNase can provide a scaffold for the selective release of cytotoxic peptides.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

The eosinophil cationic protein (ECP) is an host defense protein with antipathogen capacities [1]. Its bactericidal activity is not dependant on its enzymatic RNase activity [2] and the protein antibacterial activity correlates with its membrane disruption capacity [3]. To further understand ECP mechanism of action we have characterized the protein effect at the membrane and bacteria wall level [4–6]. The antimicrobial protein binds to bacteria cells and triggers the cell death, with a particular agglutination activity for *Escherichia coli* [7].

Antimicrobial peptides in living organisms serve as a defense system in addition to, or complementary to, the highly specific

cell-mediated immune response. As antibiotic resistance develops rapidly as soon as new agents are introduced, there is an increased interest to develop antimicrobial compounds with alternative mechanisms of action [8].

Antimicrobial peptides can act both at the bacteria envelope and at a specific intracellular target [9–12]. While intracellular vital components could be targeted by specific enzymatic activities, such as RNases, DNases or proteases, many antimicrobial polypeptides trigger the pathogen death by a direct action at the cell surface. Many antimicrobial peptides bind specifically to bacteria wall components, as peptidoglycans or lipopolysaccharides (LPS), and have a membrane lytic activity [13–15]. We also find several cases where a well characterized host defense enzyme can simultaneously disrupt the cellular membrane by an unspecific lysis mechanism. As an example, lysozyme, not only attacks the peptidoglycan layer of Gram-positive cells but can also promote the cell aggregation and lead to the Gram-negative cell lysis [16]. Lysozyme specifically binds to LPS and can disrupt the permeability barrier that represents the outer membrane of Gram-negative strains [17].

*Abbreviations:* CFU, colony forming units; CNBr, cyanogen bromide; ECP, eosinophil cationic protein; LB, Luria Broth; LPS, lipopolysaccharides; poly(U), polyuridylic acid; TFA, trifluoroacetic.

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 5814147; fax: +34 93 5811264.

E-mail address: [Ester.Boix@uab.es](mailto:Ester.Boix@uab.es) (E. Boix).

Interestingly, denatured lysozyme loses its muramidase activity but retains its membrane disruption ability [9]. Aprotinin, a protease inhibitor, denatured and devoid of protease inhibiting activity still retains its bactericidal activity [18]. Another example is cathepsin, a neutrophil proteolytic enzyme, which retains its bactericidal properties after ablation of its catalytic site [19]. These examples may represent a more generalized strategy that combines a multi-level mechanism of action, with a first mechanical step and a specialized intracellular function. Multifunctional host defense agents that can target cells simultaneously at diverse cellular levels are good candidates to reduce the development of bacteria resistance mechanisms [12,20].

There are also many examples in the literature of antimicrobial proteins which suffer post-translational proteolysis modifications. In fact, the proteolytic processing is used extensively in immunology cascade events. A local cleavage can release the active peptides in the area of infection or inflammation [21]. As an example, a specific cleavage of cathelicidins is a critical step carried out by several proteases dependant on the polypeptide sequence and post-translational modifications, which provides a mechanism for *in situ* activation [22]. Limited proteolysis of an inactive protein precursor can release *in vivo* an active fragment, which often corresponds to the N- or C-terminus [23]. The research pharmacology industry has often taken as templates these proteolysis products for drug design. A recombinant fragment corresponding to the N-terminal end of the bactericidal permeability-increasing protein (BPI), expressed in neutrophils, is currently under clinical assay in phase III, as an alternative antibiotic. Lactoferricin is a naturally occurring microbicidal peptide derived from the N-terminus of lactoferrin, by action of pepsin in the stomach [24], and is very effective against some antibiotic resistant strains [25]. Cathelicidins, expressed in neutrophils [26,27] or cryptidins, secreted by Paneth cells [28], are active peptides liberated from inactive proprotein precursors, by a specific proteolytic activation.

Interestingly, several members of the RNase A superfamily with antimicrobial activity, have conserved their active site architecture but do not require their enzymatic RNase activity for bacteria cytotoxicity [29]. Moreover, derived peptides from the chicken leukocyte RNase A-2 reproduce most of the protein original bactericidal activity [30]. Some cytotoxic RNases may then serve as a scaffold of active peptides [31].

We describe here the analysis of ECP digestion products released both by chemical cleavage and enzymatic proteolysis.

## 2. Methods

### 2.1. Materials

Endoproteinase Lys-C (E.C. 3.4.24.20) from *Lyso bacter enzymogenes* was purchased from Sigma–Aldrich. pET11 expression vector and *E. coli* BL21 (DE3) cells were from Novagen, Madison, WI. Iodoacetamide was from Sigma–Aldrich. Symmetry C18 chromatography column was from Waters Corporation, Milford, MA. *Staphylococcus aureus* 502 A strain was from ATCC, Rockville, MD. BacTiter-Glo™ assay was from Promega. Microcon and Amicon filtering devices were from Millipore. Synthetic peptides ECP (1–19), ECP(24–45) and ECP(1–45) were synthesized and purified at the Proteomics and Protein Chemistry Unit, Pompeu Fabra University, Spain, as previously described [32].

### 2.2. ECP expression and purification

Recombinant ECP was expressed using a synthetic gene for human ECP coding sequence and the pET11c expression plasmid [33]. Protein expression in the *E. coli* BL21 (DE3) strain, recovery of

the protein from inclusion bodies, and the purification steps were carried out as previously described [33]. The protein was then desalted and lyophilized.

### 2.3. ECP reduction and carboxyamidomethylation

Reduced and carboxyamidomethylated ECP was prepared by a modification of the protocol previously described [34]. Lyophilized ECP was dissolved to a concentration of 10 mg/ml in 1 M Tris–HCl, pH 8, buffer containing 2 mM EDTA and 6 M Guanidinium hydrochloride. After an incubation of 1 h at 37 °C, reduction of disulfide bridges was performed by addition of 25 mM dithiothreitol final concentration (10-fold molar excess over the total cysteine content). The mixture was incubated for 90 min at 37 °C, and then iodoacetamide was added at a 250 mM final concentration. The sample was further incubated for 1 h at 37 °C in the dark. The alkylated protein was filtrated and buffer exchanged in 50 mM acetic acid in Amicon filtrating tubes (3000 Da cut-off), and lyophilized.

### 2.4. Enzymatic proteolysis by Lys-C proteinase cleavage

Limited proteolysis of ECP was performed using the Lys-C-endoproteinase, which cleaves polypeptides at the carboxyl side of lysyl residues [35]. Proteolysis was achieved by incubating, for 3 h at 25 °C, 1 mg of the reduced and carboxyamidomethylated ECP in 50 µl of 0.1 M Tris/HCl pH 7.8 buffer with 0.05 U/ml final concentration of Lys-endoproteinase. The two fragments resulting from the process were separated using a Microcon filtrating tubes with the appropriate molecular exclusion ranges (10000 and 3000 Da cut-off). The cleavage efficiency was checked by SDS-PAGE, and confirmed by N-terminal sequencing and the molecular mass was determined by MALDI-TOF. The N-terminal sequencing of the largest cleaved fragment identified the sequence NQNTFLR, thus confirming that a unique cleavage has taken place at Lys38 residue, releasing the N-terminus 0–38 peptide. The presence of a Met0 residue, from the recombinant expression in a prokaryote system should also be taken into account.

### 2.5. Chemical cleavage of ECP by cyanogen bromide

Cyanogen bromide cleavage was performed by a modification of the protocol previously described [36], as detailed [37]. Briefly, the reduced and carboxyamidomethylated lyophilized ECP was dissolved in 0.1 N HCl at 10 mg/ml and added to a CNBr solution at 45 mg/ml in 0.1 N HCl, assuring a 100 M fold excess. The mixture was stirred for 24 h at room temperature and lyophilized.

The CNBr cleavage products of the chemical proteolysis of ECP were analysed by SDS-PAGE. Purification of the peptides was performed by HPLC reverse phase chromatography, using a Vydac C4 column and a Symmetry C18 column, by a modification of the previously described protocol [38]. A sequential gradient from solvent A (water-0.05% TFA) to solvent B (100% acetonitrile-0.05% TFA) was applied, up to 25% of solvent B in 10 min, then to 35% of solvent B for 65 min and finally to 100% solvent B for 20 min. Fractions of 2 ml were collected at a flow rate of 1 ml/min. Peptide elution was followed at 214 and 280 nm. The main representative peaks were analysed by N-terminal sequencing and molecular mass determination was carried out by MALDI-TOF methodology.

