Universitat de Girona

L'ONCONASA COM A MODEL PER L'ESTUDI DE LES BASES MOLECULARS DE LA CITOTOXICITAT DE LES RIBONUCLEASES PANCREÀTIQUES. APLICACIONS A LA CONSTRUCCIÓ DE RIBONUCLEASES AMB ACTIVITAT ANTIMICROBIANA

Gerard TORRENT ALBERTI

ISBN: 978-84-692-3074-9
Dipòsit legal: GI-538-2009

UNIVERSITAT DE GIRONA
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA
LABORATORI D'ENGINYERIA DE PROTEÏNES
ÀREA DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

Tesi Doctoral

L´onconasa com a model per l'estudi de les bases moleculars de la citotoxicitat de les ribonucleases pancreàtiques. Aplicacions a la construcció de ribonucleases amb activitat antimicrobiana.

Gerard Torrent Albertí
2009

UNIVERSITAT DE GIRONA
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA
LABORATORI D'ENGINYERIA DE PROTEÏNES
ÀREA DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

L´onconasa com a model per l'estudi de les bases moleculars de la citotoxicitat de les ribonucleases pancreàtiques. Aplicacions a la construcció de ribonucleases amb activitat antimicrobiana.

Memòria presentada per adquirir el grau de
Doctor per la Universitat de Girona, per

Gerard Torrent Alberti

Vist-i-plau
La directora de Tesi

Vist-i-plau
El director de Tesi

Dra. Maria Vilanova i Brugués
Catedràtica
de Bioquímica i Biologia Molecular

Dr. Marc Ribó Panosa
Professor Titular
de Bioquímica i Biologia Molecular

Girona, febrer 2009

S´ha entès bé el que significa
la coneguda hitòria que hi ha
al principi a de la Bíblia,
relatiu al pànic atroç que experimenta
Déu davant de la ciencia?

Friendrich Nietzsche
"L´anticrist"

Als pares i a l'Elisabet

Agraiments:

L´obtenció d´aquesta tesi doctoral no hauria pogut ser possible sense l´ajuda de moltes persones be sigui de forma directe o indirecta. Per tant, m'agradaria donar-els-hi el meu agraïment.

Primer de tot vull agrair a la Maria i en Marc la confiança dipositada en mi i l'oportunitat que m´han donat per realitzar una tesi doctoral sota la seva direcció i poder treballar i conèixer el món de la recerca. També agrair al meu company de despatx, en Toni, pel temps m´ha destinat i els coneixements i consells que m´ha transmès.

Sempre guardaré un bon record de l´estada a Montpeller i per això voldria donar les gràcies al Dr. Bruno Beaumelle, en primer lloc per acceptar-me al seu grup i en segon lloc per ajudar-me a que no em faltes de res durant l'estada.

Que dir dels meus companys de laboratori...no hi ha paraules per agrair a en Pep, la Montse, en Pere i la Jess els bons moments que hem compartit al laboratori, i com no, a la màquina de café, compartint llargues xerrades sobre qualsevol tema; que si no se que passa... que si no ho entenc...que si el Barça...que si tomba..., que si gira... Només dir-vos que ha estat un veritable plaer estar al vostre costat i us desitjo el millor dels futurs. No us oblidaré mai.

A la resta de companys de passadís de biologia per les petites ajudes que m'hàgiu pogut donar en moments delicats i per les petites i agradables estones que m'heu fet passar. Gràcies també a la resta de personal de la UdG: laborants, conserges, informàtics,...

Finalment agrair a aquelles persones per la qual la meva vida no tindria sentit. Als meus pares i a l´Elisabet, per fer-me sempre costat al llargs de tot aquest temps i, sobretot, tenir la suficient paciència per aguantar el meu mal humor. Moltes gràcies. No vull oblidar-me d´en Mateu, amic i company de llargues i dures bicicletades. Gràcies pels teus bons consells.

Gràcies a tots.

ÍNDEX

Índex i
Índex d'abreviatures iii
Resum v

INTRODUCCIÓ **1**

1. Característiques generals de les ribonucleases 1

1.1. Definició 1
1.2 Classificació 1
1.3. Funcions de les RNases 3

2. Les Ribonucleases pancreàtiques 5

2.1. RNase A com a model 5
2.2. Estudis d'estructura 5
2.3. Estudis de funció 6

3. Ribonucleases amb activitats biològiques especials 10

4. L´onconasa 12

4.1. Característiques moleculars de l´onconasa 12
4.2 Estructura 12
4.3 Estabilitat i camí de plegament de l´onconasa 15
4.4 RNasa A vs. Onconasa 15
4.5 Mecanisme catalític i interacció amb el substrat 17
4.6 Producció heteròloga de l´onconasa 18
4.7 L´onconasa com agent antitumoral 19

5. L´ECP: ribonucleasa amb activitat antimicrobiana 20

5.1 Característiques estructurals i funcionals 20
5.2 Activitats biològiques 21

6. Ribonucleasa Pancreàtica Humana (HP-RNasa) 22

6.1 Descripció funcional i estructural de l'HP-RNasa 22
6.2 Producció heteròloga de l´HP-RNasa 23
6.3 Activitat biològica de la HP-RNasa i estudis per dotar-la d'activitats biològiques especials 24

7. Objectius **27**

RESULTATS I DISCUSSIÓ **29**

Capítol I: Quantitative analysis, using MALDI-TOF mass spectrometry, of the N-terminal hydrolysis and cyclization reactions of the activation process of onconase **29**

Capítol II: Contribution of the C30A/C75A disulfide bond to the biological properties of onconase **39**

Capítol III: Bactericidal activity engineered on human pancreatic ribonuclease and onconase **51**

DISCUSSIÓ GENERAL **79**

CONCLUSIONS FINALS **89**

BIBLIOGRAFIA **92**

LLISTA D´ABREVIATURES

ε	coeficient d'extinció molar
µg	micògram
µl	microlitre
µm	micròmetre
µM	microMolar
ºC	grau centígrad
A	adenina
AAP	aeromonas proteolytica
Abs	absorbància
Ala	alanina
Amph	amphinasa
Ap	ampicil·lina
Asp	àcid aspàrtic
ATP	adenosina-5'-trifosfat
BS-RNasa	ribonucleasa bovina seminal
BSA	albúmina de sèrum boví
C	citosina
C>p	citidina 2',3'-fosfat cíclic
C-terminal	carboxi terminal
cèl	cèl·lules
CNT	cisteïna N-terminal
CNBr	bromur de cianogen
CO	grup carboxil
Cys	cisteïna
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Eagle modified medium
DMSO	dimetil sulfòxid
DNA	àcid desoxiribonucleic
dNTP	desoxiribonucleòtid-5'trifosfat
dsDNA	DNA de doble cadena
DTT	1,4-dithio-DL-treitol
E.coli	Escherichia coli
ECP	proteïna catiónica d´eosinòfil
EDTA	àcid etilendiamina-tetraacètic
EDN	neurotoxina derivada d´eosinófil
FCS	sèrum boví fetal
FPLC	cromatografia liquida de baixa pressió
g	gram
G	guanina
Glu	àcid glutàmic
Gly	glicina
Gnd-HCl	clorur de guanidini
GSH	glutatió reduït
GSSG	glutatió oxidat
HEPES	2-4-2-Hydroxyethyl-1-piperazinylethanesulfonic acid
fM	femtoMolar
h	hora
HP-RNasa	ribonucleasa pancreàtica humana
HPLC	cromatografia líquida d'alta resolució
IC50	concentració de proteïna que inhibeix al 50 % la síntesi proteica cel·lular
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranòsid
kDa	kiloDalton
K_{cat}	constant catalítica
K_i	consatant d´inhibició
$Kcat/k_M$	eficiènica catalítica
L	litre
L-Arg	L-Arginina
LB	medi Luria – Bertani
M	Molar
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
MES	àcid 2(N-morfolino) etanofulfònic.
mg	mil·ligram
ml	mil·lilitre
mM	mil·liMolar
mQ	mil·liQ
mRNA	RNA missatger
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
mut	mutated
MW	massa molecular
MWCO	molecular weight cutoff
N-terminal	amino-terminal
NLS	senyal de localització nuclear
ng	nanògram
nm	nanòmetre
OD	densitat òptica
ONC	onconasa
p/v	relació pes-volum
PAGE	electroforesi en gel de poliacrilamida
PBS	tampó fosfat salí
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PDB	banc de dades de proteïnes
PDF	pèptid deformilasa
pI	punt isoelèctric
pmol	picomol
PMSF	fenilmetilsulfonilfluorit
Poli(A)	àcid poliuridílic
poli(C)	àcid policitidílic
Pyr	piroglutàmic
O/N	overnight
RI	inhibidor proteic de ribonucleases
hRI	RI d´origen humà
pRI	RI d´origen porcí
RMN	resonància magnètica nuclear
RNA	àcid ribonucleic
RNasa	ribonucleasa
RNasa A	ribonucleasa de pàncreas boví
rpm	revolucions per minut
rRNA	RNA ribosomal
s	segon
SDS	dodecil sulfat de sodi
T	timina
T1/2	temperatura mitja de desnaturalització tèrmica
TAE	amortidor Tris/Acetat/EDTA
TCA	àcid tricloroacètic
tRNA	RNA de transferència
TB	medi Terrific Broth
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
Tm	temperatura de fusió
Tris	Tris-hidroximetil-aminometà
TSR	template suppression reagent
U	uracil
UV	ultraviolat
V	Volt
Val	valina
v/v	relació volum/volum
xg	força centrífuga relativa.

RESUM

La finalitat d'aquesta tesi s´ha centrat en aprofundir en les bases moleculars de la citotoxicitat de l´onconasa, una ribonucleasa d'origen amfibi, que es caracteritza per la seva citotoxicitat enfront de cèl·lules tumorals i que es troba en fase II/III d'assajos clínics per a determinats tipus de neoplàsies. Aquesta ribonucleasa ha esdevingut per aquestes propietats un model en els estudis de citotoxicitat i en el desenvolupament de variants d'altres ribonucleases que reprodueixen aquestes altres funcions biològiques especials. Per això una altra finalitat d´aquesta tesi ha estat el disseny, producció i caracterització de variants d´onconasa i de ribonucleases pancreàtiques humanes amb activitat bactericida.

Capítol 1. La primera part d'aquest treball s´ha centrat en la caracterització i optimització del procés d'activació de l´onconasa recombinant per tal d'obtenir nivells de producció d'enzim amb l'extrem N-terminal natiu, i conseqüentment, amb les mateixes característiques que la proteïna nativa. Per tal que l´enzim esdevingui plenament funcional cal digerir enzimaticament la Met-1 situada a l´extrem N-terminal i, per altra banda, cal que pateixi una modificació post-traduccional consistent en la ciclació del residu de Gln1 a piroglutàmic. Els resultats obtinguts indiquen que en presència de 3 M de clorur de guanidini, pH 8.0 a 37ºC durant 1-2 hores la Met-1 és hidrolitzada totalment mitjançant l'aminopeptidasa d´*Aeromonas* (AAP). Per altra banda, també s´ha comprovat que la temperatura accelera la ciclació de la Gln1 a Pyr. A partir d'aquí s´ha observat que la reacció de ciclació es completa incubant 3 hores a 70ºC. Les dues reaccions necessàries per generar el piroglutamic han estat seguides per MALDI-TOF MS. Aquesta metodologia pot ser emprada de forma general per a l´activació de qualsevol proteïna recombinant que necessiti per la seva conversió en la forma activa d´una elminació de la Met N-terminal.

Capítol 2. La segona part d´aquesta tesi s´ha centrat en l´estudi de la contribució del pont disulfur 30-75 de l´onconasa a les seves propietats biològiques. Resultats previs obtinguts en el nostre grup de recerca i corroborats per altres autors han demostrat que el pont disulfur 30-75 és el primer en reduir-se quan es sotmet l´onconasa a condicions de reducció suau. Resultats obtinguts en aquest treball han permès observar que la reducció d´aquest pont disulfur no altera de forma significativa la capacitat citotòxica tot i la important reducció de l´estabilitat de la variant. Per altra banda, s´ha pogut observar que la capacitat catalítica i la capacitat d´evasió a l´inhibidor de ribonucleases (RI) són comparables a les obtingudes per l´onconasa salvatge incubada sota condicions suaus de reducció que permeten l´obtenció de la forma reduïda Onc des(30-75). Aquests resultats

permeten suggerir que el potencial redox del citosol cel·lular podria reduir el pont disulfur 30-75 de l´onconasa salvatge afectant la unió onconasa –inhibidor proteic de ribonucleases. Aquest fet podria contribuir a les propietats citotòxiques presentades per l´onconasa.

Capítol 3. La tercera part d'aquesta tesi té una vesant més aplicada la qual ha consistit en dotar d'activitat bactericida a ribonucleases com l´onconasa i l´HP-RNasa, les quals no presenten aquesta funció biològica. Per aconseguir aquesta finalitat s´ha introduït el determinant bactericida descrit per proteïna catiònica d'eosinòfils (ECP) (YRWR) tan en una regió interna com a l'extrem C-terminal, amb i sense extensions. Els resultats obtinguts han evidenciat que les dues ribonucleases amb el determinant bactericida presenten activitat citotòxica contra bactèris gram-negatius essent les variants que presenten el determinant a l´extrem C-terminal les construccions amb més activitat. Les diferències de sensibilitat entre soques gram-negatives i gram-positives potencialment estan relacionats amb les diferències estructurals de les parets bacterianes. Per altra banda, ha resultat interessant observar que part de l´activiat bactericida está relacionada amb l´activiat ribonucleolítica dels enzims. Per últim, cal remarcar que en aquest treball de tesi s'ha aconseguit desenvolupar una ribonucleasa humana pancreàtica amb activitat antibacteriana per bacteris gram-negatius la qual no es citotòxica per cèl·lules eucariotes.

Introducció

1. Característiques generals de les ribonucleases.

1.1. Definició

Les ribonucleases (RNases) són enzims que catalitzen el trencament dels enllaços fosfodièster dels àcid ribonucleics, tant en la degradació no específica de l'RNA com en nombroses formes de processament específiques dels diferents tipus de RNA.

D'aquí, es pot intuir que són un grup d'enzims extremadament heterogeni, tant pel que fa a la seva estructura com per la funció biològica que realitzen, i que es troben presents en tots els éssers vius. Tot i que el terme ribonucleasa s'utilitza generalment per a designar proteïnes amb activitat ribonucleolítica, existeixen àcids nuclèics que presenten funcions similars, com és el cas dels ribozims i de les ribonucleoproteïnes, com l'RNasa P (Deutscher 1988; Deutscher 1993).

1.2. Classificació

L'establiment d'un sistema de classificació adequat per a aquest grup tant ampli de proteïnes no és una tasca senzilla. A fi d'organitzar agrupacions més o menys homogènies es poden utilitzar criteris bioquímics, funcionals o evolutius. La dificultat en l'establiment d'una classificació general rau en el fet que una mateixa ribonucleasa pot acomplir més d'un dels criteris utilitzats per a l'establiment de les diverses agrupacions. Així doncs, les ribonucleases es poden classificar:

- Segons l'actuació de l'enzim sobre el seu substrat. Es poden diferenciar en exoribonucleases, quan catalitzen la formació de mononucleòtids a partir d'un extrem 5' o 3' lliure de la cadena d'RNA o en endoribonucleases, si catalitzen l'escissió d'enllaços fosfodièster de l'interior d'una cadena de RNA, produint oligonucleòtids.

- Segons la seva especificitat per substrat. Per una banda distingim les ribonucleases inespecífiques, que catalitzen la degradació de tot tipus de molècules d'RNA, com és el cas de la nucleasa de *Serratia* i la nucleasa estafilocòccica. Per l'altra, les que presenten especificitat de base, com l'RNasa A, que hidrolitza les cadenes d'RNA per l'extrem 3' de residus de pirimidina. Per últim, les ribonucleases específiques, que reconeixen característiques concretes (de seqüència o d'estructura) en el seu substrat, i que estan implicades normalment en processos de maduració de l'RNA, com ara l'RNasa III.

- En funció del lloc on els enzims duen a terme la seva acció. Les ribonucleases es poden classificar com a extracel·lulars si actuen fora de la cèl·lula que l'ha sintetitzat, o com a intracel·lulars si actuen en el seu interior i estan implicades en el metabolisme de l'RNA. Les ribonucleases extracel·lulars solen ser inespecífiques i de massa molecular baixa; al contrari que les intracel·lulars, que estan implicades en el metabolisme de l'RNA cel·lular, tenen una elevada especificitat per substrat i són estructuralment complexes.

Tradicionalment, les ribonucleases de mamífer i d'altres vertebrats s'han classificat en dos grans grups (Sierakowska i Shugar 1977), les ribonucleases de *tipus secretori* i les de *tipus no secretori*. La nomenclatura no fa referència a la capacitat d'aquests enzims a ser o no secretats, sinó que té relació amb els òrgans a partir de les quals es van purificar i caracteritzar les primeres ribonucleases. Com a tipus secretori es van definir les que eren similars a la ribonucleasa produïda pel pàncrees, i com a tipus no secretori les que eren semblants a la purificada a partir del fetge o la melsa. Degut a la confusió que generava l'ordenació precedent, Sorrentino i Libonati (Sorrentino i Libonati 1997) van proposar utilitzar el terme *tipus pancreàtic* en comptes de *secretor* per classificar les ribonucleases per identitat de seqüència, d'estructura i de propietats catalítiques amb les de l'RNasa A, malgrat que es trobin en teixits i fluids diferents als pancreàtics. La designació de *tipus no pancreàtic* enlloc de *no secretor* fa referència a ribonucleases que es troben en diversos fluids i en teixits diferents al pàncrees, caracteritzades per presentar identitat de seqüència i propietats catalítiques similars a les de l'RNasa K2 de ronyó boví o a les de l'EDN humana.

Per últim, en funció del nivell de conservació de seqüència i estructura, sobretot en els residus que intervenen en el procés de catàlisi, s'ha establert una sistemàtica de les ribonucleases que engloba grups evolutius relacionats. En base a aquesta darrera classificació, els enzims dels quals es parla en aquest treball formen part de l'anomenada *superfamília de l'RNasa A* (Beintema*, et al.* 1988b), categoria que comprèn endoribonucleases pirimidina específiques, tant de tipus pancreàtic com no pancreàtic, amb ponts disulfur en la seva estructura, la tríada catalítica His-Lys-His i una distribució filogenètica restringida als vertebrats (Beintema 1998).

En els vertebrats, els enzims pertanyents a la superfamília de la RNasa A es troben àmpliament distribuïts en diversos òrgans i fluids. Els seus membres presenten diferents patrons d'expressió i mostren activitats catalítiques diverses enfront de substrats de RNA

específics. A part de la funció digestiva, dels membres del tipus pancreàtic (RNasa 1), es desconeixen encara moltes de les seves funcions fisiològiques (veure apartat 1.3). Fins al moment, s'han caracteritzat 8 famílies diferents pertanyents a aquesta superfamília en humans. La nomenclatura proposada inicialment (Zhou i Strydom 1993) es basa en l'estructura primària de les proteïnes i va incloure inicialment cinc famílies. Posteriorment, l'agrupació es va ampliar per l'addició de la família RNasa 6 (o RNasa K6) (Rosenberg i Dyer 1996) i, més recentment, per les famílies RNasa 7 i 8 (Harder i Schroder 2002; Zhang, *et al.* 2002); . A la taula 1.1 es presenten les 8 famílies conegudes fins al moment

Taula 1.1 Classificació de la superfamília de ribonucleases en humans

Família	Descripció	Tipus
RNasa 1	Ribonucleasa pancreàtica (HP-RNasa)	Pancreàtic
RNasa 2	Neurotoxina derivada d'eosinòfil (EDN)	No pancreàtic
RNasa 3	Proteïna catiònica d'eosinòfil (ECP)	No pancreàtic
RNasa 4	Ribonucleasa aïllada de plasma humà	Mixt
RNasa 5	Angiogenina (Ang)	No pancreàtic
RNasa 6	Ribonucleasa K6	No pancreàtic
RNasa 7	Ribonucleasa antimicrobial aïllada de teixit epitelial	No pancreàtic
RNasa 8	Ribonucleasa aïllada de placenta	No pancreàtic

1.3. Funcions de les RNases

Tal i com ja s'ha comentat, les ribonucleases tenen un paper central en el metabolisme de l'RNA i es troben en tots els organismes exercint funcions diverses i sovint vitals (Deutscher 1993). Molts organismes secreten ribonucleases per tal de digerir l'RNA de l'entorn cel·lular en productes que puguin ser absorbits per les cèl·lules. Per a molts microorganismes i plantes aquesta funció és essencial, perquè la disponibilitat de fosfat inorgànic representa el factor més limitant pel seu creixement. En altres casos, les ribonucleases poden estar involucrades en processos de replicació i transcripció, ser responsables de transformacions postranscripcionals de l'RNA, prevenir l'autopol·linització en plantes o participar en mecanismes de resposta cel·lular a virus o microorganismes (Schein 1997). A la taula 1.2 es presenta una llista de les diferents funcions conegudes de les ribonucleases, així com exemples representatius dins de cada grup.

El contingut de ribonucleases en una cèl·lula depèn de la seva síntesi endògena i de la internalització dels enzims presents en el medi extracel·lular, secretats pel pàncrees o per altres glàndules (Bartholeyns, *et al.* 1975a; Bartholeyns, *et al.* 1975b; Reddi 1975). Una mateixa cèl·lula pot arribar a contenir fins a 20 tipus de ribonucleases diferents alhora i amb especificitats superposades, provinents tant del seu medi extern com intern. Alguns d'aquests enzims poden ser components de complexes supramoleculars, funcionant de manera coordinada amb altres enzims (Deutscher i Li 2001).

