



Universitat de Girona

PRODUCCIÓ I CHARACTERITZACIÓ DE VARIANTS DE LA RIBONUCLEASA PANCREÀTICA HUMANA DISSENYADES PER A ADQUIRIR PROPIETATS CITOTÒXIQUES

Montserrat BOSCH i GRAU

ISBN: 84-688-5938-9

Dipòsit legal: GI-142-2004

<http://hdl.handle.net/10803/7612>

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

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

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



UNIVERSITAT DE GIRONA

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

Tesi Doctoral

**Producció i caracterització de variants
de la ribonucleasa pancreàtica humana
dissenyades per adquirir propietats
citotòxiques**

Montserrat Bosch i Grau

2003



UNIVERSITAT DE GIRONA

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

**Producció i caracterització de variants de la
ribonucleasa pancreàtica humana dissenyades
per adquirir propietats citotòxiques**

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

Montserrat Bosch i Grau

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. Antoni Benito Mundet
Professor Titular
de Bioquímica i Biologia Molecular

Girona, octubre de 2003

*Voici mon secret. Il est très simple: on ne
voit bien q'avec le coeur. L'essentiel est invisible
pour les yeux.*

*Antoine de Saint-Exúpery
Le Petit Prince*

*Als pares
A l'Agustí i l'Irene
A l'Alba i l'Ariadna*

A en Joan

Marco Polo descriu un pont pedra per pedra.

- *Però, quina és la pedra que sosté el pont? – pregunta Khubilai Khan.*
- *El pont no és sostingut per aquesta o aquella pedra – respon en Marco Polo-, sinó per la línia de l'arc que elles formen.*

Khubilai Khan roman silenciós, reflexionant. Després afegeix:

- *Per què em parles de les pedres? Només m'importa l'arc.*

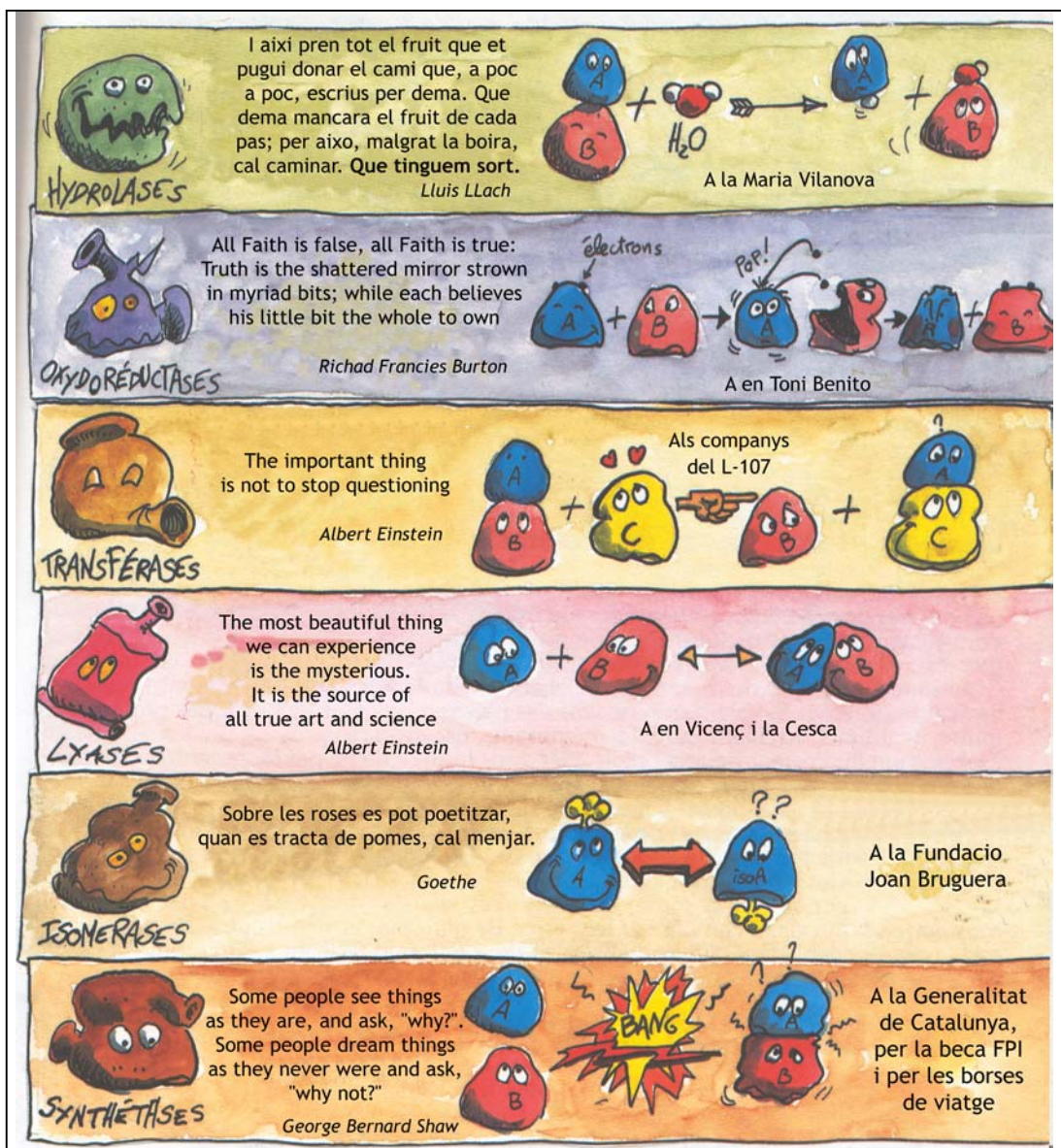
Marco Polo respon:

- *Sense pedres no hi ha arc.*

Italo Calvino

Agraïments

El treball que teniu en aquests moments a les vostres mans no és només el fruit de la meua feina, sinó que ho és de la de molta més gent, sense la qual aquesta tesi no hauria estat possible. És per aquesta raó que vull donar les gràcies en primer lloc als meus directors de Tesi, la Maria i en Toni, als companys i amics que han anat passant pel laboratori 107 i que ja són una part integrant de la meua vida, i als amics de la facultat. Als mestres, gràcies per l'aprenentatge i recolzament constant. Als companys, gràcies per les hores compartides i l'amistat. I a tots, gràcies per permetre'm créixer i madurar tant en l'aspecte científic com en l'humà.



"And the end of all our exploring
Will be to arrive where we started
And know the place for the first time."

T. S. Eliot, *Little Gidding*

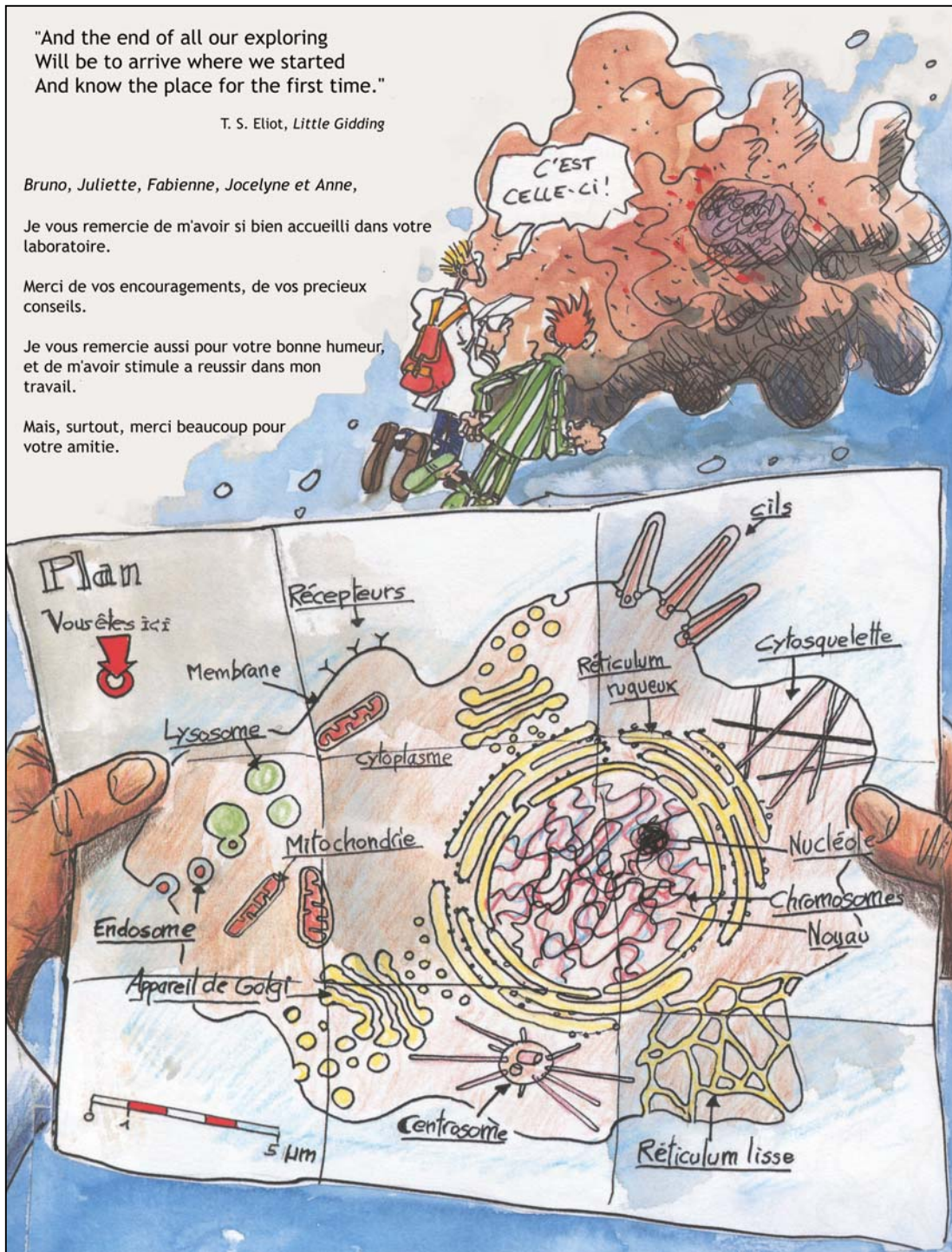
Bruno, Juliette, Fabienne, Jocelyne et Anne,

Je vous remercie de m'avoir si bien accueilli dans votre laboratoire.

Merci de vos encouragements, de vos précieux conseils.

Je vous remercie aussi pour votre bonne humeur, et de m'avoir stimulé à réussir dans mon travail.

Mais, surtout, merci beaucoup pour votre amitié.



Índex

<i>Índex general</i>	<i>i</i>
<i>Índex de taules</i>	<i>vii</i>
<i>Índex de figures</i>	<i>viii</i>
<i>Llista d'abreviatures</i>	<i>x</i>
<i>Resum / resumen / summary</i>	<i>xii</i>
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Les ribonucleases	1
1.1.1. Definició i classificació	1
1.1.2. Funcions	4
1.2. Les ribonucleases pancreàtiques	6
1.2.1. La Ribonucleasa pancreàtica bovina (RNasa A)	6
1.2.2. La Ribonucleasa pancreàtica humana (HP-RNasa)	10
1.2.2.1. Producció heteròloga de l'HP-RNasa	12
1.2.2.2. Determinació de l'estructura tridimensional de l'HP-RNasa: PM7 i PM8 ...	14
1.3. Ribonucleases amb activitats biològiques especials	16
1.3.1. α -Sarcina	17
1.3.2. Onconasa	18
1.3.3. Lectines de <i>Rana catesbeiana</i> i <i>R. japonica</i> (cSBL i jSBL)	19
1.3.4. BS-RNasa	20
1.3.5. Ribonucleases derivades d'eosinòfil: ECP i EDN	21
1.3.6. Angiogenina	21

1.4. Factors que poden determinar la citotoxicitat de les ribonucleases	23
1.4.1. Unió a superfície cel·lular	23
1.4.2. Vies de trànsit intracel·lular i translocació al citoplasma	24
1.4.3. Activitat catalítica i acció inhibidora de l'hRI	25
1.4.4. Estabilitat	28
1.5. Disseny de variants citotòxiques de l'HP-RNasa	29
1.6. L'endocitosi	31
1.7. Organització dels compartiments d'endocitosi i vies vesiculars de trànsit intracel·lular	34
1.7.1. Via de trànsit endosomal: reciclatge i degradació	35
1.7.1.1. <i>Compartiment endosomal primari: estació de tria i reciclatge</i>	37
1.7.1.2. <i>Compartiment endosomal secundari: estació de degradació</i>	38
1.7.1.3. <i>Models de transport endosomal: transferrina i EGF</i>	39
1.7.2. Via de secreció: reticle endoplasmàtic i aparell de Golgi	40
1.7.3. Connexions entre la via d'endocitosi i la via biosintètica	43
1.7.3.1. <i>Entre el TGN i els LE: el cicle de la M6PR</i>	43
1.7.3.2. <i>Entre els endosomes i el reticle endoplasmàtic: toxina del cólera i ricina</i>	45
1.8. Objectius	46
2. MATERIAL I MÈTODES	47
2.1. Material	47
2.1.1. Microorganismes	49
2.1.2. Vectors	49
2.1.3. Línies cel·lulars eucariotes	50
2.2. Mètodes microbiològics.....	51
2.2.1. Medis de cultiu i antibiòtics	51
2.2.2. Manteniment de les soques	51
2.2.3. Creixement dels cultius	51
2.3. Mètodes de cultiu per cèl·lules eucariotes	52
2.3.1. Tècnica asèptica	52

2.3.2.	Manteniment de les línies cel·lulars	52
2.3.3.	Criopreservació de les cèl·lules	54
2.3.4.	Determinació del nombre de cèl·lules	56
2.4.	Tècniques de DNA recombinant	58
2.4.1.	Condicions generals de manipulació de DNA	58
2.4.2.	Obtenció de DNA plasmídic	58
2.4.3.	Electroforesi de DNA en gels d'agarosa	58
2.4.4.	Purificació de fragments de DNA	59
2.4.5.	Concentració de DNA	59
2.4.6.	Estimació de la concentració de DNA	59
2.4.7.	Tractament amb enzims de restricció	60
2.4.8.	Reacció de lligament	60
2.4.9.	Obtenció i transformació de cèl·lules competents	60
2.4.10.	Mutagènesi dirigida per oligonucleòtid (SDM).....	61
2.4.11.	Seqüenciació de DNA	61
2.5.	Mètodes d'expressió i purificació de proteïnes recombinants	62
2.5.1.	Expressió de les proteïnes recombinants en <i>E. coli</i> BL21(DE3)	62
2.5.2.	Anàlisi dels nivells de producció	62
2.5.3.	Purificació de les proteïnes recombinants	62
2.6.	Caracterització bioquímica de proteïnes	63
2.6.1.	Determinació de la concentració de proteïna	63
2.6.1.1.	<i>Mètode de Bradford (1976)</i>	63
2.6.1.2.	<i>Mètode espectrofotomètric</i>	64
2.6.2.	Electroforesi discontinua en gel de poliacrilamida-SDS	64
2.6.3.	Determinació de l'activitat ribonucleasa	64
2.6.3.1.	<i>Zimograma</i>	64
2.6.3.2.	<i>Determinació espectrofotomètrica de les constants catalítiques</i>	65
2.6.4.	Determinació de la massa molecular	65
2.6.5.	Càlcul de la temperatura mitjana de desnaturalització tèrmica ($T_{1/2}$)	65
2.6.6.	Assaig de resistència a proteases	65
2.6.7.	Assaig d'interacció ribonucleasa-inhibidor	66
2.6.7.1.	<i>Anàlisi qualitativa de la interacció RNasa-hRI, en gel d'agarosa</i>	66
2.6.7.2.	<i>Anàlisi quantitativa de la interacció RNasa-hRI: càlcul de K_i</i>	66

2.7. Caracterització de les propietats citotòxiques de les ribonucleases sobre cèl·lules tumorals <i>in vitro</i>	67
2.7.1. Anàlisi de la capacitat d'inhibició de la síntesi proteica cel·lular: marcatge metabòlic en presència de ³⁵ S-Met	67
2.7.2. Anàlisi de la citotoxicitat en presència de drogues	70
2.8. Mesura del pH endosomal	71
2.9. Marcatge de les variants de l'HP-RNasa	73
2.9.1. Radioiodinització de les variants de l'HP-RNasa	73
2.9.2. Marcatge fluorescent de les variants PM5cct, PE3I1cct i PE5cct	74
2.10. Estudi de les vies d'internalització	76
2.10.1. Cinètica d'internalització de les ribonucleases radiomarcades	76
2.10.2. Estudi de les vies d'endocitosi per microscòpia confocal de fluorescència	77
2.10.3. Estudi del transport nuclear	83
2.10.3.1. <i>Obtenció de la fracció citoplasmàtica de cèl·lules HeLa S3</i>	83
2.10.3.2. <i>Anàlisi d'importació nuclear</i>	84
3. RESULTATS I DISCUSSIÓ	87
3.1. Disseny de les variants de l'HP-RNasa	87
3.2. Construcció de variants de l'HP-RNasa	92
3.3. Expressió i purificació de les variants de l'HP-RNasa	95
3.4. Expressió, purificació i activació de l'onconasa	97
3.4.1. Producció heteròloga de l'onconasa	98
3.4.2. Expressió citoplasmàtica i purificació de la (Met-1)-(Gln1)ONC(M23L)	99
3.4.3. Activació de la (Met-1)-(Gln1)ONC(M23L): un procés en dues etapes	101
3.4.4. Caracterització de l'ONC(M23L) activada	104
3.5. Anàlisi de la interacció ribonucleasa/hRI	106
3.5.1. Anàlisi qualitativa en gel d'agarosa	106
3.5.2. Anàlisi quantitativa de la interacció enzim/hRI.....	107

3.6. Caracterització de les propietats citotòxiques de les variants de l'HP-RNasa en cultiu cel·lular	108
3.7. Anàlisi d'internalització	111
3.8. Determinació de les propietats catalítiques	114
3.9. Anàlisi de la termoestabilitat	115
3.10. Flexibilitat conformacional de PE3 i PE5	116
3.10.1. Anàlisi de la mobilitat electroforètica	117
3.10.2. Anàlisi de resistència a la degradació per termolisina	118
3.11. Citotoxicitat en presència de drogues disruptores de les vies de trànsit intracel·lular	119
3.11.1. Acció de la monensina	122
3.11.2. Acció del NH ₄ Cl	124
3.11.3. Acció de la bafilomicina A ₁	125
3.11.4. Acció de la brefeldina A	127
3.11.5. Acció de l'àcid retinoic	129
3.12. Anàlisi del trànsit intracel·lular	131
3.12.1. Rutes de trànsit intracel·lular	131
3.12.2. Efecte de drogues disruptores de les vies d'internalització sobre la localització intracel·lular de PE5	136
3.12.2.1. <i>Monensina</i>	136
3.12.2.2. <i>Brefeldina A</i>	136
3.12.2.3. <i>Bafilomicina A₁</i>	137
3.13. Anàlisi del transport nuclear	139
3.13.1. Distribució local de càrregues en PE5	140
3.13.2. Bases del mecanisme clàssic del transport nuclear actiu	142
3.13.3. Anàlisi d'importació nuclear de PE5 i PM5 en cèl·lules permeabilitzades	145
3.13.4. Cinètica d'importació nuclear de PE5 i PM5	148
3.13.5. Caracterització del transport nucleocitoplasmàtic de PE5 i PM5	151
3.13.6. Caracterització del compartiment subnuclear on s'acumula PE5	155
3.14. Discussió general	159

4. CONCLUSIONS.....	170
5. BIBLIOGRAFIA.....	173
APÈNDIX A. PROTOCOLS DE LABORATORI.....	A-I
APÈNDIX B. PUBLICACIONS	

ÍNDIX DE TAULES

TAULA 1.1.	Famílies de ribonucleases humanes pertanyents a la superfamília de l'RNasa A	3
TAULA 1.2.	Principals funcions de les ribonucleases: selecció d'exemples representatius	4
TAULA 1.3.	Característiques generals de les diverses vies d'endocitosi	34
TAULA 1.4.	Propietats i característiques dels compartiments endosomals	36
TAULA 2.1.	Equipament utilitzat en aquest treball	48
TAULA 2.2.	Característiques genotípiques de les soques utilitzades	49
TAULA 2.3.	Característiques de les línies cel·lulars utilitzades en el present treball	50
TAULA 2.4.	Percentatge d'agarosa en funció de la mida dels fragments de DNA a separar	58
TAULA 2.5.	Enzims de restricció utilitzats en aquest treball	60
TAULA 2.6.	Drogues disruptores de l'endocitosi	71
TAULA 2.7.	Marcadors fluorescents específics d'òrgans	78
TAULA 2.8.	Anticossos primaris utilitzats pel marcatge de compartiments específics	79
TAULA 2.9.	Anticossos secundaris utilitzats pel marcatge de compartiments específics	79
TAULA 2.10.	Condicions de permeabilització cel·lular	80
TAULA 3.1.	Nomenclatura i construcció de les variants de l'HP-RNasa.....	93
TAULA 3.2.	Oligonucleòtids utilitzats per a l'obtenció dels gens mutants de l'HP-RNasa	94
TAULA 3.3.	Massa molecular i valor de pI de les variants generades en aquest treball.....	96
TAULA 3.4.	Valors de les constants d'inhibició de les variants de l'HP-RNasa per l'hRI	108
TAULA 3.5.	Paràmetres cinètics de les variants de l'HP-RNasa pels substrats C>p i poli(C)	115
TAULA 3.6.	Paràmetres de termoestabilitat de PM9, PM5 i les seves variants	116
TAULA 3.7.	Principals efectes de les drogues disruptores de les vies de trànsit intracel·lular	120
TAULA 3.8.	Valors d'IC ₅₀ de les diverses variants de l'HP-RNasa, l'onconasa i la ricina.	122
TAULA 3.9.	Càrrega neta de les variants de l'HP-RNasa	140
TAULA 3.10.	Seqüències de localització nuclear	143

ÍNDIX DE FIGURES

FIGURA 1.1.	Representació de l'estructura tridimensional de l'RNasa A.....	7
FIGURA 1.2.	Esquema de les dues etapes de degradació de l'RNA	7
FIGURA 1.3.	Representació del mecanisme de catàlisi de l'RNasa A	8
FIGURA 1.4.	Representació esquemàtica de la interacció d'un fragment d'RNA amb l'RNasa A	10
FIGURA 1.5.	Comparació de les seqüències d'aminoàcids de l'HP-RNasa i l'RNasa A	11
FIGURA 1.6.	Esquema de l'obtenció de les proteïnes híbrides PM5, PM7, PM8 i PM9	13
FIGURA 1.7.	Representació de les estructures tridimensionals de les variants PM7 i PM8.....	16
FIGURA 1.8.	Representació tridimensional de l'estructura del complex RNasa A - pRI.....	27
FIGURA 1.9.	Vies de pinocitosi.....	32
FIGURA 1.10.	Esquema de la via endocítica	35
FIGURA 1.11.	Esquema de les vies de secreció (o de biosíntesi) i endocítica (o de degradació)	42
FIGURA 1.12.	Vies de trànsit que exploten vesícules recobertes amb COPI, COPII i clatrina.....	43
FIGURA 1.13.	Cicle de la M6PR	44
FIGURA 2.1.	Hemocitòmetre Neubauer Improved.....	56
FIGURA 2.2.	Cel·la de recompte d'un hemocitòmetre.....	57
FIGURA 3.1.	Percentatge de contactes entre l'RI i diversos llaços de PM7, RNasa A i Ang.....	90
FIGURA 3.2.	Esquema de l'obtenció de les variants objectes d'estudi del present treball.....	93
FIGURA 3.3.	Representació de PM5 mostrant la localització dels residus substituïts en les variants	94
FIGURA 3.4.	Anàlisi dels nivells d'expressió de PM5 i PE5	95
FIGURA 3.5.	Purificació de la proteïna PE3.....	97
FIGURA 3.6.	Purificació de l'onconasa	100
FIGURA 3.7.	Percentatges de digestió de la Met-1 en l'onconasa, obtinguts per MALDI-TOF MS	103
FIGURA 3.8.	Perfil d'elució d'una mostra d'onconasa digerida	104
FIGURA 3.9.	Inhibició de l'activitat ribonucleasa de l'onconasa per efecte de l'hRI	105
FIGURA 3.10.	Citotoxicitat de (Pyr)ONC(M23L) i (Met-1)-(Gln1)ONC(M23L) sobre A431 i K562	105
FIGURA 3.11.	Inhibició de l'activitat enzimàtica de les variants de l'HP-RNasa per efecte de l'hRI	107
FIGURA 3.12.	Citotoxicitat de les variants de l'HP-RNasa i de l'onconasa	109

FIGURA 3.13.	Valors d'IC ₅₀ de les variants PE3, PE5 i de l'onconasa	111
FIGURA 3.14.	Internalització de l'onconasa i de PM5 en cèl·lules A431 i K562	112
FIGURA 3.15.	Internalització de l'onconasa, PM5, PI5 i PE5 en cèl·lules K562	113
FIGURA 3.16.	Anàlisi de la conformació de PM5, PE3 i PE5 per SDS-PAGE	117
FIGURA 3.17.	Sensibilitat de PM5, PE3 i PE5 a la digestió amb termolisina.....	118
FIGURA 3.18.	Inhibició de la síntesi proteica per acció de les ribonucleases en presència de drogues	121
FIGURA 3.19.	Internalització de les proteïnes PE3I1, PM5 i PE5 marcades fluorescentment.....	132
FIGURA 3.20.	Presència de PE5 en elements del compartiment endosomal, l'AG i l'ER	134
FIGURA 3.21.	Presència de PE5 en elements del compartiment endosomal tardà	135
FIGURA 3.22.	Internalització de PE5 en cèl·lules A431 incubades amb bafilomicina A ₁	139
FIGURA 3.23.	Comparació de les superfícies electrostàtiques de PM5 i PE5.....	141
FIGURA 3.24.	Cicles d'importació i d'exportació conduïts per les importines citoplasmàtiques	144
FIGURA 3.25.	L'estat de Ran és determinat per la distribució asimètrica dels seus reguladors.....	145
FIGURA 3.26.	Anàlisi de la localització nuclear del Dextrà-TRITC (72 kDa) en cèl·lules HeLa	146
FIGURA 3.27.	Anàlisi de l'acumulació nuclear de PE5 i PM5 en presència o absència d'ATP	147
FIGURA 3.28.	Anàlisi de l'acumulació nuclear de PE5 en presència d'ATP, a diferents temps.....	149
FIGURA 3.29.	Anàlisi de l'acumulació nuclear de PE5 en absència d'ATP, a 0 i 15 min	150
FIGURA 3.30.	Anàlisi de l'acumulació nuclear de PM5 en presència d'ATP, a 0, 10 i 15 min.....	151
FIGURA 3.31.	Anàlisi de l'acumulació nuclear de la BSA-NLS-FITC en cèl·lules HeLa	152
FIGURA 3.32.	Caracterització de la importació nuclear de PE5 en cèl·lules HeLa	154
FIGURA 3.33.	Caracterització de la importació nuclear de PM5 en cèl·lules HeLa.....	155
FIGURA 3.34.	Caracterització del compartiment subnuclear on s'acumula PE5.....	157
FIGURA 3.35.	Model de les vies de trànsit intracel·lular seguides per les variants PE3 i PE5.....	168

LLISTA D'ABREVIATURES

ϵ	Coefficient d'extinció molar	GTP	Guanidina-5'-trifosfat
λ	Longitud d'ona	h	Hora(es)
3'-AMP	Adenina 3'-monofosfat	HPLC	Cromatografia líquida d'alta Resolució
A	Adenina	HP-RNasa	Ribonucleasa pancreàtica humana
Å	Amstrong	IC₅₀	Concentració de proteïna que inhibeix al 50 % la síntesi proteica cel·lular
AAP	Aminopeptidasa d' <i>Aeromonas proteolytica</i>	IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosid
Abs, A	Absorbància	k_{cat}	Constant catalítica
ADP	Adenosina-5'-bifosfat	K_i	Constant d'inhibició
AG	Aparell de Golgi	K_m	Constant de Michaelis Menten
Ang	Angiogenina	L, ml, μl	Litre, mil.lilitre, microlitre
Amp, Ap	Ampicil.lina	LacZ	Gen de la β -galactosidasa
Amp^r	Soca resistent a l'ampicil.lina	Lamp	proteïna associada a les membranes lisosomals
AP	Proteïnes adaptadores	L-Arg	L-Arginina
ARF	Factor de ribosilació d'ADP	LB	Medi Luria-Bertrani
ATP	Adenosina-5'-trifosfat	LBPA	Àcid lisobifosfatídic
B	Subseti per a la fixació de bases	LDL	lipoproteïna de baixa densitat
BrEt	Bromur d'etidi	LDLR	receptor de l'LDL
BSA	Albúmina de sèrum boví	LE	Endosomes secundaris
BS-RNasa	Ribonucleasa seminal bovina	Lgps	Glicoproteïnes lisosomals de membrana
C	Citidina	LYS	Lisosomes
cCMP, C>p	Citidina 2',3'-fosfat cíclic	M, mM, μM	Molar, mil.limolar, micromolar
CCV	Vesícules recobertes de clatrina	mA	Mil.liamper
CGN	Xarxa <i>Cis</i> de l'AG	M6P	manosa-6-fosfat
CT	Toxina del cólera	M6PR	receptor de la manosa-6-fosfat
C-terminal	Carboxi-terminal	MES	Àcid 2(N-morfolino) etanosulfònic
Cy5	cianat	min	Minuts
Da, kDa	Dalton, quilodalton	MTOC	centre organitzador de microtúbuls o centríol
DMEM	<i>Dulbecco's Eagle modified medium</i>	NES	Senyal d'exportació nuclear
DMSO	Dimetilsulfòxid	NLS	Senyal d'importació nuclear
DNA	Àcid desoxiribonucleic	nm	Nanometres
cDNA	DNA còpia	NPC	Complex del porus nuclear
dsDNA	DNA de doble cadena	N-terminal	Amino-terminal
ssDNA	DNA de cadena senzilla	NTS	Senyal de transport nuclear
dNTP	Desoxiribonucleòtid-5'trifosfat	°C	Graus centígrads
DO	Densitat òptica	Oligo	Oligonucleòtid
DT	Toxina diftèrica	ONC	Onconasa
DTT	1,4-ditio-DL-treitol	p	Subseti per a la fixació de fosfats
EE	Endosomes primaris	p/p	Relació pes/pes
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	p/v	Relació pes/volum
ECP	Proteïna catiònica d'eosinòfil	PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida
ECV/MVB	<i>Endosomal carrier vesicle// multivesicular body</i>	pb	Parell de bases
EDN	Neurotoxina derivada d'eosinòdil	PBS	Tampó fosfat salí
EDTA	Àcid etilendiamina-tetraacètic	PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
EGF	Factor de creixement epidèrmic	PDB	Banc de dades de proteïnes
EGFR	Receptor de l'EGF	PEG	Poliètilenglicol
ER	Reticle endoplasmàtic	poli(A)	Àcid poliadenílic
FCS	Sèrum boví fetal	poli(C)	Àcid policitidílic
FITC	isotiocianat de fluoresceïna	poli(U)	Àcid poliuridílic
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>	PTD	domini de transducció proteic
G	Guanina	Pyr	Àcid piroglutàmic
GDP	Guanidina-5'-bifosfat	R	Subseti per a la fixació de riboses
GM	AG mitjà		
g, mg, μg, ng, kg	Gram, mil.ligram, microgram, nanogram, quilogram		
Gnd-HCl	Clorur de guanidini		
GSH	Glutatió reduït		
GSSG	Glutatió oxidat		

RE	Endosomes de reciclatge	T	Timina
RGD	tripèptid Arg-Gly-Asp	T_{1/2}	Temperatura en la qual el 50 % de la proteïna està desnaturalitzada
RI	Inhibidor proteic de riboncleases	TAE	Amortidor Tris/àcid acètic/EDTA
hRI	RI d'origen humà	TCA	Àcid tricloroacètic
pRI	RI d'origen porcí	TE	Amortidor Tris/HCl/EDTA
RNA	Àcid ribonucleic	TEMED	N, N, N', N' -tetrametiletildiamina
mRNA	RNA missatger	Tf	Transferrina
rRNA	RNA ribosòmic	TfR	Receptor de transferrina
tRNA	RNA de transferència	TFA	Àcid trifluoroacètic
RNasa A	Ribonucleasa A de pàncrees boví	TGN	Xarxa <i>Trans</i> de l'AG
RNasa	Ribonucleasa	Tris	Tris-hidroximetil-aminometà
r.p.m.	Revolucions per minut	TRITC	isotiocianat tetrametil rodamina
s	Segons	U, mU	Unitat(s), mil-liunitat(s)
SBL	<i>Sialil glicoprotein binding lectin</i>	UDO	Unitats de densitat òptica
cSBL	provinent de <i>Rana catesbeiana</i>	UV	Ultraviolat
jSBL	provinent de <i>Rana japonica</i>	V_{màx}	Velocitat màxima
SDM	Mutagènesi dirigida per oligonucleòtid	v/v	Relació volum/volum
SDS	Dodecil sulfat sòdic	xg	Força centrífuga relativa
SE	Endosomes de tria	X-Pro	Enllaç imida entre una prolina i el residu que la precedeix
ssDNA	DNA de cadena senzilla		

RESUM

Amb la finalitat d'aprofundir en les bases moleculars de la citotoxicitat de les ribonucleases pancreàtiques, es van construir variants derivades de l'HP-RNasa seguint dues estratègies. En la primera, es van generar variants de l'enzim resistent a l'acció de l'inhibidor proteic de les ribonucleases (hRI), substituint residus implicats en la interfície de contacte entre la ribonucleasa i l'hRI. En la segona, es va afegir el motiu RGD en regions de superfície de la proteïna implicades en la formació del complex amb l'hRI, a fi de promoure la seva interacció amb la membrana plasmàtica de les cèl·lules i a la vegada disminuir l'afinitat de les variants per l'hRI. Es va comprovar que només les variants portadores de substitucions múltiples adquirien la capacitat de resistència a l'hRI.

L'estudi del percentatge d'inhibició de la síntesi proteica en cèl·lules incubades amb cadascuna de les variants va mostrar que només dues de les variants construïdes havien adquirit propietats citotòxiques. La citotoxicitat més elevada la va presentar una variant que no era resistent a l'hRI, amb valors que eren només entre 5 i 15 vegades inferiors als de l'onconasa. Aquest resultat demostrà que la sensibilitat a l'hRI no és necessàriament un paràmetre limitant per a la citotoxicitat de les ribonucleases. Cap de les variants que incorporava un motiu RGD presentà citotoxicitat, evidenciant que aquest motiu no és efectiu a fi de dotar les ribonucleases pancreàtiques de propietats citotòxiques.

Es van estudiar les bases moleculars de la citotoxicitat de la variant més citotòxica. En primer lloc, l'anàlisi de la internalització per marcatge radioactiu d'aquesta variant en relació amb l'onconasa i amb altres variants de l'HP-RNasa no citotòxiques, va posar en evidència que només l'onconasa era internalitzada eficientment. Es descartava així la possibilitat que l'acció citotòxica de l'enzim estudiat fos conseqüència d'una major eficiència d'endocitosi. També es va comprovar que l'addició del motiu RGD no era capaç de promoure la internalització de les proteïnes amb més eficàcia. Per microscòpia confocal de fluorescència, les variants humanes només es van començar a detectar a l'interior de la cèl·lula a partir de les 24 h d'incubació.

Totes les variants generades van presentar una eficiència catalítica superior al 50 % de l'activitat de la seva proteïna parental, PM5, indicant que probablement l'estructura del centre actiu no havia estat afectada de manera dràstica per les substitucions introduïdes. No obstant, en tots els casos es va produir una disminució en la termoestabilitat respecte a PM5. Aquest resultat indicà que la correlació descrita a la bibliografia entre l'increment de termoestabilitat i l'increment de citotoxicitat per les ribonucleases no sempre es compleix.

Per microscòpia confocal es va comprovar que tant la proteïna més citotòxica, com una variant no citotòxica resistent a l'hRI, així com la proteïna parental, seguien la via de degradació lisosomal. Aquesta ruta de trànsit no va ser afectada per

l'addició de drogues que alteren les vies de trànsit retrògrad (monensina i brefeldina A), però sí per l'addició de la bafilomicina A₁, una droga que neutralitza el pH endosomal i que va actuar alentint el trànsit de les proteïnes als lisosomes. D'acord amb aquests resultats, els valors de citotoxicitat de les variants es van incrementar de manera significativa només en presència de bafilomicina A₁, suggerint que les ribonucleases transloquen al citoplasma a partir d'algun punt de la via de trànsit endosomal.

Es va comprovar que l'acció de la variant més citotòxica era deguda a que l'addició d'un segon motiu de tres Arg en PE5 dota a aquesta proteïna amb un senyal de transport nuclear. La fracció d'enzim que aconsegueix translocar al citoplasma a partir d'algun punt de la via endosomal previ als lisosomes, és conduït ràpidament al nucli de la cèl·lula per mitjà del mecanisme clàssic de transport actiu. Per la seva afinitat amb l'rRNA, l'enzim es concentra en el nuclèol, on probablement duu a terme la seva activitat catalítica. La interacció d'aquesta variant amb els receptors nucleocitoplasmàtics, les importines, impediria per altra banda el bloqueig de l'enzim per part de l'hRI.

Els resultats obtinguts presenten una nova estratègia de disseny de ribonucleases citotòxiques, basada en l'addició de segments NLS a fi de promoure el transport nuclear dels enzims. Aquesta estratègia podria permetre superar limitacions que fins al moment han estat descrites com a limitants de la citotoxicitat de les ribonucleases pancreàtiques, com la sensibilitat a l'hRI o la baixa eficiència d'internalització.

RESUMEN

Con la finalidad de estudiar las bases moleculares de la citotoxicidad de las ribonucleasas pancreáticas, se construyeron diversas variantes de la HP-RNasa utilizando dos estrategias distintas. En la primera, se generaron variantes del enzima resistentes a la acción del inhibidor proteico de ribonucleasas (hRI), mediante la sustitución de residuos implicados en la interfície de contacto entre la ribonucleasa y el hRI. En la segunda, se añadió el motivo RGD en regiones de superficie de la proteína implicadas también en la formación del complejo con el hRI. De esta forma se pretendía promover simultáneamente la interacción del enzima con la membrana celular y la reducción de su interacción con el inhibidor. Se comprobó que sólo las variantes portadoras de múltiples sustituciones eran capaces de evitar la interacción con el inhibidor.

El estudio del porcentaje de inhibición de la síntesis proteica en células incubadas con cada una de las variantes mostró que sólo dos de ellas adquirirían propiedades citotóxicas. Sorprendentemente, la variante más citotóxica de entre estas resultó ser sensible al hRI. Se trata de PE5, y presenta un valor de IC_{50} solamente entre 5 y 15 veces inferior a los presentados por la onconasa. Este resultado demuestra que la sensibilidad al hRI no es un factor imprescindible para la toxicidad de las ribonucleasas. Así mismo, ninguna de las variantes portadoras del motivo RGD adquirió capacidades citotóxicas.

Los análisis de internalización de las variantes marcadas radiactivamente demostraron que sólo la onconasa es internalizada eficazmente durante las primeras 7 h de incubación. Se descarta de esta manera la posibilidad de que las propiedades citotóxicas de PE5 sean el resultado de una mayor eficiencia de endocitosis. También se comprobó que la adición del motivo RGD no es capaz de promover la internalización de las proteínas que lo contienen. Mediante microscopia confocal de fluorescencia se empezaron a detectar las variantes humanas en el interior de las células sólo después de 24 h de incubación.

Todas las variantes generadas presentaron una eficiencia catalítica superior al 50 % de la actividad de su proteína de origen, PM5. Este resultado indica que probablemente la estructura del centro activo de las variantes no ha sido afectada drásticamente por las sustituciones introducidas. No obstante, en todos los casos se produjo una disminución de la termoestabilidad con relación a PM5.

El estudio de las vías de tránsito intracelular de tres de las variantes de la HP-RNasa (PE5, PM5 y una variante no citotóxica aunque sí resistente al hRI) mostró que todas ellas siguen la misma ruta de transporte, que las conduce desde la superficie celular hacia los lisosomas. Esta ruta no fué afectada por la adición de drogas que alteran las vías de tránsito retrógrado, como la monensina y la brefeldina A. Pero sí por la bafilomicina A_1 , que actúa neutralizando el gradiente de pH endosomal y frenando el tránsito endosomal hacia los lisosomas. De acuerdo con

estos datos, los valores de citotoxicidad de las variantes se incrementaron de manera significativa sólo en presencia de esta droga, sugiriendo que las ribonucleasas llegan al citoplasma después de cruzar las membranas del sistema endosomal en algún punto anterior a los lisosomas.

La caracterización del mecanismo de citotoxicidad de la variante PE5 sugirió que la presencia de un segundo motivo de tres Arg en ésta proteína le proporcionaba una señal de transporte nuclear, el cual sería el responsable de su localización en este compartimento. Así pues, la porción de enzima que consigue llegar al citosol desde los endosomas es conducida rápidamente hacia el núcleo de la célula, mediante el mecanismo de transporte activo clásico. Por su afinidad con el rRNA, el enzima se concentra a continuación en el nucleolo, donde probablemente realiza su actividad catalítica. Así mismo, la interacción de la variante PE5 con los receptores encargados del transporte a núcleo (las importinas), que se produce a nivel del NLS, impediría la formación del complejo enzima-hRI, evitando así el bloqueo del enzima por parte de su inhibidor.

Los resultados obtenidos en ésta tesis ofrecen una nueva estrategia para el diseño de ribonucleasas citotóxicas, basada en la adición de segmentos NLS con el objetivo de promover el transporte nuclear de los enzimas. Esta capacidad podría permitir superar factores que hasta el momento se habían considerado como claramente restrictivos de la citotoxicidad de las ribonucleasas pancreáticas, como són la sensibilidad de los enzimas al hRI o su baja eficiencia de internalización.

SUMMARY

The main objective of this thesis is to study the molecular bases of the cytotoxicity of certain ribonucleases. With the final aim to obtain cytotoxic variants derived from human pancreatic ribonuclease. For this purpose, we created variants derived from HP-RNase by using two different strategies. In the first, variants of the enzyme that were resistant to the action of the protein inhibitor of the ribonuclease (RI) were generated, replacing residues involved in the contact interface between the ribonuclease and RI. In the second, RGD motifs were added to the surface of the proteins involved in the formation of the RI complex, with the aim of promoting their interaction with the cell plasmatic membrane, whilst at the same time decreasing the variant's affinity for RI. We showed that only variants carrying multiple substitutions acquired the capacity to resist the RI.

The study of the percentage of inhibition of protein synthesis in incubated cells using each of the variants showed that only two variants had acquired cytotoxic properties. The highest level of cytotoxicity found in a non-resistant variant to RI had a value that was only 5 and 25 times lower than those registered by Onconase®. This result shows that RI sensitivity is not a limiting factor for the cytotoxicity of the ribonuclease. None of the variants which contained RGD motifs showed any sign of toxicity, suggesting that for this reason it is not effective in giving pancreatic ribonuclease cytotoxic properties.

The cytotoxic molecular bases of the most cytotoxic variant were studied. Firstly by the analysis of the internalisation of this particular variant by radioactive marking in relation to Onconase and other non-cytotoxic variants of HP-RNase, which showed that only Onconase was effectively internalised. Thus the possibility that the cytotoxic action of the enzyme under observation was a result of a more efficient endocytosis was ruled out. It was also shown that the addition of the RGD motif was unable to encourage the internalisation of the proteins more effectively. Using confocal microscopy, the human variants only began to be noted inside the cell after 24 hours incubation.

All the variants that were created retained a catalytic efficiency that was never less than 50 % of the catalytic activity achieved by the parent protein PM5. This suggests that the structure within the active centre had not been affected in any serious way by the introduction of the substitutions. However a decrease in thermostability was noted across the board with regards to PM5. This result indicates that the correlation mentioned in the bibliography between the increase of thermostability and the increase of cytotoxicity of the ribonuclease does not always exist.

Using a confocal microscope, we confirmed that both the most cytotoxic protein, such as a non-cytotoxic variant resistant to RI, and the parent protein, followed the same lysosomal pathway of degradation. This outcome was unaffected by the

addition of drugs which can change retrograde transit pathways (monensine and brefeldine A), but was effected by the addition of bafilomycin A₁ a drug which neutralises endosomal pH and which in this case acted by slowing down the movement of proteins to lysosomes. In accordance with these results, the cytotoxicity values of the variants were significantly increased only by the presence bafilomycin A₁ suggesting that the ribonuclease translocate into the cytoplasm starting from a point somewhere along the endosomal transit pathway.

We confirmed that the behaviour of the most cytotoxic variant was due to the fact that the addition of a second motif of 3 Arg in PE5 endowed the protein with a nuclear transport signal. The division of the enzyme that translocates into the cytoplasm (from somewhere along the endosomal transit path before the lysosomes) is rapidly moved towards the core of the cell via the conventional mechanism for nucleus transport. Due to its affinity for rRNA, the enzyme gathers in the nucleolus, where it probably carries out its catalytic activity. On the other hand, the interaction of this variant with nucleocytoplasmatic receptors will prevent the RI from inhibiting the enzyme.

These results offer a new strategy for the design of cytotoxic ribonuclease, based on the addition of NLS motifs, with the aim of encouraging the nuclear transport of enzymes. This strategy could allow one to overcome limitations that up until now have been the down-side to the cytotoxicity of pancreatic ribonuclease, such as a sensitivity for RI or the limited efficiency of internalisation.

1. Introducció

1. Introducció

1.1. Les Ribonucleases

1.1.1. Definició i classificació

Les ribonucleases són un grup d'enzims extremadament heterogeni, tant pel que fa a la seva estructura com per la funció biològica que realitzen, present en tots els éssers vius. Aquests enzims es caracteritzen per presentar activitat ribonucleolítica, catalitzant el trencament d'enllaços fosfodièster en l'RNA.

Tot i que el terme ribonucleasa s'utilitza generalment per a designar proteïnes amb activitat ribonucleolítica, existeixen àcids nucleics que presenten funcions similars, com és el cas dels ribozims i de les ribonucleoproteïnes, com l'RNasa P (Deutscher, 1988; Deutscher, 1993).

L'establiment d'un sistema de classificació adient per a aquest grup tant ampli de molècules 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

1. Introducció

ribonucleasa pot variar 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 o en endoribonucleases, en funció de si actuen sobre un enllaç fosfodiéster extern o intern, respectivament.
- Segons la seva especificitat de 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 a l'extrem 3' de residus de pirimidina. I 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 molt baixa. Ben al contrari que les intracel·lulars, que són molt més específiques i estructuralment complexes.

De manera més concreta, 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 caracteritzar i purificar 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. Actualment però, aquesta classificació sovint no és apropiada, donat que es donen casos en què una ribonucleasa classificada en una d'aquestes categories s'ha trobat *a posteriori* en altres teixits que no es corresponen a aquells que descriu el seu nivell de classificació.

Arran de la confusió que genera l'ordenació precedent, Sorrentino i Libonati (1997) van proposar utilitzar el terme *tipus pancreàtic* en lloc del *secretori*, per classificar les ribonucleases amb 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 *tipus no pancreàtic* en lloc de *no secretòria* fa referència a una categoria de ribonucleases (expressades en diversos fluids i en teixits diferents al pàncrees) caracteritzada per presentar identitat de seqüència i propietats catalítiques similars a les de l'RNasa K2 de ronyó boví o l'EDN humana. Les ribonucleases estructuralment pertanyents al tipus pancreàtic, però que presenten característiques catalítiques similars als dos grups, s'engloben en un tipus mixt.

1. Introducció

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 evolutivament 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.*, 1988), categoria que comprèn endoribonucleases pirimidina específiques, tant de tipus pancreàtic com no pancreàtic, amb ponts disulfur en la seva estructura, la tríada catalítica HKH (veure APARTAT 1.2.1), i una distribució filogenètica restringida als vertebrats (Beintema i Kleineidam, 1998).

Els enzims pertanyents a aquesta superfamília es troben àmpliament distribuïts en diversos òrgans i fluids en els vertebrats. Els seus membres presenten diferents patrons d'expressió i mostren activitats catalítiques diverses enfront de substrats RNA específics. A part de la funció digestiva dels membres del tipus pancreàtic (RNasa 1), es desconeixen encara moltes de les funcions fisiològiques d'aquest grup d'enzims (veure APARTAT 1.1.2). Fins al moment, s'han caracteritzat 8 famílies diferents pertanyents a aquesta superfamília en humans. La nomenclatura proposada inicialment per 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.

Famílies de ribonucleases humanes pertanyents a la superfamília de l'RNasa A.

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 del plasma seminal	Mixt
RNasa 5	Angiogenina (Ang)	No pancreàtic
RNasa 6	Ribonucleasa K6	No pancreàtic
RNasa 7	ribonucleasa antimicrobial aïllada del teixit epitelial	No pancreàtic
RNasa 8	ribonucleasa aïllada de placenta	No pancreàtic

1. Introducció

1.1.2. Funcions

Tal i com ja s'ha comentat, les ribonucleases tenen un paper central en el metabolisme de l'RNA i és 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 un llistat de les diferents funcions conegudes de les ribonucleases, així com exemples representatius dins de cada grup.

TAULA 1.2.

Principals funcions de les ribonucleases: selecció d'exemples representatius.

Funció	Ribonucleasa	Organisme
Digestió RNA extracel·lular	RNasa A	<i>Bos taurus</i>
	RNasa T ₁	<i>Aspergillus oryzae</i>
	Nucleasa de <i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>
	Nucleasa estafilococal	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Nucleasa P1	<i>Penicillium citrinum</i>
Maduració RNA	RNasa III	<i>Escherichia coli</i>
	'Complexe de trencament' per al processament en l'extrem 3' de pre-mRNAs eucariotes	<i>Bos taurus</i>
Degradació RNA intracel·lular	RNasa E	<i>Escherichia coli</i>
	RNasa HI	<i>Escherichia coli</i>
	Exoribonucleasa específica poli(A)	<i>Homo sapiens</i>
Apoptosi	Nucleasa anticodó	<i>Escherichia coli</i>
	RNasa L	<i>Homo sapiens</i>
Defensa	α -Sarcina	<i>Aspergillus giganteus</i>
	ECP i EDN	<i>Homo sapiens</i>
	RNasa 7	<i>Homo sapiens</i>
Aspermatogènia i immunotòxica	BS-RNasa	<i>Bos taurus</i>
	RNasa 4	<i>Homo sapiens</i>
Control de creixement	Angiogenina	<i>Homo sapiens</i>
	S-RNases	<i>Nicotiana glauca</i>

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 complexos 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 procarïotes com en eucariotes superiors. 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 és desconeguda encara en la majoria dels casos. Pel que fa a l'RNasa 1, s'accepta que intervé activament en processos digestius, sobretot en herbívors rumugants, 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). Tanmateix 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 el terme 'Risbases' (*Ribonucleases endowed with special bioactions*) (D'Alessio, 1997; Irie, 1997). Aquest grup inclou, entre d'altres, les ribonucleases que presenten propietats citotòxiques.

Les ribonucleases citotòxiques que s'han descrit en humans són l'ECP (RNasa 3), que presenta activitat antibacteriana, antivírica, cito-, neuro- i helmintotòxica; l'EDN (RNasa 2), amb una activitat helmintotòxica inferior, però també amb propietats antivíriques, i més neurotòxica (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 recentment del 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 (o P-30) 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).

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 activitats especials de les ribonucleases han renovat l'interès de la comunitat científica en l'estudi d'aquestes proteïnes, que han demostrat ser molt més que simples enzims digestius (D'Alessio, 1993; Schein, 1997), obrint-se així noves vies de recerca per a la generació d'agents terapèutics. Atenent a la importància d'aquests enzims, així com a l'enorme varietat de funcions que exerceixen, se'ls considera, juntament amb llurs inhibidors i activadors, prometedors agents terapèutics per al tractament de patologies diverses.

De les diverses ribonucleases humanes descrites, el present treball de tesi se centra en l'estudi de l'RNasa 1 o ribonucleasa pancreàtica humana (HP-RNasa).

1.2. Les ribonucleases pancreàtiques

1.2.1. La Ribonucleasa pancreàtica bovina (RNasa A)

En qualsevol treball dedicat a l'estudi de les ribonucleases es fa inevitable fer referència a la ribonucleasa pancreàtica bovina o RNasa A (EC 3.1.27.5). És possiblement la ribonucleasa més estudiada i una de les proteïnes més extensament analitzada, degut a la seva fàcil purificació, gran estabilitat i baix pes molecular. S'han publicat diferents treballs de revisió que recopilen la informació existent sobre aquest enzim, entre les quals es poden destacar: Richards i Wyckoff (1971), Blackburn i Moore (1982), Eftink i Biltonen (1987b), Parés *et al.* (1991), Nogués *et al.* (1995), Cuchillo *et al.* (1997), Neira i Rico (1997) i Raines (1998).

L'RNasa A ha estat el model d'estudi de les ribonucleases de tipus secretor. És per tot això que constitueix un punt de referència obligat en l'estudi de qualsevol membre d'aquesta superfamília. A més a més, i puix que presenta un percentatge d'identitat de seqüència del 70 % amb la proteïna objecte d'aquest treball (l'HP-RNasa), és interessant remarcar-ne les principals característiques.

L'RNasa A és una proteïna monomèrica constituïda per una cadena de 124 aminoàcids, amb una massa molecular de 13683 Da i un pI de 9,6 (Anfinsen *et al.*, 1952; Smyth *et al.*, 1963). Té 8 residus de cisteïna que formen 4 ponts disulfur intracatenaris (posicions 26-84, 40-95, 58-110 i 65-72), els quals contribueixen a l'elevada estabilitat de l'enzim.

En l'estat natiu, l'RNasa A té una forma arronyonada, amb els residus del centre actiu (His 12, Lys 41 i His 119) situats al llarg de la depressió central, i unes dimensions aproximades de 3,5 x 4,5 x 3,1 nm (FIGURA 1.1). Té quatre residus de prolina: Pro42, Pro93, Pro114 i Pro117. Els enllaços peptídics que precedeixen els residus Pro93 i Pro114 estan en conformació *cis*. Aquests dos residus de prolina es troben en girs d'inversió de tipus VI (Chou i Fasman, 1977) en els costats oposats de la proteïna nativa.

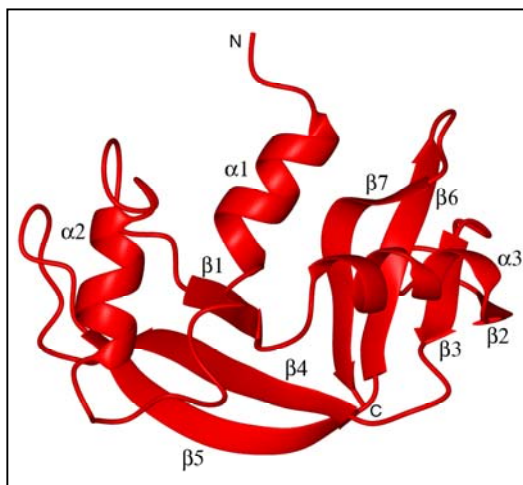
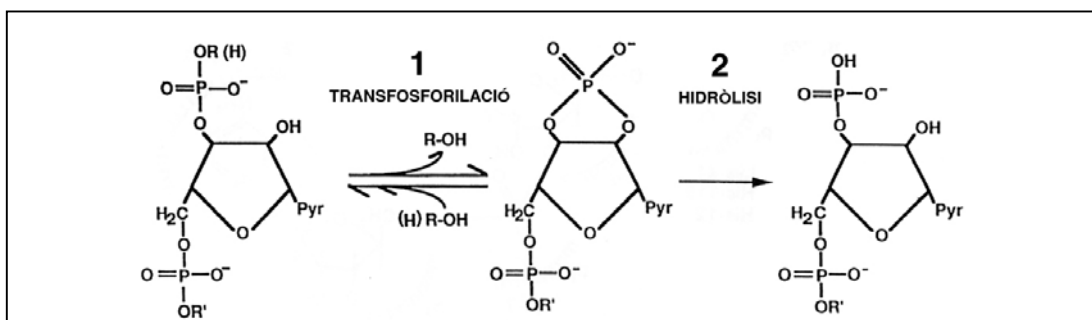


FIGURA 1.1.

Representació de l'estructura tridimensional de l'RNasa A (7RSA; Wlodawer *et al.*, 1988). α1 a α3, hèlix-α; β1 a β7, cadenes β.

L'RNasa A catalitza el trencament dels enllaços 3'-5'-fosfodièster de les cadenes senzilles d'RNA mitjançant una reacció en dues etapes (FIGURA 1.2). 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 produeix la hidròlisi del fosfodièster cíclic, formant-se un grup 3'-fosfat terminal. La base en la posició 3' de l'enllaç que es trenca ha d'ésser una pirimidina. La reacció de transfosforilació es produeix a una velocitat molt superior a la d'hidròlisi i és reversible.

FIGURA 1.2.



Esquema de les dues etapes de degradació de l'RNA. Reproduït de Cuchillo *et al.* (1993). R i R': cadenes de polinucleòtid; Pyr: pirimidina.

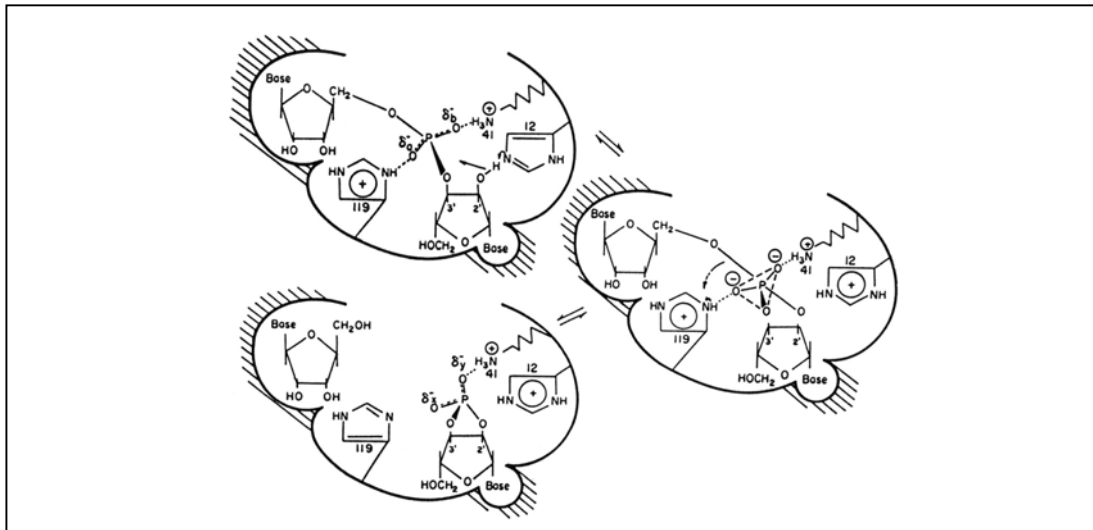
Estudis sobre el mecanisme de catàlisi de l'RNasa A (Cuchillo *et al.*, 1993) indiquen que no és correcte considerar la reacció com un procés seqüencial, amb la formació d'un intermediari associat a l'enzim, sinó que més aviat s'hauria de parlar

1. Introducció

de processos catalítics separats, fins al punt que la reacció d'hidròlisi pràcticament no es produeix fins que no finalitza el trencament de tots els enllaços 3',5'-fosfodiéster que l'enzim té disponibles. Per aquesta raó, els autors suggereixen un canvi en la classificació de l'RNasa A: l'enzim s'hauria de catalogar com una transferasa i no com una hidrolasa.