### 2.6. RNase activity

Zymograms or activity-staining gels were performed as described [39] to confirm the ECP denaturation process. Samples were mixed with the loading buffer (60 mM Tris–HCl, 10% glycerol, 0.015% bromophenol blue, 3% SDS, pH 6.8) and analysed for RNase

activity by zymogram on SDS-15% PAGE containing 0.6 mg/mL of polyuridylic acid (poly(U)) as substrate. After elimination of SDS by incubation with 10 mM Tris–HCl, pH 7.5 and 20% isopropanol buffer, and two subsequent washes of 15 min of 10 mM Tris–HCl, pH 7.5, the gels were incubated at 25 °C for 60 min in 100 mM Tris–HCl, pH 7.5. Gels were stained with 0.2% of blue of toluidine in Tris–HCl 10 mM, pH 7.5.

### 2.7. Antibacterial activity

Antibacterial activity against *E. coli* BL21 (DE3) and *S. aureus* 502 A strains was tested by turbidimetry after addition of the protein or peptides and by measuring the sample optical density at 600 nm. A 2 mL culture grown in Luria Broth (LB) was incubated overnight at 37 °C and diluted with fresh media. A stationary phase culture ( $OD_{600} = 1$ ) was transferred to 5 ml of fresh culture and grown to exponential phase ( $OD_{600} = 0.5–0.7$ ). Bacteria suspensions were centrifuged at 8000g and washed twice in 10 mM sodium phosphate, pH 7.5. Cell pellets were diluted in 10 mM phosphate buffer, pH 7.5 to an  $OD_{600} = 0.6–0.8$ . Cells were incubated at room temperature, with continuous stirring, protein was added after 30 min at a final concentration of 4  $\mu$ M, and the optical density at 600 nm was recorded. The percentage of initial OD was calculated and plotted as a function of time.

Alternatively the antibacterial activity was assayed by registering the colony forming units as a function of time. Cultures of *E. coli* BL21 (DE3) and *S. aureus* 502 A were grown in LB overnight at 37 °C, diluted in a fresh culture and grown to exponential phase ( $OD_{600} = 0.5–0.7$ ). Cells were washed twice in 10 mM sodium phosphate, pH 7.5. Aliquots of 20  $\mu$ l of bacterial suspension were incubated up to 4 h at 37 °C with different protein concentrations (0.5, 1, 2 and 4  $\mu$ M) or with the same volume of phosphate buffer as a control. The 10-fold serial dilutions, from 1/100 to 1/10,000, were plated on LB agar Petri dishes and grown overnight at 37 °C. The colony forming units (CFU)/mL for each treatment was determined. In each experiment, all the assays were carried out in triplicate, and the results obtained were the average of three independent experiments.

### 2.8. Bacteria viability assay

Antimicrobial activity was also assayed by following the reduction of bacteria viability by a modification of the protocol described [40], using the BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability kit (Promega), which measures the number of viable bacterial cells, by ATP quantification. ATP, as an indicator of metabolically active cells, is indirectly measured by a coupled luminescence detection assay. The luminescent signal is proportional to the amount of ATP, required for the conversion of luciferin into oxyluciferin, in the presence of luciferase. Overnight cultures of *E. coli* BL21 (DE3) were used to inoculate fresh LB liquid cultures, and logarithmic phase cultures were grown to an  $OD_{600}$  of 0.6. ECP or its derived peptides were added to 200  $\mu$ l of culture at a final concentration from 4 to 20  $\mu$ M. The bacteria viability profile was followed at 37 °C up to 24 h.

For the evaluation of the bactericidal activity of chromatography fractions from the separation of ECP cleavage products, the samples were processed as follows. Each collected fraction was lyophilized and then resuspended in 100  $\mu$ l of 10 mM sodium phosphate, pH 7.5, buffer, and an aliquot of 15  $\mu$ l of each fraction was incubated with 250  $\mu$ l of cell culture and the bacteria cell viability was registered after 1 h. The active fractions were further evaluated by assessing the activity profile every hour up to 5 h with a final overnight measurement. The cell culture was diluted 1/10 in 50  $\mu$ l of LB and an equal quantity of BacTiter-Glo™ reconstituted reagent was added over the mixture in the 96-well plate for the assay. Plates were equilibrated at room temperature. The measurements were taken

by arbitrary units of luminescence, registered using an opaque 96-well plate with a luminometer (Victor–Perkin Elmer). Arbitrary units of luminescence, as a measurement of the ATP cell content were taken as a measurement of the viable bacteria cell total.

## 3. Results and discussion

Searching for sequence determinants of ECP antimicrobial activity we have screened its primary structure by the analysis of the protein selective cleavage products. Recombinant ECP was irreversibly denatured and enzymatic and chemical cleavage products were analysed. The protein fragments (Fig. 1) were purified and their antimicrobial activity was assessed in both Gram-negative and Gram-positive bacteria species. The antimicrobial activity of the most active cleavage digestion product has been further compared with ECP synthetic derived peptides.

### 3.1. Denatured ECP

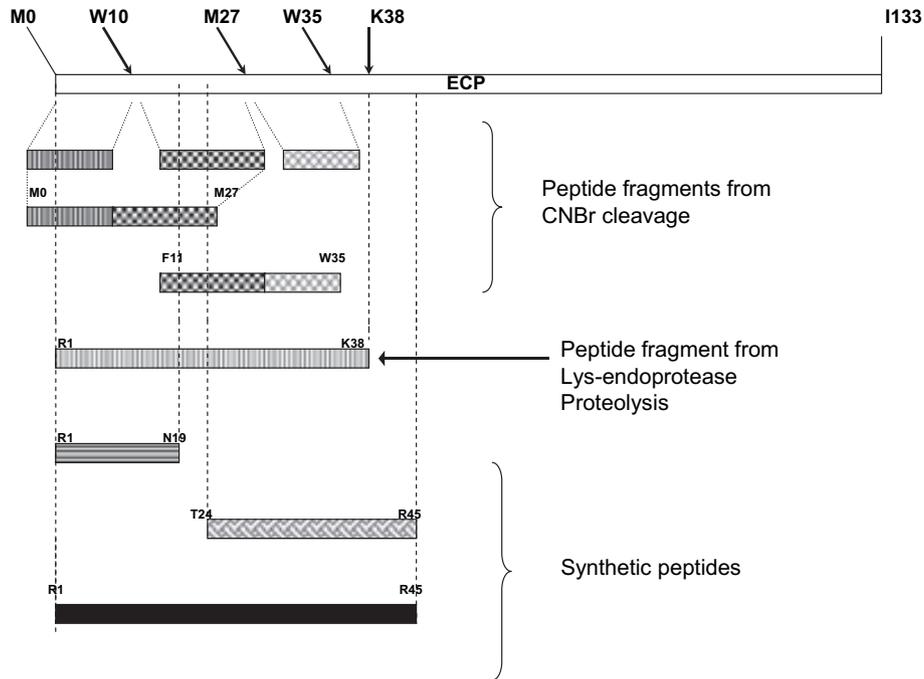
Recombinant ECP was expressed and purified as previously described [33]. The protein is expressed without its secretion signal peptide and includes an N-terminal Met residue. Prior to enzymatic and chemical digestion, the protein was reduced and carboxyamidomethylated to discard any potential refolding that may interfere in the cleavage process, and to avoid formation of any intermolecular disulfide bridges between the released fragments after the cleavage process. The protocol was previously successfully applied to irreversibly denatured RNase A [41]. ECP, as RNase A, has 8 cysteine residues that can form 4 disulfide bridges, and is known for its particular stability and ability to reversible refold to native conformation [42,43]. On the other hand, ECP has an even higher thermal stability than the other studied RNase A family counterparts [44]. The lack of RNase activity of denatured ECP (ECPdnt) was assessed by activity-staining gel, corroborating the efficiency of the irreversible denaturation treatment (Fig. S1).

The bactericidal activity of denatured ECP was then assayed by the BacTiter-Glo™ methodology which estimates the number of viable bacteria cells. No effect was detected on both *E. coli* and *S. aureus* cell cultures treated with ECPdnt, assayed from 4 to 20  $\mu$ M, after 5 h of incubation. The comparative kinetic profile with the native recombinant protein (ECPnat) confirmed that no effect on the cell viability for both bacteria species was registered even after an overnight incubation with the denatured protein (Fig. 2). The results indicate that ECP polypeptide primary sequence does not provide by itself the protein bactericidal activity. Therefore, ECP differs from other antimicrobial polypeptides that do retain their antimicrobial activity when denatured. As an example, the heat denatured lysozyme does retain the membrane disrupting activity of the native protein [9,45].

### 3.2. Enzymatic proteolysis of ECP

Enzymatic cleavage of denatured ECP by Lys-C-endoproteinase provided a unique cleavage site (Fig. 1). A first screening of potential peptidases suitable for an enzymatic digestion of ECP polypeptide using the ExpASY Peptide Cutter tool [46] indicated that most of the available proteases can cleave the protein at many target sequences releasing too many digestion products for an activity screening analysis. Therefore, we selected the Lys-C-endoproteinase that presents a unique target in ECP sequence, Lys38.