Les ribonucleases intracel·lulars són les que participen en la maduració, processament i recanvi dels diversos tipus d'RNA cel·lular, amb una elevada especificitat de substrat, tant en procariotes com en eucariotes. L'estricta regulació d'aquestes ribonucleases és essencial, donat que el metabolisme de l'RNA és essencial per a l'expressió gènica (Deutscher 1988).

Pel que fa a les ribonucleases extracel·lulars, la funció fisiològica es desconeix encara en la majoria dels casos. Pel que fa al membre més ben estudiat de la família de RNases pancreàtiques, RNasea A (RNasa 1), s'accepta que intervé activament en processos digestius, sobretot en herbívors remugants, com a conseqüència de la gran quantitat d'RNA d'origen microbià que s'ha de degradar en l'intestí d'aquests organismes (Barnard 1969).

Taula 1.2 Principals funcions de les ribonucelases: selecció d'exemples representatius

Funció	Ribonucleasa	Organisme
Digestió RNA extracel·lular	RNasa A	*Bos taurus*
	RNasa T1	*Aspergillus oryzae*
	Nucleasa de *Serratia*	*Serratia marcescens*
	Nucleasa estafilococal	*Staphylococcus aureus*
	Nucleasa P1	*Penicillum citrinum*
Maduració RNA	RNasa III	*Escherichia coli*
	Complexe de trencament' per al processament a l'extrem 3' de pre-mRNAs eucariotes	*Bos taurus*
Degradació RNA intracel·lular	RNasa E	*Escherichia coli*
	RNasa HI	*Escherichia coli*
	Exoribonucleasa específica poli(A)	*Homo sapiens*
Apoptosi	Nucleasa anticodó	*Escherichia col*
	RNasa L	*Homo sapiens*
Defensa	α-sarcina	*Aspergillus giganteus*
	ECP i EDN	*Homo sapienss*
	RNasa 7	*Homo sapiens*
Aspermatogènia i immunotoxicatat	BS-RNasa	*Bos taurus*
	RNasa 4	*Homo sapiens*
Control de creixement	Angiogenina	*Homo sapiens*
	S-RNases	*Nicotiana alata*

2. Les Ribonucleases pancreàtiques

2.1. RNasa A com a model

La Ribonucleasa A (RNasa A E.C 3.1.27.5.) s´ha utilitzat com a model per estudi de les ribonucleases de tipus secretori. És la ribonucleasa més estudiada i possiblement una de les proteïnes sobre la qual s'ha realitzat un major nombre d'estudis, a la qual cosa hi ha contribuït, probablement, la facilitat per a purificar-la i l'abundor amb què es troba present en l'òrgan d'origen, la seva gran estabilitat i la seva massa molecular relativament petita. Aquests factors han permès que fos objecte d'una gran diversitat d'estudis, tant sobre estructura i plegament com sobre mecanisme de catàlisi, que estan recollits en nombroses revisions, d'entre les quals es poden destacar les següents: (Anfinsen*, et al.* 1961; Scheraga i Rupley 1962; Richards i Wickoff 1971; Blackburn i Moore 1982; Eftink i Biltonen 1987; Pares*, et al.* 1991; Nogues*, et al.* 1995; Cuchillo i col. 1997 i Raines 1998). Estudis sobre la RNasa A han permès aprofundir en el coneixement general de proteïnes i enzims, així com en les relacions estructura-funció existents en aquests. La RNasa A ha estat també emprada com a model per aplicar tècniques d'anàlisi com la difracció de raigs x (Frankuchen I., 1941), la ressonància magnètica nuclear (Saunders *i col.,* 1957), la seqüenciació de proteïnes i com a model d´estudis de plegament proteic utilitzant una gran diversitat de tècniques (Nogues, *et al.* 1995; Raines 1998; Chatani*, et al.* 2001; Ribo*, et al.* 2006). És per tot això que constitueix un punt de referència obligat en l'estudi de qualsevol membre d'aquesta superfamília.

2.2. Estudis d'estructura

La RNasa A fou el primer enzim (i la segona proteïna) que es va seqüenciar. L'enzim està constituït per una única cadena polipeptídica de 124 residus, de forma globular i amb una massa molecular de 13.683 Da i un pI de 9,6 (Anfinsen*, et al.* 1952; Smyth*, et al.* 1963). Conté 8 residus de cisteïna que formen quatre ponts disulfur intracatenaris entre les posicions 26-84, 40-95, 58-110 i 65-72. La seva estructura tridimensional (Figura 2.1) es va determinar a partir d'estudis per cristal.lografia i difracció de raigs x (Wlodawer*, et al.* 1988; Santoro*, et al.* 1993). La RNasa A té una forma similar a un ronyó amb una profunda depressió, i unes dimensions aproximades de 3,5 x 4,5 x 3,1 nm. En l'extrem N-terminal s´hi troba un segment d'hèlix-α (residus 3-13). A més la proteïna presenta dues regions més hèlix-α, més curtes (residus 24-34 i 50-60), empaquetades enfront d'una regió tipus fulla plegada-β formada per tres cadenes antiparal·leles (residus 43-49, 79-87 i 96-104), a les

que s'afegeixen tres cadenes-β també antiparal·leles que defineixen un segon lòbul de la proteïna (residus 61-63, 72-74, 106-110 i 116-124) (Wlodawer *i col.* 1988). Aquesta estructura global, la majoria de ponts d'hidrogen i posicions de les cadenes laterals d´una part significativa de residus s'han vist confirmats per estudis posteriors per RMN (Santoro *i col.* 1993), en que es va obtenir l'estructura tridimensional d'alta resolució en solució.

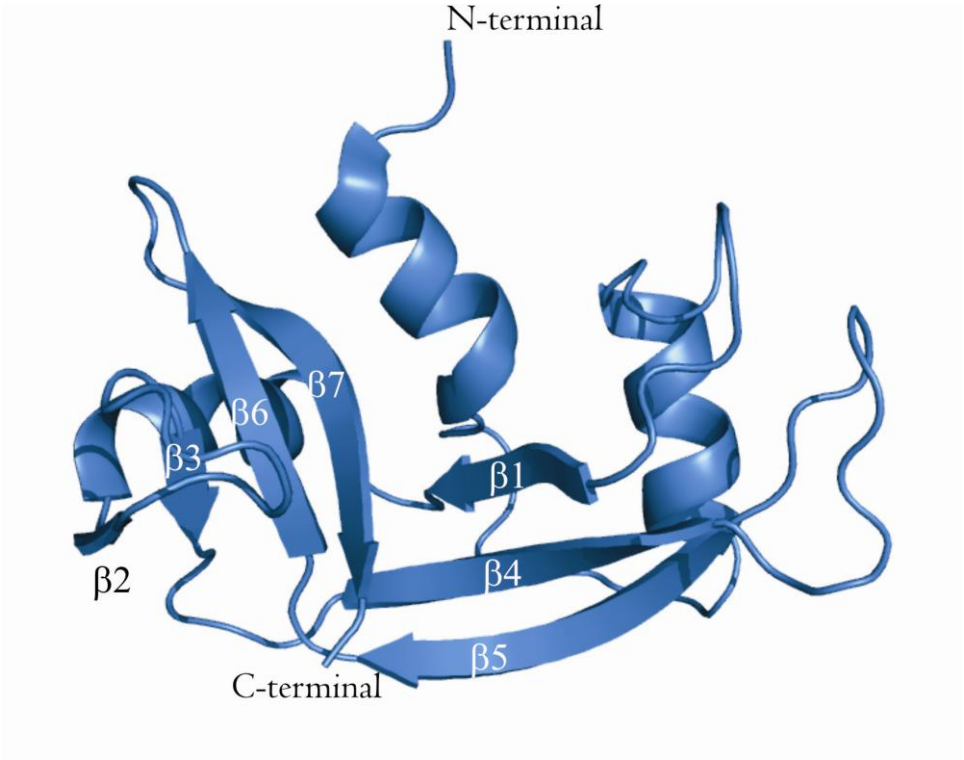

Figura 2.1. Representació de la molècula de la RNAsa A, creada a partir de les coordenades atòmiques obtingudes per anàlisi de difracció de raig x. (*7rsa*.pdb) (Wlodower, A. *et al.*, 1988), representada emprant el programa PYMOL (DeLano 2002).

2.3. Estudis de funció

- ***Mecanisme de catàlisi***

Respecte al seu mecanisme de catàlisi, tradicionalment, s'ha considerat que la RNasa A catalitza el trencament dels enllaços 3',5'-fosfodiester de les cadenes senzilles de RNA mitjançant una reacció en dues etapes (Figura 2.1). La primera etapa és una reacció de transfosforilació des de la posició 5' d'un nucleòtid a la posició 2' del nucleòtid adjacent, formant-se un extrem 2',3'-fosfat cíclic i un extrem 5'-OH lliure. Durant la segona etapa es

dóna la hidròlisi del fosfodiester cíclic, formant-se un grup 3'-fosfat terminal. La base en la posició 3' de l'enllaç que s'hidrolitza ha d'ésser una pirimidina. La reacció de transfosforilació es produeix a una velocitat molt superior a la d'hidròlisi.

Estudis sobre el mecanisme de catàlisi de la RNasa A (Cuchillo*, et al.* 1993) indiquen que no és correcte considerar la reacció com un procés seqüencial, amb la formació d'un intermediari associat a l'enzim. Les dues etapes de transfosforilació i hidròlisi s'han de considerar com dos processos catalítics separats. Els estudis cinètics d'anàlisi dels productes del procés de degradació del substrat poli(C) per HPLC (Cuchillo *i col.* 1993) indiquen que els productes alliberats de la primera reacció, que presenten un extrem 2',3'-fosfat cíclic, no s'hidrolitzen mentre es trobin substrats de la primera etapa de reacció. La hidròlisi dels enllaços 2',3'-fosfodiester s'hauria de considerar com un procés equivalent a la reacció inversa de la transfosforilació dels enllaços 3',5'-fosfodiester (Cuchillo *i col.* 1993). Els autors suggereixen un canvi en la classificació de la RNasa A: l'enzim s'hauria de catalogar com una transferasa i no com una hidrolasa.

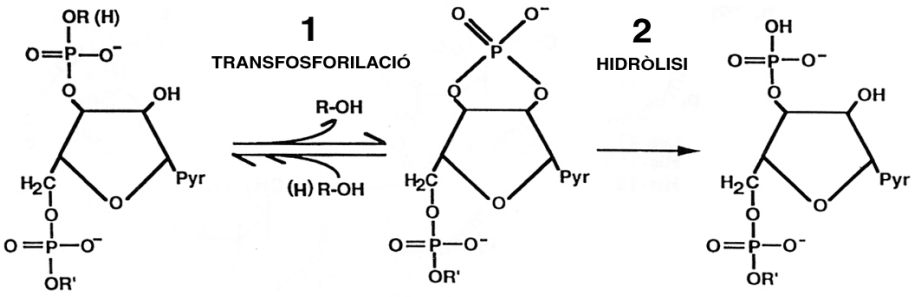

Figura 2.2.. Esquema de les dues etapes de degradació del RNA. Reproduït de Cuchillo i col., (1993). R i R': cadenes de polinucleòtid; Pyr: pirimidina.

- ***Especificitat de la reacció***

La RNasa A presenta un seti principal de fixació per a les bases pirimidíniques, on hi interacciona la base nitrogenada situada en posició 3' en relació a l'enllaç fosfodiester que s'escindeix, i un seti secundari d'interacció per bases del nucleòtid en posició 5', que mostra una certa preferència pels nucleòtids purínics, essent l'ordre de preferència: A>G>C>U.

L'especificitat de la reacció de transfosforilació, pel que fa a la seqüència de bases del substrat, no és absoluta, ja que la RNasa A és també capaç de dur a terme aquest tipus de

reacció enfront de poli(A). S'observa, però, una clara preferència per les pirimidines en la posició 3' (Markham i Smith 1952a; Markham i Smith 1952b). La segona etapa de la reacció és molt més específica i només s'hidrolitzen els esters fosfats cíclics que tenen una pirimidina com a base nitrogenada (Cuchillo *i col.* 1993; Nogues, *et al.* 1995).

- ***Interacció RNasa A-RNA***

En la interacció de la RNasa A amb el seu substrat natural, el RNA, participen, a més a més del centre catalític, altres subsetis (Richards i Wyckoff, 1971; Blackburn i Moore, 1982; Eftink i Biltonen, 1987; Pares *i col.* 1991; Nogues*, et al,*1995; Cuchillo *i col.*, 1997; Nogues*, et al.* 1998). Richards i Wyckoff (1971) van introduir la nomenclatura següent: B_i pels subsetis d'unió a bases; R_i pels d'unió a riboses i p_i pels d'unió a fosfat. Segons aquesta nomenclatura, es defineix p_1 com el subseti catalític on es troba el grup fosfat de l'enllaç fosfodiester que s'escindeix i B_1 com a seti principal específic per a pirimidines. Els mononucleòtids 3'-pirimidina interaccionen principalment amb $B_1R_1p_1$ (Figura 1.3).

A partir d'estudis cinètics (Witzel i Barnard 1962; Wieker i Witzel 1967), cristal.logràfics (Richards i Wyckoff, 1971; Wodak 1977; Boque*, et al.* 1994; Fontecilla-Camps*, et al.* 1994) i de RMN (Arus*, et al.* 1982) es va caracteritzar un subseti secundari de fixació de bases B_2 amb preferència per purines (Figura 2.3).

Posteriorment es van anar descrivint subsetis addicionals d'unió que es defineixen com a subsetis secundaris d'interacció amb el substrat. Es considera que aquests subsetis addicionals reconeixen principalment les càrregues negatives del grup fosfat del RNA (de Llorens*, et al.* 1989; Pares *i col.* 1991). Els subsetis secundaris d'interacció de la RNasa A complementen i modifiquen les propietats catalítiques de l'enzim. El centre actiu $B_1R_1p_1$ determina l'especificitat de substrat (B_1 és específic per a pirimidines), el subseti B_2 confereix preferència per les purines.

L'eficiència catalítica de la RNasa A s'incrementa amb la longitud de la cadena de l'oligonucleòtid (Irie*, et al.* 1984). L'ocupació dels subsetis secundaris, pròxims al centre actiu, permet una correcta disposició del substrat per a la catàlisi, possibilitant una orientació correcta de la cadena de RNA i impedint associacions improductives.

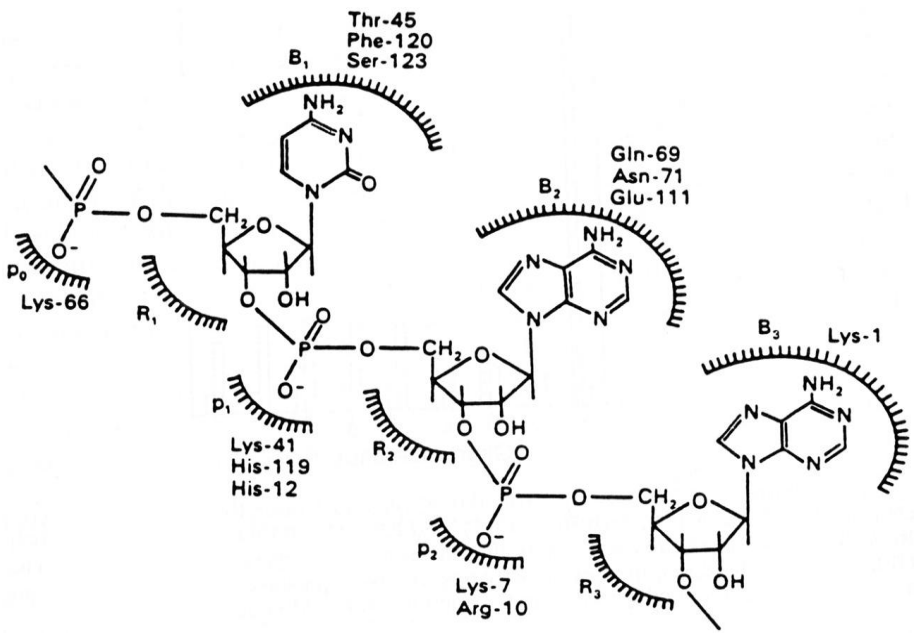

Figura 2.3. Representació esquemàtica de la interacció d'un fragment d'RNA amb la RNasa A. B, R i p fan referència als subsetis per a la fixació de bases, riboses i fosfats, respectivament. B_1 és específic per a pirimidines i B_2 *prefereix* purines. Els mononucleòtids 3'-pirimidina interaccionen a $B_1R_1p_1$ i els mononucleòtids 5'-purina interaccionen a $B_2R_2p_1$. El 3'-AMP interacciona a $B_2R_2p_2$. El grup fosfat de l'enllaç fosfodiéster hidrolitzat per l'enzim se situa a p_1. S'indiquen els residus que podrien participar en cada subseti. Reproduït de Parés i col. (1991).

A fi de caracteritzar el procés implicat en la degradació de substrats de tipus polinucleotídic, Cuchillo *i col.* (1993) estudiaren el procés de degradació del poli(C) mitjançant l'anàlisi dels productes de la reacció per HPLC. L'estudi de la distribució dels productes generats en funció del temps de reacció permeté proposar un model de degradació per substrats de cadena llarga. En la primera etapa de la reacció, l'enzim prefereix substrats de cadena llarga, generant una acumulació inicial d'oligonucleòtids d'entre 5 i 7 unitats, oligonucleòtids que en una etapa posterior es degraden fins a la formació de C>p. Els resultats indiquen que el procés de degradació dels oligonucleòtids no és a l'atzar. Es considera que el model de digestió observat és conseqüència de l'estructura en subsetis de l'enzim. El coneixement que es té actualment de l'estructura i la localització dels subsetis fixadors de fosfat, juntament amb les propietats cinètiques de l'enzim, demostren que l'eficiència catalítica observada en els substrats d'elevada massa molecular es deu a una unió cooperativa i múltiple del substrat a l'enzim (Pares *i col.* 1991; Mosimann*, et al.* 1994).

Boix i col.laboradors (1994), mitjançant estudis de mutagènesi sobre la Lys-7 i l'Arg-10 de la RNasa A, proposaren que p_2 no formaria part exclusivament d'un subseti de fixació, sinó que podria afectar el procés catalític, ja que observaren un augment del valor de la K_M per poli(C) i una disminució de la K_{cat}, especialment en el doble mutant (K7QR10Q). Així mateix la desaparició del subseti P2 fa que l'enzim presenti un pattern de trencament de poli(C) més exonucleolític que el presentat per l'enzim salvatge. Al contrari, l'eliminació del subseti P_0 (K66Q) confereix a l'enzim una activitat més endonucleolítica(Cuchillo*, et al.* 2002).

La interacció de la RNasa A amb cadenes senzilles de RNA o DNA, i la capacitat de desestabilitzar la conformació nativa del DNA, degut a la seva afinitat preferencial per les cadenes polinucleotídiques senzilles, podria tenir alguna funció fisiològica en la hidròlisi de l'RNA intestinal. Jensen i Von Hippel (Jensen, 1976) observaren la capacitat de la RNasa A de desestabilitzar estructures secundàries de DNA. L'enzim iniciaria la digestió de l´RNA intestinal mitjançant la destrucció de les estructures secundàries, i a continuació realitzaria una hidròlisi total de la cadena polinucleotídica.

3. Ribonucleases amb activitats biològiques especials

S'ha comprovat que diversos membres de la superfamília de l'RNasa A presenten accions biològiques especials, a banda del simple paper degradatiu que clàssicament s'ha establert per aquests enzims. Aquestes ribonucleases s'agrupen sota la denominació '**RISBASES**' (*Ribonucleases endowed with special bioactions*) (D'Alessio 1997). Aquest grup inclou, entre d'altes, les ribonucleases que presenten propietats citotòxiques.

Arran del descobriment de ribonucleases amb funcions especials (Risbases) l'interès per l'estudi d'aquests enzims, més enllà del simple paper com a model proteic que han exhibit històricament, ha renascut. Aquestes ribonucleases presenten un ampli rang d'accions biològiques, a més del simple paper digestiu i de la seva participació en el manteniment del contingut cel·lular d'RNA. Per aquesta raó, aquests enzims presenten un important potencial com a agents terapèutics per a determinats desordres humans, incloent el càncer i la síndrome d'immunodeficiència adquirida (SIDA), ja sigui per sí sols o en conjugació amb altres molècules transportadores selectives (Rybak i Newton 1999). Per altra banda, presenten també la possibilitat de servir com a marcadors moleculars de disfuncions biològiques específiques.

Les ribonucleases citotòxiques que s'han descrit en humans són la proteïna catiónca d´eosinófil o ECP (RNasa 3), que presenta activitat antibacteriana, antivírica, cito-, neuro- i helmintotòxica; la neurotoxina derivada d´eosinófil o EDN (RNasa 2), amb una activitat helmintotòxica inferior, però també amb propietats antivíriques, i més neurotòxica que l´ECP (Barker*, et al.* 1989; Sorrentino i Libonati 1997); la ribonucleasa de plasma seminal (RNasa 4), que presenta activitats aspermatogènica, immunosupressora, embriotòxica, antivírica i antitumoral (D'Alessio 1997); i l'RNasa 7, aïllada més recentment de teixit epitelial i que presenta activitat antimicrobiana (Harder i Schroder 2002). S'han descobert altres ribonucleases citotòxiques d'origen no humà. Entre elles l'onconasa (ONC) aïllada a partir dels oòcits de *Rana pipiens*, i dues lectines provinents de *R. catesbeiana* i *R. japonica,* d'origen amfibi; i la BS-RNasa, d'origen boví (Matousek 2001). Més recentment s´ha descrit que els oòcits de *R. pipiens* contenen també una altra ribonucleasa que s´ha anomenat Amphinasa (Amph) amb activitats citostàtica i citotòxica en front de cèl·lules tumorals similars a les descrites per l´ONC (Ardelt*, et al.* 2007).