S'han proposat diversos mecanismes de catàlisi per l'RNasa A, d'entre els quals el més acceptat és el dels treballs de Findlay *et al.* (1961 i 1962), que fou modificat per Roberts *et al.* (1969) i posteriorment refinat per Usher *et al.* (1970). En la catàlisi intervenen principalment els anells imidazol de dos residus d'His (FIGURA 1.3). En l'etapa de transfosforilació, la His12 actua com a base, desprotonant el grup O2' i la His119 actua com a àcid, protonant el grup O5'-R que s'allibera i debilitant l'enllaç P-O5', facilitant així l'atac de l'O2' sobre el fósfor. Aquestes funcions s'inverteixen en l'etapa d'hidròlisi, en la que la His119 actua com a base, captant un protó d'una molècula d'aigua, mentre que la His12 passa a actuar com a base, protonant el grup O2'. En totes dues etapes es forma un complex intermediari pentacovalent, on el fosfat adopta una configuració de bipiràmide trigonal, estabilitzada principalment per la Lys41 (Allewel *et al.*, 1973; Borkakoti *et al.*, 1983; Wlodawer i Sjolín, 1983). Estudis posteriors sobre el mecanisme de catàlisi van confirmar el model inicial de catàlisi àcid/base on participen els grups imidazol dels residus His12 i His119 (Eftink i Biltonen, 1987; Eftink i Biltonen, 1983; Herschlag, 1994).

FIGURA 1.3.



Representació del mecanisme de catàlisi de l'RNasa A. Els residus His12 i His119 estan involucrats en un mecanisme bifuncional àcid-base. Reproduït de Cuchillo *et al.* (1997).

L'enzim pot associar-se tant a desoxiribonucleòtids com a ribonucleòtids, però només pot hidrolitzar els darrers, ja que el grup 2'-OH de la ribosa és necessari pel mecanisme catalític.

L'RNasa A exhibeix una clara preferència per les pirimidines en la posició 3' en relació a l'enllaç fosfodiéster que s'escindeix, hidrolitzant el substrat poli(C) aproximadament 20 vegades més ràpid que el poli(U). Tanmateix, l'especificitat de la reacció de transfosforilació no és absoluta, ja que l'enzim és també capaç catalitzar la degradació del poli(A), per bé que amb una eficiència 10^3 - 10^4 vegades inferior que la del poli(U) (delCardayre i Raines, 1994; Sorrentino i Libonati, 1994). Paral·lelament a aquesta especificitat primària, s'ha observat que la composició dels nucleòtids adjacents té una gran influència en l'eficiència catalítica (k_{cat}/K_m) d'aquest enzim. S'ha descrit una especificitat 'secundària' per la base del nucleòtid en posició 5' en relació a l'enllaç fosfodiéster que s'escindeix, seguint l'ordre A>G>C>U (Follmann *et al.*, 1967; Rushizky *et al.*, 1961; Witzel i Barnard, 1962). La segona etapa de la reacció és molt més específica i només s'hidrolitzen els èsters fosfat cíclic que tenen una pirimidina com a base nitrogenada (Cuchillo *et al.*, 1993; Nogués *et al.*, 1995).

Estudis estructurals, cinètics i de modificació química han proposat i demostrat l'existència de diferents subsetis enzimàtics que contribueixen a la unió del substrat polimèric (FIGURA 1.4). Els treballs on s'ha estudiat la participació dels diferents subsetis de l'RNasa A han estat revistats per Cuchillo *et al.* (1997), Gilliland (1997) i Nogués *et al.* (1998).

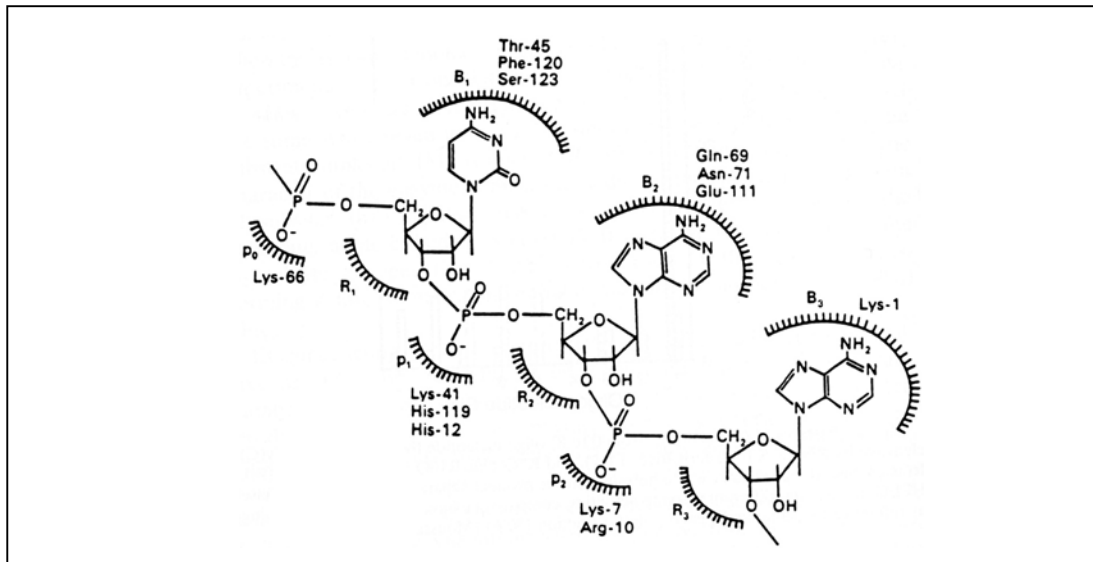
Segons la nomenclatura introduïda per Richards i Wyckoff (1971), B, R i p fan referència als subsetis per a la fixació de bases, riboses i fosfats, respectivament. Es defineix p_1 com el subseti catalític on se situa el grup fosfat de l'enllaç fosfodiéster que s'escindeix, i B_1R_1 com el subseti principal específic per pirimidines (posició 3' respecte a l'enllaç fosfodiéster que s'escindeix). A més, donat que l'enzim mostra preferència per nucleòtids de purina en la posició 5', s'ha definit un subseti secundari anomenat B_2R_2 . De la mateixa manera, s'han proposat altres subsetis d'unió de grups fosfats a més de p_1 . Els més ben caracteritzats són p_0 i p_2 , els quals es troben adjacents al subseti catalític en la direcció 5' i en la direcció 3', respectivament (Mitsui *et al.*, 1978; Parés *et al.*, 1980).

Tres dels subsetis (B_1 , B_2 i B_3) interaccionen amb les bases dels substrat que s'uneix a l'enzim. Tal i com s'ha esmentat, el subseti B_1 és específic per pirimidines (Aguilar *et al.*, 1992; McPherson *et al.*, 1986) i presenta preferència per citosina. Al contrari, els subsetis B_2 i B_3 s'uneixen a totes les bases, per bé que B_2 i B_3 tenen preferència per purines (Boque *et al.*, 1994; Irie *et al.*, 1984b; Katoh *et al.*, 1986; Parés *et al.*, 1980; Rushizky *et al.*, 1961).

L'eficiència catalítica de l'RNasa A s'incrementa amb la longitud de la cadena de l'oligonucleòtid (Irie *et al.*, 1984a; Irie *et al.*, 1984b). El coneixement que es té de l'estructura i localització dels subsetis d'unió a fosfats, així com de les propietats cinètiques de l'enzim, demostren que la millor eficiència catalítica observada pels

substrats d'elevat pes molecular s'origina per la unió múltiple i cooperativa del substrat amb l'enzim (Cuchillo *et al.*, 1997; Moussaoui *et al.*, 1996).

FIGURA 1.4.



Representació esquemàtica de la interacció d'un fragment d'RNA amb l'RNasa A. B, R i p fan referència als subsetis per a la fixació de bases, riboses i fosfats, respectivament. B₁ és específic per pirimidines i B₂ prefereix purines. Els mononucleòtids 3'-pirimidina interaccionen a B₁R₁p₁ i els mononucleòtids 5'-purina interaccionen a B₂R₂p₁. El 3'-AMP interacciona a B₂R₂p₂. El centre catalític de l'enzim se situa a p₁. S'indiquen els residus que podrien participar en cada subseti. Reproduït de Parés *et al.* (1991).

Els residus més importants dels diferents subsetis han estat identificats per mitjà d'estudis cinètics, estudis de modificació química, estudis de complexos de l'RNasa A amb diversos anàlegs de substrat i també per mutagènesi dirigida. Aquests residus s'indiquen a la FIGURA 1.4. Tots aquests treballs es troben detallats a la revisió de Nogués *et al.* (1998).

1.2.2. La Ribonucleasa pancreàtica humana (HP-RNasa)

La ribonucleasa de pàncrees humà (HP-RNasa o RNasa 1, segons la nomenclatura de Zhou i Strydom; EC 3.1.27.5) 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 del seu homòleg boví, l'RNasa A. S'ha suggerit que la presència de ribonucleasa de tipus pancreàtic en vertebrats no remugants podria ser un vestigi evolutiu, atès que aquests organismes no necessiten aprofitar el fòsfor ni el nitrogen intestinal d'origen microbià (Barnard, 1969). Així mateix, aquest enzim s'ha localitzat també (tot i que en menor quantitat) en l'orina,

1. Introducció

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).

A diferència de la seva homòloga bovina, l'HP-RNasa ha estat més difícil de caracteritzar degut a la poca quantitat de proteïna present en el pàncrees i, evidentment, a la dificultat d'obtenir el teixit biològic d'origen. Per tot això, la seva purificació fins a homogeneïtat no es va aconseguir fins als treballs de Weickmann (Weickmann *et al.*, 1981; Weickmann i Glitz, 1982). La seva estructura primària fou determinada poc temps després per (Beintema *et al.*, 1984), que va obtenir una seqüència en la qual mancava la Thr de l'extrem C-terminal. La presència d'aquest últim residu fou confirmada pel mateix grup i per (Ribó *et al.*, 1994), mitjançant la determinació de la seqüència de nucleòtids del gen que la codifica.

L'HP-RNasa presenta un 70 % d'identitat de seqüència amb la seva homòloga bovina, l'RNasa A, amb qui comparteix la capacitat de degradar l'RNA específicament a l'extrem 3' de les bases pirimidíniques (veure FIGURA 1.5). 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. I cal destacar també la presència de set residus de Pro, quatre dels quals es troben en la mateixa posició en l'RNasa A, mentre que els altres tres hi són absents (posicions 19, 50 i 101) (Beintema *et al.*, 1984).

FIGURA 1.5.

RNasa A	KETAAAKFERQHMDSSSTSAASSSNYCNQMMKSRNL	35
HP-RNasa	KESRAKKFORQHMDSDSSPSSSSTYCNQMMRRRNM	35
RNasa A	TKDRCKPVNTFVHESLADVQAVCSQKNVACKNGQT	70
HP-RNasa	TQGRCKPVNTFVHEPLVDVQNVCFQEKVTCKNGQG	70
RNasa A	NCYQSYSTMSITDCRETGSSKYPNCAYKTTQANKH	105
HP-RNasa	NCYKSNSSMHIITDCRLTNGSRYPNCAYRTSPKERH	105
RNasa A	IIVACEGNPYVPVHFDASV----	124
HP-RNasa	IIVACEGSPYVPVHFDASVEDST	128

Comparació de les seqüències d'aminoàcids de l'HP-RNasa i l'RNasa A. Els residus assenyalats en requadres negres corresponen a canvis en la seqüència. Alineació realitzada utilitzant el programa CLUSTAL w (1.82), Multiple Sequence Alignments (Thompson *et al.*, 1994a).

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 de poli(C) en relació al poli(U), amb l'òptim d'activitat proper a pH 8,0. No obstant, l'HP-RNasa és més activa sobre RNA de doble cadena i té una acció desestabilitzadora del DNA més important (Sorrentino, 1998).

1.2.2.1. Producció heteròloga de l'HP-RNasa

Donada la dificultat d'obtenir la proteïna a partir de la seva font natural, diferents laboratoris consideraren com alternativa l'obtenció de l'enzim mitjançant el clonatge i l'expressió heteròloga del gen que el codifica. S'empraren sistemes d'expressió tant de tipus procariota com eucariota. Els darrers es van descartar ja que produïen proteïna heterogènia, degut a la incorporació de glicosilacions (Bal i Batra, 1997; Boix *et al.*, 1996; Futami *et al.*, 1995; Ribó *et al.*, 1996; Russo *et al.*, 1993).

En el nostre laboratori s'optà també per la producció heteròloga de l'HP-RNasa, emprant un gen sintètic (Ribó *et al.* 1996) i un sistema d'expressió periplàsmica 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 (Torrent *et al.*, 1999). Sorprenentment, els rendiments que es van obtenir amb l'enzim humà foren molt inferiors (> 1 mg proteïna per litre de cultiu), la qual cosa obligà a millorar el sistema de producció heteròloga de l'HP-RNasa tant a nivell d'expressió del gen com de recuperació de la proteïna.

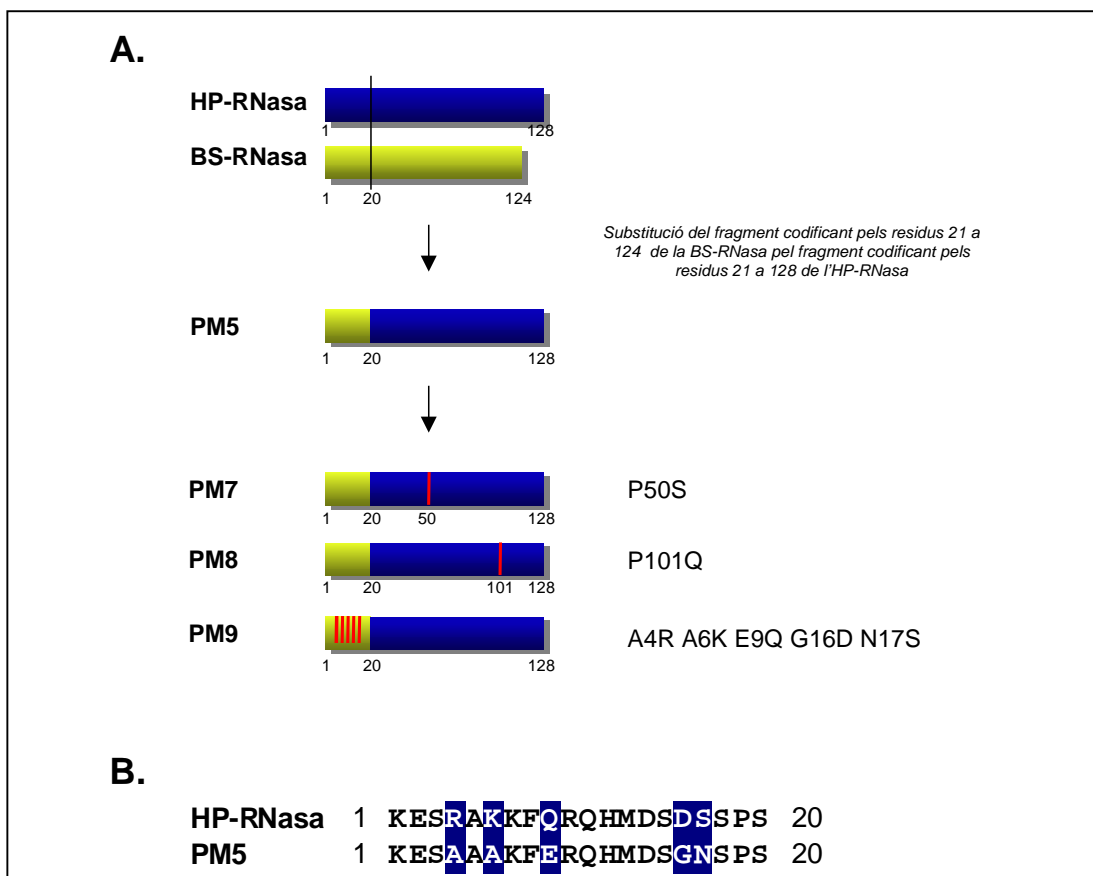
Així mateix, la producció de BS-RNasa mitjançant un sistema d'expressió cel·lular proporciona un elevat rendiment d'expressió del gen, el qual codifica per una proteïna que presenta un 80 % d'identitat de seqüència amb l'RNasa A (Kim i Raines, 1993). Aquest elevat rendiment s'atribueix a l'estructura secundària de l'extrem 3' de l'm-RNA codificant per l'enzim, tant a nivell del primer triplet d'inici de la traducció com de la seqüència de Shine-Dalgarno, 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 codificants pels residus 1 a 20) i la seqüència del gen que codifica pels residus 21 a 128 de l'HP-RNasa (Canals *et al.*, 1999) (FIGURA 1.6A). Amb aquesta construcció es va aconseguir conservar l'estructura de l'extrem 5' de l'm-RNA codificant per l'enzim boví i així afavorir l'expressió del gen. Aquest va presentar nivells d'expressió similars als descrits per la BS-RNasa. 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 *et al.* 1999) (veure FIGURA 1.6B).

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. Per això, i a fi de millorar els nivells de recuperació de la proteïna, es va procedir a substituir els residus de Pro extra de la

1. Introducció

seqüència de l'HP-RNasa. Concretament les Pro de les posicions 50 i 101, substituint-les pels aminoàcids corresponents a les mateixes posicions en la seqüència de l'RNasa A. L'objectiu era millorar les etapes de repliegament i oxidació del procés de purificació de l'HP-RNasa, mitjançant de l'eliminació dels passos de plegament lent, possiblement promoguts per l'existència d'enllaços X-Pro en conformació *cis*. Cal esmentar que en el moment en que es van dissenyar aquestes variants, l'estructura tridimensional de l'HP-RNasa no es coneixia i que, per tant, no era possible conèixer l'estat isomèric dels seus enllaços X-Pro. Així es van obtenir dues noves variants, anomenades PM7 i PM8, les quals incorporaven les substitucions Pro50Ser i Pro101Gln sobre PM5, respectivament (FIGURA 1.6A). Amb aquests canvis, el rendiment de recuperació de proteïna va millorar, tot i que s'arribava a assolir els nivells obtinguts amb les dues ribonucleases bovines homòlogues de l'HP-RNasa prèviament esmentades (Canals *et al.*, 1999; Ribó *et al.*, 2001).

FIGURA 1.6.



Esquema de l'obtenció de les proteïnes híbrides PM5, PM7, PM8 i PM9. (A) Esquema global d'obtenció de la construcció híbrida PM5, a partir dels gens codificants per la BS-RNasa (en groc), i l'HP-RNasa (en blau). (B) Comparació de les seqüències corresponents a l'extrem N-terminal de l'HP-RNasa i PM5. Ambdós segments es diferencien en només 5 posicions (ombregat en blau).

Per últim, a partir de PM5 es va redissenyar el gen de l'HP-RNasa salvatge, eliminant les 5 diferències existents i intentant mantenir l'extrem 5', a fi d'assegurar l'estructura de l'm-RNA que permetia els elevats nivells d'expressió del gen. Aquesta nova construcció, corresponent a l'enzim salvatge, es va anomenar PM9 (FIGURA 1.6A).

Totes les construccions esmentades van permetre l'obtenció de proteïnes pures i homogènies, que presentaren unes característiques cinètiques similars a les presentades per l'RNasa A (Canals *et al.* 1999; Ribó *et al.* 2001). És important remarcar no obstant, que la termoestabilitat de les proteïnes híbrides (PM5, PM7 i PM8) va ser superior a la de la proteïna salvatge (PM9) (Benito *et al.*, 2002). Recentment s'ha descrit que la major estabilitat enfront de la temperatura de PM5 respecte a PM9 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'hel·lipticitat de l'extrem N-terminal de la proteïna (Benito *et al.* 2002).

La contribució dels residus de Pro a un replegament més lent només podia evidenciar-se per mitjà de la resolució de les estructures cristal·logràfiques corresponents a cadascuna de les construccions (PM5, PM7 i PM8). Tanmateix, només les dues darreres estructures es van poder resoldre per cristal·lografia: PM7 i PM8. Aquestes van demostrar que les tres Pro extrems de l'HP-RNasa es trobaven en configuració *trans*, de manera que es descartava la possibilitat que l'increment en el rendiment de purificació de la variant PM7 fos degut a la pèrdua de la conformació *cis* de l'enllaç Glu49-Pro50, el qual s'havia postulat que podria ser en part el responsable d'introduir etapes lentes durant el replegament de l'HP-RNasa. De tota manera, els residus de Pro poden afectar la cinètica de plegament encara que no formin un enllaç *cis* amb el residu precedent, tal com passa amb la Pro117 de l'RNasa A (Dodge i Scheraga, 1996; Houry *et al.*, 1994). El sol fet de presentar tres residus de Pro més que l'RNasa A ja pot ser motiu suficient per a dificultar el procés de plegament de l'HP-RNasa. De fet, per bé que la substitució de la Pro50 pel residu present a la mateixa posició en l'RNasa A contribueix a una millora en el rendiment de la purificació, aquest rendiment no arriba a ser equiparable a l'obtingut per l'RNasa A.

1.2.2.2. Determinació de l'estructura tridimensional de l'HP-RNasa: PM7 i PM8

Gràcies a l'augment dels rendiments d'obtenció de forma pura i homogènia tant de les diferents variants de l'HP-RNasa com de la proteïna salvatge, va ser possible abordar estudis estructurals (Canals *et al.*, 2001; Pous *et al.*, 2000). Així, es van assajar diverses condicions de cristal·lització. Mentre que la proteïna salvatge no va cristal·litzar en cap de les condicions utilitzades, per les proteïnes PM7 i PM8 sí que es van obtenir cristalls, els quals van permetre la resolució de la seva estructura cristal·logràfica.

L'obtenció en primer lloc de l'estructura de PM7 (Pous *et al.*, 2000) suposà la primera aproximació per difracció de raigs X a l'estructura tridimensional de l'HP-RNasa. Com ja s'ha detallat, les úniques diferències a nivell de seqüència entre PM7

i l'HP-RNasa es troben a les posicions 4, 6, 9, 16 i 17 de l'extrem N-terminal, i a la posició 50 localitzada al llaç $\beta 1\alpha 3$. Donats els pocs canvis que incorpora PM7, la seva estructura es pot considerar com a representativa de la de l'HP-RNasa salvatge.

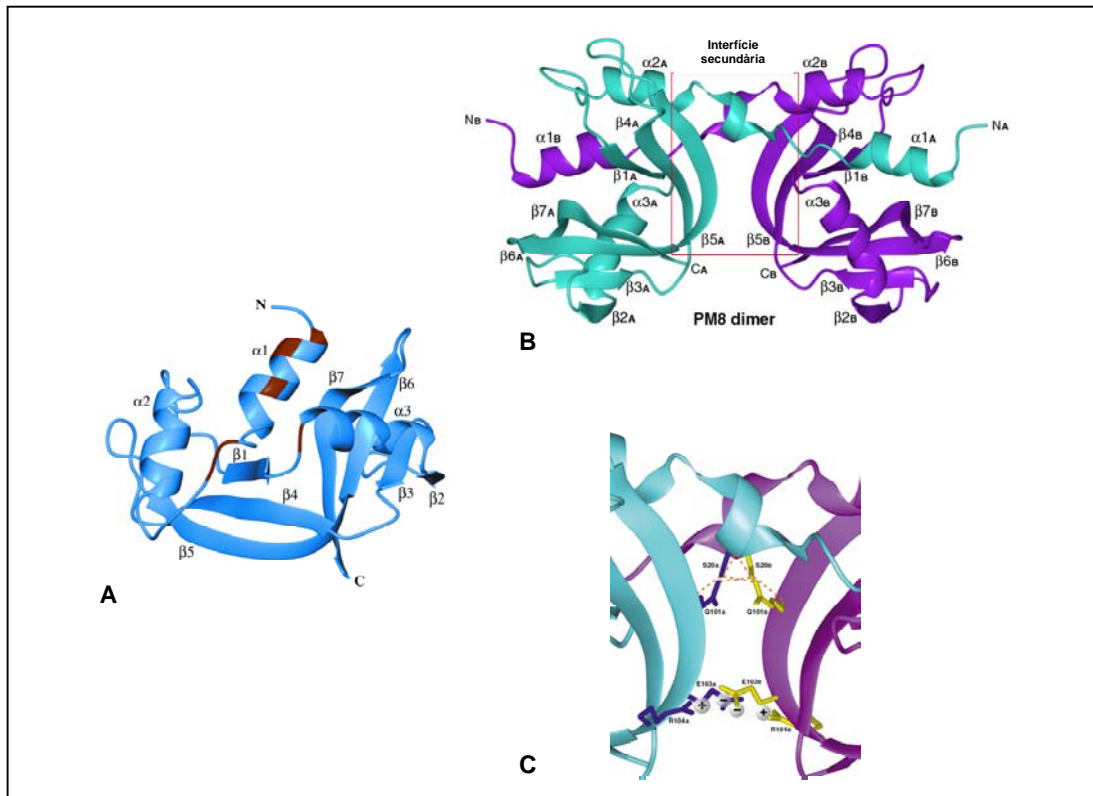
PM7 va presentar una estructura tridimensional (FIGURA 1.7A) pràcticament idèntica a la de la seva homòloga bovina, mostrant els mateixos elements d'estructura secundària i una arquitectura del centre catalític i dels subetis no catalítics també similars, fet que permet explicar la similitud de comportament cinètic entre l'HP-RNasa i l'RNasa A. Així mateix, la informació obtinguda a partir de l'estructura de PM7 descarta la possibilitat que l'extrem C-terminal de la proteïna humana adopti una estructura en hèlix α , tal i com s'havia proposat en el treball de Bal i Batra (1997) a partir de prediccions basades en anàlisis per difracció de raigs X. Segons les dades extretes de PM7, aquest extrem de la proteïna presenta una l'estructura en cadena β , com a mínim fins al residu 126. Les principals diferències però entre l'HP-RNasa i l'RNasa A es troben en els llaços que connecten els diversos elements d'estructura secundària, especialment els llaços $\alpha 2\beta 1$, $\beta 2\beta 3$ i $\beta 4\beta 5$, els quals, tal i com es veurà més endavant, són importants en el reconeixement de les diferents ribonucleases pel seu inhibidor proteic o hRI (Pous *et al.* 2000).

L'estructura de PM8 (Canals *et al.* 2001) va resultar ser dimèrica, presentant un intercanvi dels dominis N-terminals entre les dues subunitats del complex. Aquest intercanvi es manté gràcies les interaccions promogudes pel canvi de la Pro101 per un residu de Gln (FIGURA 1.7B), ja que aquest residu estableix quatre ponts d'hidrogen amb els residus Ser20. Així, cadascun dels dos residus Gln101 del dímer estableix tres enllaços per ponts d'hidrogen, un amb el residu Ser20 de la seva pròpia cadena, i els altres dos amb el residu Ser20 de l'altra cadena, a més a més de participar en interaccions d'apilament amb la Pro19 i la Tyr25. La Gln101 promou també l'establiment de dos ponts salins intermoleculars, que tenen lloc entre residus molt propers: el Glu103 d'una cadena i l'Arg104 de la cadena veïna, les cadenes laterals dels quals s'enfronten entre molècules diferents tal i com es mostra a la FIGURA 1.7C. Aquest conjunt d'interaccions es produeixen en l'anomenada interfície secundària o oberta del dímer, és a dir, en la regió d'interacció entre les dues subunitats on no participa el domini intercanviat.

Tot i l'intercanvi, la posició relativa que prenen els dominis N-terminal d'una molècula i C-terminal de l'altra és, per a cada conjunt, la mateixa que prenen a les estructures monomèriques de PM7 o l'RNasa A. Per tant, l'estructura de cada subunitat, tot i estar formada per dues cadenes, és molt similar a la descrita per PM7, mantenint-se fins hi tot els centres actius que en PM8 són mixtes. Aquest tipus d'intercanvi per a la formació de dímers no és nou en el món de les ribonucleases, ja que s'han descrit estructures dimèriques per intercanvi de dominis N-terminal en el cas de l'RNasa A (Liu *et al.*, 1998) i de la BS-RNasa (Mazzarella *et al.*, 1993). Cal esmentar que l'estructura quaternària global de PM8 sí que és totalment diferent a la descrita per les altres formes dimèriques. Al contrari del que passa amb el dímer natural de la BS-RNasa (veure APARTAT 1.3.4), no existeix cap tipus d'interacció covalent entre les dues cadenes que formen el dímer de PM8. Així, l'estructura

dimèrica es manté gràcies a interaccions no covalents localitzades tant a l'anomenda interfície primària (conjunt d'interaccions entre residus del domini N-terminal i residus del domini C-terminal) com en la interfície secundària.

FIGURA 1.7.



Representació de les estructures tridimensionals de les variants PM7 i PM8. (A) Representació tridimensional de PM7. (B) Representació tridimensional de PM8 dimèrica. (C) Detall de la regió emmarcada, on es mostren les interaccions que tenen lloc a la interfície secundària. Els ponts d'hidrogen, tant intramoleculars com intermoleculars, que s'estableixen entre les Gln101 i les Ser20 de totes dues cadenes s'indiquen mitjançant línies discontinües vermelles. Els parells iònics antiparalels (residus Glu103 i Arg104 de totes dues cadenes) estan representats per esferes blanques amb el signe de la seva càrrega corresponent. Figures creades amb MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996).

1.3. Ribonucleases amb activitats biològiques especials

L'interès en l'estudi de les ribonucleases més enllà del simple rol com a model proteic que han exhibit històricament, ha renaixut arran del descobriment de ribonucleases amb funcions especials (Risbases) (veure APARTAT 1.1.2). 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 l'HIV, 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 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). Pel que fa als vertebrats, existeixen certs membres de la superfamília de l'RNasa A que presenten activitat citotòxica específicament sobre cèl·lules malignes, desencadenant la resposta apoptòtica. Entre ells varies ribonucleases d'origen amfibi, l'onconasa i dues lectines (provinents de *Rana pipiens*, *R. catesbeiana* i *R. japonica*, respectivament) i la BS-RNasa, d'origen boví. I d'altres, com l'angiogenina, capaces de promoure el desenvolupament de nous vasos sanguinis.

En el cas de les ribonucleases citotòxiques, aquesta activitat 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 degradant 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 condueix 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 catalitzar aquest substrat tot i la presència d'inhibidors. Tot seguit es descriuen les principals ribonucleases amb activitats especials (l'angiogenina i les ribonucleases citotòxiques), que resulten interessants per a comparar l'enzim objecte d'estudi del present treball: l'HP-RNasa.

1.3.1. α -Sarcina

Aquesta ribonucleasa pertany a la família de l'RNasa T₁. Es tracta d'un enzim bàsic, no glicosilat, de 17.000 Da de massa molecular, aïllat a partir del fong *Aspergillus giganteus* (MDH18894) (Olson i Goerner, 1965; Olson *et al.*, 1965). La seva funció biològica precisa es desconeix, tot i que es creu que està relacionada amb el metabolisme de l'RNA per la nutrició o la defensa del fong que la produeix.

Aquesta ribonucleasa ha demostrat ser capaç d'inhibir el creixement de tumors en ratolins, concretament del sarcoma 180 i del carcinoma 755 (Olson i Goerner, 1965). Tanmateix, i malgrat els prometedors resultats inicials, les anàlisis clíniques van mostrar la poca efectivitat d'aquest enzim com a agent quimioterapèutic, a causa de la seva poca especificitat i dels efectes secundaris que provoca. Tot i aquestes

objeccions, alguns autors van reprendre l'estudi d'aquest enzim, essent la primera ribonucleasa a ser utilitzada com a domini tòxic en la generació d'immunotoxines (Conde *et al.*, 1989; Wool, 1997). L'efectivitat terapèutica d'aquestes construccions però, tampoc va demostrar ser satisfactòria.

La seva toxicitat és fruit de la inactivació dels ribosomes mitjançant el trencament del de l'rRNA 28S (Endo *et al.*, 1993a; Endo *et al.*, 1993b), a nivell d'una seqüència específica i molt ben conservada. Per evitar ser malmès per la seva pròpia toxina, *Aspergillus* la produeix en forma de protoxina (Endo *et al.*, 1993a; Endo *et al.*, 1993b), la qual no és activada fins al moment de la seva secreció. El mecanisme pel qual aquest enzim s'internalitza en les cèl·lules sobre les que actua és encara desconegut, tot i que sembla ser que no interacciona amb cap receptor proteic específic.

1.3.2. Onconasa

L'onconasa, o P-30, és una proteïna purificada inicialment a partir d'embrions i d'òocits de *Rana pipiens* que ha demostrat una important activitat citotòxica. Es tracta d'una proteïna de 104 residus, molt bàsica, amb una massa molecular de 11.816 Da i que presenta un 28 % d'homologia de seqüència amb l'RNasa A (Ardelt *et al.*, 1991). Presenta 4 ponts disulfur, tres dels quals es conserven en l'RNasa A. L'enllaç Cys65-Cys72 és substituït en l'onconasa per un enllaç Cys87-Cys104. Aquestes diferències estructurals incrementen extraordinàriament la seva estabilitat (la $T_{1/2}$ de l'onconasa és de 90°C, gairebé 30°C més que l'RNasa A) (Leland *et al.*, 1998). L'eliminació del pont disulfur C-terminal no només afecta l'estabilitat de l'enzim, sinó que a més en compromet la citotoxicitat.

Una de les majors diferències estructurals entre l'RNasa A i l'onconasa es troba a l'extrem N-terminal. En l'RNasa A, la Lys1 s'extén lluny del centre catalític de la proteïna. En canvi en l'onconasa, el primer residu de la seqüència, la Glu1, cicla a àcid piroglutàmic (Pyr1), el qual plega l'hèlix- α N-terminal contra el cos de la proteïna, per mitjà de la formació de ponts d'hidrogen amb el residu Val96 (situat en la fulla β de l'extrem C-terminal) i amb la Lys9, un residu del centre actiu encarregat de la interacció amb els grups fosfat del substrat (Mosimann *et al.*, 1994). Per les característiques del seu extrem N-terminal, juntament amb la participació del residu C-terminal en la formació d'un pont disulfur, l'estructura tridimensional de l'onconasa és molt més compacta que la de l'RNasa A.

A l'igual que l'RNasa A, l'onconasa catalitza el trencament en l'RNA de l'enllaç P-O^{5'} a l'extrem 3' de nucleòtids de pirimidina. Els principals residus implicats en la catàlisi de l'RNasa A es conserven en l'onconasa, fet que suggereix que ambdues proteïnes utilitzen un mecanisme similar de catàlisi. Malgrat això, cal remarcar la importància del residu de Pyr N-terminal en l'activitat de l'enzim. Tot i que el seu paper no és encara del tot conegut, la no ciclació de la Glu a Pyr com a conseqüència de la presència d'un residu extra a l'extrem N-terminal (fet que es produeix, per exemple, quan l'onconasa s'expressa de forma recombinant en el citoplasma de

cèl·lules bacterianes) disminueix dràsticament l'activitat enzimàtica i, en conseqüència, les seves propietats citotòxiques (Boix *et al.*, 1996). Ja que, tot i ser 1000 vegades menys activa que l'RNasa A (Ardelt *et al.*, 1991), l'activitat de l'onconasa ha demostrat ser essencial per la seva toxicitat (Newton *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1993).

Les conseqüències fisiològiques de la seva acció catalítica fan de l'onconasa un agent citostàtic, aturant el cicle cel·lular a la fase G1 (Darzynkiewicz *et al.*, 1988; Juan *et al.*, 1998); i citotòxic (Wu *et al.*, 1993). Les cèl·lules en proliferació activa són més sensibles a l'acció citotòxica de l'onconasa que les quiescents (Smith *et al.*, 1999). L'onconasa té també una acció antivírica, inhibint la replicació de l'HIV-1 a través de la seva activitat sobre l'RNA viral (Saxena *et al.*, 1996).

Actualment, l'onconasa es troba en fase III d'assajos clínics per al tractament del mesotelioma maligne i de l'adenocarcinoma pancreàtic (Mikulski *et al.*, 2002). Malgrat ser una proteïna d'origen amfibi, la similitud que mostra respecte la seva homòloga humana fa que sigui ben tolerada pel sistema immunològic, provocant només toxicitats moderades i reversibles després d'administrar-se repetidament. Els assajos clínics de fase I i II en humans pel tractament de diversos tumors sòlids, incloent càncer de pulmó i de pàncrees, van mostrar un impacte favorable en la supervivència dels pacients, amb efectes secundaris lleus i reversibles, consistents bàsicament en toxicitat renal (Mikulski *et al.*, 1998). Aquest enzim s'ha utilitzat en assajos clínics també en combinació amb altres agents quimioterapèutics, per tal d'evitar el fenomen de resistència tumoral a les drogues; i com a component tòxic en la generació d'immunotoxines (Newton *et al.*, 2001; Vasandani *et al.*, 1999).

1.3.3. Lectines de *Rana catesbeiana* i *R. japonica* (cSBL i jSBL)

Les lectines són proteïnes àmpliament distribuïdes en animals, plantes i fongs, que s'uneixen específicament als receptors d'àcid siàlic de superfície cel·lular (per la qual cosa reben el nom de *Sialil glicoprotein Binding Lectin* o SBL). Es caracteritzen per la seva capacitat d'aglutinar cèl·lules via reconeixement d'estructures glucídiques concretes.

Al llarg d'una sèrie de treballs encaminats a l'estudi dels factors de creixement implicats en el desenvolupament dels ous i els embrions d'amfibi, es van descobrir dues lectines amb activitat ribonucleolítica, que compartien el 80 % de la seva seqüència (Titani *et al.*, 1987). S'havien purificat a partir dels oòcits de *Rana catesbeiana* i de *R. japonica*, i eren ser capaces d'aglutinar específicament cèl·lules tumorals (Sakakibara *et al.*, 1976). La seva citotoxicitat va demostrar ser similar a la presentada per l'onconasa (Nitta *et al.*, 1993), amb la que compartien una homologia de seqüència del 50 %. Degut a la seva estructura, es van incloure dins la superfamília de l'RNasa A, amb qui mostraren una homologia de seqüència del 28 i del 37 %, respectivament (Kawauchi *et al.*, 1975; Lewis *et al.*, 1989; Nitta *et al.*, 1993).

L'estructura de la lectina provinent de *R. catesbeiana* (cSBL) és similar a la de l'onconasa. Presenta 4 ponts disulfur en les mateixes posicions, i té també una elevada termoestabilitat ($T_{1/2} > 75^{\circ}\text{C}$). L'estructura de la lectina provinent de *R. japonica* (jSBL) de moment no ha estat tant ben caracteritzada, però conserva els mateixos residus de Cys i una estabilitat també similar a la de l'onconasa. Ambdues lectines catalitzen el trencament en l'RNA de l'enllaç P-O^{5'} al costat 3' dels nucleòtids de pirimidina i la seva activitat enzimàtica és essencial per a la toxicitat (Nitta *et al.*, 1993).

1.3.4. BS-RNasa

Les glàndules seminals bovines produeixen la proteïna BS-RNasa, la qual es localitza en el fluid seminal a una concentració d'1,5 mg/ml (D'Alessio, 1993). Aquest enzim, que en la seva forma monomèrica presenta una massa molecular de 13.600 Da, pertany a la superfamília de l'RNasa A, amb qui presenta un 80 % d'homologia de seqüència (Suzuki *et al.*, 1987), i és l'únic membre d'aquest grup d'enzims que presenta estructura quaternària.

La BS-RNasa és una proteïna homodimèrica, cadascuna de les subunitats de la qual està formada per 124 residus i presenta 4 enllaços disulfur. Els dos monòmers s'interconnecten mitjançant dos ponts disulfur addicionals intercatenaris (Cys31-Cys32 d'una subunitat i les Cys31-Cys32 de l'altra), donant lloc a dues formes dimèriques que coexisteixen. En la primera, cadascuna de les subunitats reté el seu propi extrem N-terminal. En la segona, els dos monòmers intercanvien aquest segment (Kim *et al.*, 1995b; Piccoli *et al.*, 1992) i, com a conseqüència d'aquest intercanvi, el centre actiu de cada monòmer està constituït per residus que pertanyen a l'altre: la His 12 d'una subunitat, i la His 119 provinent de l'altra.

A l'igual que la seva homòloga pancreàtica, la BS-RNasa té activitat ribonucleasa pirimidina específica i un mecanisme de catàlisi similar, en dues etapes. Però es diferencia per presentar més activitat enfront d'RNA de doble cadena i d'híbrids RNA-DNA (Thompson *et al.*, 1994b). Les activitats biològiques d'aquest enzim són estrictament dependents de la seva activitat ribonucleolítica (Rybak i Newton, 1999).

El seu paper fisiològic sembla estar relacionat amb un efecte immunosupressor, que protegeix les cèl·lules espermàtiques del fluid seminal del sistema immunitari de l'organisme femella. S'ha comprovat també que la BS-RNasa exerceix una potent acció citotòxica específicament contra cèl·lules tumorals, tant en experiments *in vitro* com *in vivo*. Les bases d'aquesta especificitat, però, es desconeixen. Totes aquestes activitats són també estrictament dependents de l'activitat ribonucleolítica de la proteïna (D'Alessio, 1997). Les propietats citotòxiques de la BS-RNasa estan associades només a la forma dimèrica de l'enzim amb els extrems N-terminal intercanviats (enzimàticament activa) (Soucek *et al.*, 1996).

1.3.5. Ribonucleases derivades d'eosinòfil: ECP i EDN

Els leucòcits eosinòfils són les cèl·lules encarregades de la primera línia de defensa de l'organisme contra la invasió de paràsits, i poden presentar també activitat antitumoral. Aquestes cèl·lules es caracteritzen per tenir una gran quantitat de grànuls citoplasmàtics, que alliberen el seu contingut al medi en resposta a una infecció parasitària o a una reacció d'hipersensibilitat (Gleich *et al.*, 1995). Algunes de les proteïnes incloses en aquests grànuls són citotòxiques, i entre elles trobem la *neurotoxina derivada d'eosinòfil* (EDN, RNasa 2), que també pot trobar-se al fetge, pulmó i placenta; i la *proteïna catiònica d'eosinòfil* (ECP, RNasa 3). Tanmateix, els mecanismes pels quals aquests enzims arriben a l'interior de la cèl·lula diana es desconeixen.

L'EDN (18,4 kDa) i l'ECP (15,5 kDa) són dues proteïnes bàsiques amb activitat ribonucleasa, que comparteixen el 65 % de la seqüència aminoacídica, i homòlogues a l'RNasa A, amb qui presenten un 30 % d'homologia de seqüència. L'activitat enzimàtica de l'EDN i l'RNasa A és equivalent, però la de l'ECP és 100 vegades inferior (Gullberg *et al.*, 1986). Ambdues proteïnes estan glicosilades, i la composició d'hidrats de carboni de l'EDN depèn del teixit d'origen (Newton i Rybak, 1998; Yamashita *et al.*, 1986) han descrit l'existència natural d'una variant “-4EDN”, en la qual hi ha quatre residus addicionals en l'extrem N-terminal (SLHV). Aquesta variant de l'enzim presenta propietats citotòxiques contra cèl·lules tumorals del sarcoma de Kaposi (KS). La raó per la qual aquesta proteïna és processada post traduccionalment per a donar lloc a la forma nativa predominant, l'EDN, es desconeix.

El seu ús en estudis clínics antitumorals es va descartar a causa de la seva elevada toxicitat sobre les cèl·lules nervioses (Youle *et al.*, 1993), ja que provocaven rigidesa muscular, atàxia i paràlisi quan s'injectaven en models animals. Posteriorment es van utilitzar com a component tòxic en la generació d'immunotoxines (Deonarain i Epenetos, 1998; Newton *et al.*, 1994), augmentant llur especificitat d'acció i eliminant els efectes secundaris derivats de la seva neurotoxicitat. L'EDN, a més de l'activitat neurotòxica que comparteix amb l'ECP, té també una acció antivírica, actuant en els mecanismes de defensa de l'hoste. L'ECP en canvi, presenta un ventall més ampli d'accions, que inclouen l'activitat citotòxica contra bacteris, paràsits helmints, virus RNA de cadena simple i cèl·lules de mamífer infectades o danyades. En l'ECP i l'EDN l'activitat ribonucleolítica és essencial per a les funcions neurotòxica i antivírica, però no per les activitats antivírica i antihelmíntica de l'ECP (Domachowske i Rosenberg, 1997).

1.3.6. Angiogenina

L'angiogènesi és un procés complex i altament regulat que condueix a la formació de nous vasos sanguinis. També està associat a situacions patològiques, en particular la neoplàsia. S'han identificat diversos factors angiogènics, entre ells l'angiogenina

(Vallee i Riordan, 1997), una ribonucleasa bàsica ($pI > 9,5$) que pertany a la superfamília de l'RNasa A, amb la qual mostra un 33 % d'identitat de seqüència. Respecte la seva homòloga bovina, l'angiogenina conserva els residus del centre actiu (His13, Lys40 i His114), i degrada preferencialment l'extrem 3' de nucleòtids de pirimidina, tot i que la seva activitat és diversos ordres de magnitud inferior. L'angiogenina humana està formada per 123 residus, i li manca el pont disulfur que en l'RNasa A uneix els residus 65-72 (Beintema *et al.*, 1988), els quals formen part d'un seti d'unió a substrat. En l'angiogenina, es creu que aquesta regió està involucrada en la interacció amb receptors de superfície cel·lular (per ara desconegut), crítics per a la resposta angiogènica (Shapiro i Vallee, 1989), però que actuen en detriment de la seva activitat catalítica.

L'angiogenina s'uneix a les cèl·lules endotelials, fibroblasts i miòcits. Aquesta interacció condueix a la producció de missatgers secundaris, fet que explica l'efecte mitogènic d'aquesta proteïna, estimulant la proliferació cel·lular. Diversos estudis han demostrat també que l'angiogenina és internalitzada per endocitosi i que s'acumula al nuclèol, on probablement actua sobre l'rRNA. La seqüència de transport nucleolar RRRGL (residus 31 a 35) és la responsable aquesta localització. Tanmateix, es desconeixen encara els detalls precisos del trànsit intracel·lular que la condueix a la seva destinació final, el nuclèol. Des d'aquest compartiment pot actuar o bé com agent regulador de la transcripció de determinats gens, o bé sobre la biosíntesi dels ribosomes. El que sí s'ha demostrat és que la capacitat angiogènica és totalment dependent de la seva activitat ribonucleolítica en el nuclèol (Vallee i Riordan, 1997).

L'angiogenina és una proteïna extracel·lular sintetitzada pel fetge, que circula pel plasma humà en forma ja activa i a una concentració de 250-500 ng/ml. Malgrat això, no provoca la proliferació de nous vasos sanguinis de manera indiscriminada. Una explicació a aquesta paradoxa és que les cèl·lules endotelials no són sensibles a l'angiogenina en condicions normals. D'acord amb aquesta hipòtesi, s'ha comprovat que en condicions de cultiu *in vitro*, les cèl·lules endotelials confluents no són sensibles a l'angiogenina aplicada al medi. Per contra, cultius esparsos sí que ho són, fet que promou la síntesi de nou DNA i la proliferació cel·lular. Aquests resultats suggereixen que només les cèl·lules no confluents expressen un receptor per a l'angiogenina. Així doncs, el paper de l'angiogenina plasmàtica podria ser el de promoure la cicatrització de ferides que han afectat al teixit vascular (Badet, 1999). Quan una lesió provoca una certa pèrdua d'integritat vascular, la conseqüent disrupció en la confluència de les cèl·lules endotelials promourà una acumulació local d'angiogenina, la qual al seu torn facilitarà la neovascularització i la reparació del teixit danyat. En determinats tumors sòlids, les cèl·lules malignes alliberen angiogenina al medi per tal de promoure la formació de nous vasos sanguinis per irrigar al tumor en formació i permetre el seu creixement. La utilització de molècules inhibidores de l'angiogenina, com ara anticossos monoclonals dirigits específicament contra ella o l'angiostatina, ha mostrat ser una bona teràpia per atacar l'angiogènesi i frenar el creixement tumoral (Hu *et al.*, 1997; Vallee i Riordan, 1997).

1.4. Factors que poden determinar la citotoxicitat de les ribonucleases

1.4.1. Unió a superfície cel·lular

Per exercir les seves propietats citotòxiques, una ribonucleasa ha d'assolir l'interior cel·lular. La unió a la superfície de les membranes plasmàtiques es pot produir de dues maneres, o bé a per la interacció amb receptors proteics de superfície, o bé per mitjà d'interaccions electrostàtiques entre l'enzim i els hidrats de carboni lligats als lípids o a les proteïnes de la membrana, encarregats de conferir la càrrega negativa present a la cara externa de la bicapa lipídica. Així doncs, l'especificitat de la interacció de les ribonucleases amb les cèl·lules pot venir determinada o bé per proteïnes de membrana específiques, o bé per agrupacions més o menys específiques de lípids.

Per a les dues lectines citotòxiques provinents de *R. catesbeiana* i *R. japonica* s'ha descrit una interacció específica amb glicoproteïnes de superfície en línies cel·lulars tumorals (Nitta *et al.*, 1994). Per a l'onconasa i la BS-RNasa s'han descrit també llocs específics d'unió a membrana (Bracale *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 1995a; Leland i Raines, 2001), però no s'ha identificat l'existència de cap receptor proteic. Certs autors suggereixen que la internalització d'aquestes proteïnes es produeix mitjançant un mecanisme no dependent de receptor específic (Haigis *et al.*, 2002; Mastronicola *et al.*, 1995; Olmo *et al.*, 2001).

S'ha demostrat que molècules carregades positivament interaccionen més fàcilment amb els glicolípid i les glicoproteïnes de la superfície cel·lular, que estan carregats negativament. I es postula que aquesta interacció promou la internalització d'aquestes molècules. Així mateix, moltes línies cel·lulars tumorals presenten una quantitat superior de fosfolípids a membrana plasmàtica en relació a llurs corresponents no tumorals, fet que els confereix una càrrega més electronegativa (Ran *et al.*, 2002). Això determina que la basicitat d'una molècula sigui una propietat molt interessant quan hom es planteja desenvolupar-la com a agent quimioterapèutic, ja que pot facilitar la seva interacció amb les membranes i la seva posterior internalització.

En base a aquestes dades, la 'cationització' es considera una estratègia per promoure la internalització cel·lular de proteïnes. D'acord amb això, la modificació química de grups carboxil de l'RNasa A i l'HP-RNasa ha demostrat promoure l'adquisició de propietats citotòxiques per part dels enzims (Futami *et al.*, 2001; Futami *et al.*, 2002). En aquest sentit cal fer referència a estudis previs en els quals s'afirma que la BS-RNasa pot permeabilitzar membranes sintètiques neutres o carregades negativament gràcies a la seva basicitat (Mancheno *et al.*, 1994). Així mateix, recentment s'ha suggerit que l'activitat bactericida de l'ECP està relacionada amb aminoàcids bàsics de la seva superfície (Carreras *et al.*, 2003).

1.4.2. Vies de trànsit intracel·lular i translocació al citoplasma

S'ha demostrat que l'RNasa A nativa només és citotòxica quan és introduïda de manera artificial a l'interior d'una cèl·lula (Rybak *et al.*, 1991; Saxena *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1999). En canvi, l'onconasa provoca apoptosi tant si és aplicada al medi com si és microinjectada en les cèl·lules (Smith *et al.*, 1999). Aquests resultats indiquen que la toxicitat de les ribonucleases depèn de la seva internalització, i que és independent de processos de senyalització mediat per receptors de superfície cel·lular. Així doncs, a fi d'exercir la seva activitat, una ribonucleasa citotòxica ha de ser capaç d'internalitzar-se en les cèl·lules diana.

En el cas de la BS-RNasa (Bracale *et al.*, 2002), l'onconasa i l'RNasa A (Haigis *et al.*, 2002), els enzims penetren en la cèl·lula via endocitosis mediada per endosomes àcids. Per als dos darrers enzims, aquest mecanisme ha demostrat ser clatrina- i dinamina independent (Haigis i Raines, 2003).

Una vegada internalitzada, la ribonucleasa és conduïda des de la superfície a la seva destinació final a l'interior de la cèl·lula, on degradarà l'RNA, provocant així la seva mort. Una estació essencial en aquest "viatge" és el punt de *translocació*, és a dir, el compartiment vesicular que l'enzim travessa per arribar al citoplasma.

A diferència de diverses toxines vegetals i bacterianes, que contenen un domini específic de translocació (Montecucco *et al.*, 1994; Pelham, 1992), les ribonucleases estan constituïdes per un únic domini. A més a més, les ribonucleases són catióniques, no lipofíliques, i els seus 4 enllaços disulfur els imposen una rigidesa important (els ponts disulfur han de romandre intactes durant la translocació, perquè l'ambient reductor del citoplasma no en permetria la reoxidació). Totes aquestes particularitats fan difícil que una molècula de ribonucleasa sigui capaç d'inserir-se en la bicapa lipídica i travessar la membrana del compartiment vesicular que la conté. La citotoxicitat associada a les ribonucleases és, doncs, probablement el resultat de la translocació d'un nombre reduït de molècules, que resulten ser suficients per matar una cèl·lula (Saxena *et al.*, 1991).

Les vies de transport intracel·lular seguides per les ribonucleases, així com el punt de translocació al citoplasma, encara es desconeixen. S'ha suggerit que una mateixa ribonucleasa pot seguir diverses vies de trànsit, d'entre les quals només una la conduirà al compartiment on la translocació és possible (via productiva). Aquesta hipòtesi podria explicar perquè la BS-RNasa, malgrat que és internalitzada per totes les cèl·lules, és tòxica només en les tumorals (Mastronicola *et al.*, 1995). Probablement, el metabolisme de les cèl·lules malignes determina que la BS-RNasa emprengui una via de transport productiva.

Una via possible de trànsit podria incloure el transport dels enzims des dels endosomes a la xarxa *trans* de l'aparell de Golgi (*trans golgi network*, TGN), i d'aquí al reticle endoplasmàtic (via de transport retrògrada), produint-se la translocació a citoplasma en algun punt intermedi. Confirmant aquesta hipòtesi, i només en cèl·lules tumorals, s'ha observat que la BS-RNasa progressa des del

compartiment endosomal envers l'aparell de Golgi (AG), observant-se posteriorment una possible localització al nucli que calia confirmar amb nous estudis (Bracale *et al.*, 2002). Altres treballs descriuen un resultat similar per l'onconasa (Wu *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1995) i per variants citotòxiques de l'RNasa A (Haigis i Raines, 2003), quan les cèl·lules s'incuben en presència d'agents químics que actuen desorganitzant l'AG. Segons els autors, la disrupció de l'AG actua promovent una via alternativa de trànsit per les ribonucleases, que les condueix a aquest compartiment dispers, en el qual probablement la translocació al citoplasma es veu facilitada. La toxicitat dels enzims és potenciada, demostrant que el bloqueig de la via de trànsit retrògrada no és un requeriment essencial per la seva toxicitat.

En conclusió, es creu que les ribonucleases transloquen al citoplasma des d'algun compartiment anterior al reticle endoplasmàtic, tot i que es desconeix si a nivell d'endosomes o de qualsevol dels compartiments associats al sistema de l'AG.

1.4.3. Activitat catalítica i acció inhibidora de l'hRI

Una vegada translocades al citoplasma, les ribonucleases poden actuar sobre diferents tipus d'RNA cel·lular, en funció de la seva especificitat. L'onconasa degrada preferentment el tRNA (Saxena *et al.*, 2002), mentre que la BS-RNasa i l'RNasa A actuen sobre l'rRNA (Lin *et al.*, 1994). Totes aquestes activitats condueixen a la inhibició de la síntesi proteica. La relació entre aquesta inhibició i les vies de senyalització que condueixen a la mort cel·lular per apoptosi encara es desconeixen, tot i que es creu que els productes de la hidròlisi de l'RNA podrien actuar com agents reguladors del procés. Tanmateix, la unió de les ribonucleases a certs components cel·lulars podria suggerir l'existència de noves dianes d'actuació, diferents als elements de la maquinària de síntesi proteica (Batey i Doudna, 2002). Donat que actuen sobre diferents substrats, l'onconasa i l'RNasa A activen de manera diferencial la via de mort cel·lular. Així, els fibroblasts NIH/3T3 en fase exponencial de creixement són més sensibles a la toxicitat de l'onconasa que les cèl·lules quiescents, que són més sensibles a l'RNasa A (Smith *et al.*, 1999). En base a aquests resultats es va proposar que l'RNasa A té efecte en estadis primerencs de la fase G1, mentre que l'onconasa actua en un o més punts en la transició de G1 a G1/S.

L'activitat catalítica de les ribonucleases és, per tant, essencial per a la seva toxicitat, tal i com s'ha demostrat per a l'onconasa i la BS-RNasa (Rybak i Newton, 1999). Per exemple, la inhibició del 98 % de l'activitat ribonucleolítica en l'onconasa per mitjà de la seva alquilació provoca també la pèrdua de les seves propietats citotòxiques (Iordanov *et al.*, 2000; Saxena *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 1999). Així mateix, les ribonucleases d'origen amfibi, i entre elles l'onconasa, es caracteritzen pel fet que el primer residu de la seva seqüència (Pyr1) forma part del centre actiu. Quan aquests enzims s'expressen de manera recombinant, l'addició de la nova Met(-1) impedeix la ciclació del Glu-1 a Pyr1, determinant que els enzims perdin tant la seva activitat catalítica com la seva toxicitat. Aquestes propietats es recuperen quan

es reconstitueix l'extrem Pyl1, o bé quan se'l modifica per tal de recuperar les interaccions natives (Newton *et al.*, 1998).

No obstant, s'ha demostrat que l'activitat enzimàtica és necessària però no suficient per provocar una resposta tòxica en les cèl·lules. En el cas de ribonucleases de mamífer no citotòxiques, l'increment en la càrrega positiva neta per modificació química proporciona variants citotòxiques que retenen només l'1,5 % de l'activitat catalítica (Futami *et al.*, 2001). Així mateix, mutacions dutes a terme en el centre actiu de l'ECP eliminen l'activitat ribonucleasa, però no tenen efectes en l'activitat antibacteriana de la proteïna (Rosenberg, 1995). A més a més, el fet que l'onconasa mostri una toxicitat molt superior a la d'altres enzims catalíticament molt més actius que ella, evidència que tot i que l'activitat ribonucleolítica és essencial en la seva toxicitat, no n'és el factor limitant.