Incubation conditions were optimized and the unique cleavage after the carboxyl side of Lys38 residue was confirmed by SDS-PAGE (Fig. S2) and N-terminal sequencing. The fragments were isolated by combining selective filtering devices of 3,000 and 10,000 MW cut-off and the molecular weight of the purified N-terminus



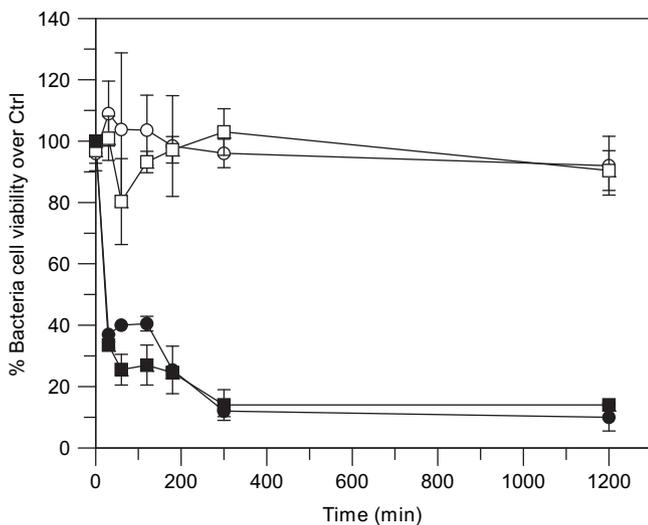
**Fig. 1.** Schematic picture of ECP enzymatic and chemical cleavage products, together with the characterized ECP synthetic peptides. Cleavage sites are indicated, corresponding to Met/Trp and Lys residues for CNBr and Lys-endoproteinase cleavage respectively. Fragments are indicated by their corresponding first and last amino acid.

segment was assessed by MALDI-TOF spectrometry. The recovered fragment, ECP (0–38), includes the two unique Trp residues in ECP sequence and is highly cationic, rich in Arg residues, with an estimated pI of 11.7, as predicted by the *ProtParam* online program from the *ExPASy* website [47].

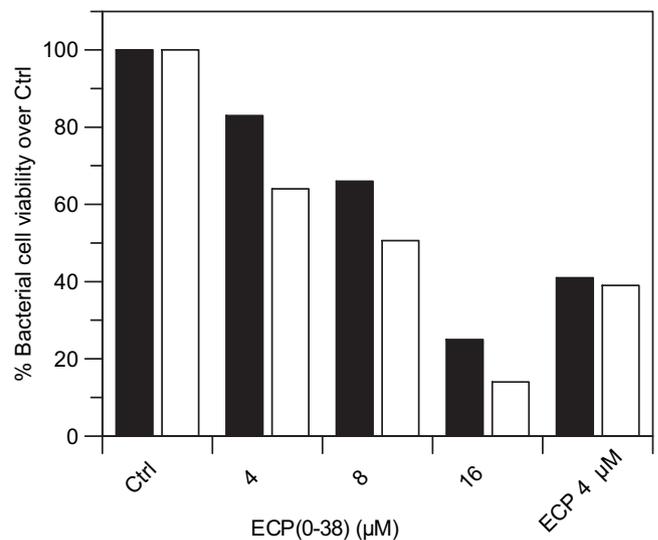
The proteolytic fragment partly retained the bactericidal activity of the whole protein against both tested *E. coli* and *S. aureus* species. A comparative analysis as a function of the protein concentration indicates that at 4  $\mu\text{M}$  the ECP(0–38) retain more than 50% of the

bactericidal activity (Fig. 3). The bactericidal activity of the ECP (0–38) fragment on *E. coli* cells is also retained during an overnight incubation (Fig. 4). The results corroborate our previous experimental and *in silico* data which locate the main active domain at the protein N-terminus [32,48].

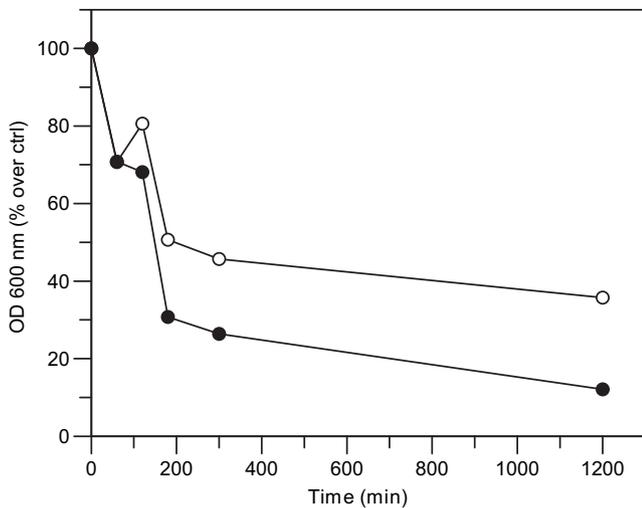
We could even be tempted to speculate that a potential protein cleavage may represent an *in vivo* mechanism for the release of a functional active N-terminus domain. In fact, as previously discussed, there are many examples in the literature where the proteolysis of host defense proteins releases *in situ* an active peptide.



**Fig. 2.** Comparative bactericidal activity of native (ECPnat) and denatured (ECPdnt) ECP on *E. coli* and *S. aureus* bacteria cell cultures. Cell viability values were measured by the BacTiter-Glo™ methodology and calculated in relation to control untreated cells. The bacteria cells were incubated with 4 and 10  $\mu\text{M}$  for native and denatured proteins respectively. • *E. coli* incubated with ECPnat; ■ *S. aureus* incubated with ECPnat; ○ *E. coli* incubated with ECPdnt and □ *S. aureus* incubated with ECPdnt. The values are a mean of three independent experiments, and error bars indicate the standard deviation.



**Fig. 3.** Graph of the bacteria cell viability measured by the BacTiter-Glo™ method. The ECP(0–38) peptide activity was tested at a concentration range up to 16  $\mu\text{M}$  over both *E. coli* (black) and *S. aureus* (white) cell cultures in comparison with ECP at 4  $\mu\text{M}$ . Cells were incubated for 1 h and the percentage of viable cells was calculated in relation to control untreated cells.



**Fig. 4.** Growth evolution assessed by optical density at 600 nm of *E. coli* cell culture after incubation with the ECP(0–38) peptide at 10  $\mu$ M (○) compared with ECP at 4  $\mu$ M (●). The values are a mean of three independent experiments.

It is interesting to note that while the other RNase A family partners include in their sequences other Lys residues, ECP has only retained one. In fact, Lys38 is conserved in all the family members, as part of the active site catalytic triad. Moreover, during eosinophil RNases divergence from the ECP/EDN common ancestor, ECP lineage retained only one Lys, but acquired a considerable number of Arg residues. The ECP/EDN divergent evolution lead to the ECP hominoid primate genes, which only retained the catalytic Lys38, while less evolved ECP primates and all the EDN counterparts maintain some additional Lys residues [49] (Fig. S3). The other closest ECP homologues, the eosinophil associated RNases (Ears), which are secreted by rodent eosinophils and can also display some antimicrobial activity, present one or two more Lys residues (Fig. S3).

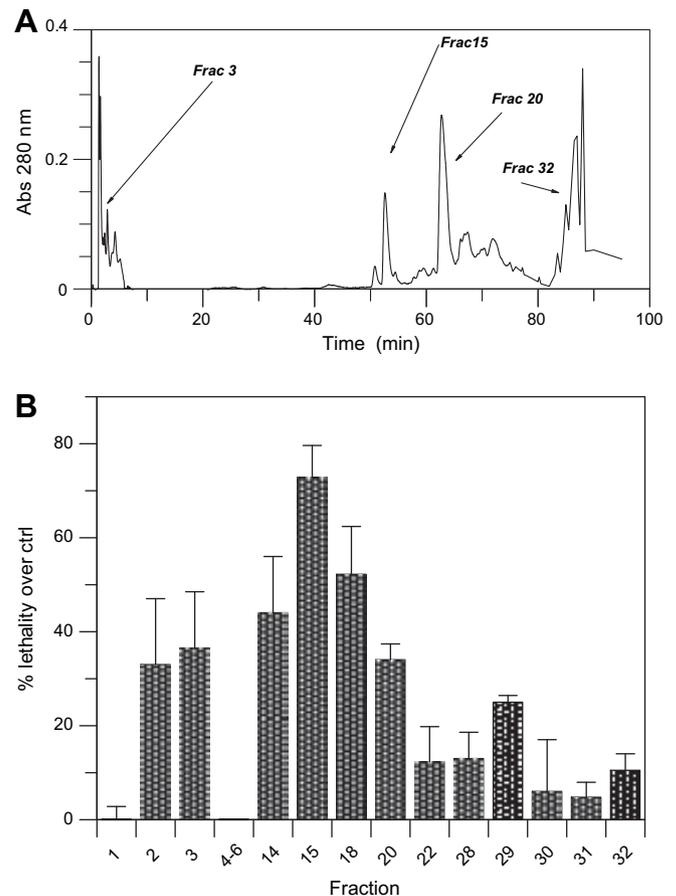
Unfortunately, the literature on the potential proteases involved in a directed *in situ* proteolysis is scarce. Lys-endoproteinases are described in some bacteria species [35] but there is currently no evidence of this activity in a physiological activation process during the host immune response.