Així mateix, s'ha comprovat que algunes ribonucleases extracel·lulars tenen un paper important en el control del creixement i del desenvolupament en eucariotes (Benner i Allemann 1989), i per tant, s'engloben també en el grup de les Risbases. Aquest és el cas de l'angiogenina (RNasa 5), un enzim plasmàtic que està implicat en l'angiogènesi, estimulant la neovascularització (Fett*, et al.* 1985); i també de la ribonucleasa de plasma seminal (RNasa 4) (D'Alessio 1997), implicada en el procés de fertilització. Ara bé, malgrat que totes aquestes proteïnes tenen activitat ribonucleasa, sovint la relació entre aquesta activitat enzimàtica i la funció biològica que presenta cadascun dels enzims no és encara massa clara.

Les ribonucleases d'aquest grup presents en fongs, bacteris i plantes superiors estan implicades en processos tant diversos com la defensa de l'hoste o les vies fisiològiques de mort cel·lular (Rybak i Newton 1999).

L'activitat citotòxica de les RNases s'explica per la seva acció catalítica sobre els RNAs cel·lulars, fet que provoca la inhibició de la síntesi proteica i, en conseqüència, la mort de la cèl·lula. Degut a aquesta capacitat, les ribonucleases poden considerar-se com a toxines potencials, oferint una alternativa a les toxines bacterianes i vegetals clàssiques i als agents quimioterapèutics estàndard que actuen sobre el DNA.

Els factors que determinen les funcions especials de les ribonucleases inclouen la seva internalització en l'interior de la cèl·lula, una ruta de trànsit intracel·lular que les condueixi

al compartiment en el qual se situa el seu substrat, una estabilitat suficient per a conservar l'activitat enzimàtica en condicions fisiològiques i la capacitat de degradar aquest substrat tot i la presència d'inhibidors específics com l'inhibidor proteic de ribonucleases present en el citosol de les cèl.lules de mamífer.

Nom		Organisme	Homologia	Activitat biològica
Onconasa	ONC	*Rana pipens*	30% RNase A	Citotòxic/citostàtica
Amphinasa	Amph	*Rana pipens*	40% ONC	Citotòxic/citostàtica
Lectines	RC-RNasa	*Rana catesbeiana*	50% ONC	Citotòxic/citostàtica
	RJ-RNasa	*Rana japonica*	50 % ONC	Citotòxic/citostàtica
Bovina seminal	BS RNasa	*Bos taurus*	Dímer (83 % RNasa A)	Citotòxica, espermatogènica, Immunosupresora i embriotóxica
Angiogenina	Ang	*Homo sapiens*	35 % HP-RNase	Angiogenesis
Proteïna catiònica d'eosinòfil	ECP	*Homo sapiens*, eosinòfils	30 % RNasa A	Citotòxica, bactericida, helmintotòxica i antiviral

Taula 3.1. Ribonucleases amb activitat citotóxica. Conjunt de Ribonucleases de naturalesa humana i no humana amb capacitat citotóxica.

De les diverses ribonucleases descrites, el present treball de tesi se centra en les variants de l'onconasa, i de HP-RNasa. Aquestes enzims es descriuen breument a continuació, junt amb l´ECP atès que determinants bactericides descrits per aquest enzim s´ha introduït per enginyeria de proteïnes en les altres RNases esmentades (Hofsttenge, 1997; Benito*, et al.* 2005).

4. L´onconasa

4.1. Característiques moleculars de l´onconasa

L´onconasa (ONC) és el membre conegut més petit de la superfamília de les ribonucleases pancreàtiques i va ser purificada inicialment a partir d'embrions i d'oòcits de *Rana pipiens*. Es tracta d'una proteïna de 104 residus, molt bàsica (pI =8.5), amb una massa molecular de 11.816 Da i que presenta un 28 % d'homologia a nivell d'estructura primària,

que arriba a un 48 % si es tenen en compte els canvis conservatius, amb l'RNasa A (Ardelt, *et al.* 1991). Presenta els 20 aminoàcids estàndards i és de destacar la presència d'un piroglutàmic a l'extrem N-terminal el qual té una gran transcendència en l'activitat i l'estabilitat de l'onconasa.

4.2. Estructura

L'estructura tridimensional de l´onconasa s'ha determinat a partir dels estudis de cristal·lografia i difracció de raig x (Mosimann *et al.* 1994). Tot i les diferencies en l'estructura primària entre la RNasa A i l´onconasa, ambdós enzims presenten una conservació dels elements d'estructura secundaria que dóna lloc a una estructura terciària molt semblant (Figura 4.1. a).

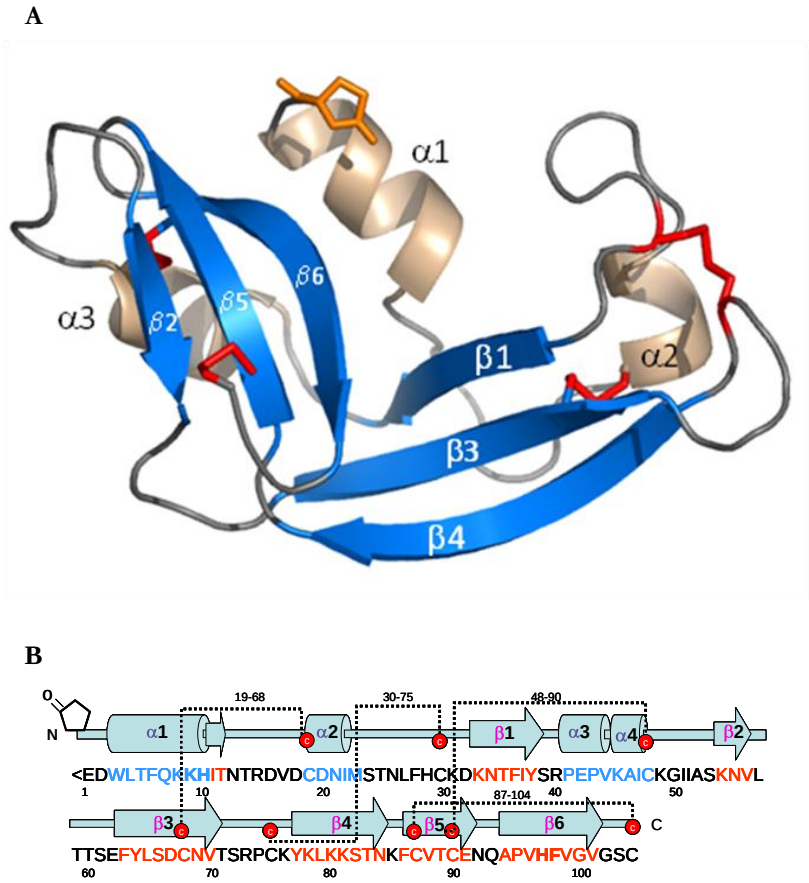

Figura 4.1. A. Representació esquemàtica de tipus ribbon dels elements d'estructura secundària de l´Onconasa (1ONC.pdb), (Mossiman et al., 1994). En vermell es representen els ponts disulfur i en taronja el piroglutàmic de l'extrem N-teminal. **B.** Diagrama lineal dels elements d'estructura secundària. Les fletxes representen les cadenes β i els cilindres les α-hèlix. Els punts vermells representen les cisteïnes. Els residus en negreta representa els residus del centre catalític.

L'ordenació dels elements d'estructura secundària és el mateix que els descrits per la RNasa A, el prototipus d'aquesta família (Figura 4.1. b).

Les cadenes beta antiparal·leles es troben agrupades formant dues fulles beta que donen una aparença bilobulada a l´estructura globular de la proteïna. La primera fulla està formada per les cadenes β1(33-38), β3(63-70) i β4(77-84). La segona està formada per les cadenes β2(55-58), β5(86-91) i β6(94-101). Els residus involucrats en estructures helicoïdals son: residus 3 a 10 (hèlix α1), residus 19 a 23 (hèlix α2) i residus 41-48 (hèlix α3). Aquestes dues hèlix són una barreja de hèlix-α i hèlix 3_{10}. La resta de residus que no formen part d´elements regulars d´estructura secundària i es troben formant quatre girs reversos. Dels quatre girs, 2 són de tipus II (48-51,73-76) i dos de tipus I (28-31, 91-94). Així mateix, entre l'hèlix α1 i α2 apareix un gir irregular que inclou els residus que van del 11 al 13, ambdós inclosos.

En els extrems de la cadena polipeptídica, N-terminal i C-terminal, tenim dos i tres residus, respectivament, que no formen part de cap element de l´estructura secundària. A l´extrem N-terminal el Pyr1 i l´Asp2 es pleguen encarant-se cap al centre actiu de l´enzim. Els residus Gly 100 a Cys 104 formen una estructura tancada en el mateix pla de la fulla β (β2, β5, β6) que s´estabilitza per interaccions per pont d'hidrogen i per la formació d´un pont disulfur entre els residus Cys 104 i Cys 87. El piroglutàmic (Pyr) es forma per la ciclació sobre el grup amí terminal de la cadena lateral de la glutamina. Aquest Pyr forma interaccions per ponts d'hidrogen amb el N amínic de la Lys 9, un residu catalític, permetent la seva estabilització i la correcta orientació respecte el substrat.

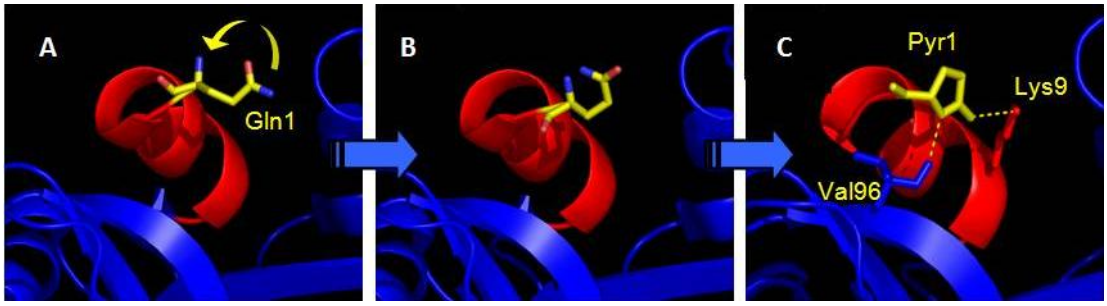

Figura 4.2. Ciclació de glutamina (Gln 1) a Piroglutàmic (Pyr). Esquema de l'extrem N-terminal de l´Onconasa on es representa el procés de ciclació de la glutamina N-terminal a Piroglutàmic. **A**: glutamina a l'extrem N-terminal. **B**: ciclació de la glutamina, el grup amí de la cadena lateral terminal forma un enllaç amb Cα alliberant-se un grup NH^{+}_{3}. **C**: Piroglutàmic situat a l'extrem N-terminal formant interaccions amb la Lys 9 i la Val 96. Representada emprant el programa PYMOL (DeLano. 2002).

També estableix una interacció per pont d'hidrogen amb el grup CO de la Val 96 de la fulla β C-terminal provocant que l'hèlix α1 quedi empaquetada sobre el cos principal de l´onconasa (Figura 4.2.).

Com a conseqüència, l´onconasa presenta una estructura terciària molt més compacte que la resta de ribonucleases de la mateixa família. Aquest plegament determina també que l'extrem N-terminal de l´onconasa formi part del centre actiu de l´enzim interaccionant amb el grup ε-amino de la cadena lateral de la Lys9, la qual forma part del subseti principal d´unió a grups fosfats del substrat (Mosimann *et al.,* 1994).

Tot i la semblança entre les estructures de l´onconasa i RNasa A, l´onconasa és 20 residus més curta. Quan s'alineen les seqüències i es sobreposen les cadenes polipeptídiques s´observa que l´onconasa presenta una estructura més compacta en la qual tots els girs es reduirien a la llargada mínima necessària per tal d´unir els elements d´estructura secundària i preservar l´estructura terciària.

L´onconasa presenta 8 cisteïnes que formen quatre ponts disulfur intracatenaris (posicions 19-68, 30-75, 48-90, 87-104). D´aquests, tres són homòlegs als que es troben en l´RNasa A: 19-68 amb 26-84, 30-75 amb 40-95 i 48-90 amb 58-110, respectivament. El pont disulfur 65-72 present en la RNasa A no presenta el seu homòleg en l´onconasa, en canvi aquesta presenta el pont d´hidrogen que uneix Cys 87 amb Cys 104, bloquejant l´extrem C-terminal i contribuint a la comparació de l´estructura (Mosiman *et al.,* 1994).

4.3. Estabilitat i camí de plegament de l´onconasa

Una de les característiques més interessant de l´onconasa és la seva elevada termoestabilitat, presentant un valor $T_{½}$ de 90ºC i la resistència a la degradació per varies proteases (Notomista et al., 2000). Comparat amb la RNasa A aquesta temperatura mitja de desnaturalització, pràcticament 30ºC superior a la de la RNasa A (62ºC), posiciona l´onconasa com una de les proteïnes mesofíliques més termostables. La gran compactació, per una reducció dels girs a una mínima llargada, preservant l'estructura terciària, és un factor clau en la gran estabilitat d´aquesta ribonucleasa.

Així mateix, el pont disulfur 87-104 situat a l'extrem C-terminal, i el residu de piroglutàmic situat a l´extrem N-terminal també són responsables d'aquesta inusual estabilitat. El grup de Notomista i col va mostrar com l'eliminació del residu 104 de l´extrem C-teminal promovia una pèrdua d´estabilitat considerable ($\Delta T_{½}$=19ºC) (Notomista*, et al.* 2001). Paral·lelament, el grup de Raines *i col* va demostrar que

l'eliminació del mateix pont disulfur a través de la construcció de la variant C87AC104A també provocava una desestabilització significativa ($\Delta T_{½}$ = 30ºC) (Leland*, et al.* 2000). Així mateix, la presència d´una metionina a l´extrem N-teminal, impedint la ciclació de la glutamina a piroglutàmic, promou una reducció de l´estabilitat no tan marcada ($\Delta T_{½}$ = 3ºC) (Liao*, et al.* 2003).

4.4. RNasa A vs. Onconasa

L´RNasa A ha esdevingut un model per a estudis de plegament proteic. L´estudi del plegament de la RNasa A, és interessant ja que presenta quatre ponts disulfur i residus de prolina que donen lloc a enllaços peptídics en conformacions *trans* i *cis*. El canvi conformacional necessari per passar de l'isòmer *trans* al *cis* està descrit com una etapa limitant del procés de plegament proteic (Schmid, 1978; Schmid, 1982). Degut a aquestes característiques els estudis de plegament els podem classificar en dos grups. En primer lloc, aquells estudis en els quals s´ha treballat amb la proteïna oxidada, és a dir, amb els quatre ponts disulfur intactes, i en segon lloc, els estudis en els quals s´ha treballat amb la proteïna reduïda, estudiant seu procés d'oxidació, respectivament.

El plegament de la RNasa A i de l´onconasa està vinculat a la formació dels enllaços disulfur. Tal com s´ha esmentat, ambdues proteïnes presenten 4 ponts dissulfur que, durant el plegament oxidatiu, condueixen a la generació d´un gran nombre d'intermediaris per combinació dels vuit residu de cisteïna, els quals poden ésser dividits en 5 grans grups (R, 1S, 2S, 3S i 4S) segons el nombre de ponts disulfur que contenen (R, completament reduït; 1S, 2S, 3S i 4S, presència de 1, 2, 3 o 4 ponts disulfur, respectivament).

Tot i que la RNase A i l`onconasa presenten unes estructures molt semblants s´ha pogut observar que els camins de plegament oxidatiu son significativament diferents. En el cas de la RNase A es formen dos intermediaris estables 3S (amb 3 ponts disulfur formats) que corresponen a les formes des-[40-95] i des-[65-72] (Rothwarf*, et al.* 1998). A més a més, no s´ha trobat l'existència d´intermediaris estables 2S. Per contra, estudis recents sobre el plegament oxidatiu de l´onconasa han evidenciat que només es forma un intermediari estable 2S (Gahl*, et al.* 2008; Schulenberg *et al.,* 2006).

Estudis de desplegament reductiu han evidenciat que els camins de desplegament entre aquestes dues proteïnes també presenten diferències significatives. La cinètica de reducció de la RNasa A nativa suggereix que es formen dos intermediaris amb tres enllaços disulfur, des-[65-72] i des-[40-95] que es trobarien en camins paral·lels. A diferencia de la RNasa A,

l´onconasa presentaria un camí de desplegament reductiu que s´iniciaria per la formació del intermediari 3S estable, des-[30-75] (Narayan*, et al.* 2004; Xu*, et al.* 2004). Les diferències en el camí i la cinètica de desplegament reductiu entre les dues RNases són molt probablement degudes a la diferent exposició al solvent dels àtoms que formen els ponts disulfur. Una anàlisi més detallada de l'accessibilitat dels diferents ponts disulfur de l´onconasa evidencia que el pont disulfur (30-75) presenta una àrea accessible al solvent molt més elevada (23,9 Å) que no pas qualsevol dels altres ponts disulfur de la mateixa onconasa. Igualment, comparant l'àrea accessible al solvent dels ponts disulfur de l´onconasa i la RNasa A es pot observar com el pont (30-75) de l´onconasa és troba 7 vegades més exposat que el pont dissulfur homòleg de la RNasa A (40-95) (Narayan*, et al.* 2004; Xu*, et al.* 2004).

En l'anàlisi del camí de desplegament tant de l´onconasa com la RNasa A en condicions oxidatives, és a dir, en que els 4 ponts disulfur es troben intactes, cal tenir en compte la presència de les prolines i la seva isomerització (Wedemeyer*, et al.* 2002; Bhat*, et al.* 2003). Igualment, en l´estudi de l'estabilitat i plegament d'aquestes proteïnes cal considerar la contribució dels clústers hidrofòbics o centres de nucleació (Font*, et al.* 2006a; Font*, et al.* 2006b; Font*, et al.* 2006c).

4.5. Mecanisme catalític i interacció amb el substrat.

L´onconasa i l´RNasa A presenten un mecanisme de catàlisi molt semblant. L´onconasa catalitza un trencament dels enllaços 3', 5'-fosfodièster de les cadenes senzilla de RNA mitjançant una reacció en dues etapes (veure apartat 2.3). La His10 i la His 97 són els equivalents de His 12 i His119 de la RNasa A mentre que la Lys 31 és equivalent a la Lys 41 de la RNasa A (Mosimann *et al.,* 1994; Moussaoui*, et al.* 1996).

En estudis sobre la contribució a l'activitat de l´onconasa de diferents residus, Lee i Raines (Lee i Raines 2003) van observar que en l´onconasa els residus Lys 9 i Lys 31 participen en l'estabilització de l'estat de transició, a diferència de la RNasa A on només és la Gln 11. Segons els mateixos autors, mentre la Lys 9 intervindria en el mecanisme catàlisis de forma directe, la Gln 11 de la RNasa A estaria implicada en la unió del substrat (Lee i Raines 2003).

L´onconasa mostra una gran disminució de l'eficiència catalítica pels substrats sobre els que la RNase A és més activa i una preferència pel trencament de substrats: RNA de cadena senzilla > poli (U) > poli (C). Pels substrats de baix pes molecular l´onconasa presenta preferència pels dinucleòtids UpG i CpG (Ardelt *et al.,* 1994; Mosimann *et al.*,

1994) i una disminució important de l'activitat catalítica pels mononucleòtids de 2', 3' fosfat cíclic en comparació amb la que presenta la RNasa A (Boix *i col.* 1996).

La reducció de l'activitat de l´onconasa, en relació a les RNases pancreàtiques està relacionada amb l'estructura del centre actiu i els lloc d'unió al substrat (Boix, *et al.* 1996) que determina una més baixa afinitat pels àcids nuclèics de cadena senzilla (Lee, *et al.* 2003). Per definir aquests punts d'unió amb el substrat s'ha utilitzat la mateixa nomenclatura originalment descrit per l´RNasa A (P_1, B_1 i B_2) (Richards i Wyckoff, 1971). El subseti P_1 (centre actiu) es troba al llarg de l'escletxa central l´estructura de l´onconasa. Presenta una tríada catalítica formada per: His10, Lys31 i His97 situada entre l'hèlix α1 i les cadena β6 i β1 (Ardelt, *et al.,* 1991). Aquesta tríada catalítica es troba conservada en els membres de la superfamília de les RNases A (His12, Lys41 i His119) i altres membres no-pancreàtics con l´angiogenina (Leland*, et al.* 1998) i RNase 4 (Hsu*, et al.* 2003). Els altres dos residus que intervenen en el centre actiu, que només es presenten en ribonucleases de granota, són Pyr1 i Lys9. (Richards & Wychkoff, 1971; Hsu *i col.* 2003).

4.6. Producció heteròloga de l´onconasa

Els primers treballs i descobriment de l´onconasa es va donar en dos grups de forma independent. En un primer estudi sobre l'aglutinació de cèl·lules per part de diverses lectines obtingudes de *Rana japonica* va mostrar una selectivitat per l'aglutinació de cèl·lules tumorals (Sakakibara*, et al.* 1976; Nitta*, et al.* 1994). Paral·lelament, un segon grup que treballava sobre els factors que controlen el creixement i desenvolupament cel·lular, va observar que l'extracte obtingut d'embrions de granota inhibia el creixent dels tumors de granota. A partir d'aquí es va aïllar una proteïna d'embrions de *Rana pipiens*, anomenada inicialment Pannon o P-30, que presentava una seqüència d'aminoàcids semblant a la RNasea A (30% d'identitat seqüencial). Més tard se la va anomenar onconasa (Darzynkiewicz*, et al.* 1988; Ardelt i Laskowski 1991; Ardelt, *et al.* 1991; Mikulski*, et al.* 1992).