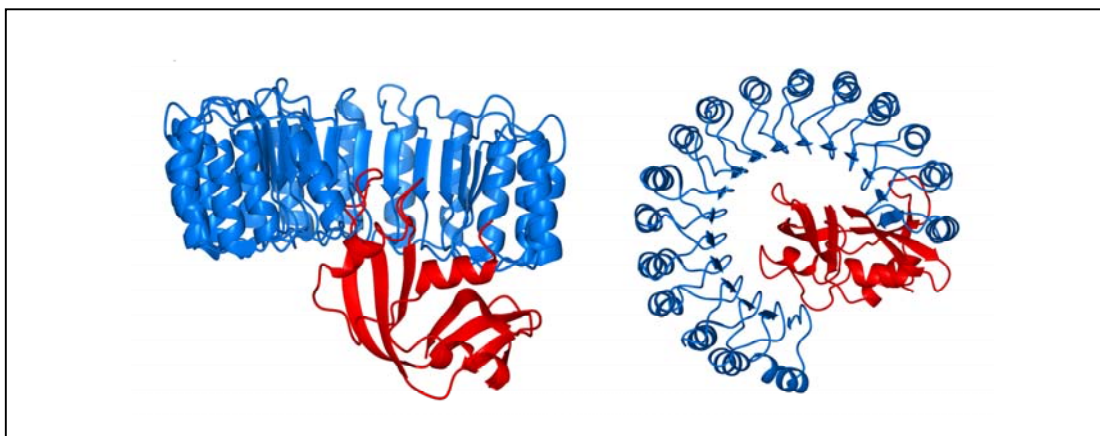
L'activitat enzimàtica de les ribonucleases citotòxiques probablement es duu a terme en el citoplasma. Per aquesta raó, una característica comuna en tots aquests enzims és la seva capacitat de defugir l'acció de l'inhibidor proteic de ribonucleases (RI). L'RI és una proteïna àcida (pI 4,7), de 50 kDa (Hofsteenge, 1997) i de localització citoplasmàtica (Roth i Juster, 1972), amb una àmplia distribució en el món animal (es troba en mamífers, aus, amfibis i insectes). En una cèl·lula de mamífer, l'RI representa entre el 0,01-0,1 % del contingut total de proteïna en el citoplasma. Es localitza en gairebé tots els teixits i presenta una arquitectura molt similar en els diversos mamífers, tant pel que fa a la seva mida (450-460 residus), composició aminoàcida (rica en Leu i Cys) com en l'estructura (formada per 16 repeticions riques en Leu, de 24-29 residus cadascuna).

L'RI forma un complex no covalent amb diverses ribonucleases, amb una estequiometria 1:1. Tal i com es mostra a la FIGURA 1.8, l'RI encercla l'enzim, bloquejant l'accés del substrat al seu centre actiu (Kobe i Deisenhofer, 1995). Una de les propietats més remarcables de l'RI és l'elevada afinitat amb què s'uneix als diversos tipus de ribonucleases, que poden diferir bastant pel que fa a seqüència d'aminoàcids, presentant constants d'inhibició de l'ordre de picomolar (Hofsteenge, 1997). Aquesta característica s'explica per dues raons. Per una banda, l'RI és capaç de realitzar petits ajustaments conformacionals que li permeten acomodar-se als diferents lligands. I per l'altra, l'extensa àrea de l'RI que participa en el contacte amb l'enzim compensa la possible falta de complementarietat entre ambdues molècules (Kobe i Deisenhofer, 1995).

Les funcions de l'RI no es coneixen amb certesa. Però la seva localització citoplasmàtica suggereix que té un paper important en la protecció dels RNAs contra les ribonucleases extracel·lulars que assoleixen l'interior de la cèl·lula. Per altra banda, es creu que presenta també una funció reguladora de les activitats biològiques de certes ribonucleases, com l'angiogenina o l'EDN. Finalment, la presència de nivells apreciables d'RI en eritròcits madurs i plaquetes, que no tenen RNA funcional, suggereix que aquesta proteïna hi duu a terme una funció no relacionada amb la inhibició de les ribonucleases (Moenner *et al.*, 1998). Les ribonucleases

intracel·lulars, implicades en el catabolisme de l'RNA en el citoplasma de les cèl·lules, són totalment insensibles a l'RI (Shapiro, 2001).

FIGURA 1.8.



Representació tridimensional de l'estructura del complex RNasa A – pRI (1DFJ; (Kobe i Deisenhofer, 1995), del qual es presenta una vista lateral (esquerra) i una visió zenital respecte l'anterior (dreta).

L'origen de l'RI determina les ribonucleases sobre les quals pot actuar. Entre les ribonucleases inhibides per l'RI humà (hRI) es troben l'RNasa A, l'HP-RNasa, l'angiogenina, l'EDN i l'ECP. Per contra, la BS-RNasa (en forma de dímer) i les ribonucleases d'origen amfibi (l'onconasa i les lectines de les espècies *R. catesbeiana* i *R. japonica*), són resistents a l'inhibidor. Sovint es relaciona la capacitat de resistència a l'RI amb la toxicitat de les ribonucleases. Aquesta hipòtesi ha promogut la generació de noves variants d'aquests enzims resistents a l'acció de l'hRI com a estratègia per obtenir nous agents quimioterapèutics.

Malgrat que tant l'onconasa com la BS-RNasa presenten una topologia molt similar a la de l'RNasa A, les regions d'interacció amb l'hRI són diferents. Així, l'estructura de les dues proteïnes tòxiques impossibilita la formació del complex amb l'hRI. Aquest bloqueig és conseqüència, o bé de la presència de residus que estableixen impediments de tipus estèric o electrostàtic, en el cas de l'onconasa (Boix *et al.*, 1996), o bé de la dimerització, en el cas de la BS-RNasa (D'Alessio, 1997). D'acord amb això, la producció de variants de l'RNasa A i de l'HP-RNasa resistents a l'hRI va resultar en l'adquisició de propietats citotòxiques (Leland *et al.*, 1998), suggerint que l'evasió a l'hRI és essencial per a l'adquisició de propietats citotòxiques.

La citotoxicitat de l'onconasa i de la BS-RNasa ve determinada per la seva capacitat d'exercir l'activitat ribonucleasa en les condicions fisiològiques de la cèl·lula. Per això, els enzims han de conservar la seva estructura i ser resistents a l'acció inhibidora de l'hRI. La K_i de l'hRI per l'onconasa ($K_i \geq 10^{-6}$ M) és 10^7 vegades

superior al valor d'aquest paràmetre per l'RNasa A i l'HP-RNasa (Boix *et al.*, 1996). Així, tot i que tant l'RNasa A com l'HP-RNasa són molt més actives enzimàticament que l'onconasa, els dos enzims haurien d'assolir el citoplasma cel·lular a concentracions molt més elevades, a fi de saturar l'hRI i poder catalitzar la degradació del seu substrat, conduïnt a la mort de la cèl·lula (Wu *et al.*, 1993).

Tot i les evidències existents, la importància de l'escapament a l'hRI en la citotoxicitat de les ribonucleases és encara una qüestió controvertida (Rybak i Newton, 1999). Evidentment, si una ribonucleasa susceptible de ser inhibida és acomplexada per una molècula d'hRI, la seva acció enzimàtica serà neutralitzada. No obstant això, s'ha comprovat que ribonucleases sensibles a l'hRI introduïdes en cèl·lules tumorals tenen activitat citotòxica. Així mateix, malgrat que la forma dimèrica de la BS-RNasa és la que presenta propietats tòxiques, s'ha suggerit que la proteïna arriba al citoplasma majoritàriament en forma monomèrica, la qual és sensible a l'hRI (Murthy *et al.*, 1996). Recolzant aquestes dades, un híbrid EDN-onconasa sensible a l'hRI va mostrar una citotoxicitat similar a la de l'onconasa (Newton *et al.*, 1997). Totes aquestes observacions es podrien explicar per la presència de nivells molt baixos d'hRI citoplasmàtic, per la presència d'hRI ja acomplexat en certes línies tumorals, per la compartimentalització de la ribonucleasa i l'hRI, o per la saturació de l'hRI com a conseqüència de la translocació d'un nombre important de molècules de ribonucleasa al citoplasma.

1.4.4. Estabilitat

Diverses evidències experimentals suggereixen que l'estabilitat és un factor important en la citotoxicitat de les ribonucleases, donat que determina una major resistència dels enzims a la proteòlisi (Klink i Raines, 2000; Leland i Raines, 2001; Leland *et al.*, 2001).

L'onconasa n'és un bon exemple. Tal i com s'ha presentat en l'APARTAT 1.3.2, aquest enzim és excepcionalment estable, gràcies a seva estructura extremadament compacta (amb els extrems N- i C-terminal replegats sobre el cos principal de l'enzim) i al pont disulfur del C-terminal (Notomista *et al.*, 2001). L'eliminació d'aquests dos elements actua reduïnt l'estabilitat de l'enzim, i en compromet la potència citotòxica (Leland *et al.*, 2000).

La relació entre l'estabilitat i la citotoxicitat s'ha analitzat també en variants de l'RNasa A. Estudis en els quals es va afegir o eliminar un pont disulfur sobre una variant citotòxica d'aquest enzim van proporcionar una bateria de citotoxines amb estabilitats variables (fins a 30°C de diferència), en la qual s'observà una correlació positiva entre la citotoxicitat i la termoestabilitat de les variants (Klink i Raines, 2000). A més, s'ha comprovat que en general les variants de l'HP-RNasa més estables que la parental solen ser també més citotòxiques (Leland *et al.*, 2001). De la mateixa manera, s'ha comprovat que l'ECP, la ribonucleasa humana més tòxica en condicions naturals, és també la més resistent al desplegament induït per clorur de guanidini (Maeda *et al.*, 2002).

Aquesta correlació, però, no es compleix en les ribonucleases bacterianes. Per exemple, l'RNasa Sa3 i la seva variant 5K, d'idèntica estabilitat, presenten activitats citotòxiques ben diferents (Ilinskaya *et al.*, 2002).

1.5. Disseny de variants citotòxiques de l'HP-RNasa

El descobriment de que certes ribonucleases eren citotòxiques de manera natural, juntament amb l'observació de que la microinjecció d'RNasa A en oòcits de *Xenopus genus* provocava una toxicitat idèntica a la de la ricina (Rybak *et al.*, 1991), va portar a considerar que les ribonucleases pancreàtiques podrien actuar com a citotoxines.

L'ús de ribonucleases com a agents citotòxics es remonta a l'any 1955, quan es va descriure que la injecció d'RNasa A directament en tumors sòlids de ratolins frenava el creixement tumoral (Ledoux, 1955; Ledoux i Revel, 1955). Posteriorment, aquest enzim es va utilitzar en assajos clínics en humans pel tractament de la leucèmia mielocítica. Es van subministrar diàriament dosis de 0,5-1 mg d'RNasa A per via subcutània en pacients afectats d'aquest càncer, i es va observar una disminució en la mida de la melsa i una milloria general (Aleksandrowicz, 1958). Malgrat que aquests resultats semblaven prometedors, publicacions posteriors mostraren resultats contradictoris (de Lamirande, 1961; Roth, 1963).

Les immunotoxines consisteixen en la fusió d'una molècula tòxica a una molècula transportadora, la qual ha de ser capaç de dirigir la internalització del motiu tòxic en la cèl·lula diana. Les ribonucleases pancreàtiques poden actuar com a motiu tòxic d'una immunotoxina si es fusionen a alguna proteïna capaç de transportar-les a l'interior d'una cèl·lula. Entre les molècules transportadores s'utilitzen normalment anticossos monoclonals dirigits específicament contra antígens tumorals, però també factors de creixement o citoquines (Pastan *et al.*, 1992). Pel que fa al domini tòxic, històricament s'han estat utilitzant toxines d'origen vegetal o bacterià, com l'exotoxina A de *Pseudomonas*, la toxina diftèrica i la ricina. La unió dels dos dominis es pot realitzar per conjugació química o per construcció recombinant. Amb aquestes construccions s'aconsegueix dirigir el domini citotòxic específicament contra cèl·lules tumorals, evitant així els efectes tòxics sobre teixits normals. A més, en afavorir la interacció de la partícula tòxica amb la superfície cel·lular, s'afavoreix la seva internalització i, en conseqüència, se'n potencia la toxicitat. Tanmateix, la utilització d'aquest tipus de construccions en teràpia clínica no ha demostrat ser útil, a causa dels seriosos efectes secundaris generats per les reaccions immunològiques contra el domini tòxic, que no és d'origen humà (Ghetie i Vitetta, 1994a; Ghetie i Vitetta, 1994b).

En aquest sentit, el disseny de proteïnes de fusió entre l'HP-RNasa i anticossos dirigits específicament contra cèl·lules tumorals ha demostrat ser una estratègia molt eficient per facilitar la interacció de l'enzim amb la membrana plasmàtica, i afavorir així la seva internalització (Rybak i Newton, 1999; Youle *et al.*, 1993; Zewe *et al.*, 1997). D'aquesta manera s'aconsegueix incrementar la potència tòxica de la

ribonucleasa, tot evitant la seva acció sobre els teixits sans. Aquest sistema ofereix també l'avantatge de superar els problemes d'excessiva toxicitat i d'immunogenicitat associada a les toxines d'origen no humà. Utilitzant aquesta estratègia, s'han construït diversos conjugats utilitzant l'HP-RNasa com a motiu tòxic. Per exemple, quan l'enzim lliure (amb un valor d'IC₅₀ de 10⁻⁴ M) es va conjuguar amb l'EGF, el seu valor d'IC₅₀ va disminuir a 3·10⁻⁷ M (Jinno *et al.*, 1996), i quan es va conjuguar amb la transferrina, a 2·10⁻⁹ M (Suzuki *et al.*, 1999). Així mateix, una proteïna de fusió entre l'angiogenina i un anticòs contra el receptor de la transferrina va mostrar ser citòxica a una concentració de 4 a 10 nM per a cèl·lules tumorals, malgrat que l'angiogenina per ella mateixa no és tòxica (Newton *et al.*, 1996).

El fet de que els membres citotòxics de la superfamília de les ribonucleases presentin una baixa afinitat per l'hRI, va suggerir que un sistema alternatiu d'obtenció de noves ribonucleases citotòxiques podria ser la generació de formes resistents a l'hRI. Així, es van dissenyar variants de les dues ribonucleases pancreàtiques que mimetitzaven les característiques estructurals que semblen determinar la resistència a l'hRI en les proteïnes tòxiques (BS-RNasa i onconasa).

Una primer sistema per aconseguir formes resistents a l'hRI és la generació de variants dimèriques que mimetitzin l'estructura de la BS-RNasa (dimerització i intercanvi dels dos segments N-terminals). Mitjançant l'entrecreuament per conjugació química de dos monòmers d'RNasa A, es van obtenir dímers que adquiriren propietats citotòxiques enfront de certes línies cel·lulars tumorals (Bartholeyns i Baudhuin, 1976). Més recentment, l'obtenció per mitjà de tècniques de mutagènesi dirigida de variants recombinants de l'RNasa A i de l'HP-RNasa amb estructura dimèrica, va promoure l'adquisició d'una modesta activitat citotòxica en comparació amb la BS-RNasa. En base al coneixement de les característiques estructurals que fan de la BS-RNasa una proteïna citotòxica, mutacions addicionals en les variants que permetien l'intercanvi dels segments N-terminal entre els dos monòmers van resultar en un augment de la citotoxicitat dels dos dímers (Di Donato *et al.*, 1994; Piccoli *et al.*, 1999).

Un segon sistema consisteix en la introducció de substitucions puntuals en els punts de contacte entre la ribonucleasa i l'hRI, a fi de dificultar la formació del complex. Les variants generades resistents a l'hRI (*in vitro*) han demostrat ser citotòxiques (Gaur *et al.*, 2001; Leland *et al.*, 1998; Leland *et al.*, 2001). Arran d'aquests resultats, diversos autors proposen que l'evasió a l'hRI és una condició indispensable per al disseny de ribonucleases citotòxiques.

La generació d'immunotoxines s'ha utilitzat també per evitar la interacció de l'hRI amb l'enzim. Així per exemple, la unió d'una molècula de transferrina al residu 89 de l'HP-RNasa va afavorir la interacció de l'enzim amb la superfície de cèl·lules que expressaven el receptor de la transferrina, a més a més d'impedir la interacció de l'hRI amb la ribonucleasa (Suzuki *et al.*, 1999). Aquesta construcció va demostrar ser extremadament tòxica. Però aquesta relació no té perquè complir-se en tots els casos. Conjugats en els quals el motiu ribonucleasa és inhibït per l'hRI han demostrat ser igualment tòxics (Newton *et al.*, 1996). En aquests casos, el domini que dirigeix

la interacció de la ribonucleasa amb la superfície de la cèl·lula incrementa la seva internalització i acumulació al citoplasmàtica, provocant la saturació de l'hRI. L'activitat ribonucleolítica excedent és llavors capaç de degradar el seu substrat, conduint a la inhibició de la síntesi proteica i a la mort de la cèl·lula.

L'elevada estabilitat que presenta l'onconasa ha promogut la realització de treballs en els quals s'intenta potenciar la toxicitat de les ribonucleases per mitjà d'increments en la seva estabilitat. Així, l'addició d'un cinquè pont disulfur en una variant citotòxica de l'RNasa A va evidenciar una relació directament proporcional entre estabilitat i citotoxicitat (Klink i Raines, 2000; Klink *et al.*, 2000). Els autors van proposar que l'augment de citotoxicitat per efecte d'una major estabilitat és conseqüència de la menor susceptibilitat de l'enzim a la degradació intracel·lular per proteases.

El recent interès en el desenvolupament de l'HP-RNasa com a agent citotòxic ha sorgit de l'expectativa que, pel seu origen humà, la seva menor antigenicitat facilitarà la seva aplicació clínica (Leland *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1999). Fins al moment, l'HP-RNasa només ha adquirit propietats citotòxiques quan s'ha produït en forma de proteïna dimèrica, anàloga a la BS-RNasa (Piccoli *et al.*, 1999), o quan s'ha conjugat amb altres molècules per tal de facilitar la internalització de l'activitat ribonucleasa (Psarras *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1999). Així doncs, la creació de noves variants de l'HP-RNasa citotòxiques és un camp de desenvolupament intens. Segons tot el que s'ha exposat fins al moment, sembla ser que l'eficiència de les variants de l'HP-RNasa monomèriques com a agents citotòxics pot dependre del balanç entre l'activitat ribonucleolítica que és capaç d'arribar a citoplasma, la capacitat de defugir l'acció de l'hRI, i una estabilitat suficient com per a conservar les seves característiques estructurals i funcionals en les condicions fisiològiques. Així mateix, l'adquisició de toxicitat específica dependrà de la correcta direccionalització i eficient internalització de l'enzim per les cèl·lules diana.

1.6. L'endocitosi

Com a part integrant de l'anàlisi dels diversos factors que participen en el mecanisme de citotoxicitat de les ribonucleases, en el present treball s'ha dut a terme la caracterització de la internalització i de les vies de trànsit intracel·lular seguides per aquestes enzims. Per aquesta raó, els pròxims apartats ofereixen una breu descripció d'aquests processos, a fi d'introduir tota una sèrie de conceptes que s'aniran presentant al llarg de l'apartat de RESULTATS I DISCUSSIÓ.

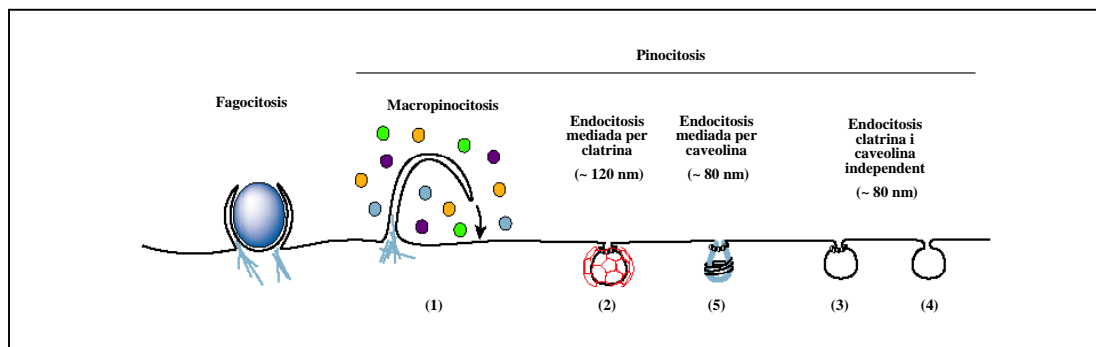
En una cèl·lula eucariota existeix un intercanvi permanent de macromolècules entre els medis extern i intern, regit per processos inversos que s'equilibren: la captura de molècules externes per mitjà dels diferents mecanismes d'endocitosi; i la secreció de molècules resultants del metabolisme cel·lular, mitjançant el mecanisme d'exocitosi (o secreció).

1. Introducció

Els processos d'endocitosi mitjançant els quals les cèl·lules internalitzen material a partir del medi extracel·lular, són essencials i compleixen funcions molt diverses. Entre elles l'adquisició de nutrients (sobretot en eucariotes unicel·lulars), la regulació dels sistemes de senyalització a la superfície cel·lular, la presentació d'antigen, l'eliminació de cèl·lules en apoptosi, la regulació dels receptors, o la transmissió sinàptica (Conner i Schmid, 2003). Així mateix, les diverses vies d'endocitosi sovint són explotades per patògens, incloent virus, eucariotes unicel·lulars i bacteris. A nivell fisiològic s'ha comprovat que l'endocitosi està involucrada en processos patològics, com la hipertensió arterial o l'Alzheimer (Mukherjee *et al.*, 1997).

Per satisfer els requeriments específics exigits per cadascun d'aquests processos, les vies d'endocitosi han de ser capaces de permetre una regulació diferencial en funció del tipus de molècula transportada (la *càrrega*) i de la seva destinació final (Nichols i Lippincott-Schwartz, 2001). Les cèl·lules eucariotes han desenvolupat diferents sistemes per internalitzar el material extracel·lular (FIGURA 1.9). De Duve (1991) va agrupar aquests sistemes sota el terme general d'endocitosi. L'endocitosi es defineix com el procés pel qual la cèl·lula eucariota captura material provinent del medi que l'envolta per mitjà de la invaginació de la membrana plasmàtica, tot formant una vesícula intracel·lular que conté el material ingerit. En funció de la mida de la molècula endocitada, es distingeixen dos processos diferents d'endocitosi, la fagocitosi (partícules) i la pinocitosi (fluids i soluts). Donat que la fagocitosi només es produeix en certes cèl·lules especialitzades que no són objecte del present treball, a partir d'aquest moment equipararem el terme endocitosi al concepte de pinocitosi.

FIGURA 1.9.



Vies de pinocitosi. Les diferents vies difereixen en la mida de les vesícules endocítiques i en la natura del material que transporten (l·ligands, receptors i lípids), així com en els mecanismes de formació de les vesícules (Conner i Schmid, 2003). La via dependent de clatrina (2) és la responsable del 50 % de l'endocitosi en fase adsorptiva, tant de manera constitutiva com en resposta a un estímul. La macropinocitosi (1), contribueix de manera inductiva i transitòria a l'endocitosi de fase fluida, tot formant grans vesícules de mida heterogènia. Les vesícules llises (3) contribueixen sobretot a l'endocitosi constitutiva de fluids i soluts (fase fluida). Els microdominis (4) i les caveoles (5) estan enriquides en colesterol i esfingolípid. La GTPasa dinamina està implicada en tres de les vies d'endocitosi (2, 3 i 5). Els mecanismes moleculars de les vies independents de clatrina són poc coneguts (Johannes i Lamaze, 2002).

La pinocitosi es defineix com la internalització de macromolècules i soluts en vesícules que es generen per invaginació i estrangulació de la membrana plasmàtica (van Deurs *et al.*, 1989; Watts i Marsh, 1992), i que s'alliberen al citoplasma. Segons el tipus de relació que s'estableix entre la partícula a internalitzar i la membrana cel·lular, la pinocitosi pot donar-se en *fase fluïda* o en *fase adsortiva*:

- La pinocitosi es produeix en *fase fluïda* quan les molècules que es troben en solució en el medi són incloses en l'interior de les vesícules (lumen) sense necessitat de cap interacció específica prèvia amb la membrana plasmàtica (Steinman *et al.*, 1974).
- I es produeix en *fase adsortiva* quan les molècules es lliguen a la membrana plasmàtica, i són concentrades abans d'ésser internalitzades (Lamaze i Schmid, 1995). Aquesta es pot tenir lloc:
 - De manera *no específica*, mitjançant la unió de la partícula a internalitzar a un punt qualsevol de la membrana plasmàtica. Aquesta unió, prèvia a l'endocitosi, pot produir-se per mitjà d'interaccions hidrofòbiques si el component a internalitzar té natura lipídica; per la interacció amb hidrats de carboni de superfície cel·lular, si presenta natura proteica; o per efecte de la càrrega, si la partícula té caràcter catiònic (Straus i Keller, 1986).
 - De manera *específica* (també anomenada *dependent o mediada per receptor*) en el cas en el qual la molècula a internalitzar (ligand) s'uneix a un receptor particular de superfície cel·lular, i el complex lligand/receptor és internalitzat. Aquest procés d'endocitosi està sotmès a un control exhaustiu, mitjançant la regulació de l'expressió dels receptors de superfície cel·lular.

Això no obstant, cal tenir en compte que cadascuna de les vesícules formades per endocitosi contindrà solut, encara que pertanyi al tipus *adsortiu*, de manera que l'endocitosi en *fase adsortiva* inclou també una *fase fluïda*.

Segons el procés de formació de les vesícules d'endocitosi s'han distingit cinc tipus diferents de pinocitosi en cèl·lules de mamífer: la macropinositosi, les depressions recobertes de clatrina, les caveoles i l'endocitosi independent tant de clatrina com de caveolina: les vesícules llises i els microdominis (FIGURA 1.9 i TAULA 1.3). Tanmateix, a la pràctica es divideix la pinocitosi en dos subgrups generals: dependent i independent de clatrina (D'Hondt *et al.*, 2000; Mukherjee *et al.*, 1997). Inicialment es considerava que la via dependent de clatrina era l'única responsable de l'endocitosi mediada per receptor. Actualment però, aquest concepte ha canviat arran del descobriment que la majoria de vies endocítiques poden tenir lloc per interaccions específiques receptor-ligand (Conner i Schmid, 2003).

TAULA 1.3.

Característiques generals de les diverses vies d'endocitosi. A la taula se citen aquells marcadors marcadors i inhibidors moleculars que permeten estudiar selectivament les diferents vies d'endocitosi. De vegades es pot utilitzar la càrrega (molècula internalitzada) com a marcadora específica d'una via concreta (p.ex.: receptor de la transferrina, receptor de l'interleucina-2) (Johannes i Lamaze, 2002).

Vies ^(a)	Marcadors	Càrrega	Inhibidors moleculars	Dependència de la dinamina	Inhibidors
Macropinocitosi (1)	Dextrans HRP	Fluids Membrana	?	?	Amiloride
Depressions recobertes de clatrina (2)	AP-2 Transferrina	La major part dels receptors membranars	Eps15 SH3 amfifisina SH3 intersectina	+	Acidificació del citoplasma Depleció de potassi Medi hipertònic
Vesícules Ilises (3)	Dextrans HRP	Fluids Membrana	?	?	?
Microdominis (4)	GM1	Receptor de l'interleucina-2	?	+	Ciclodextrina Filipina
Caveoles (5)	Caveolina GM1	Virus Toxines bacterianes Certs GPCR Proteïnes GPI	RNA antisentit de la caveolina	+	Ciclodextrina Filipina

(a) Els números entre parèntesis corresponen a les vies descrites a la FIGURA 1.9. HRP: peroxidasa de rabe; GM1: receptor de la toxina del cólera; GPCR: receptor acoblat a proteïna G; GPI: glicosil inositol fosfat. El signe '?' indica que el factor es desconeix.

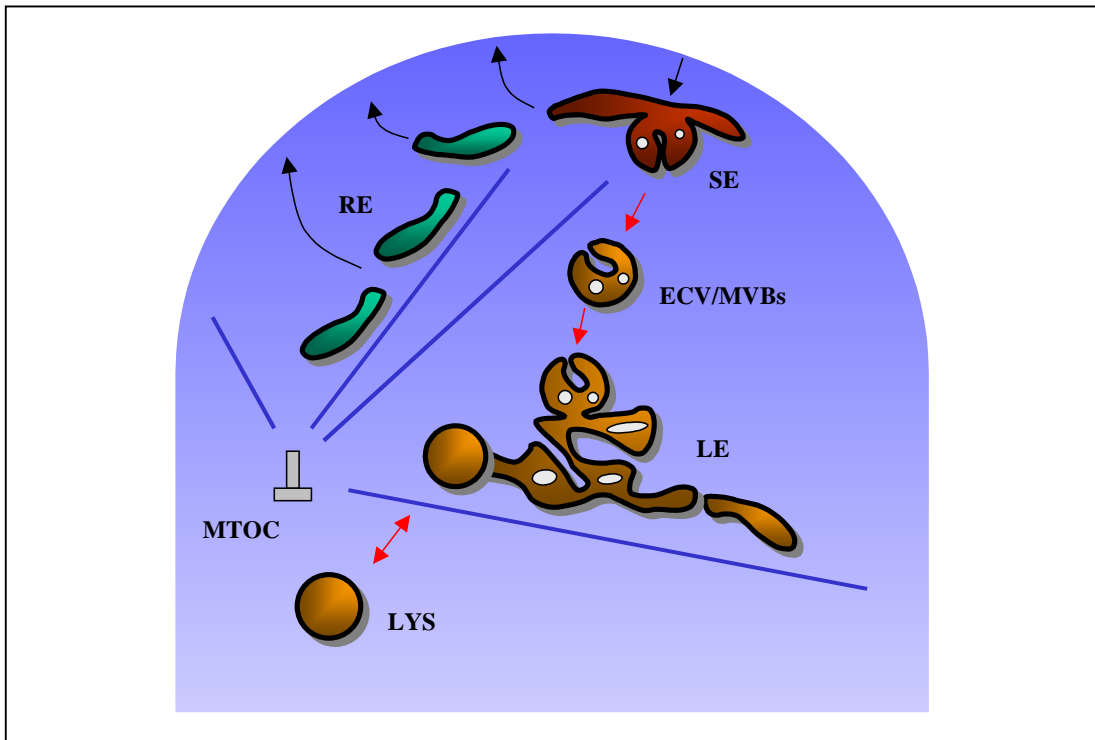
1.7. Organització dels compartiments d'endocitosi i vies vesiculars de trànsit intracel·lular

Les diverses funcions de la cèl·lula estan assegurades per compartiments interns en equilibri dinàmic. Les vies d'endocitosi, de degradació i de secreció requereixen un intercanvi de vesícules constant, així com el manteniment de la integritat i la composició de la membrana que delimita cada compartiment. Els mecanismes subjacents i la regulació d'aquests intercanvis tot just comencen a ser coneguts.

1.7.1. Via de trànsit endosomal: reciclatge i degradació

El sistema endosomal és un complex membranar constituït per una xarxa túbulo-vesicular heterogènia, que es distribueix des de la perifèria de la cèl·lula fins a la regió perinuclear, a prop de l'AG i del centríol (centre organitzador de microtúbuls o MTOC) (FIGURA 1.10). En funció de criteris temporals i funcionals es distingeix un compartiment endosomal primari i un compartiment endosomal secundari. El compartiment primari està constituït pels endosomes primaris (*early endosomes*, EE), que se subdivideixen en dos subcompartiments diferenciats en l'espai: l'endosoma de tria (*sorting endosome*, SE) i l'endosoma de reciclatge (*recycling endosome*, RE). El compartiment secundari està constituït pels endosomes secundaris (*late endosomes*, LE), pels ECV/MVBs (*endosomal carrier vesicles/multivesicular bodies*) i pels lisosomes (LYS).

FIGURA 1.10.



Esquema de la via endocítica. La via de reciclatge està indicada en verd i la degradativa en taronja. Els microtúbuls i el MTOC es representen en blau. La internalització de receptors i d'altres molècules de superfície cel·lular es produeix per endocitosis. Les molècules internalitzades són enviades als SE, on es decideix quin serà el seu destí. Alguns receptors són retornats cap a la membrana plasmàtica per tal de ser reutilitzats, a partir dels RE; mentre que d'altres són enviats als LE i als LYS per a la seva degradació. Els LE proporcionen la darrera estació de tria, mentre que els LYS representen l'estació final. Existeixen rutes de transport que connecten les vies endocítica amb la de secreció, i que són responsables de l'adquisició per part del sistema endocític d'enzims degradatius i de diverses proteïnes de membrana.

1. Introducció

A la TAULA 1.4 es presenten les característiques principals dels diferents compartiments de la via endocítica de transport, que es descriuran en els apartats següents.

TAULA 1.4.

Propietats i característiques dels compartiments endosomals (Gruenberg, 2001).

	Compartiments endocítics				
	primaris		secundaris		
	SE	RE	ECV-MVB	LE	LYS
Distribució	Perifèrica	Generalment perinuclear	Citoplasmàtica	~ Perinuclear	~ Perinuclear
Morfologia	Túbulovesicular (amb membranes internes)	Tubular	Esfèrica, amb invaginacions de membrana	Estructura complexa, amb invaginacions de membrana	Variable (tubular o com els LE)
pH	6,0	6,5	< 6,0	5,0-5,5	4,5-5,5
Receptors proteics	TfR Lligands destinats a LYS	TfR Lligands no destinats a LYS	M6PR	M6PR	-
Proteïnes i lípids de membrana	-	-	-	Lgps, Lamps, LBPA	Lgps, Lamps, LBPA
Proteïnes d'unió a GTP	Rab4, Rab5	Rab4, Rab5, Rab11	-	Rab7, Rab9	-

SE, endosoma de tria; RE, endosoma de reciclatge; ECV/MVB, vesícula endosomal de transport; LE, endosoma secundari; LYS: lisosoma; M6PR, receptor de la manosa-6-fosfat; Lgps, glicoproteïnes membranars lisosomals; Lamps, proteïnes membranars associades als lisosomes; TfR, receptor de la transferrina. (Gruenberg, 2001)

El compartiment endosomal és àcid degut a la presència a les seves membranes d'una bomba dirigida per ATP, que bombeja H^+ des del citoplasma al lumen dels endosomes (la bomba ATPasa vacuolar, o v-ATPasa) (Finbow i Harrison, 1997; Peng *et al.*, 1994). Aquesta bomba es distribueix de manera diferencial al llarg del compartiment endosomal, de manera que es genera un gradient d'acidesa creixent des dels EE als lisosomes.

Aquest gradient té un paper essencial en la funció d'aquests orgànuls, donat que permet la dissociació de la major part dels complexos lligand-receptor, així com l'activitat enzimàtica de les hidrolases àcides dins del lumen lisosomal (Gruenberg i Maxfield, 1995). El medi àcid contribueix també a la desnaturalització dels substrats proteics internalitzats per la via degradativa, fet que facilita la seva proteòlisi. Actua també regulant l'activitat dels transportadors de membrana lisosomals, que a pH àcid asseguren el transport dels productes de lisi (aminoàcids i lípids) dels lisosomes al citoplasma (Pillay *et al.*, 2002).

L'estudi del mecanisme pel qual el medi acídic de la llum dels endosomes modula el trànsit membranar ha suggerit l'existència d'algun tipus de sensor de pH transmembranar. Aquest sensor regularia l'organització de la maquinaria de gemmació al costat citoplasmàtic dels endosomes en funció del pH intraluminal. El descobriment que les proteïnes COPI de mantell s'associen a les membranes dels endosomes de forma dependent de pH (Gu i Gruenberg, 2000) sembla refermar aquesta hipòtesi (veure APARTAT 1.7.2).

La disposició dels diferents compartiments dins de la cèl·lula ve determinada pels microtúbuls. Així, l'AG, el centrosoma, els RE, els LE i els lisosomes se situen normalment en el centre, de forma perinuclear, a l'extrem *menys* dels microtúbuls. Mentre que les vesícules secretores i els SE se situen a la perifèria, cap a l'extrem *més*.

1.7.1.1. Compartiment endosomal primari: estació de tria i reciclatge

El material extracel·lular internalitzat en vesícules d'endocitosi, és incorporat al compartiment endosomal primari, a nivell dels SE per la fusió de la vesícula que el transporta a aquest compartiment. El SE actua aleshores com una estació de classificació, destriant les molècules que cal reciclar de les que cal degradar. D'aquesta regió sorgeixen, per una banda una sèrie de túbuls fins, que constitueixen la regió tubular del RE, que permet el retorn dels receptors reutilitzables a la membrana plasmàtica; i per l'altra, grans vesícules que es dirigeixen cap a la via de degradació lisosomal.

En l'ambient àcid del SE, molts dels receptors internalitzats pateixen un canvi de conformació i alliberen el seu lligand a la llum de l'endosoma. En alguns casos, però, el lligand es manté unit al seu receptor i comparteix el seu destí, essent reciclat pels RE cap a la membrana plasmàtica. Els lligands alliberats a la llum de l'endosoma normalment estan predestinats a ser destruïts pels lisosomes, juntament amb la resta del contingut luminal. Aquest és el cas de lligands com la insulina i l'LDL. En canvi, el destí dels receptors internalitzats (i dels lligands que hi han restat units, com és el cas de la transferrina, Tf) varia en funció del seu tipus. La majoria són reciclats a membrana plasmàtica per tal de ser reutilitzats en nous processos d'endocitosi, com el receptor d'LDL, el de la insulina i el de la transferrina (TfR). Alguns, no obstant, són enviats també als lisosomes, on seran degradats, com és el cas del receptor d'EGF (EGFR).

Els SE i els RE es diferencien per la seva funció, morfologia, localització cel·lular, pH luminal i pel tipus de molècules que transporten, tal i com es descriu a la TAULA 1.4. Aquests dos subcompartiments estan interconnectats per mitjà de vesícules intermediàries, fet que determina en el sistema EE la capacitat de fusió *homotípica* (o sigui, d'emetre vesícules que es fusionen dins del mateix compartiment, l'EE).

Contràriament a d'altres sistemes de transport intracel·lular, no ha estat possible d'identificar els motius específics que permeten el reciclatge de certs receptors a la membrana plasmàtica a partir dels SE (com és el cas del receptor de la transferrina). Sembla ser que existeixen diversos mecanismes de tria, i que aquests determinen la incorporació dels receptors dins de dominis lipídics particulars.

A partir dels SE, les estructures vesiculars es dirigeixen cap a l'interior de la cèl·lula mitjançant els microtúbuls i el seu motor associat, la dineïna (transport EE→LE i SE/LE →TGN) (Aniento *et al.*, 1993; Bomsel *et al.*, 1990). La via de reciclatge és també dependent de microtúbuls. Així com també el trànsit vesicular que es produeix entre les cisternes de l'AG, en el qual participa la quinesina com a proteïna motor associada.

1.7.1.2. Compartiment endosomal secundari: estació de degradació

La connexió entre el compartiment primari, en el qual es produeix la selecció de les molècules que cal degradar, i el compartiment secundari responsable d'aquesta degradació es realitza per mitjà de vesícules intermediàries de transport. Aquestes vesícules es generen a partir del SE, i transporten el material seleccionat fins als LE, on aboquen el seu contingut per fusió directa de les seves membranes (FIGURA 1.10).

Aquestes vesícules intermediàries de transport són de gran mida i presenten nombroses invaginacions de membrana. Pel seu paper com a intermediaris de transport i per la seva morfologia, se les pot anomenar indistintament 'vesícules endocítiques transportadores' o 'cossos multivesiculars' (*Endocytic Carrier Vesicles*, ECVs o *Multivesicular Bodies*, MVBs) (Sachse *et al.*, 2002).

El transport dels ECV/MVBs és dependent de microtúbuls i dels motors moleculars associats. No tenen capacitat de fusió homotípica, ni poden fusionar-se amb els SE, només poden alliberar el seu contingut als LE (Aniento i Gruenberg, 1995).

El compartiment dels LE és, a l'igual que l'EE, extremadament dinàmic i heterogeni. Presenta múltiples invaginacions de membrana i una morfologia túbulo-vesicular. Per aquesta raó, la distinció entre els ECV/MVBs i els LE és realment subtil, atès que tant a nivell morfològic com funcional ambdós constitueixen dues etapes molt properes de la via degradativa. Malgrat això, la composició de lípids i de proteïnes de membrana en fa dos compartiments diferenciats: els LE són molt més rics en Lamp1 (*Lysosomal associated membrane protein 1*) i en àcid lisobifosfatídic (LBPA) que els ECV/MVBs

Els LE actuen en certa manera també com a estació de tria, igual que els SE. El seu pH intern oscil·la entre 5,0 i 5,5, fet que determina la dissociació d'un grup específic de complexos lligand-receptor que arriben a aquest nivell de la via de degradació. Aquests complexos en concret, no són els que han estat capturats des de la superfície cel·lular per endocitosi i que es dirigeixen a lisosomes per a ser degradats, sinó que provenen de les vies de secreció de la mateixa cèl·lula i s'encarreguen d'aportar enzims digestius de nova formació a la via degradativa. Els receptors encarregats d'aquest transport s'anomenen receptors de manosa-6-fosfat (*mannose 6-fosfate receptor*, M6PR), i es caracteritzen pel fet de realitzar diversos cicles de transport entre la via de secreció i la degradativa (APARTAT 1.7.3.1). Malgrat que el M6PR recicla entre els LE i l'AG, és en els LE on es troba més concentrat, de manera que se'l pot utilitzar com a marcador d'aquest compartiment, encara que la seva localització no hi sigui estrictament específica (Beaumelle *et al.*, 1990).

La darrera etapa de la via degradativa la constitueixen els lisosomes, que són també difícils de distingir dels orgànuls que el precedeixen. Així, tant les molècules internalitzades destinades a ser degradades com els nous enzims hidrolítics sintetitzats per la cèl·lula, són transportats pel sistema endocític fins als lisosomes, on són abocats per la fusió directa dels LE a les seves membranes (Futter *et al.*, 1996). La funció principal dels lisosomes és la digestió cel·lular, catalitzant i reciclant un gran nombre de molècules endògenes i exògenes, internalitzades per endocitosi o fagocitosi (Hunziker i Geuze, 1996). Contràriament al cas dels SE, els RE i els LE, encara no s'han identificat marcadors per identificar específicament els lisosomes. No obstant això, a nivell molecular els lisosomes es diferencien dels EE per l'absència de Tf, i dels LE per l'absència de M6PR (veure la TAULA 1.4). Així mateix, els lisosomes es distingeixen dels LE pel fet d'estar molt més enriquits en proteïnes Lamp (les quals poden arribar a constituir fins al 50 % de les proteïnes transmembrana lisosomals), en hidrolases àcides i en LBPA.

Donada la dificultat en distingir els lisosomes dels LE, s'ha proposat que els dos subcompartiments representen elements dinàmics separats d'una xarxa comuna, estretament interconnectada. Ambdós contenen pocs receptors reciclants, un pH inferior a 6,0 i són rics en glicoproteïnes i hidrolases lisosomals. Entre aquests dos compartiments existeix un trànsit bidireccional (Jahraus *et al.*, 1994), idèntic al que s'estableix entre la via de secreció (TGN) i el sistema endosoma/lisosoma per a l'adquisició de nous enzims digestius (Rohn *et al.*, 2000). La membrana d'aquests compartiments és rica en LBPA, un fosfolípid poc sensible a la degradació, que probablement presenta un paper en la tramesa i transport de molècules destinades a degradació.

1.7.1.3. Models de transport endosomal: Transferrina i EGF

El receptor de la transferrina (TfR) segueix la via de reciclatge. El seu lligand, la transferrina (Tf) és una proteïna transportadora de ferro que circula pel torrent sanguini. La Tf interacciona amb el seu receptor a la superfície de les cèl·lules i és

endocitada per la via depenent de clatrina. Quan el complex lligand-receptor arriba al SE, el baix pH fa que la Tf alliberi el ferro que transporta. Però la Tf lliure de ferro (apotransferrina) roman unida al seu receptor, i el complex és reciclat cap a la membrana plasmàtica. Aquí, el pH neutre del fluid extracel·lular fa que l'apotransferrina es dissociï del seu receptor i s'alliberi al medi, on podrà tornar a unir el ferro, tornant a començar així el cicle. D'aquesta manera la Tf actua com una llançadora entre el fluid extracel·lular i el compartiment endosomal, evitant entrar en contacte amb els lisosomes i subministrant el ferro que la cèl·lula necessita per créixer. Les molècules Tf/TfR s'utilitzen com a molècules marcadores del procés pinocitosi mediada per receptor depenent de clatrina, i específicament de la via de reciclatge.

El receptor del factor de creixement epidèrmic (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) segueix la ruta degradativa. El seu lligand, l'EGF, és una petita molècula que estimula la divisió de les cèl·lules de l'epidermis i d'altres tipus cel·lulars. L'EGFR s'acumula a les depressions recobertes únicament quan s'ha unit amb el seu lligand. Només llavors el receptor és internalitzat, i el complex és enviat als lisosomes, on serà degradat. Per aquesta raó, la unió del lligand al seu receptor comporta una disminució de la concentració de receptor a la superfície cel·lular (regulació per disminució, *down regulation*). Com a resultat d'això, la concentració de lligand senyal en el medi extracel·lular regula el nombre de molècules de receptor complementari de la superfície de la cèl·lula diana. Les molècules EGF/EGFR s'utilitzen com a marcadors de pinocitosi mediada per receptor depenent de clatrina, i específicament de la via de degradació.

1.7.2. Via de secreció: reticle endoplasmàtic i aparell de Golgi

La via de secreció (també anomenada via biosintètica o via de trànsit *anterògrada*) és el conjunt de processos pels quals els lípids i les proteïnes sintetitzats de nou per la cèl·lula, adquireixen les modificacions adients i són distribuïdes a la seva destinació específica. Aquest procés implica la participació del reticle endoplasmàtic, de l'aparell de Golgi i de tota una sèrie de vesícules intermediàries de transport, que es descriuen tot seguit.

El reticle endoplasmàtic (*endoplasmic reticulum*, ER) constitueix una vasta xarxa membranal contínua amb la membrana nuclear, i està organitzat en forma d'una malla de túbuls ramificats i de sàculs aplanats que s'extèn per tot el citoplasma. Se subdivideix en *llis* i *rugós*, en funció de l'absència/presència en les seves membranes de ribosomes associats. El primer intervé en el metabolisme dels lípids, sobretot del colesterol. Mentre que el segon assegura la correcta localització de les proteïnes transmembranals, les proteïnes destinades a secreció i les proteïnes destinades als lisosomes.

La presència d'una seqüència codificant per un pèptid senyal en l'mRNA que codifica per a proteïnes destinades a l'ER *rugós*, determina que el ribosoma que el tradueix s'uneixi a la membrana externa d'aquest compartiment. La cadena

polipeptídica en formació és translocada cap a la llum de l'ER de manera simultània a la seva traducció. Segons si la proteïna final és de tipus transmembranal o de tipus soluble, la translocació serà parcial (i la proteïna restarà inclosa a la membrana de l'ER) o completa (la proteïna és abocada al lumen de l'ER).

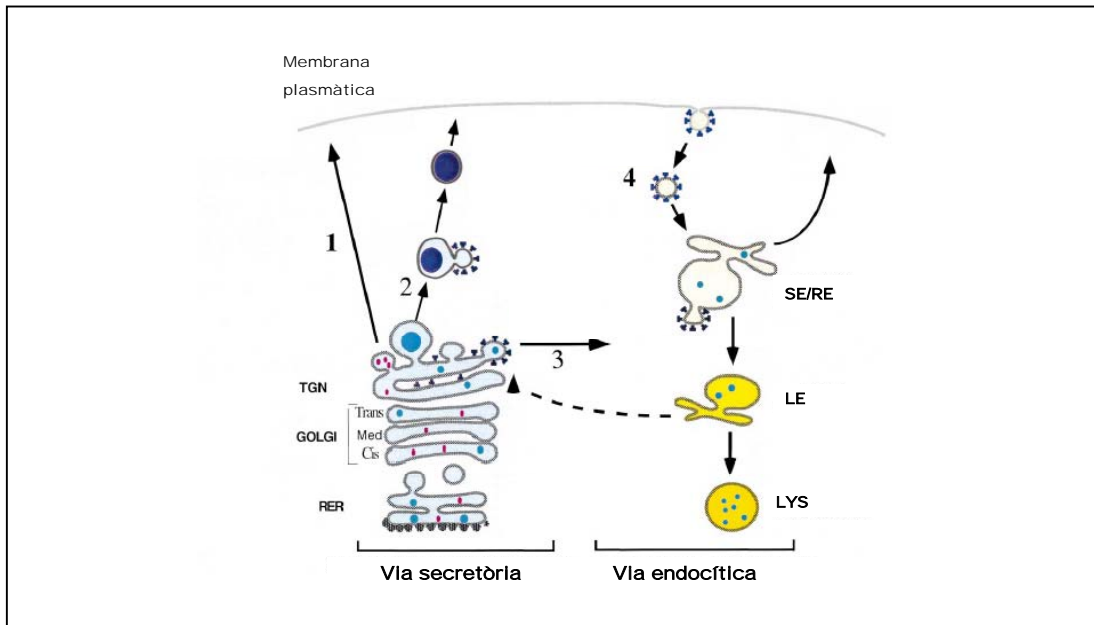
Algunes d'aquestes proteïnes transmembrana restaran a l'ER, però la majoria seran dirigides envers d'altres destinacions, com ara la membrana plasmàtica o la membrana d'algun orgànul, passant prèviament per l'AG. Les proteïnes solubles seran enviades també al lumen d'algun orgànul o bé seran secretades. En el moment de distribuir aquest material, l'ER actua com a una estació de control de qualitat. Només les proteïnes correctament formades i plegades podran avançar per la via de secreció i assolir la seva destinació final, dins o fora de la cèl·lula. Aquestes seran conduïdes a l'AG per mitjà de vesícules intermediàries de transport. Aquestes vesícules no són selectives, de manera que transporten qualsevol producte pertanyent al ER cap a l'AG. Per aquesta raó les proteïnes residents en l'ER contenen una seqüència senyal específica a l'extrem C-terminal (KDEL), que els permet ser recuperades selectivament una vegada han estat transportades i descarregades a l'AG. Aquest reciclatge es realitza per mitjà de receptors específics localitzats a l'AG, els quals concentren els seus lligands en vesícules de transport, que retornen el seu contingut al RE. Aquesta via, entre l'AG al ER, rep el nom de *via retrògrada*.

L'AG és un centre de síntesi glucídica, que participa en les modificacions post traduccional del material provinent de l'ER, glicosilant els lípids i les proteïnes que ho requereixen. A la vegada és un important centre de tria, on es classifica i es distribueix el material de nova síntesi envers destinacions cel·lulars diverses, sempre mitjançant vesícules de transport.

L'AG té una distribució perinuclear, al costat del centrosoma. Està constituït per una sèrie de sacs i de vesícules estructural i funcionalment polaritzades. El costat d'entrada o (cara *cis*) representa el punt d'arribada de les molècules provinents de l'ER. El costat de sortida (o cara *trans*) representa l'estació de tria on es classifiquen i es distribueixen les molècules de nova síntesi a diferents destinacions de la cèl·lula. Aquests dos extrems de l'AG estan constituïts per uns compartiments especials, formats per una xarxa d'estructures tubulars i cisternes que són, respectivament, la xarxa del *cis* Golgi (CGN, *Cis Golgi Network*), i la xarxa del *trans* golgi (TGN, *trans golgi network*). Entre aquests dos extrems se situa el golgi mitjà (*medium golgi*), on es produeixen les modificacions post traduccional sobre proteïnes i lípids.

Les dues xarxes són punts essencials de classificació i distribució de proteïnes. A la cara *cis* se seleccionen les proteïnes que han de retornar a l'ER (portadores de la seqüència de retenció KDEL) de les que s'han de seguir processant a l'AG (la via per defecte, no requereix cap seqüència senyal). I a la cara *trans* es realitza la distribució específica de proteïnes a membrana plasmàtica, a lisosomes, o a les vesícules de secreció. Així doncs, el transport entre el ER i l'AG és bidireccional. A la FIGURA 1.11 es mostra un esquema simplificat de la via de biosíntesi o secreció, i de les diverses destinacions finals que pot assolir el material transportat.

FIGURA 1.11.



Esquema de la vies de secreció (o de biosíntesi) i endocítica (o de degradació). Les proteïnes sintetitzades en el reticle endoplasmàtic són enviades a l'AG, on es completen les modificacions post-traduccionals i on es seleccionen, a nivell del TGN per a les diverses destinacions finals: a la superfície cel·lular (1), a grànuls de secreció (2) o als endosomes (3). La línia puntejada representa la via de reciclatge dels M6PR (Le Borgne i Hoflack, 1998).

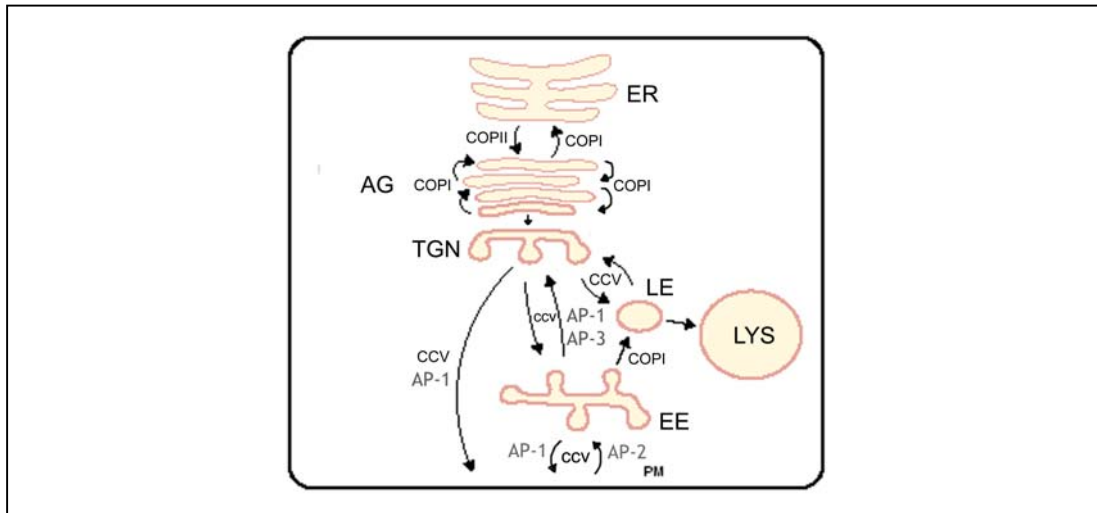
La força que condueix la gemmació de la membrana per a formar una vesícula pot tenir dos orígens. En el primer, la deformació membranar és mediada per la polimerització de proteïnes citosòliques de recobriment que s'uneixen a constituents integrals de membrana. És el cas de la clatrina, COPI i COPII. En el segon, la invaginació de membrana és promoguda per la interacció amb elements del citoesquelet. L'escissió final de la vesícula pot ser produïda pels mateixos components del mantell que participen en la invaginació (COPI i COPII) o bé per la dinamina (en el cas de la clatrina) (Huttner i Zimmerberg, 2001).

Les vesícules recobertes de clatrina són responsables de la captura de molècules extracel·lulars per endocitosi a partir de la membrana plasmàtica, així com del transport intracel·lular entre la xarxa TGN i els endosomes (FIGURES 1.11 i 1.12). Les vesícules recobertes de COPI i COPII participen en el transport anterògrad i retrògrad, respectivament, entre el reticle endoplasmàtic i l'AG. Així, el trànsit des de l'ER a l'AG és conduït per vesícules recobertes d'un mantell format per la proteïna COPII. Mentre que el trànsit invers, de l'AG a l'ER, es produeix per mitjà de vesícules recobertes d'un mantell de COPI. El transport que es produeix entre les mateixes cisternes de l'AG explota també les COPI (Bannykh i Balch, 1997), de la mateixa manera que els processos de transport vesicular dins del sistema endosomal i

la biogènesi dels ECV/MVBs (Bénichou i Benmerah, 2003; Gu i Gruenberg, 1999). En el sistema endosomal, s'ha comprovat que l'organització del mantell de COPI és dependent de pH (Gu i Gruenberg, 1999).

L'organització dels mantells de COPI i COPII que recobreixen les vesícules intermediàries en les vies de secreció, de transport retrògrad i d'endocitosi, requereix l'acció de les GTPases citosòliques ARF-1 (*ADP-ribosilating factor*) i Sar1p, respectivament. ARF-1 s'activa per la unió d'un nucleòtid GTP, fet que promou la seva interacció amb la membrana de l'AG, el reclutament de les proteïnes adaptadores necessàries (AP-1 o AP-3), i l'associació de COPI citoplasmàtic (Rohn *et al.*, 2000).

FIGURA 1.12.



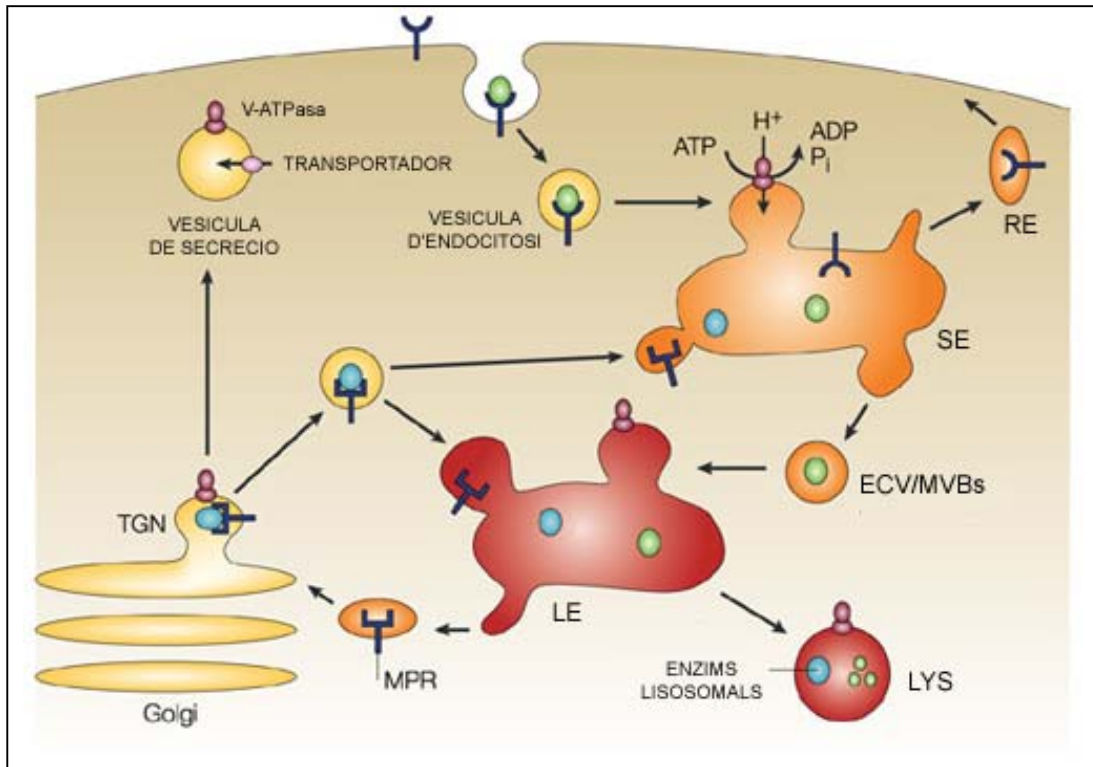
Vies de trànsit que exploten vesícules recobertes amb COPI, COPII i clatrina. A la via biosintètica, les molècules són transportades de l'ER a l'AG, i des d'una cisterna de l'AG a la següent fins que arriben al TGN. Aquí es produeix la selecció, i les molècules es distribueixen a la membrana plasmàtica o als endosomes. En la via d'endocitosi, les molècules són internalitzades a la membrana plasmàtica i enviades als SE, des d'on seràn seleccionades per al seu reciclatge a superfície cel·lular a partir dels RE o enviats a la via (Nebenfuhr, 2002).