### 3.3. Chemical cleavage of ECP

To complement the enzymatic proteolytic analysis, we also performed a chemical cleavage on ECP. The cyanogen bromide (CNBr) chemical treatment was chosen for the selective Met cleavage at the carboxyl side of the unique Met27. Surprisingly, a battery of digestion products was collected. Characterization of the chemical proteolysis products indicated that proteolysis had taken place at the carboxyl side of not only Met but also Trp residues (Fig. 1). This behaviour was also previously reported for some other proteins [50–52]. The selective cleavage after Trp residues has been related to a promoted oxidation and degradation of the indole ring, although the chemical explanation is not fully known [52]. In fact, a protocol for specific cleavage at the carboxyl side of Trp residues has been set up, combining a first oxidation step followed by CNBr cleavage [53]. In our particular experimental setting, the preliminary protein treatment with iodoacetamide may have favoured the additional cleavage at the Trp residues. The protein carboxyamidomethylation treatment was performed to prevent the formation of potential inter and intramolecular disulfide bridges between free Cys of the peptide digestion products. The CNBr treatment was appropriate for our purpose as it provided a collection of fragments of variable size at the protein N-terminus (Fig. 1).

The CNBr digestion products were purified by reverse phase HPLC chromatography using a C18-Symmetry column (Fig. 5; Table S1). Representative fractions were characterized by checking their MW by MALDI-TOF and the N-terminal sequencing of the first up to 8 residues, which confirmed the cleavage after residues W10, M27 and W35 (Fig. 1 and Table S1). No cleavage after the Met0 residue of the recombinant protein was observed at the assayed conditions, as determined by N-terminal sequencing. Fractions 3, 15 and 20, as indicated in the HPLC chromatography profile, correspond to fragments F11-M27, R28-W35 and F11-W35 respectively. A silver staining SDS-18%PAGE was also performed to detect the presence of the higher MW fragments in each fraction (Fig. S4). By SDS-PAGE analysis we could identify at the end of the reverse phase chromatography the fragments corresponding to the protein C-terminus (Table S1). The elution peak corresponding to the denatured protein (ECPdnt) prior to digestion was also located at the end of the chromatography, and corresponded to an elution time of about 80 min in the same chromatographic conditions.

Collected aliquots from the chromatography profile were assessed for bactericidal activity and active peptides were



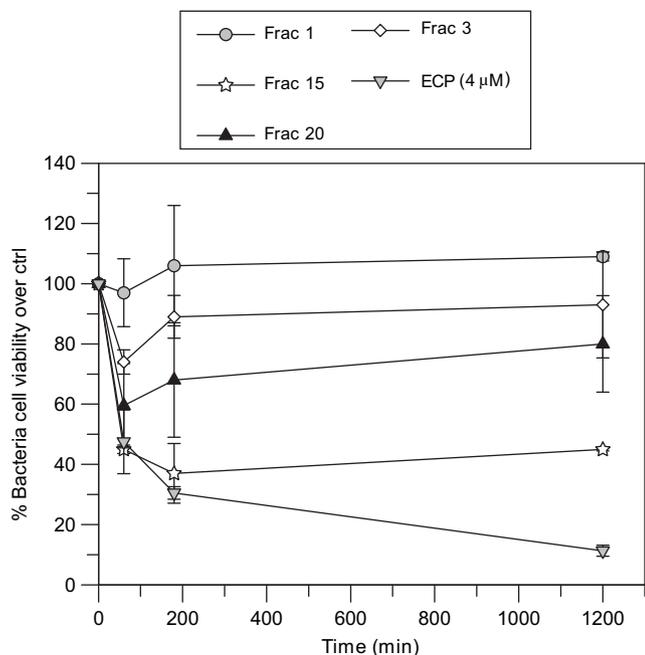
**Fig. 5.** A) HPLC chromatography profile of CNBr ECP cleavage products by reverse phase chromatography using a C18-Symmetry column. Solid line corresponds to absorbance at 280 nm. The fractions which have been collected for further characterization have been highlighted in the graph. B) An aliquot of each fraction was tested for bactericidal activity. Lethality percentage in *E. coli* bacteria cells was calculated as a measurement of percentage reduction of bacteria viable cells in relation to control untreated cells, as measured by the BacTiter-Glo™ method, as detailed in the methodology section. The correspondence of fraction numbering is detailed in Table S1. Representative selected fractions were assayed. Only aliquots corresponding to peak fractions are shown. The values are a mean of three experiments, and their respective error bar standard deviation is indicated. ECP activity at 4  $\mu$ M was assayed as a positive reference control.

identified. Bactericidal activity was evaluated by assessing the bacteria cell viability on treated *E. coli* cultures using the BacTiter-Glo™ kit (Fig. 5; Table S1). An equivalent activity profile was recorded on *S. aureus* cell cultures (results not shown). A further comparison of representative fractions was performed by registering the kinetic profile for up to 24 h of an *E. coli* treated culture (Fig. 6). Results indicate that the R28-W35 and the F11-W35 are the most active fragments. No activity was registered at the end of the chromatogram, corresponding to the C-terminus bigger fragments (Fig. 5; Table S1).

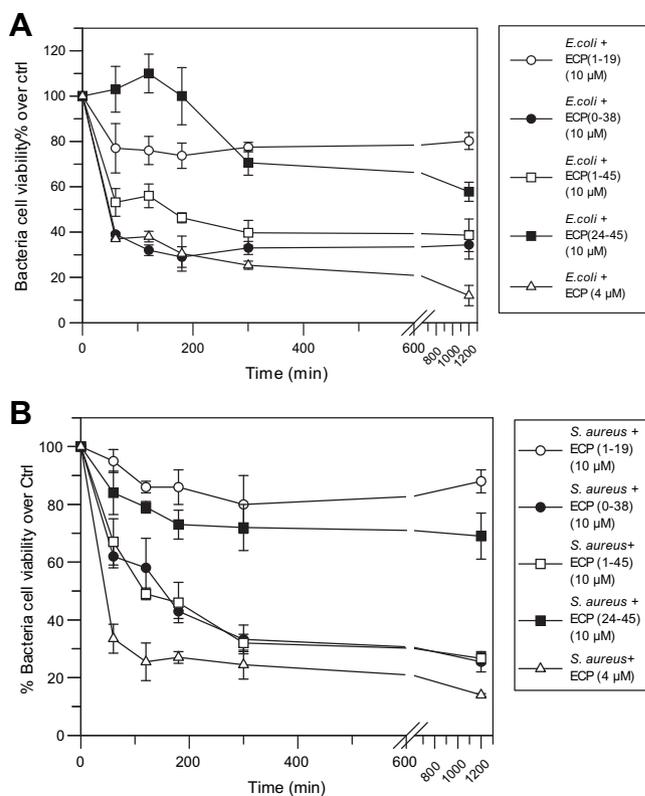
### 3.4. Comparison of ECP cleavage products with synthetic ECP derived peptides

To further delimitate the ECP antimicrobial region, we have compared the bactericidal activity of the most active fragment with ECP synthetic peptides. A first comparison between enzymatic and chemical cleavage products indicated that the ECP(0–38) fragment provided the highest bactericidal activity (Figs. 7 and 8). The synthetic peptides ECP(1–19), ECP(24–45) and ECP(1–45) correspond to the protein primary structure, where Cys residues (Cys 23 and Cys 37) have been substituted by Ser to avoid the potential formation of intermolecular disulfide bonds [32].