L´interès per estudiar quins determinants de la proteïna eren els responsables de les propietats citotòxiques que se li van atribuir, va plantejar la necessitat d'obtenir-la de forma recombinant. Per tal de poder-la aïllar en forma pura, activa i en quantitats importants va ser necessari desenvolupar un sistema heteròleg d'expressió i així com una estratègia de purificació.

Tal com ja s´ha esmentat, una de les diferències entre l´onconsa i la RNasa A es troba a l´extrem N-terminal. A l´onconasa, el primer residu de la seqüència (Glu1) està sotmès a un procés de modificació post-traduccional que dona lloc a la formació d´un residu d'àcid piroglutàmic (Pyr). Es tracta d´un residu necessari per l'activitat catalítica i citotòxica de l´onconasa (Newton*, et al.* 1994; Boix*, et al.* 1996).

Els mètodes descrits per l'expressió i la purificació de l´onconasa, bé sigui per un mètode d'expressió citoplasmàtica o un mètode d'expressió que dirigeix la proteïna a l'espai periplasmàtic, requereixen que al final del procés s'obtingui una onconasa activa, la qual cosa implica la ciclació del residu de Gln de l´extrem N-terminal a Pyr.

Els sistemes d'expressió citoplasmàtica proporcionen rendiments de purificació més elevats, degut al segrest de la proteïna expressada en forma de cossos d´inclusió. Aquests cossos d'inclusió protegeixen la cèl·lula de l'acció tòxica de la proteïna i, per altre banda, protegeixen la proteïna recombinant de la degradació per proteases. Malgrat aquestes avantatges, la proteïna presenta una formilmetionina addicional situada a l'extrem N-terminal que evita la ciclació de la glutamina a piroglutàmic (Pyr). Això provoca una disminució significativa de l´activitat catalítica i propietats citotòxiques de l´enzim (Boix *i col.* 1996). En aquest cas, l'activació requerí dos passos: l'eliminació de la metionina i la ciclació de la glutamina. El grup de Boix i col. va dissenyar una estratègia que consistia en l'eliminació de la metionina mitjançant bromur de cianogen (CNBr). Per evitar que el reactiu actues sobre la metionina 23 van substituir aquest residu per una leucina. A la vegada, el residu Glu1 es va substituir per Gln1, a fi d'afavorir la seva ciclació, la qual es produïa espontàniament després del procés de digestió. Aquest sistema permeté l'obtenció d´onconasa activa i citotòxica però amb el canvi de seqüència esmentat (Boix *i col.* 1996).

Una segona estratègia per eliminar la metionina N-terminal consistí en la utilització d´amino peptidasa d´*Aeromonas proteolytica* (AAP), que té preferència per la degradació de residus hidrofòbics, entre ells la metionina situada a l'extrem N-terminal en les proteïnes (Wagner*, et al.* 1972). Els rendiments d´onconasa activada obtinguts emprant aquest procediment foren baixos ja que la metionina no es trobava suficientment exposada (Leland *i col.* 1998).

Alguns autors (Adinolfi*, et al.* 1995; Leland *i col.* 1998) han descrit un sistema d´expressió en *E. coli* basat en el transport de l´onconasa a l'espai periplasmàtic. Aquest procediment genera rendiments de purificació molt variables, proporcionant una proteïna recombinant amb propietats comparables a les de l´onconasa salvatge no recombinant. En aquest cas

l'activació no requereix l'eliminació de la metionina N-terminal i únicament cal una ciclació de la glutamina a piroglutàmic.

4.7. L´onconasa com agent antitumoral

Es va observar que l´onconasa s'incubava "*in vitro*" amb cèl·lules tumorals presentava activitat citostàtica i citotòxica (Doms*, et al.* 1989). S'ha demostrat que no tant sols suprimeix el creixement de cèl·lules tumorals "*in vitro*" (Pelham 1991; Newton*, et al.* 1998) sinó que redueix la mida dels tumors en animals (Wu*, et al.* 1995) i que incrementa la citotoxicitat de diferents agents terapèutics (Pelham 1991; Sciaky*, et al.* 1997; Vitelli*, et al.* 1997; Bucci*, et al.* 2000). Aquests resultats van suposar el inici del camí que ha portat a la utilització de l´onconasa a nivell clínic com agent antitumoral. L´onconasa és una biodroga que s´administra extracel.lularment però que actua intracel.lularment. De forma general el mecanisme acceptat que confereix citotoxicitat a l´onconasa es divideix en dos processos: (i) internalització citosòlica; i (ii) degradació catalítica del RNA (Johnson*, et al.* 2007). Els assajos clínics en fase I i II pel tractament de diversos tumors sòlids, incloent càncer de pulmó (Mikulski*, et al.* 2002) i càncer de màma, van suposar un increment significatiu en la supervivència dels pacients, amb efectes secundaris lleus i reversibles, consistents principalment en toxicitat renal. Aquest enzim s´ha utilitzat en assajos clínics també en combinació amb altres agents quimioterapèutics (Vasandani*, et al.* 1999; Newton i Rybak 2001; Pavlakis i Vogelzang 2006). Actualment es troba en fase III d´assajos clínics per al tractament del mesotelioma maligne (Mikulski *i col.* 2002; Costanzi*, et al.* 2005).

5. L´ECP: ribonucleasa amb activitat antimicrobiana.

Els leucòcits eosinòfils són les cèl.lules encarregades de la primera línea de defensa de l´organisme contra la invasió de paràsits, i poden presentar també activitat antitumoral. Aquestes cèl·lules es caracteritzen per tenir una quantitat de grànuls citoplasmàtics, que alliberen el seu contingut al medi en resposta a una infecció parasitària o una reacció d'hipersensibilitat (Kita*, et al.* 1995). Una de les proteïnes presentes en aquests grànuls, és la proteïna catiònica d´eosinòfil (ECP).

5.1. Característiques estructurals i funcionals

L´ECP és una proteïna petita de 133 aminoàcids (15,5 KDa). Comparteix un 30% d'homologia amb la seqüència de la RNasa A. És una de les ribonucleases més bàsiques (pI=10,8) degut al nombre de residus d'arginina que presenta a la superfície molecular.

Conté tres punts de glicosilació que donen heterogeneïtat a la proteïna purificada d´eosinòfils (Boix, *et al.* 2001). L'estructura tridimensional presenta un plegament tipus RNase A amb un centre actiu que també es troba molt conservat (Boix, *et al.* 1999a; Mallorqui-Fernandez, *et al.* 2000). La distribució de les càrregues positives a la superfície de la proteïna és important ja que es relaciona amb la seva capacitat d'unió a molècules carregades negativament o membranes cel·lulars i amb la seva baixa activitat catalítica.

L'eficiència catalítica de l´ECP és 100 vegades inferior a la de la RNasa A (Gullberg, *et al.* 1986). L´ECP presenta una preferència per substrats d´alt pes molecular com poli (U) i poli (C) i una activitat molt baixa enfront mononucleòtids de 2', 3' fosfat cíclic (Boix, *et al.* 1999b). El patró de digestió de substrat d'elevada massa molecular indica que té una activitat de tipus exonucleasa que predomina sobre l´endonucleasa, a diferència de la RNasa A, que presenta un patró més endonucleasa. Aquest comportament s´ha atribuït a una estructura diferent dels subsetis d'interacció de l´ECP amb el substrat. El centre catalític està format per la tríade catalítica His 15, His 128 i Lys 38 les quals són posicions equivalents a les de His 12, His 119 i Lys 41 de la RNasa A (Boix *i col.* 1999b).

5.2 Activitats biològiques

L´ECP presenta un ampli ventall d'accions biològiques, en el que s'inclouen les activitats neurotòxica (Durack, *et al.* 1979; Fredens, *et al.* 1982), helmitotòxica, bactericida, antivírica i citotòxica (Venge, *et al.* 1999).

El mecanisme de citotoxicitat de l´ECP només es coneix parcialment i la seva relació amb l'activitat ribonucleasa presenta controvèrsia. Així, aquesta activitat sembla ser imprescindible per la immunotoxicitat de la proteïna (Durack i Klebanoff 1979; Fredens i Venge 1982) i per l'activitat antiviral (Domachowske, *et al.* 1998) però no per l'activitat bactericida (Rosenberg 1995).

La contribució a les activitats citotòxica i bactericida de residus bàsics i aromàtics presents en la superfície de la molècula s´ha avaluat mitjançant mutagènesis dirigida (Carreras, *et al.* 2003). Substitucions a les posicions W10, W35 R36, R37 F6, R101R104 i en el llaç 115-122, han permès demostrar, emprant liposomes com a model, que l´ECP tendeix a provocar disrupció de membranes preferentment acídiques. D´entre aquestes posicions W35R36 semblen ser les més crítiques per a la disrupció de vesícules de liposomes i per l'activitat bactericida. Quan s´ha examinat el paper d'aquests determinants sobre línies cel·lulars humanes (HL-60 i HeLa), també la parella W35R36 sembla ser

essencial per a la inhibició del creixement cel·lular mentre que les altres posicions juguen un paper secundari (Carreras*, et al.* 2005).

Estudis del mecanisme d'interacció de la ECP sobre la membrana plasmàtica s´han centrat en els residus W10 i W35. El residu 35 s'introduiria dins de la bicapa lipídica de la membrana mentre que el residu 10 intervindria en la reorientació d'altres residus de naturalesa catiònica per facilitat interaccions electrostàtiques amb la membrana plasmàtica. Els resultats apunten a un mecanisme tipus "Carpet-Like". Segons aquest model la proteïna s'uniria a la superfície membranal fins a arribar a un cert umbral de concentració, a partir del qual es provocaria agregacions i disrupcions de vesícules (Torrent*, et al.* 2007).

Recentment, s'ha estudiat les etapes inicials del procés d'interacció de l´ECP amb la membrana cel·lular de cèl·lules eucariotes (cèl·lules humanes epitelials bronquials Beas-2B) així com les etapes inicials dels seu procés d'internalització. Aquests estudis també presenten controvèrsia. Així, s´ha descrit que l´ECP es internalitzada per un mecanisme depenent de clatrina, seguint una ruta messopinocítica depenent de raft (Fan*, et al.* 2007). En canvi, quan el mecanisme citotòxic de l´ECP s´ha estudiat en cèl·lules HL-60 (human promyelocytic leukemia) i HeLa (adenocarcinoma) com a model, es va observar que la citotoxicitat d´ECP s'assolia per unió i agregació a la superfície cel·lular. Aquesta etapa inicial ve seguida d'una alteració de la permeabilitat membranal que comporta una modificació de l'equilibri iònic intracel·lular. En aquest estudi no es va observar internalització cel·lular de l´ECP (Navarro*, et al.* 2008). Per tant, el mecanisme d'acció de l´ECP sembla ser cèl·lula depenent. L'aspecte que sembla més clar del procés és el que l´ECP és una ribonucleasa que s'uneix a heparina i que la seva citotoxicitat depèn d'aquesta unió. Recentment s´ha caracteritzat les interaccions moleculars entre l´ECP i l´heparina i s´ha identificat un lloc en la superfície molecular d'unió d'aquest oligoreceptor (Fan *i col.* 2007).

6. Ribonucleasa Pancreàtica Humana (HP-RNasa).

La ribonucleasa de pàncrees humà (HP-RNasa o RNasa 1, segons la nomenclatura de Zhou i Strydom (Zhou i Strydom 1993) és un dels enzims digestius que, sintetitzats a la part exocrina d'aquesta glàndula, formen part del suc pancreàtic. La seva quantitat en aquest òrgan no és, ni de bon tros, tan elevada com la de la RNasa A en el pàncrees boví. Ha estat suggerit (Barnard 1969) que la presència de ribonucleasa pancreàtica en vertebrats no remugants pot ésser un vestigi evolutiu, atès que no existeix en aquests organismes la

necessitat d'aprofitament de fòsfor i nitrogen procedent de l´RNA de la microbiota intestinal. Així mateix, aquest enzim s´ha localitzat també en menor quantitat a l´orina, el plasma seminal, el cervell i el ronyó. En funció del fluid o teixit d´origen, la ribonucleasa pancreàtica pot presentar diferents patrons de glicosilació (Sorrentino 1998).

Els intents de purificació de l'HP-RNasa han estat diversos, però degut a la dificultat d'obtenció de la mostra i a aquest baix contingut d'enzim al pàncrees, la purificació fins a homogeneïtat no fou possible fins als treballs de Weickmann (Weickmann*, et al.* 1981), de Weickmann i Glitz (Weickmann i Glitz 1982) i de Kurihara (Kurihara*, et al.* 1982). La seqüència d'aminoàcids de la HP-RNasa va ser publicada poc temps després (Beintema*, et al.* 1984). L'enzim constava, segons aquest treball, de 127 residus. A la seqüència obtinguda hi mancava la Thr de l'extrem C-terminal i la seva presència fou confirmada pel mateix grup i per Ribó i col.laboradors (Ribo*, et al.* 1994).

6.1 Descripció funcional i estructural de l´HP-RNasa

L´HP-RNasa presenta un 70% d'identitat de seqüència amb la seva homòloga bovina, l´RNase A, amb qui comparteix la capacitat de degradar l´RNA específicament a l´extrem 3´de les bases pirimidíniques. Tanmateix, l´enzim humà difereix en 42 posicions, incloent l´extrem C-terminal, on presenta una prolongació de 4 residus (EDST), de manera que l´enzim està format per un total de 128 residus. Així mateix, cal assenyalar que l´HP-RNasa presenta una major proporció de residus bàsics que la RNasa A. Cal destacar també la presència de set residus de Pro, quatre dels quals es troben en la mateixa posició que en l´RNasa A, mentre que els altres tres hi són absents (posicions 19, 50 i 101) (Beintema *i col.* 1984).

L´ HP-RNasa presenta 3 llocs potencials d'unió a glicans (Asn34, Asn76 i Asn88), els quals mostren diferent grau de glucosilació depenent del teixit d´origen (Yamashita*, et al.* 1986; Beintema*, et al.* 1988a; Ribo *i col.* 1994).

A partir d´estudis de caracterització enzimàtica, s'observà que l´HP-RNasa catalitza la degradació de l´RNA seguint un mecanisme idèntic al descrit per l´RNasa A. Així mateix, ambdós enzims coincideixen en presentar una marcada preferència pel trencament del poli(C) en relació al poli(U), amb l'òptim d'activitat proper a pH 8.0. No obstant, l´HP-RNasa presenta un comportament molt més endonucleolític que el descrit per a la RNasa A (Rodriguez*, et al.* 2008). A diferència de la RNasa A, a la qual se li suposa una funció de digestió de RNA exogen, no es coneix la funció de la HP-RNasa A però aquest enzim

podria estar implicat en la degradació de RNA tant de cadena simple com doble (Sorrentino i Libonati 1997; Sorrentino 1998; Libonati i Sorrentino 2001; Sorrentino*, et al.* 2003).

6.2 Producció heteròloga de l´HP-RNasa

La dificultat d'obtenir la proteïna a partir de la seva font natural va conduir a considerar el clonatge del gen i l'expressió heteròloga com a via per a la seva obtenció. S'empraren sistemes d'expressió tant de tipus procariota com eucariota. Els darrers es van descartar ja que produïen proteïna amb una gran heterogeneïtat degut a la glicosilació (Russo*, et al.* 1993; Futami*, et al.* 1995; Boix *i col.* 1996; Ribo*, et al.* 1996; Bal i Batra 1997).

La producció heteròloga de l´HP-RNasa es va dur a terme emprant un gen sintètic (Ribo *i col.* 1996) i un sistema d'expressió periplasmàtica basat en el promotor del gen de l´RNA polimerasa del fag T7. Aquest mateix sistema havia estat utilitzat per la producció heteròloga de l´RNasa A amb resultats que permetien l'obtenció d´entre 30 i 50 mg de proteïna per litre de cultiu La producció i purificació de l'enzim humà recombinant va donar lloc a un rendiment final d´1 mg per litre de cultiu (Ribo *i col.* 1994).

Paral.lelament a aquests resultats, es va observar que la producció de BS-RNasa, proteïna que presenta un 80% d'identitat de seqüència amb l´RNasa A, mitjançant un sistema d'expressió cel·lular proporcionava un elevat rendiment d'expressió del gen (Kim i Raines 1993). Aquest elevat rendiment s'atribueix a l'estructura secundària de l'extrem 5' de l´m-RNA codificant per l´enzim, la qual el fa més fàcilment accessible al ribosoma, i afavoreix el procés de traducció (Li*, et al.* 1991). Atenent a aquest fet, es va procedir a la construcció d´un gen híbrid que contenia la seqüència de l'extrem 5' del gen de la BS-RNasa (triplets codificant pels residus 1 a 20) i la seqüència del gen que codifica pels residus 21 a 128 (Canals*, et al.* 1999). Tot i la introducció dels 20 primers residus corresponents a l´extrem N-terminal de la BS-RNasa, el gen híbrid incorporava només 5 canvis respecte a la seqüència de l´HP-RNasa salvatge (Canals *i col.* 1999). Els rendiments finals de recuperació de la proteïna híbrida, que es va anomenar PM5, seguien essent tanmateix notablement inferiors als obtinguts en la producció tant de la BS-RNasa com de l´RNasa A.

La variant híbrida (PM5) esmentada va permetre l'obtenció de la proteïna pura i homogènia, que presentà unes característiques cinètiques similars a les presentades per l´RNasa A (Canals *i col.* 1999; Ribo*, et al.* 2001). De totes formes, la termoestabiltat de PM5

va ser superior a la proteïna salvatge (Benito*, et al.* 2002). La major estabilitat per part de la variant híbrida respecte a la forma salvatge és deguda a l'eliminació de dos residus bàsics de l´extrem N-terminal (R4A i K6A), la qual cosa afavoreix un increment de l´el·lipticitat d´aquest extrem de la proteïna (Benito *i col.* 2002).

6.3 Activitat biològica de la HP-RNase i estudis per dotar-la d'activitats biològiques especials.

Tal com ja s´ha esmentat les ribonucleases presenten funcions biològiques especials (RIBASES) (veure apartat 3). Aquestes ribonucleases presenten un ampli rang d'accions biològiques, a més del simple paper digestiu i de la seva participació en el manteniment del contingut cel·lular d´RNA. Per aquesta raó, aquestes activitats de les ribonucleases de tipus secretori els donen un gran potencial com a agents terapèutics i justifiquen un estudi rigorós de la relació entre la seva estructura i la seva funció. D'entre totes les ribonucleases de tipus secretori, l'HP-RNasa presenta un interès especial a causa del seu origen humà, que ha promogut el desenvolupament d'estudis dirigits a l'obtenció de mutants capaços d'assolir propietats citotòxiques. Aquests mutants probablement presentarien l'avantatge respecte a d'altres proteïnes citotòxiques, de ser més tolerats pel sistema immunològic humà (Leland *i col.* 1998; Suzuki*, et al.* 1999).

En aquest sentit els estudis que hi ha fins avui per dotar a l´HP-RNasa d'activitat biològica especial s´ha centrat en l'obtenció de variants amb propietats citotòxiques sobre cèl·lules eucariotes. A diferència de l´onconsa, que és ràpidament capturada per algun component, encara no identificat, de la membrana cel.lular (Wu*, et al.* 1993; Bosch*, et al.* 2004; Rodriguez*, et al.* 2007), i translocada al citosol a partir dels endosomes de reciclatge (Rodriguez *i col.* 2007) l´HP-RNase entra a la cèl·lula més lentament i és dirigida a la ruta degradativa lisosomal (Haigis i Raines 2003; Bosch *i col.* 2004). Es creu que si arribés suficient HP-RNase al citosol cel·lular aquest enzim pot saturar l´inhibidor proteic de ribonucleases i així exercir la seva acció citotòxica. Recentment, unes investigacions (Leich*, et al.* 2007) sobre la internalització citoplasmàtica de la variant de RNases citotòxiques sensibles i no sensibles a l´RI ha indicat que la internalització endocítica és un factor limitant de la citotoxicitat. Aquestes limitacions s´ha superat conjugant químicament o fusionant genèticament les RNases a lligands d'unió cel·lular.

Així doncs, una de les estratègies que ha demostrat ser més eficient per facilitar la interacció de l'enzim amb la membrana plasmàtica i facilitar la seva internalització ha estat el disseny de proteïnes de fusió entre HP-RNase i anticossos dirigits específicament contra

cèl·lules tumorals (Youle*, et al.* 1993; Zewe*, et al.* 1997; Rybak i Newton 1999). D'aquesta manera s'aconsegueix incrementar la potencia tòxica de la ribonucleasa, tot evitant la seva acció sobre els teixits sans. Aquest sistema ofereix l'avantatge de potencial superior els problemes de toxicitat i d´immunogeneicitat associada a les toxines d'origen no humà com la RNase A (Ghetie i Vitetta 1994a; Ghetie i Vitetta 1994b).