1.7.3. Connexions entre la via d'endocitosi i la via biosintètica

1.7.3.1. Entre el TGN i els LE: el cicle de la M6PR

Un exemple molt ben descrit d'aquesta via el representa el cicle dels receptor de la manosa-6-fosfat (M6PRs) (FIGURA 1.13) (Iversen *et al.*, 2001). Aquests receptors transmembranals estan situats en el TGN, on reconeixen i uneixen les hidrolases àcides de nova síntesi que cal enviar als lisosomes, gràcies al reconeixement d'una seqüència glucídica específica que aquestes contenen, la manosa-6-fosfat (M6P).

FIGURA 1.13.



Cicle de la M6PR. L'acidificació dels LE és imprescindible per a l'alliberament dels enzims lisosomals dels M6PR, i pel reciclatge d'aquests receptors cap al TGN. El color groc indica pH neutre, i el vermell indica pH àcidic. Els cercles blaus indiquen enzims lisosomals, i els verds indiquen molècules destinades a degradació (figura extreta de Nishi i Forgac, 2002).

Els complexos lligand-receptor es concentren en regions concretes del TGN, on es produeix la gemmació i fissió de vesícules de transport recobertes en aquest cas d'un mantell de clatrina i d'AP-1 o AP-3 (FIGURA 1.12). Després de la pèrdua del seu mantell, aquestes vesícules es fusionen amb els SE i són conduïdes als LE. Aquí es produeix la dissociació dels complexos i l'alliberació dels enzims hidrolítics per efecte del baix pH, de manera que aquests poden començar a digerir la resta del material endocitat transferit als LE des dels SE. Els receptors, ja lliures de la seva càrrega, són recuperats en noves vesícules de transport que sorgeixen per gemmació dels LE, i retornats a les membranes del TGN.

No obstant, no tota la càrrega destinada als lisosomes arriba al seu destí. Part de les hidrolases àcides aconseguen evitar la via de trànsit que els correspon, i són transportades a la superfície cel·lular per la ruta per defecte, la secreció. Per aquesta raó alguns M6PR es dirigeixen a la membrana plasmàtica, a fi de recapturar aquests enzims i retornar-los mitjançant endocitosis mediada per clatrina als lisosomes, via SE i LE.

1.7.3.2. Entre els endosomes i el reticle endoplasmàtic: toxina del cólera i ricina

Certes molècules, i en concret determinades toxines, a l'internalitzar-se en una cèl·lula poden emprendre la via de transport retrògrada. Aquesta les dirigeix des de les vesícules del sistema endosomal al reticle endoplasmàtic, passant pel TGN. Aquest és el cas de la toxina del *cólera* (CT) i de la *ricina* (Johannes i Lamaze, 2002).

1.8. Objectius

Un dels objectius generals de la recerca que es duu a terme en el Laboratori d'Enginyeria de Proteïnes, on s'ha dut a terme aquest treball, és el disseny de variants de la ribonucleasa pancreàtica humana (HP-RNasa) amb activitat citotòxica, a fi d'aprofundir en el coneixement de les bases moleculars de la citotoxicitat d'aquests enzims. La generació de ribonucleases humanes amb propietats similars a les descrites per a altres ribonucleases d'origen no humà (com l'onconasa i la BS-RNasa) ofereix la possibilitat de desenvolupar nous agents quimioterapèutics que, en humans, probablement mostrarien una millor tolerància immunològica.

Els factors moleculars que determinen la capacitat tòxica de les ribonucleases comencen a ser coneguts. S'accepta que el procés s'inicia per la unió de l'enzim a la superfície cel·lular, seguit per la seva endocitosis i la seva translocació al citoplasma, on haurà de superar l'activitat inhibidora de l'hRI per tal de dur a terme la catàlisi enzimàtica de l'RNA, conduint així a la mort de la cèl·lula.

En base a aquestes propietats, l'objectiu principal d'aquest treball va ser la generació de variants de l'HP-RNasa que superessin algunes de les barreres més importants que suposadament limiten les capacitats tòxiques en aquest enzim. En concret la resistència a l'hRI i la capacitat d'interaccionar més eficientment amb la superfície cel·lular, a fi de facilitar la seva internalització. Arran d'aquestes consideracions, els objectius concrets que es van definir foren els següents:

1. Obtenció, per mutagènesi dirigida per oligonucleòtid, de variants de l'HP-RNasa que introduïssin alguna de les següents modificacions, o una combinació entre les dues, sense alterar les propietats estructurals ni catalítiques de l'enzim parental.
 - Impediments estèrics i/o electrostàtics en els punts de contacte de l'enzim amb l'inhibidor.
 - Addició d'un o varis pèptids RGD en la seqüència de la proteïna, per tal d'afavorir la seva interacció amb els receptors d'integrina de superfície cel·lular.
2. Expressió i purificació de cadascuna de les variants de l'HP-RNasa construïdes, així com de la proteïna parental, en quantitats suficients per a dur a terme els estudis posteriors.
3. Expressió, purificació i activació de l'onconasa, en quantitats suficients per a utilitzar-la com a control positiu en les anàlisis de citotoxicitat.
4. Caracterització de les propietats citotòxiques de les noves variants en diverses línies de cèl·lules tumorals *in vitro*, i estudi de la relació hRI-resistència amb la citotoxicitat.
5. Caracterització bioquímica de les variants de l'HP-RNasa tant a nivell d'activitat catalítica, com d'estabilitat.
6. Anàlisi de la internalització i estudi de les possibles vies de trànsit intracel·lular seguides per les variants de l'HP-RNasa que han adquirit propietats citotòxiques.

2. Material i Mètodes

2. *Material i mètodes*

Nota: El present capítol està complementat a l'APÈNDIX A, on es descriuen de manera detallada els protocols de laboratori d'ús generalitzat en el nostre laboratori. En canvi, les tècniques posades a punt al llarg del present treball de tesi, es descriuen en detall en el corresponent apartat d'aquest capítol.

2.1. **Material**

Durant aquest treball s'ha utilitzat l'equipament que es detalla a la TAULA 2.1. En general, els productes químics que s'han utilitzat durant aquest treball han estat de grau analític, procedents de les cases Roche Molecular Biochemicals (Alemanya), Fluka (Suïssa), Merk (Alemanya), Panreac (Espanya), Serva (Alemanya) i Sigma Chemical Co. (EUA). Pel que fa a productes d'ús més específic, la seva procedència serà indicada a mesura que apareguin en el text.

2. Material i mètodes

TAULA 2.1.

Equipament utilitzat en aquest treball

<i>Equip</i>	<i>Marca</i>	<i>Model</i>	<i>País</i>
Aparell de cavitació	Artisan Industry	-	EUA
Bombes HPLC	Pharmacia Biotech	P-900	Suècia
Bomba peristàtica	Pharmacia Biotech	P-1	Suècia
Càmera fotogràfica	Polaroid	MP4+	EUA
Centrífuga	Sorvall	RC-5B	EUA
Col·lector de cèl·lules	Molecular Devices	Skatron Combi-12	EUA
Detector HPLC	Pharmacia Biotech	UV-900	Suècia
Electroforesi d'agarosa	Pharmacia-Biotech	HE33-IM	Suècia
Electroforesi de proteïnes	Bio-Rad	Mini-Protean II™	EUA
Espectrefotòmetre	Perkin Elmer	Lambda Bio20	EUA
Espectrefluorímetre	Perkin Elmer	LS50	EUA
Espectrepolarímetre	Jasco	J715	Japó
Hematocitòmetre	Preciss	Neubauer Improved	França
Homogeneitzador de cèl·lules	Jencons	Dounce	Regne Unit
Incubador	Selecta	HotCold-UM	Espanya
Incubador CO ₂	Heraeus	B 5060	Alemanya
Lector radiació β	Beckman Coulter	LS 3801	EUA
Lector radiació γ	Packard	Cobra	EUA
Liofilitzador	Heto	CT60e	Dinamarca
Microspoci confocal de fluorescència	Leica	TCS 4D	Alemanya
Premsa de French	SIM-AMINCO	20K rapid Fill cell	EUA
Sonda de temperatura	HANNA	HI93551	Espanya
Termociclador	Biometra	Personal Cycler	Alemanya
Transil.luminador UV	TFX	20M	França
Ultracentrífuga	Beckman-Coulter	Optima	EUA
Ultrafiltrador tangencial	Millipore	Acrylic Minitan II	EUA

2.1.1. Microorganismes

En el present treball s'han emprat les següents soques d'*Escherichia coli*, el genotip de les quals es descriu en detall a la TAULA 2.2.

Escherichia coli TG1 (Gibson, 1984)

Aquesta soca, obtinguda d'Amersham Biosciences (Regne Unit), ha estat utilitzada de manera general com a hospedant del vector pET17b(+) i per a la construcció de les variants descrites en aquesta tesi. Es tracta d'una soca idònia per a la propagació i manipulació de vectors pel fet de créixer molt bé en medis rics, i tenir una elevada taxa de transformabilitat.

Escherichia coli BL21(DE3) (Studier *et al.*, 1990)

Aquesta soca, obtinguda de Novagene (EUA) s'ha utilitzat per a l'expressió de les construccions fetes sobre el vector pET17b(+) i derivats. Presenta la particularitat que en el gen *int* del genoma bacterià s'hi ha inserit el bacteriòfag DE3, de manera que el gen *int* roman inactivat. El bacteriòfag DE3 és un derivat del fag λ , que porta un fragment de DNA que conté el gen *lacI*, un fragment inicial del gen *lacZ* i el gen que codifica per la RNA polimerasa de T7 sota el control del promotor *lacUV5*. La inactivació del gen *int* fa que el bacteriòfag DE3 no es pugui escindir del genoma ni tornar-se a integrar sense l'ajuda d'un fag coadjuvant, de manera que resta com a lisogen estable. En aquestes condicions, l'únic promotor capaç de conduir la transcripció de la RNA polimerasa de T7 és el promotor *lacUV5*, que és induïble per IPTG. En afegir IPTG a un cultiu d'aquesta soca en fase de creixement, es transcriu RNA polimerasa de T7, la qual al seu torn transcriurà el gen que ha estat clonat en el plasmidi pET17b(+) o derivats, darrera del promotor reconegut per aquesta polimerasa.

TAULA 2.2.

Característiques genotípiques de les soques utilitzades

<i>Soca</i>	<i>Genotip</i>
<i>Escherichia coli</i> TG1	<i>thr</i> , <i>hsd</i> Δ 5, <i>supE</i> , Δ (<i>lac-pro AB</i>), <i>thi</i> ⁻¹ , Δ (<i>mcrB-hsdSM</i>)5, (<i>rK</i> <i>mK</i>), F'[<i>traD36</i> , <i>proA</i> ⁺ , <i>proB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^f <i>lac Z</i> Δ M15]
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F, <i>ompT</i> , (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻) <i>hsdS</i> , <i>gal</i> λ (<i>DE3</i>) <i>dcm</i> , <i>don</i> ⁻

2.1.2. Vectors

Per al clonatge i l'expressió de les diferents construccions recombinants descrites en aquest treball, s'ha utilitzat el vector pET17b(+) (Rosenberg, 1987; Studier i Moffatt, 1986; Studier *et al.*, 1990), procedent de Novagene (EUA). Aquest vector permet una expressió citoplasmàtica de les proteïnes recombinants. És un plasmidi

2. Material i mètodes

de 3.306 pb, que conté un origen de replicació d'*E. coli* (*ori*), un gen de resistència a l'ampicil·lina, una regió policonnectora amb deu possibles dianes, el promotor de l'RNA polimerasa de T7 i un operador *lac* just darrera d'aquest promotor. A la vegada, aquest vector és portador del gen del repressor *lac* (*lacI*) juntament amb el seu promotor natural. El vector també conté un terminador propi de l'RNA polimerasa de T7.

Quan aquest vector s'utilitza en lisògens del tipus DE3 per a l'expressió de gens foranis, el repressor *lac* actua tant sobre el promotor *lacUV5*, on reprimeix la transcripció de la RNA polimerasa de T7, com bloquejant la transcripció del gen forani per qualsevol RNA polimerasa de T7 que es pugui trobar.

2.1.3. Línies cel·lulars eucariotes

A la TAULA 2.3 es descriuen les diverses línies cel·lulars emprades en el present treball (per a més informació veure *American Type Culture Collection*, a l'adreça <http://www.atcc.org>).

TAULA 2.3.

Característiques de les línies cel·lulars utilitzades en el present treball

<i>Nom</i>	<i>Morfologia</i>	<i>Teixit d'origen</i>	<i>Creixement</i>	<i>Temps de divisió</i>
A431	Epitelial	Carcinoma epidermoid	Adherent	24 h
K562	Limfoide	Eritroleucemia	Suspensió	18 h
HeLa	Epitelial	Adenocarcinoma cèrvix	Adherent	25 h
HeLaS3 ^a	Epitelial	Adenocarcinoma cèrvix	Suspensió	25 h
MCF7	Epitelial	Adenocarcinoma mamari	Adherent	48 h
Daudi	Limfoblast	Limfoma	Suspensió	24 h

^a HeLa S3 és una línia clonal derivada de la parental HeLa. Aquesta línia és molt útil per la possibilitat d'adaptar el seu creixement en suspensió.

2.2. Mètodes microbiològics

2.2.1. Medis de cultiu i antibiòtics

Per al creixement i propagació de les diverses soques bacterianes, portadores o no de vectors, s'ha utilitzat el medi de cultiu LB (Sambrook *et al.*, 1989). La composició d'aquest medi es descriu a l'APARTAT A1 de l'APÈNDIX A. El medi LB s'ha utilitzat amb totes les soques, tant per a l'obtenció i manipulació dels vectors, com per a l'expressió de les diferents construccions resultants d'aquesta manipulació.

Per al cultiu de microorganismes s'ha utilitzat únicament l'antibiòtic ampicil·lina. La solució d'emmagatzematge ha estat sempre de 50 mg/ml en aigua destil·lada. Una vegada preparada aquesta solució, s'ha esterilitzat per filtració (0,22 µm de diàmetre de porus) i s'ha guardat en alíquotes a -20°C. La concentració de treball d'ampicil·lina en el medi de cultiu ha estat sempre de 50 µg/ml. Si cal suplementar un medi sòlid (en placa), l'antibiòtic s'afegeix quan el medi ja s'ha refredat prou, just abans de dispensar-lo a les plaques.

2.2.2. Manteniment de les soques

Per al manteniment a llarg termini de les soques, aquestes s'han emmagatzemant en forma de glicerinat a -80°C. El procediment dut a terme per a l'obtenció dels glicerينات és el següent:

1. Inocular una colònia de la soca desitjada en 3 ml del medi de cultiu adequat.
2. Incubar a 37°C en agitació (250 r.p.m) entre 12 i 15 hores.
3. Transferir 1 ml de cultiu a un tub eppendorf i afegir 0.315 ml d'una solució de glicerol 87 % estèril (concentració final 20 %).
4. Homogeneïtzar el tub i desar a -80°C.

Les cèl·lules desades a -80°C d'aquesta manera es mantenen viables durant molts mesos, fins i tot anys. Per inocular un nou cultiu a partir d'un d'aquests estocs congelats, es fon un petit volum de la superfície del tub, s'inocula, i la resta es retorna al congelador sense que s'hagi arribat a descongelar completament.

2.2.3. Creixement dels cultius

Per als cultius líquids s'han aplicat sempre les mateixes normes generals. S'ha intentat que el volum de medi de cultiu fos com a màxim 1/5 part del volum total del flascó. Els cultius de menys de 4 ml s'han preparat sempre a partir d'una colònia

única o bé d'un glicerinat. Els cultius de volum superior sempre s'ha fet créixer abans un pre-inòcul de volum adequat, per després afegir-lo al medi de cultiu amb una proporció 1:100 (inòcul:medi).

Per al seu creixement, els cultius s'han incubat a una temperatura de 37°C i amb una agitació de 250 rpm. Pel que fa al temps d'incubació referit normalment com *overnight* (O/N), ha estat sempre d'entre 12 i 15 hores. Incubacions més llargues són desaconsellables pel fet que pot veure's reduïda la població de cèl·lules portadores del vector d'interès, a favor de la població de cèl·lules sense vector. El temps d'incubació de cultius per a l'expressió de gens recombinants ha oscil·lat entre les 6 i les 8 hores, les tres darreres, posteriors a la inducció.

2.3. Mètodes de cultiu per cèl·lules eucariotes

2.3.1. Tècnica asèptica

Atès que les cèl·lules es fan créixer en cultiu *in vitro* durant llargs períodes de temps, és essencial seguir tot un conjunt de mesures bàsiques d'esterilitat per tal d'evitar contaminacions. Tot el material i els reactius que han d'entrar en contacte amb els cultius han de ser estèrils, així com també totes les superfícies de treball.

La cabina de flux laminar ha de contenir únicament el material imprescindible per a dur a terme la manipulació experimental. La superfície interior de la cambra s'ha de netejar rutinàriament amb etanol al 70 %.

Tot el material d'un sol ús utilitzat en el cultiu cel·lular, incloent pipetes, plaques, flascons i ampolles de medi són subministrats per les cases comercials de forma ja estèril. Pel que fa al material de vidre, cal esterilitzar-lo mitjançant l'autoclau, seguint les condicions específiques per a cada tipus de material. Les solucions que no poden ser sotmeses a l'autoclau, com ara medis o solucions d'antibiòtics, han de ser esterilitzades per filtració, amb un filtre amb un diàmetre de porus de 0,22 µm.

2.3.2. Manteniment de les línies cel·lulars

Totes les línies cel·lulars s'han fet créixer en medi DMEM (Gibco) suplementat amb 10 % de serum boví fetal (FCS) (Gibco), L-glutamina 2 mM, penicilina 50 U/ml i estreptomycinina 50 µg/ml. Les incubacions s'han realitzat en un incubador amb ambient saturat d'aigua, a 37°C i 5 % CO₂.

Per les línies de creixement adherent, els cultius s'han de trobar en un estat de semiconfluència d'entre el 75-100 % en el moment de ser subcultivats. Si es dilueixen més tard, el fenomen d'inhibició per contacte entre les cèl·lules atura el seu creixement i, finalment, en condueix la seva mort. Si es subcultiven abans, obtindrem

una fase de latència més llarga del normal, alentint-se l'establiment del cultiu. Així mateix, per subcultivar cal afegir un nombre de cèl·lules suficient per a obtenir una concentració final de $\approx 5 \cdot 10^4$ cèl·lules/ml en cadascun dels nous cultius. Les característiques de creixement varien en cada línia cel·lular. Per a les línies que s'han emprat en el present treball, amb l'excepció de MCF7, el temps de divisió cel·lular ha estat de 24 h, i els cultius s'han subcultivat cada 2 o 3 dies. MCF7 presenta un temps de divisió més llarg, de 48 h, per la qual cosa s'han subcultivat cada 5 dies.

Propagació de cultius de creixement adherent

1. Eminar el medi vell amb una pipeta estèril.
2. Rentar dues vegades la monocapa de cèl·lules adherida al flascó amb PBS estèril.
Els processos de rentat serveixen per eliminar restes de FCS del medi, que actuarien inhibint l'acció de la tripsina.
3. Afegir la solució de tripsina/EDTA a 37°C fins que cobreixi la monocapa de cèl·lules adherida a la superfície del flascó (≈ 1 ml per a flascons de cultiu de 25 cm²).
4. Incubar el flascó a 37°C i 5 % CO₂. Controlar regularment al microscopi el moment en què les cèl·lules deixen d'estar adherides.
5. Una vegada les cèl·lules s'han deslligat de la superfície del flascó, afegir 9 ml de medi complet fresc i temperat a 37°C. Pipetejar la suspensió de cèl·lules repetidament. Aquesta acció mecànica permet dissociar les cèl·lules que encara romanen lligades entre elles o a la superfície del flascó. El FCS que conté el medi inhibirà l'acció de la tripsina, evitant que aquesta malmeti les cèl·lules.
6. Realitzar la dilució en nous flascons: 1/3, 1/5 o 1/10.
7. Incubar en un incubador saturat de vapor d'aigua a 37°C i 5 % CO₂.
8. Per la simple propagació del cultiu, subcultivar cada vegada que les cèl·lules assoleixin la pre-confluència, cada 2-3 dies.

REACTIUS I SOLUCIONS

Tampó fosfat salí (PBS), pH 7.4

0.24 g KH₂PO₄ (1.4 mM)
0.20 g KCl (2.7 mM)
8.00 g NaCl (0.137 M)
1.44 g Na₂HPO₄ (0.01 M)
H₂O fins a 1 litre
Ajustar al pH desitjat amb 1 M NaOH o 1 M HCl
Emmagatzemar a temperatura ambient.

Tripsina/EDTA

0.25 % (p/v) tripsina
0.2 % (p/v) EDTA
Emmagatzemar ≤ 1 any a -20°C.

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

El subcultiu de les línies que creixen en suspensió és molt més simple que el de les cèl·lules que creixen en forma de monocapa. Donat que les cèl·lules es troben suspeses en el medi en lloc d'estar lligades a la superfície del flascó, no és necessari cap tractament enzimàtic previ a la pròpia dilució en medi fresc. Malgrat això, cal subcultivar els flascons cada 2 o 3 dies abans que les cèl·lules deixin de créixer en la fase exponencial de creixement.

2.3.3. Criopreservació de les cèl·lules

Al llarg del temps, les cèl·lules cultivades pateixen canvis en el seu creixement, morfologia i característiques genètiques. Aquests canvis afecten negativament la reproductibilitat dels resultats experimentals. La criopreservació de les línies cel·lulars és una tècnica que permet preservar i retenir la integritat de les línies cel·lulars subjectes a estudi. Congelant les cèl·lules una vegada s'ha acabat el treball experimental, s'evita la senescència cel·lular, es redueixen els riscos de contaminació i es minimitzen els efectes de la deriva genètica.

Els cultius seleccionats per a la criopreservació han d'estar en fase exponencial de creixement. La suspensió de cèl·lules es congela en presència de DMSO com a agent crioprotector. Les cèl·lules es congelen gradualment i es descongelen ràpidament, per tal d'evitar la formació de cristalls de gel que les lisarien. Els cultius poden ser congelats i emmagatzemats indefinidament en nitrogen líquid (-180°C), o a -80°C durant alguns mesos.

Congelació de línies cel·lulars de creixement adherent

1. Aspirar el medi d'un flascó (de 25 cm²) de cèl·lules en fase exponencial de creixement.
2. Realitzar un tractament amb tripsinitza tal i com es descriu en l'APARTAT 2.3.2).
3. Transferir les cèl·lules a un tub de centrífuga estèril, i afegir 2 ml de medi complet amb FCS.
4. Centrifugar a 300 xg durant 5 min, eliminar el sobrenedant i resuspendre el sediment en 2 ml del medi de congelació (per tal de tenir una concentració final d'entre 10⁶ i 10⁷ cel/ml). Posar el tub ràpidament en gel.

2. Material i mètodes

5. Fer alíquotes d'1 ml de la suspensió de cèl·lules, en vials de 2 ml (Nalgene Cryofreezer, EUA).
6. Congelar els vials a -80°C durant tota la nit.
7. Transferir els vials a una cambra de nitrogen líquid per a una conservació a llarg termini.

REACTIUS I SOLUCIONS

Medi de congelació

DMEM	7 ml
FCS	2 ml
DMSO	1 ml

La concentració de DMSO no pot ser superior al 10% de concentració final, donat que és tòxic per a les cèl·lules.

Congelació de línies cel·lulars de creixement en suspensió

1. Centrifugar una suspensió de cèl·lules en fase exponencial de creixement (entre $5 \cdot 10^6$ i 10^7 cèl·lules), 10 min a $300 \times g$ i a temperatura ambient.
 2. Eliminar el sobrenedant i resuspendre el sediment en medi de congelació a 4°C , fins a una concentració de 10^6 - 10^7 cel/ml.
 3. Transferir alíquotes d'1 ml de la suspensió de cèl·lules en vials, i congelar seguint les mateixes indicacions que per a les línies de creixement adherent.
-

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

Descongelació

1. Agafar el vial del recipient de nitrogen líquid, i col·locar-lo immediatament en un bany d'aigua a 37°C . Agitar el vial contínuament, fins que el medi estigui descongelat (< 60 s).
2. Netejar la superfície externa del vial amb etanol al 70 %.

2. Material i mètodes

3. Una vegada descongelat, transferir ràpidament el contingut dels vials a un tub de centrifuga estèril que contingui 2 ml de medi complet atemperat a 37°C. Centrifugar 10 min a 300 xg, a temperatura ambient. Descartar el sobrenedant.

Aquest rentat es realitza per eliminar el DMSO residual del medi fresc.

4. Resuspendre suaument el sediment en 1 ml de medi complet, i transferir a un flascó de cultiu amb 9 ml de medi.

Els cultius es reestableixen a una densitat cel·lular més elevada a la que s'utilitza normalment, donat que sempre es produeix un percentatge de mort cel·lular associada a la congelació. Normalment, 1 ml de suspensió cel·lular es resembra en 5-20 ml de medi.

5. Controlar els cultius 24 h després, per assegurar que les cèl·lules s'han lligat a la superfície del flascó (en el cas de les línies adherents) i que evolucionen correctament.
6. Canviar el medi 2-3 dies després, abans que l'indicador de pH del medi iniciï el canvi de color.

2.3.4. Determinació del nombre de cèl·lules

Per al recompte del nombre de cèl·lules s'ha utilitzat un hemocitòmetre del tipus Neubauer Improved. L'hemocitòmetre consisteix en una espècie de portaobjectes força gruixut, com el mostrat a la FIGURA 2.1. Presenta quatre estries longitudinals en el seu terç central. Aquestes estries són paral·leles, i el terç central té la mateixa mida que el cobreobjectes que s'utilitza amb l'hemocitòmetre. Els dos suports externs es troben més elevats que el suport intern, de manera que el cobreobjectes reposarà sobre els dos primers. Les dues reixetes o cel·les de comptatge (FIGURA 2.2) estan gravades sobre el suport central, circumscrit per les dues estries internes.

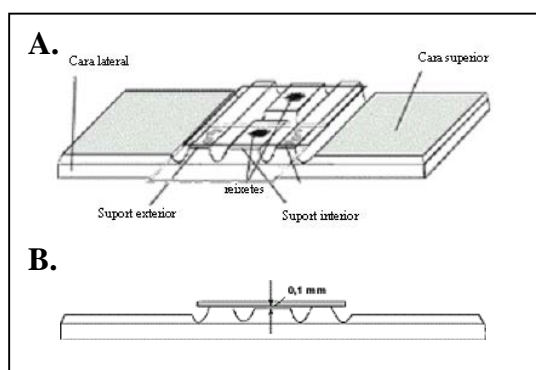


FIGURA 2.1.

Hemocitòmetre Neubauer Improved. A. Visió frontal. **B.** Visió lateral.

2. Material i mètodes

El cobreobjectes es col·loca reposant sobre els dos suports externs, i la mostra de cèl·lules en suspensió s'aplica en les dues estries internes. Per capil·laritat, el líquid es desplaça per sota el cobreobjectes i cobreix les dues reixetes situades a la plataforma central.

L'hemocitòmetre es disposa en un microscopi òptic, i es procedeix al recompte de les cèl·lules de la mostra a partir de la cel·la de comptatge. Cadascuna de les dues cel·les consisteix en una reixeta subdividida en 4 quadrats (indicats com a **L** a la FIGURA 2.2), d'1 mm de costat i 0,1 mm de profunditat. Cada quadrat està subdividit a la vegada, per 16 quadrats de 0,25 mm de costat. Per obtenir la concentració de cèl·lules en una solució, es realitza el seu recompte en les quatre àrees **L**, i s'aplica la fórmula següent :

$$\text{N}^{\circ} \text{ cèl·lules per } \mu\text{L} = \text{N}^{\circ} \text{ cèl·lules} / (4 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}) \quad (\text{EQUACIÓ 2.1})$$

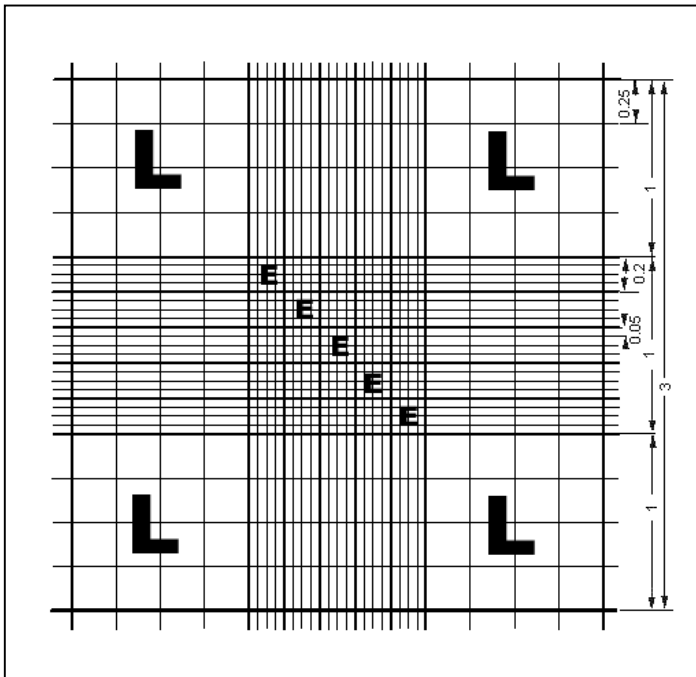


FIGURA 2.2.

Cel·la de recompte d'un hemocitòmetre.

2.4. Tècniques de DNA recombinant

2.4.1. Condicions generals de manipulació de DNA

El DNA és molt susceptible de ser atacat per les nucleases que es troben arreu, tant provinents de la pell del propi manipulador, com d'origen bacterià, presents a la pols de l'ambient. És per aquesta raó que és necessari treballar respectant certes mesures de seguretat, per tal de no malmetre la mostra. Així doncs, cal esterilitzar amb autoclau tot aquell material i solucions que hagin de tenir un contacte directe amb el DNA. Per la mateixa raó, sovint és aconsellable l'ús de quelants d'ions divalents (com l'EDTA) que inhibeixin l'acció de les nucleases. Així mateix, és recomanable manipular sempre les mostres amb guants de làtex.

2.4.2. Obtenció de DNA plasmídic

Per a l'obtenció de DNA plasmídic s'ha utilitzat el kit comercial Quantum Prep Plasmid Miniprep kit (Bio-Rad, Alemanya), el qual ens permet obtenir entre 3 i 5 µg de DNA per ml de cultiu, si es treballa amb cèl·lules portadores de plasmidis d'elevat nombre de còpia, com ha estat el nostre cas. El DNA obtingut mitjançant aquests processos pot ser utilitzat per a transformacions i digestions amb enzims de restricció. Els detalls del protocol s'especifiquen a l'APARTAT A2.1 de l'APÈNDIX A.

2.4.3. Electroforesi de DNA en gels d'agarosa

Per a la preparació de gels s'ha utilitzat agarosa de baixa electroendòsmosi (Ecogen, Espanya). Pel que fa al percentatge d'agarosa per a la preparació del gel, ha oscil·lat sempre entre un 0,8 % i un 2,0 %, en funció de la longitud dels fragments que es volien separar (TAULA 2.4). Els detalls de la tècnica s'especifiquen a l'APARTAT A2.2 de l'APÈNDIX A.

TAULA 2.4.

Percentatge d'agarosa en funció de la mida dels fragments de DNA a separar

<i>% d'agarosa</i>	<i>Mida del fragment (Kb)</i>
0,8	1,0-20
1,0	0,5-10
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

2.4.4. Purificació de fragments de DNA

L'aïllament de fragments de DNA de doble cadena a partir de gels d'agarosa, s'ha dut a terme mitjançant el sistema GeneClean de BIO101 Inc. (EUA). Els detalls d'aquest protocol s'especifiquen a l'APARTAT A2.3 de l'APÈNDIX A.

2.4.5. Concentració de DNA

Els procediments emprats per a la concentració de DNA han estat diversos. En primer lloc, es pot optar per un GeneClean (APARTAT 2.4.4), tot resuspentent a l'etapa final amb un volum inferior a l'inicial. L'avantatge d'aquest mètode és que permet obtenir DNA molt pur en molt poc temps. Un segon mètode utilitzat ha estat la precipitació del DNA, prèvia extracció amb fenol i cloroform, afegint 0,1 volums d'acetat sòdic 3 M i 2 volums d'etanol, per al final resuspendre amb un petit volum d'aigua Milli-Q o TE (veure l'APARTAT A2.4 de l'APÈNDIX A).

2.4.6. Estimació de la concentració de DNA

Per a fer una estimació de la quantitat de DNA present en una dissolució, es poden emprar dos sistemes: la determinació espectrofotomètrica i l'estimació per electroforesi en gel d'agarosa.

La *determinació espectrofotomètrica* consisteix en mesurar l'absorbància a 260 nm de la dissolució de DNA de la qual es vol determinar la concentració o d'una dilució de la mateixa. S'accepta de forma general, que una unitat de densitat òptica a 260 nm equival a una concentració de 50 µg/ml de DNA de doble cadena, i a 20 µg/ml per un oligonucleòtid de cadena senzilla. Per a determinar el grau de puresa de l'àcid nucleic, s'estudia la relació entre els valors de densitat òptica a 260 i 280 nm (DO_{260}/DO_{280}). En preparacions pures de DNA, aquest quocient té el valor 1,8. Valors inferiors indiquen que la preparació està contaminada amb proteïnes o fenol, i valors superiors a 1,8 en una preparació de DNA indiquen la presència d'RNA.

Sovint els volums de les dissolucions de DNA purificat són massa petits o aquestes estan massa diluïdes i es fa difícil estimar la seva concentració espectrofotomètricament. En aquests casos es pot estimar la concentració a partir d'electroforesi en gels d'agarosa. Per dur a terme aquest tipus d'estimació cal realitzar una electroforesi analítica (APARTAT 2.4.3), per una banda de la dissolució de DNA de la qual es vol fer l'estimació de la concentració i per l'altra de marcadors de massa molecular adequats. Atès que es pot conèixer quina quantitat de DNA hi ha en cadascuna de les bandes dels marcadors a partir del volum o concentració aplicades, es pot inferir la quantitat de DNA present en la banda de la dissolució problema, tenint en compte el volum aplicat, per comparació de la seva intensitat amb la de les bandes dels marcadors més propers.

2.4.7. Tractament amb enzims de restricció

En el present treball s'han emprat enzims de restricció de tipus II per obtenir fragments de DNA amb extrems cohesius, els quals es poden purificar i combinar per donar lloc a molècules de DNA recombinants. Els enzims de restricció utilitzats es presenten a la TAULA 2.5, on s'indica també la casa comercial de la qual s'han obtingut. La temperatura d'incubació ha estat, per a tots els enzims utilitzats, de 37°C, i el temps d'incubació d'entre 2 i 6 hores. El volum d'enzim a afegir a la reacció mai va superar el 10 % del volum total.

TAULA 2.5.

Enzims de restricció utilitzats en aquest treball

<i>Enzim</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Seqüència diana</i>
<i>SacI</i>	Roche Molecular Biochemicals	GAGCT↓ C
<i>NdeI</i>	MBI Fermentas	CA↓ TATG
<i>XhoI</i>	MBI Fermentas	C↓ TCGAG

2.4.8. Reacció de lligament

Per al lligament de molècules de DNA s'ha utilitzat la DNA lligasa de T4 distribuïda per Roche Molecular Biochemicals (Alemanya), seguint les indicacions de la casa comercial. Generalment, s'ha deixat que la reacció tingués lloc durant 12 hores a 16 °C (veure l'APARTAT A2.5 de l'APÈNDIX A).

2.4.9. Obtenció i transformació de cèl·lules competents

Per a l'obtenció de cèl·lules competents (veure l'APARTAT A2.6 de l'APÈNDIX A) s'ha seguit una variació del protocol descrit per (Cohen *et al.*, 1972), basat en el tractament de les cèl·lules bacterianes amb CaCl₂ 50 mM a 4°C. Cal fer esment que les cèl·lules només incorporen de forma estable molècules de DNA de doble cadena circulars. Les cèl·lules competents preparades poden ser transformades amb DNA provinent d'un lligament o obtenció minipreparativa. La introducció del DNA en les cèl·lules competents es realitza mitjançant un xoc tèrmic de 2 min a 42°C. Els detalls del protocol s'especifiquen a l'APARTAT A2.7 de l'APÈNDIX A.

2.4.10. Mutagènesi dirigida per oligonucleòtid (SDM)

La tècnica de mutagènesi dirigida emprada en el present treball ha estat la descrita per (Juncosa *et al.*, 1994). Aquesta tècnica aprofita la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), utilitzant dsDNA com a motlle i una DNA polimerasa amb activitat correctora 3'→5', la *Deep Vent DNA polimerase* (New England Biolabs, EUA) (veure els APARTATS A2.8 i A2.9 de l'APÈNDIX A).

Els oligonucleòtids han estat dissenyats en cada cas per optimitzar l'eficiència de mutagènesi. Si la mutació afecta a una sola base, l'oligonucleòtid ha tingut una longitud de 21 bases, amb la mutació centrada. En el cas de canvis de més d'una base consecutiva, la longitud dels oligonucleòtids a banda i banda de la regió de mutació s'ha ajustat de manera que la temperatura teòrica d'hibridació fos aproximadament de 42°C, d'acord amb la fórmula de l'EQUACIÓ 2.2. Els oligonucleòtids dissenyats d'aquesta manera han estat sintetitzats i adquirits liofilitzats a Roche Molecular Biochemicals (Alemanya).

$$T_m (\text{°C}) = 81,5 + 0,41 (\% \text{ GC}) - 675/a - b/a \quad (\text{EQUACIÓ 2.2})$$

Essent *a* el número de bases total, i *b* el número de bases no aparellades.

Per a la SDM es parteix del gen que es vol mutar (DNA motlle), inserit en un vector adequat per al qual es tenen dos oligonucleòtids que s'hibriden als extrems del gen, a cadenes complementàries. En una primera PCR s'amplifica una part del gen, la compresa entre les regions a les que s'hibriden l'oligonucleòtid mutagènic i un dels oligonucleòtids externs universals (APARTAT A2.9 de l'APÈNDIX A). El producte d'aquesta primera PCR, degudament purificat, tal i com es descriu a l'APARTAT 2.4.4, s'utilitza com a encebador juntament amb l'altre oligonucleòtid universal per a una segona PCR, en la que el DNA motlle segueix essent el vector que porta incorporat el fragment a mutar. El producte final de la segona PCR és digerit amb els enzims de restricció adients, i inserit a pET17b digerit amb els mateixos enzims de restricció.

El producte del lligament es transforma sobre *E. coli* TG1. D'entre les colònies transformants obtingudes, se selecciona les que han incorporat correctament la mutació, fet que es comprova per seqüenciació del DNA.

2.4.11. Seqüenciació de DNA

La seqüenciació del DNA s'ha realitzat seguint el mètode de Sanger (Sanger i Coulson, 1978; Sanger *et al.*, 1977). S'ha emprat la tècnica de seqüenciació automàtica en un aparell ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Biosystems, EUA), tot seguint les indicacions de la casa comercial (veure APARTAT A2.10 de l'APÈNDIX A). La reacció de seqüenciació s'ha dut a terme utilitzant el kit ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (PE Biosystems), amb la DNA polimerasa AmpliTaq[®] (PE Biosystems).

2.5. Mètodes d'expressió i purificació de proteïnes recombinants

2.5.1. Expressió de les proteïnes recombinants en *E. coli* BL21(DE3)

El creixement de la soca portadora del vector a expressar es realitza tal i com es descriu a l'APARTAT 2.2.3. Les condicions específiques de cultiu de la soca *E. coli* BL21(DE3), encaminades a la producció de les diferents proteïnes recombinants, van ser les que s'exposen a continuació (veure també l'APARTAT A3.1 de l'APÈNDIX A):

S'estableix un cultiu de nit, inoculant una única colònia de la soca desitjada en 1-5 ml de medi líquid LB suplementat amb 400 µg/ml d'ampicil·lina. El cultiu s'incuba a 37°C amb agitació (250 r.p.m.) durant 12-15 hores.

Amb aquest cultiu s'inocula a una dilució 1/100 en 1 L de medi LB suplementat amb 50 µg/ml d'ampicil·lina. Es deixa créixer el cultiu a 37°C i en agitació (250 r.p.m.) durant 3-4 hores, fins que s'assoleix un valor d'absorbància a 550 nm de 0.8-1.0. En aquest moment es realitza la inducció de l'expressió de la proteïna recombinant afegint IPTG 1 mM (concentració final). Es deixa créixer el cultiu induït 3 hores i tot seguit, es centrifuga a 10.000 xg durant 20 min per tal de recollir les cèl·lules. Aquestes es guarden a -20°C fins al moment d'iniciar el procés de purificació (APARTAT 2.5.3).

2.5.2. Anàlisi dels nivells de producció

Per tal d'analitzar la producció de proteïna recombinant durant la inducció, es prenen mostres d'1 ml de cultiu en el moment anterior a la inducció i a diferents temps al llarg d'aquesta. Aquestes mostres es centrifuguen a 10.000 xg, durant 4 min a temperatura ambient, s'elimina el sobrenedant per aspiració, es resuspèn el sediment cel·lular en 150 µl d'aigua, s'afegeixen 50 µl de tampó d'aplicació de proteïnes 4x, i es bull durant 5 min. Finalment, s'analitzen les proteïnes per SDS-PAGE (APARTAT 2.6.2).

2.5.3. Purificació de les proteïnes recombinants

En aquest treball s'ha seguit el protocol de purificació descrit per Canals *et al.* (1998) i per Ribó *et al.* (2001), el qual permet obtenir quantitats suficients de proteïna pura i homogènia. El protocol utilitzat, adaptat per a la purificació a partir d'1 L de cultiu induït (APARTAT 2.5.1) es descriu a grans trets tot seguit. Els detalls del procediment s'especifiquen a l'APARTAT A3.2 de l'APÈNDIX A.

El procés de purificació s'inicia amb l'expressió heteròloga de la proteïna, tal i com s'ha descrit en l'APARTAT 2.5.1. Les cèl·lules recollides per centrifugació es resuspenen en tampó Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0. Tot seguit es procedeix al trencament de les cèl·lules per mitjà de la premsa de French. A continuació s'aïllen els cossos d'inclusió per centrifugació, que és on es troba la major part de la proteïna recombinant produïdes per la cèl·lula. El procés continua amb la desnaturalització d'aquests agregats amb Gnd-HCl 6 M i a seva reducció amb GSH 0,1 M.

La mostra, desnaturalitzada i reduïda, es dilueix en un amortidor de replegament que conté L-Arg i GSSG a pH 8,5, fins a una concentració de proteïna d'entre 50 i 100 µg/ml. A través de la dilució, tant el Gnd-HCl com el GSH passen a estar a una concentració molt baixa, de manera que s'inicia el replegament i, gràcies a la presència de GSSG, la reoxidació de la proteïna. La mostra s'incuba en aquestes condicions a 4°C durant 24 h i tot seguit se li ajusta el pH a 5,0 amb àcid acètic per tal d'aturar el procés d'oxidació.

Donat que en aquest estadi la mostra es troba molt diluïda, es procedeix a la seva concentració per mitjà del sistema d'ultrafiltració tangencial. La mostra ja concentrada, es dialitza contra l'amortidor acetat sòdic 50 mM, i s'aplica a una columna de bescanvi catiònic Mono-S d'HPLC. Es recull el pic principal del cromatograma, que correspon a la proteïna pura i homogènia. Per refermar l'homogeneïtat de la proteïna pura obtinguda, s'analitza una mostra d'aquest pic per cromatografia de fase reversa, utilitzant una columna per HPLC Vydac-C4.

Finalment, la proteïna es dialitza en contra d'aigua Milli-Q i es liofilitza, per tal d'emmagatzemar-la a -20°C.

2.6. Caracterització bioquímica de proteïnes

2.6.1. Determinació de la concentració de proteïna

2.6.1.1. Mètode de Bradford

La determinació de la concentració de proteïna total s'ha dut a terme mitjançant el mètode de (Bradford, 1976) basat en la unió del colorant blau de Coomassie a les proteïnes. Aquest mètode es basa en el canvi del màxim d'absorció, de 465 a 595, del colorant Coomassie Brilliant Blue G-250 en solució àcida quan s'uneix a proteïna (veure apartat A4.1 de l'APÈNDIX A).

2.6.1.2. Mètode espectrofotomètric

La concentració de les mostres de ribonucleasa s'ha determinat també per espectrofotometria, a partir del valor d'absorbància a 278 nm i utilitzant el coeficient d'extinció molar corresponent. Per a l'RNasa A comercial: $\epsilon_{278} = 9800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Sela i Anfinsen, 1957), i per a l'onconasa: $\epsilon_{278} = 10.280 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Leland *et al.*, 1998).

En el cas de les variants de l'HP-RNasa aquest coeficient s'ha determinat seguint el mètode descrit per (Gill i von Hippel, 1989), que en tots els casos va proporcionar un valor de $\epsilon_{278} = 8800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.6.2. Electroforesi discontinua en gel de poliacrilamida-SDS

En aquest treball s'ha utilitzat el mètode d'electroforesi discontinua descrit per (Laemmli, 1970). La concentració d'acrilamida del gel superior ha estat sempre del 5 %, i la del gel inferior normalment del 15 % (veure APARTATS A4.2 i A4.3 de l'APÈNDIX A). Per preparar les mostres, s'afegeix 1 volum d'amortidor d'aplicació de mostres (4x) per cada tres volums de mostra. Si es vol que l'amortidor d'aplicació tingui caràcter reductor, s'hi addiciona beta-mercaptoetanol 7,5 % (v/v). Les mostres s'escalfen durant 5 min a 90°C abans de ser carregades al gel.

2.6.3. Determinació de l'activitat ribonucleasa

2.6.3.1. Zimograma

Aquest sistema s'ha utilitzat per identificar l'activitat ribonucleasa tant en les diferents fraccions recollides d'una cromatografia, com al llarg dels diversos passos d'una purificació. S'ha utilitzat el mètode de tinció negativa de gels de poliacrilamida-SDS amb poli(C) que es detalla a (Bravo *et al.*, 1994) (veure APARTAT A4.4 de l'APÈNDIX A)

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

2.6.3.2. *Determinació espectrofotomètrica de les constants catalítiques*

Els paràmetres cinètics de les proteïnes amb activitat ribonucleasa s'han caracteritzat utilitzant dos substrats diferents, la citidina 2',3'-fosfat cíclic (C>p) i el poli(C) com a substrats de baix i d'alt pes molecular, respectivament. El protocol específic es presenta a l'APARTAT A4.5 de l'APÈNDIX A.

2.6.4. **Determinació de la massa molecular**

La massa molecular de les proteïnes generades s'ha comprovat per espectrometria de masses MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) en un equip BRUKER-BIFLEX, d'acord amb el protocol descrit a (Wu i Watson, 1997). Aquestes anàlisis s'han dut a terme al Servei de Seqüenciació de Proteïnes i Biocomputació de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina "V. Villar i Palasí" de la Universitat Autònoma de Barcelona.

2.6.5. **Càlcul de la temperatura mitja de desnaturalització tèrmica ($T_{1/2}$)**

Les diferències de termoestabilitat ($\Delta T_{1/2}$) de les variants en estudi respecte la proteïna salvatge es van calcular utilitzant un espectrofotòmetre equipat amb un portacubetes termostatitzat i una sonda de temperatura, seguint la metodologia descrita per (Torrent *et al.*, 1999).

Els enzims es van dissoldre a una concentració d'1 mg/ml en tampó acetat sòdic 50 mM, pH 5,0. Els espectres d'absorció es van enregistrar entre 250 i 310 nm en funció de la temperatura, des de 20 fins a 80°C amb increments de 2-3°C a cada pas. Després de cada increment de temperatura, el sistema es va deixar equilibrar durant 2 min abans de dur a terme la mesura.

El valor de $T_{1/2}$ de cada proteïna es va determinar per mitjà de l'anàlisi dels espectres de quarta derivada. A partir dels espectres de quarta derivada es va calcular la diferència d'amplitud acumulativa (CDA), la qual reflecteix la diferència entre l'espectre enregistrat en condicions natives i els successius espectres enregistrats al llarg del desplegament. Aquest valor (CDA) es va representar en funció de la temperatura. La transició de desnaturalització induïda per la temperatura es va ajustar a un model de dos estats (Torrent *et al.*, 1999).

2.6.6. **Assaig de resistència a proteases**

Les diferents ribonucleases (13 µg) dissoltes en tampó Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 14 mM (pH 7,3) es van incubar amb diverses quantitats de termolisina (d'1,4 ng a 1,4 µg) (Sigma), en un volum final de 10 µl, durant 30 min a 43°C. Les digestions es van aturar per l'addició d'EGTA 20 mM, i les mostres es van aplicar en un gel SDS-

PAGE (utilitzant gels de tricina amb 12,5 % d'acrilamida, veure l'APARTAT A4.3 de l'APÈNDIX A), el qual es va tenyir amb Blau de Coomassie. Per a la quantificació de les bandes, es van escanejar gels per duplicat i les bandes es van quantificar mitjançant el programa ImageQuant (Amersham Biosciences, Gran Bretanya).

2.6.7. Assaig d'interacció proteïna-inhibidor

2.6.7.1. Anàlisi qualitativa de la interacció RNasa-hRI, en gel d'agarosa

Per analitzar el nivell d'interacció de les variants de l'HP-RNasa amb la proteïna inhibidora de ribonucleases (RI), s'ha emprat una variant del mètode descrit per (Blackburn *et al.*, 1977), que es descriu tot seguit. Aquest mètode es basa en la visualització de la degradació del substrat 16S- i 23S- rRNA per acció de les ribonucleases en absència o presència de 40 unitats d'hRI, en un gel d'agarosa al 1,2 %.

Així, 15 ng de ribonucleasa en 20 µl de NaCl 125 mM, DTT 10 mM, EDTA 1 mM i Hepes 20 mM (pH 7,0) es van incubar amb 0 o en 40 unitats d'hRI (on 1 unitat és la quantitat d'hRI necessària per inhibir el 50 % de l'activitat de 5 ng de ribonucleasa). Després d'una incubació de 10 min a 37°C, es va afegir 4 µg del substrat 16 S- i 23S-rRNA al tub de reacció, i la mescla es va incubar 10 min més a 37°C. La reacció es va aturar per l'addició del tampó de càrrega (sacarosa 40 % (p/v), dietilpirocarbonat 0,2 % (v/v) i blau de bromofenol 0,25 % (p/v)). La mostra es va sotmetre a electroforesi en gel d'agarosa 1,2 % (p/v).

Les solucions utilitzades en l'assaig s'han realitzat sempre emprant aigua prèviament tractada a fi d'eliminar possibles ribonucleases contaminants ('RNase free'). Per a la seva preparació, s'afegeixen 0,2 ml de dietilpirocarbonat (DEPC) en 100 ml d'aigua. Aquesta mescla s'agita, i s'incuba O/N dins de la cabina d'extracció de gasos. El dia següent, la solució s'autoclava a fi d'inactivar el DEPC, que és extremadament tòxic, i s'emmagatzema a temperatura ambient pel seu ús.

2.6.7.2. Anàlisi quantitativa de la interacció RNasa-hRI: càlcul de K_i

Els valors de K_i de les variants de l'HP-RNasa es van determinar mitjançant la mesura de la hidròlisi del substrat FRET ArUAA (Novagen, EUA) en presència de concentracions creixents d'hRI (Leland *et al.*, 1998), seguida per espectroscòpia de fluorescència. Totes les solucions es van preparar utilitzant aigua 'RNase free' (veure l'APARTAT 2.6.7.1).

El substrat fluorescent FRET ArUAA es va dissoldre a una concentració de 314 nM en un volum final d'1 ml en el tampó MES-NaOH 0,10 M, NaCl 0,10 M, DTT 5 mM (pH 6,0). La variant a assajar es va afegir a la solució de substrat a una concentració final de 0,2 nM. Durant 1 min, es va seguir la degradació del substrat per mitjà del canvi de fluorescència en funció del temps, utilitzant una λ excitació de

495 nm i una $\lambda_{emissió}$ de 515 nm. Tot seguit, es va afegir la solució d'hRI (Promega) a la concentració adient a la mescla de reacció, i es va determinar el canvi de fluorescència al llarg d'1 min més. Sobre la mateixa mescla de reacció, es van anar addicionant successivament les 8 dilucions d'hRI, amb una concentració a l'assaig creixent de 0,02 nM a 2 nM. Per a cada valor de concentració d'hRI es va recollir la intensitat de fluorescència durant 1 min, i l'assaig es va realitzar per duplicat per a cadascun dels mutants. La solució estoc d'hRI es va preparar a un valor de concentració tal a fi de que les successives addicions a la mescla de reacció no provoqués variacions del volum final superiors al 5 %.

Es va comprovar que la variació del substrat al llarg de tot el procés no va afectar la velocitat de degradació d'aquest. A partir de la tangent a l'origen dels canvis de fluorescència en funció del temps obtinguts, es va determinar la velocitat inicial per a cada concentració d'hRI, i es va determinar el valor de K_i .

Els valors de K_i per cada mutant es van calcular a partir de les equacions següents (Stone i Hofsteenge, 1986), les quals descriuen la unió d'inhibidors d'elevada afinitat.

$$v_i = \left(\frac{v_0}{2E_t} \right) \left(\left((K'_D + I_t - E_t)^2 + 4K'_D E_t \right)^{1/2} - (K'_D I_t - E_t) \right) \quad (\text{EQUACIÓ 2.3})$$

On: v_i és la velocitat a cada concentració d'hRI; v_0 és la velocitat de la reacció en absència d'hRI; E_t és la concentració de ribonucleasa final en cada punt; I_t és la concentració d'hRI final a cada punt; i K'_D és:

$$K'_D = K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_M} \right) \quad (\text{EQUACIÓ 2.4})$$

En el nostre cas, com que $[S] \ll K_M$, la $K'_D \cong K_i$.

2.7. Caracterització de les propietats citotòxiques de les ribonucleases sobre cèl·lules tumorals *in vitro*

2.7.1. Anàlisi de la capacitat d'inhibició de la síntesi proteica cel·lular: marcatge metabòlic en presència de ^{35}S -Met

La citotoxicitat de les variants de l'HP-RNasa es va analitzar per marcatge metabòlic amb la ^{35}S -Met de cèl·lules de les línies A431, K562, HeLa, MCF7 i Daudi tractades amb concentracions creixents de cadascuna de les variants.

D'aquesta manera es van quantificar els nivells de síntesi proteica en cadascun dels tractaments efectuats.

El marcatge metabòlic ens permet determinar si els nivells de biosíntesis en una cèl·lula es veuen afectats o no per la presència en el medi de la molècula que estudiem. La ^{35}S -Met afegida directament al medi de cultiu, és ràpidament incorporada a les proteïnes de les cèl·lules que creixen activament, les quals incorporaran més radioactivitat que les cèl·lules metabòlicament poc actives.

Els assajos de citotoxicitat es van dur a terme en plaques de cultiu de 96 pouets. Les cèl·lules sembrades a la densitat indicada tal i com es detalla més endavant, van ser incubades en presència de concentracions creixents de les variants de l'HP-RNasa a analitzar, entre 10^{-8} M i $3 \cdot 10^{-5}$ M. Dins de la mateixa placa es van incloure els controls de creixement 0 % (cicloheximida 1 mM) i 100 % (medi DMEM, 10 % FCS). La citotoxicitat s'expressa en valors de IC_{50} , que correspon a la concentració de cadascuna de les ribonucleases que provoca una reducció del 50 % del percentatge de síntesi proteica. El protocol es presenta adaptat per a línees cel·lulars de creixement adherent i per a línees de creixement en suspensió.

Citotoxicitat en línees cel·lulars de creixement adherent (A431, HeLa i MCF7)

NOTA: Totes les incubacions s'han dut a terme en un ambient amb saturació de vapor d'aigua, a 37°C i 5 % CO_2 .

1. Sembrar 2500 cels/pouet (100 μl medi) en plaques de 96 pouets, per a A431 i HeLa; i 7500 cels/pouet per a MCF7.
2. Incubar durant 2 h per a permetre l'adhesió de les cèl·lules a la superfície dels pouets.
3. Afegir les dilucions d'enzim (prèviament esterilitzat per filtració) necessàries per assolir la concentració desitjada en 100 μl de medi DMEM, FCS 10 % (volum final per pouet: 200 μl). Control 0 % = cicloheximida 1 mM final; control 100 % = medi.
4. Incubar 3 dies.
5. Afegir 20 μl /pouet de la solució de ^{35}S -Met (500.000 cpm) en medi DMEM sense Met (Gibco).
6. Incubar 24 hores.
7. Aspirar el medi.
8. Lisar les cèl·lules de cada pouet amb 100 μl NaOH 0,1 N. Incubar 10 min a temperatura ambient.
9. Precipitar les proteïnes cel·lulars amb 100 μl TCA 30 % (p/v) per pouet (concentració TCA final al pouet: 15 %). Incubar 15 min en gel.

2. Material i mètodes

10. Filtrar el contingut de cada pouet en un filtre de fibra de vidre (Whatman) per mitjà d'un col·lector de cèl·lules unit a una bomba de buit i a un tanc amb TCA 5 % (p/v).
11. Distribuir cadascun dels filtres de fibra de vidre en un vial.
12. Afegir 1,5 ml de líquid d'escintil·lació (Ready Safe, Beckman) per vial, agitar i llegir la radioactivitat en un comptador d'escintil·lacions.

REACTIUS I SOLUCIONS

Solució estoc de Cicloheximida 32 mM (en aigua).

Citotoxicitat en línees cel·lulars de creixement en suspensió (K562 i Daudi)

NOTA: Totes les incubacions s'han dut a terme en un ambient amb saturació de vapor d'aigua, a 37°C i 5 % CO₂.

1. Sembrar 1250 cels/pouet (100 µl medi) en plaques de 96 pouets.
2. Afegir les dilucions d'enzim (prèviament esterilitzat per filtració) necessàries per assolir la concentració desitjada en 100 µl de medi DMEM, FCS 10 % (volum final per pouet: 200 µl). Control 0 % = cicloheximida 1 mM final, control 100 % = medi.
3. Incubar 3 dies.
4. Afegir 20 µl/pouet de la solució de ³⁵S-Met (500.000 cpm) en medi DMEM sense Met (Gibco).
5. Incubar 24 hores.
6. Lisar les cèl·lules de cada pouet amb 20 µl NaOH 1,1 N. Incubar 10 min a temperatura ambient.
7. Precipitar les proteïnes cel·lulars amb 50 µl TCA 130 % (p/v) per pouet (concentració TCA final al pouet: 24 %). Incubar 15 min en gel.
8. Centrifugar la placa a 300 xg, i eliminar el sobrenedant en cada pouet.
9. Filtrar el contingut de cada pouet en un filtre de fibra de vidre (Whatman) amb un col·lector de cèl·lules unit a una bomba de buit i a un tanc amb TCA 5 % (p/v).
10. Distribuir cadascun dels filtres de fibra de vidre en un vial.
11. Afegir 1,5 ml de líquid d'escintil·lació per vial, agitar i llegir la radioactivitat en un comptador d'escintil·lacions.

REACTIUS I SOLUCIONS

Solució estoc de Cicloheximida 32 mM (en aigua).