Further comparison of the ECP(0–38) peptide with the ECP N-terminus derived synthetic peptides (Figs. 7 and 8) indicates that the fragment released by Lys-endoproteinase cleavage, ECP(0–38), is the most active, being even slightly more active than the ECP(1–45) synthetic peptide. On the other hand, the current evaluation of synthetic peptides activity using the bacteria viability test (Fig. 7) confirmed previous reported data, where the peptide potency was analysed by the reduction of the colony forming units (CFU) [32]. For all peptides, no overall significant differences are detected for



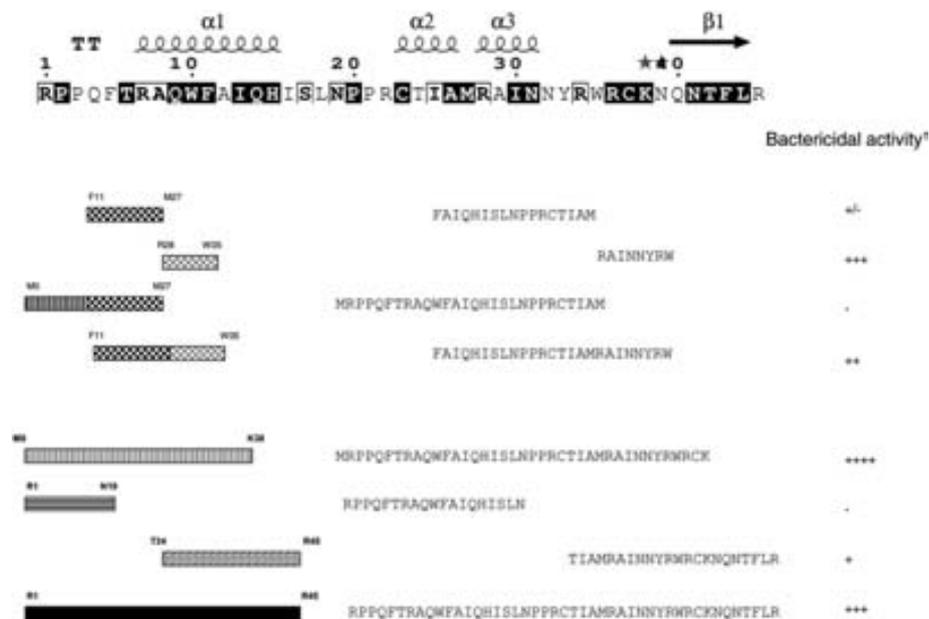
**Fig. 6.** Graph of bactericidal activity of selected HPLC reverse phase chromatography fractions collected from the ECP digestion with CNBr. Activity on *E. coli* cell cultures was assessed by following the bacteria cell viabilities profile as a function of time using the BacTiter-Glo™ kit. The measurements are calculated over the reference non-treated cell control. Fractions are named according to Fig. 5 and fraction number correspondence with chromatography elution time is detailed in Table S1. Each chromatography fraction was assayed for bactericidal activity as detailed in the methodology section. ECP was tested at 4  $\mu$ M. The points are a mean of three independent experiments, and error bar is the standard deviation.



**Fig. 7.** Comparison graph of bactericidal activity of the ECP(0–38) proteolytic fragment with the ECP N-terminal synthetic peptides. Bacteria cell viabilities of *E. coli* (A) and *S. aureus* (B) treated cell cultures were assessed using the BacTiter-Glo™ methodology. The cell viability percentages are calculated in relation to the non-treated cell cultures. Bacteria cells were incubated for up to 24 h with peptides at 10  $\mu$ M and ECP at 4  $\mu$ M. The values are a mean of three independent experiments, and the error bar is the standard deviation.

both tested species. A summary of all the tested peptides is shown in Fig. 8. A qualitative comparison of their respective bactericidal activity delimitates the 1–38 segment as the key region, which in its turn includes the 28–35 active stretch.

The results corroborate previous data by site-directed mutagenesis which highlighted the main contribution of W35R36 in both the membrane lytic and cytotoxic activities [3,54]. Direct interaction of W35 with lipid bilayers was also confirmed by biophysical characterization [4] and potential interactions of N-terminus residues with glycosaminoglycans were suggested by site-directed mutagenesis [55] and molecular docking modelling [56]. High affinity binding to bacteria wall glycosaminoglycans would contribute to the protein action on both Gram-negative and Gram-positive strains [5]. Moreover, the 1–38 sequence also overlaps the antimicrobial region predicted by our recently developed bioinformatic approach [48]. In fact, the protein N-terminus complies the basic biophysical requisites for antimicrobial peptides [57,58]. The active region presents an amphiphilic composition and high pI and its tendency to adopt a predominant helix conformation on a lipid environment would facilitate its membrane disruption properties. The structural characterization of the N-terminus synthetic derived peptides [32,59] suggests that the 0–38 fragment could also adopt a predominant  $\alpha$ -helix conformation when interacting to the lipid bilayer. In fact, the previously characterized 1–19 and 1–45 segment by NMR was found to present a predominantly unstructured conformation in aqueous solution with a tendency to form two helices, which is enhanced in the presence of an organic solvent or lipid micelles [59]. NMR analysis of the ECP(1–45) peptide confirmed that the



**Fig. 8.** Scheme including all the characterized peptides and a qualitative comparison of their respective bactericidal activities. Relative bactericidal activity, as assessed using the BacTiter-Glo™ assay on *E. coli* cell culture, as described in the methodology. Secondary elements corresponding to the ECP three dimensional structure (1QMT.pdb, [61]) are depicted at the top.

boundaries of the first  $\alpha$ -helix matches the corresponding native  $\alpha_1$  helix in the protein (from residues 6 to 15), while the protein  $\alpha_2$ -helix is lengthen in the peptide, spanning from residue 23 to the C-terminus [59]. Circular dichroism spectra of N-terminal synthetic peptides in the presence of SDS micelles also revealed an increase of their  $\alpha$ -helix conformation [32]. The peptide structuration on lipid bilayers should facilitate its membrane disruption activity, a process which might not be easily achieved by the full length polypeptide.

On the other hand, the ECP N-terminus includes an hydrophobic aggregation prone stretch which could trigger the observed protein aggregation on lipid bilayers and bacteria cell agglutination activity, promoting the bacteria cell death [7,32]. In fact, recent results from our group by site-directed mutagenesis confirmed the direct involvement of residue 13 in the protein aggregation activity [60].

To end up, we should emphasize that the identified protein sequence cannot fully reproduce the protein antimicrobial activity. Thus, we cannot discard the potential contribution of other protein regions in its mechanism of action and further research would be performed to fully understand the protein function structural determinants.

#### 4. Conclusions

Enzymatic and chemical cleavage of ECP was proven successful for the identification of the sequence determinants for ECP antimicrobial activity and confirmed the main role of the protein N-terminus. The data also corroborated that the 11–35 internal sequence, and in particular the 28–35 stretch, is essential for the protein activity. The identified region is involved in both the protein aggregation and bacteria envelope binding properties. We hypothesize that the first N-terminus residues may work *in vivo* as a functional peptide, as reported for other antimicrobial proteins that release *in situ* functional proteolytic fragments. The ECP N-terminus includes two helices that provide an amphiphilic nature, with alternating polar and non-polar faces. The segment could represent the protein leader active region that could serve both as a membrane disruption and bacteria cell agglutination domain, triggering the protein cytotoxic mechanism.

#### Acknowledgments

We thank Beatriz de la Torre and David Andreu at the Pompeu Fabra University, Barcelona, Spain, for providing the ECP synthetic peptides. Spectrofluorescence measurements were performed at the *Laboratori d'Anàlisi i Fotodocumentació*, UAB and the MALDI-TOF analysis and N-terminal sequencing at the Proteomic Service, *Institut de Biotecnologia i Biomedicina*, UAB. The work was supported by the Ministerio de Educación y Cultura (grant number BFU2009-09371) and by the Generalitat de Catalunya (2009 SGR 795).

#### Appendix. Supplementary material

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.biochi.2010.10.005.

#### References

- [1] E. Boix, M. Torrent, D. Sánchez, M.V. Nogués, The antipathogen activities of eosinophil cationic protein, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9 (2008) 141–152.
- [2] H.F. Rosenberg, Recombinant human eosinophil cationic protein. Ribonuclease activity is not essential for cytotoxicity, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 7876–7881.
- [3] E. Carreras, E. Boix, H.F. Rosenberg, C.M. Cuchillo, M.V. Nogués, Both aromatic and cationic residues contribute to the membrane-lytic and bactericidal activity of eosinophil cationic protein, *Biochemistry* 42 (2003) 6636–6644.
- [4] M. Torrent, E. Cuyas, E. Carreras, S. Navarro, O. Lopez, A. de la Maza, M.V. Nogués, Y.K. Reshetnyak, E. Boix, Topography studies on the membrane interaction mechanism of the eosinophil cationic protein, *Biochemistry* 46 (2007) 720–733.
- [5] M. Torrent, S. Navarro, M. Moussaoui, M.V. Nogués, E. Boix, Eosinophil cationic protein high-affinity binding to bacteria-wall lipopolysaccharides and peptidoglycans, *Biochemistry* 47 (2008) 3544–3555.
- [6] M. Torrent, D. Sánchez, V. Buzón, M.V. Nogués, J. Cladera, E. Boix, Comparison of the membrane interaction mechanism of two antimicrobial RNases: RNase 3/ECP and RNase 7, *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (2009) 1116–1125.
- [7] M. Torrent, M. Badia, M. Moussaoui, D. Sanchez, M.V. Nogués, E. Boix, Comparison of human RNase 3 and RNase 7 bactericidal action at the Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall, *FEBS J.* 277 (2010) 1713–1725.
- [8] E. Guani-Guerra, T. Santos-Mendoza, S.O. Lugo-Reyes, L.M. Teran, Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease, *Clin. Immunol.* 135 (2010) 1–11.
- [9] K. Doring, P. Porsch, A. Mahn, O. Brinkmann, W. Gieffers, The non-enzymatic microbicidal activity of lysozymes, *FEBS Lett.* 449 (1999) 93–100.