Un sistema alternatiu per dotar la capacitat citotòxica a la HP-RNase s´ha basat en l'obtenció de variants que presentin una baixa afinitat per l´inhibidor de Ribonucleases (RI). Així s´han dissenyat variants que mimetitzen les característiques estructurals que semblen determinar la resistència de l´hRI de les RNases tòxiques BS-RNasa i onconasa. S´han dissenyat variants de l´HP-RNase per mutagènesis dirigida amb la finalitat de dimeritzar la proteïna i aconseguir un dímer potencialment similar al de la BS-RNase (Di Donato*, et al.* 1994; Piccoli*, et al.* 1999; Di Gaetano*, et al.* 2001) o s´hi han introduït canvis en residus directament relacionats amb la unió a l´inhibidor (Leland *i col.* 1998; Leland*, et al.* 2001). Aquestes variants evadeixen l´RI i presenten capacitat citotòxica per cèl·lules tumorals. Segons el que s´ha exposat semblaria que una forma de dotar l´HP-RNase amb una activitat biològica especial dependria de la capacitat de defugir de l'acció de l´hRI. Tot i això, estudis recents han demostrat que la interacció observada amb l´RI "*in vitro*" no necessariament s´ha de correspondre amb una interacció *in vivo*. La presencia d'altres molècules permetrien modular la capacitat d'interacció de les RNases amb l´RI (Murthy i Sirdeshmukh 1992; Murthy*, et al.* 1996; Leland *i col.* 2001; Bosch *i col.* 2004). Així, en el grup de recerca on s´ha portat a terme aquesta tesi, s´ha obtingut una variant citotòxica de HP-RNase sensible a l´RI, anomenada PE5 (Bosch *i col.* 2004), la qual presenta un grau de citotoxicitat equivalent a la d'altres variants no inhibides pel RI (Leland *i col.* 2001). Aquesta variant incorpora els canvis G89R i S90R, els quals la doten d´una senyal de localització nuclear (NLS) que la dirigeix al nucli, on no s´ha detectat la presència de RI (Roth i Juster 1972), de manera que pot desenvolupar la seva activitat RNasa. La zona d'interacció entre PE5 i la importina, membre de la maquinària de transport nuclear, comprèn residus implicats en la unió al RI, de manera que en el citosol s'estableix una competència entre la importina i el RI per unir-se a PE5. El fet que aquesta variant presenti un lleuger escapament l´inhibidor permet que petites quantitats d'aquesta RNasa restin capturables per l´importina. La translocació de la RNasa al nucli produeix una disminució de la forma lliure disponible, cosa que afavoreix la dissociació del complex amb el RI i una acumulació progressiva al nucli, principalment al nuclèol (Bosch *i col.* 2004).

7. Objectius

Tal com s'ha descrit en la introducció, hi ha una sèrie de membres de la família de les ribonucleases pancreàtiques que presenten activitats biològiques particulars. Aquestes activitats els fan candidats a ésser utilitzats com agents terapèutics pel tractament de diferents tipus de malalties, de les quals el càncer n'és una de les més destacades. De tots els membres d'aquesta família s'ha ressaltat la importància de l'onconasa com a droga antitumoral que es troba actualment en fase II/III pel tractament de diferents tipus de càncer amb resultats prometedors. Malgrat aquest fet, el mecanisme pel qual aquest enzim exerceix les seves propietats citotòxiques és encara relativament poc conegut. Per aquest motiu, un dels objectius del grup de recerca on s'ha dut a terme aquest treball està centrat en l'estudi de les bases moleculars de la citotoxicitat de les ribonucleases pancreàtiques. Aquests coneixements tenen com a finalitat, no tan sols contribuir a comprendre con aquests enzims exerceixen la seva citotoxicitat, sinó que són la base pel disseny de variants de diferents ribonucleases que potencialment puguin presentar citotoxicitat ja sigui sobre cèl·lules eucariotes o procariotes.

Atès el que s'ha exposat, **l'objectiu general** d'aquest treball ha estat contribuir al coneixement de les bases moleculars de la citotoxicitat de l'onconasa i també el disseny de variants d'aquest enzim i de la ribonucleasa pancreàtica humana que presentin activitat antimicrobiana.

Per això els objectius concrets que es van marcar van ser el següents:

1.- Obtenció d'una onconasa recombinant que presentés la mateixa activitat biològica que la forma natural. Estudi del procés d'activació d'aquest enzim per MALDI-TOF.

2.- Estudi de la contribució del pont disulfur 30-75 de l'onconasa en les seves propietats bioquímiques i biològiques.

3.- Construcció, producció i caracterització de variants de l'onconasa i de la HP-RNasa amb activitat antimicrobiana.

Resultats i discussió

Quantitative analysis, using MALDI-TOF mass spectrometry, of the N-terminal hydrolysis and cyclization reactions of the activation process of onconase

Onconase, a member of the ribonuclease superfamily, is a potent cytotoxic agent that is undergoing phase II/III human clinical trials as an antitumor drug. Native onconase from Rana pipiens and its amphibian homologs have an N-terminal pyroglutamyl residue that is essential for obtaining fully active enzymes with their full potential as cytotoxins. When expressed cytosolically in bacteria, Onconase is isolated with an additional methionyl (Met1) residue and glutaminyl instead of a pyroglutamyl residue at position 1 of the N-terminus and is consequently inactivated. The two reactions necessary for generating the pyroglutamyl residue have been monitored by MALDI-TOF MS. Results show that hydrolysis of Met(−1), catalyzed by *Aeromonas* aminopeptidase, is optimal at a concentration of ≥ 3 M guanidinium-chloride, and at pH 8.0. The intramolecular cyclization of glutaminyl that renders the pyroglutamyl residue is not accelerated by increasing the concentration of denaturing agent or by strong acid or basic conditions. However, temperature clearly accelerates the formation of pyroglutamyl. Taken together, these results have allowed the characterization and optimization of the onconase activation process. This procedure may have more general applicability in optimizing the removal of undesirable N-terminal methionyl residues from recombinant proteins overexpressed in bacteria and providing them with biological and catalytic properties identical to those of the natural enzyme.

Keywords: onconase; cytotoxicity; recombinant protein activation; MALDI-TOF mass spectrometry.

N- or C-terminal modifications constitute post-translational modifications that can modulate a peptide activity and/or resistance to degradation, as is the case with acetylation, pyroglutamyl formation or C-terminal amidation. Many proteins and bioactive peptides exhibit an N-terminal pyroglutamyl, which subsequently minimizes their susceptibility to degradation by aminopeptidases, although it may also play a crucial role at the functional level [1]. This residue is also a frequent determinant of overall peptide function, as has been shown by the hypothalamic releasing factor binding to its receptor [2], or by the amyloid b-peptide and the implications in senile plaque formation and pathogenesis in Alzheimer's disease [3].

Onconase (ONC) is a ribonuclease that is present in the oocytes and early embryos of the frog, *Rana pipiens* [4]. ONC, discovered as a result of its potent anticancer activity [5], is now in Phase III human clinical trials for the treatment of several types of cancer [6]. The enzyme, isolated from frog oocytes, has an N-terminal pyroglutamyl residue that contributes to the structure of its active site [7] and also to its stability [8]. This N-terminal pyroglutamyl residue produced *in vivo* by the cyclization of the N-terminal lglutamyl residue. Pyroglutamyl N-termini have been found in other frog ribonucleases that also display interesting cytotoxic and antitumoral properties [9]. It has been reported that non-natural N-terminal residues correlate with a decrease in the catalytic activity and cytotoxicity of these enzymes [10]. The interest in ONC as a therapeutic agent has led to the expression of ONC recombinants, created using site-specific mutagenesis, in order to study the molecular determinants of its biological action.

The production of unfused proteins from recombinant vectors generates a cytosolic protein with an additional methionyl residue at the N-terminus. When ONC is produced with an N-terminal methionyl residue, Met1, it retains only 2% of the ribonucleolytic activity of the native enzyme and is an ineffective cytotoxin, despite being folded properly [11].

However, cytosolic expression of the ONC in *Escherichia coli* is interesting because it produces higher yields than the alternative, secretory approach [12]. Initially, an ONC

Abbreviations: AAP, aminopeptidase of Aeromonas proteolytica; CNBr, cyanogen bromide; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; (Gln1)-ONC (M23L), onconase variant with a Gln1 and leucine replacing methionine at position 23; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; IC_{50}, 50% inhibitory concentration; IPTG, isopropyl thio-b-D-galactoside; (Met1)-ONC (M23L), onconase variant with a methionine preceding Gln1; ONC, Onconase; (Pyr)-ONC (M23L), onconase variant with a pyroglutamyl residue at position 1 and leucine replacing methionine at position 23; rONC, wild-type recombinant onconase.

Contribution of the C30/C75 disulfide bond to the biological properties of onconase

Abstract

Onconase, a member of the pancreatic type ribonuclease family, is currently used as a chemotherapeutic agent for the treatment of different types of cancer. It is widely accepted that one of the properties that renders this enzyme cytotoxic is its ability to evade the cytosolic ribonuclease inhibitor (RI). In the present work, we produced and characterized an onconase variant that lacks the disulfide bond C30/C75. This variant mimics the stable unfolding intermediate des(30–75) produced in the reductive unfolding pathway of onconase. We found that the reduction of the C30/C75 disulfide bond does not significantly alter the cytotoxic properties of onconase, although the variant possesses a notably reduced conformational stability. Interestingly, both its catalytic activity and its ability to evade RI are comparable to wild-type onconase under mild reductive conditions in which the three disulfide containing intermediate des(30–75) is present. These results suggest that the C30/C75 disulfide bond could easily be reduced under physiological redox conditions.

Keywords: catalytic activity; cytotoxicity; ribonuclease inhibitor evasion; site-directed mutagenesis; stability.

Introduction

Ongoing research in our laboratory is focused on identifying the molecular basis of the cytotoxic properties of pancreatic-type ribonucleases. Among the members of this family, onconase (ONC), a ribonuclease from oocytes of *Rana pipiens*, is of outstanding interest because it is now undergoing phase II/III clinical trials as an antitumor drug (Costanzi et al., 2005).

ONC (104 residues) is one of the smallest members of the ribonuclease family sharing 30% sequence identity with ribonuclease A (RNase A), the defining member of this family (Beintema et al., 1988; Ardelt et al., 1991). However, the three-dimensional structures of both enzymes show a very similar topology (Wlodawer and Sjolin, 1983; Mosimann et al., 1994). Both enzymes present four disulfide bonds, of which three of them are conserved: C19/C68, C30/C75, and C48/C90, which are the equivalent in ONC of C26/C84, C40/C95, and C58/C110 in RNase A. The disulfide analogous to the C65/C72 disulfide bond in RNase A is not conserved in ONC. The amphibian ribonuclease, in turn, presents a synapomorphic C87/C104 disulfide bond that tethers the C-terminal residue to a central β-strand.

In spite of their very similar three-dimensional structures, the two proteins exhibit remarkable differences in stability, catalytic activity, and cytotoxicity. Wild-type ONC has an unusually high denaturation temperature (T_m of 90°C) (Leland et al., 1998; Notomista et al., 2000), which positions this protein among the most thermostable mesophilic proteins found so far. It has been suggested that this high conformational stability, compared to that of RNase A (T_m of 58°C) (Font et al., 2006) is mainly due to (i) the presence of the above mentioned C87/C104 C-terminal disulfide bond (Leland et al., 2000; Notomista et al., 2001), (ii) the N-terminal pyroglutamic acid residue that establishes two hydrogen bonds with both the CO group of Val96 and the ´-amino group of Lys9 (Mosimann et al., 1994; Notomista et al., 2001), (iii) the overall compactness characterized by a strong hydrophobic core and shorter loops, and (iv) the absence of *cis*-Pro bonds (Arnold et al., 2006; Arnold and Ulbrich-Hofmann, 2006).

The ribonucleolytic activity of ONC with different substrates is 10^4–10^5-fold lower than that of RNase A. However, the low ribonucleolytic activity of ONC is essential for its cytotoxicity, even though RNase A is not cytotoxic (Wu et al., 1993; Leu et al., 2003). The low catalytic activity of ONC is compensated by other attributes apart from its extraordinary conformational stability, including its rapid internalization (for a review, see Benito et al., 2005) and its ability to evade the cytosolic ribonuclease inhibitor (RI) [$K_i \geq 10^6$ pM for ONC (Boix et al., 1996); K=0.067 pM for RNase A (Leland et al., 1998)]. This last aspect has been proposed as a requirement for any ribonuclease to be cytotoxic (Leland et al., 1998).

ONC and RNase A also behave dissimilarly in their unfolding kinetics (Arnold et al., 2006) and in their reductive unfolding pathways. ONC reductively unfolds through a single intermediate, des(30–75), a three-disulfide species lacking the disulfide bond 30–75, while RNase A reductively unfolds through parallel pathways with the formation of two native-like three-disulfide-containing intermediates, des(40–95) and des(65–72), before forming the fully reduced species. This dissimilarity between the unfolding pathways of the two homologous enzymes has been explained by the different degree of solvent exposure of the sulfur atoms forming the four individual disulfide bonds of RNase A and ONC (Narayan et al., 2004). The 30/75 disulfide bond of ONC is far more solvent exposed than any other disulfides from ONC or RNase A (Figure 1) (Narayan et al., 2004). For that reason, mild reduction conditions lead to the reduction of the 30/75 disulfide bond of ONC allowing for the formation

Bactericidal activity engineered on human pancreatic ribonuclease and onconase†

ABSTRACT

Ribonucleases belonging to the pancreatic-type family exhibit a variety of biological activities that make them potential candidates as chemotherapeutic agents. Among them it is remarkable the selective cytotoxicity against tumour cells, exhibited by onconase, and the bactericidal activity presented by the eosinophil cationic protein (ECP). In the last years, based on what is known about the cytotoxic mechanism of ribonucleases, a lot of work has been performed to switch non-naturally cytotoxic ribonucleases to potent toxins. Most of the efforts have been devoted to the production of ribonucleases endowed with selective cytotoxicity against tumour cells. In the present paper, however, we have used two non-bactericidal ribonucleases, onconase and the human pancreatic ribonuclease as scaffolds onto which engineer bactericidal activity. To this end, the main bactericidal determinant described for ECP (YRWR) has been introduced to these proteins either in an internal position or as an extension of the C-terminal end. The ribonucleolytic activity, thermostability, cytotoxicity against eukaryotic cells and the antibacterial activity against gram- positive and -negative strains have been determined for all the variants produced. The results show that we have endowed both ribonucleases with antibacterial activity exclusively against gram-negative bacteria. In addition, we show that this activity is, at least in part, dependent on the ribonucleolytic activity of the enzymes. Remarkably, we have developed a human pancreatic ribonuclease variant with *de novo* acquired selective antibacterial activity against gram-negative strains which is not cytotoxic to mammalian cells.

INTRODUCTION

Ribonucleases (RNases) can be cytotoxic and thus have noteworthy potential as chemotherapeutic agents. For example, Onconase (ONC) a member of the Ribonuclease A (RNase A) superfamily, presently is undergoing phase III human clinical trials for the treatment of malignant mesothelioma (*1*). A lot of work has been performed during the last years trying to understand the molecular bases underlying the cytotoxic activity of RNases and

Discussió general

Una de les línies de recerca del grup d'investigació, en el qual s'ha portat a terme aquest treball, se centra en l'estudi de les bases moleculars que es troben darrera dels mecanismes que confereixen capacitat citotòxica a determinades ribonucleases pancreàtiques. Entre els membres d'aquesta família d'enzims, l'onconasa presenta un interès particular pel fet que actualment es troba en fase II/III d'assaig clínics pel tractament de diferents tipus de càncer (Costanzi *i col.* 2005). Tot i aquest fet, i tal com ja s'ha esmentat en la introducció, és poc conegut el mecanisme molecular pel qual aquest enzim exerceix les seves propietats citotòxiques.

Un dels objectius d'aquesta tesi ha estat contribuir al coneixement del mecanisme molecular de la citotoxicitat de l'onconasa, tot estudiant la contribució del pont disulfur 30-75 d'aquest enzim a les seves propietats biològiques. Per assolir aquest objectiu va caldre disposar d'una onconasa recombinant que presentés les mateixes característiques que la proteïna d'origen natural, aïllada d'oòcits de *Rana pipiens*. Atès que és una proteïna que per ser plenament funcional cal que pateixi una modificació post-traduccional consistent en la ciclació del residu de Gln N-terminal a piroglutàmic (Leu*, et al.* 2003), i tal com s´exposa en el capítol 1 la primera part d'aquest treball es va dedicar a la caracterització i optimització del procés d'activació de l´onconasa recombinant, obtinguda a partir d'un sistema d'expressió citosòlica. La finalitat perseguida fou obtenir alts nivells de producció d'enzim amb l'extrem N-terminal natiu i, conseqüentment, amb les característiques catalítiques, estructurals i funcionals de la proteïna natural (Ardelt *et al.* 1991; Notomista *i col.* 2001). La caracterització de les dues reaccions que calen per a l'obtenció d'una onconasa plenament activa, la enzimàtica i la no enzimàtica (eliminació de la metionina situada a la posició -1 de l'extrem N-terminal i ciclació de Glu1 a Pyr, respectivament), van ser seguides mitjançant MALDI-TOF MS. El procés d'activació de l'onconasa recombinant es va basar en el mètode descrit per Notomista i col·laboradors (Notomista*, et al.* 1999). La principal innovació del procés que s'ha portat a terme en aquest treball recau en el fet que la digestió enzimàtica mitjançant l'aminopeptidasa d'*Aeromonas* (AAP) de la Met-1 de l'extrem N-terminal, es realitza a partir de la proteïna ja purificada, sense necessitat de reduir-la, evitant així la formació de productes de degradació i reduint el temps d'obtenció de la proteïna completament activa. Ara bé, l'estructura compacte de l'onconasa i el fet que l l'extrem N-terminal es replega cap al cos central de la proteïna (Mosimann, Ardelt i James 1994), suposà una dificultat per l'accés de l´AAP al seu seti d'acció. Per això es va seguir el procés d'eliminació de la Met-1 a diferents concentracions de clorur de guanidini. Es va observar que a una concentració de 3M l'onconasa començava a desplegar-se de tal manera que

l'extrem N-terminal es trobava accessible a l'acció de l´AAP afavorint la reacció d'hidròlisi d'aquest residu. També es va seguir la reacció de ciclació de la Gln a Pyr en funció de la temperatura i el pH. S'observà que l'augment de la temperatura clarament incrementava la velocitat de la reacció de ciclació. En canvi, condicions de pH extremes no afavorien el procés. A partir d'aquests resultats es van trobar unes condicions òptimes d'activació. Així, en presència de 3M de clorur de guanidini, pH 8.0 i a 37ºC s'aconseguia la hidròlisi completa de la Met-1 en 1-2 hores. La reacció de ciclació de la Gln1 a pyroglutàmic es completava incubant la proteïna 3 h a 70ºC.

Atès que la finalitat d'aquest treball consistia en l'obtenció de l´onconasa amb l´extrem N-terminal natiu per tal de recuperar les característiques citotòxiques, es va procedir a la seva caracterització. Els assajos de citotoxicitat duts a terme sobre varies línies cel·lular indicaren que la forma activada (Pyr1)ONC(M23L) retenia tot el seu potencial citotòxic.

Malgrat aquests bons resultats del procés d'activació de l'onconasa, estudis posteriors van permetre obtenir onconasa recombinant amb alt rendiment (25 mg/L cultiu) emprant un procés d'expressió periplasmàtica. Aquest fet va permetre simplificar el procés d'obtenció d'onconasa recombinant plenament activa i citotòxica atès que s'eliminava l'etapa d'hidròlisi de la Met-1. La proteïna recombinant i les seves variants, obtingudes pels treballs posteriors, s'aconseguiren amb un N-terminal natiu simplement dialitzant-les en front de tampó fosfat a pH 7.2 durant 48 hores. Cal esmentar que el procés d'activació de l'onconasa seguit per MALDI-TOF MS, presenta el valor afegit de ser un procés aplicable de manera general a l'activació de qualsevol proteïna recombinant que necessiti per a la seva conversió en la forma activa d'una eliminació de la Met N-terminal.

El segon capítol es centra en l'estudi de la contribució del pont disulfur 30-75 de l'onconasa a les seves propietats biològiques. Una anàlisis comparativa de l'accessibilitat al solvent dels diferents ponts disulfur de la RNasa A i l´onconasa va evidenciar que el pont disulfur (30-75) presentava una àrea accessible al solvent unes 7 vegades més gran que la dels altres ponts disulfur tant de la mateixa onconasa com de la RNasa A. Aquesta major accessibilitat al solvent del pont disulfur (30-75) de l´onconasa, permetria pensar que en condicions reductores aquest pont disulfur tindria un comportament diferenciat respecte als altres ponts disulfurs de la mateixa onconasa o de la RNasa A. Resultats presentats en aquest treball i corroborats de forma paral·lela per Scheraga i col·laboradors (Xu, *et al.* 2003; Narayan *i col.* 2004; Xu *i col.* 2004) han demostrat que en sotmetre l´onconasa a condicions de reducció suau, en primer lloc es redueix el pont disulfur 30-75 formant-se un intermediari estable amb només 3 ponts disulfur. Tenint en compte aquests resultats, es va

plantejar la hipòtesis què la major accessibilitat d'aquest pont disulfur podria comportar, que un cop l´onconasa fos internalitzada i arribés al citosol cel·lular, on les condicions són reductores, aquest pont disulfur 30-75 podria ser fàcilment reduït. Aquesta reducció podria provocar un canvi conformacional que dificultés el reconeixement de l'onconasa per part de l'inhibidor proteic de ribonucleases (RI), present en el citosol de totes les cèl·lules de mamífer, factor que podria contribuir a la citotoxicitat d'aquest enzim.