2.7.2. Anàlisi de la citotoxicitat en presència de drogues que afecten al trànsit intracel·lular

L'assaig de citotoxicitat en presència de drogues disruptores de les vies d'endocitosi és essencialment el mateix descrit en l'apartat anterior, però amb les variacions que es presenten a continuació. La variació del valor d'IC₅₀ d'una variant per efecte de l'acció d'una droga concreta, proporciona informació sobre la ruta seguida per aquesta ribonucleasa. Els assajos s'han realitzat sempre sobre la línia A431, i el temps d'incubació total ha estat sempre de 48 h.

Citotoxicitat en presència de drogues

NOTA 1:Totes les incubacions s'han dut a terme en un ambient amb saturació de vapor d'aigua, a 37°C i 5 % CO₂.

1. Dissoldre en medi DMEM, FCS 10 %, la droga a assajar a una concentració doble de la desitjada.
 2. Sembrar 10⁴ cels/pouet (100 µl medi) en plaques de 96 pouets, utilitzant el medi que conté la droga a utilitzar.
 3. Incubar durant 2 h.
 4. Afegir les dilucions d'enzim (prèviament esterilitzat per filtració) necessàries per assolir la concentració desitjada en 100 µl de medi (volum final per pouet: 200 µl). Control 0 % = cicloheximida 1 mM, control 100 % = medi+droga.
 5. Incubar 24 h.
 6. Afegir ³⁵S-Met (500.000 cpm/pouet) en 20 µl/pouet de DMEM sense metionina.
 7. Incubar 24 hores.
 8. Aspirar el medi.
 9. Lisar les cèl·lules de cada pouet amb 100 µl NaOH 0,1 N. Incubar 10 min a temperatura ambient.
 10. Precipitar les proteïnes cel·lulars amb 100 µl TCA 30 % (p/v) per pouet (concentració TCA final al pouet: 15 %). Incubar 15 min en gel.
 11. Filtrar el contingut de cada pouet en un filtre de fibra de vidre (Whatman) amb el col·lector de cèl·lules unit a una bomba de buit i a un tanc amb TCA 5 % (p/v).
 12. Transferir cadascun dels filtres de vidre en un nou vial.
 13. Afegir 1,5 ml de líquid d'escintil·lació per vial, agitar i llegir la radioactivitat mitjançant un comptador d'escintil·lacions.
-

2. Material i mètodes

A la TAULA 2.6 s'especifiquen les condicions d'estoc i les concentracions a l'assaig de les drogues emprades en aquest treball.

TAULA 2.6

Drogues disruptores de l'endocitosi. Utilitzades per l'anàlisi del trànsit intracel·lular de les variants de l'HP-RNasa i de l'onconasa

Droga	Concentració estoc ^a	Concentració treball
Monensina	0,5 mM en etanol	0,5 µM
NH ₄ Cl	*	20 mM
Bafilomicina A ₁	0,8 mM en DMSO	0,1 µM
Brefeldina A	18 mM en etanol	18 nM
Àcid retinoic	15 mM en DMSO	10 µM

^a Totes les solucions estoc s'han emmagatzemant a -20°C.

* El NH₄Cl es prepara en el moment del seu ús, directament a la concentració de treball.

2.8. Mesura del pH endosomal

La variació del pH endosomal per efecte de la monensina, el NH₄Cl i la bafilomicina A₁ (utilitzades en l'APARTAT 2.7.2), es va dur analitzar per mitjà del protocol descrit per (Presley *et al.*, 1997). Així, es van incubar cèl·lules de la línia A431 tractades amb alguna d'aquestes drogues, en presència de Tf marcada simultàniament amb rodamina i amb fluoresceïna (R-Tf-F). La fluorescència emesa pel primer d'aquests fluoròfors és sensible al pH, mentre que la fluorescència del segon no. Així, la relació entre la intensitat de fluorescència de la rodamina (vermell) respecte a la fluoresceïna (verda) ens proporcionarà una mesura del pH del compartiment marcat per la Tf, que correspon als RE i part dels SE.

Mesura del pH endosomal

NOTA: Totes les incubacions realitzades abans de la fixació de les cèl·lules, s'han de dur a terme en un incubador amb atmosfera saturada d'aigua a 37°C i 5% CO₂.

1. Distribuir un cobreobjectes (número 1) estèril al fons de cada pouet d'una placa de 24 pouets.
2. Disposar 1 ml per pouet d'una solució a $0.3 \cdot 10^5$ cels A431/ml, en medi DMEM, FCS 5 %.

Per a una observació òptima en el microscopi confocal de fluorescència, les cèl·lules han de presentar semi-confluència en el moment de la seva observació al microscopi.

2. Material i mètodes

3. Incubar O/N.
 4. Aspirar el medi vell i substituir-lo per medi fresc, en presència de drogues en els casos que ho requereixin. Per a un volum final d'1 ml: monensina 0,25 μ M; bafilomicina A₁ 100 i 50 nM; NH₄Cl 20 mM.
 5. Incubar 24 h.
 6. Substituir el medi vell dels pouets per nou medi DMEM, BSA 2 % i en presència de drogues en els casos que ho requereixin.
 7. Per a cada mostra, de manera individual, iniciar el següent procés:
 - Fer dos rentats amb medi DMEM, BSA 2 % i en presència de droga a la concentració d'estudi, si la mostra ho requereix.
 - Preparar 500 μ l del medi especificat en el punt anterior, amb R-Tf-F 10 μ g/ml, i disposar-lo en el pouet, prèvia aspiració del medi vell.
 - Incubar 45 min.
 - Fer dos rentats amb la mateixa solució de medi.
 - Realitzar el muntatge final sobre el portaobjectes, amb la mateixa solució de medi.
 8. Realitzar immediatament la visualització de la preparació al microscopi confocal de fluorescència, amb un objectiu 63x/1,4 OIL.
 9. Quantificar la intensitat de fluorescència obtinguda per als dos fluoròfors en les imatges obtingudes per mitjà del programa ImageQuant (Amersham biosciences).
 10. A partir dels valors de fluorescència obtinguts per la rodamina i per la fluoresceïna, calcular el quocient R/F.
 11. Per obtenir la recta patró que ens permetrà relacionar el quocient intensitat de fluorescència R/F amb el pH, repetir la mateixa experiència (passos 1-10), utilitzant medi DMEM, FCS 5 %. Una vegada finalitzat el procés (punt 10), incubar les cèl·lules en presència de tampons a diferents pHs (pH 5; 5,5; 6; 6,5; 7 i 7,5) durant 3 min, i processar les imatges obtingudes al microscopi confocal a fi de mesurar el quocient R/F per a cada valor de pH.
 12. La interpolació del valor R/F experimental a la recta patró, proporciona el valor de pH del compartiment endosomal primari
-

2.9. Marcatge de les variants de l'HP-RNasa

Per tal d'estudiar la incorporació i acumulació d'una molècula en un sistema cel·lular, així com les diverses vies de transport que aquesta pot seguir, ha calgut posar a punt una metodologia pel seu marcatge. En el present treball, s'han utilitzat dos sistemes de marcatge diferents.

2.9.1. Radioiodinització de les variants de l'HP-RNasa

Les molècules es poden marcar radioactivament per la incorporació d'àtoms radioactius en posicions determinades de la seva estructura. El marcatge radioactiu d'una molècula té com a principal avantatge l'elevada sensibilitat de detecció. L'estratègia que s'ha realitzat en el present treball, és la radioiodinització amb ^{125}I . Aquest radioisòtop és relativament senzill de manipular, proporciona una elevada activitat específica i presenta un temps de vida mitja de 60 dies. Les molècules radiomarcades en aquest treball han estat l'onconasa i les variants de l'HP-RNasa: PM5, PE3 i PE5.

El mètode de radioiodinització emprat en aquest treball ha estat el de Iodogen de Pierce (1,3,4,5-tetracloro-3 α ,6 α -difenílglicoluril; Fraker i Speck, 1978). El reactiu oxidant hidrofòbic, Iodogen, dissolt en un dissolvent orgànic (triclorometà), es disposa recobrint el fons d'un tub de poliestirè. El dissolvent és tot seguit eliminat del tub per evaporació. A continuació s'afegeix en el tub un tampó per a neutralitzar l'elevat pH de la solució de sal de iode que s'afegeix a continuació. Les solucions de Na^{125}I i de ribonucleasa a marcar s'afegeixen al tub i es deixen reaccionar durant 3 minuts a temperatura ambient. Durant aquest temps, el reactiu Iodogen oxida la solució Na^{125}I a un estat reactiu, el qual és tot seguit incorporat als anells fenol i imidazol de les cadenes laterals dels aminoàcids tirosina i histidina, respectivament (a pH entre 6-7 predomina el marcatge de les Tyr, mentre que a pH més alts es dona també el marcatge de les His) (Tsomides i Eisen, 1993). Es traspasa la solució a un altre tub per tal d'aturar l'acció oxidant del Iodogen, i s'addiciona una solució saturada de Tyr a fi de segrestar el iode reactiu que resta encara lliure. La proteïna radiomarcada és pot separar del iode lligat a Tyr lliure per mitjà d'una cromatografia de gel filtració.

Iodinització: mètode Iodogen

1. Equilibrar una columna de gel filtració PD-10 (Amesham Biosciences) amb ≥ 20 ml PBS, BSA 1 mg/ml.
2. Preparar la solució de proteïna a iodinitzar a una concentració de 1 mg/ml en un volum de 100 μl , en PBS a pH 7,2.
3. Fer dos rentats amb PBS (500 μl de PBS per rentat) el tub que conté el reactiu Iodogen dessecat (per mitjà d'una bomba de buit) recobrint les seves parets.

2. Material i mètodes

4. Afegir la solució de proteïna al tub que conté el reactiu Iodogen, evitant ressuspèndre el reactiu, i deixar a temperatura ambient.
5. Afegir Na^{125}I (0,5 mCi) al tub que conté la mescla proteïna-Iodogen.
6. Incubar 10 min a temperatura ambient.
7. Canviar la reacció de tub, a fi d'aturar l'acció del Iodogen.
8. Afegir 20 μl d'una solució de Tyr 1 mg/ml per aturar la reacció, pipetejar tres vegades.
9. Afegir 20 μl NaI 10 mg/ml al tub de la reacció, per tal d'evitar la fixació no específica del ^{125}I , pipetejar també 3 vegades.
10. Incubar 1 min a temperatura ambient.
11. Carregar la mescla de reacció a una columna de gel filtració PD-10, i recollir fraccions de 1 ml en tubs. Utilitzar com a solvent d'elució una solució PBS, BSA 1 mg/ml. Localitzar les fraccions que contenen la proteïna radiomarcada a través de la detecció de radiació γ , per mitjà d'un comptador manual.

La proteïna radiomarcada s'eluirà en primer lloc, mentre que el iode radioactiu que resti lliure, serà retingut durant més temps al seu interior.

12. Recollir les fraccions que contenen la proteïna radiomarcada, dialitzar-les enfront de PBS i emmagatzemar-les a 4°C.

REACTIUS I SOLUCIONS

Na^{125}I (Amersham, IMS.30): 100 mCi/ml, 3,7 GBq/ml

Reactiu Iodogen (Pierce, UK) (1,3,4,6-tetracloro-3 α ,6 α -difenil glicoluril)

Dissoldre el reactiu sòlid Iodogen en CHCl_3 a 0,5 mg/ml. Aliquotar 20 μl d'aquesta solució en tubs de polipropilè (10 μg de reactiu per tub). Dessecar la solució i emmagatzemar a temperatura ambient protegit de la llum, fins al moment del seu ús. Aquest reactiu és extremadament estable si s'emmagatzema dessecat.

Solució de Tyr 1 mg/ml en PBS i a 25°C

NaI 10 mg/ml en PBS i a 25°C

2.9.2. Marcatge fluorescent de les variants PM5cct, PE3I1cct i PE5cct

Les variants PM5cct, PE3I1cct i PE5cct han estat marcades fluorescentment per conjugació amb el fluoròfor maleïmida Alexa Fluor 594 C₅ (Molecular Probes, USA) al seu residu de Cys C-terminal.

2. Material i mètodes

L'avantatge dels conjugats preparats amb el fluoròfor Alexa Fluor 594 és que aquests exhibeixen un espectre d'emissió de fluorescència poc superposat al dels derivats de la fluoresceïna i als de Cy5. Aquesta característica és molt útil per a la col·localització de les variants amb altres molècules específiques de compartiments subcel·lulars marcades amb aquests altres fluoròfors. Els conjugats Alexa Fluor 594 presenten uns màxims en els espectres d'excitació/emissió de ~ 585/610 nm ($\lambda_{\text{màxima}}$ d'excitació en un làser Ar-Kr de 568 nm; $\lambda_{\text{màxima}}$ d'emissió en un làser He-Ne de 594 nm); una vida mitja de fluorescència d'aproximadament 4.0 nanosegons i una elevada absorció, amb un coeficient d'extinció superior a $80.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Els conjugats preparats amb aquest fluoròfor emeten a la regió del vermell de l'espectre.

En el present treball s'ha emprat una maleïmida Alexa Fluor capaç de reaccionar amb els grups sulfidril de la proteïna a marcar. El pH òptim de reacció de les maleïmides és proper a 7,0. Donat que els grups tiol són marcats amb una elevada especificitat, els agents tiol-reactius proporcionen un mitjà molt selectiu per a modificar una proteïna en un punt molt concret. L'enllaç generat entre la proteïna i el fluoròfor és de naturalesa irreversible, assegurant així que al llarg dels assajos biològics realitzats la seva associació no es trenca.

Marcatge Alexa

1. Preparar 135 μl d'una solució de l'enzim a marcar a una concentració d'11 μM en PBS, pH 7,2.

En aquest pH, els grups tiol de la proteïna són prou nucleofílics per a reaccionar gairebé exclusivament amb la maleïmida, tot i la presència de la resta d'amines de la proteïna, ja que es troben protonades i són poc reactives.

2. Reduir el ponts disulfur Cys-Glutatió terminal de la proteïna, afegint 15 μl de DTT 100 mM (concentració final a l'assaig: 10 mM).
3. Incubar 20 min a temperatura ambient i en atmosfera inert (N_2).
4. Eliminar l'excés de DTT per cromatografia de gel filtració en una columna de Sephadex G-25 (Sigma), prèviament equilibrada amb PBS, pH 7,2. Realitzar l'elució de la mostra amb el mateix tampó, en fraccions de 0,5 ml.
5. Llegir l' $\text{Abs}_{278 \text{ nm}}$ de cada fracció, i reunir aquelles que contenen l'enzim en un mateix tub.
6. Afegir ràpidament 15 μl d'una solució d'Alexa Fluor 594 C₅ 20 mM.

És essencial preparar la solució estoc d'Alexa Fluor immediatament abans del seu ús.

7. Incubar la reacció durant 2-3 h a temperatura ambient i a la foscor, o O/N a 4°C, protegit també de la llum.
8. Aturar la reacció per addició de GSH 1 mM, concentració final a l'assaig.

9. Concentrar el volum de la reacció en tubs Centricon (Amicon, 8.000 Da *cutoff*) fins a un volum aproximat d'1,5 ml.
10. Dialitzar extensivament enfront de PBS, pH 7,2, a 4°C i protegit de la llum.
11. Esterilitzar la solució d'enzim marcat per filtració amb un filtre de diàmetre de porus de 0,22 µm.
12. Aliquotar i emmagatzemar l'enzim marcat a -20°C, protegint sempre de la llum.

MATERIAL

Alexa Fluor 594 C₅ (Molecular Probes, Holanda). Solució a 20 mM en PBS.

Solució estoc GSH 10 mM en PBS, pH 7,2.

2.10. Estudi de les vies d'internalització

2.10.1 Cinètica d'internalització de les molècules radiomarcades

En el present treball, la internalització de l'onconasa i de les variants PM5, PE3 i PE5 radiomarcades amb l'isòtop ¹²⁵I (veure APARTAT 2.9.1) es va analitzar mitjançant el següent protocol, adaptat d'(Alami *et al.*, 1998) sobre cèl·lules K562.

Cinètica d'internalització

NOTA: Totes les incubacions s'han dut a terme en un ambient amb saturació de vapor d'aigua, a 37°C i 5 % CO₂

1. Preparar 1 tub Falcon, amb 19 ml d'una suspensió de cèl·lules K562 (10⁷ cels/ml) en medi DMEM, BSA 1 %, per a cadascuna de les variants a assajar.
2. Afegir a cada tub 300 µl de la solució de la variant radiomarcada (2.8 µg/ml en PBS, BSA 1 %) (concentració d'enzim final a l'assaig 3 nM).
3. Repartir el contingut del tub en una placa de 24 pouets (1,5 ml/pouet).
4. Incubar diferents temps: 0, 45 min, 2 h, 3,5 h, 5h i 7 h.
5. Per cada temps, prendre 1,5 ml del contingut del pouet corresponent al temps especificat, i dipositar-lo en un tub prèviament dipositat en gel.
6. Centrifugar 3 min a 890 *xg* a 4°C.

7. Aspirar el sobrenedant.
8. Fer tres rentats amb PBS fred, tal i com s'especifica a continuació: afegir 1 ml de PBS, centrifugar 3 min a 890 $\times g$ a 4°C, aspirar el sobrenedant, resuspendre el sediment en nou PBS.
Els rentats es fan per eliminar del medi la ribonucleasa que no ha estat ni internalitzada ni lligada a les membranes.
9. Resuspendre el sediment en 500 μ l de pronasa.
10. Incubar 45 min en gel.
11. Durant aquest temps, preparar per a cada mostra un nou tub amb 750 μ l de dibutilaftalat (DBP), a temperatura ambient.
12. En sèries de 4 o de 6, agafar el volum de mostra que estava en gel i posar-lo en el corresponent tub amb DBP.
13. Ràpidament, centrifugar 3 min a 21.000 $\times g$ a temperatura ambient.
14. Posar 300 μ l del sobrenedant en un tub de plàstic i el sediment en un altre tub (prèvia aspiració del sobrenedant que hi resti).
15. Mesurar la radiació γ emesa per les mostres en un comptador γ , de la fracció membranal (fracció soluble en DBP, sobrenedant) i de la fracció intracel·lular (fracció insoluble en DBP, sediment). El percentatge d'endocitosi es calcula com:

$$E_{\%} = (100 * \gamma \text{ intracel·lular}) / (\gamma \text{ intracel·lular} + \gamma \text{ unida a membranes}) \quad \text{EQUACIÓ 2.5}$$

REACTIUS I SOLUCIONS

Pronasa 0,3 %, en PBS.

2.10.2. Estudi de les vies d'endocitosi per microscòpia confocal de fluorescència

Els assajos d'endocitosi per microscòpia confocal de fluorescència permeten caracteritzar el trànsit intracel·lular de les variants marcades fluorescentment una vegada han estat ja endocitades. La seva localització s'estudià mitjançant el marcatge múltiple de la cèl·lula amb la proteïna fluorescent d'interès per una banda, i de molècules d'ubicació coneguda per l'altre. Aquesta metodologia permet situar la proteïna d'interès a l'interior de la cèl·lula, i seguir el seu trànsit entre els diversos compartiments al llarg del temps.

En aquest treball s'ha seguit el trànsit de variants de l'HP-RNasa marcades amb el fluoròfor Alexa-595C₅ (APARTAT 2.9.2) juntament amb marcadors específics de diversos compartiments intracel·lulars (TAULES 2.7, 2.8 i 2.9). Pel que fa al marcatge específic de cada compartiment, s'ha utilitzat tant el mètode de fluorescència directa

(quan la molècula marcadora està directament unida a un fluoròfor), com d'immunofluorescència indirecta (quan ha calgut l'ús d'anticossos per al marcatge).

En el cas de la fluorescència directa, les cèl·lules s'incuben amb les molècules marcades durant el temps adient. A continuació, es realitza la seva fixació, a fi de retenir la distribució cel·lular de les molècules a ubicar i preservar la morfologia cel·lular. I finalment es munta la preparació, que ja està a punt per a ser observada al microscopi.

Pel que fa al marcatge immunofluorescent indirecte, el procés s'inicia amb la fixació de les cèl·lules. Tot seguit, aquestes s'incuben amb l'anticòs primari dirigit contra la proteïna d'interès, en presència d'agents que actuen permeabilitzant les membranes per tal d'assegurar l'accés de l'anticòs al seu epítot. A continuació s'eliminen les molècules d'anticòs que no s'han unit al seu lligant mitjançant una sèrie de rentats. L'anticòs correctament lligat és revelat per la incubació amb un anticòs secundari fluorescent i dirigit específicament contra ell. Una vegada eliminat l'excés d'anticòs secundari que queda lliure, la mostra està llesta per ser observada en el microscopi de fluorescència. Aquesta tècnica és extraordinàriament sensible, donat que cada immunoglobulina d'anticòs primari pot unir varis anticossos secundaris, amplificant així el senyal.

En la immunofluorescència, els paràmetres crítics són: la fixació, la permeabilització i la determinació de l'especificitat de marcatge. Les condicions de fixació i de permeabilització s'han de definir individualment per a cada anticòs i per a cada tipus cel·lular. Una vegada definides les condicions òptimes, es pot realitzar un doble o triple marcatge a fi de comparar les localitzacions entre la molècula problema i molècules de distribució coneguda. A les TAULES 2.7, 2.8 i 2.9 es descriuen els diversos marcadors utilitzats en el present treball.

TAULA 2.7.

Marcadors fluorescents específics d'òrgans

Marcador	Marcatge	[treball]	Temps incubació	Casa comercial
Sytox Green	DNA (NU)	100 nM	15 min ^(b)	Molecular Probes
Dextrà-FITC	LY	1 mg/ml	24 h ^(a)	Sigma
EGF-FITC	LY	165 nM	24 h ^(a)	Molecular Probes
LysoTracker	LE i LY	75 nM	2 h ^(a)	Molecular Probes
MitoTracker	MIT	100 nM	20 min ^(b)	Molecular Probes
NBD C₆-Ceramida	TGN	5 mM	30 min ^(b)	Molecular Probes
Ricina-FITC	AG	5 µM	45 min ^(a)	Sigma
Transferrina-Cy5	EE i RE	100 nM	45 min ^(a)	Amersham Pharmacia

SE: endosomes de tria ; LE: endosomes tardans ; RE: endosomes de reciclatge; LY: lisosomes; AG: aparell de Golgi; TGN: Xarxa trans de l'AG (*Trans-Golgi Network*); MIT: mitocondries; NU: nucli.

^(a) Incubació abans de fixar la mostra; ^(b) Incubació després la fixació.

2. Material i mètodes

TAULA 2.8.

Anticossos primaris utilitzats pel marcatge de compartiments específics.

Anticòs primari	Origen	Orgànul	Temperatura d'emmagatzematge i dilucions de treball	Casa comercial
α AP-1	Ratolí, monoclonal	AG	-20 °C, 1/100	Sigma
α BIP (GRP78)	Ratolí, monoclonal	ER	- 20 °C, 1/100	BD
α B3/25 (antiRTf)	Ratolí, monoclonal	RE	4 °C, 1/2000	Futter
α CD63	Ratolí, policlonal	LE, LY	4 °C, 1/100	BD
α Furina	Cabra, policlonal	TGN	4 °C, 1/100	Sta. Cruz
α GM130	Ratolí, monoclonal	MG	- 20°C, 1/100	BD
α Ki67	Ratolí, monoclonal	N	4 °C, 1/100	Dako
α Lamp1 (H4A3)	Ratolí, monoclonal	LE, LY	4 °C, 1/100	DSBHB
α Lamp2 (H4B4)	Ratolí, monoclonal	LE, LY	4 °C, 1/100	DSBHB
α Lamp3 (H5C6)	Ratolí, monoclonal	LE, LY	4 °C, 1/100	DSBHB
α M6PR	Pollastre, policlonal	LE	-20 °C, 1/100	Gruenberg
α Nucleolina	Ratolí, monoclonal	N	4 °C, 1/100	Sta. Cruz
α Rab5	Conill, policlonal	SE, RE	4 °C, 1/100	Sta. Cruz
α Rab7	Cabra, policlonal	LE	4 °C, 1/100	Sta. Cruz
α Rab11	Ratolí, monoclonal	RE i TGN	-20 °C, 1/100	BD
α TNG46	Ovella, policlonal	TGN	4 °C, 1/100-1/200	Serotec
α 6C4 (antiLBPA)	Ratolí, monoclonal	LE, LY	4 °C, 1/100	Gruenberg

SE: endosomes de tria ; LE: endosomes tardans ; RE: endosomes de reciclatge; LY: lisosomes; AG: aparell de Golgi; TGN: Xarxa trans de l'AG (*Trans* Golgi network); MG: AG mitjà (*Medium* golgi) ER: reticle endoplasmàtic; N: nuclèol; α : designa l'epítot contra el qual està dirigit l'anticòs primari; *: L'anticòs α B3/25 va ser amablement cedit per Clare Futter (MRC, London), i els anticossos α M6PR i α 6C4 per Jean Gruenberg (Geneva, Switzerland)

TAULA 2.9.

Anticossos secundaris utilitzats pel marcatge de compartiments específics.

Secundari	Temperatura d'emmagatzematge i dilucions de treball	Casa comercial
DoAG-FITC	4°C, 1/100	Tebu
DoASh-FITC	4°C, 1/100	Sigma,
GAM-FITC	4°C, 1/200	Sigma
RACH-FITC	-20 °C, 1/100	Nordic
RAG-FITC	-20°C, 1/400	Sigma
RAM-FITC	4°C, 1/100	Nordic

2. Material i mètodes

A continuació es descriu el protocol estàndard de les diverses anàlisis que es van dur a terme en aquest treball. Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, sovint va caldre modificar les condicions de permeabilització o d'incubació per adaptar el protocol a les particularitats de cada anticòs (veure TAULA 2.10). Totes les anàlisis es van realitzar sobre cèl·lules A431.

TAULA 2.10.

Condicions de permeabilització cel·lular. Condicions experimentals per a la permeabilització de les cèl·lules a fi de permetre l'entrada dels anticòs primaris i secundaris descrits a les TAULES 2.8 i 2.9.

Anticòs	Condicions de permeabilització	Rentats després de permeabilitzar
αCD63	PBS, Tritó X-100 0,2 %, 4 min a temperatura ambient	PBS, Gelatina 0,2 %
αM6PR, αTGN46, αAP-1, αBIP, αFurina	PBS, saponina 0,5 %, FCS 5 %, 15 min a temperatura ambient	PBS, saponina 0,015 %, BSA 1 %
αNucleolina, αKi67	Metanol/Acetona 1:1 (v/v), 4 min a 4°C.	Rehidratar 30 min en PBS, BSA 1 % a temperatura ambient, i fer els rentats amb PBS, BSA 1 %
αRab5, 7 i 11, αGM130	PBS, saponina 0,2 %, BSA 0,1 %, 15 min a temperatura ambient	PBS, saponina 0,2 %, BSA 0,1 %
α6C4, αB3/25, αLamp1, 2 i 3	PBS, saponina 0,05 %, BSA 0,1 %, 15 min a temperatura ambient	PBS, saponina 0,05 %, BSA 0,1 %

Localització sucel·lular seguida per fluorescència

NOTA: Totes les incubacions realitzades abans de la fixació de les cèl·lules, s'han de dur a terme en un incubador amb atmosfera saturada d'aigua a 37°C i 5 % CO₂.

1. Distribuir un cobreobjectes estèril al fons de cada pouet d'una placa de 24 pouets.

Els cobreobjectes han de ser del n°. 1 per tal de proporcionar el menor gruix possible a la mostra que observarem al microscopi. Cobreobjectes més gruixuts proporcionaran aberracions que resulten en imatges pobres al microscopi.

2. Disposar 1 ml per pouet d'una solució a $0,8 \cdot 10^5$ cèl·lules A431 per ml, en medi DMEM, FCS 5 %.

Per a una observació òptima en el microscopi confocal de fluorescència, les cèl·lules han de presentar semi-confluència.

3. Incubar O/N.

2. Material i mètodes

4. Aspirar el medi vell i substituir-lo per 1 ml de medi fresc, en presència de drogues en els casos que ho requereixin (monensina 0,1 μ M; bafilomicina A₁ 50 nM; brefeldina A 18 nM; NH₄Cl 20 mM).
5. Incubar 45 min.
6. Afegir la solució de ribonucleasa-Alexa a tots els pouets de l'assaig (20-25 μ l), a fi d'obtenir una concentració final de 5 μ g/pouet (volum final del pouet: aproximadament 1 ml).
7. Incubar 4 h.
8. Afegir el marcador Dextrà-FITC (1 mg/ml) o EGF-FITC (165 nM) a les mostres que ho requereixin, per als tractaments que s'han planificat.
9. Incubar les cèl·lules 20 h.
10. Afegir la Transferrina-Cy5 (100 nM) a tots els pouets, i els diversos marcadors fluorescents a les mostres que ho requereixin.
11. Incubar la placa durant els temps especificats a la TAULA 2.7 per a cada marcador.
12. Aspirar el medi de cada pouet, per tal d'eliminar les molècules de marcador que no han estat internalitzades.
13. Rentar 3 vegades cada pouet amb 1 ml PBS, a 4°C.
14. Aspirar el PBS i afegir 200 μ l/pouet de solució fixadora.
15. Incubar 30 min a temperatura ambient i aspirar el contingut de cada pouet.
16. Afegir 1 ml/pouet de NH₄Cl (2.7 mg/ml) en PBS.
17. Incubar 10 min a temperatura ambient i aspirar el contingut de cada pouet (aquest pas serveix per eliminar l'excés de fixador).
18. Rentar 2 cops cada pouet amb 1 ml PBS, a 4°C. Incubar 5 min entre rentat i rentat.
19. Les mostres que no han de ser sotmeses a cap més tractament es poden processar directament per al seu muntatge final (*punt 22*).
20. Les mostres que han de ser tractades amb marcadors fluorescents després de la seva fixació, s'incuben seguint les especificacions comercials de cada molècula (*veure els temps d'incubació i les concentracions de marcador a la TAULA 2.7*). Tot seguit continuar seu processament a partir del *punt 22*.
21. Per a les mostres que han de ser tractades amb anticossos:
 - Permeabilitzar les membranes:
 - Aspirar el PBS
 - Afegir 1 ml/pouet de tampó de permeabilització
 - Incubar 15 min a temperatura ambient i en fosc

2. Material i mètodes

- Preparar les dilucions d'anticòs primari indicades a la TAULA 2.8 en tampó de permeabilització. Centrifugar a 21.000 xg 3 min a 4°C, i guardar en gel fins al moment del seu ús.
 - Preparar una cambra humida, i posar un tros de parafilm en el seu interior.
 - Aplicar una gota de 50 µl de cada solució d'anticòs primari sobre el parafilm.
 - Amb molta cura, agafar cadascun dels cobreobjectes de la placa amb unes pinces, eliminar l'excés de líquid i col·locar-lo sobre la gota (50 µl) corresponent. Incubar 45 min a temperatura ambient i foscor.
 - Retornar els cobreobjectes al seu corresponent pouet en la placa.
 - Rentar 3 cops cada pouet amb 1 ml de *tampó de permeabilització* per tal d'eliminar l'anticòs que no s'ha unit al seu epítop i bloquejar la seva possible adsorció inespecífica. Esperar 5 min entre cada rentat, abans d'aspirar la solució.
 - Diluir l'anticòs secundari conjugat a un fluoròfor en el *tampó de permeabilització* (veure TAULA 2.9). Mesclar bé, i centrifugar 21.000 xg 3 min a 4°C, per tal d'eliminar els possibles agregats que s'han format.
 - Preparar la cambra humida. Aplicar 50 µl de l'anticòs secundari adequat sobre un parafilm.
 - Col·locar cada cobreobjectes sobre la gota que li pertoca. Tancar la cambra, i incubar 45 min protegint-la de la llum, a temperatura ambient.
 - Retornar els cobreobjectes als corresponents pouets, i fer 3 rentats amb *tampó de permeabilització*, deixant 5 min entre cada rentat. Respectar al màxim les condicions de foscor.
 - Rentar 2 vegades amb PBS.
 - Rentar amb H₂O.
 - Prendre els cobreobjectes de la placa amb les pinces, submergir-los ràpidament en un recipient amb aigua, i eliminar-ne l'excés sobre un paper absorbent (cal assegurar-se de tenir la superfície amb cèl·lules sempre cara amunt, i protegir-la del paper).
22. Col·locar els cobreobjectes sobre el medi de muntatge (mowiol) en un portaobjectes.
23. Emmagatzemar les preparacions a 4°C i en la foscor fins a la seva visualització al microscopi confocal de fluorescència, amb un objectiu 63x/1,4 OIL.

REACTIUS I SOLUCIONS

Tampó de fixació: sacarosa 30 mM, paraformaldehid 3,7 % en PBS.

Solució NH₄Cl 2,7 mg/ml en PBS.

Tampó de permeabilització: saponina 0,015 %, BSA 1 mg/ml en PBS.

Medi de muntatge (MOWIOL): Preparar en Tris-HCl 100 mM, pH 8,5

- 25 % (v/v) glicerol
- 10 % (p/v) mowiol 4.88 (Sigma D 2522)
- Ajustar el pH a 8,0 amb NaOH
- Emmagatzemar alíquotat a -20°C .

Enzims-Alexa 596

Descongelar les alíquotes en gel just abans del seu ús. Centrifugar 21.000 xg durant 3 min a 4°C i reservar en gel fins al moment de ser utilitzades.

2.10.3. Estudi del transport nuclear

L'estudi de la importació nuclear s'ha realitzat *in vitro* adaptant un protocol que reproduceix fidelment el procés natural (Adam *et al.*, 1990), i que ha demostrat mantenir fidelment les característiques del procés natural. En aquest protocol, el substrat a importar, marcat fluorescentment, és introduït en cèl·lules prèviament permeabilitzades (o perforades) amb el detergent digitonina, i la seva possible acumulació nuclear es monitoritza per microscòpia confocal de fluorescència. La permeabilització amb digitonina permet l'entrada al citoplasma de molècules del medi, sense alterar la integritat de l'embolcall nuclear ni modificar els mecanismes de transport que hi operen. D'aquesta manera s'aconsegueix superar la limitació d'una internalització poc eficient de la molècula a estudiar, i així augmentar la sensibilitat del marcatge nuclear.

Com a conseqüència de la permeabilització de la membrana cel·lular, es produeix una pèrdua del contingut soluble del citosol. Per això, el sistema requereix l'addició d'extractes citoplasmàtics i d'un sistema regenerador d'ATP (APARTATS 2.10.3.1 i 2.10.3.2).

2.10.3.1. Obtenció de la fracció citoplasmàtica de cèl·lules HeLaS3

La fracció citoplasmàtica obtinguda a partir de cèl·lules de la línia HeLa S3 aporta els factors de transport solubles, essencials per al procés d'importació nuclear, que les cèl·lules permeabilitzades amb digitonina han perdut a conseqüència de l'obertura de porus en les seves membranes.

Obtenció de la fracció citoplasmàtica

NOTA: Tots els passos es fan a 4°C .

1. Reunir entre 10^8 i 10^9 cèl·lules HeLa S3, cultivades en medi DMEM, FCS 10 %, en un tub Falcon de 50 ml.
2. Centrifugar a 300 xg durant 5 min a 4°C , i eliminar el medi.

2. Material i mètodes

3. Fer dos rentats amb PBS, per centrifugació a 300 *xg* durant 5 min a 4°C.
4. Fer un rentat amb ~ 20 ml de *tampó de lisi*, per centrifugació a 300 *xg* durant 5 min a 4°C.
5. Descartar el sobrenedant, i resuspendre el sediment en 2 ml de *tampó de lisi* (volum final ~ 3 ml).
6. Lisar les cèl·lules per cavitació: 15 min a 4°C, 50 bars de pressió per N₂.
7. Tornar a lisar les cèl·lules amb un homogeneïtzador cel·lular (40 passades).
8. Afegir a l'homogenat de cèl·lules 0.1 volums de *tampó de transport*, per tal de recuperar la isotonicitat de la mostra.
9. Centrifugar a 40.000 *xg*, 30 min a 4°C (rotor Ti50 Beckman). Aquest pas es fa per eliminar els orgànuls cel·lulars.
10. Recuperar el sobrenedant i centrifugar-lo a 100.000 *xg*, 1 h a 4°C (rotor Ti50 Beckman), per tal d'eliminar les membranes.
11. Comprovar per Bradford (APARTAT 2.6.1.1) la concentració de proteïna de la solució de sobrenedant. Ens interessa obtenir un valor d'aproximadament 3 mg/ml.
12. Aliquotar el sobrenedant, i emmagatzemar-lo a -80°C.

MATERIAL

Tampó de lisi (x10)

Hepes-KOH 5 mM (pH 7,3), *acetat potàssic* 5 mM, *acetat magnèsic* 2 mM, *EGTA* 1 mM, *DTT* 2 mM, *aprotinina* 10 µg/ml, *leupeptina* 10 µg/ml, *pepstatina* 10 µg/ml i *AEBSF* 200 µg/ml.

Tampó de transport

Hepes-KOH 20 mM (pH 7,3), *acetat potàssic* 110 mM, *acetat magnèsic* 2 mM, *EGTA* 1 mM, *DTT* 2 mM, *aprotinina* 10 µg/ml, *leupeptina* 10 µg/ml, *pepstatina* 10 µg/ml i *AEBSF* 200 µg/ml.

2.10.3.2. Anàlisi d'importació nuclear

A continuació es descriu el protocol utilitzat per a l'anàlisi d'importació nuclear *in vitro*, que s'ha utilitzat per les variants PM5-Alexa i PE5-Alexa. En aquest sistema, cèl·lules de la línia HeLa es cultiven en cobreobjectes i són tractades amb el detergent digitonina, que permeabilitza les seves membranes, deixant l'embolcall nuclear intacte. El substracte fluorescent, PM5-Alexa o PE5-Alexa, és addicionat al medi, i la seva acumulació a nucli és monitoritzada per microscòpia confocal de fluorescència (Adam *et al.*, 1990). El procés és dependent de l'addició de citosol exogen, i es realitza paral·lelament amb i sense sistema regenerador d'energia, per comprovar si el transport de les ribonucleases està subjecte a la presència d'ATP.

Reacció d'importació nuclear

NOTA: Totes les incubacions realitzades abans de la fixació de les cèl·lules, s'han de dur a terme en un incubador amb atmosfera saturada d'aigua a 37°C i 5 % CO₂.

1. Disposar un cobreobjectes estèril (12 mm diàmetre, n° 1) en el fons de cada pouet d'una placa de 24 pouets.
2. Sembrar cèl·lules HeLa (a 10⁵cels/ml) en medi DMEM, FCS 5 % (1 ml per pouet) sobre els cobreobjectes en la placa.
3. Incubar la placa 24 h a l'incubador.
4. Posar la placa en gel i aspirar el medi
5. Afegir 1 ml de *tampó de permeabilització* fred a cada pouet i incubar durant 5 min en gel.
6. Aspirar el contingut dels pouets i afegir 1 ml de *tampó de transport (A)* fred, per pouet.
7. Preparar una cambra humida, posar un tros de parafilm al fons i dipositar-hi per a cada cobreobjectes una gota de 20 µL del *tampó de la reacció d'importació* adient (en presència o absència d'ATP), que contingui PE5-Alexa o PM5-Alexa a una concentració final de 2,3 µM, i els tractaments següents quan s'escaigui:
 - GTP_γS 300 µM
 - CHAPS 0,025 %, glicerol 1 %, Tris 2 mM (pH 7,0)
 - BSA-NLS-FITC 10 µM
 - Dextrà-TRITC (7,2 ó 4,4 kDa)
8. Dipositar cada cobreobjectes sobre la gota corresponent, prèvia eliminació de l'excés de líquid.
9. Incubar 12 min a 30°C, protegint de la llum.
10. Aturar la reacció de transport nuclear per addició de 200 µL de *tampó de transport (A)* fred a cada gota, sobre el mateix parafilm.
11. Retornar els cobreobjectes a la placa, i fer un rentat amb 1 ml de *tampó de transport (A)* per pouet.
12. Aspirar el contingut dels pouets i fixar les mostres amb 1 ml de *tampó de fixació* per pouet. Incubar 30 min a temperatura ambient.
13. Aspirar el contingut dels pouets i afegir 1 ml per pouet de NH₄Cl (2,7 mg/ml) en PBS. Incubar 10 min a temperatura ambient. Aquest pas ens permet eliminar l'excés de fixador.
14. Aspirar el contingut de cada pouet i rentar 2 vegades cada pouet amb ~ 1 ml PBS a 4°C. Incubar 5 min entre cada rentat.
15. Les mostres que no han d'ésser marcades amb cap anticòs, es poden processar directament per al seu muntatge final (punt 18).

2. Material i mètodes

16. Les mostres que han de ser tractades amb marcadors fluorescents després de la seva fixació, s'incuben seguint les especificacions de la TAULA 2.7. Per finalitzar, procedir al seu muntatge final (punt 18).
17. Les mostres que han de ser tractades amb anticossos, es processen seguint les especificacions detallades a partir del punt 21 de l'APARTAT 2.10.2, amb les següents variacions:
 - Tampó de permeabilització: Triton X-100 0,1 % (PBS), 1 ml/pouet
 - Permeabilització: 5 min en gel.
 - Tampó de rentat: PBS.
 - Tampó de dilució dels anticossos: PBS.Per acabar, procedir al seu muntatge final (punt 18)
18. Col·locar els cobreobjectes sobre el medi de muntatge (mowiol) en un portaobjectes.
19. Emmagatzemar les preparacions a 4°C i en la foscor fins a la seva visualització al microscopi confocal de fluorescència.

MATERIAL

Tampó de transport (A):

Hepes-KOH 20 mM (pH 7,3), acetat potàssic 110 mM, acetat magnèsic 2 mM, EGTA 1 mM, DTT 2 mM, aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 10 µg/ml, pepstatina 10 µg/ml.

Solució estoc de digitonina (Sigma): 20 mg/ml en DMSO

Tampó de permeabilització: digitonina 35 µg/ml en tampó de transport (A).

Tampó de la reacció d'importació en presència d'ATP (sistema regenerador d'energia) :

Cada mostra de reacció de transport nuclear té un volum total de 22 µl, i està constituïda per la mescla que es descriu a continuació. Així mateix, les solucions estoc es preparen amb antelació, a la concentració que s'especifica en tampó A., i s'emmagatzemen a -20°C fins al moment del seu ús.

1 µL BSA 20 mg/ml (Sigma)
1 µL ATP 20 mM (Sigma)
1 µL fosfocreatina 100 mM (Sigma)
1 µL creatina fosfoquinasa 400 u/ml (Sigma)
16 µL citosol 3 mg/ml

.....
2 µL ribonucleasa-Alexa 0.37 mg/ml

Tampó de la reacció d'importació sense ATP:

En la solució anterior substituir l'ATP per 1 µl d'apirasa 2000 u/ml (Sigma).

Tampó de fixació: Sacarosa 30 mM, paraformaldehid 3,7 % en PBS.

3. Resultats i discussió

3. Resultats i discussió

3.1. Disseny de les variants de l'HP-RNasa

Les funcions biològiques típicament assignades als membres de la superfamília de l'RNasa A inclouen el processament de l'RNA cel·lular i la degradació de l'RNA provinent de la dieta. Això no obstant, s'ha descobert que alguns membres d'aquesta superfamília presenten funcions especials, entre les quals destaquen les propietats citotòxica, angiogènica, immunosupressora, aspermatogènica i antiviral, que ja han estat descrites a l'APARTAT 1.1.2 de la INTRODUCCIÓ. D'entre aquestes funcions, l'activitat citotòxica és una de les més interessants, ja que aquests enzims poden ser utilitzats, sols o bé conjugats amb altres molècules, com a agents quimioterapèutics pel tractament de diferents patologies canceroses (Rybak i Newton, 1999a).

L'onconasa n'és un bon exemple. Es tracta d'una ribonucleasa monomèrica aïllada dels oòcits de *Rana pipiens*, que és tòxica de manera selectiva enfront de cèl·lules tumorals, tan *in vitro* com *in vivo* (Youle i D'Alessio, 1997). Tot i que aquest enzim es troba actualment en fase III d'assajos clínics (Mikulski *et al.*, 2002), les bases moleculars que determinen la seva toxicitat i especificitat són encara desconegudes.

Es postula que el mecanisme general de citotoxicitat de l'onconasa s'inicia amb la interacció de la proteïna amb la superfície cel·lular, per mitjà de la seva interacció amb algun component específic de la membrana que encara no ha estat caracteritzat (Leland i Raines, 2001; Wu *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1995). A continuació es produeix l'endocitosis de l'enzim, el qual inicia així la ruta de trànsit intracel·lular que el condueix al compartiment des d'on es produeix la seva translocació al citoplasma, on es creu que l'onconasa exerceix la seva acció citotòxica, basada en la degradació de l'RNA cel·lular (Leland i Raines 2001).

Pel que fa a la primera etapa d'aquest mecanisme, s'ha demostrat que la internalització és un paràmetre limitant en la toxicitat de les ribonucleases pancreàtiques. En aquest sentit s'ha comprovat que la unió de monòmers d'HP-RNasa o d'RNasa A a molècules transportadores (ja sigui per conjugació química, o per fusió recombinant), com ara transferrina, factors de creixement o anticossos, actua incrementant els nivells d'internalització en les cèl·lules diana, i augmentant la seva citotoxicitat (Rybak i Newton, 1999a).

Així mateix, s'ha evidenciat que la capacitat de resistència a l'acció inhibidora de l'hRI citoplasmàtic és també un paràmetre clau en la toxicitat de les ribonucleases. L'RI inhibeix les ribonucleases pancreàtiques per mitjà del seu segrest en un complex, el qual segueix una estequiometria de 1:1 i té una constant de dissociació de l'ordre de picomolar (Boix *et al.*, 1996; Leland *et al.*, 1998; Leland *et al.*, 2001). En canvi, l'afinitat de l'onconasa per l'hRI és un miler de vegades inferior, fet que permet que l'enzim sigui capaç de dur a terme la seva activitat ribonucleolítica tot i la presència d'aquest en el citoplasma (Youle i D'Alessio, 1997). La relació entre la capacitat d'escapar a l'hRI i la toxicitat de les ribonucleases es va confirmar en treballs en els quals la generació de variants de l'RNasa A i de l'HP-RNasa, capaces d'evadir l'inhibidor, va determinar l'adquisició de propietats citotòxiques per part d'aquests enzims (Boix *et al.*, 1996; Leland *et al.*, 1998; Leland *et al.*, 2001; Piccoli *et al.*, 1999).

Finalment, s'ha observat que l'augment de l'estabilitat de les ribonucleases en condicions de temperatura i de pH fisiològiques és també un factor que pot incrementar les seves propietats citotòxiques (Klink i Raines, 2000; Leland i Raines, 2001; Youle i D'Alessio, 1997). En aquest sentit, cal esmentar que l'onconasa és una proteïna extremadament estable (Notomista *et al.*, 2001).

Per tot això, l'activitat citotòxica que de manera natural presenten algunes ribonucleases, com l'onconasa i la BS-RNasa, s'ha atribuït essencialment a la capacitat d'aquests enzims d'exercir la seva activitat ribonucleolítica en l'interior de

la cèl·lula (Kim *et al.*, 1995a), en condicions fisiològiques i en presència de l'hRI. A partir d'aquests coneixements, la generació de variants citotòxiques de ribonucleases d'origen humà, com l'HP-RNasa, pot representar una nova línia de desenvolupament de potencials agents quimioterapèutics. Atès el seu origen humà, es pot hipotetitzar que variants d'aquest enzim que hagin adquirit propietats citotòxiques probablement seran menys immunogèniques que l'onconasa i la BS-RNasa en cas d'ésser utilitzades en clínica humana. En el present treball s'han seguit dues estratègies a fi d'obtenir noves variants de l'HP-RNasa amb propietats citotòxiques:

- Per una banda, s'ha intentat promoure la interacció de les variants de l'HP-RNasa amb la membrana cel·lular per mitjà de la introducció del tripèptid Arg-Gly-Asp (RGD) en regions de superfície de la proteïna, a fi d'afavorir la seva unió a membrana i, conseqüentment, la seva internalització.
- Per l'altra, s'han dissenyat una sèrie de substitucions de diferents residus amb l'objectiu de reduir l'afinitat entre HP-RNasa i l'hRI.

La primera estratègia es va dissenyar en base al fet que l'addició de la seqüència RGD en àrees de la superfície d'una proteïna ha demostrat actuar promovent la seva interacció amb les integrines de la superfície cel·lular (Pasqualini *et al.*, 1997; Zanetti *et al.*, 1993). De manera natural, la seqüència RGD es troba en un ampli nombre de proteïnes d'adhesió a la matriu extracel·lular, així com en certs virus i en certs receptors bacterians, i actua com a lloc d'unió de les partícules que la contenen amb les integrines presents en la membrana plasmàtica. Així mateix, la presència d'un motiu RGD en un llaç de superfície de l'angiogenina (residus 67 a 69), podria indicar que aquesta ribonucleasa és reconeguda per receptors cel·lulars de la família de les integrines (Papadopoulos *et al.*, 1998).

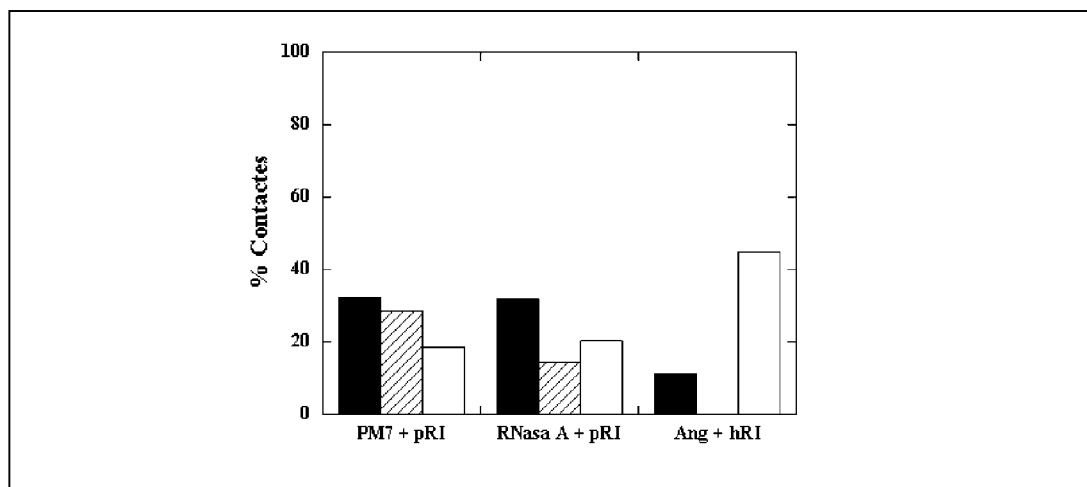
Pel que fa a la segona estratègia, en primer lloc calia esbrinar quins residus de l'HP-RNasa estan implicats en la interacció amb l'RI. L'absència de l'estructura cristal·logràfica d'un complex HP-RNasa+RI ens va conduir a generar un model molecular. Amb aquest objectiu, es va substituir les coordenades atòmiques de l'estructura de l'RNasa A en el complex RNasa A-pRI (Kobe i Deisenhofer, 1993) per les coordenades d'una variant de l'HP-RNasa resolta en el nostre grup de recerca (PM7) (Pous *et al.*, 2000). Mitjançant mètodes de dinàmica molecular i de minimització d'energia, es va obtenir l'estructura del complex PM7+pRI (Pous *et al.*, 2000), la qual es va comparar amb les dels complexos resolts i descrits de l'RNasa A+pRI (Kobe i Deisenhofer, 1996) i de l'Ang+hRI (Papageorgiou *et al.*, 1997). L'anàlisi de les estructures tridimensionals d'aquests tres complexos, va mostrar que les regions implicades de manera més significativa en la formació del complex eren els llaços $\alpha 2\beta 1$ (residus 30-42), $\beta 2\beta 3$ (residus 64-71) i $\beta 4\beta 5$ (residus 87-96), trobant-se els dos darrers en el mateix costat de l'enzim.

A la FIGURA 3.1 es comparen els percentatges dels contactes entre l'hRI i les ribonucleases abans esmentades. En els complexos RNasa A+pRI i Ang+hRI, el llaç $\beta 2\beta 3$ sembla ser el menor en importància en quant a la seva interacció amb

l'inhibidor, representant el 14,4 i el 0 % dels contactes, respectivament. En el model obtingut pel complex PM7+pRI, el percentatge de contactes en les tres regions es troba molt més equilibrat, ja que en aquest cas es produeix una participació molt més important de la regió $\beta 2\beta 3$ (28,4 % dels contactes). Aquest resultat va permetre postular que per al disseny de variants de l'HP-RNasa que escapin a l'hRI, la disrupció d'interaccions en un sol dels llaços probablement no resultaria suficient.

La contribució dels diferents residus d'una ribonucleasa en la interacció amb l'RI ha estat estudiada en diversos treballs, per mitjà de modificacions químiques i d'experiments de mutagènesi dirigida. En el cas de l'RNasa A, es va comprovar que la substitució de la Gly88, situada en el llaç $\beta 4\beta 5$, per una Arg o per un Asp, era suficient per dotar l'enzim de resistència a l'RI i per adquirir propietats citotòxiques (Leland *et al.*, 1998). No obstant, una substitució equivalent en l'HP-RNasa, en la qual els residus de les posicions 88 i 89 se substituïren per una Arg i una Ser, respectivament, donant lloc a la variant Asn88Arg Gly89Ser, no va permetre que l'enzim adquirís a l'hRI (Pous *et al.*, 2000). Aquest resultat va recolzar la hipòtesi suggerida pel model PM7+pRI, en la qual es considera que les substitucions generades en un sol llaç no són suficients per a trencar la interacció de les variants humanes amb l'RI.

FIGURA 3.1.



Percentatge de contactes entre l'RI i diversos llaços de PM7, RNasa A i Ang. El percentatge de contactes entre l'RI i els diferents llaços va ser calculat a partir del número de contactes àtom-àtom a distàncies inferiors a 4 Å, determinats per mitjà del programa CONTACT del paquet CCP4 (Collaborative Computational Project, number 4, 1994) que s'estableixen entre cada regió i l'RI, respecte el número total de contactes existents entre ambdues molècules. Barres negres: llaç $\alpha 2\beta 1$; barres ratllades: llaç $\beta 2\beta 3$; barres blanques: llaç $\beta 4\beta 5$. Resultats extrets de Pous *et al.* (2000).

En conjunt, aquestes dades suggerien que les tres regions esmentades podien ser bones ubicacions per introduir canvis en la seqüència de l'HP-RNasa amb l'objectiu d'afeblir la interacció de l'enzim amb l'inhibidor. I també que per assolir aquest objectiu, probablement seria necessari introduir substitucions en més d'una localització.

Així, les variants generades en base a les dues estratègies presentades prèviament (escapament a l'hRI i interacció amb la superfície cel·lular), es van realitzar per mitjà de la introducció de substitucions en les tres àrees de superfície esmentades, intentant no modificar residus implicats en la catàlisi o en el manteniment de l'estructura de l'enzim, a fi de preservar les seves propietats catalítiques i la seva estabilitat.

Per evitar la interacció amb l'RI es van introduir els canvis que es descriuen tot seguit. La posició Arg31 (hèlix $\alpha 2$) es va substituir per un residu acídric amb la finalitat de promoure una repulsió electrostàtica amb el residu Asp31 de l'RI. La posició Arg91 (llaç $\beta 4\beta 5$) es va substituir per un residu amb una cadena lateral més curta, a fi de suprimir un nombre important d'interaccions de van der Waals que es produïen amb els residus Trp314, Cys317 i Glu397 del complex. Finalment, les posicions Gly89 i Ser90 (llaç $\beta 4\beta 5$) van ser substituïdes simultàniament per dos residus d'Arg, amb l'objectiu d'afeblir la formació del complex per impediment estèric. Aquests residus voluminosos (volum de Van der Waals de 140 \AA^3) i polars, s'introduïren en una zona de l'enzim que en el model se situava interaccionant amb una regió hidrofòbica de l'RI, definida pels Trp257, Trp259 i Trp314, de manera que era difícil que l'RI pogués acomodar-ne la mida i la polaritat.

A fi de promoure la internalització de les variants, es va introduir el motiu RGD per substitució aminoacídica en cadascuna de les tres àrees de superfície implicades en el contacte amb l'RI. Les regions seleccionades s'estenen des del residu 37 al 39 (llaç $\alpha 2\beta 1$), del 66 al 68 (llaç $\beta 2\beta 3$) i del 89 al 91 (llaç $\beta 4\beta 5$). Així, la introducció del motiu RGD es va produir tant en un llaç tancat per un enllaç disulfur (Cys65-Cys72, llaç $\beta 2\beta 3$), i per tant de baixa mobilitat, com en llaços més flexibles (llaços $\alpha 2\beta 1$ i $\beta 4\beta 5$) (FIGURA 3.3). Les substitucions realitzades, a més d'introduir la seqüència RGD, també havien de permetre trencar un nombre significatiu de contactes amb l'RI. En el cas del llaç $\beta 2\beta 3$ però, la introducció del motiu RGD va suposar la substitució del residu Lys66 per una Arg, fet que feia témer per aquesta variant una pèrdua d'activitat catalítica, ja que el residu Lys66 pertany al subseti catalític p0 i té un paper important en la interacció enzim-substrat (Nogués *et al.*, 1998). No obstant això, en treballs previs s'havia comprovat que la substitució de la Lys66 per una Gln provocava una disminució de l'eficiència catalítica d'un 44 %, emprant poli(C) com a substrat (Nogués *et al.*, 1998). El fet de no provocar una pèrdua total de l'activitat de l'enzim, va fer suposar que les substitucions en aquesta posició no comportarien cap efecte negatiu en la possible citotoxicitat de les variants.

La combinació de les dues aproximacions descrites va portar a la construcció de les variants es detallen també a la Taula 3.1. La localització de les diferents substitucions en l'estructura tridimensional de l'HP-RNasa es representa a la FIGURA 3.3.

3.2. Construcció de variants de l'HP-RNasa

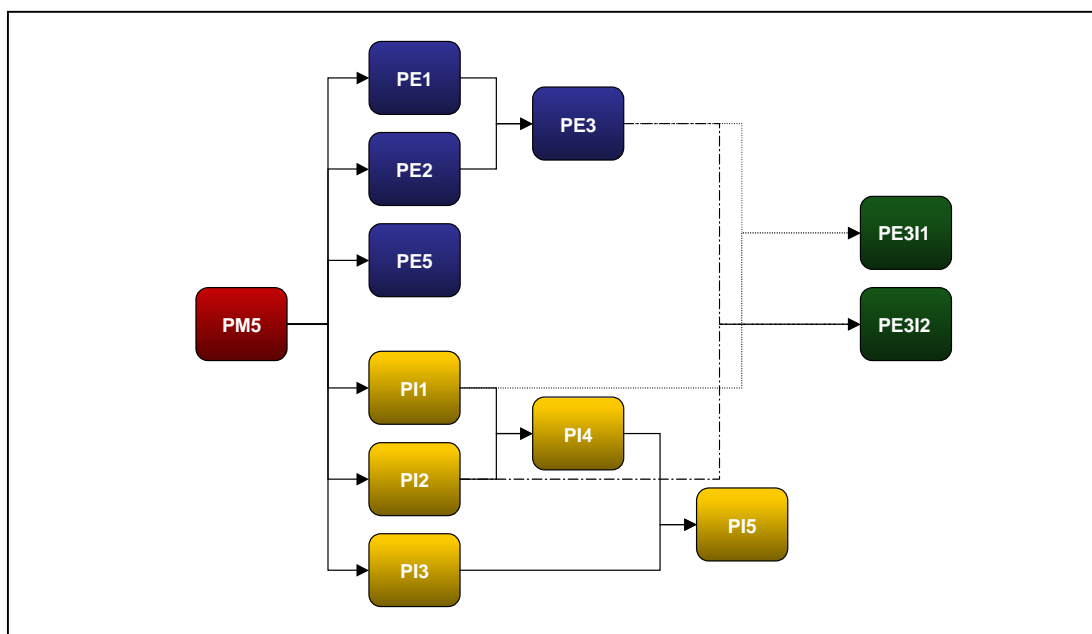
Totes les variants es van construir sobre el gen codificant per la proteïna PM5 (veure FIGURA 1.6A de la INTRODUCCIÓ). Aquesta proteïna és una variant de l'HP-RNasa en la qual els 20 primers residus de l'extrem N-terminal es van substituir per la seqüència corresponent de la BS-RNasa (Canals *et al.*, 1999). Malgrat tot, gràcies a l'homologia de seqüència entre la BS-RNasa i l'HP-RNasa, PM5 només difereix en cinc residus respecte a l'HP-RNasa salvatge (veure FIGURA 1.6B). Les construccions es van realitzar sobre PM5 ja que aquesta proteïna presenta una termoestabilitat superior a la de la proteïna salvatge (Canals *et al.*, 1999), la qual cosa hauria de permetre compensar, almenys fins a un cert punt, les pèrdues d'estabilitat generades per les substitucions introduïdes.