- [10] L. Otvos Jr., Antibacterial peptides and proteins with multiple cellular targets, *J. Pept. Sci.* 11 (2005) 697–706.
- [11] P. Nicolas, Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides, *Febs J.* 276 (2009) 6483–6496.
- [12] J.D. Hale, R.E. Hancock, Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria, *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 5 (2007) 951–959.
- [13] R. Dziarski, D. Gupta, Peptidoglycan recognition in innate immunity, *J. Endotoxin Res.* 11 (2005) 304–310.
- [14] Y. Rosenfeld, Y. Shai, Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: role in bacterial resistance and prevention of sepsis, *Biochim. Biophys. Acta* 1758 (2006) 1513–1522.
- [15] K. Lohner, New strategies for novel antibiotics: peptides targeting bacterial cell membranes, *Gen. Physiol. Biophys.* 28 (2009) 105–116.
- [16] V.J. Iacono, S.M. Zove, B.L. Grossbard, J.J. Pollock, D.H. Fine, L.S. Greene, Lysozyme-mediated aggregation and lysis of the periodontal microorganism *Capnocytophaga gingivalis* 2010, *Infect. Immun.* 47 (1985) 457–464.
- [17] K. Brandenburg, M.H. Koch, U. Seydel, Biophysical characterisation of lysozyme binding to LPS Re and lipid A, *Eur. J. Biochem.* 258 (1998) 686–695.
- [18] A. Pellegrini, U. Thomas, R. von Fellenberg, P. Wild, Bactericidal activities of lysozyme and aprotinin against gram-negative and gram-positive bacteria related to their basic character, *J. Appl. Bacteriol.* 72 (1992) 180–187.
- [19] W.M. Shafer, L.E. Martin, J.K. Spitznagel, Cationic antimicrobial proteins isolated from human neutrophil granulocytes in the presence of diisopropyl fluorophosphate, *Infect. Immun.* 45 (1984) 29–35.
- [20] N.Y. Yount, A.S. Bayer, Y.Q. Xiong, M.R. Yeaman, Advances in antimicrobial peptide immunobiology, *Biopolymers* 84 (2006) 435–458.
- [21] K.L. Brown, R.E. Hancock, Cationic host defense (antimicrobial) peptides, *Curr. Opin. Immunol.* 18 (2006) 24–30.
- [22] M.F. Burton, P.G. Steel, The chemistry and biology of LL-37, *Nat. Prod. Rep.* 26 (2009) 1572–1584.
- [23] G.H. Gudmundsson, B. Agerberth, Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system, *J. Immunol. Methods* 232 (1999) 45–54.
- [24] H. Kuwata, T.T. Yip, M. Tomita, T.W. Hutchens, Direct evidence of the generation in human stomach of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin, *Biochim. Biophys. Acta* 1429 (1998) 129–141.
- [25] P.H. Nibbering, E. Ravensbergen, M.M. Welling, L.A. van Berkel, P.H. van Berkel, E.K. Pauwels, J.H. Nuijens, Human lactoferrin and peptides derived from its N terminus are highly effective against infections with antibiotic-resistant bacteria, *Infect. Immun.* 69 (2001) 1469–1476.
- [26] O. Levy, Antimicrobial proteins and peptides of blood: templates for novel antimicrobial agents, *Blood* 96 (2000) 2664–2672.
- [27] M. Zanetti, R. Gennaro, D. Romeo, Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain, *FEBS Lett.* 374 (1995) 1–5.
- [28] T. Ayabe, D.P. Satchell, P. Pesendorfer, H. Tanabe, C.L. Wilson, S.J. Hagen, A.J. Ouellette, Activation of Paneth cell alpha-defensins in mouse small intestine, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 5219–5228.
- [29] H.F. Rosenberg, RNase A ribonucleases and host defense: an evolving story, *J. Leukoc. Biol.* 83 (2008) 1079–1087.
- [30] T. Nitto, K.D. Dyer, M. Czapiga, H.F. Rosenberg, Evolution and function of leukocyte RNase A ribonucleases of the avian species, *Gallus gallus*, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 25622–25634.
- [31] E. Pizzo, G. D'Alessio, The success of the RNase scaffold in the advance of biosciences and in evolution, *Gene* 406 (2007) 8–12.
- [32] M. Torrent, B.G. de la Torre, V.M. Nogues, D. Andreu, E. Boix, Bactericidal and membrane disruption activities of the eosinophil cationic protein are largely retained in an N-terminal fragment, *Biochem. J.* 421 (2009) 425–434.
- [33] E. Boix, Z. Nikolovski, G.P. Moiseyev, H.F. Rosenberg, C.M. Cuchillo, M.V. Nogues, Kinetic and product distribution analysis of human eosinophil cationic protein indicates a subsite arrangement that favors exonuclease-type activity, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 15605–15614.
- [34] J. Lacadena, A. Martinez del Pozo, M. Gasset, B. Patino, R. Campos-Olivas, C. Vazquez, A. Martinez-Ruiz, J.M. Mancheno, M. Onaderra, J.G. Gavilanes, Characterization of the antifungal protein secreted by the mould *Aspergillus giganteus*, *Arch. Biochem. Biophys.* 324 (1995) 273–281.
- [35] P.A. Jekel, W.J. Weijer, J.J. Beintema, Use of endoproteinase Lys-C from *Lysobacter* enzymogenes in protein sequence analysis, *Anal. Biochem.* 134 (1983) 347–354.
- [36] E. Gross, B. Witkop, Nonenzymatic cleavage of peptide bonds: the methionine residues in bovine pancreatic ribonuclease, *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 1856–1860.
- [37] E. Boix, Y. Wu, V.M. Vasandani, S.K. Saxena, W. Ardel, J. Ladner, R.J. Youle, Role of the N terminus in RNase A homologues: differences in catalytic activity, ribonuclease inhibitor interaction and cytotoxicity, *J. Mol. Biol.* 257 (1996) 992–1007.
- [38] J. Alonso, M.V. Nogues, C.M. Cuchillo, Modification of bovine pancreatic ribonuclease A with 6-chloropurine riboside, *Arch. Biochem. Biophys.* 246 (1986) 681–689.
- [39] J. Bravo, E. Fernandez, M. Ribo, R. de Llorens, C.M. Cuchillo, A versatile negative-staining ribonuclease zymogram, *Anal. Biochem.* 219 (1994) 82–86.
- [40] K. Hilpert, R. Volkmer-Engert, T. Walter, R.E. Hancock, High-throughput generation of small antibacterial peptides with improved activity, *Nat. Biotechnol.* 23 (2005) 1008–1012.
- [41] M.R. Gregory, W.E. Daniel Jr., R.G. Hiskey, Spin-labeled ribonuclease A. Effects of chemical, enzymatic, and physical modifications on enzyme conformation, *Biochemistry* 17 (1978) 2025–2030.
- [42] B. Gutte, R.B. Merrifield, The total synthesis of an enzyme with ribonuclease A activity, *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 501–502.
- [43] V.G. Janolino, H.E. Swaisgood, H.R. Horton, Renaturation of soluble and immobilized ribonuclease: are the polypeptide folding pathways for structure formation the same for soluble proteins and for proteins associated with a surface? *J. Appl. Biochem.* 7 (1985) 33–37.
- [44] Z. Nikolovski, V. Buzon, M. Ribo, M. Moussaoui, M. Vilanova, C.M. Cuchillo, J. Cladera, M.V. Nogues, Thermal unfolding of eosinophil cationic protein/ribonuclease 3: a nonreversible process, *Protein Sci.* 15 (2006) 2816–2827.
- [45] H.R. Ibrahim, U. Thomas, A. Pellegrini, A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site left of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 43767–43774.
- [46] C. Hoogland, E. Gasteiger, A. Gattiker, S. Duvaud, M.R. Wilkins, R.D. Appel, A. Bairoch, in: J.o.h.n.M. Walker (Ed.), *Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASY Server* (2005).
- [47] E. Gasteiger, A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R.D. Appel, A. Bairoch, ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3784–3788.
- [48] M. Torrent, V.M. Nogues, E. Boix, A theoretical approach to spot active regions in antimicrobial proteins, *BMC Bioinformatics* 10 (2009) 373–382.
- [49] J. Zhang, H.F. Rosenberg, M. Nei, Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 3708–3713.
- [50] M. Merrett, Primary structure of 3-phosphoglycerate kinase from horse muscle. II. Amino acid sequence of cyanogen bromide peptides CB1-CB4 and CB6-CB14, sequence of methionine-containing regions, and complete sequence of the enzyme, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 10293–10305.
- [51] H.V. Huang, M.W. Bond, M.W. Hunkapiller, L.E. Hood, Cleavage at tryptophanyl residues with dimethyl sulfoxide-hydrochloric acid and cyanogen bromide, *Meth. Enzymol.* 91 (1983) 318–324.
- [52] D.W. Boulware, P.D. Goldsworthy, F.A. Nardella, M. Mannik, Cyanogen bromide cleaves Fc fragments of pooled human IgG at both methionine and tryptophan residues, *Mol. Immunol.* 22 (1985) 1317–1322.
- [53] B.J. Smith, in: J.M. Walker (Ed.), *Chemical Cleavage of Proteins at Tryptophan Residues*, Human Press Inc., Totowa, NJ, 1996.
- [54] E. Carreras, E. Boix, S. Navarro, H.F. Rosenberg, C.M. Cuchillo, M.V. Nogues, Surface-exposed amino acids of eosinophil cationic protein play a critical role in the inhibition of mammalian cell proliferation, *Mol. Cell. Biochem.* 272 (2005) 1–7.
- [55] T.C. Fan, S.L. Fang, C.S. Hwang, C.Y. Hsu, X.A. Lu, S.C. Hung, S.C. Lin, D.T. Chang, Characterization of molecular interactions between eosinophil cationic protein and heparin, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 25468–25474.
- [56] M. Torrent, M.V. Nogues, E. Boix, Eosinophil cationic protein (ECP) can bind heparin and other glycosaminoglycans through its RNase active site, *J. Mol. Recognit.* (2010).
- [57] M. Zasloff, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature* 415 (2002) 389–395.
- [58] D. Andreu, L. Rivas, Animal antimicrobial peptides: an overview, *Biopolymers* 47 (1998) 415–433.
- [59] M.F. García-Mayoral, M. Moussaoui, B.G. de la Torre, D. Andreu, E. Boix, M.V. Nogués, M. Rico, D.V. Laurents, M. Bruix, NMR structural determinants of eosinophil cationic protein binding to membrane and heparin mimetics, *Biophys. J.* 98 (2010) 2702–2711.
- [60] M. Torrent, F. Odorizzi, M.V. Nogués, E. Boix, Eosinophil cationic protein (ECP) aggregation. Identification of an N-terminus amyloid prone region, *Bio-macromolecules* 11 (2010) 1983–1990.
- [61] E. Boix, D.D. Leonidas, Z. Nikolovski, M.V. Nogues, C.M. Cuchillo, K.R. Acharya, Crystal structure of eosinophil cationic protein at 2.4 Å resolution, *Biochemistry* 38 (1999) 16794–16801.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