A partir d'aquest plantejament es va portat a terme la construcció d'una variant d´onconasa sense el pont disulfur (30-75), ONC(C30AC75A). Aquesta construcció emula l´intermediari estable generat en el procés de desplegament reductiu de l'onconasa (Xu *i col.* 2004). Així, es van poder analitzar els efectes que l'eliminació del pont disulfur té sobre l'activitat ribonucleasa, l'escapament a l'inhibidor (RI) i la termoestabilitat d'aquest enzim, factors descrits com a importants per dotar de capacitat citotòxica a determinades ribonucleases (Benito, Ribo i Vilanova 2005). És important remarcar que la variant ONC(C30AC75A) tot i perdre estabilitat respecte a la proteïna salvatge ($T_{½}$ de 71.7ºC vs 87.2ºC) es manté completament plegada a temperatura fisiològica de 37ºC a la qual es porten a terme els assajos de citotoxicitat. Cal mencionar que els treballs publicats per Scheraga i col·laboradors (Narayan *i col.* 2004), on s'ha determinat el valor de $T_{½}$ del intermediari de reducció Onc des (30-75), aquest presenta una $T_{½}$ és de 56.7ºC, valor que és 15ºC menor que el trobat en el present treball per a la variant Onc C30AC75A. La diferència entre aquests valors podria molt bé ser deguda al fet què en l´intermediari de reducció, Onc des (30-75), podrien donar-se interaccions de repulsió càrrega-càrrega entre els grups tiol de les cisteïnes reduïdes que afectarien l'estabilitat global i també a què la metodologia emprada pel càlcul de termoestabilitat és diferent. També és important remarcar que la pèrdua d'estabilitat és del mateix ordre que la que es dóna en eliminar el pont disulfur que implica la Cys C-terminal (residus 87 i 104) (Leland*, et al.* 2002).

L'eficiència catalítica de la variant ONC(C30AC75A) presentà una disminució d'un 60% respecte a la de l´onconasa salvatge. Aquesta disminució es pot explicar pel fet que la Lys 31, veïna de la Cys 30, que en el mecanisme de catàlisi estabilitza l'estat de transició (Mosimann, Ardelt i James 1994) podria veure alterada la seva orientació, degut a l'eliminació d'aquest pont disulfur.

Mesures qualitatives de la capacitat d'evasió de l'RI per part de l'onconasa salvatge i les seves variants sense el pont disulfur 30-75 (ONC C30AC75A, ONC C30A i ONC C75A) indicaren que no hi ha diferències significatives. En aquests mateixos assajos es va observar, al menys de manera qualitativa, que l'eliminació del pont disulfur 30-75 permetia

una degradació de RNA, per part de les variants, similar a la que s'obté per l'onconasa salvatge, tant en presència com en absència de RI.

Finalment, i de forma sorprenent, les mesures de citotoxicitat de la variant ONC(C30AC75A) sobre diferents línies cel·lulars eucariotes, tumorals i no tumorals, ens indicà que, depenent de la línia, aquesta citotoxicitat es veu poc o gens afectada pel fet de presentar només tres ponts disulfur. En altres paraules, malgrat la pèrdua d'estabilitat i, principalment, d'eficiència catalítica, l'eliminació del pont disulfur 30-75 no sembla afectar de forma significativa les propietats citotòxiques de l'enzim.

A diferència del que indiquen nombrosos estudis, en els que es descriu una correlació directe entre estabilitat i citotoxicitat (Leland i Raines 2001; Lee i Raines 2003; Kim*, et al.* 2004), i entre activitat catalítica i capacitat citotòxica per part de l'onconasa i altres ribonucleases pancreàtiques (Wu *i col.* 1993; Boix *i col.* 1996; Newton*, et al.* 1997; Ribo*, et al.* 2004), els nostres resultats ens indiquen que la pèrdua d'estabilitat i d'eficiència catalítica de l´onconasa per l'eliminació del pont disulfur 30-75 no es correlaciona amb una disminució de l'activitat citotòxica de l'enzim. Pel que respecta a l'estabilitat, recentment ha estat descrit que les activitats citostàtica i citotòxica de l'onconasa depenen molt més de la seva eficiència catalítica que de la seva estabilitat (Schulenburg*, et al.* 2007).

D'acord amb aquestes dades, el fet que la variant amb el pont disulfur obert, ONCC30AC75, i la forma salvatge presentin una capacitat citotòxica semblant ens podria indicar, d'una forma indirecte, que la nostra hipòtesi de partida podria ser factible. És a dir, que la reducció del pont disulfur 30-75 de l´onconasa salvatge, degut a l'ambient reductor del citosol, podria afectar la unió a l'RI compensant la pèrdua d'eficiència catalítica.

Ara bé, una mesura directa del fet que l'eliminació del pont disulfur 30-75 afecta la unió onconasa – RI, no és fàcil de dur a terme. La raó és senzilla, per a mantenir l'RI en la seva forma activa cal la presència en el medi d'agent reductor (es tracta d'una proteïna amb unes 30 Cys que s'han de mantenir reduïdes per a que l'RI sigui funcional (Hofsteenge*, et al.* 1991)). D'acord amb això, els assaigs descrits sobre escapament a l'RI, portats a terme en el present treball, així com la única determinació de constant d'inhibició d'onconasa per part de l'RI (Boix *et al.* 1996) s'han fet en un medi que conté DTT reduït. Les relacions molars DTT^{red} /ONC en els assaigs esmentats són suficients per a reduir el pont disulfur 30-75 de l'onconasa (Xu *i col.* 2003; Narayan *i col.* 2004). Per tant, el que realment s'està mesurant és la interacció entre l'intermediari des 30-75 de l'onconasa i l'RI.

Aquestes consideracions ens van portar a mesurar l'activitat de l'onconasa salvatge en presència d'agents reductors a concentracions que sabem permeten l'obertura del pont disulfur 30-75. Es va assajar tant l'efecte del DTT^{red} com del glutatió reduït, atès que aquest últim agent és un dels principals responsables del manteniment del poder reductor del citosol cel·lular. Per a mesurar l'activitat de l'onconasa així tractada es van emprar dues aproximacions, una qualitativa i una quantitativa. La primera consistia en mesurar la capacitat de degradació de RNA per part de l'onconasa, tractada amb agent reductor, seguida mitjançant gels d'agarosa, mentre que la segona mesurava l'activitat de l'enzim, també tractat amb agent reductor, per a degradar el substrat fluorescent FRED ArUAA (Kelemen*, et al.* 1999). Aquests assajos es van fer també amb la variant ONC(C30AC75A). Es va observar que l'activitat de l'onconasa tractada amb agent reductor esdevenia comparable a l'activitat de la variant ONC(C30AC75A).

En vista els resultats obtinguts és factible pensar que la nostra hipòtesi de partida pot ser correcta. El potencial redox del citosol cel·lular on l'onconasa exerceix la seva acció citotòxica es manté essencialment pel parell redox GSH / GSSG. La relació molar entre la forma reduïda i l'oxidada varia de 30:1 fins a 100:1, essent la concentració de la forma reduïda aproximadament 10mM (Akerboom*, et al.* 1992; Hwang*, et al.* 1992). Tot i que el poder reductor del parell GSH/GSSG és inferior al del parell DTT^{red}/DTT^{ox} (Rothwarf i Scheraga 1992), la concentració molar de GSH^{red} en el citosol és un ordre de magnitud més elevada que la del DTT^{red} emprada en els assajos realitzats. A més a més, la concentració d'onconasa en el citosol, després de la seva internalització, és d'esperar que sigui força baixa la qual cosa comportarà una relació molar GSH^{red}/onconasa alta. En conseqüència, el pont disulfur 30-75 pot ser fàcilment reduït en aquestes condicions. La reducció del pont disulfur deixa dos grups tiolat o bé disulfurs mixtes tiol – glutatió que poden afectar la unió onconasa – RI i, al seu torn, aquest fet pot contribuir a les propietats citotòxiques presentades per l'onconasa.

En el capítol 3 i última part d'aquesta tesi, tot i continuar essent recerca bàsica, té una vesant més aplicada. Així, l'objectiu d'aquest darrer capítol va consistir en dotar d'activitat bactericida a ribonucleases com l'onconasa i PM5 o HP-RNasa, les quals no presenten aquesta funció biològica, a diferència d'altres membres de la mateixa família com pot ser l'ECP que sí la presenten. Així mateix, el nostre objectiu fou aconseguir que algunes d'aquestes variants no fossin citotòxiques, fet que es podia preveure a partir del coneixement de les propietats citotòxiques de l'HP-RNasa i de les seves variants assajades en el nostre laboratori (Bosch *i col.* 2004).

A partir dels estudis realitzats pel grup de Carreras i col·laboradors (veure apartat 5.2 de la introducció) i a fi d'obtenir variants de PM5 i onconasa bactericides es va incorporat el determinant W35R36, el qual sembla ser el més crític per a l'activitat bactericida de l'ECP (Carreras *i col.* 2003). Aquest determinant en l'ECP pot ser una prolongació de la seqüència Y33R34, és a dir una combinació alternada de residus aromàtics i bàsics. Per aquest motiu en el disseny de les variants s'introduí la seqüència YRWR com a determinant bactericida i es van seguir dues estratègies. En primer lloc construir variants que incorporessin el determinant bactericida de l'ECP a la regió seqüencialment equivalent de l'HP-RNasa (PM5YRWR) i onconasa (ONCRWR) (Figura 1, C i D). En segon lloc, construir un grup de variants que presentessin el determinant bactericida com a extensió de l'extrem C-terminal amb i sense extensions que separessin el determinant del cos central de la proteïna: (PM5(YRWR)$_2$) (Figura 1A), (PM5(GS)YRWR), (PM5(GS)$_2$YRWR), (ONC(GS)YRWR) i (ONC(GS)$_2$YRWR) (Figura 1B) a fi d'afavorir la seva interacció amb la membrana cel·lular (veure Figura 1 del capítol 3).

Les variants esmentades es van caracteritzar realitzant mesures de termoestabilitat, eficiència catalítica i capacitat d'evasió de l'RI. Tant les variants que presentaven el determinant YRWR situat en la posició interna de la proteïna, com les que el presentaven a l'extrem C-terminal, presentaren una disminució de l'eficiència catalítica, molt més marcada en el cas de les variants d'onconasa. Tot i que en el disseny es va evitar la substitució de residus implicats en la catàlisis, la situació de la seqüència en una posició interna de la proteïna, probablement, influeix en l'orientació dels residus K41 i K31, respectivament, els quals es troben implicats en el procés de catàlisi (Cuchillo *i col.* 1993). Per altra banda, la introducció del determinant a l'extrem C-terminal pot generar interaccions electrostàtiques amb el substrat (RNA) dificultant la seva correcte disposició en el centre actiu de les ribonucleases. Així mateix, la introducció del determinant en el cas de les variants d'HP-RNasa en la posició interna (loop $\alpha1-\beta1$) afecta de manera més marcada la seva termoestabilitat que la seva introducció a l'extrem C-terminal. Aquesta mateixa caracterització no es dugué a terme per les variants d'onconasa atesa la elevada termoestabilitat d'aquest enzim (Klink i Raines 2000; Leland *i col.* 2000) que assegura que a temperatura fisiològica, malgrat que hi hagi una pèrdua de termoestabilitat, les variants es trobaran correctament plegades. Respecte a la capacitat d'evasió de l'acció de l'RI s'ha pogut observar que les variants de PM5 i de l'onconasa mantenen la mateixa sensibilitat a RI que les seves formes salvatges.

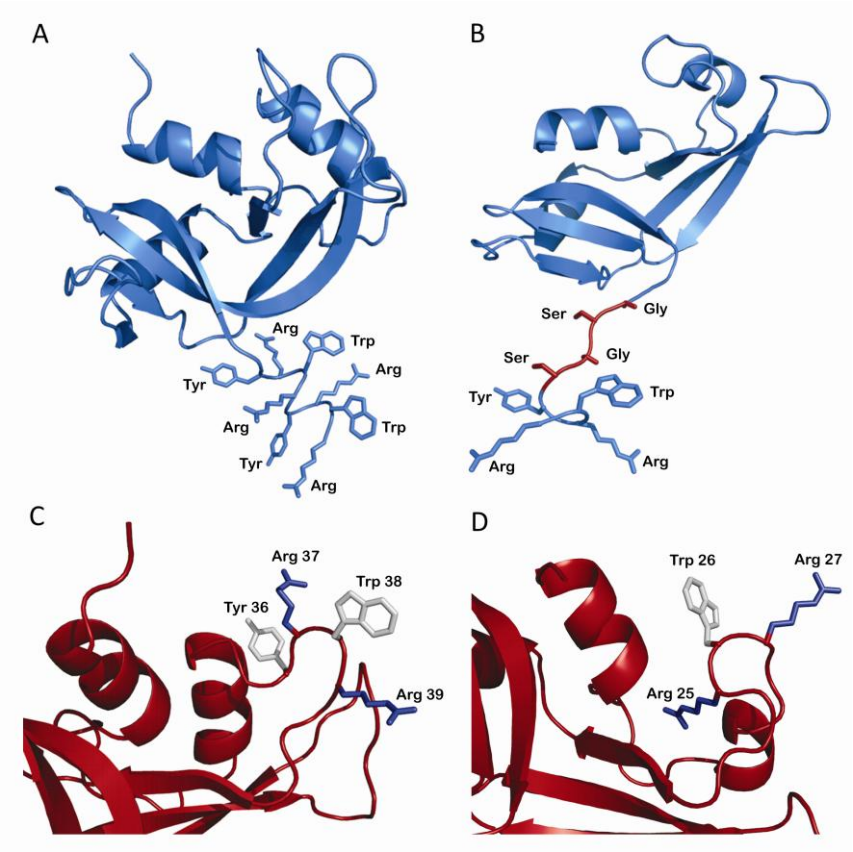

Figura 1. Representació esquemàtica de variants de PM5 i ONC utilitzades en aquest treball. (A) PM5(YRWR)$_2$, PM5 amb la seqüència YRWRYRWR a l´extrem C-terminal. **(B),** ONCGSGSYRWR. ONC amb la l´extenció C-terminal GSGSYRWR. **(C)**, PM5YRWR, subtitucions T36YQ37RG38WR39 al loop α1-β1 de PM5 de. **(D)**, ONCRWR, subtitucions T25RN26WL2R al loop α1- β1 de ONC. Representades emprant el programa Pymol (DeLanao 2002).

Els assajos bactericides permeten concloure que les variants de PM5 i ONC produïdes adquireixen activitat antimicrobiana gaire bé exclusivament per bacteris Gram-negatius. Tot i que l'ECP presenta activitat antimicrobina tant per bacteris gram-positus com negatius l'eliminació per mutagènesi dels residus W35R36 afecta més la supervivència dels bacteris gram-positius que dels negatius (Carreras *i col.* 2003). El nostres resultats confirmen la importància de la seqüència W35R36 de l'ECP en l'activitat bactericida sobre tot pels bacteris gram-positius. Aquest determinant bactericida facilitaria la unió de la proteïna a la superfície de la paret cel·lular a traves d'interaccions electrostàtiques seguit d'una penetració a la matriu lipídica de la membrana i d'una desestabilització i disrupció d'aquesta membrana. La selectivitat per eliminar bacteris gram-negatius exhibida per aquestes proteïnes molt probablement està relacionada amb les diferències estructurals entre les parets bacterianes de les soques gram-negatives i les gram-positives. En ambdós casos

l'activitat bactericida sembla que necessita de dos tipus d'interaccions. Per un costat unions electrostàtiques entre grups de la membrana carregats negativament i grups positius de la proteïna i per l'altre costat interaccions hidrofòbiques que promourien la disrupció d'aquesta membrana. Ara bé, les interaccions electrostàtiques en el cas dels bacteris gram-negatius i gram-positius poden ser clarament diferents degut a la diferent composició dels grups carregats negativament de la membrana/paret cel·lular (el lipolisacàrid majoritari de la membrana externa o bé els àcids teicoics de la paret cel·lular en el cas dels bacteris gram-positius i gram-negatius, respectivament (Ferguson*, et al.* 2000; Caroff i Karibian 2003; Dmitriev*, et al.* 2004; Fournier i Philpott 2005; Rosenfeld*, et al.* 2006). Així mateix, els bacteris gram-positius presenten una capa fina de peptidglicà que seria fàcilment travessada per les proteïnes bactericides, en canvi, les soques gram-positives presenten una capa de peptidglicà que representa més del 90% de la paret bacteriana, la qual pot suposar una important barrera mecànica a l'acció de les proteïnes bactericides i al seu pas a través del periplasma (Dijkstra i Keck 1996).

Així mateix, cal esmentar que els assajos fungicides han evidenciat que les variants amb activitat antibacteriana en front de bacteris gram-negatius no presenten toxicitat en front de *Candida albicans*. Aquesta selectivitat també estaria relacionada amb les característiques de la membrana plasmàtica dels fongs. Per una banda, la presència de residus de manosa a la paret cel·lular del fong augmentaria el nombre de càrregues positives de la membrana plasmàtica suposant una reducció de l'eficiència d'unió a membrana de les variant assajades, per una altra banda, la presència d'una capa interna de glucans i quitina suposaria una barrera que impediria l'acció citotòxica de les proteïnes (Klis*, et al.* 2001; Poulain i Jouault 2004; Netea*, et al.* 2006).

De totes les variants assajades, centrant-nos en l'activitat bactericida per bacteris gram-negatius, les que presenten major activitat antimicrobiana són les que contenen el determinant a l'extrem C-terminal, tant en el cas de les variants d'onconasa com d'HP-RNasa. Particularment, les més tòxiques són PM5$(YRWR)_2$, ONCGSYRWR i ONC $(GS)_2$YRWR.. És important remarcar que emprant com a control el pèptid YRWRYRWR, aquest per si sol no va presentar activitat bactericida.

La capacitat bactericida de les dues variants d´onconasa que presenten major activitat antimicrobiana és molt similar. Aquest resultat suggereix que la distància de l'espaiador, GS i GSGS, introduït entre l'extrem C-terminal i el determinant bactericida no influeix en l'activitat bactericida. Per altra banda, la impossibilitat de poder obtenir la variant ONC sense la seqüència espaiadora a l'extrem C-terminal, ONC$(YRWR)_2$ faria pensar que la

presència d'aquesta seqüència donaria lloc a una llibertat conformacional a l´onconasa que en facilitaria el procés de plegament.

Pel que respecta a la variant PM5(YRWR)$_2$ hi poden haver diferents factors que expliquin el fet de la seva major capacitat antibacteriana. Malgrat que és la variant que presenta menor activitat ribonucleasa, no està sensiblement desestabilitzada i és la variant que presenta la basicitat més alta. Això pot contribuir a una major interacció amb la paret o membrana cel·lular que incrementi l'activitat antibacteriana. Per altra banda, la major llargada d'aquesta seqüència podria donar lloc a que pogués adoptar una conformació secundaria en helix-α de naturalesa amfipàtica. Un gran nombre de pèptids antimicrobians tendeixen a adoptar una estructura secundaria amfipàtica la qual els permet acomodar-se dins de la membrana, permeabilitzar-la i trencar la bicapa lipídica (Oren i Shai 1998; Shai 1999; Hancock i Shai 2006).

Un aspecte important en el disseny de proteïnes bactericides és la seva innocuïtat per cèl·lules eucariotes. Per això es va mesurar la capacitat citotòxica de les diferents variants construïdes en aquest treball per cèl·lules HeLa. S'observà que cap de les variants d'HP-RNasa presentava citotoxicitat i que les variants d'onconasa amb activitat antimicrobiana més marcada presentaven una disminució de la citotoxicitat per HeLa de 4 a 7 vegades. Molt probablement la pèrdua de citotoxicitat per cèl·lules eucariotes de les variants d'onconasa estigui relacionada amb la significativa baixada d'eficiència catalítica.

Aquest darrer punt ens porta a considerar un aspecte molt important de l'activitat antimicrobiana de les variants construïdes i assajades en aquest treball. En el cas de l'ECP, el grup de Nogués i col. (Carreras *i col.* 2005) han demostrat que el determinant bactericida també està implicat en la citotoxicitat en front de cèl·lules eucariotes. En el nostre cas els resultats obtinguts ens suggereixen que aquest fet no és així. Per últim, s'ha descrit que l'activitat ribonucleolítica de l'ECP és important per la seva activitat citotòxica per a cèl·lules tumorals però no per a la seva activitat antibacteriana Per comprovar si l'activitat ribonucleasa era importat per a l'activitat bactericida de les variants assajades en aquest treball, es construí una nova variant, ONC(H10AH97A)GSYRWR, en la qual els dos residus essencials per a l'activitat ribonucleasa s'han substituït per residus que no poden dur a terme la catàlisi àcid-base de l'enzim. Amb aquesta variant es mesurà l'activitat bactericida i s'observà que disminuïa unes 3 vegades. Aquest resultat suggerí que l'activitat ribonucleasa té un paper significatiu en la toxicitat d'aquestes variants de ribonucleases sobre bactèries gram-negatius. Igualment, i tal com s'esperava, la substitució d'aquests residus del centre

actiu va suposar la inhibició de l'activitat citotòxica de la variant d´onconasa sobre cèl·lules eucariotes HeLa.

Per a finalitzar, destacar que s'ha aconseguit una variant de la ribonucleasa pancreàtica humana (PM5(YRWR)$_2$) amb una activitat bactericida significativa per a soques gram-positives i que, en canvi, no presenta activitat citotòxica en front de cèl·lules eucariotes. Fins a on arriba el nostre coneixement, aquest és el primer cas en què s'aconsegueix dotar d'activitat antimicrobiana a ribonucleases pancreàtiques mitjançant enginyeria de proteïnes.

Conclusions finals

1. El seguiment del procés d'activació de l'onconasa, produïda mitjançant un sistema d'expressió citosòlica, per MALDI-TOF MS ha permès obtenir unes condicions òptimes d'activació d'aquest enzim. Aquestes condicions són: 3 M de clorur de guanidini, pH 8.0 a 37ºC durant 1-2 hores per la hidròlisis de la Met-1, i 3 hores d'incubació a 70ºC per la ciclació de la Gln1 a pyroglutàmic La proteïna obtinguda és catalíticament activa i presenta propietats citotòxiques idèntiques a les de la forma recombinant. Aquest procés és extrapolable a l'activació de qualsevol proteïna produïda citosólicament.