A fi de facilitar la nomenclatura amb la que es denomina cada variant, s'ha seguit el següent esquema: les variants dissenyades per promoure la disminució de l'afinitat amb l'RI s'agrupen dins de la sèrie PEx; mentre que aquelles variants en les que s'ha introduït la seqüència RGD, per tal de promoure la seva interacció amb la superfície cel·lular, s'agrupen dins de la sèrie PIx. Així es van generar les variants PE1, PE2, PE3, PE5, PI1, PI2, PI3, PI4 i PI5, que es descriuen a la TAULA 3.1.

Per a la construcció de les diverses variants de l'HP-RNasa es va seguir l'estratègia de mutagènesi dirigida per oligonucleòtid descrita per Juncosa-Ginestà *et al.* (1994). L'esquema del procés de generació de les construccions es presenta a la FIGURA 3.2. Els oligonucleòtids utilitzats per introduir aquestes substitucions en el gen codificant per a PM5, es descriuen a la TAULA 3.2. Aquests oligonucleòtids mutagènics es van emprar juntament amb un oligonucleòtid extern al gen, com a encebadors de la primera PCR del procés de mutagènesi dirigida (veure APÈNDIX A2.9). Els canvis de bases es van fer respectant l'ús de codó d'*E. coli*. Les construccions obtingudes es van confirmar per seqüenciació.

Per combinació de substitucions pertanyents a les dues sèries descrites prèviament (PEx i PIx) es va procedir a la generació de noves variants, que s'inclouen en la sèrie mixta PExIx, i que es caracteritzen també per presentar canvis en diferents regions exposades a la superfície. Aquestes variants es construïren amb l'objectiu de promoure de manera simultània, per una banda l'afebliment de la interacció amb l'inhibidor des de diferents posicions de la proteïna, i per l'altra la seva interacció amb la superfície cel·lular. Es tracta de les variants PE3I1 i PE3I2, que es descriuen també a la TAULA 3.1. A la FIGURA 3.2 es mostra un esquema de la construcció de les diverses variants generades en aquest treball, a partir de la proteïna parental PM5. La variant PE3 és una combinació de PE1 i PE2. La variant PI5 incorpora tres pèptids RGD, un a cadascun dels tres llaços que participen amb la interacció amb l'RI. Les construccions PE3I1 i PE3I2 presenten substitucions que combinen les dues aproximacions anteriors, introduint el motiu RGD en els llaços $\alpha 2\beta 1$ i $\beta 2\beta 3$, respectivament, sobre les substitucions corresponents a la variant PE3.

FIGURA 3.2.



Esquema de l'obtenció de les variants objecte d'estudi del present treball. Les variants PE1, PE2, PE3, PE5, PI1, PI2 i PI3 es van construir a partir de PM5 per mitjà de mutagènesi dirigida per oligonucleòtid. La sèrie PEx fa referència a les variants generades amb l'objectiu d'escapar a l'RI; la sèrie PIx inclou les variants que introdueixen un o més segments RGD; i la sèrie mixta PExIx correspon a la combinació de les dues aproximacions anteriors.

TAULA 3.1.

Nomenclatura i construcció de les variants de l'HP-RNasa.

Nom variant	Substitucions	Variant de partida	Oligonucleòtid mutagènic
PE1	R31E	PM5	HPR-1
PE2	R91A	PM5	HPR-2
PE3	R31E R91A	PE1	HPR-2
PE5	G89R S90R	PM5	HPR-3
PI1	Q37R R39D	PM5	HPR-4
PI2	K66R N67G G68D	PM5	HPR-5
PI3	G89R S90G R91D	PM5	HPR-6
PI4 ^a	Q37R R39D K66R N67G G68D	PI1	HPR-5
PI5	Q37R R39D K66R N67G G68D G89R S90G R91D	PI4	HPR-6
PE311	R31E R91A Q37R R39D	PE3	HPR-4
PE312	R31E R91A K66R N67G G68D	PE3	HPR-5

^a La realització de PI4 ha estat estrictament un pas intermediari en la construcció de PI5, i no serà, doncs objecte d'estudi en el present treball.

3. Resultats i Discussió

TAULA 3.2.

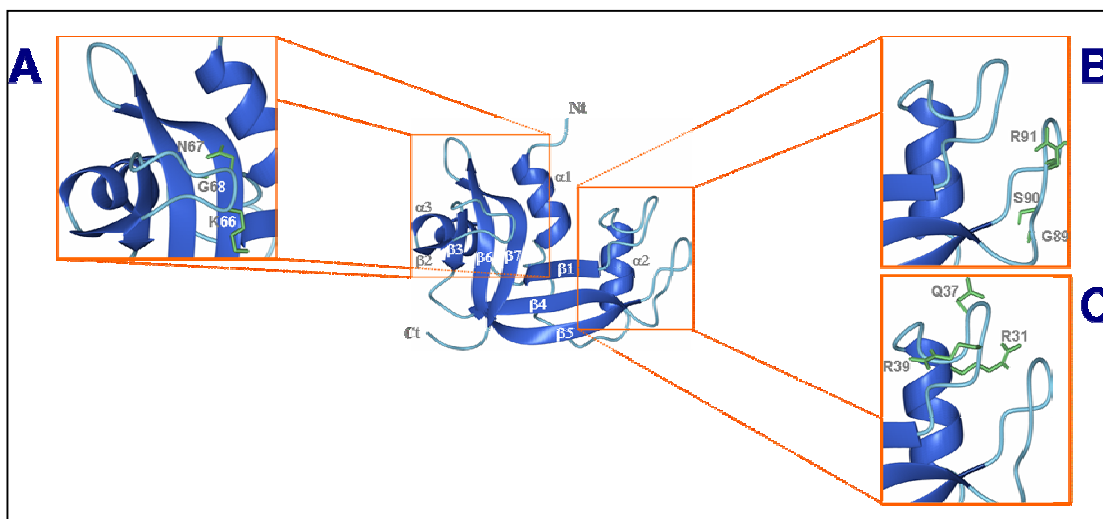
Oligonucleòtids utilitzats per a l'obtenció dels gens mutants de l'HP-RNasa

Nom	Substitucions introduïdes	Seqüència*
HPR-1	R31E	5'- CAT ATT TCG GCG Ctc CAT CAT TTG ATT -3'
HPR-2	R91A	5'- CAA TTA GGG TAT gcA GAA CCA -3'
HPR-3	G89R S90R	5'- ATT AGG GTA TCT Acg ACg ATT AGT CAG TCT -3'
HPR-4	Q37R R39D	5'- CAG GTT TAC Aat cAC CTc GAG TCA TAT T -3'
HPR-5	K66R N67G G68D	5'- AAT TAC CTT Gat cAc cgc ggC AAG TAA CTT T -3'
HPR-6	G89R S90G R91D	5'- ACA ATT AGG GTA atc Acc ACg ATT AGT CAG TCT -3'

* Les bases escrites en minúscula i negreta són les modificades

A la FIGURA 3.3 s'especifica la ubicació de les substitucions aminoacídiques introduïdes en PM5, que han donat lloc a les diverses variants objecte d'estudi del present treball.

FIGURA 3.3.



Representació de PM5 mostrant la localització dels residus substituïts en les variants. Substitucions localitzades en (A) hèlix $\alpha 2$ i llaç $\alpha 2\beta 1$; (B) llaç $\beta 2\beta 3$; (C) llaç $\beta 4\beta 5$.

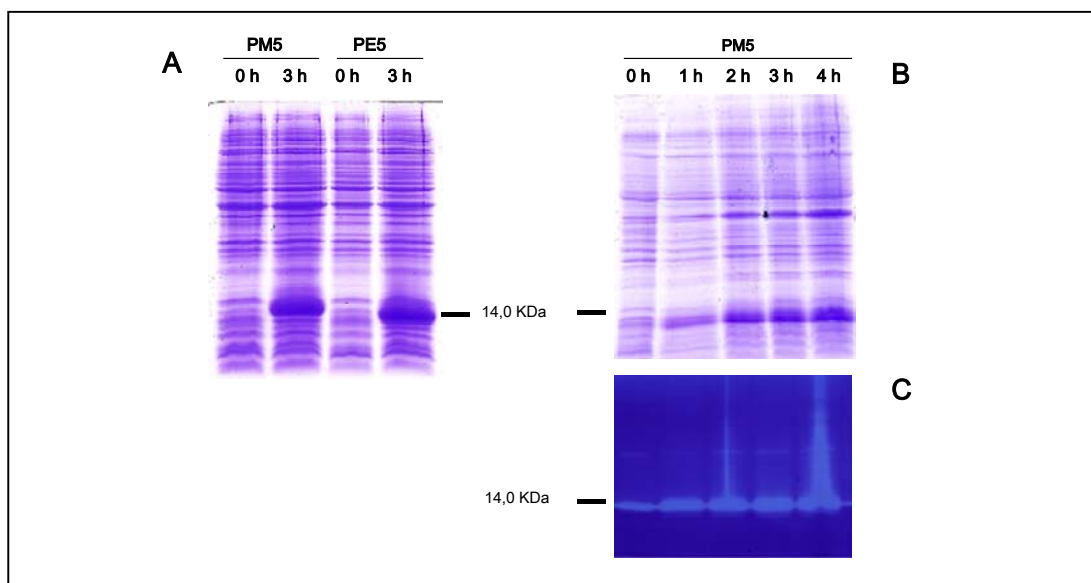
3.3. Expressió i purificació de les variants de l'HP-RNasa

Donat que les construccions generades en el present treball s'expressen sota el control del promotor de l'RNA polimerasa de T7, es van transformar cèl·lules competents de la soca BL21(DE3) d'*E. coli* amb els plasmidis d'expressió que contenien els gens modificats.

Abans de començar la producció de les variants, es va realitzar l'anàlisi de l'expressió de cada construcció, sempre respecte a PM5. Es tractava de definir el temps òptim d'inducció necessari perquè el cultiu produeixi la màxima quantitat de proteïna, així com comprovar si existeixen diferències significatives entre els nivells d'expressió de les variants i els de la seva proteïna parental. Per això es van analitzar electrofòreticament els sediments bacterians de cultius induïts amb IPTG de cèl·lules que prèviament havien estat transformades amb les construccions d'interès.

Tal i com es mostra a la FIGURA 3.4A per a la variant PE5 en relació a PM5, la introducció de les diverses mutacions en el gen parental no té un efecte significatiu sobre els nivells d'expressió de la proteïna. Aquest resultat va ser el mateix per la resta de variants (dades no mostrades). Així mateix, el temps òptim d'inducció per a totes les variants és de 3 h, tal i com s'indica a les FIGURES 3.4B i C per a PM5.

FIGURA 3.4.



Anàlisi dels nivells d'expressió de PM5 i PE5. (A) Electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS al 15 % tenyit amb blau de Comassie, de mostres de cultius de BL21(DE3)/PM5 i BL21(DE3)/PE5 a 0 i 3 h d'inducció amb IPTG 1 mM. (B) Electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS al 15 % tenyit amb blau de Comassie, de mostres de cultius de BL21(DE3)/PM5 a 0, 1, 2, 3 i 4 h d'inducció. (C) Zimograma revelat per activitat de les mateixes mostres que B.

3. Resultats i Discussió

L'expressió i la purificació de cadascuna de les variants es va dur a terme tal i com es descriu a l'APARTAT 2.5. El percentatge de NaCl al qual eluïa cada una de les variants estava directament relacionat amb el seu valor de pI teòric (calculat a partir de la composició d'aminoàcids, Compute pI/Mw, a l'adreça d'Internet http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html), el qual es presenta a la TAULA 3.3.

Per a totes les variants, l'homogeneïtat i la puresa de la mostra obtinguda en el pic principal de la cromatografia d'intercanvi catiònic utilitzant una columna Mono-S HR 5/5, que correspon a la darrera etapa del procés de purificació (FIGURA 3.5A per la proteïna PE3), es va analitzar amb una columna de fase reversa (Vydac 214-TPC4), obtenint-se un únic pic (FIGURA 3.5 B, per la proteïna PE3). L'anàlisi per SDS-PAGE i per zimograma va mostrar la presència d'una única banda (dades no mostrades). Finalment, l'anàlisi per espectrometria de masses (MALDI-TOFF MS), realitzat a l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la UAB (IBB) va confirmar l'existència d'una sola proteïna amb el pes molecular esperat en cada cas, tal i com s'indica a la TAULA 3.3, juntament amb els valors teòrics corresponents, calculats a partir de la seqüència d'aminoàcids (Compute pI/Mw, a l'adreça d'Internet http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html).

El rendiment mig de la sèrie de purificacions realitzades per totes les variants, excepte PI5, seguint aquest protocol va ser de 15-20 mg de proteïna pura i correctament plegada per litre de cultiu, valor idèntic a l'obtingut per a la purificació de PM5. En el cas de PI5, la variant que incorpora el major nombre de substitucions, es van obtenir rendiments de 7 mg per litre de cultiu. Probablement les substitucions introduïdes afecten l'etapa de replegament, reduint així el rendiment final de recuperació de la proteïna.

TAULA 3.3.

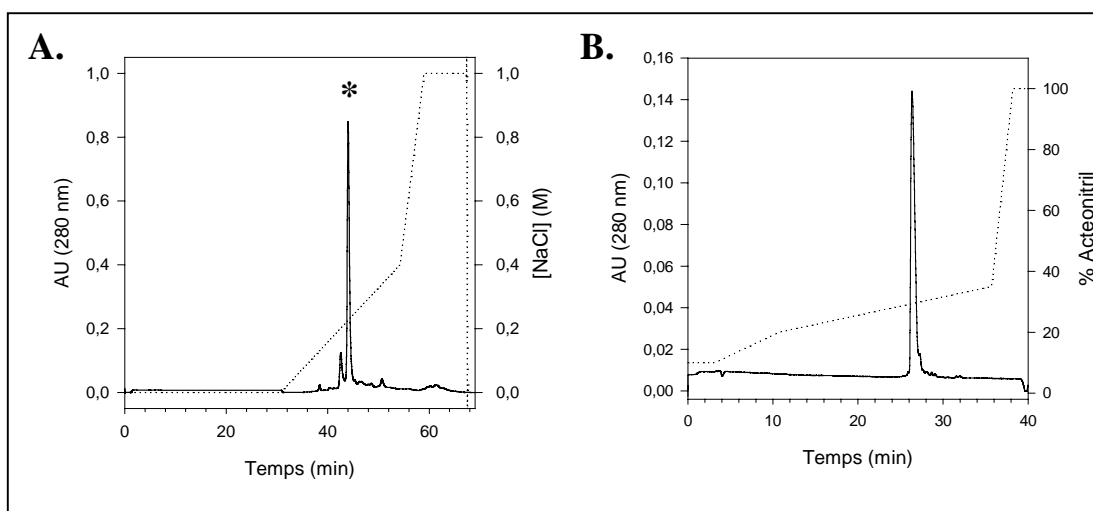
Massa molecular i valor de pI de les variants generades en aquest treball.

Variants	Mw* experimental (Da)	Mw* teòric (Da)	pI
PE1	n.d.	14506,2	8,13
PE2	n.d.	14448,2	8,44
PE3	14414,6	14415,0	7,58
PE5	14699,5	14694,0	8,99
PI1	n.d.	14520,2	8,44
PI2	n.d.	14562,3	8,45
PI3	n.d.	14561,3	8,44
PI4	n.d.	14549,2	8,13
PI5	14574,0	14570,0	7,58
PE3I1	14404,4	14402,0	6,93
PE3I2	14445,3	14444,0	6,93
PM5	14539,0	14533,3	8,66

La massa molecular experimental es va determinar a partir dels espectres de MALDI-TOFF MS, mentre que la massa teòrica i el valor de pI es van calcular a partir de la seqüència d'aminoàcids.

Mw*: pes molecular (Da). n.d.: no determinat.

FIGURA 3.5.



Purificació de la proteïna PE3. (A) Perfil d'elució de PE3 enregistrat a 280 nm de la cromatografia de bescanvi catiònic amb una columna Mono-S HR 5/5-FPLC. La mostra correspon a la darrera etapa del procés de purificació. La columna es va equilibrar amb l'amortidor acetat sòdic 50 mM (pH 5,5), i la mostra es va eluir amb un gradient lineal de NaCl de 0 a 400 mM en el mateix amortidor d'equilibrat. El símbol (*) indica el pic pertanyent a la fracció de proteïna correctament plegada. (B) Perfil d'elució de PE3 enregistrat a 280 nm de la cromatografia en fase reversa en columna Vydac 214-TP C4 per HPLC. La columna es va equilibrar amb acetonitril 10 %, TFA 0,1 % i la mostra es va eluir amb un gradient lineal de 20-35 % d'acetonitril. La mostra aplicada correspon a la fracció principal de la cromatografia de bescanvi catiònic per HPLC, marcada amb el símbol (*).

3.4. Expressió, purificació i activació de l'onconasa

L'onconasa és una ribonucleasa d'origen amfibi, aïllada originalment a partir dels oòcits i dels embrions de *Rana pipiens* (Darzynkiewicz *et al.*, 1988; Mikulski *et al.*, 1990), que presenta activitats antivirals, citostàtiques i citotòxiques envers un ampli nombre de línies cel·lulars tumorals, així com activitat antitumoral *in vivo* envers models tumorals de ratolí (Mikulski *et al.*, 1990). Actualment es troba en fase II/III d'assajos clínics pel tractament de mesotelioma maligne i de l'adenocarcinoma pancreàtic (veure APARTAT 1.3.2) (Mikulski *et al.*, 2002).

Atès que l'onconasa presenta propietats citotòxiques, es va optar per utilitzar aquesta proteïna com a control positiu en els assajos de citotoxicitat de les variants de l'HP-RNasa generades en aquest treball (APARTATS 3.6 i 3.11). Per aquesta raó, va ser necessari establir un sistema d'expressió i purificació adient a fi d'obtenir onconasa en quantitats suficients per a dur a terme els estudis indicats.

3.4.1. Producció heteròloga de l'onconasa

Tal i com s'ha comentat a l'APARTAT 1.3.2 de la INTRODUCCIÓ, una de les majors diferències entre l'onconasa i l'HP-RNasa es troba a l'extrem N-terminal. En l'onconasa, el primer residu de la seqüència (Glu1) està sotmès a un procés de modificació postraducciona, que consisteix en la ciclació de la cadena lateral sobre el grup amino terminal. El resultat és la formació d'un residu d'àcid piroglutàmic (Pyr) en la primera posició de la seqüència. Es tracta d'un residu essencial per l'activitat de l'onconasa, ja que està implicat en aspectes estructurals i funcionals de l'enzim (Mosimann *et al.*, 1994). Per una banda, el Pyr1 interacciona per mitjà d'un pont d'hidrogen amb el grup CO de la Val96, situada a la cadena β C-terminal, fet que determina que l'hèlix- α N-terminal es plegui contra el cos de la proteïna. 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. Així mateix, el Pyr1 interacciona via un pont d'hidrogen amb el grup ϵ -amino de la cadena lateral de la Lys9, la qual forma part del subseti d'unió a grups fosfats del substrat (Mosimann *et al.*, 1994).

L'interès de l'onconasa com a agent farmacològic ha conduït al desenvolupament de diversos sistemes heteròlegs d'expressió recombinant i de protocols de producció, per tal de produir quantitats importants de proteïna pura i activa. Alguns autors (Adinolfi *et al.*, 1995; Leland *et al.*, 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.

Tanmateix, els sistemes d'expressió citoplasmàtics proporcionen rendiments de purificació significativament més elevats, degut al segrest de la proteïna expressada en forma de cossos d'inclusió. Això permet, per una banda, protegir a la cèl·lula de l'acció tòxica de la proteïna sobreexpressada i, per l'altra, protegir la proteïna recombinant de la degradació per proteases cel·lulars. Malgrat aquestes avantatges, l'onconasa expressada de manera recombinant al citoplasma d'un organisme procariota presenta un residu addicional de formilmetionina (fMet-1) a l'extrem N-terminal, el qual impedeix la ciclació de la Glu1 a Pyr1. Com a conseqüència d'aquesta alteració en la seqüència, les interaccions de l'extrem N-terminal amb la Val96 i la Lys9 no es produeixen. Això provoca una pèrdua significativa tant de l'activitat catalítica com de les propietats citotòxiques de l'enzim (Boix *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1998; Lee i Raines, 2003).

Això no obstant, diversos treballs han demostrat que l'activitat catalítica i l'estructura de l'enzim es poden recuperar si es reconstitueix el residu Pyr1 a partir de la forma (Met-1)-ONC (Boix *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1998; Notomista *et al.*, 1999). En aquest sentit, Boix *et al.* (1996) van dissenyar una variant recombinant de l'onconasa on es substituïa la Met23 per una Leu, per tal de que l'únic residu de Met

que restés en la seqüència fos el de la posició N-terminal. Aquest era eliminat per digestió amb bromur de cianogen (CNBr). 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. La proteïna resultant recuperava la seva activitat enzimàtica i citotòxica (Boix *et al.*, 1996; Newton *et al.*, 1994).

A fi de produir un enzim actiu, es va desenvolupar una altra estratègia, consistent en l'eliminació de la Met-1 per digestió enzimàtica amb una amino peptidasa. Aquesta metodologia ja s'havia emprat prèviament per a l'obtenció d'altres ribonucleases recombinants, com és el cas de l'angiogenina (Shapiro *et al.*, 1988) i de la BS-RNasa (Adinolfi *et al.*, 1995), utilitzant una aminopeptidasa provinent d'*Aeromonas proteolytica* (AAP) (Wagner *et al.*, 1972). Notomista *et al.* (1999) van utilitzar aquesta estratègia amb la finalitat de reconstituir l'extrem N-terminal de l'onconasa produïda citoplasmàticament. El procediment, però, va presentar una eficiència molt baixa, probablement a causa de la poca exposició de la Met-1 a la superfície de la proteïna (Mosimann *et al.*, 1994). Arran d'això, els autors optaren per eliminar la Met-1 en un punt intermedi del procés de purificació, en el qual la proteïna es trobava completament desplegada i reduïda. La digestió enzimàtica d'aquesta conformació, on l'extrem N-terminal era accessible a l'activitat proteolítica de l'AAP, va resultar eficaç. Posteriorment, la proteïna havia de ser replegada i reoxidada, i finalment purificada. Malgrat que els autors van aconseguir dur a terme la digestió, s'havien incrementat el nombre de passos en el protocol d'obtenció de proteïna activa, amb la corresponent reducció del rendiment final de producció.

En el present treball s'ha desenvolupat un procediment de purificació i activació de l'onconasa que és una modificació de l'anterior. Aquest proporciona un elevat rendiment de producció, i és més senzill, ràpid i eficient. Presenta com a innovació el fet que la digestió enzimàtica de la Met-1 es realitza a partir de la proteïna ja purificada, sense necessitat de reduir-la.

3.4.2. Expressió citoplasmàtica i purificació de la (Met-1)-(Gln1)ONC(M23L)

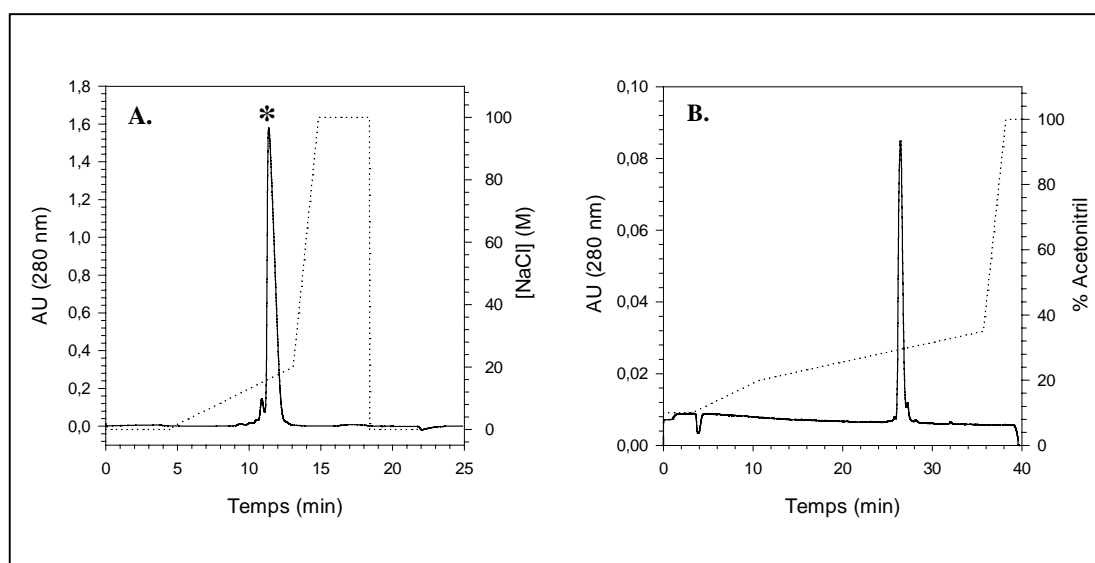
La construcció recombinant pET11d-(Met-1)-(Gln1)ONC(M23L) (amablement cedida pel Dr. R.T. Raines, University of Madison, Wisconsin, USA) es va expressar en cèl·lules d'*E. coli* BL21(DE3), d'acord amb el procediment descrit prèviament per a les variants de l'HP-RNasa (Canals *et al.*, 1999). L'anàlisi en gel de poliacrilamida-SDS tenyit amb blau de Coomassie del sediment cel·lular d'un cultiu induït durant 3 h, va mostrar una banda de sobre expressió d'una proteïna d'aproximadament 11 kDa, valor que coincideix amb la massa molecular de l'onconasa (dades no mostrades).

Aquesta proteïna es va purificar seguint el mateix protocol descrit prèviament per a les variants de l'HP-RNasa. A la FIGURA 3.6A es presenta el cromatograma corresponent a la darrera etapa del procés de purificació, emprant una columna de

3. Resultats i Discussió

bescanvi catiònic (Mono-S HR5/5). El pic marcat amb un asterisc correspon a la proteïna pura, homogènia i correctament plegada. L'homogeneïtat i la puresa de la mostra es va analitzar amb una columna de fase reversa (Vydac 214-TP C4), obtenint-se un únic pic (FIGURA 3.6 B). Finalment, l'anàlisi per MALDI-TOF MS va confirmar l'existència d'una sola proteïna amb el pes molecular esperat per a la (Met-1)-(Gln1)ONC(M23L), de 11947 ± 2 Da (11950 Da teòrics). Els rendiments de purificació per a 1 L de cultiu induït foren de 15-20 mg, similars als obtinguts per a les variants de l'HP-RNasa.

FIGURA 3.6.



Purificació de l'onconasa. (A) Perfil d'elució de la (Met-1)-(Gln1)ONC(M23L) enregistrat a 280 nm de la cromatografia de bescanvi catiònic amb una columna Mono-S HR 5/5-FPLC per HPLC. La mostra correspon a la darrera etapa del procés de purificació. La columna es va equilibrar amb l'amortidor acetat sòdic 50 mM (pH 5,5), i la mostra es va eluir amb un gradient lineal de NaCl de 0 a 200 mM en el mateix amortidor d'equilibrat. (B) Perfil d'elució de la (Met-1)-(Gln1)ONC(M23L) enregistrat a 280 nm de la cromatografia en fase reversa en columna Vydac 214-TP C4 per HPLC. La columna es va equilibrar amb acetonitril 10 %,TFA 0,1 %, i la mostra es va eluir amb un gradient lineal de 20-35 % d'acetonitril.

La proteïna resultant es va sotmetre a un procés de seqüenciació per mitjà de la reacció d'Edman, a l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina, IBB. Els resultats obtinguts van confirmar que l'onconasa resultant del procés de purificació retenia la Met-1. Aquest residu addicional en la seqüència de l'enzim provocava una pèrdua d'activitat catalítica de l'enzim, tal i com es va comprovar per assaig d'activitat ribonucleasa sobre rRNA, en gel d'agarosa (veure més endavant). Aquest resultat és consistent amb el descrit en el treball de Boix *et al.* (1996).

Malgrat que el sistema de producció va permetre assolir rendiments suficients com per a dur a terme els estudis posteriors, la proteïna resultant no era activa. Per aquesta raó va ser necessari desenvolupar una estratègia per reconstruir l'extrem N-terminal natiu de la proteïna, a fi de recuperar les seves característiques catalítiques, estructurals i funcionals.

3.4.3. Activació de la Met(-1)-(Gln1)ONC(M23L): un procés en dues etapes

La reconstitució de l'extrem N-terminal natiu en l'onconasa és un procés que implica dues reaccions: l'eliminació del residu Met-1 i la ciclació de la glutamina N-terminal a àcid piroglutàmic. Ambdues reaccions són imprescindibles perquè l'enzim recuperi l'estabilitat, activitat i potencial citotòxic pròpies de la forma salvatge. La reacció d'hidròlisi és essencial per obtenir un residu de Gln1, capaç de ciclitzar de manera no enzimàtica a Pyr1. En aquest apartat del treball s'han establert les condicions per a realitzar les dues etapes d'activació, que condueixen de la (Met-1)-(Gln1)ONC(M23L) a la (Pyr1)-ONC(M23L).

Per a la primera reacció, es va utilitzar l'aminopeptidasa d'*Aeromonas proteolytica* (AAP). Es tracta d'una metal·loproteasa que conté zinc, extremadament estable i amb un pH òptim d'activitat d'entre 8,0 i 8,5. La seva acció proteolítica depèn de la presència d'un grup α -amino lliure en el substrat, té preferència per residus hidrofòbics (entre ells la Met) i els residus Asn, Gln i Cys són resistents a la hidròlisi (Wagner *et al.*, 1972).

La presència d'un grup α -amino lliure en la seqüència de l'onconasa, a partir del qual és possible la reacció d'hidròlisi per l'AAP, s'havia confirmat per degradació d'Edman a l'extrem N-terminal (NH₂-Met-Gln-Asp-Trp-Leu). Que el primer residu de la seqüència fos una Met (posició -1), susceptible de ser digerida; i el segon un Gln (posició 1), resistent a aquesta digestió, conferia les condicions teòriques òptimes per considerar l'AAP com la proteasa més adient per a la hidròlisi de la Met-1. Una vegada catalitzada l'escissió d'aquest primer residu, era d'esperar que la reacció s'aturés a causa de la presència de la Gln1, resistent a l'acció de l'AAP. A més a més, la posterior ciclació espontània del Gln1 a Pyr1 probablement participaria també en el bloqueig de la digestió, degut a l'absència del grup α -amino lliure que aquesta modificació comporta.

Les condicions experimentals de la reacció de digestió, la primera etapa del procés, es van obtenir a partir de treballs previs (Shapiro *et al.*, 1988), en els quals es definien el tampó i el pH òptim per afavorir la ciclació.

L'estructura compacta de l'onconasa li proporciona una extremada resistència a la digestió per proteases. Per aquesta raó, i a fi de possibilitar l'accés de l'AAP al seu seti d'acció sobre l'onconasa (la Met-1 de l'extrem N-terminal), calia aportar flexibilitat a l'estructura de la ribonucleasa. Amb aquest objectiu, es va realitzar una bateria de digestions de la proteïna ja purificada i dissolta en el tampó esmentat prèviament, en presència de diferents condicions desnaturalitzants (Gnd-HCl 0, 1,5,

3,0 i 4,5 M). La finalitat d'aquestes anàlisis era determinar les condicions desnaturalitzants mínimes per permetre l'accés de la proteasa al seu substrat. Cap d'aquestes concentracions d'agent desnaturalitzant no haurien d'afectar negativament a l'AAP, ja que aquest és un enzim molt estable, capaç de tolerar condicions extremes de temperatura (varies hores a 70°C), i resistent a l'acció d'elevades concentracions d'agents desnaturalitzant (per exemple, d'urea 8 M) (Shapiro *et al.*, 1988).

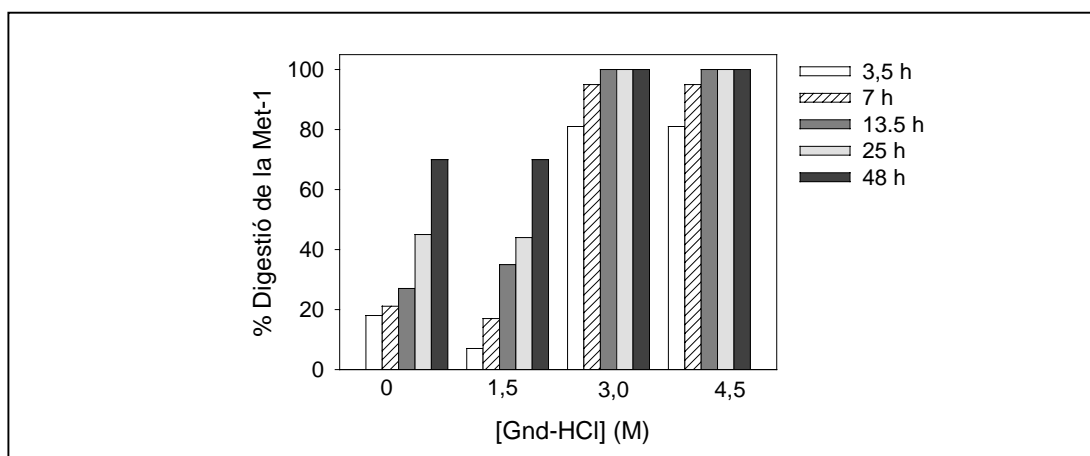
Després d'una incubació de 15 min a temperatura ambient de l'onconasa en aquesta bateria de condicions desnaturalitzants, es va procedir a la seva hidròlisi enzimàtica. L'AAP es va afegir a la solució de reacció amb una relació molar de 1:2500 (AAP:ONC), i les mesclades es van incubar a 37°C durant 0; 3,5; 7; 13,5; 24 i 48 h. La reacció d'hidròlisi finalment es va aturar per addició d'EDTA 20 mM a la mescla.

La digestió de la Met-1 es va seguir per MALDI-TOF MS en cadascun dels assajos realitzats. La massa determinada per la (Met-1)-(Gln1)ONC(M23L) sense digerir fou de 11947±2 Da (valor pròxim a l'esperat a partir de la seva seqüència, de 11950 Da). La diferència de massa per la pèrdua de la Met-1 hauria de correspondre a 131 Da, i si a més la Gln N-terminal es trobava ciclada a Pyr, la diferència de massa a afegir seria de 17 Da més, o sigui una diferència total de 148 Da. Així doncs, el pes molecular de l'enzim amb l'extrem N-terminal correctament reconstituït, o sigui, la forma (Pyr1)ONC(M23L), hauria de ser de 11799±2 Da.

La resolució dels espectres de masses obtinguts permetia discriminar clarament les formes digerida i no digerida de l'onconasa, però no el seu estat de ciclació, o sigui, les espècies (Gln1)ONC(M23L) i (Pyr1)ONC(M23L). Pel que fa al seguiment de la reacció de digestió, la fracció pertanyent a cadascuna de les dues espècies es va seguir per mitjà de la variació de la intensitat (referida com a l'àrea) de cada pic al llarg del temps. Així, la fracció d'enzim hidrolitzat, ONC(M23L) (ciclat i no ciclat), es va expressar com a percentatge, a partir del quocient entre la intensitat del pic corresponent a l'ONC(M23L) i la intensitat total, definida com la suma de les intensitats dels pics corresponents a les dues espècies, ONC(M23L) i (Met-1)-ONC(M23L).

Els resultats obtinguts a partir dels espectres de masses (FIGURA 3.7), indiquen que per als tractaments 0 i 1,5 M Gnd-HCl després de 48 h d'incubació, tan sols es produeix el 70 % de la digestió de la proteïna. L'estructura globular de l'onconasa en aquestes condicions es conserva prou compacta com per a dificultar l'accés del substrat al centre actiu de la proteasa. Ara bé, per als tractaments 3,0 i 4,5 M de Gnd-HCl, s'observa a les 3,5 h d'incubació un 81 % de digestió, i a les 7 h una digestió pràcticament total.

FIGURA 3.7.



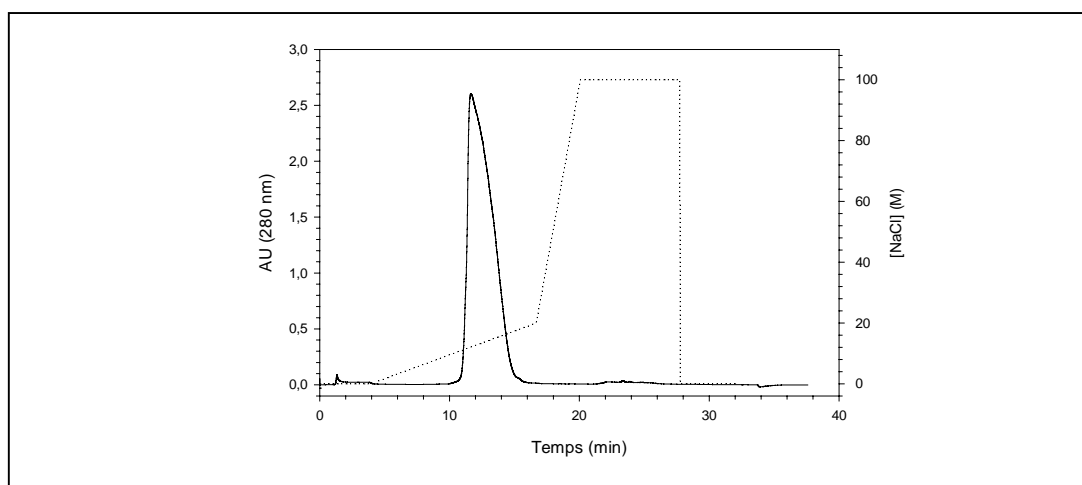
Percentatges de digestió de la Met-1 en l'onconasa, obtinguts per MALDI-TOF MS. Els percentatges s'han mesurat a partir del quocient entre la intensitat del pic corresponent a l'espècie digerida i la intensitat total, que és la suma de les intensitats dels pics corresponents a les dues espècies.

En base als treballs previs (Shapiro *et al.*, 1988), era d'esperar que les condicions d'incubació que s'han utilitzat en aquest treball haurien de promoure la ciclació de la Gln1 a Pyr1, una vegada digerida la Met-1. Segons les dades de MALDI-TOF MS, tot i que l'equip emprat no permetia separar la forma ciclada de la no ciclada, es va observar l'aparició de diferències d'aproximadament 148 Da (o sigui, hidròlisi de la Met-1 i ciclació de la Gln1) a partir de 13,5 h en el tractament 1,5 M i a partir de 3,5 h en els tractaments 3,0 i 4,5 M Gnd-HCl.

A partir d'aquests resultats, es van seleccionar les condicions per a la digestió preparativa de la proteïna. Així, aquesta es va digerir en presència de 3,0 M Gnd-HCl durant 13,5 h, a 37°C. En aquestes condicions, l'anàlisi d'espectrometria de masses va mostrar una massa molecular experimental de 11799 ± 2 Da, la qual correspon a la massa teòrica de la (Pyr1)ONC(M23L) correctament processada (11801,6 Da teòrics). Així mateix, a fi de confirmar l'eficiència de ciclació de la l'onconasa digerida en aquestes condicions, la mostra es va sotmetre a degradació d'Edman. Els resultats d'aquesta anàlisi van demostrar que >95 % de la mostra era resistent a la seqüenciació (indicant la presència de menys d'un 5 % d'extrems N-terminal lliures), de manera que tant la digestió com la ciclació s'havien dut a terme correctament.

A fi de comprovar la seva puresa, la proteïna activada es va introduir en una columna de bescanvi catiònic, en una columna Mono-S HR 5/5 i amb un gradient salí de 0 a 200 mM NaCl. A la FIGURA 3.8 es mostra el perfil d'elució de l'onconasa digerida, on s'observa l'existència d'un sol pic de proteïna pura i homogènia.

FIGURA 3.8.



Perfil d'elució d'una mostra d'onconasa digerida. (Met-1)-(Gln1)ONC(M23L) digerida amb AAP durant 13,5 h en presència de Gnd-HCl 3,0 M. Cromatografia de bescanvi catiònic en columna Mono-S HR 5/5-FPLC, per HPLC, enregistrada a 280 nm. La columna es va equilibrar amb l'amortidor fosfat potàssic 20 mM (pH 7,2), i la mostra es va eluir amb d'un gradient lineal de NaCl de 0 a 200 mM en el mateix amortidor d'equilibrat.

3.4.4. Caracterització de l'ONC(M23L) activada

Per tal de comprovar si la reconstrucció de l'extrem N-terminal natiu en l'onconasa havia permès la recuperació de les característiques catalítiques i citotòxiques de l'enzim, es va procedir a la seva caracterització.

L'activitat enzimàtica de les formes (Met-1)-(Gln1)ONC(M23L) i (Pyr1)ONC(M23L), així com llur capacitat de defugir l'acció inhibidora de l'hRI, es va seguir per anàlisi, en gel d'agarosa, de la seva acció sobre el substrat 16S- i 23S-rRNA. Ambdues formes es van incubar amb el substrat, en presència o absència d'hRI. Els resultats es mostren a la FIGURA 3.9. La forma no digerida de l'enzim no va presentar activitat catalítica ni en presència ni en absència de l'hRI. En canvi, la forma recombinant amb l'extrem N-terminal reconstituït va presentar activitat enzimàtica, independentment de la presència de l'hRI.

A partir d'aquesta mateixa figura, es va comprovar que l'onconasa catalitza la degradació del substrat amb menys eficiència que l'HP-RNasa i l'RNasa A. Aquest resultat és consistent amb el fet que l'onconasa presenta una activitat catalítica molt menor que les seves homòlogues humana i bovina (Boix *et al.*, 1996).

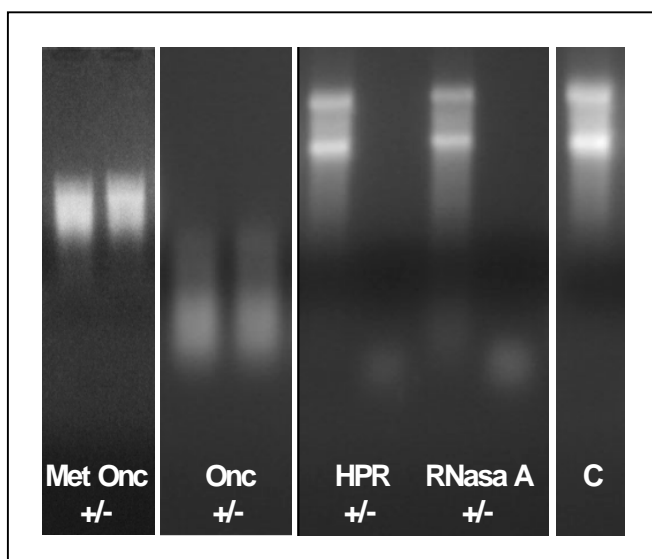
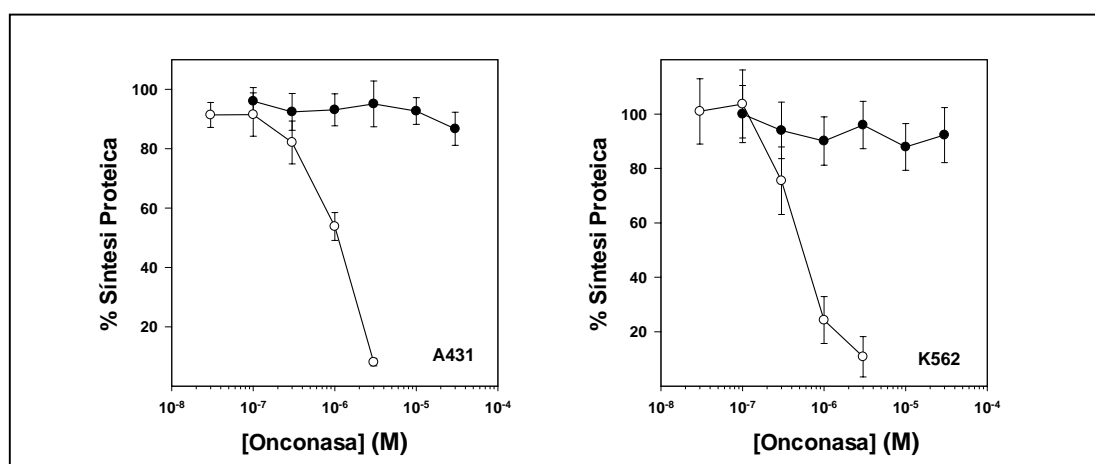


FIGURA 3.9.

Inhibició de l'activitat ribonucleasa de l'onconasa per efecte de l'hRI. S'ha estudiat l'activitat de la (Met-1)-(Gln1)ONC(M23L), la (Pyr1)ONC(M23L), l'HP-RNasa i l'RNasa A. La inhibició s'ha detectat visualitzant en un gel d'agarosa la degradació catalitzada per l'enzim sobre el substrat 16S- i 23S-rRNA en absència (-) o presència (+) de 40 unitats d'hRI. C, substrat; Met-Onc, (Met-1)-(Gln1)ONC(M23L); Onc, (Pyr1)ONC(M23L); HPR, HP-RNasa.

L'acció citotòxica de les dues formes d'onconasa es va examinar en les línies cel·lulars tumorals humanes A431 i K562, realitzant incubacions de 96 h. A la FIGURA 3.10, on es presenten les corbes dosi-resposta de l'acció de les dues formes d'onconasa, es pot observar que la forma amb l'extrem N-terminal reconstituït presenta un valor d'IC₅₀ d'1 i 0,3 µM per a les línies A431 i K562, respectivament. En canvi, la forma no digerida no afecta la viabilitat de les cèl·lules a les concentracions analitzades.

FIGURA 3.10.



Citotoxicitat de (Pyr1)ONC(M23L) (○) i (Met-1)-(Gln1)ONC(M23L) (●) sobre A431 i K562. Inhibició de la síntesi proteica, mesurada a partir de la incorporació de ³⁵S-metionina a les proteïnes de nova síntesi després d'una incubació de 96 h en presència de diferents concentracions d'enzim.

En els assajos de citotoxicitat que es van realitzar posteriorment a fi de caracteritzar les propietats citotòxiques de les diverses variants de l'HP-RNasa generades en aquest treball, es va utilitzar sempre l'onconasa com a control de citotoxicitat positiva (APARTATS 3.6 i 3.11). Aquests assajos es van dur a terme sobre diverses línies cel·lulars tumorals humanes (A431, K562, MCF7, HeLa i Daudi) al llarg d'incubacions de 96 h (APARTAT 3.6) i de 48 h (APARTAT 3.11). En totes les línies estudiades, la (Pyr1)ONC(M23L) va presentar un valor de IC₅₀ que oscil·lava entre 0,3-1 µM. Aquests resultats són consistents amb els descrits a la literatura per a l'onconasa en diverses línies cel·lulars (Rybak i Newton, 1999a), i evidencien l'existència de diferents sensibilitats cel·lulars a l'acció d'aquest enzim (veure APARTAT 1.3.2).

L'onconasa produïda seguint el procediment descrit en aquest apartat, es va utilitzar també com a control en els assajos d'anàlisi de la interacció amb l'hRI i d'internalització cel·lular de les variants de l'HP-RNasa produïdes en aquest treball (APARTATS 3.5 i 3.7). Els tots els casos, els valors obtinguts per a l'onconasa es van ajustar a les dades referides a la literatura.

Aquests resultats assenyalen que els processos de producció i d'activació de l'onconasa recombinant desenvolupats en el present treball permeten obtenir de manera ràpida i senzilla (sobretot en relació als protocols descrits a la bibliografia) quantitats importants de proteïna recombinant amb propietats similars a les de la forma salvatge.

Les condicions de les dues reaccions necessàries per a regenerar l'extrem N-terminal de l'onconasa expressada en el citoplasma de les cèl·lules bacterianes, la digestió enzimàtica de la Met-1 i la ciclació no enzimàtica del Gln1 a Pyr1, han estat optimitzades posteriorment a la realització d'aquest treball, a fi de reduir els temps d'incubació (veure Ribó *et al.*, enviat per publicació, a l'APÈNDIX B).

3.5. Anàlisi de la interacció ribonucleasa/hRI

En els estudis descrits fins al moment, la citotoxicitat de les variants de l'RNasa A i de l'HP-RNasa generades presenta una correlació directa amb la seva habilitat d'escapar a l'acció de l'hRI endogen (Bretscher *et al.*, 2000; Haigis *et al.*, 2002; Haigis *et al.*, 2003; Leland *et al.*, 1998). Per tal de valorar quina o quines de les variants construïdes en el present treball adquirien resistència a l'hRI, es van dur a terme dues aproximacions, que es descriuen tot seguit.

3.5.1. Anàlisi qualitativa en gel d'agarosa

La interacció amb l'hRI de les diverses variants es va analitzar a nivell qualitatiu mitjançant un assaig en gel d'agarosa (Wu *et al.*, 1993), mesurant la capacitat de degradació del substrat 16S- i 23S- rRNA per part de les diverses variants en

presència o en absència de l'hRI. Els resultats es presenten a la FIGURA 3.11. A l'assaig es van utilitzar PM5 i RNasa A com a controls negatius, i onconasa com a control positiu.

Els resultats indiquen que la variant PM5 i l'RNasa A són sensibles a l'acció inhibidora de 40 unitats d'hRI (el substrat no es degrada en presència d'hRI), mentre que l'onconasa n'és resistent (el substrat es degrada tant en presència com en absència d'hRI). Pel que fa a les variants, cap de les que incorporaven substitucions en només un dels tres llaços (PE1, PE2, PI1, PI2 i PI3) és resistent a l'acció de l'hRI, almenys en les condicions de l'assaig. Aquest també és el cas de la variant PE5, portadora de les substitucions Gly89Arg Ser90Arg en el llaç $\beta 4\beta 5$.

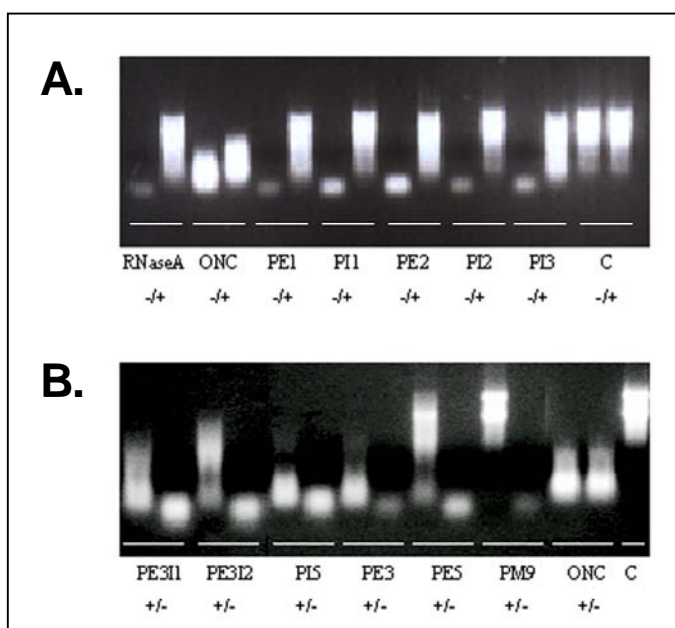


FIGURA 3.11.

Inhibició de l'activitat enzimàtica de les variants de l'HP-RNasa per efecte de l'hRI. La inhibició s'ha detectat visualitzant en un gel d'agarosa la degradació catalitzada per l'enzim sobre el substrat 16S- i 23S-rRNA en absència (-) o presència (+) de 40 unitats d'hRI. **A.** Variants sensibles a l'hRI. **B.** Variants amb diferents graus de sensibilitat a l'hRI. ONC: onconasa, control resistent a l'hRI; PM5 i RNasa A, controls sensibles a l'hRI. C, control sense ribonucleasa.

Les variants PI5, PE3I1, PE3I2 i PE3, portadores de substitucions en més d'un llaç, van presentar resistència a l'acció de l'hRI, tot i que amb lleugeres diferències. Per tal de quantificar l'eficiència d'escapament a l'hRI de cadascuna d'aquestes variants, es va dur a terme la determinació de la seva constant d'inhibició (veure APARTAT 3.5.2).

3.5.2. Anàlisi quantitativa de la interacció enzim/inhibidor

Per les variants que en l'assaig qualitatiu presentaven capacitat d'evasió a l'hRI, es va determinar la constant d'inhibició seguint el protocol descrit a l'APARTAT 2.6.7.2 de MATERIAL I MÈTODES. Els valors de K_i obtinguts es presenten a la Taula 3.4. Tots ells són de l'ordre de nanomolar, d'acord amb els valors de K_i descrits en treballs previs per d'altres variants de l'HP-RNasa resistents a l'hRI (Leland i Raines, 2001).

La interacció entre l'hRI i una de les variants més sensibles a la seva acció (PE5), a l'igual que pel control negatiu (PM5), és massa forta com per a permetre la determinació de la constant d'inhibició mitjançant el present assaig. Per a l'HP-RNasa salvatge, el valor de K_i descrit a la literatura es troba en l'ordre de picomolar (Boix *et al.*, 1996; Gaur *et al.*, 2001; Rushizky *et al.*, 1961).

Així mateix, es va comprovar que la variant que és la que incorpora un major nombre de substitucions aminoacídiques en les regions de contacte amb l'hRI, PI5, és precisament la que mostra un valor de K_i més elevat. Amb una menor capacitat d'evasió la segueixen PE3I1 i PE3I2, ambdues amb un valor similar i, finalment PE3.

TAULA 3.4.

Valors de les constants d'inhibició de les variants de l'HP-RNasa per l'hRI.

Enzims	K_i (nM)
PE3	$0,42 \pm 0,09$
PE5	-
PE3I1	$0,80 \pm 0,13$
PE3I2	$0,77 \pm 0,14$
PI5	$1,34 \pm 0,17$
PM5	-

Els valors de K_i (\pm SE) per a les variants de l'HP-RNasa es van mesurar mitjançant la inhibició de la catàlisi del substrat FRET ArUAA a pH 6,0 i a 25°C en presència de diferents concentracions d'hRI.

En base a aquests resultats, es van seleccionar les variants capaces d'escapar a l'hRI, encara que fos amb una baixa eficiència, per continuar el treball, les quals s'indiquen a la TAULA 3.4. Segons el que es troba descrit a la bibliografia, s'esperava que el nivell de resistència a l'hRI seria directament proporcional a l'adquisició de propietats citotòxiques per part de les variants.

3.6. Caracterització de les propietats citotòxiques de les variants de l'HP-RNasa en cultiu cel·lular

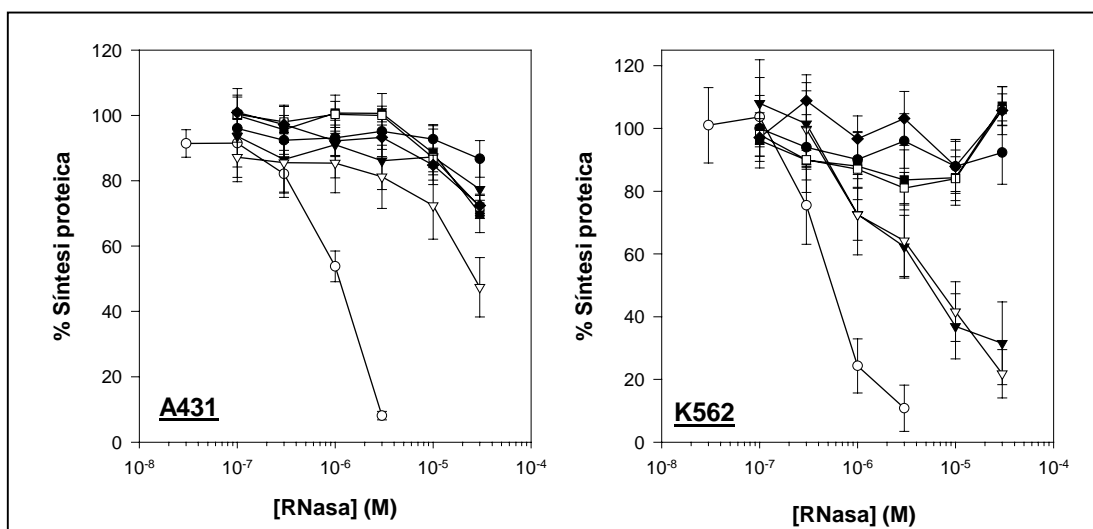
Tal i com s'ha descrit a l'apartat anterior, les diverses variants de l'HP-RNasa presenten diferents nivells de sensibilitat a l'hRI. En aquest apartat s'analitza la relació entre la capacitat d'evasió de les variants a l'hRI i la seva possible citotoxicitat. Així mateix, es vol comprovar si la presència del motiu RGD afavoreix l'adquisició de propietats citotòxiques.

3. Resultats i Discussió

Inicialment es va assajar la toxicitat de les variants de l'HP-RNasa en cultiu cel·lular *in vitro*, sobre les línies tumorals d'origen humà A431 i K562, un epidermocarcinoma (de creixement adherent) i una eritroleucèmia (de creixement en suspensió), respectivament. Els resultats obtinguts per les variants de l'HP-RNasa PE3, PE5, PE3I1 i PI5 es mostren a la FIGURA 3.12, juntament amb els valors corresponents a PM5 i l'onconasa com a controls negatiu i positiu, respectivament.

L'onconasa, d'acord amb resultats descrits en treballs previs, va presentar un valor d'IC₅₀ de 0,3 µM per a les cèl·lules de la línia K562 (Leland *et al.*, 1998), i d'1 µM per a les de la línia A431. Pel que fa a les variants de l'HP-RNasa portadores de motius RGD (PE3I1, PE3I2 i PI5), es va observar que la màxima concentració d'enzim assajada (30 µM) no va afectar la viabilitat en cap de les dues línies assajades. Així, la introducció del motiu RGD en les ribonucleases no va semblar ser efectiva a fi de promoure l'adquisició de propietats citotòxiques per part dels enzims. Ben al contrari, les variants PE3 i PE5 van presentar un valor d'IC₅₀ d'entre 6-10 µM sobre la línia K562. Curiosament, només PE5 va mostrar citotoxicitat en la línia A431, amb un valor d'IC₅₀ de 3 µM.