Table S1. A) Correspondence of fraction numbering from aliquots collected from the Symmetry C18 reverse phase chromatography profile as shown in figure 5. B) Experimental and theoretical information data related to the characterized fragments.

Figure S1. SDS-15%PAGE activity staining gel containing polyU at 0.12 mg/ml as RNase substrate. Aliquots of denatured ECP (ECPdnt) were compared with native ECP (ECPnat). Lanes: A) ECPdnt at 0.4  $\mu$ M, B) ECPdnt at 0.2  $\mu$ M, C) ECPdnt at 0.02  $\mu$ M, D) negative control and E) ECPnat at 0.2  $\mu$ M. All the wells were loaded with a final volume of 5  $\mu$ l.

Figure S2. SDS-18% PAGE silver stained. A: Purified ECP(0-38) fragment, indicated by an arrow, B: undigested denatured ECP. The two weight markers have been taken from a separate lane.

Figure S3. Alignment of ECP representative homologues among primates and rodents: human ECP, *Homo sapiens* (P12724); chimpanzee ECP, *Pan troglodytes* (P47780); gorilla ECP, *Gorilla gorilla* (P47778); crab-eating macaque ECP, *Macaca fascicularis* (P47779); orangutan ECP, *Pongo Pygmeus* (P47781); tamarin EDN, *Saginus labiatus* (Q8SPY3); rat Ear11, *Rattus norvegicus* (P70709) and mouse Ear9, *Mus musculus* (Q9R124). Pairing cysteines are indicated at the bottom. Non conserved lysines are highlighted, Star indicates the conserved lysine 38. The figure was created using the ESPript software (<http://esript.ibcp.fr/ESPript/>). Secondary elements corresponding to the ECP three dimensional structure (1QMT.pdb, [61]) are depicted at the top.

Figure S4. Silver staining of SDS-18%PAGE electrophoresis for selected HPLC fractions of ECP digested with CNBr (fractions are numbered as detailed in table S1). Each well was loaded with 5  $\mu$ l of each fraction lyophilized and resuspended in 100  $\mu$ l of deionized water.

**Table S1**

A

Fraction	Volume (ml)	Fraction	Volume (ml)
1	0-2	16	54-56
2	2-4	17	56-58
3	4-6	18	58-60
4	6-8	19	60-62
5	8-14	20	62-64
6	14-20	21	64-66
7	20-22	22	66-68
8	22-26	23	68-70
9	26-30	24	70-72
10	30-38	25	72-76
11	38-42	26	76-78
12	42-48	27	78-80
13	48-50	28	80-84
14	50-52	29	84-85
15	52-54	30	85-87
		31	87-90
		32	90-92

B

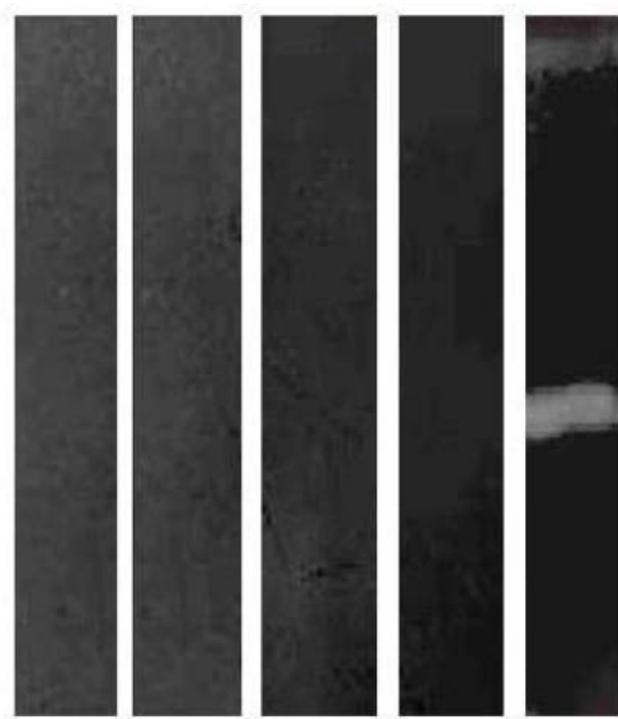
Fragment	N-terminal sequence <sup>1</sup>	Estimated pI	Bactericidal activity <sup>2</sup>	HPLC Frac. n°
F11-M27	FAIQ	8.26	+/-	3
M0-M27	MRPPQFTR	11.27	-	5-6
R28-W35	RAINNYR	10.84	+++	15
F11-W35	FAIQHISL	10.76	++	20
ECP C-terminal	n.d. <sup>3</sup>	~9.65	-	32

<sup>1</sup> As confirmed by N-terminal sequencing.

<sup>2</sup> Qualitative estimation of bactericidal activity on *E. coli* cell culture, taking as a reference native ECP at 4  $\mu$ M. Each + represents about 25% of activity respect to ECP.

<sup>3</sup> n.d not determined. The fraction could not be evaluated, as it included more than one protein C-terminal fragment, as confirmed by SDS-PAGE.

A B C D E



**Figure S1**

**A**

**B**

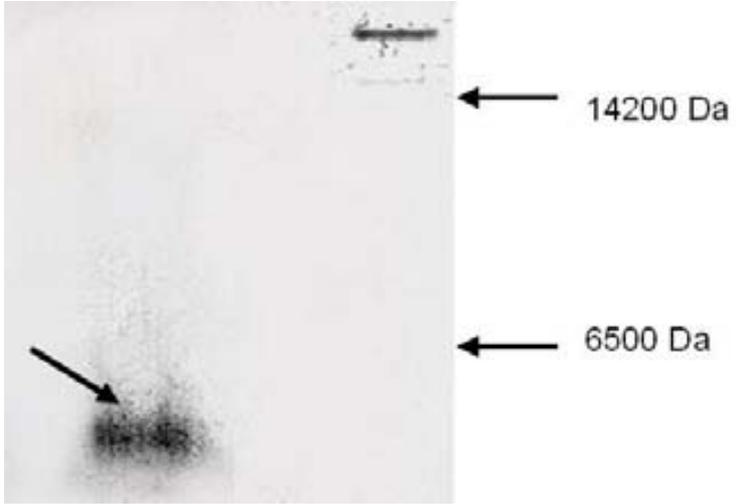


Figure S2

*RNase3\_ECP [Homo sapiens]*

1                    10                    20                    30                    40                    50                    60                    TT TT

*RNase3\_ECP [Homo sapiens]* RPPQFTRAQWF<sup>1</sup>AIQHISLNP.PRCTIAMRAINNYRWRCKNQNTFLR<sup>2</sup>TTFANVVNVCGNQ<sup>3</sup>SIRCPHNRTL<sup>4</sup>N