2. L'obtenció de l'onconasa per un sistema d'expressió heteròloga que dirigeix la proteïna al periplasma ha permès simplificar l'obtenció de l'enzim plenament actiu i citotóxic pel fet que la proteïna expressada no presenta una metionina a l'extrem N-terminal. L'obtenció de la proteïna amb l'extrem N-terminal natiu s'aconsegueix dialitzant-la en front de tampó fosfat pH 7.2 durant 48 hores.

3. En condicions de reducció suau, el pont disulfur 30-75, el qual presenta una gran accessibilitat al solvent, és el primer pont disulfur a reduir-se donant lloc a un intermediari estable de reducció de només 3 ponts disulfur, ONC des (30-75).

4. La caracterització de la variant ONC(C30AC75A), obtinguda per emular l´intermediari estable sense el pont disulfur (30-75), ens indica que:
   Presenta una termoestabilitat significativament reduïda respecte a la proteïna salvatge (71,7ºc vs 87,2ºc), equivalent a l'eliminació del pont disulfur 87-104.
   La seva eficiència catalítica disminueix un 60% respecte al valor presentat per la proteïna salvatge.
   L'eliminació del pont disulfur 30-75 no afecta de manera significativa la interacció amb el RI.

5. Els assajos de citotoxicitat indiquen que l'eliminació del pont disulfur C30-C75 de l'onconasa no provoca un increment significatiu dels valors d´IC_{50} obtinguts en treballar amb diferents línees cel·lulars humanes tumorals i no tumorals. Per tant, malgrat la disminució d'estabilitat i d'eficiència catalítica l'enzim no perd les seves propietats citotòxiques. És a dir, no es pot establir una correlació directa entre pèrdua d'estabilitat i activitat citotòxica ni entre pèrdua d'activitat catalítica i activitat citotòxica.

6. La mesura de l'eficiència catalítica de l'onconasa salvatge en presència d'agents reductors esdevé comparable a l'activitat de la variant ONC (C30AC75A).

7. Els resultats obtinguts permeten hipotetitzar que el potencial redox del citosol cel·lular podria reduir el pont disulfur 30-75 de l´onconasa salvatge deixant els grups tiol lliures poden afectar la unió onconasa-RI. Aquest fet pot contribuir a les propietats citotòxiques presentades per l´onconasa.

8. S'han construït i produït variants d´onconasa i PM5 o HP-RNasa que incorporen el principal determinant bactericida, descrit per l'ECP (YRWR), tan en una regió interna com a l´extrem C-terminal, amb i sense extensions. Aquestes variants presenten una activitat antimicrobiana selectiva per soques gram-negatives. La diferent sensibilitat entre soques entre gram-negatives i gram-positives podria estar relacionada amb les diferències estructurals de les parets bacterianes.

9. Les construccions d´onconasa i PM5 amb més activitat bactericida per bacteris gram-negatius són les que presenten el determinant a l'extrem C-terminal. Les construccions amb més activitat antibacteriana són ONCGSYRWR i, ONC$(GS)_2$YRWR) i PM5$(YRWR)_2$.

10. Les variants d´onconasa i PM5 amb el determinant bactericida incorporat tenen una eficiència catalítica inferior a la de les proteïnes parentals però no es veu afectada la seva capacitat d'evasió a RI. Així mateix, s'ha observat una disminució de termoestabilitat en el cas de les variants de PM5 però que permet que les proteïnes estiguin correctament plegades a 37ºC.

11. Les variants més bactericides en front de bacteris gran-negatius no presenten activitat antifúngica. Aquesta selectivitat probablement també estaria relacionada amb les característiques de la membrana plasmàtica dels fongs.

12. Les construccions de PM5 amb activitat bactericida no presenten capacitat citotòxica en front de cèl·lules eucariotes. Per altra banda, les construccions d´onconasa presenten una disminució de la citotoxicitat de 4 a 7 vegades per cèl·lules HeLa.

13. La construcció de la variant ONC(H10AH97A)GSYRWR, en el qual els dos residus essencials per l'activitat ribonucleasa han estat substituïts, ha permès comprovar la implicació de l'activitat ribonucleasa en l'activitat bactericida.

14. S'ha aconseguit una variant de la ribonucleasa pancreàtica humana amb una activitat bactericida inferior a la descrita per l'ECP que no presenta citototoxicitat per cèl·lules de mamífer.

Bibliografia

Adinolfi, B. S., V. Cafaro, G. D'Alessio and A. Di Donato (1995). "Full antitumor action of recombinant seminal ribonuclease depends on the removal of its N-terminal methionine." Biochem Biophys Res Commun **213**(2): 525-32.

Akerboom, T. P., G. Bartosz and H. Sies (1992). "Low- and high-Km transport of dinitrophenyl glutathione in inside out vesicles from human erythrocytes." Biochim Biophys Acta **1103**(1): 115-9.

Anfinsen, C. B., M. Flavin and J. Farnsworth (1952). "Preliminary studies on ribonuclease structure." Biochim Biophys Acta **9**(4): 468-9.

Anfinsen, C. B., E. Haber, M. Sela and F. H. White, Jr. (1961). "The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain." Proc Natl Acad Sci U S A **47**: 1309-14.

Ardelt, B., W. Ardelt, P. Pozarowski, J. Kunicki, K. Shogen and Z. Darzynkiewicz (2007). "Cytostatic and cytotoxic properties of Amphinase: a novel cytotoxic ribonuclease from Rana pipiens oocytes." Cell Cycle **6**(24): 3097-102.

Ardelt, W. and M. Laskowski, Jr. (1991). "Effect of single amino acid replacements on the thermodynamics of the reactive site peptide bond hydrolysis in ovomucoid third domain." J Mol Biol **220**(4): 1041-53.

Ardelt, W., S. M. Mikulski and K. Shogen (1991). "Amino acid sequence of an anti-tumor protein from Rana pipiens oocytes and early embryos. Homology to pancreatic ribonucleases." J Biol Chem **266**(1): 245-51.

Arus, C., L. Paolillo, R. Llorens, R. Napolitano and C. M. Cuchillo (1982). "Evidence on the existence of a purine ligand induced conformational change in the active site of bovine pancreatic ribonuclease A studied by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy." Biochemistry **21**(18): 4290-7.

Bal, H. P. and J. K. Batra (1997). "Human pancreatic ribonuclease--deletion of the carboxyl-terminal EDST extension enhances ribonuclease activity and thermostability." Eur J Biochem **245**(2): 465-9.

Barker, R. L., D. A. Loegering, R. M. Ten, K. J. Hamann, L. R. Pease and G. J. Gleich (1989). "Eosinophil cationic protein cDNA. Comparison with other toxic cationic proteins and ribonucleases." J Immunol **143**(3): 952-5.

Barnard, E. A. (1969). "Biological function of pancreatic ribonuclease." Nature **221**(5178): 340-4.

Bartholeyns, J., C. Peeters-Joris and P. Baudhuin (1975a). "Hepatic nucleases. Extrahepatic origin and association of neutral liver ribonuclease with lysosomes." Eur J Biochem **60**(2): 385-93.

Bartholeyns, J., C. Peeters-Joris, H. Reychler and P. Baudhuin (1975b). "Hepatic nucleases. 1. Methods for the specific determination and characterization in rat liver." Eur J Biochem **57**(1): 205-11.

Beintema, J. J. (1998). "Introduction: the ribonuclease A superfamily." Cell Mol Life Sci **54**(8): 763-5.

Beintema, J. J., A. Blank, G. L. Schieven, C. A. Dekker, S. Sorrentino and M. Libonati (1988a). "Differences in glycosylation pattern of human secretory ribonucleases." Biochem J **255**(2): 501-5.

Beintema, J. J., C. Schuller, M. Irie and A. Carsana (1988b). "Molecular evolution of the ribonuclease superfamily." Prog Biophys Mol Biol **51**(3): 165-92.

Beintema, J. J., P. Wietzes, J. L. Weickmann and D. G. Glitz (1984). "The amino acid sequence of human pancreatic ribonuclease." Anal Biochem **136**(1): 48-64.

Benito, A., M. Bosch, G. Torrent, M. Ribo and M. Vilanova (2002). "Stabilization of human pancreatic ribonuclease through mutation at its N-terminal edge." Protein Eng **15**(11): 887-93.

Benito, A., M. Ribo and M. Vilanova (2005). "On the track of antitumour ribonucleases." Mol Biosyst **1**(4): 294-302.

Benner, S. A. and R. K. Allemann (1989). "The return of pancreatic ribonucleases." Trends Biochem Sci **14**(10): 396-7.

Blackburn, P. I Moore, S. (1982) A "The enzymes" (Ed. Boyer, P. D.) **15**, 317-433.

Bhat, R., W. J. Wedemeyer and H. A. Scheraga (2003). "Proline isomerization in bovine pancreatic ribonuclease A. 2. Folding conditions." Biochemistry **42**(19): 5722-8.

Boix, E., E. Carreras, Z. Nikolovski, C. M. Cuchillo and M. V. Nogues (2001). "Identification and characterization of human eosinophil cationic protein by an epitope-specific antibody." J Leukoc Biol **69**(6): 1027-35.

Boix, E., D. D. Leonidas, Z. Nikolovski, M. V. Nogues, C. M. Cuchillo and K. R. Acharya (1999a). "Crystal structure of eosinophil cationic protein at 2.4 A resolution." Biochemistry **38**(51): 16794-801.

Boix, E., Z. Nikolovski, G. P. Moiseyev, H. F. Rosenberg, C. M. Cuchillo and M. V. Nogues (1999b). "Kinetic and product distribution analysis of human eosinophil cationic protein indicates a subsite arrangement that favors exonuclease-type activity." J Biol Chem **274**(22): 15605-14.

Boix, E., M. V. Nogues, C. H. Schein, S. A. Benner and C. M. Cuchillo (1994). "Reverse transphosphorylation by ribonuclease A needs an intact p2-binding site. Point mutations at Lys-7 and Arg-10 alter the catalytic properties of the enzyme." J Biol Chem **269**(4): 2529-34.

Boix, E., Y. Wu, V. M. Vasandani, S. K. Saxena, W. Ardelt, J. Ladner and R. J. Youle (1996). "Role of the N terminus in RNase A homologues: differences in catalytic activity, ribonuclease inhibitor interaction and cytotoxicity." J Mol Biol **257**(5): 992-1007.

Boque, L., M. Gracia Coll, M. Vilanova, C. M. Cuchillo and I. Fita (1994). "Structure of ribonuclease A derivative II at 2.1-A resolution." J Biol Chem **269**(31): 19707-12.

Bosch, M., A. Benito, M. Ribo, T. Puig, B. Beaumelle and M. Vilanova (2004). "A nuclear localization sequence endows human pancreatic ribonuclease with cytotoxic activity." Biochemistry **43**(8): 2167-77.

Bucci, C., P. Thomsen, P. Nicoziani, J. McCarthy and B. van Deurs (2000). "Rab7: a key to lysosome biogenesis." Mol Biol Cell **11**(2): 467-80.

Canals, A., M. Ribo, A. Benito, M. Bosch, E. Mombelli and M. Vilanova (1999). "Production of engineered human pancreatic ribonucleases, solving expression and purification problems, and enhancing thermostability." Protein Expr Purif **17**(1): 169-81.

Caroff, M. and D. Karibian (2003). "Structure of bacterial lipopolysaccharides." Carbohydr Res **338**(23): 2431-47.

Carreras, E., E. Boix, S. Navarro, H. F. Rosenberg, C. M. Cuchillo and M. V. Nogues (2005). "Surface-exposed amino acids of eosinophil cationic protein play a critical role in the inhibition of mammalian cell proliferation." Mol Cell Biochem **272**(1-2): 1-7.

Carreras, E., E. Boix, H. F. Rosenberg, C. M. Cuchillo and M. V. Nogues (2003). "Both aromatic and cationic residues contribute to the membrane-lytic and bactericidal activity of eosinophil cationic protein." Biochemistry **42**(22): 6636-44.

Costanzi, J., D. Sidransky, A. Navon and H. Goldsweig (2005). "Ribonucleases as a novel pro-apoptotic anticancer strategy: review of the preclinical and clinical data for ranpirnase." Cancer Invest **23**(7): 643-50.

Cuchillo, C., Vilanova, M. i Nogués, M.V. (1997) A "Ribonucleases: Structures and Functions". Academic Press, Nes York.

Cuchillo, C. M., M. Moussaoui, T. Barman, F. Travers and M. V. Nogues (2002). "The exo- or endonucleolytic preference of bovine pancreatic ribonuclease A depends on its subsites structure and on the substrate size." Protein Sci **11**(1): 117-28.

Cuchillo, C. M., X. Pares, A. Guasch, T. Barman, F. Travers and M. V. Nogues (1993). "The role of 2',3'-cyclic phosphodiesters in the bovine pancreatic ribonuclease A catalysed cleavage of RNA: intermediates or products?" FEBS Lett **333**(3): 207-10.

Chatani, E., N. Tanimizu, H. Ueno and R. Hayashi (2001). "Structural and functional changes in bovine pancreatic ribonuclease a by the replacement of Phe120 with other hydrophobic residues." J Biochem **129**(6): 917-22.

D'Alessio, G. i. R., J. F (1997). Ribonucleases, Structures and Functions. New York, Academic Press.

Darzynkiewicz, Z., S. P. Carter, S. M. Mikulski, W. J. Ardelt and K. Shogen (1988). "Cytostatic and cytotoxic effects of Pannon (P-30 Protein), a novel anticancer agent." Cell Tissue Kinet **21**(3): 169-82.

de Llorens, R., C. Arus, X. Pares and C. M. Cuchillo (1989). "Chemical and computer graphics studies on the topography of the ribonuclease A active site cleft. A model of the enzyme-pentanucleotide substrate complex." Protein Eng **2**(6): 417-29.

Deutscher, M. P. (1988). "The metabolic role of RNases." Trends Biochem Sci **13**(4): 136-9.

Deutscher, M. P. (1993). "Ribonuclease multiplicity, diversity, and complexity." J Biol Chem **268**(18): 13011-4.

Deutscher, M. P. and Z. Li (2001). "Exoribonucleases and their multiple roles in RNA metabolism." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **66**: 67-105.

Di Donato, A., V. Cafaro and G. D'Alessio (1994). "Ribonuclease A can be transformed into a dimeric ribonuclease with antitumor activity." J Biol Chem **269**(26): 17394-6.

Di Gaetano, S., G. D'Alessio and R. Piccoli (2001). "Second generation antitumour human RNase: significance of its structural and functional features for the mechanism of antitumour action." Biochem J **358**(Pt 1): 241-7.

Dijkstra, A. J. and W. Keck (1996). "Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport." J Bacteriol **178**(19): 5555-62.

Dmitriev, B. A., F. V. Toukach, O. Holst, E. T. Rietschel and S. Ehlers (2004). "Tertiary structure of Staphylococcus aureus cell wall murein." J Bacteriol **186**(21): 7141-8.

Domachowske, J. B., K. D. Dyer, A. G. Adams, T. L. Leto and H. F. Rosenberg (1998). "Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNase A-family ribonuclease with direct antiviral activity." Nucleic Acids Res **26**(14): 3358-63.

Doms, R. W., G. Russ and J. W. Yewdell (1989). "Brefeldin A redistributes resident and itinerant Golgi proteins to the endoplasmic reticulum." J Cell Biol **109**(1): 61-72.

Durack, D. T., S. M. Sumi and S. J. Klebanoff (1979). "Neurotoxicity of human eosinophils." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(3): 1443-7.

Eftink, M. I Biltonen, R. (1987a) A "hydrolytic enzymes". Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York and Oxford.

Fan, T. C., H. T. Chang, I. W. Chen, H. Y. Wang and M. D. Chang (2007). "A heparan sulfate-facilitated and raft-dependent macropinocytosis of eosinophil cationic protein." Traffic **8**(12): 1778-95.

Fankuchen, I. (1941). J. Gen. Physiol. **24**: 315-316.

Ferguson, A. D., W. Welte, E. Hofmann, B. Lindner, O. Holst, J. W. Coulton and K. Diederichs (2000). "A conserved structural motif for lipopolysaccharide recognition by procaryotic and eucaryotic proteins." Structure **8**(6): 585-92.

Fett, J. W., D. J. Strydom, R. R. Lobb, E. M. Alderman, J. L. Bethune, J. F. Riordan and B. L. Vallee (1985). "Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells." Biochemistry **24**(20): 5480-6.

Font, J., A. Benito, R. Lange, M. Ribo and M. Vilanova (2006a). "The contribution of the residues from the main hydrophobic core of ribonuclease A to its pressure-folding transition state." Protein Sci **15**(5): 1000-9.

Font, J., A. Benito, J. Torrent, R. Lange, M. Ribo and M. Vilanova (2006b). "Pressure- and temperature-induced unfolding studies: thermodynamics of core hydrophobicity and packing of ribonuclease A." Biol Chem **387**(3): 285-96.

Font, J., J. Torrent, M. Ribo, D. V. Laurents, C. Balny, M. Vilanova and R. Lange (2006c). "Pressure-jump-induced kinetics reveals a hydration dependent folding/unfolding mechanism of ribonuclease A." Biophys J **91**(6): 2264-74.

Fontecilla-Camps, J. C., R. de Llorens, M. H. le Du and C. M. Cuchillo (1994). "Crystal structure of ribonuclease A.d(ApTpApApG) complex. Direct evidence for extended substrate recognition." J Biol Chem **269**(34): 21526-31.

Fournier, B. and D. J. Philpott (2005). "Recognition of Staphylococcus aureus by the innate immune system." Clin Microbiol Rev **18**(3): 521-40.

Fredens, K., R. Dahl and P. Venge (1982). "The Gordon phenomenon induced by the eosinophil cationic protein and eosinophil protein X." J Allergy Clin Immunol **70**(5): 361-6.

Futami, J., M. Seno, M. Kosaka, H. Tada, S. Seno and H. Yamada (1995). "Recombinant human pancreatic ribonuclease produced in E. coli: importance of the amino-terminal sequence." Biochem Biophys Res Commun **216**(1): 406-13.

Gahl, R. F., M. Narayan, G. Xu and H. A. Scheraga (2008). "Dissimilarity in the oxidative folding of onconase and ribonuclease A, two structural homologues." Protein Eng Des Sel **21**(4): 223-31.

Ghetie, M. A. and E. S. Vitetta (1994a). "Recent developments in immunotoxin therapy." Curr Opin Immunol **6**(5): 707-14.

Ghetie, V. and E. Vitetta (1994b). "Immunotoxins in the therapy of cancer: from bench to clinic." Pharmacol Ther **63**(3): 209-34.

Gullberg, U., B. Widegren, U. Arnason, A. Egesten and I. Olsson (1986). "The cytotoxic eosinophil cationic protein (ECP) has ribonuclease activity." Biochem Biophys Res Commun **139**(3): 1239-42.

Haigis, M. C. and R. T. Raines (2003). "Secretory ribonucleases are internalized by a dynamin-independent endocytic pathway." J Cell Sci **116**(Pt 2): 313-24.

Hancock, R. E. and H. G. Sahl (2006). "Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies." Nat Biotechnol **24**(12): 1551-7.

Harder, J. and J. M. Schroder (2002). "RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin." J Biol Chem **277**(48): 46779-84.

Hofsteenge, J. (1997) Ribonuclease Inhibitor in " Ribonucleases: Structures and Functions". Academic Press., NovaYork.

Hofsteenge, J., C. Servis and S. R. Stone (1991). "Studies on the interaction of ribonuclease inhibitor with pancreatic ribonuclease involving differential labeling of cysteinyl residues." J Biol Chem **266**(35): 24198-204.

Hsu, C. H., Y. D. Liao, Y. R. Pan, L. W. Chen, S. H. Wu, Y. J. Leu and C. Chen (2003). "Solution structure of the cytotoxic RNase 4 from oocytes of bullfrog Rana catesbeiana." J Mol Biol **326**(4): 1189-201.

Hwang, C., A. J. Sinskey and H. F. Lodish (1992). "Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum." Science **257**(5076): 1496-502.

Irie, M., H. Watanabe, K. Ohgi, M. Tobe, G. Matsumura, Y. Arata, T. Hirose and S. Inayama (1984). "Some evidence suggesting the existence of P2 and B3 sites in the active site of bovine pancreatic ribonuclease A." J Biochem **95**(3): 751-9.

Jensen, D. E., von Hippel, P. H., (1976). "DNA "melting" proteins. I. Effects of bovin pancreatic ribonuclease binding on the conformation and stability of DNA". J Biol Chem **251**(22): 7198-214.

Johnson, R. J., L. D. Lavis and R. T. Raines (2007). "Intraspecies regulation of ribonucleolytic activity." Biochemistry **46**(45): 13131-40.

Kelemen, B. R., T. A. Klink, M. A. Behlke, S. R. Eubanks, P. A. Leland and R. T. Raines (1999). "Hypersensitive substrate for ribonucleases." Nucleic Acids Res **27**(18): 3696-701.

Kim, B. M., H. Kim, R. T. Raines and Y. Lee (2004). "Glycosylation of onconase increases its conformational stability and toxicity for cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **315**(4): 976-83.

Kim, J. S. and R. T. Raines (1993). "Bovine seminal ribonuclease produced from a synthetic gene." J Biol Chem **268**(23): 17392-6.

Kita, H., R. I. Abu-Ghazaleh, S. Sur and G. J. Gleich (1995). "Eosinophil major basic protein induces degranulation and IL-8 production by human eosinophils." J Immunol **154**(9): 4749-58.