FIGURA 3.12.



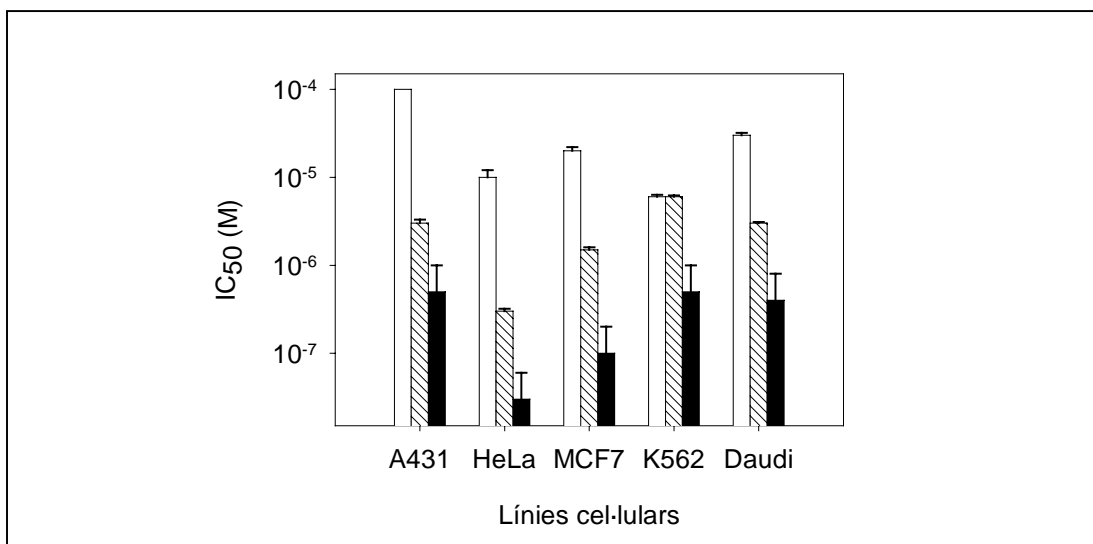
Citotoxicitat de les variants de l'HP-RNasa i de l'onconasa. Representació del percentatge de síntesi proteica en cèl·lules A431 i K562, mesurada a partir de la incorporació de ³⁵S-metionina a les proteïnes de nova síntesi després d'una incubació de 96 h amb concentracions creixents de les ribonucleases corresponents. Els resultats per a cada experiment individual són la mitjana de quatre determinacions, i cada experiment es va repetir tres vegades. PM5 (●), onconasa (○), PE3 (▼), PE5 (▽), PE3I1 (■), PE3I2 (□), PI5 (◆).

Per tal de verificar si la citotoxicitat PE3 sobre la línia K562 era deguda tan sols a una sensibilitat particular d'aquesta línia, es va repetir l'anàlisi emprant un ventall més ampli de línies cel·lulars tumorals. Així doncs, i per a les proteïnes PE3, PE5 i onconasa es va dur a terme l'assaig de citotoxicitat sobre les línies MCF7 (carcinoma de glàndules mamàries), HeLa (carcinoma de cèrvix) i Daudi (limfoma de Burkitt). A la FIGURA 3.13 es representen els valors d'IC₅₀ obtinguts per cada proteïna, sobre les diferents línies assajades. S'observa que la variant més sensible a l'hRI, PE5, presenta nivells de citotoxicitat superiors als de PE3 en totes les línies assajades, amb valors d'IC₅₀ que oscil·len entre 0,3 i 3 µM. Aquests valors són només 5-15 vegades més alts que els determinats per a l'onconasa. PE3, la variant resistent a l'acció de l'hRI i menys citotòxica que PE5 en totes les línies analitzades, presenta valors d'IC₅₀ d'entre 10⁻⁵ (HeLa) i 3·10⁻⁵ M (MCF7 i Daudi).

A partir de les dades obtingudes s'evidencia que cada línia cel·lular presenta una sensibilitat lleugerament diferent a l'acció de les ribonucleases, malgrat que la seva vulnerabilitat és gairebé sempre la mateixa, essent de més a menys tòxiques: onconasa > PE5 > PE3. La línia K562 és l'única que no segueix aquesta tendència, ja que PE3 i PE5 presenten el mateix valor d'IC₅₀. Així mateix, els valors d'IC₅₀ indiquen que la línia cel·lular més sensible a l'acció de les ribonucleases és l'HeLa, seguida per MCF7, i finalitzant amb K562/Daudi/A431, les tres amb un nivell de sensibilitat similar. Les variacions observades en l'activitat tòxica d'una mateixa ribonucleasa en funció del tipus cel·lular pot ser deguda a diferents factors, entre els quals cal destacar possibles diferències en l'eficiència d'internalització de l'enzim en cadascuna de les línies, o bé divergències en les vies de trànsit intracel·lular que segueix.

La relació entre la sensibilitat de les ribonucleases a l'hRI i la seva citotoxicitat ha estat descrita extensament en diversos treballs (Gaur *et al.*, 2001; Leland i Raines, 2001; Leland *et al.*, 2001; Rybak i Newton, 1999a). En el cas de la BS-RNasa i de l'onconasa, la citotoxicitat s'ha correlacionat principalment amb la capacitat de l'enzim d'evitar la interacció amb l'hRI (Kim *et al.*, 1995a; Kim *et al.*, 1995b). Com conseqüència d'aquestes observacions, es va plantejar la hipòtesi que, per adquirir citotoxicitat, una ribonucleasa ha de ser resistent a l'hRI. Diversos treballs amb variants de l'RNasa A i de l'HP-RNasa que adquirien citotoxicitat quan s'impedia la seva interacció amb l'inhibidor, així com els resultats obtinguts en aquest treball per la variant PE3, donen suport a aquesta hipòtesi (Leland *et al.* 1998). Això no obstant, el supòsit de que la sensibilitat a l'hRI és un paràmetre clau en la generació de ribonucleases citotòxiques és, encara avui, objecte de controvèrsia, ja que en l'adquisició d'aquesta propietat hi intervenen també altres factors (Rybak i Newton, 1999b). Les nostres dades experimentals així ho confirmen, puix que la variant més tòxica, PE5, és precisament sensible a la inhibició per l'hRI. S'evidencia així que la correlació entre capacitat d'evasió a l'hRI i l'adquisició de propietats citotòxiques no sempre es compleix, com és el cas de PE5.

FIGURA 3.13.



Valors d'IC₅₀ de les variants PE3, PE5 i de l'onconasa. Valors obtinguts per a les diverses línies cel·lulars assajades. Onconasa (barres negres), PE3 (barres blanques) i PE5 (barres ratllades).

Així doncs, les dades obtingudes per a PE5 reafirmen que la sensibilitat a l'hRI és tan sols un dels factors implicats en el mecanisme de citotoxicitat de les ribonucleases. Altres paràmetres, com la capacitat d'unió a superfície cel·lular, l'estabilitat en condicions fisiològiques i una via de transport eficient per conduir l'enzim envers la seva diana intracel·lular, poden ser també elements clau en la definició del mecanisme de toxicitat d'aquests enzims. Per aquest motiu, en els següents apartats s'analitzen diferents aspectes que poden promoure l'adquisició de propietats citotòxiques en les ribonucleases, amb especial atenció al cas de PE5.

3.7. Anàlisi d'internalització

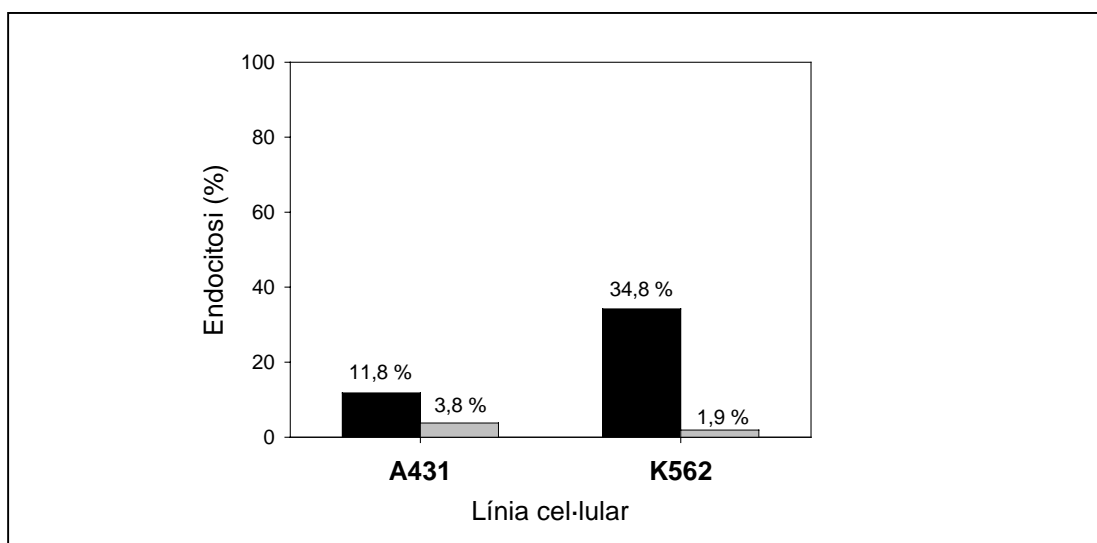
El primer aspecte que es va considerar a fi d'intentar trobar una explicació al fet que PE5, tot i l'elevada sensibilitat a l'hRI, fos la variant més citotòxica, va ser l'existència de possibles diferències en quan a eficiència d'internalització d'aquesta variant respecte les altres. Per aquesta raó es va investigar la relació entre la capacitat citotòxica de PE5 i la seva eficiència d'internalització, juntament amb l'onconasa com a control positiu i PM5 com a control negatiu. Es volia comprovar si les propietats citotòxiques de PE5, que és significativament sensible a l'hRI, eren fruit d'una major eficàcia d'internalització respecte la resta de variants, sobretot en relació a PI5 (portadora de tres motius RGDs), la qual havia demostrat ser la variant més

resistent a l'hRI, malgrat no ser citotòxica. El seguiment de l'endocitosi de les variants es va dur a terme amb les proteïnes marcades radioactivament amb ^{125}I , sobre les línies cel·lulars tumorals A431 i K562.

Els assajos inicials d'internalització es van realitzar per l'onconasa i PM5 sobre les línies A431 i K562, seguint la seva internalització a diferents temps (entre 0 i 45 min). A la FIGURA 3.14 es mostren els resultats obtinguts pel temps màxim assajat, 45 min. Com es pot observar, la línia K562 va ser la més sensible a la internalització de l'onconasa, per la qual cosa es va decidir dur a terme les anàlisis posteriors sobre aquesta línia cel·lular. La major internalització de l'onconasa sobre la línia K562 podria explicar perquè el valor d'IC₅₀ d'aquesta proteïna és menor per aquesta línia cel·lular que per a A431.

La validesa dels resultats obtinguts per la línia A431 es va confirmar pel seguiment de la internalització de la transferrina marcada també amb ^{125}I , la qual va assolir un 60 % d'internalització als 45 min d'incubació (resultats no mostrats).

FIGURA 3.14.



Internalització de l'onconasa (en negre) i de PM5 (en gris) en cèl·lules A431 i K562. Les cèl·lules es van incubar 45 min amb cadascun dels enzims marcats amb ^{125}I , a 37°C. El percentatge d'internalització es va calcular com la fracció de radioactivitat associada

A la FIGURA 3.15 es presenten els resultats de la internalització de l'onconasa, PM5, PE5 i PI5 sobre la línia K562. Per la resta de variants els resultats van ser idèntics als obtinguts per PM5, de manera que no es presenten a la figura. S'observa que l'onconasa és l'única ribonucleasa que presenta un nivell d'internalització significatiu, del 40 % després d'una incubació de 7 h. Aquest resultat és consistent

amb les dades presentades en el treball de Wu *et al.* (1993), on es descriu que l'onconasa s'uneix de manera saturable a cèl·lules de la línia 9L amb una cinètica d'unió a membrana plasmàtica que augmenta fins més enllà de les 6 h d'incubació. No obstant, la naturalesa del seu receptor cel·lular és encara desconeguda. Certs autors han suggerit que l'onconasa s'internalitza per mitjà d'un mecanisme no dependent de receptor proteic, sinó a través de la interacció amb algun altre tipus de component específic de la membrana plasmàtica. Aquest és el cas, per exemple, de les lectines cSBL i jSBL, les quals presenten una elevada homologia de seqüència amb l'onconasa, i que s'uneixen a glicoproteïnes de superfície cel·lular (veure APARTAT 1.3.3) (Haigis *et al.*, 2002; Mastronicola *et al.*, 1995; Olmo *et al.*, 2001). Així doncs, l'elevada citotoxicitat de l'onconasa és en part conseqüència d'una major eficiència d'internalització, juntament amb la seva capacitat de defugir l'hRI.

La tècnica utilitzada no ha estat prou sensible per a detectar nivells significatius d'internalització per cap de les variants de l'HP-RNasa estudiades (FIGURA 3.15). Aquests resultats permeten descartar la possibilitat de que la major citotoxicitat de PE5 en relació a la resta de variants sigui deguda a una major eficiència d'internalització d'aquest l'enzim.

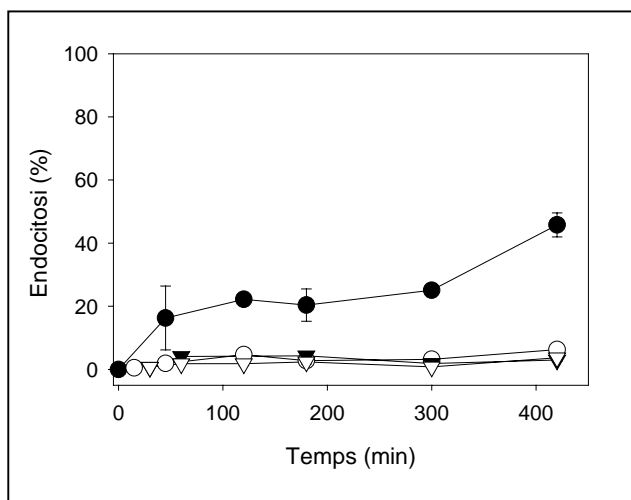


FIGURA 3.15.

Internalització de l'onconasa (●), PM5 (○), PI5 (▼) i PE5 (▽) en cèl·lules K562. Les cèl·lules es van incubar a diferents temps amb cadascuna de les ribonucleases marcades amb ^{125}I , a 37°C . El percentatge d'internalització es va calcular com la fracció de radioactivitat associada a cèl·lules, que és resistent a la digestió amb pronasa.

Aquestes dades, juntament amb el fet que fins al moment no s'ha descrit l'existència d'un receptor per a l'HP-RNasa, suggereixen que probablement el mecanisme de citotoxicitat de la variant PE5 s'inicia amb la seva internalització via endocitosi en fase fluïda, procés que l'introduiria així en la circulació del sistema endosomal de la cèl·lula. Aquesta hipòtesi explicaria els baixos rendiments d'internalització trobats, i suggeriria que l'endocitosi d'un reduït nombre de molècules és suficient per desencadenar l'acció citotòxica sobre la cèl·lula.

D'acord amb aquesta suposició, Haigis *et al.* (2003), estudiant la capacitat d'unió de l'onconasa i d'una variant citotòxica de l'RNasa A (Lys7Ala Gly88Arg RNasa A) a la membrana plasmàtica de cèl·lules K562, han mostrat que les dues proteïnes s'uneixen a la superfície cel·lular quan aquestes s'incuben a 4°C, sense arribar però a creuar la membrana plasmàtica. La internalització només es produeix si les cèl·lules s'incuben a 37°C, demostrant que l'entrada d'aquestes proteïnes a la cèl·lula es produeix per un procés d'endocitosi. Així mateix, els autors van comprovar que la preincubació de les cèl·lules K562 amb inhibidors metabòlics de l'endocitosi actua protegint-les de la toxicitat de l'onconasa i de la variant Lys7Ala Gly88Arg RNasa A.

Tal i com s'ha comentat, les variants portadores de motius RGD, i en especial la variant PI5, portadora de tres motius RGD d'unió a integrina localitzats en tres llaços exposats a la superfície de la proteïna diferents, no són més eficientment internalitzades que la seva parental PM5 ni que la proteïna citotòxica PE5 (FIGURA 3.15). Aquest resultat és coherent amb el fet que cap de les variants portadores de motius RGD (PE3I1, PE3I2 i PI5) adquireixen propietats citotòxiques (APARTAT 3.6). Així mateix, cal destacar que l'addició d'un motiu RGD en els llaços $\alpha 2\beta 1$ (I1) i $\beta 2\beta 3$ (I2) sobre la variant PE3 (generant les formes PE3I1 i PE3I2) suprimeix les propietats citotòxiques que PE3 havia adquirit. Sembla doncs, que a més de no haver estat capaç de promoure la internalització de les variants, la inserció d'aquest motiu afecta negativament l'adquisició de propietats citotòxiques.

3.8. Determinació de les propietats catalítiques

Tal i com ja s'ha descrit, la citotoxicitat de les ribonucleases depèn de llur activitat enzimàtica (Bretscher *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 1993). Per aquesta raó, es va comprovar si les substitucions introduïdes sobre PM5 per a la generació de les diverses variants, induïen canvis en les propietats catalítiques de l'enzim.

Els paràmetres cinètics de les diverses variants es van determinar mitjançant mètodes espectrofotomètrics per a substrats de baix (C>p) i alt (poli(C)) pes molecular (APARTAT A4.5 de l'APÈNDIX A), i es van comparar amb els que s'obtenen per la proteïna PM5.

A la TAULA 3.5 es presenten els valors dels paràmetres cinètics de les diferents variants. Per als dos substrats analitzats, totes les variants van retenir entre el 50-93 % de l'eficàcia catalítica respecte a la presentada per PM5. Aquests resultats suggereixen que les mutacions introduïdes no han alterat l'estructura nativa de la proteïna, almenys no de forma suficient com per produir un canvi en la posició de les cadenes laterals dels residus que participen en la catàlisi que anuli completament l'activitat catalítica. Probablement l'estructura del centre actiu de les variants generades és, si bé no idèntica, similar a la conformació que presenta la proteïna salvatge.

Aquestes dades indiquen que la manca de citotoxicitat de les variants que són resistents a l'hRI no és deguda a una pèrdua de la capacitat de degradació de l'RNA. Cal tenir en compte que l'onconasa és 1000 vegades menys activa que les ribonucleases pancreàtiques (Boix *et al.*, 1996), i tot i això és citotòxica. Així doncs, el fet que les variants generades conservin un valor d'eficiència catalítica superior al 50 % en tots els casos, assegura que aquest paràmetre no és el responsable de que les variants que escapen a l'hRI no hagin adquirit propietats citotòxiques.

TAULA 3.5.

Paràmetres cinètics de les variants de l'HP-RNasa pels substrats C>p i poli(C)

C>p				
Enzim	K_m (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)x10 ³	Rel. (k_{cat}/K_m) (%) ^a
PE3	0.97	38.2	39.38	70.6
PE5	0.78	41.1	52.69	93.3
PE3I1	1.61	70.0	43.47	77.0
PE3I2	1.43	66.2	46.29	82.0
PI5	1.50	54.4	36.27	64.2
PM5	0.48	27.1	56.46	100

Poli(C)				
Enzim	K_m (mg/ml)	$V_{m\grave{a}x}/[E_0]$ ^b	Rel. $V_{m\grave{a}x}/[E_0]/K_m$	Rel. ($V_{m\grave{a}x}/[E_0]/K_m$) (%) ^c
PE3	0.77	87.8	114.05	78.0
PE5	1.28	115.0	89.85	61.4
PE3I1	0.98	101.8	103.86	71.0
PE3I2	0.69	52.2	75.65	51.7
PI5	0.32	30.2	94.34	64.5
PM5	1.29	188.6	146.22	100

^a Els valors de (k_{cat}/K_m) es referencien sempre al valor de PM5, considerat com a 100 %.

^b $[E_0]$ és la concentració final d'enzim a l'assaig, que ha estat sempre de 5 nM.

^c El valor de $V_{m\grave{a}x}/[E_0]/K_m$ per a PM5 es refereix com a 100 %.

3.9. Anàlisi de la termoestabilitat

Un altre dels requeriments necessaris per tal que una ribonucleasa presenti propietats tòxiques, consisteix en la preservació de la seva estructura nativa a temperatura fisiològica. Les ribonucleases han de conservar un nivell d'estructuració conformacional suficient que els permeti realitzar la seva activitat catalítica, imprescindible per a la citotoxicitat, a l'interior de la cèl·lula.

Els experiments de desnaturalització tèrmica seguits per espectroscòpia d'absorció a l'ultraviolat, mostren que totes les variants presenten una disminució del seu valor de $T_{1/2}$ (que és el punt mig de la transició de desnaturalització tèrmica) respecte PM5. Els resultats es presenten a la TAULA 3.6. Les variants més afectades han estat PE3I2,

3. Resultats i Discussió

PE5 i PI5, que presenten una disminució de $T_{1/2}$ respecte a la parental d'11,4, 12,6 i 17,8°C, respectivament. La variant menys alterada a nivell de termoestabilitat ha estat PE3.

TAULA 3.6.

Paràmetres de termoestabilitat de PM9, PM5 i les seves variants^a

Proteïna	$T_{1/2}$ (°C)	$\Delta T_{1/2}$ ^b (°C)
PE3	53.1	-5.2
PE5	45.7	-12.6
PE3I1	52.0	-6.3
PE3I2	46.9	-11.4
PI5	40.5	-17.8
PM9	51,4	-6,9
PM5	58.3	-

Els errors estàndard per a la determinació de $T_{1/2}$ han estat sempre <1 %.

^a PM9 correspon a l'HP-RNasa salvatge amb una Met N-terminal, tal i com es descriu a la FIGURA 1.6.

^b $\Delta T_{1/2}$ és la diferència entre els valors de $T_{1/2}$ de cadascuna de les variants i el valor de $T_{1/2}$ de PM5.

Tal com s'esmenta a l'APARTAT 1.4.4 de la INTRODUCCIÓ, en la literatura ha estat descrita l'existència d'una correlació entre els valors d'estabilitat i la citotoxicitat de diverses ribonucleases (Klink i Raines, 2000). Segons aquests autors, increments en l'estabilitat dels enzims semblen actuar potenciant la seva citotoxicitat. No obstant això, els resultats obtinguts en aquest treball no mantenen aquesta correspondència, ja que la variant més citotòxica, PE5, és també la segona més afectada a nivell de pèrdua de termoestabilitat, després de PI5.

Així mateix, la baixa termoestabilitat presentada per PI5 ($T_{1/2}$ de 40,5 °C) podria determinar que l'enzim patís una pèrdua important d'estructura a temperatura fisiològica, de manera que els seus motius RGD perdessin la capacitat de ser reconeguts pels receptors d'integrina. Paral·lelament, l'enzim desestructurat seria fàcilment degradat per la cèl·lula abans que pogués exercir la seva acció citotòxica.

3.10. Flexibilitat conformacional de PE3 i PE5

Atès que no s'observà una correlació entre la termoestabilitat i la citotoxicitat en les variants assajades, es va suggerir la possibilitat de que una menor estabilitat actués facilitant la seva translocació al citoplasma, especialment en el cas de PE5. En aquest sentit, l'estudi del procés de translocació d'algunes toxines clàssiques, com la

toxina diftèrica (DT), ha evidenciat que el baix pH del sistema endosomal indueix el desplegament parcial de la toxina, promovent la seva inserció a la bicapa lipídica del compartiment i la seva translocació al citoplasma (Argent *et al.*, 1994; Falnes *et al.*, 1994).

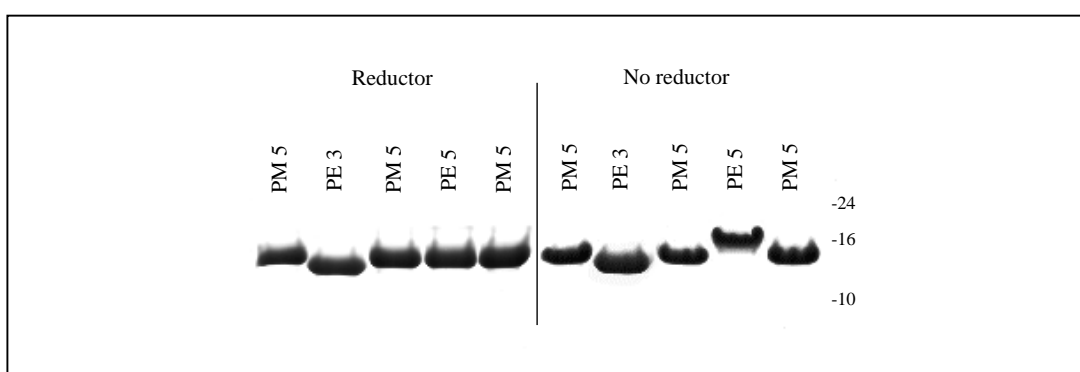
Donat que la baixa intenalització cel·lular (veure APARTAT 3.7) impedia que es pogués dur a terme un assaig directe que mesurés el grau de translocació, es va explorar el grau de compactació de les variants citotòxiques (PE3 i PE5) en relació a PM5, utilitzant dues aproximacions diferents (APARTATS 3.10.1 i 3.10.2).

3.10.1. Anàlisi de la mobilitat electroforètica

La comparació de la mobilitat electroforètica de PE3, PE5 i PM5 en gels de poliacrilamida reductors i no reductors representa una mesura indirecta de llur grau d'empaquetament. En gels no reductors, les proteïnes menys compactes migren més lentament, mentre que en gels reductors aquest alentiment en la migració pràcticament no és detectable (Falnes *et al.*, 1994; Voulhoux *et al.*, 2000).

A la FIGURA 3.16 es presenta l'anàlisi electroforètica de les proteïnes en estudi en condicions reductores i no reductores. S'observa que PE3 presenta la mateixa mobilitat que PM5 (control) tant en el gel reductor com en el no reductor, fet que suggereix que les dues proteïnes tenen un nivell d'empaquetament similar. Pel que fa a PE5, malgrat que la seva migració és idèntica a la de PM5 en condicions reductores, en condicions no reductores mostra un retard evident en relació a la seva parental, indicant que està menys empaquetat.

FIGURA 3.16.



Anàlisi de la conformació de PM5, PE3 i PE5 per SDS-PAGE. Les variants es van separar en gels tricina SDS-PAGE (12,5 % acrilamida) en condicions reductores i no reductores. A la dreta del gel s'indiquen les masses moleculars de marcadors estàndard (kDa).

3.10.2. Anàlisi de resistència a la degradació per termolisina

L'anàlisi de la sensibilitat d'una proteïna a la proteòlisi proporciona també una mesura indirecta del seu grau d'empaquetament. Així, els enzims PM5, PE3 i PE5 es van digerir amb concentracions creixents de termolisina, a pH 7,2. L'avantatge de la termolisina és que és que exerceix la seva activitat hidrolítica pel cantó N-terminal de residus hidrofòbics (de Kreij *et al.*, 2001), els quals no han estat alterats en cap de les tres ribonucleases objecte d'estudi. Així doncs, diferències de sensibilitat de les variants enfront d'aquesta proteasa no seran degudes a les substitucions aminoacídiques que els enzims contenen.

Els resultats presentats a la FIGURA 3.17 mostren que PE5 és 100 vegades més sensible a la digestió per termolisina que el control PM5 (el 50 % de digestió de PE5 s'assoleix a 1 µg/ml de termolisina, mentre que el 50 % de digestió de PM5 s'assoleix a >100 µg/ml). Aquestes dades confirmen el menor empaquetament de PE5 en relació a PM5. Així doncs, tant les dades de termostabilitat (TAULA 3.6), com les anàlisis de mobilitat electroforètica (FIGURA 3.16) i de sensibilitat a proteasa (FIGURA 3.17) evidencien que PE5 presenta un menor empaquetament en relació al control PM5.

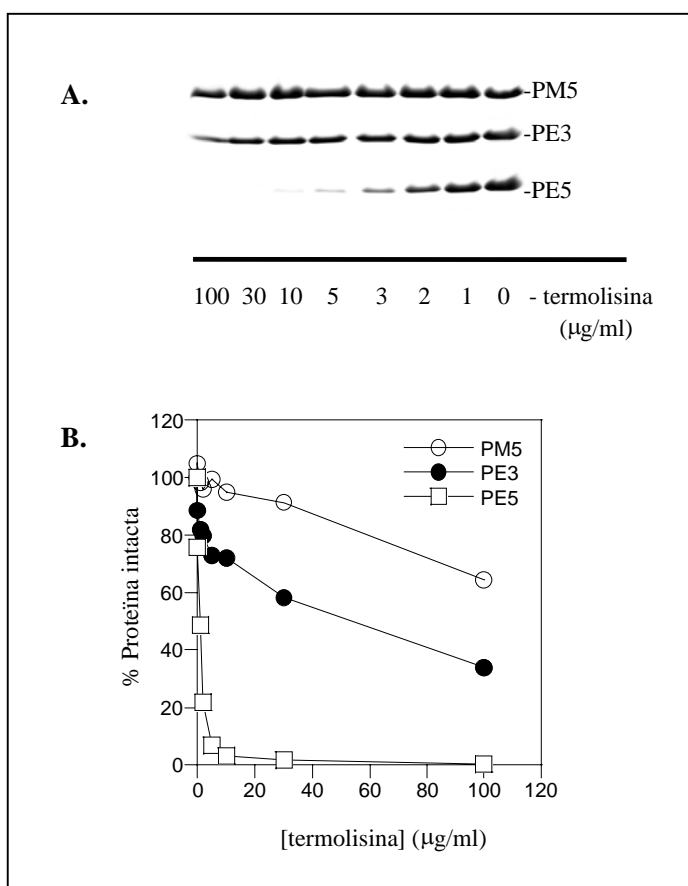


FIGURA 3.17.

Sensibilitat de PM5, PE3 i PE5 a la digestió amb termolisina.

Les ribonucleases es van digerir durant 30 min a 43°C a les concentracions de termolisina indicades (µg/ml), abans de ser analitzades en gels de tricina SDS-PAGE. **A.** Gels tenyits amb blau de Coomassie. **B.** Quantificació dels gels (els resultats corresponen a la mitja de dos assajos). La intensitat de la banda corresponent a la mostra no tractada es considera com a 100 % per a cada ribonucleasa.

PE3 va mostrar una sensibilitat només 2-3 vegades més elevada per la termolisina que PM5 (el 50 % de digestió de PE3 s'assoleix a $\approx 50 \mu\text{g/ml}$ de termolisina). Tant les dades de desnaturalització tèrmica, com la seva susceptibilitat a la termolisina, indiquen que PE3 presenta també un cert grau de desestructuració. Aquesta lleugera diferència enfront PM5 probablement explica el perquè no es detecten signes de desplegament de PE3 per SDS/PAGE, que és la tècnica menys sensible i la menys quantificable entre les que s'han utilitzat en aquest apartat.

El conjunt de resultats presentats en aquest apartat, juntament amb les dades de termoestabilitat, evidencien que PE5 presenta una flexibilitat conformacional major que la presentada per la proteïna parental (PM5). Aquest fet suggereix que la toxicitat de PE5 podria el resultat, almenys en part, d'una major capacitat de translocació a través de les membranes, la qual cosa permetria l'arribada al citoplasma d'una major quantitat d'enzim.

3.11. Citotoxicitat en presència de drogues disruptores de les vies de trànsit intracel·lular

Donat que no s'observaren diferències en l'eficiència d'internalització de la variant citotòxica (PE5) respecte a les no tòxiques (PM5 i PI5), es va plantejar la possibilitat de que la toxicitat de PE5 fos el resultat de la utilització per part d'aquest enzim d'una via d'endocitosi diferent a la de la resta de variants, la qual afavorís la seva translocació al citoplasma.

Una manera indirecta de determinar quina és la via de transport que segueix una ribonucleasa citotòxica és la determinació de diferències en la inhibició de la síntesi proteica de cèl·lules incubades amb aquest enzim, quan les vies de transport es bloquegen a diferents nivells. Amb aquest objectiu s'han utilitzat drogues que afecten més o menys específicament compartiments intracel·lulars involucrats en les vies de transport efectives d'una toxina. Així, s'ha analitzat l'efecte citotòxic sobre cèl·lules A431 de les nostres variants en presència de les següents drogues: monensina, un ionòfor carboxílic; NH_4Cl , una base feble; bafilomicina A_1 , un inhibidor específic de la bomba ATPasa vacuolar; brefeldina A, un metabòlit fúngic que actua disgregant l'AG i inhibint les vies de síntesi/secreció de proteïnes; i àcid retinoic, que actua disgregant l'AG. Aquesta anàlisi es va realitzar per les dues variants citotòxiques (PE3 i PE5), per una de les variants que escapa a l'acció de l'hRI però que no és citotòxica (PE3I1), i pels controls PM5 i onconasa. Els efectes coneguts més importants d'aquestes drogues sobre les vies de trànsit intracel·lular, es presenten resumits a la TAULA 3.7.

En aquests assajos s'ha inclòs la ricina com a control de l'efecte de les drogues. Es tracta d'una toxina d'origen vegetal que actua inhibint la síntesi de proteïnes, i de la qual es té un extens coneixement de les vies de trànsit que emprèn una vegada internalitzada. La seva citotoxicitat es basa en un primer pas d'endocitosi i un segon

3. Resultats i Discussió

pas de translocació del domini enzimàticament actiu al citoplasma, on la toxina actua com a adenosina N-glicosidasa, inutilitzant al 28S-rRNA i inhibint així la síntesi proteica (Olsnes *et al.*, 1988). Se suggereix que el procés de translocació de la ricina es pot produir en diversos compartiments: els endosomes (Beaumelle *et al.*, 1993), el TGN (Bilge *et al.*, 1995) i el reticle endoplasmàtic (Sandvig i van Deurs, 1999). Aquesta toxina s'ha utilitzat tant per analitzar els diferents tipus d'endocitosi, com per estudiar vies de transport amb destinacions tan diverses com l'AG, el reticle endoplasmàtic i el sistema endocític (Rapak *et al.*, 1997; Sandvig i van Deurs, 1996).

TAULA 3.7.

Principals efectes de les drogues utilitzades en aquest treball sobre les vies de trànsit intracel·lular.

Droga	Principals efectes intracel·lulars		
	Neutralització del pH endosomal	Disrupció del trànsit endosomal	Disrupció de l'AG
Monensina	√	√ ^a	√ ^b
NH ₄ Cl	√	√ ^a	
Bafilomicina A ₁	√	√ ^a	
Brefeldina A		√ ^c	√ ^c
Àcid retinoic			√

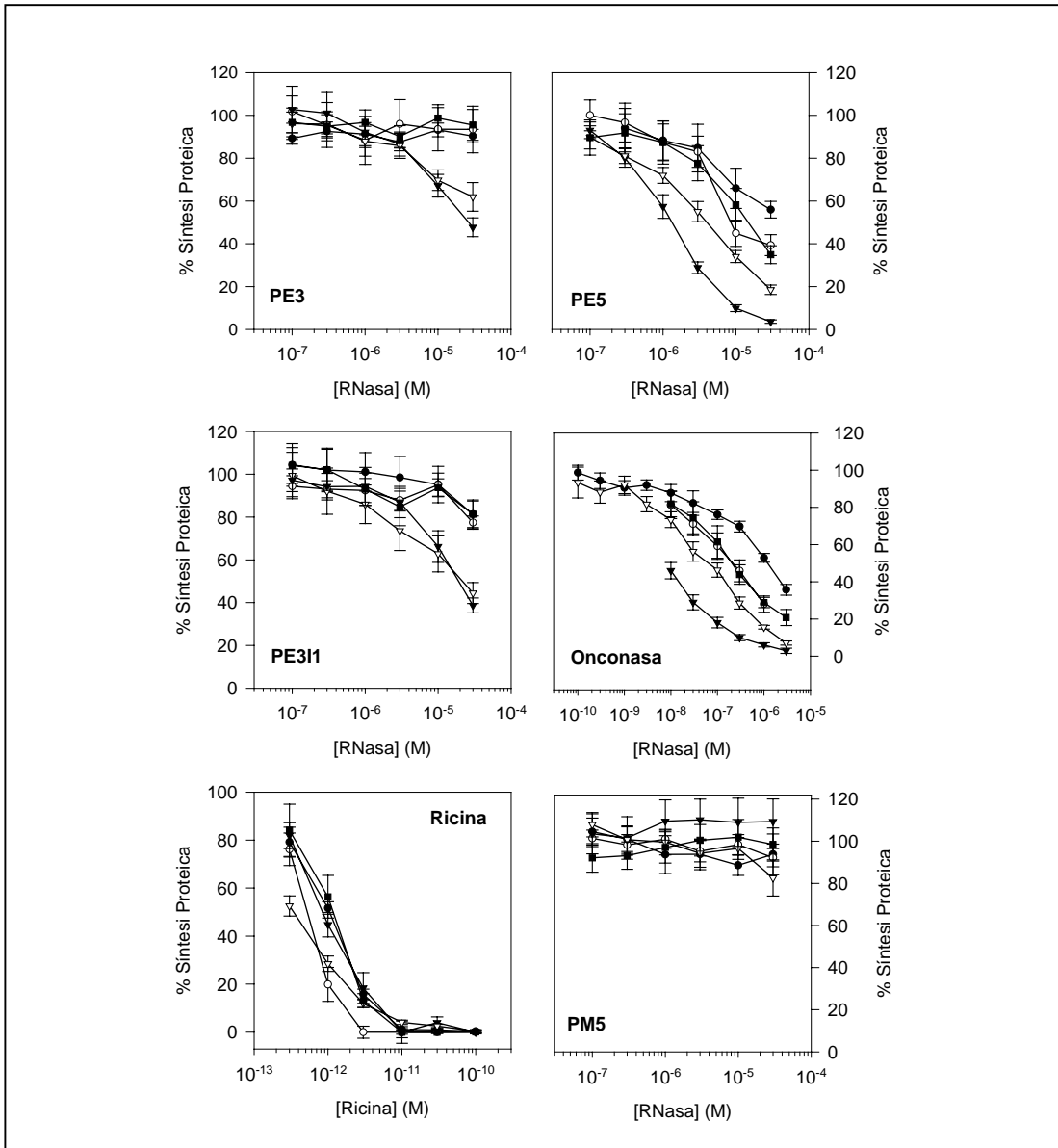
^a Efecte degut a la pèrdua del gradient de pH àcidic en el lumen endosomal.

^b Efecte poc específic. L'acció ionòfora de la monensina provoca l'inflament de tots els compartiments vesiculars de la cèl·lula, entre els quals es troben les cisternes de l'AG (Wu, 1997).

^c Efecte molt específic i reversible. La brefeldina A inactiva la proteïna ARF1, impedit la formació dels mantells de COPI. Una primera conseqüència directa és el bloqueig del transport vesicular del reticle endoplasmàtic a l'AG, però no del transport en sentit invers, de manera que l'AG es desorganitza i es col·lapsa. Una segona conseqüència és el bloqueig de la gemmació de vesícules a partir dels ECV/MVBs, dificultant el trànsit als lisosomes (Gu i Gruenberg, 2000).

A la FIGURA 3.18 es comparen els percentatges de síntesi proteica de les variants PE3, PE5, PE3I1, de l'onconasa i de la ricina després d'una incubació de 48 h en presència de diferents drogues: monensina 0,5 µM, NH₄Cl 20 mM, bafilomicina A₁ 0,1 µM i brefeldina A 18 nM, sempre en relació al control sense droga. El tractament amb àcid retinoic 10 µM es va realitzar per a totes les variants, però no es representa a la figura a fi de simplificar-ne la lectura, donat que no va mostrar activitat en cap dels casos.

FIGURA 3.18.



Inhibició de la síntesi proteica per acció de les ribonucleases en presència de drogues. Acció de les variants de l'HP-RNasa, l'onconasa i la ricina en cèl·lules A431 incubades en presència de monensina 0,5 μ M, NH₄Cl 20 mM, bafilomicina A₁ 0,1 μ M i brefeldina A 18 nM. Sobre un cultiu de cèl·lules A431, es van afegir les drogues al medi 45 min abans de l'addició de les concentracions adients de ribonuclease, i es va procedir a una incubació de 48 hores. La inhibició de la síntesi proteica es va mesurar per mitjà de la monitorització de la incorporació de [³⁵S]-metionina a les proteïnes de nova síntesi. Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard obtinguda per cada conjunt d'experiments. Control (●), monensina (○), bafilomicina A₁ (▼), brefeldina A (▽) i NH₄Cl (■).

La concentració de treball de cadascuna de les drogues es va determinar en un assaig previ sense ribonucleasa, i es va seleccionar en base al valor de concentració de droga que provocava aproximadament el 50 % d'inhibició de la síntesi proteica, en incubacions de 48 h. La reducció del temps d'incubació, de 96 h a 48 h va ser necessària ja que la realització de cinètiques al llarg del temps va mostrar que incubacions superiors a 48 h en presència de diverses concentracions de droga, provocaven una amplificació excessiva de la seva citotoxicitat, per la qual cosa calia reduir la seva concentració si es volia mantenir el 50 % de viabilitat cel·lular (dades no mostrades). A concentracions massa reduïdes, l'efecte de les drogues sobre el sistema de transport intracel·lular deixa de ser l'esperat. Realitzant incubacions de 48 h, les concentracions de droga que provocaven el 50 % de la inhibició de la síntesi proteica estan incloses dins dels marges de concentració descrits en la literatura per als estudis de trànsit intracel·lular.

A la TAULA 3.8 es mostren els valors d'IC₅₀ de les proteïnes analitzades en presència de les diverses drogues estudiades i en referència al control sense droga.

TAULA 3.8

Valors d'IC₅₀ de les diverses variants de l'HP-RNasa, l'onconasa i la ricina.

Tractament	Valor IC ₅₀ (µM)					
	PM5	PE3	PE3I1	PE5	Onconasa	Ricina
Control	> 30	> 30	> 30	30	1	10 ⁻⁶
monensina 0,5 µM	> 30	> 30	> 30	10	0,2	5·10 ⁻⁷
NH ₄ Cl 20 mM	> 30	> 30	∅	10	0,2	∅
bafilomicina A ₁ 0,1 µM	> 30	30	20	1	0,01	10 ⁻⁶
brefeldina A 18 nM	> 30	30-100	20	3	0,03	3·10 ⁻⁷
àcid retinoic 10 µM	> 30	> 30	> 30	30	1	10 ⁻⁶

∅: no mesurat

3.11.1. Acció de la monensina

L'acidificació dels compartiments endosomals té un paper essencial en el trànsit vesicular, així com en les vies de transport i de degradació de proteïnes (Yoshimori *et al.*, 1991). Així mateix, el gradient de pH és també necessari per a que un gran nombre de virus i toxines puguin translocar dels endosomes al citoplasma. A fi d'estudiar les implicacions del gradient acídic sobre la toxicitat de les ribonucleases,

es va utilitzar la monensina, un agent que actua incrementant el pH dels sistemes vesiculars àcids.

La monensina és un ionòfor carboxílic capaç d'unir ions Na^+ , K^+ i H^+ (Mollenhauer *et al.*, 1990). Gràcies a la seva natura lipofílica, s'insereix a les membranes cel·lulars, des d'on exerceix el seu efecte tòxic per mitjà del transport de cations monovalents a través de la bicapa (Henderson *et al.*, 1969; Shavit *et al.*, 1970). La droga facilita l'intercanvi transmembranar principalment d'ions Na^+ citoplasmàtics per H^+ provinents del lumen del compartiment membranós (Tartakoff, 1983). Una conseqüència directa d'aquest intercanvi és la neutralització dels compartiments intracel·lulars àcids, provocant el bloqueig de la via lisosomal de degradació proteica, una disminució del reciclatge dels receptors endocitats i la disrupció del TGN sense alterar, però la internalització (Mollenhauer *et al.*, 1990). Alhora, la monensina provoca la vacuolització de les cisternes de l'AG i dels endosomes, per efecte d'un flux d'entrada d'aigua que equilibra l'augment de la pressió osmòtica resultant de l'increment de concentració de ions Na^+ (Mollenhauer *et al.*, 1990). Això resulta en la inhibició dels processos de glicosilació i de proteòlisi que es produeixen en fases tardanes en l'AG, tot i que no bloqueja la secreció.

Els resultats que es mostren a la FIGURA 3.18 evidencien que la monensina (0,5 μM) té un efecte potenciador en la toxicitat de la ricina, ja que la droga duplica la sensibilitat de les cèl·lules A431 per la toxina. Aquest resultat és consistent amb les dades descrites a la literatura per a dosis similars de monensina (~0,01-0,1 μM). En aquests treballs, la monensina modifica la funcionalitat dels sistemes endosomal/AG sense alterar-ne dràsticament el pH (Sandvig i Olsnes, 1982a; Sandvig i Olsnes, 1982b; van Deurs *et al.*, 1986). Segons els autors, l'efecte de la monensina sobre la toxicitat de la ricina suggereix que l'AG podria estar implicat en la via de transport efectiva que condueix la toxina al citoplasma.

La monensina (0,5 μM) exerceix també un lleu efecte potenciador en la citotoxicitat de la variant PE5 i de l'onconasa, ja que s'observa una disminució del valor d' IC_{50} de 3 i 5 vegades, respectivament (TAULA 3.8). Aquest resultat sembla indicar que o bé la disrupció de l'AG i/o la reducció del gradient àcid intravesicular potencien el trànsit d'aquestes proteïnes cap al compartiment on exerceixen la seva citotoxicitat. En canvi, els nivells de síntesi proteica de les variants que no són tòxiques en aquesta línia cel·lular (PM5, PE3 i PE3I1) no han estat alterats per la droga, almenys en les condicions de l'assaig.

Per intentar correlacionar el lleuger augment de citotoxicitat de PE5 i de l'onconasa per efecte de la droga, amb l'increment de pH endosomal que aquesta provoca, es va dur a terme la determinació d'aquest pH en cèl·lules A431 incubades en presència de monensina 0,25 μM durant 24 h. La concentració de droga es va reduir a la meitat ja que el temps d'incubació va passar de 48 a 24 h. Els resultats obtinguts van mostrar que la monensina 0,25 μM provocava un increment de pH en lumen dels RE de 5,2 a 6,5. Així doncs, tot i reduir significativament el gradient àcid, la droga no aconseguia neutralitzar totalment el pH d'aquest compartiment.

En treballs previs s'ha descrit l'efecte de la monensina sobre la citotoxicitat de diferents ribonucleases citotòxiques en diverses línies cel·lulars. Així, es va comprovar que l'addició de monensina 0,1 μM en cèl·lules SVT2 tenia un efecte modest sobre la citotoxicitat induïda per la BS-RNasa (Bracale *et al.*, 2002). Respecte l'onconasa, varis autors han descrit per la monensina un efecte potenciador de la seva citotoxicitat, incrementant-la de 2 a 20 vegades en funció de la concentració de droga i de la línia cel·lular utilitzada (Haigis i Raines, 2003; Newton *et al.*, 1998; Newton *et al.*, 2001b; Wu *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1995).

Estudis recents indiquen que la monensina (10 μM) potencia l'efecte tòxic de l'onconasa unes 10 vegades sobre la línia cel·lular K562, sense afectar però, la toxicitat d'una variant tòxica de l'RNasa A (Gly88Arg RNasa A) (Haigis i Raines, 2003). Aquesta observació, juntament amb la resta d'evidències presentades en l'esmentat treball, va conduir als autors a afirmar que la internalització d'ambdues proteïnes és independent del pH endosomal, donat que la neutralització del gradient de pH provocada pel tractament amb monensina no actua negativament sobre la toxicitat de les dues ribonucleases. Els autors argumenten també, que l'efecte potenciador de la monensina sobre la toxicitat de l'onconasa podria ser conseqüència de les modificacions que la droga provoca sobre la ruta de trànsit intracel·lular que segueix l'enzim. Així, suggereixen que el bloqueig del transport de l'onconasa a través de l'AG causat per la monensina, afavoriria que l'onconasa seguís una altra ruta de transport, que la conduiria a un compartiment des del qual la translocació a citoplasma es veïés afavorida. El fet que la droga no afecti la citotoxicitat de la variant Gly88Arg-RNasa A suggeriria que aquesta no és conduïda en cap moment a través de l'AG.

Tot i la gran quantitat d'informació descrita en la literatura sobre aquesta droga, cal ser prudent a l'hora d'interpretar les seves repercussions sobre la toxicitat de les ribonucleases, ja que els efectes cel·lulars de la monensina són molt poc específics. Així mateix, els mecanismes moleculars de les vies de transport són complexes, i la modificació d'un paràmetre pot tenir efectes diversos a diferents nivells. El tipus cel·lular, la concentració de monensina i altres factors poden afectar els resultats obtinguts. Així doncs, per a la interpretació d'aquestes dades cal l'anàlisi en paral·lel d'altres drogues, que aportin informació complementària.

3.11.2. Acció del NH_4Cl

El NH_4Cl és una base feble que s'utilitza també correntment per incrementar el pH dels compartiments àcids. Aquesta droga, a pH fisiològic no està protonada i difon lliurement a través de les membranes fins a l'interior dels compartiments endosomals, on el baix pH provoca la seva protonació i impedeix que difonguin de nou a l'exterior. El segrest de protons per part de la base feble té com a conseqüència indirecta la neutralització del pH endosomal, provocant el bloqueig de la via de degradació lisosomal i una disminució del reciclatge de receptors a superfície cel·lular (Wu, 1997).

La incubació de cèl·lules A431 en presència d'aquest agent provoca un augment de la toxicitat de PE5 i de l'onconasa idèntic a l'obtingut per la monensina (veure FIGURA 3.18 i TAULA 3.8). El fet que les alteracions en el gradient de pH generades per aquestes dues drogues provoquen canvis similars en la toxicitat de PE5 i de l'onconasa, suggereix que el transport d'ambdós enzims al citoplasma és probablement independent del manteniment d'un pH baix en el sistema endosomal, almenys en aquesta línia cel·lular. En el cas de PM5 i PE3, l'addició de NH_4Cl 20 mM tampoc altera el percentatge de síntesi proteica.

La determinació del pH en cèl·lules A431 incubades en presència de NH_4Cl 20 mM durant 24 h va mostrar un increment de pH en lumen dels RE de 5,2 a 5,6. Aquest resultat indica que aquest agent és menys eficaç a fi de neutralitzar el pH endosomal que la monensina 0,25 μM . No obstant aquesta menor eficiència, l'acció de la droga sobre la citotoxicitat de PE5 i de l'onconasa és pràcticament la mateixa que la de la monensina.

D'acord amb els nostres resultats, el treball de Newton *et al.* (1998) mostra per a l'onconasa un increment de citotoxicitat de 3,8 vegades, sobre cèl·lules SF539 tractades amb NH_4Cl 10 mM. Tanmateix, Haigis i Raines (2003) no detecten variacions en la citotoxicitat de l'onconasa ni de la variant Gly88Arg-RNasa A en cèl·lules K562 incubades amb NH_4Cl 20 i 30 mM. Segons aquests autors, els resultats indiquen que per a aquesta línia cel·lular, la translocació de les dues proteïnes no es és depenent del gradient de pH endosomal, donat que alteracions en aquest no en modifiquen la toxicitat dels enzims.

3.11.3. Acció de la bafilomicina A_1

La bafilomicina A_1 és un antibiòtic que inhibeix específicament l'acció de la bomba v-ATPasa responsable d'establir i mantenir el gradient de pH en els compartiments endo i exocítics, per mitjà de la seva fixació en el domini transmembranar d'aquesta (Crider *et al.*, 1994; Harada *et al.*, 1997). Aquesta acció específica té com a conseqüència directa la neutralització del pH dels compartiments acídics. En la cèl·lula, aquesta neutralització pot desencadenar processos tals com (i) la inhibició de la dissociació dels complexos lligand/receptor internalitzats (Harada *et al.*, 1997); (ii) alteracions en el trànsit de proteïnes transmembrana (Presley *et al.*, 1997); (iii) inhibició de la formació d'ECV/MVBs a partir dels SE (Clague *et al.*, 1994); (iv) inhibició de la fusió LE/lisosomes (van Weert *et al.*, 1995), (v) inhibició de l'activitat de les hidrolases lisosomals i (vi) fragmentació dels EE (D'Arrigo *et al.*, 1997). Tots aquests efectes secundaris varien en funció del tipus cel·lular.

La monensina i el NH_4Cl alteren també el pH endosomal però, a diferència de la bafilomicina A_1 , ho fan de forma més inespecífica, provocant a més a més la distensió de les estructures membranals intracel·lulars, fet que modifica el trànsit d'una manera que no necessàriament és conseqüència directa de la seva acció sobre el pH.

La bafilomicina A₁ és una droga molt utilitzada en biologia cel·lular per tal de comprovar la implicació del compartiment endosomal en el trànsit intracel·lular de les molècules. Per una banda permet estudiar la relació entre la translocació de toxines i el baix pH vesicular. Per l'altra, la reducció del transport als lisosomes posa de manifest la implicació de la ruta de degradació lisosomal de les proteïnes en l'activitat de les toxines. Cal tenir en compte que, en funció del tipus cel·lular utilitzat, la bafilomicina A₁ actua sobre el trànsit endosomal a nivell dels EE o bé dels LE (Bayer *et al.*, 1998; Clague *et al.*, 1994; van Deurs *et al.*, 1996). En el cas de la línia A431, s'ha descrit que aquesta droga, tot i no inhibir totalment el trànsit vesicular cap als lisosomes, sí que impedeix l'acció hidrolítica dels enzims degradatius per efecte de la neutralització del pH (Yoshimori *et al.*, 1991).

Tal i com s'observa a la FIGURA 3.18 per cèl·lules A431, la inhibició de l'acidificació endosomal provocada per la bafilomicina A₁ no presenta cap efecte significatiu sobre la toxicitat de la ricina. Aquest resultat és consistent amb el descrit prèviament a la literatura (Sandvig *et al.*, 2002; Sandvig i van Deurs, 2002). S'ha suggerit que la via de transport efectiva de la ricina és independent del pH, ja que implica el pas dels SE al TGN i el transport retrògrad des de l'AG al reticle endoplasmàtic. Així doncs, alteracions en el pH endosomal per efecte de la bafilomicina A₁ no haurien d'alterar la translocació de la ricina, tal i com evidencien els presents resultats.

A la mateixa figura s'observa que la bafilomicina A₁ és la droga amb l'efecte més significatiu sobre la citotoxicitat de l'onconasa i de totes les variants de l'HP-RNasa (veure TAULA 3.8). El valor d'IC₅₀ de la variant PE5 disminueix unes 30 vegades respecte al tractament sense bafilomicina A₁, mentre que la citotoxicitat de l'onconasa és potenciada unes 100 vegades per efecte de la droga. Pel que fa a les variants que no eren citotòxiques a les concentracions d'enzim assajades, PE3 i PE3II, el tractament amb la bafilomicina A₁ va permetre la determinació del valor d'IC₅₀, essent aquest de 30 i 20 µM respectivament.

L'anàlisi de l'increment de pH endosomal per efecte de la bafilomicina A₁ va mostrar que aquesta és la droga més efectiva a nivell de neutralització del lumen dels RE. Els resultats obtinguts mostren que a una concentració de 0,1 µM, el pH dels compartiments endosomals primaris resulta completament neutralitzat, passant de pH 5,2 a 7,0. A una concentració de 50 nM, l'efecte de la bafilomicina A₁ és lleugerament menys eficaç, obtenint-se un valor de pH de 6,4.

Així doncs, la potenciació de la citotoxicitat de les ribonucleases sembla estar directament relacionada amb la neutralització del pH endosomal. La droga més eficient en aquest aspecte, la bafilomicina A₁, és la que exerceix l'efecte potenciador de la citotoxicitat més important, mentre que el NH₄Cl i la monensina, que no arriben a neutralitzar el pH, promouen una potenciació molt menor. Aquests resultats indiquen que les ribonucleases objecte d'estudi en el present treball emprenen la via de trànsit endosomal, per ser conduïdes finalment al citoplasma.

L'efecte potenciador de la bafilomicina A₁ en la citotoxicitat de les variants estudiades pot tenir dos orígens. En primer lloc, el fet de disminuir el transport a lisosomes reduiria la degradació de les molècules de ribonucleasa internalitzades, permetent d'aquesta manera que un major nombre d'unitats transloquessin correctament al citoplasma. En segon lloc, la inhibició de les hidrolases lisosomals per efecte de la neutralització del pH podria impedir la degradació de les ribonucleases que hi són enviades, afavorint així la seva translocació.

El conjunt de resultats obtinguts fins al moment, juntament amb les dades descrites a la bibliografia, semblen indicar que les ribonucleases internalitzades segueixen una via de trànsit intracel·lular que és independent del manteniment d'un gradient decreixent de pH.

3.11.4. Acció de la brefeldina A

La brefeldina A és un metabòlit d'origen fúngic que, de manera específica i reversible, bloqueja el transport vesicular des del reticle endoplasmàtic a l'AG en diversos tipus cel·lulars, com a conseqüència de la inhibició de la proteïna ARF1 (*ADP-ribosylation factor*), la qual és necessària per a l'organització dels mantells de COPI en les vesícules de transport de l'AG (Donaldson *et al.*, 1991; Helms i Rothman, 1992).

Donat que el transport retrògrad no és alterat, el tractament amb aquesta droga acaba provocant el col·lapse i la desorganització de les cisternes de l'AG i la redistribució del seu contingut membranar i luminal cap al RE i l'embolcall nuclear (Doms *et al.*, 1989; Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989). Aquesta acció sobre l'AG provoca la inhibició de la via secretora en la cèl·lula (Klausner *et al.*, 1992), tot i que existeixen evidències de què el TGN, si bé perd la seva posició perinuclear, roman funcional i estructuralment intacte (Chege i Pfeffer, 1990; Doms *et al.*, 1989; Sandvig *et al.*, 1991).

A la vegada, però de manera més subtil, la brefeldina A actua a nivell del sistema membranar endocític alterant la morfologia dels compartiments vesiculars, que adopten una estructura tubular i dispersa en forma de xarxa (Hunziker *et al.*, 1991; Hunziker *et al.*, 1992; Pelham, 1991; Strous *et al.*, 1993). Malgrat que això modifica tots els elements de la via endocítica, incloent els lisosomes, Strous *et al.* (1993) afirmen que no es produeixen alteracions ni en la internalització ni en les vies de transport que condueixen a la degradació lisosomal. Contràriament, Misumi *et al.* (1986) sostenen que els nivells de degradació lisosomal en les cèl·lules tractades amb brefeldina A són un 20 % inferiors al de les cèl·lules no tractades. Confirmant aquest resultat, Lippincott-Schwartz *et al.* (1991) mantenen que el material endocitat no assoleix els lisosomes en presència de brefeldina A, com a conseqüència d'un bloqueig en el transport produït a nivell dels endosomes, per la fusió dels SE amb el TGN i la membrana plasmàtica.

Així doncs, el patró de modificacions estructurals provocat per la brefeldina A és molt variable en funció dels models utilitzats. Aquesta diversitat d'accions ha estat també posada en evidència en estudis de trànsit intracel·lular utilitzant la ricina com a marcadora d'endocitosi. Tal i com s'ha comentat anteriorment, la translocació de la ricina al citoplasma es pot produir en diversos compartiments: els endosomes (Beaumelle *et al.*, 1993), el TGN (Bilge *et al.*, 1995) i el reticle endoplasmàtic (Sandvig i van Deurs, 1999). Per aquesta raó, malgrat que la brefeldina A protegeix la majoria de línies cel·lulars de l'acció de la ricina, perquè bloqueja el transport al reticle endoplasmàtic (Hudson i Grillo, 1991), en alguns casos es produeix una sensibilització (Sandvig *et al.*, 1991), possiblement per l'efecte de la brefeldina A sobre els altres compartiments implicats en la translocació.