*ECP [Pan troglodytes]* RPPQFTRAQWF<sup>1</sup>AIQHISLNP.PRCTIAMRVINNYRWRCKNQNTFLR<sup>2</sup>TTFANVVNVCGNQ<sup>3</sup>SIRCPHNRTL<sup>4</sup>N

*ECP [Gorila gorila]* RPPQFTRAQWF<sup>1</sup>AIQHISLNP.PRCTIAMRVINNYRWRCKNQNTFLR<sup>2</sup>TTFANVVNVCGNQ<sup>3</sup>SIRCLHNRTL<sup>4</sup>N

*ECP [Macaca fascicularis]* RPPQFT<sup>1</sup>RAQWF<sup>2</sup>AIQHINVNP.PRCTIAMRVINNYQRRCKNQNTFLR<sup>3</sup>TTFAYTANVCRNERIRCP<sup>4</sup>RNRTLH

*ECP [Pongo pygmeus]* <sup>1</sup>KPRQFTRAQWF<sup>2</sup>AIQHVSLNP.PQCTTAMRVINNYQRRCKDQNTFLR<sup>3</sup>TTFANVVNVCGN<sup>4</sup>FNITCPRNRTLH

*EDN [Saguinus labiatus]* <sup>1</sup>KPQQFSWAQWFR<sup>2</sup>IQHIQTTP.LHCTYAMRAINRYQPRCKNRNTFLHT<sup>3</sup>TFADVNVVCGNTNMTCPGNASLN

*Ear11 [Rattus norvegicus]* ..QPPTPSQWFE<sup>1</sup>IQHIYNRAYPRCNDAMRHRNRFTGHCKDINTFLHT<sup>2</sup>SFASVVGVCGRNIPCG.NRTYR

*Bar-9 [Mus musculus]* ..LGQT<sup>1</sup>PSQWFAIQYINNNANLQC<sup>2</sup>NVEMLRINRSRRTCKGLNTFLHT<sup>3</sup>SFANAVGVCGRNIPSG<sup>4</sup>GLCS.DNISQ

*RNase3\_ECP [Homo sapiens]*

70                    80                    90                    100                    110                    120                    130

*RNase3\_ECP [Homo sapiens]* NCHRSRFRV<sup>1</sup>PLLHC<sup>2</sup>DLINPGAQNI<sup>3</sup>SNCTYADRPGRRFYV<sup>4</sup>VACDNRDPRDS<sup>5</sup>PRYPVVPVHLD<sup>6</sup>TTI

*ECP [Pan troglodytes]* NCHQSRFRV<sup>1</sup>PLLHC<sup>2</sup>DLINPGAQNI<sup>3</sup>SNCGYADRPGRRFYV<sup>4</sup>VACDNRDPRDS<sup>5</sup>PRYPVVPVHLD<sup>6</sup>TTI

*ECP [Gorila gorila]* NCHRSRFRV<sup>1</sup>PLLHC<sup>2</sup>DLINPGAQNI<sup>3</sup>SNCRYADRPGRRFYV<sup>4</sup>VACDNRD<sup>5</sup>PQDS<sup>6</sup>PRYPVVPVHLD<sup>7</sup>TTI

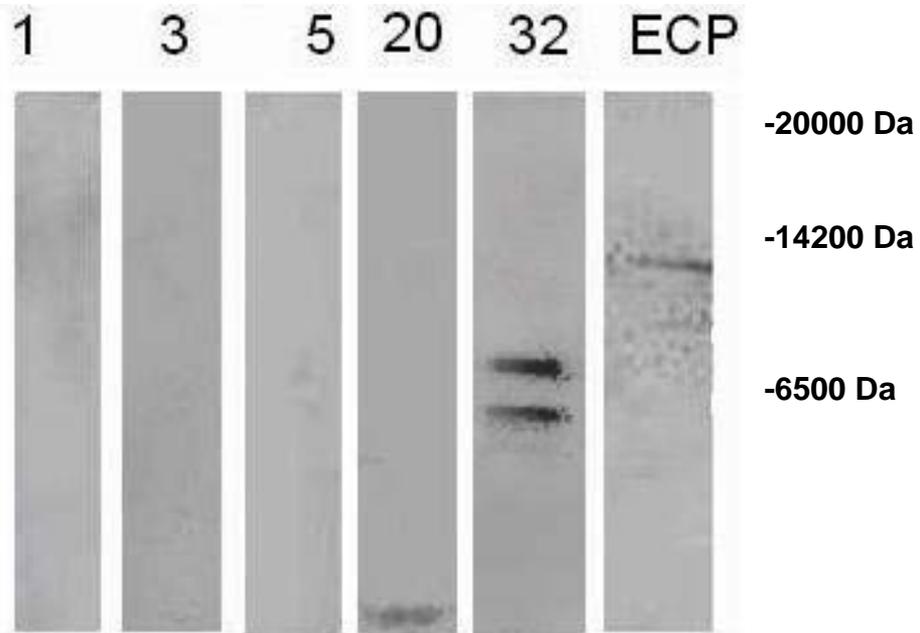
*ECP [Macaca fascicularis]* NCHRSRYR<sup>1</sup>VPLLHC<sup>2</sup>DLINPGAQNI<sup>3</sup>STCRYADRPGRRFYV<sup>4</sup>VACESRD<sup>5</sup>PRDS<sup>6</sup>PRYPVVPVHLD<sup>7</sup>TTI

*ECP [Pongo pygmeus]* NCHRSRFQ<sup>1</sup>VPLLHC<sup>2</sup>NLTNPGAQNI<sup>3</sup>SNCKYADRTERRFYV<sup>4</sup>VACDNRDPRDS<sup>5</sup>PRYPVVPVHLD<sup>6</sup>TTI

*EDN [Saguinus labiatus]* NCHHS<sup>1</sup>GVRVPLTY<sup>2</sup>CNLTGP..QTISNCVYSS<sup>3</sup>TQANMFYV<sup>4</sup>VACDNRDPRD<sup>5</sup>PPQ<sup>6</sup>YPVVPVHLD<sup>7</sup>TTI

*Ear11 [Rattus norvegicus]* NCHNSRYR<sup>1</sup>VVSIT<sup>2</sup>FCNLTTPAR.IYTQCR<sup>3</sup>YQ<sup>4</sup>TTRS<sup>5</sup>R<sup>6</sup>K<sup>7</sup>FYTVGCDPRT<sup>8</sup>PRDS<sup>9</sup>PMYPVVPVHLD<sup>10</sup>RIF

*Bar-9 [Mus musculus]* NCHNS<sup>1</sup>SSRVHIT<sup>2</sup>VCNIT<sup>3</sup>SWRRT<sup>4</sup>PTYTQ<sup>5</sup>CRYQA<sup>6</sup>K<sup>7</sup>RSLEY<sup>8</sup>YTV<sup>9</sup>VACD<sup>10</sup>PRT<sup>11</sup>PQDS<sup>12</sup>PMYPVVPVHLD<sup>13</sup>DGTF



## 12. Agradecimientos y dedicatorias

Principalmente a quien debo agradecer la consecución de esta tesis doctoral, tanto por incorporarme en el grupo, como aconsejarme y guiarme en el transcurso de la misma, como apoyarme en los momentos problemáticos es a la Doctora Ester Boix Borrás. Asimismo agradezco a la Doctora Maria Victoria Nogués la asimilación institucional en el grupo y en consecuencia en la unidad de Bioquímica, además de ofrecernos recursos para seguir la investigación.

Por su ayuda inestimable y/o su apoyo científico y/o por muchos momentos de humanidad y risas he de agradecer la presencia en este tiempo de muchos compañeros de los que haría una lista interminable: Marc Torrent, Joan Bargés, Natalia Sánchez De Groot, Francesco Odorizzi, Jordi Vilardell, Eduard Calam, Jordi Moreno, Alba Espargaró, Arantza Rodríguez, y un largo etcétera. Por su aporte científico agradezco a gente tanto de fuera de la unidad de Bioquímica como de otros grupos de la misma que amablemente me ha ilustrado con sus conocimientos: Josep Antoni Biosca, Miquel Vallmitjana, Jennyy Eriksson, Natalia Sacchi y Dimitris Leónidas. También agradecer el inestimable apoyo técnico de Salva Bartolomé, Silvia Bronsoms del equipo de proteómica del IBB, Mohammed Moussaoui y Helena Carbó.

En el plano de las dedicatorias que es esencialmente humano he de citar a quien siempre ha creído en mí, quien han soportado o subsanado lo que no se veía en el laboratorio pero que ha ayudado a que siguiese en él: Natividad Martínez Marín.

Dedico también esta obra especialmente a mi madre, desaparecida prematuramente que me educó con cariño en la autosuperación y en la responsabilidad. Y como una especie de caja del tiempo de lo que hizo su padre, como una historia más que explicarles o una imagen más para narrar, esta tesis también va dedicada a mis queridos hijos: David, Carlos y Eduard.

“La vida no se vive celebrando victorias, sino superando derrotas”  
Ernesto “Che” Guevara