Klink, T. A. and R. T. Raines (2000). "Conformational stability is a determinant of ribonuclease A cytotoxicity." J Biol Chem **275**(23): 17463-7.

Klis, F. M., P. de Groot and K. Hellingwerf (2001). "Molecular organization of the cell wall of Candida albicans." Med Mycol **39 Suppl 1**: 1-8.

Kurihara, M., M. Ogawa, T. Ohta, E. Kurokawa, T. Kitahara, G. Kosaki, T. Watanabe and H. Wada (1982). "Purification and immunological characterization of human pancreatic ribonuclease." Cancer Res **42**(11): 4836-41.

Lee, J. E. and R. T. Raines (2003). "Contribution of active-site residues to the function of onconase, a ribonuclease with antitumoral activity." Biochemistry **42**(39): 11443-50.

Leich, F., N. Stohr, A. Rietz, R. Ulbrich-Hofmann and U. Arnold (2007). "Endocytotic internalization as a crucial factor for the cytotoxicity of ribonucleases." J Biol Chem **282**(38): 27640-6.

Leland, P. A. and R. T. Raines (2001). "Cancer chemotherapy--ribonucleases to the rescue." Chem Biol **8**(5): 405-13.

Leland, P. A., L. W. Schultz, B. M. Kim and R. T. Raines (1998). "Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(18): 10407-12.

Leland, P. A., K. E. Staniszewski, B. Kim and R. T. Raines (2000). "A synapomorphic disulfide bond is critical for the conformational stability and cytotoxicity of an amphibian ribonuclease." FEBS Lett **477**(3): 203-7.

Leland, P. A., K. E. Staniszewski, B. M. Kim and R. T. Raines (2001). "Endowing human pancreatic ribonuclease with toxicity for cancer cells." J Biol Chem **276**(46): 43095-102.

Leland, P. A., K. E. Staniszewski, C. Park, B. R. Kelemen and R. T. Raines (2002). "The ribonucleolytic activity of angiogenin." Biochemistry **41**(4): 1343-50.

Leu, Y. J., S. S. Chern, S. C. Wang, Y. Y. Hsiao, I. Amiraslanov, Y. C. Liaw and Y. D. Liao (2003). "Residues involved in the catalysis, base specificity, and cytotoxicity of ribonuclease from Rana catesbeiana based upon mutagenesis and X-ray crystallography." J Biol Chem **278**(9): 7300-9.

Li, X. M., K. Y. Trinh and C. L. Hew (1991). "Expression and characterization of an active and thermally more stable recombinant antifreeze polypeptide from ocean pout, Macrozoarces americanus, in Escherichia coli: improved expression by the modification of the secondary structure of the mRNA." Protein Eng **4**(8): 995-1002.

Liao, Y. D., S. C. Wang, Y. J. Leu, C. F. Wang, S. T. Chang, Y. T. Hong, Y. R. Pan and C. Chen (2003). "The structural integrity exerted by N-terminal pyroglutamate is crucial for the cytotoxicity of frog ribonuclease from Rana pipiens." Nucleic Acids Res **31**(18): 5247-55.

Libonati, M. and S. Sorrentino (2001). "Degradation of double-stranded RNA by mammalian pancreatic-type ribonucleases." Methods Enzymol **341**: 234-48.

Mallorqui-Fernandez, G., J. Pous, R. Peracaula, J. Aymami, T. Maeda, H. Tada, H. Yamada, M. Seno, R. de Llorens, F. X. Gomis-Ruth and M. Coll (2000). "Three-dimensional crystal structure of human eosinophil cationic protein (RNase 3) at 1.75 A resolution." J Mol Biol **300**(5): 1297-307.

Markham, R. and J. D. Smith (1952a). "The structure of ribonucleic acid. III. The end groups, the general structure and the nature of the core." Biochem J **52**(4): 565-71.

Markham, R. and J. D. Smith (1952b). "The structure of ribonucleic acids. II. The smaller products of ribonuclease digestion." Biochem J **52**(4): 558-65.

Matousek, J. (2001). "Ribonucleases and their antitumor activity." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **129**(3): 175-91.

Mikulski, S. M., J. J. Costanzi, N. J. Vogelzang, S. McCachren, R. N. Taub, H. Chun, A. Mittelman, T. Panella, C. Puccio, R. Fine and K. Shogen (2002). "Phase II trial of a single weekly intravenous dose of ranpirnase in patients with unresectable malignant mesothelioma." J Clin Oncol **20**(1): 274-81.

Mikulski, S. M., A. Viera, Z. Darzynkiewicz and K. Shogen (1992). "Synergism between a novel amphibian oocyte ribonuclease and lovastatin in inducing cytostatic and cytotoxic effects in human lung and pancreatic carcinoma cell lines." Br J Cancer **66**(2): 304-10.

Mosimann, S. C., W. Ardelt and M. N. James (1994). "Refined 1.7 A X-ray crystallographic structure of P-30 protein, an amphibian ribonuclease with anti-tumor activity." J Mol Biol **236**(4): 1141-53.

Moussaoui, M., A. Guasch, E. Boix, C. Cuchillo and M. Nogues (1996). "The role of non-catalytic binding subsites in the endonuclease activity of bovine pancreatic ribonuclease A." J Biol Chem **271**(9): 4687-92.

Murthy, B. S., C. De Lorenzo, R. Piccoli, G. D'Alessio and R. Sirdeshmukh (1996). "Effects of protein RNase inhibitor and substrate on the quaternary structures of bovine seminal RNase." Biochemistry **35**(13): 3880-5.

Murthy, B. S. and R. Sirdeshmukh (1992). "Sensitivity of monomeric and dimeric forms of bovine seminal ribonuclease to human placental ribonuclease inhibitor." Biochem J **281 (Pt 2)**: 343-8.

Narayan, M., G. Xu, D. R. Ripoll, H. Zhai, K. Breuker, C. Wanjalla, H. J. Leung, A. Navon, E. Welker, F. W. McLafferty and H. A. Scheraga (2004). "Dissimilarity in the reductive unfolding pathways of two ribonuclease homologues." J Mol Biol **338**(4): 795-809.

Navarro, S., J. Aleu, M. Jimenez, E. Boix, C. M. Cuchillo and M. V. Nogues (2008). "The cytotoxicity of eosinophil cationic protein/ribonuclease 3 on eukaryotic cell lines takes place through its aggregation on the cell membrane." Cell Mol Life Sci **65**(2): 324-37.

Netea, M. G., N. A. Gow, C. A. Munro, S. Bates, C. Collins, G. Ferwerda, R. P. Hobson, G. Bertram, H. B. Hughes, T. Jansen, L. Jacobs, E. T. Buurman, K. Gijzen, D. L. Williams, R. Torensma, A. McKinnon, D. M. MacCallum, F. C. Odds, J. W. Van der Meer, A. J. Brown and B. J. Kullberg (2006). "Immune sensing of Candida albicans requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors." J Clin Invest **116**(6): 1642-50.

Newton, D. L., L. Boque, A. Wlodawer, C. Y. Huang and S. M. Rybak (1998). "Single amino acid substitutions at the N-terminus of a recombinant cytotoxic ribonuclease markedly influence biochemical and biological properties." Biochemistry **37**(15): 5173-83.

Newton, D. L. and S. M. Rybak (2001). "Preparation and preclinical characterization of RNase-based immunofusion proteins." Methods Mol Biol **160**: 387-406.

Newton, D. L., S. Walbridge, S. M. Mikulski, W. Ardelt, K. Shogen, S. J. Ackerman, S. M. Rybak and R. J. Youle (1994). "Toxicity of an antitumor ribonuclease to Purkinje neurons." J Neurosci **14**(2): 538-44.

Newton, D. L., Y. Xue, L. Boque, A. Wlodawer, H. F. Kung and S. M. Rybak (1997). "Expression and characterization of a cytotoxic human-frog chimeric ribonuclease: potential for cancer therapy." Protein Eng **10**(4): 463-70.

Nitta, K., K. Ozaki, M. Ishikawa, S. Furusawa, M. Hosono, H. Kawauchi, K. Sasaki, Y. Takayanagi, S. Tsuiki and S. Hakomori (1994). "Inhibition of cell proliferation by Rana catesbeiana and Rana japonica lectins belonging to the ribonuclease superfamily." Cancer Res **54**(4): 920-7.

Nogues, M. V., M. Moussaoui, E. Boix, M. Vilanova, M. Ribo and C. M. Cuchillo (1998). "The contribution of noncatalytic phosphate-binding subsites to the mechanism of bovine pancreatic ribonuclease A." Cell Mol Life Sci **54**(8): 766-74.

Nogues, M. V., M. Vilanova and C. M. Cuchillo (1995). "Bovine pancreatic ribonuclease A as a model of an enzyme with multiple substrate binding sites." Biochim Biophys Acta **1253**(1): 16-24.

Notomista, E., V. Cafaro, R. Fusiello, A. Bracale, G. D'Alessio and A. Di Donato (1999). "Effective expression and purification of recombinant onconase, an antitumor protein." FEBS Lett **463**(3): 211-5.

Notomista, E., F. Catanzano, G. Graziano, S. Di Gaetano, G. Barone and A. Di Donato (2001). "Contribution of chain termini to the conformational stability and biological activity of onconase." Biochemistry **40**(31): 9097-103.

Oren, Z. and Y. Shai (1998). "Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides." Biopolymers **47**(6): 451-63.

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

Pavlakis, N. and N. J. Vogelzang (2006). "Ranpirnase--an antitumour ribonuclease: its potential role in malignant mesothelioma." Expert Opin Biol Ther **6**(4): 391-9.

Pelham, H. R. (1991). "Recycling of proteins between the endoplasmic reticulum and Golgi complex." Curr Opin Cell Biol **3**(4): 585-91.

Piccoli, R., S. Di Gaetano, C. De Lorenzo, M. Grauso, C. Monaco, D. Spalletti-Cernia, P. Laccetti, J. Cinatl, J. Matousek and G. D'Alessio (1999). "A dimeric mutant of human pancreatic ribonuclease with selective cytotoxicity toward malignant cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 7768-73.

Poulain, D. and T. Jouault (2004). "Candida albicans cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk." Curr Opin Microbiol **7**(4): 342-9.

Raines, R. T. (1998). "Ribonuclease A." Chem Rev **98**(3): 1045-1066.

Reddi, K. K. (1975). "Nature and possible origin of human serum ribonuclease." Biochem Biophys Res Commun **67**(1): 110-8.

Ribo, M., J. J. Beintema, M. Osset, E. Fernandez, J. Bravo, R. De Llorens and C. M. Cuchillo (1994). "Heterogeneity in the glycosylation pattern of human pancreatic ribonuclease." Biol Chem Hoppe Seyler **375**(5): 357-63.

Ribo, M., A. Benito, A. Canals, M. V. Nogues, C. M. Cuchillo and M. Vilanova (2001). "Purification of engineered human pancreatic ribonuclease." Methods Enzymol **341**: 221-34.

Ribo, M., M. Bosch, G. Torrent, A. Benito, B. Beaumelle and M. Vilanova (2004). "Quantitative analysis, using MALDI-TOF mass spectrometry, of the N-terminal hydrolysis and cyclization reactions of the activation process of onconase." Eur J Biochem **271**(6): 1163-71.

Ribo, M., S. B. delCardayre, R. T. Raines, R. de Llorens and C. M. Cuchillo (1996). "Production of human pancreatic ribonuclease in Saccharomyces cerevisiae and Escherichia coli." Protein Expr Purif **7**(3): 253-61.

Ribo, M., J. Font, A. Benito, J. Torrent, R. Lange and M. Vilanova (2006). "Pressure as a tool to study protein-unfolding/refolding processes: the case of ribonuclease A." Biochim Biophys Acta **1764**(3): 461-9.

Richards, F. M. I Wychoff, E.A. (1971) A "The enxymes" (Ed. Boyer, P.D.). **4**, 647-806.

Rodriguez, M., M. Moussaoui, A. Benito, C. M. Cuchillo, M. V. Nogues and M. Vilanova (2008). "Human pancreatic ribonuclease presents higher endonucleolytic activity than ribonuclease A." Arch Biochem Biophys **471**(2): 191-7.

Rodriguez, M., G. Torrent, M. Bosch, F. Rayne, J. F. Dubremetz, M. Ribo, A. Benito, M. Vilanova and B. Beaumelle (2007). "Intracellular pathway of Onconase that enables its delivery to the cytosol." J Cell Sci **120**(Pt 8): 1405-11.

Rosenberg, H. F. (1995). "Recombinant human eosinophil cationic protein. Ribonuclease activity is not essential for cytotoxicity." J Biol Chem **270**(14): 7876-81.

Rosenberg, H. F. and K. D. Dyer (1996). "Molecular cloning and characterization of a novel human ribonuclease (RNase k6): increasing diversity in the enlarging ribonuclease gene family." Nucleic Acids Res **24**(18): 3507-13.

Rosenfeld, Y., N. Papo and Y. Shai (2006). "Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action." J Biol Chem **281**(3): 1636-43.

Roth, J. S. and H. Juster (1972). "On the absence of ribonuclease inhibitor in rat liver nuclei." Biochim Biophys Acta **287**(3): 474-6.

Rothwarf, D. M., Y. J. Li and H. A. Scheraga (1998). "Regeneration of bovine pancreatic ribonuclease A: identification of two nativelike three-disulfide intermediates involved in separate pathways." Biochemistry **37**(11): 3760-6.

Rothwarf, D. M. and H. A. Scheraga (1992). "Equilibrium and kinetic constants for the thiol-disulfide interchange reaction between glutathione and dithiothreitol." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(17): 7944-8.

Russo, N., M. de Nigris, A. Ciardiello, A. Di Donato and G. D'Alessio (1993). "Expression in mammalian cells, purification and characterization of recombinant human pancreatic ribonuclease." FEBS Lett **333**(3): 233-7.

Rybak, S. M. and D. L. Newton (1999). "Natural and engineered cytotoxic ribonucleases: therapeutic potential." Exp Cell Res **253**(2): 325-35.

Sakakibara, F., G. Takayanagi, H. Kawauchi, K. Watanabe and S. Hakomori (1976). "An anti-A-like lectin of Rana catesbiana eggs showing unusual reactivity." Biochim Biophys Acta **444**(2): 386-95.

Santoro, J., C. Gonzalez, M. Bruix, J. L. Neira, J. L. Nieto, J. Herranz and M. Rico (1993). "High-resolution three-dimensional structure of ribonuclease A in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy." J Mol Biol **229**(3): 722-34.

Saunders, M. A. Wishnia, i co. (1957) J. Am. Chem. Soc **79**: 3289-3290.

Sciaky, N., J. Presley, C. Smith, K. J. Zaal, N. Cole, J. E. Moreira, M. Terasaki, E. Siggia and J. Lippincott-Schwartz (1997). "Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells." J Cell Biol **139**(5): 1137-55.

Schein, C. H. (1997). "From housekeeper to microsurgeon: the diagnostic and therapeutic potential of ribonucleases." Nat Biotechnol **15**(6): 529-36.

Scheraga, H. A. and J. A. Rupley (1962). "Structure and function of ribonuclease." Adv Enzymol Relat Subj Biochem **24**: 161-261.

Schmid, F.X (1982) "Proline isomerization in unfolded ribonuclease A". Adv. Biophys 18: 21-41.

Schmid, F.X. i R.L. Baldwin (1978). "Acid catalysis of the formation of the slow-folding species of RNase A: evidence that the reaction is proline isomerization. "Proc Ntl Acad Sci USA 75(10): 4764-8.

Schulenburg, C., B. Ardelt, W. Ardelt, U. Arnold, K. Shogen, R. Ulbrich-Hofmann and Z. Darzynkiewicz (2007). "The interdependence between catalytic activity, conformational stability, and cytotoxicity of onconase." Cancer Biol Ther **6**(8): 1233-9.

Shai, Y. (1999). "Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides." Biochim Biophys Acta **1462**(1-2): 55-70.

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

Smyth, D. G., W. H. Stein and S. Moore (1963). "The sequence of amino acid residues in bovine pancreatic ribonuclease: revisions and confirmations." J Biol Chem **238**: 227-34.

Sorrentino, S. (1998). "Human extracellular ribonucleases: multiplicity, molecular diversity and catalytic properties of the major RNase types." Cell Mol Life Sci **54**(8): 785-94.

Sorrentino, S. and M. Libonati (1997). "Structure-function relationships in human ribonucleases: main distinctive features of the major RNase types." FEBS Lett **404**(1): 1-5.

Sorrentino, S., M. Naddeo, A. Russo and G. D'Alessio (2003). "Degradation of double-stranded RNA by human pancreatic ribonuclease: crucial role of noncatalytic basic amino acid residues." Biochemistry **42**(34): 10182-90.

Suzuki, M., S. K. Saxena, E. Boix, R. J. Prill, V. M. Vasandani, J. E. Ladner, C. Sung and R. J. Youle (1999). "Engineering receptor-mediated cytotoxicity into human ribonucleases by steric blockade of inhibitor interaction." Nat Biotechnol **17**(3): 265-70.

Torrent, M., E. Cuyas, E. Carreras, S. Navarro, O. Lopez, A. de la Maza, M. V. Nogues, Y. K. Reshetnyak and E. Boix (2007). "Topography studies on the membrane interaction mechanism of the eosinophil cationic protein." Biochemistry **46**(3): 720-33.

Vasandani, V. M., J. C. Castelli, J. S. Hott, S. Saxena, S. M. Mikulski and R. J. Youle (1999). "Interferon enhances the activity of the anticancer ribonuclease, onconase." J Interferon Cytokine Res **19**(5): 447-54.

Venge, P., J. Bystrom, M. Carlson, L. Hakansson, M. Karawacjzyk, C. Peterson, L. Seveus and A. Trulson (1999). "Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease." Clin Exp Allergy **29**(9): 1172-86.

Vitelli, R., M. Santillo, D. Lattero, M. Chiariello, M. Bifulco, C. B. Bruni and C. Bucci (1997). "Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway." J Biol Chem **272**(7): 4391-7.

Wagner, F. W., S. H. Wilkes and J. M. Prescott (1972). "Specificity of Aeromonas aminopeptidase toward amino acid amides and dipeptides." J Biol Chem **247**(4): 1208-10.

Wedemeyer, W. J., E. Welker and H. A. Scheraga (2002). "Proline cis-trans isomerization and protein folding." Biochemistry **41**(50): 14637-44.

Weickmann, J. L., M. Elson and D. G. Glitz (1981). "Purification and characterization of human pancreatic ribonuclease." Biochemistry **20**(5): 1272-8.

Weickmann, J. L. and D. G. Glitz (1982). "Human ribonucleases. Quantitation of pancreatic-like enzymes in serum, urine, and organ preparations." J Biol Chem **257**(15): 8705-10.

Wieker, H. J. and H. Witzel (1967). "[On the mechanism of the ribonuclease reaction. 3. Relationship between the kinetic parameters k+1, k-1, k+2 and interpretation of Km]." Eur J Biochem **1**(2): 251-8.

Witzel, H. and E. A. Barnard (1962). "Mechanism and binding sites in the ribonuclease reaction. I. Kinetic studies on the second step of the reaction." Biochem Biophys Res Commun **7**: 289-94.

Wlodawer, A., L. A. Svensson, L. Sjolin and G. L. Gilliland (1988). "Structure of phosphate-free ribonuclease A refined at 1.26 A." Biochemistry **27**(8): 2705-17.

Wodak, S. Y. (1977). "The structure of cytidilyl(2',5')adenosine when bound to pancreatic ribonuclease S." J Mol Biol **116**(4): 855-75.

Wu, Y., S. M. Mikulski, W. Ardelt, S. M. Rybak and R. J. Youle (1993). "A cytotoxic ribonuclease. Study of the mechanism of onconase cytotoxicity." J Biol Chem **268**(14): 10686-93.

Wu, Y., S. K. Saxena, W. Ardelt, M. Gadina, S. M. Mikulski, C. De Lorenzo, G. D'Alessio and R. J. Youle (1995). "A study of the intracellular routing of cytotoxic ribonucleases." J Biol Chem **270**(29): 17476-81.

Xu, G., M. Narayan, E. Welker and H. A. Scheraga (2003). "A novel method to determine thermal transition curves of disulfide-containing proteins and their structured folding intermediates." Biochem Biophys Res Commun **311**(2): 514-7.

Xu, G., M. Narayan, E. Welker and H. A. Scheraga (2004). "Characterization of the fast-forming intermediate, des [30-75], in the reductive unfolding of onconase." Biochemistry **43**(11): 3246-54.

Yamashita, K., A. Hitoi, M. Irie and A. Kobata (1986). "Fractionation by lectin affinity chromatography indicates that the glycosylation of most ribonucleases in human viscera and body fluids is organ specific." Arch Biochem Biophys **250**(1): 263-6.

Youle, R. J., D. Newton, Y. N. Wu, M. Gadina and S. M. Rybak (1993). "Cytotoxic ribonucleases and chimeras in cancer therapy." Crit Rev Ther Drug Carrier Syst **10**(1): 1-28.

Zewe, M., S. M. Rybak, S. Dubel, J. F. Coy, M. Welschof, D. L. Newton and M. Little (1997). "Cloning and cytotoxicity of a human pancreatic RNase immunofusion." Immunotechnology **3**(2): 127-36.

Zhang, J., K. D. Dyer and H. F. Rosenberg (2002). "RNase 8, a novel RNase A superfamily ribonuclease expressed uniquely in placenta." Nucleic Acids Res **30**(5): 1169-75.

Zhou, H. M. and D. J. Strydom (1993). "The amino acid sequence of human ribonuclease 4, a highly conserved ribonuclease that cleaves specifically on the 3' side of uridine." Eur J Biochem **217**(1): 401-10.