A la FIGURA 3.18 s'observa que la brefeldina A té un efecte potenciador significatiu sobre la toxicitat de la ricina, essent necessària una concentració 3-4 vegades inferior de toxina per provocar una inhibició del 50 % síntesi proteica en relació amb les cèl·lules no tractades amb brefeldina A. Aquests resultats són idèntics als descrits per Sandvig *et al.* (1991) per les línies MDCK i PtK2, i indiquen que la inhibició de la via de transport retrògrada no actua negativament sobre la toxicitat de la ricina en aquesta línia cel·lular. Així mateix, l'efecte potenciador en la toxicitat suggereix que la inhibició de la via de degradació lisosomal i l'acumulació de la toxina en el TGN podrien afavorir la translocació d'un major nombre de molècules al citoplasma, incrementant així la toxicitat, malgrat que el transport a reticle endoplasmàtic hagi estat bloquejat.

Pel que fa a les variants de l'HP-RNasa i l'onconasa, el tractament amb brefeldina A 18 nM augmenta lleugerament la seva toxicitat en tots els casos (FIGURA 3.18 i TAULA 3.8). Els valors d'IC₅₀ de PE5 i de l'onconasa disminueixen 10 i 33 vegades, respectivament, en presència de la droga. Les variants PE3 i PE3I1, que no són tòxiques sobre la línia A431 en absència de la droga, passen a exhibir valors d'IC₅₀ de 30 i 20 µM, respectivament, en el tractament amb brefeldina A. La brefeldina A (18 nM) és la segona droga (després de la bafilomicina A₁ 0,1 µM) més potent a l'hora de d'incrementar la toxicitat de les ribonucleases assajades.

Aquests resultats semblen mostrar que la via de transport retrògrada no és un component essencial per a la translocació de les ribonucleases al citoplasma, ja que la disrupció de l'AG no afecta negativament a la seva toxicitat. Així mateix, considerant l'enorme versatilitat d'accions de la brefeldina A i els resultats obtinguts amb les altres drogues (monensina, NH₄Cl i bafilomicina A₁), se suggereix que l'increment de citotoxicitat de les ribonucleases per efecte de la brefeldina A podria ser conseqüència d'alteracions en el sistema endosomal, possiblement d'una certa inhibició del trànsit a lisosomes, d'acord amb les referències prèvies descrites per Lippincott-Schwartz *et al.* (1991).

Wu *et al.* (1993, 1995), en cèl·lules de glioma 9L incubades amb brefeldina A 14-18 µM, no van observar canvis en la citotoxicitat de l'onconasa ni de la BS-RNasa, però sí una inhibició de la potenciació produïda per l'àcid retinoic (10 µM) sobre la seva citotoxicitat. Els autors van afirmar que tant l'onconasa com la BS-RNasa

assolien el citoplasma a nivell d'un compartiment insensible a la brefeldina A, o sigui, que no involucrava ni al reticle endoplasmàtic ni a l'AG. Tanmateix, l'efecte potenciador de l'àcid retinoic en la citotoxicitat d'aquestes ribonucleases s'explicaria pel fet que aquesta droga actua modificant la seva via de transport, direccionant als enzims cap a un AG desorganitzat des d'on seria afavorida la seva translocació al citoplasma. L'addició de brefeldina A en cèl·lules tractades amb àcid retinoic impediria que les ribonucleases assolissin els compartiments de la via secretora, neutralitzant d'aquesta manera l'efecte potenciador de l'àcid retinoic. Aquestes dades es van confirmar, per a l'onconasa, en treballs posteriors de Newton *et al.* (1998) en cèl·lules de glioma humà SF539, i de Boix *et al.* (1996) en cèl·lules de glioma humà U251.

En contraposició, Bracale *et al.* (2002) han descrit un efecte potenciador de la brefeldina A (0,7 μM) en la citotoxicitat de la BS-RNasa, en cèl·lules de fibroblasts 3T3-SVT2 malignes. Segons els autors, l'AG està involucrat en les vies de trànsit intracel·lular d'aquesta ribonucleasa. També proposen que la brefeldina A actua reestructurant el sistema vesicular endo i exocític en dos subcompartiments separats: un dels quals comprèn la membrana plasmàtica, els endosomes i el TGN, i l'altre l'AG i el reticle endoplasmàtic. Malgrat que segueixen en funcionament, no es comuniquen entre ells. Així, en presència de brefeldina A, la BS-RNasa s'acumulava a nivell del TGN, des d'on es translocaria al citoplasma. El bloqueig del transport a nivell del TGN per efecte de la brefeldina A afavoriria que un major nombre de molècules de BS-RNasa aconseguissin translocar al citoplasma, determinan un augment en la citotoxicitat de l'enzim.

Recentment Haigis i Raines (2003) han estudiat també la importància de la via retrògrada sobre la toxicitat de l'onconasa i de la variant Gly88Arg RNasa. En estudis de citotoxicitat, van comprovar un efecte potenciador de la brefeldina A (10 μM) d'aproximadament 10 vegades, permetent-los suggerir que el transport retrògrad no és un component essencial en la translocació de les ribonucleases al citoplasma. Aquestes dades estan d'acord amb els resultats obtinguts en el present treball per les diferents variants de l'HP-RNasa assajades.

3.11.5. Acció de l'àcid retinoic

L'àcid retinoic provoca la dispersió reversible de l'AG, el qual passa de la seva localització perinuclear en forma de xarxa, a tenir l'estructura d'un agregat vacuolar difús, similar al que s'observa en cèl·lules tractades amb monensina. D'aquesta manera, l'àcid retinoic altera les vies de trànsit intracel·lular en les que participa aquest compartiment; i actua potenciant la toxicitat de certes immunotoxines, per les quals el bloqueig d'aquesta ruta determina l'establiment d'una via alternativa des de la qual és més probable la translocació al citoplasma (Wu *et al.*, 1993). S'ha demostrat que aquesta potenciació és bloquejada completament per la brefeldina A (Wu *et al.*, 1995).

Tot i la seva acció sobre l'AG, el tractament amb àcid retinoic 10 μM no va alterar la toxicitat de la ricina ni de cap de les ribonucleases estudiades (TAULA 3.8), almenys sobre la línia cel·lular A431 i en les condicions de l'assaig. De manera consistent amb els nostres resultats, Sandvig i Olsnes (1981) van comprovar que l'àcid retinoic (10 μM) no afectava la sensibilitat envers la ricina de les línies cel·lulars HeLa i 2T, tot i que tenia un lleuger efecte protector sobre cèl·lules de la línia Vero, disminuint la sensibilitat per la toxina entre 2 i 5 vegades;

Pel que fa a les ribonucleases, i tal i com ja s'ha introduït a l'APARTAT 3.11.4, Wu *et al.* (1995) van observar que l'àcid retinoic (10 μM) actuava potenciant la toxicitat de l'onconasa i de la BS-RNasa, en cèl·lules de glioma 9L. Segons els autors, la translocació de les ribonucleases al citoplasma era més eficient a través d'un AG desorganitzat, ja que d'aquesta manera se superava la limitació que suposa el pas de l'enzim a través de les membranes. Quan l'àcid retinoic es combinava amb la brefeldina A, que inhibeix el transport retrògrad del *cis* Golgi al reticle endoplasmàtic, la potenciació en l'activitat de l'onconasa era bloquejada. Ara bé, el fet de que la brefeldina A no modifiqués la citotoxicitat de l'onconasa en absència d'àcid retinoic, indicava que la ruta normal de l'enzim era diferent a la que s'induïa en presència de l'àcid retinoic. Aquests resultats, que consideren l'existència de dues rutes alternatives de trànsit de l'onconasa al citoplasma, no són consistents amb les dades obtingudes en el present treball per l'onconasa ni per les variants de l'HP-RNasa, les quals semblen indicar que la via retrògrada no està implicada en la ruta que emprenen aquestes ribonucleases per assolir el citoplasma.

El conjunt de dades obtingudes per les diverses drogues utilitzades evidencien que la translocació al citoplasma de les variants de l'HP-RNasa i l'onconasa no depèn del manteniment d'un gradient de pH acídic en els compartiments endosomals. L'acció potenciadora en la toxicitat de les ribonucleases de les drogues que redueixen o anulen el gradient acídic del compartiment endosomal (monensina, NH_4Cl i bafilomicina A_1), així ho sembla demostrar. Així mateix, la manca d'efecte de l'àcid retinoic i la potenciació de la brefeldina A, dues drogues que disgreguen l'AG, en la toxicitat de les ribonucleases suggereix que el transport retrògrad tampoc és un component essencial en la translocació d'aquests enzims al citoplasma. Pel que fa a l'acció potenciadora de la brefeldina A, un agent amb un ampli espectre d'accions, aquesta es podria justificar probablement per l'acció que aquesta droga presenta sobre el sistema endosomal, reduint el trànsit lisosomal en diverses línies cel·lulars i evitant la degradació dels enzims internalitzats. Per tot això, la translocació de les ribonucleases probablement té lloc en algun punt de la via de trànsit endosomal previ als lisosomes, sense descartar la possible participació del TGN. Finalment, s'ha comprovat que les diferents drogues assajades afecten de la mateixa manera a la citotoxicitat de les variants de l'HP-RNasa i de l'onconasa, suggerint que aquestes proteïnes segueixen camins d'internalització similars.

3.12. Anàlisi del trànsit intracel·lular per microscòpia confocal de fluorescència

Amb la finalitat d'aprofundir en el coneixement de les possibles vies de trànsit intracel·lular seguides per les variants de l'HP-RNasa, i en particular per comprovar si la citotoxicitat de PE5 es podia explicar en base a una ruta específica per aquesta variant, es va aprofundir l'anàlisi del seu trànsit intracel·lular per microscòpia confocal de fluorescència. La internalització d'aquesta variant citotòxica i sensible a l'hRI es va comparar amb la seguida per la proteïna parental PM5 (no citotòxica i també sensible a l'hRI) i amb la seguida per la variant PE3I1, la qual no és citotòxica però sí resisteix l'acció de l'hRI.

El marcatge dels enzims es va realitzar per conjugació química de variants que incorporaven una Cys lliure a l'extrem C-terminal (designades com a PM5cct, PE3I1cct i PE5cct) amb el fluoròfor tiol-reactiu Alexa Fluor 595 C₅. La seva ubicació en l'interior de la cèl·lula es va determinar per mitjà de la colocalització de l'enzim fluorescent amb marcadors específics de diferents orgànuls, per microscòpia confocal de fluorescència i en la línia cel·lular tumoral A431. S'ha utilitzat aquesta línia ja que és sobre la qual s'ha estudiat la citotoxicitat tant en presència com en absència de drogues.

Per construir les variants -cct, la mutagènesi dirigida per oligonucleòtid es va realitzar utilitzant l'oligo mutagènic HPR-7 (5'- GGG GTC GAC TTA AcA gga TcC AAC aCC AgC ATC AAA ATG AAC -3'), el qual introdueix les substitucions S123G E125G D126S S127C T128Ø, sobre els gens codificants per PM5, PE3I1 i PE5. Malgrat que les variants incorporaven un nou residu de Cys, les seves propietats no es van veure modificades a nivell de catàlisi, termoestabilitat, interacció amb l'hRI ni citotoxicitat respecte a les mateixes variants sense els canvis a l'extrem C-terminal. Per aquesta raó, a partir d'aquest moment es farà referència a les construccions conjugades amb el fluoròfor per mitjà del seu nom i sense el sufix -cct, és a dir, com a PE5-Alexa, PM5-Alexa i PE3I1-Alexa.

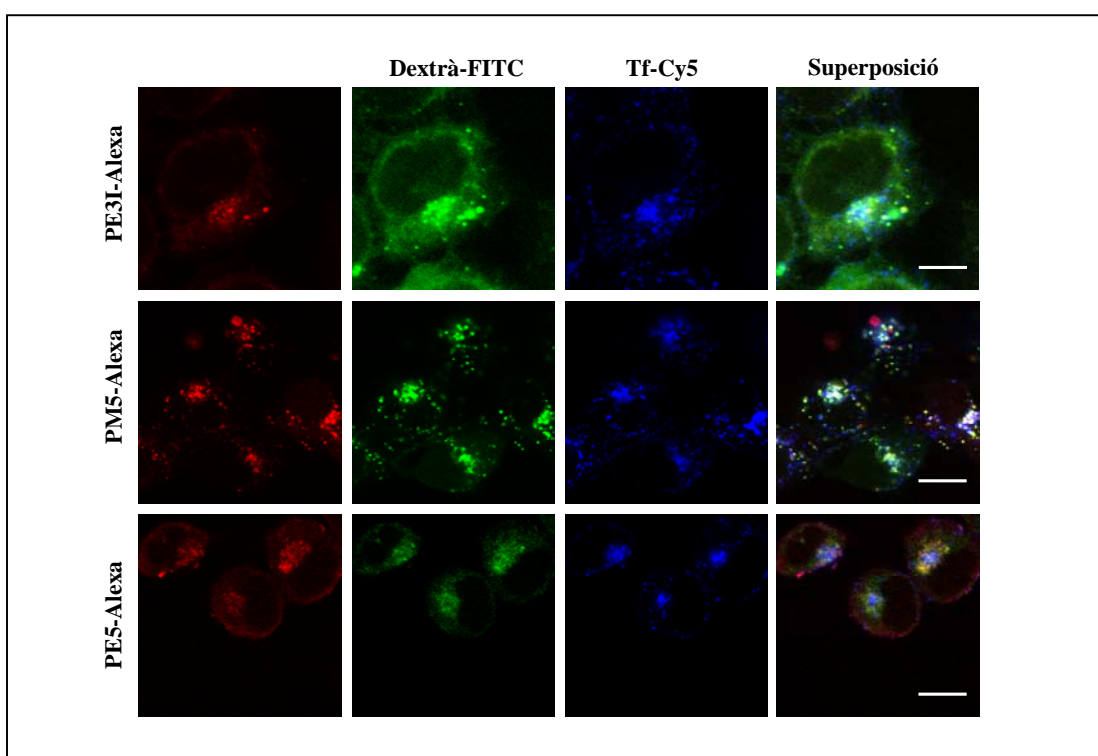
3.12.1. Rutes de trànsit intracel·lular

En primer lloc, es va dur a terme una cinètica d'internalització de les proteïnes PM5, PE3I1 i PE5 en presència de transferrina-Cy5 (Tf-Cy5), un marcador de la ruta endocítica que es localitza específicament en els EE, i sobretot en els RE. Les cèl·lules A431 es van incubar en presència d'una o altra variant durant 4, 6, 8, 24 i 48 h, abans de ser fixades i observades al microscopi. A les 24 h es va obtenir, per a les tres proteïnes, la senyal de màxima intensitat de fluorescència en l'interior de les cèl·lules. La fluorescència de cadascuna de les tres variants es va observar en un compartiment vesicular diferent del marcat per la Tf-Cy5. Així mateix, incubacions més prolongades no van resultar en increments de la intensitat obtinguda. A partir

d'aquest moment doncs, les cèl·lules es van incubar en presència de les ribonucleases durant 24 h. Aquest resultat és consistent amb les dades obtingudes en els experiments d'internalització monitoritzada per marcatge radioactiu, que no van detectar internalització per a cap de les variants en incubacions de fins a 7 h (APARTAT 3.7).

Els resultats d'aquest estudi van evidenciar que tant PE5 com PM5 i PE3I1 colocalitzaven amb el Dextrà-FITC (FIGURA 3.19), un marcador d'endocitosi en fase fluïda, que emprèn la via d'endocitosi degradativa per acumular-se als lisosomes (Kagawa *et al.*, 1978). Així doncs, les tres proteïnes seguien la mateixa via de transport des de la membrana cel·lular fins als lisosomes, on probablement són degradades. D'acord amb aquest resultat, Isenman i Dice (1989) van comprovar que l'RNasa A endocitada en cèl·lules de fibroblast humà és transportada als lisosomes, on és degradada.

FIGURA 3.19.



Anàlisi per microscòpia confocal de fluorescència de la internalització de les proteïnes PE3I1, PM5 i PE5 marcades amb el fluoròfor Alexa Fluor 594 C5 (en vermell). La barra indica 10 µm en la sèrie corresponent a PE3I1, i 20 µm en les sèries corresponents a PE5 i PM5.

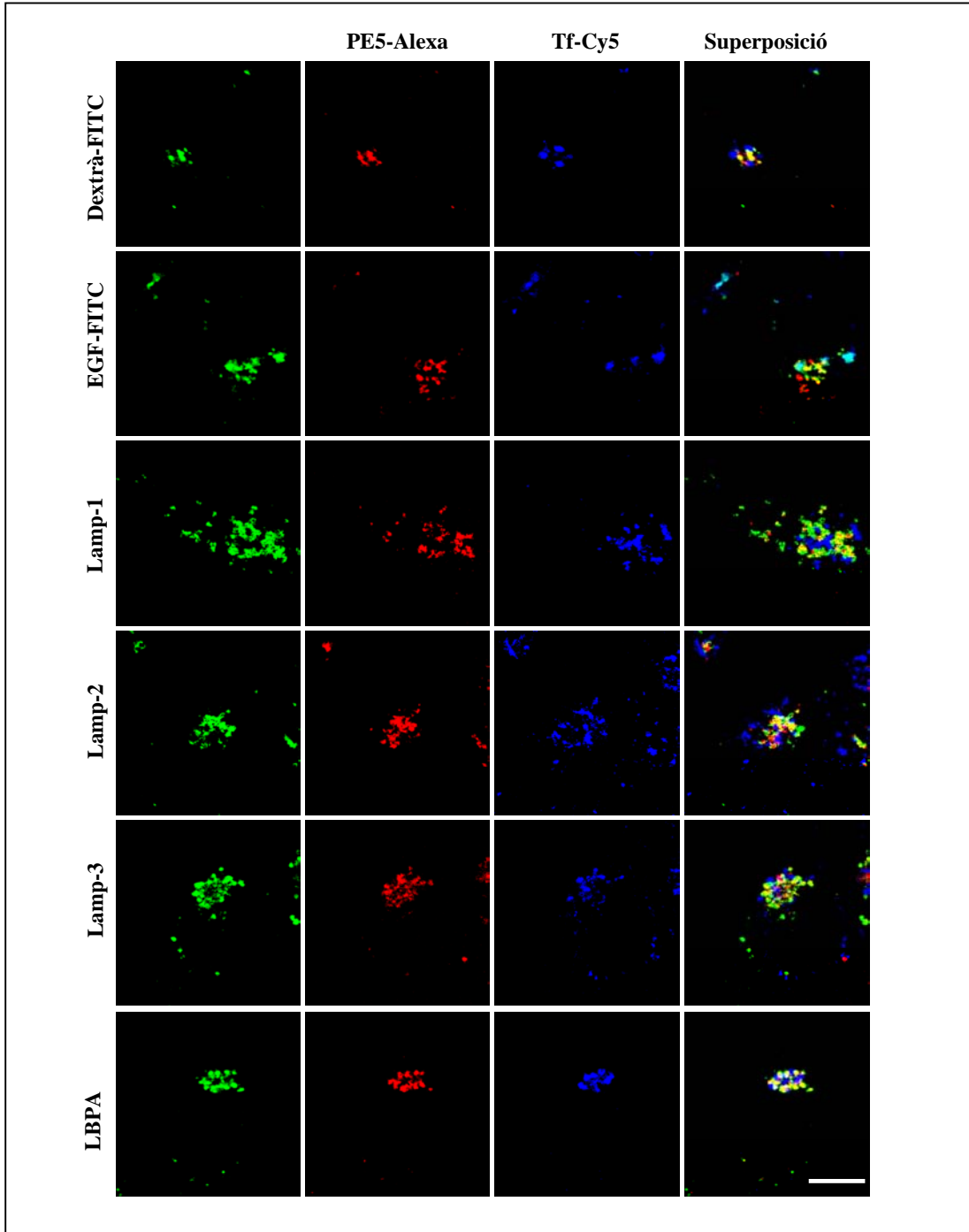
Per aprofundir en la possible existència de rutes alternatives de transport per a PE5 respecte a les altres variants, que la conduïssin a un compartiment diferent al lisosomal, des d'on es pogués dur a terme la seva translocació al citoplasma, es van emprar altres marcadors específics per a diversos compartiments cel·lulars. Així, es va examinar la colocalització de PE5 en relació al receptor de la manosa 6-fosfat (M6PR), una proteïna que recircula entre el TGN i el sistema SE/LE (veure APARTAT 1.7.3.1). Els resultats es presenten a la FIGURA 3.20. Com era d'esperar, es va observar una certa superposició entre la M6PR i la Tf-Cy5. Tanmateix, no es va produir cap superposició entre la M6PR i PE5, indicant que aquesta proteïna no s'acumulava ni en els endosomes primerencs, ni en els tardans, ni en el TGN.

Donat que la brefeldina A té un lleuger efecte activador en la toxicitat de PE5 (APARTAT 3.11.4), es va voler comprovar si una determinada fracció de PE5 era transportada envers algun dels subcompartiments de l'AG o del reticle endoplasmàtic, a través de la via de transport retrògrad. Aquesta via de transport és utilitzada per diverses toxines, per exemple la ricina (Yoshida *et al.*, 1991) i la toxina de Shiga (Sandvig *et al.*, 1992), s'ha suggerit per la BS-RNasa (Bracale *et al.*, 2002) i, segons alguns autors, en ocasions també per l'onconasa (Lin *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1995).

Amb aquest objectiu, i malgrat que no s'havia observat cap superposició entre PE5 i la M6PR (la qual es distribueix en certa proporció al TGN), es va fer un triple marcatge (sempre en presència de Tf-Cy5, a fi de tenir un control que indiqui el correcte estat de les cèl·lules) amb anticossos que marquen diverses subregions de l'AG: els anticossos TGN46 i AP-1, com a marcadors del TGN; i el GM130, com a marcador del *medium* Golgi. Per a la identificació del reticle endoplasmàtic es va utilitzar l'anticòs anti BIP (*binding protein*, una xaperona del reticle endoplasmàtic). Tal i com s'observa a la FIGURA 3.20, no es va produir superposició entre cap d'aquests marcadors i PE5. Aquests resultats descartaven que PE5 fos transportat a través de la via de trànsit retrògrada, d'acord amb els resultats obtinguts en l'APARTAT 3.11.

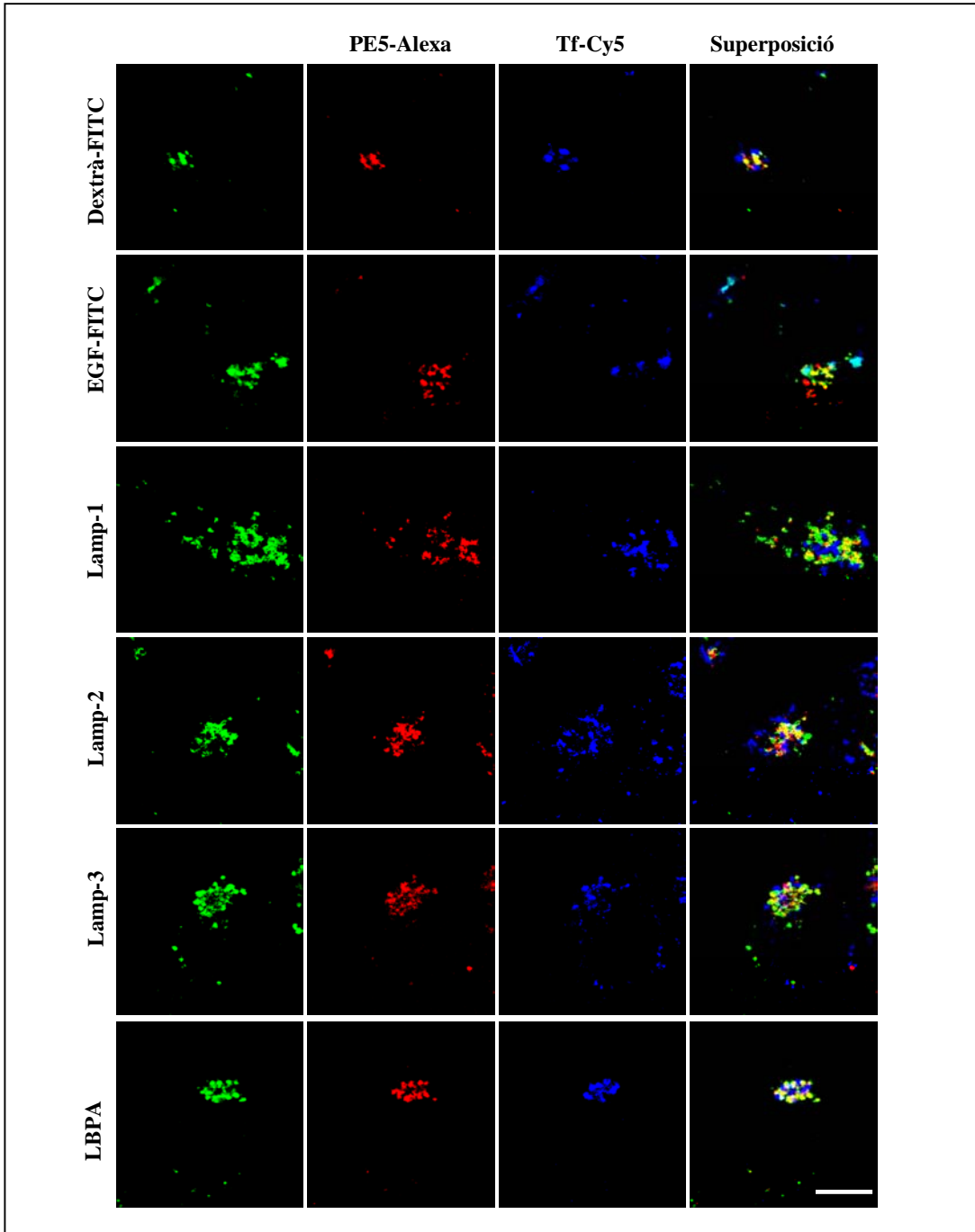
El conjunt de les dades obtingudes fins aquest moment refermaven la hipòtesi que PE5 era internalitzada per la via endosomal, i que la major part de la proteïna empenia la ruta degradativa envers els lisosomes. Amb l'objectiu de caracteritzar millor aquesta via, es van dur a terme marcatges en presència de diferents marcadors específics (FIGURA 3.21). Per al marcatge dels compartiments endosomals primerencs, es va utilitzar la Tf-Cy5 i un anticòs anti receptor de la transferrina (TfR), el qual es localitza específicament en els SE/RE. Per als compartiments endosomals tardans, es va utilitzar l'EGF (d'acumulació lisosomal) i els següents anticossos: anti LBPA (present a les membranes dels LE i dels lisosomes, però més enriquit en els darrers), anti Lamp-1, Lamp-2 i Lamp3 (*Lysosomal membrane glycoproteins*, presents tant als LE com als lisosomes, però també més enriquides en el darrer).

FIGURA 3.20.



Presència de PE5 en elements del compartiment endosomal, l'AG i l'ER. Anàlisi de colocalització de PE5-Alexa amb elements del compartiment endosomal, M6PR i LBPA, amb elements pertanyents a l'AG, TGN46 i GM130, i amb elements de l'ER, el BIP. Els anticossos es van visualitzar per mitjà d'anticossos secundaris conjugats amb FITC. La barra indica 10 µm.

FIGURA 3.21.



Presència de PE5 en elements del compartiment endosomal tardà. Anàlisi de colocalització de PE5-Alexa amb el Dextrà-FITC, l'EGF-FITC, i anticossos anti Lamp-1, -2 i -3. Els anticossos primaris es van visualitzar per mitjà d'anticossos secundaris conjugats amb FITC. La barra indica 10 μ m.

Els resultats d'aquestes anàlisis de colocalització van confirmar les dades obtingudes amb el Dextrà-FITC. PE5 colocalitzava amb l'EGF-FITC, Lamp-1, Lamp-2, Lamp-3, i sobretot amb l'LBPA, però no amb la M6PR. Això indicava que després d'una incubació de 24 h, PE5 s'acumula al darrer compartiment de la via degradativa, el lisosoma.

L'endocitosi de PM5 i de PE5 marcades fluorescentment, no va ser inhibida per l'aplicació al medi d'un excés de la mateixa proteïna sense marcar. L'absència del fenomen de competència suggereix que les diverses variants de l'HP-RNasa no són internalitzades per cap via dependent de receptor.

3.12.2. Efecte de drogues disruptores de les vies d'internalització sobre la localització intracel·lular de PE5

Tal i com ja s'ha presentat en l'apartat anterior, els resultats obtinguts fins al moment indiquen que PE5 és internalitzada per la mateixa ruta que les variants PM5 i PE311. I que la citotoxicitat d'aquesta variant és probablement el resultat d'una major eficiència de translocació al citoplasma a partir d'algun punt de la via previ als lisosomes. A fi de comprovar que realment la ruta endocítica és la via de trànsit efectiva que segueix la variant citotòxica PE5, es van completar els estudis anteriors repetint els assajos de colocalització d'aquesta proteïna amb diversos marcadors i en presència de drogues disruptores de les vies de trànsit intracel·lular, les quals ja s'havien utilitzat en l'APARTAT 3.11. En totes les anàlisis, les cèl·lules A431 es van incubar amb cadascuna de les drogues 45 min abans de l'addició de la ribonucleasa.

3.12.2.1. Monensina

Tal i com s'ha comentat, la monensina promou una lleugera neutralització del pH endosomal i bloqueja el trànsit a través de l'AG. En experiments de toxicitat seguits per marcatge metabòlic, es va comprovar que la monensina presenta un lleu efecte potenciador de la toxicitat de PE5 (APARTAT 3.11.1). Malgrat aquest efecte, l'anàlisi per microscòpia confocal de la internalització de PE5 en presència de monensina (0,1 µM) no va mostrar canvis en la colocalització de l'enzim respecte al Dextrà-FITC i la Tf-Cy5. L'enzim va seguir la ruta envers els lisosomes tant en presència com en absència de la droga (dades no mostrades).

3.12.2.2. Brefeldina A

La brefeldina A provoca la dispersió de l'AG, ja que impossibilita la unió de COPI a les membranes de l'AG, fet que té com a conseqüència el bloqueig de les vies de secreció de la cèl·lula i del transport retrògrad de l'AG al reticle endoplasmàtic (veure FIGURA 1.12) (Pelham, 1991).

Els estudis de citotoxicitat en presència de brefeldina A (APARTAT 3.11.4) van mostrar que la droga té un cert efecte potenciador de la toxicitat en totes les variants de l'HP-RNasa i en l'onconasa. Aquestes dades indicaven que el transport retrògrad no és un component essencial per a la translocació de les ribonucleases al citoplasma, ja que la manca d'un AG íntegre no va afectar negativament la toxicitat de les variants.

Per confirmar aquest resultat, es van incubar cèl·lules A431 en presència de brefeldina A 18 nM, i es va estudiar la colocalització de PE5 amb el Dextrà-FITC, la Tf-Cy5, el TGN46 i el BIP. L'anàlisi de les imatges va mostrar que, efectivament, l'AG era afectat per la presència de la droga. En presència de brefeldina A, el marcador TGN46 colocalitzava parcialment amb la Tf-Cy5, fet que demostrava la fusió del TGN amb els SE i la dispersió de l'AG. Però la localització de PE5 en relació al marcador dels RE (Tf-Cy5) i dels lisosomes (Dextrà-FITC) no va canviar, l'enzim seguia colocalitzant amb el Dextrà independentment de l'efecte de la brefeldina A (dades no mostrades).

Els resultats d'experiments de citotoxicitat en presència d'aquesta droga podrien induir a creure que l'acció potenciadora de la brefeldina A en la toxicitat de les ribonucleases era deguda al col·lapse de l'AG, el qual impediria que les ribonucleases emprenguin la ruta de trànsit retrògrada, promovent una ruta alternativa que els seria més efectiva a nivell de translocació al citoplasma. En contrapartida, els resultats obtinguts per microscòpia confocal demostren que PE5 no es localitza a l'AG, i que la presència de brefeldina A en el medi no altera la localització de PE5 en els lisosomes. Així, i d'acord amb les dades obtingudes en l'APARTAT 3.11, es pot afirmar és que el sistema de transport retrògrad no és necessari per a la translocació de les ribonucleases al citoplasma, donat que la seva desorganització no resulta contraproduent per la toxicitat.

3.12.2.3. *Bafilomicina A₁*

En el present treball s'ha utilitzat la bafilomicina A₁ com a inhibidora específica i reversible de les v-ATPases (Bayer *et al.*, 1998; Bowman *et al.*, 1988; Furuchi *et al.*, 1993), per tal de neutralitzar el gradient acídic dels compartiments endosomals i estudiar així l'efecte del pH en el transport intracel·lular de PE5. A la FIGURA 3.22 es comparen les localitzacions en cèl·lules tractades amb bafilomicina A₁ de PE5 amb Tf-Cy5 i altres marcadors de la via endocítica i secretora.

Cal destacar, en primer lloc, que la Tf-Cy5 (marcadora de RE) canvia de situació i es concentra al centre de la cèl·lula. Aquesta acumulació en la zona perinuclear és deguda al fet que la bafilomicina A₁ inhibeix el reciclatge de la Tf envers la superfície cel·lular, de manera que els RE (que es localitzen al voltant del nucli) s'acumulen, fet que provoca un increment en la intensitat de marcatge de la Tf. Aquest resultat és consistent amb el treball de (Johnson *et al.*, 1993), en el qual s'afirma que la bafilomicina A₁ provoca un alentiment en el reciclatge del RTf.

Pel que fa a PE5, comprovem que la droga no altera de manera significativa el seu transport al sistema LE/lisosomes. PE5 mostra les mateixes colocalitzacions que en absència de bafilomicina A₁, situant-se majoritàriament a la mateixa zona que el Dextrà-FITC, la LBPA (FIGURA 3.22) i l'EGF-FITC (imatge no mostrada). De la mateixa manera que en els controls sense bafilomicina A₁, PE5 no colocalitza ni amb marcadors de l'AG, com és el cas del GM130 (FIGURA 3.22) o de l'AP-1 (imatge no mostrada), ni del reticle endoplasmàtic, com és el cas de BiP (imatge no mostrada).

Convé ressaltar que la ubicació en els lisosomes dels marcadors Dextrà-FITC i EGF-FITC no es veu alterada per la presència de la bafilomicina A₁ en el medi. Yoshimori *et al.* (1991), han descrit que la droga no modifica ni la internalització ni el transport d'ambdues molècules, tot i que inhibeix la seva degradació per part dels enzims lisosomals com a conseqüència indirecta de la pèrdua del gradient de pH, necessari per a l'activitat de les hidrolases àcides.

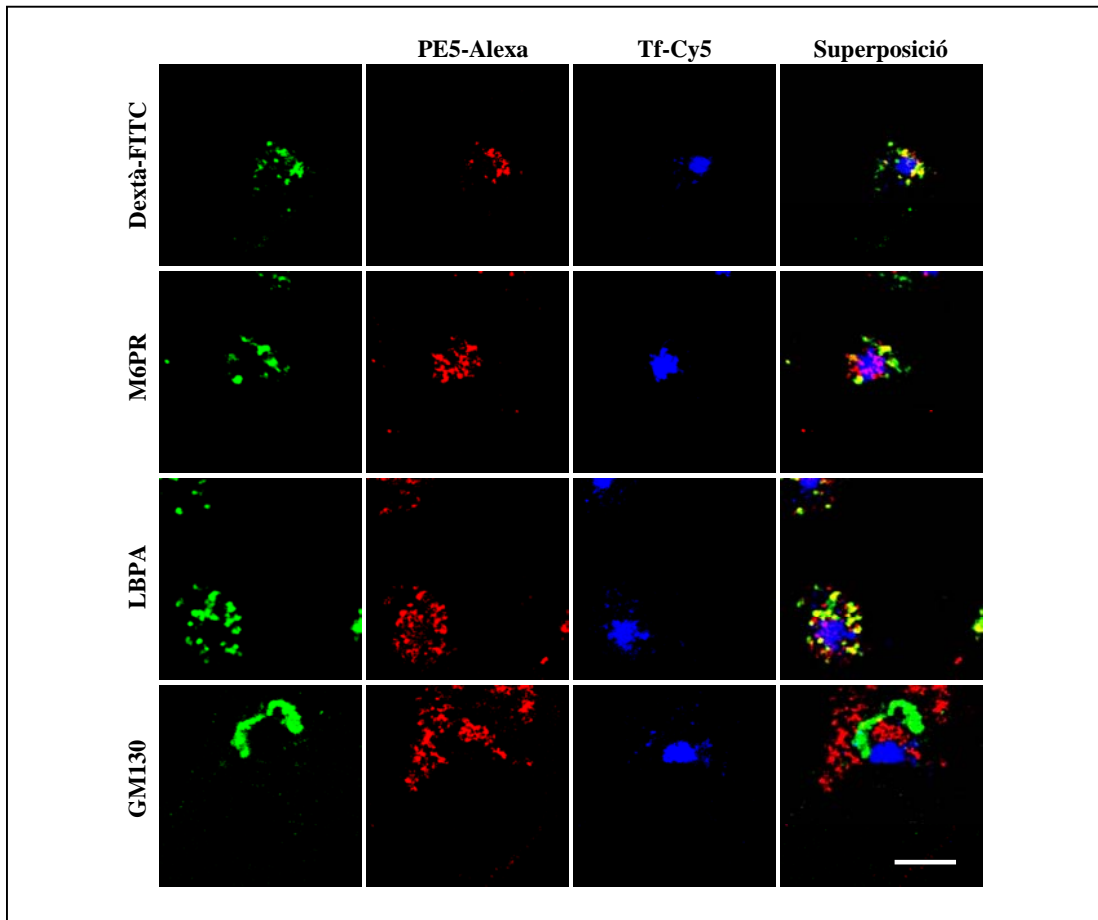
No obstant, i a diferència de les anàlisis sense bafilomicina A₁, s'evidencia una certa colocalització entre PE5 i la Tf-Cy5 (FIGURA 3.22), indicant que una certa fracció de PE5 és retinguda a nivell dels SE/RE. Així doncs, tot i no provocar el bloqueig total de la ruta degradativa, la bafilomicina A₁ promou un alentiment del trànsit lisosomal. Confirmant el mateix resultat, una altra fracció de PE5 ha mostrat colocalització amb la M6PR (fet que en absència de la droga no es produeix) però no amb la Tf-Cy5 (FIGURA 3.22). Això indica que una part de l'enzim és retinguda també a nivell dels LE. Cal remarcar que en presència de bafilomicina A₁ s'ha observat que una fracció de M6PR colocalitza també amb la Tf-Cy5 (FIGURA 3.22) i amb el TfR, indicant que l'augment del pH endosomal promogut per la droga, provoca un lleuger retard del transport SE→LE i del reciclatge LE→TGN.

Tot i no bloquejar totalment el transport a lisosomes, comprovem que la bafilomicina A₁ promou un retard en la via de trànsit degradatiu, fet que determina l'acumulació de les molècules internalitzades en compartiments anteriors als lisosomes. A més, la inhibició de les v-ATPases per part de la bafilomicina A₁ impedeix la generació del gradient de pH, provocant la neutralització del pH lisosomal i per tant, inhibint l'acció hidrolítica dels enzims, cosa que evita la degradació de les molècules internalitzades. Aquests resultats són consistents amb els descrits per Yoshimori *et al.* (1991).

Els resultats obtinguts per PE5 en presència de bafilomicina A₁ són probablement extrapolables a totes les altres variants de l'HP-RNasa estudiades en aquest treball, donat que el valor d'IC₅₀ de totes elles disminueix en presència d'aquesta droga.

Els assajos de colocalització en presència de drogues i, concretament, els resultats obtinguts en presència de la bafilomicina A₁, confirmen la hipòtesi apuntada anteriorment (APARTAT 3.11). És a dir, que les variants de l'HP-RNasa internalitzades a partir de la superfície cel·lular, són conduïdes envers l'interior de la cèl·lula per la via endocítica, des d'on transloquen al citoplasma, en algun punt previ als lisosomes.

FIGURA 3.22.



Internalització de PE5 en cèl·lules A431 incubades amb bafilomicina A₁. Anàlisi per microscòpia confocal de fluorescència de la internalització de PE5-Alexa en cèl·lules A431 incubades amb bafilomicina A1 50 nM, i en presència de marcadors específics. Els anticossos es van visualitzar per mitjà d'anticossos secundaris conjugats amb FITC. La barra indica 10 µm.

3.13. Anàlisi del transport nuclear

El conjunt de dades obtingudes fins al moment encara no ens permetia explicar la major citotoxicitat de PE5 respecte la resta de variants de l'HP-RNasa assajades. El seu grau d'internalització d'aquesta variant (APARTAT 3.7), la seva eficiència catalítica (APARTAT 3.8) i la ruta de trànsit intracel·lular que segueix (APARTATS 3.11

i 3.12) no ens permeten explicar el per què de la seva major toxicitat. Això no obstant, cal recordar que PE5 és la variant més flexible conformacionalment (APARTAT 3.10), fet que podria determinar la translocació d'un major nombre d'unitats d'enzim al citoplasma de la cèl·lula. Tanmateix, aquest aspecte no és suficient per explicar les propietats tòxiques d'aquest enzim, sobretot tenint en compte la seva sensibilitat a l'hRI (APARTAT 3.5).

3.13.1. Distribució local de càrregues en PE5

Per altra banda, s'ha descrit que la introducció de càrregues positives en una proteïna pot afavorir la seva interacció amb les membranes cel·lulars i la seva translocació al citoplasma. D'acord amb això, recentment ha estat descrita la creació de ribonucleases amb propietats citotòxiques per mitjà de la cationització dels seus grups carboxil (Futami *et al.*, 2001; Futami *et al.*, 2002). Per aquesta raó es va dur a terme el càlcul de la càrrega neta de PE5 i de la resta de variants, utilitzant el programa ProParam, del paquet ExPaSy. A la TAULA 3.9 s'observa que PE5 és la variant que presenta una major càrrega neta positiva.

Aquesta característica suggeriria la possibilitat de que la major cationització de la proteïna fos la responsable directa de les seves propietats citotòxiques. No obstant, el fet de que PE5 presenti la mateixa càrrega que l'HP-RNasa salvatge (PM9) (TAULA 3.9), la qual no és citotòxica (Leland i Raines, 2001) descarta aquesta possibilitat.

TAULA 3.9.

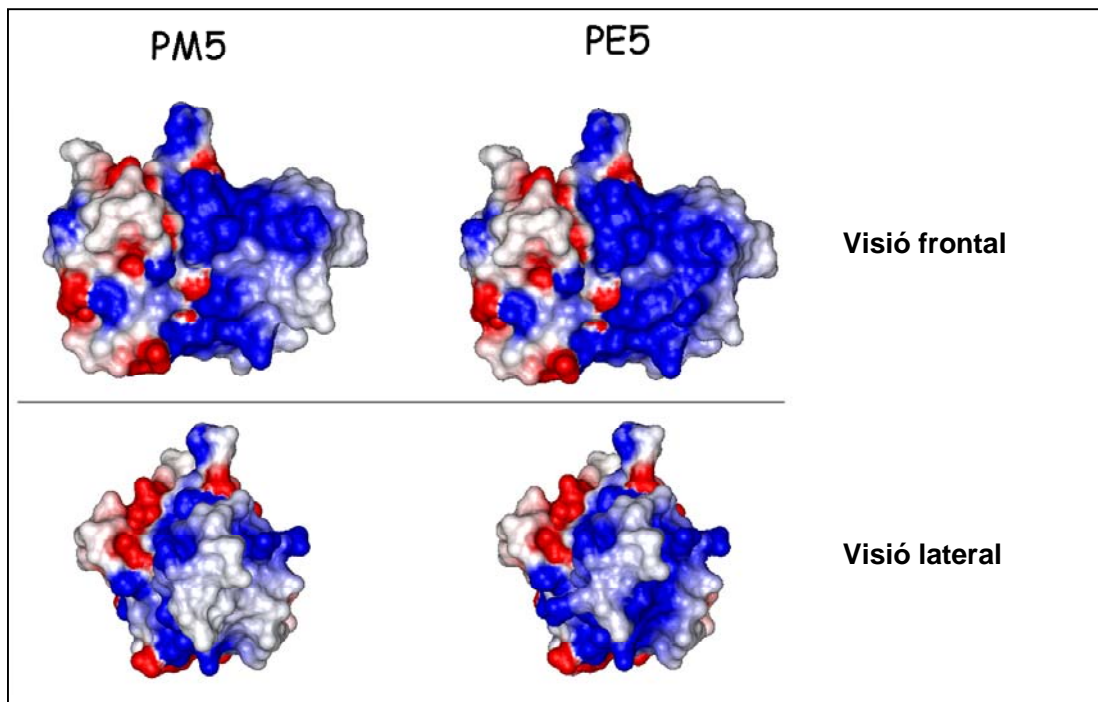
Càrrega neta de les variants de l'HP-RNasa

Proteïna	Càrrega neta *
PE3	+1
PE5	+6
PE3I1	+0
PE3I2	+0
PI5	+1
PM9	+6
PM5	+4

* El valor de càrrega neta de cada proteïna es calcula per mitjà de la diferència entre el nombre total de Lys+Arg i el nombre total de Glu+Asp.

La substitució en PE5 dels residus de les posicions 89 i 90 per dues Arg, determina la presència de dos segments de 3 Arg situats al mateix costat de la molècula. Concretament les regions 31-33 del llaç $\alpha 2\beta 1$, i 89-91 del llaç $\beta 4\beta 5$. A la FIGURA 3.23 es comparen les superfícies de potencial de PE5 i PM5. En PE5 es pot observar la presència d'una regió amb una densitat de càrregues positives (en blau) superior a la de PM5, que correspon a les dues regions descrites. Malgrat la distància que les separa a nivell de seqüència, aquestes dues regions es localitzen de forma molt propera en l'estructura tridimensional de la proteïna. No es pot descartar aleshores que la distribució de càrregues a la superfície sigui el paràmetre que determina la citotoxicitat de PE5.

FIGURA 3.23.



Comparació de la superfície electrostàtica de PM5 i PE5. La visió lateral mostra les molècules amb una rotació de 90° en l'eix y. Les figures s'han generat amb el programa MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996).

Les proteïnes que són importades al nucli cel·lular es caracteritzen generalment per presentar en la seva seqüència senyals de localització nuclear (o NLS). Aquestes estan constituïdes sobretot per residus bàsics (veure TAULA 3.10). Així doncs, la presència dels dos segments de tres Arg en una regió molt localitzada de la proteïna

PE5 podria dotar a l'enzim d'una possible seqüència de transport nuclear. El transport al nucli explicaria perquè l'enzim és capaç de dur a terme la seva acció tòxica tot i ser sensible a l'hRI.

En aquest sentit, l'existència d'un membre de la família de les ribonucleases pancreàtiques humanes capaç de translocar al nucli de les cèl·lules, l'angiogenina (Moroiianu i Riordan, 1994), va reforçar el nostre interès per estudiar la possibilitat que PE5 fos també importada a aquest compartiment. L'angiogenina és internalitzada per les cèl·lules via endocitosi depenent de receptor, translocada al nucli i acumulada al nuclèol, on probablement actua sobre l'rRNA (Lixin *et al.*, 2001). La seqüència Arg31-Arg32-Arg33-Gly34-Leu35 de l'angiogenina és responsable de la seva direccionalització al nucli, actuant com a NTS (*Nucleolar targeting signal*) (Lixin *et al.*, 2001; Moroiianu i Riordan, 1994). Cal esmentar també que, a l'igual que PE5, l'angiogenina és sensible a l'hRI.

3.13.2. Bases del mecanisme clàssic del transport nuclear actiu

Abans d'iniciar l'anàlisi de la possible acumulació nuclear de PE5, presentem una breu introducció als processos implicats en el mecanisme general de transport nuclear actiu de proteïnes, els quals podrien afectar al trànsit intracel·lular seguit per la variant PE5.

Totes les molècules que són transportades entre el nucli i el citoplasma ho fan a través del complex dels porus nuclears (NPC). Aquestes estructures travessen l'embolcall nuclear i estan constituïdes per més de 100 proteïnes diferents, les quals reben el nom de nucleoporines. Per les seves característiques, els NPC impedeixen la difusió passiva cap al nucli de molècules de més de 40 o 50 KDa (Pante i Aebi, 1996).

Les proteïnes que tenen una mida superior a aquest límit són importades o exportades del nucli mitjançant un transport actiu depenent de senyal. Existeixen tant senyals de localització nuclear (NLS) (TAULA 3.10), responsables de dirigir les proteïnes cap al nucli, com senyals d'exportació nuclear (NES), que promouen el retorn d'aquestes cap al citoplasma.

Tanmateix, no totes les proteïnes que són transportades a través dels NPC contenen seqüències de senyalització. En aquests casos és necessari que les proteïnes interaccionin amb d'altres que sí la tinguin. De forma similar, existeixen proteïnes que, tot i ser prou petites com per poder entrar i sortir del nucli per difusió passiva, contenen a més a més un segment NLS o NES. D'aquesta manera s'incrementa l'eficiència del seu transport a dins o a fora del nucli. Els NLS en general es caracteritzen per la presència d'amino àcids bàsics concentrats en un o dos segments de la proteïna. Segons aquesta distribució reben el nom de mono o bipartits. Les proteïnes de mamífer portadores d'NLS solen presentar el tipus bipartit, que consisteix en dues agrupacions de residus catiònics separades per un espai d'entre 10-12 residus. A la TAULA 3.10 es presenten alguns exemples.

TAULA 3.10.

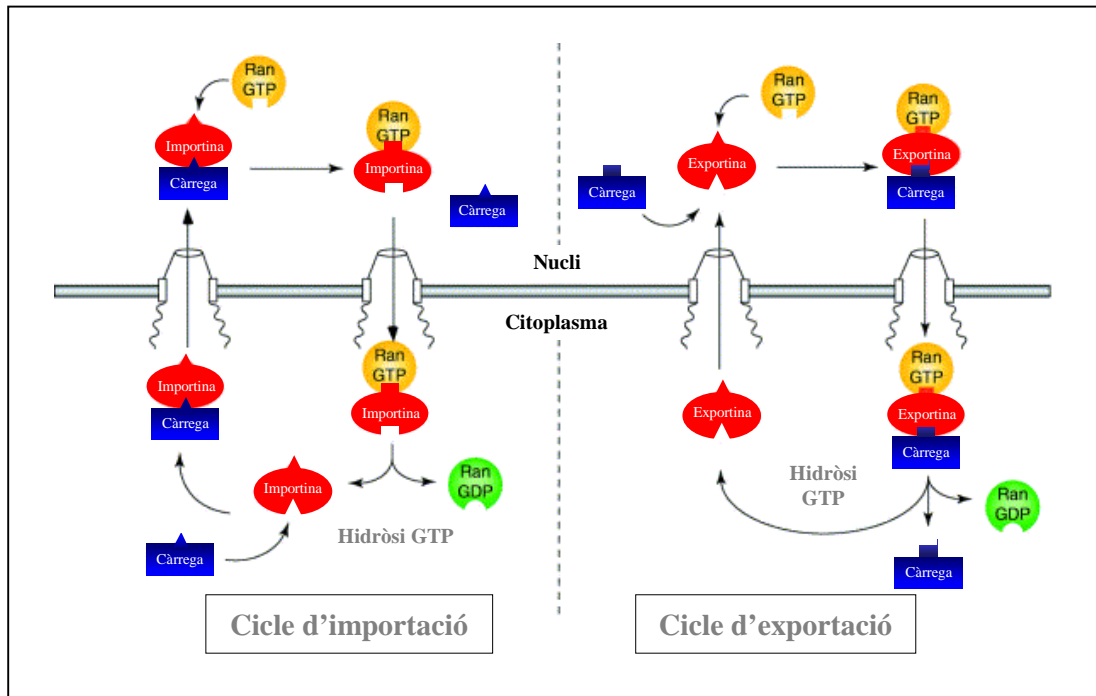
Seqüències de localització nuclear

Tipus	Proteïna	NLS ^(a)	Referències
	Antigen T de SV40 T	PKKKRKY ¹³²	1
	SV40 VP2/3	PNKKKRK ³²³	2
Seqüència monopartida	v-rel de pollastre	KSKKQK ²⁹⁵	3
	L29 ribosomal	KTRKHRG ¹²	4
	2B histona llevat	GKKRSKAK ³⁶	5
	Poli(ADP-ribosa)polimerasa	KRKGDEVDGVDEVAKKKSKK ²²⁶	6
Seqüència bipartida	SRY humà	KRPMNAFIVWSRDQRRK ⁷⁷	7
	FGF3 de ratolí	RLRRDAGGRGGVYEHLLGGAPRRRK ⁷⁶	8
	Nucleoplasmina de <i>Xenopus</i>	KRPAATKKAGQAKKKKL ¹⁷¹	9

1. Chelsky *et al.*, 1989; 2. Clever i Kasamatsu, 1991; 3. Gilmore i Temin, 1988; 4. Underwood i Fried, 1990; 5. Moreland *et al.*, 1987; 6. Schreiber *et al.*, 1992; 7. Poulat *et al.*, 1995; 8. Kiefer *et al.*, 1994; 9. Robbins *et al.*, 1991.

El model clàssic de transport nuclear actiu consta de dues fases, tant per a la importació com per a l'exportació de proteïnes a través dels NPCs, i en el que són bàsiques les proteïnes de transport i el sistema RanGTP/GDP. En el primer es produeix el reconeixement de la seqüència senyal en el substrat a transportar per part de les importines i la interacció amb el complex del NPC. En el segon, es produeix la translocació del complex a través dels NPC envers l'interior del nucli (FIGURA 3.24).

FIGURA 3.24.

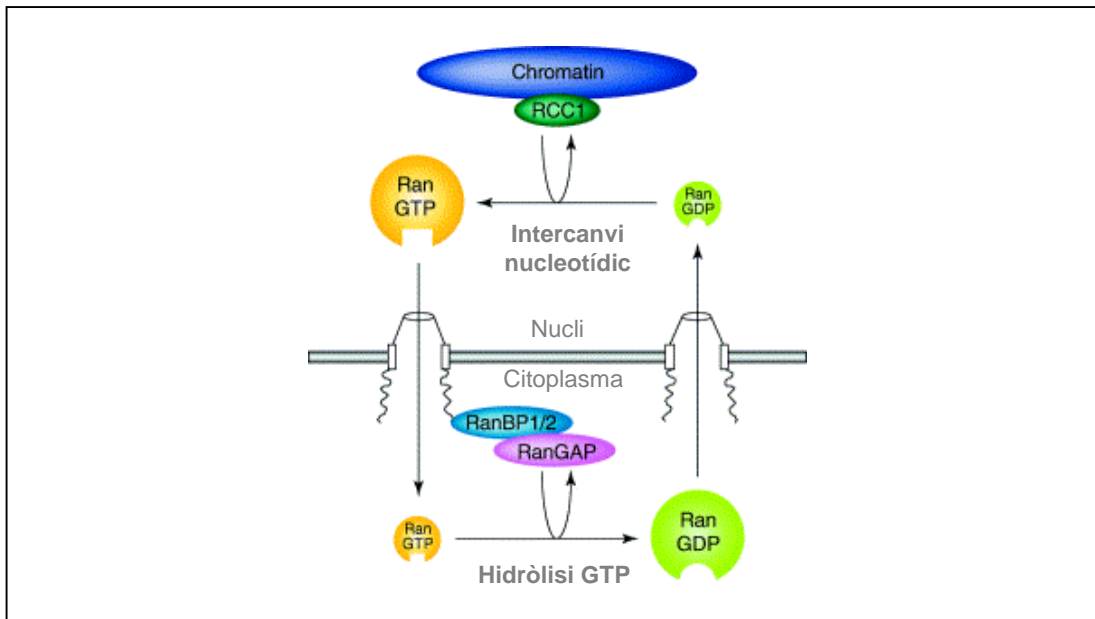


Cicles d'importació i exportació conduïts per les importines citoplasmàtiques. **Cicle d'importació** (esquerra). Les importines s'uneixen a les molècules a transportar en el citoplasma, i interaccionen amb elements del NPC per translocar el complex d'importació en el nucli. La RanGTP nuclear s'uneix a la importina i induïx l'alliberació de la càrrega del complex. El complex importina-RanGTP és tot seguit reciclat vers el citoplasma, on la RanGTP és desplaçada de la importina per RanBP1 i RanBP2. A continuació, RanGAP induïx la hidròlisi del GTP en Ran. El **cicle d'exportació** (dreta) és essencialment el mateix, amb la sola diferència que RanGTP induïx la unió de la càrrega a exportar en el nucli. En el citoplasma, la hidròlisi del GTP en RanGTP promou el seu desplaçament del complex, l'exportina se separa de la càrrega, i el receptor buit és reciclat cap al nucli (Kuersten *et al.*, 2001).

El primer pas és iniciat per un receptor proteic citoplasmàtic específic que reconeix el segment NLS del substrat, la importina α . Aquest complex heterodimèric interacciona tot seguit amb una proteïna també citoplasmàtica d'unió a nucleoporines, la importina β , que permetrà la interacció del complex resultant amb els NPC situats en l'embolcall nuclear. Un cop a l'interior del nucli, s'inicia el segon pas del cicle, la unió de la RanGTP al complex, que provoca l'alliberament de la càrrega al nucleoplasma, permetent que el nou complex importina-RanGTP retorni al citoplasma. Aquí es produirà la seva dissociació gràcies a la hidròlisi del GTP, que és activada per l'acció de GAP, una proteïna de localització exclusivament citoplasmàtica que estimula l'activitat GTPasa de Ran. L'alliberament dels components del complex, les importines i la RanGDP, permetrà la seva reutilització

en successius cicles de transport. La RanGDP és enviada llavors a l'interior del nucli, on la proteïna RCC1 intercanvia el GDP per una molècula de GTP (Gorlich i Kutay, 1999). Així, la direccionalitat del transport depèn de la formació de dos reservoris diferenciats de Ran (FIGURA 3.25). Un unit a GTP a l'interior del nucli gràcies a l'acció de la proteïna RCC1 i l'altre a GDP per hidròlisi d'aquest nucleòtid en el citoplasma mitjançant l'acció activadora de la proteïna GAP (Gorlich i Kutay, 1999).

FIGURA 3.25.



L'estat de Ran és determinat per la distribució asimètrica dels seus reguladors. La proteïna unida a cromatina RCC1 (o RanGEF) actua com a factor d'intercanvi GDP-GTP per Ran. RCC1 promou la dissociació del GDP de Ran, i per tant permet la unió del nucleòtid GTP. Donat que RCC1 es troba unit a la cromatina, la Ran nuclear és majoritàriament unida a GTP. Una vegada que Ran deixa el nucli, dues proteïnes relacionades d'unió a Ran, RanBP1 i 2, cooperen amb la proteïna activadora de l'activitat GTPasa de Ran (RanGAP) per induir la hidròlisi del GTP en Ran. El resultat és que la concentració citoplasmàtica de Ran-GTP es manté molt baixa (Kuersten *et al.*, 2001).

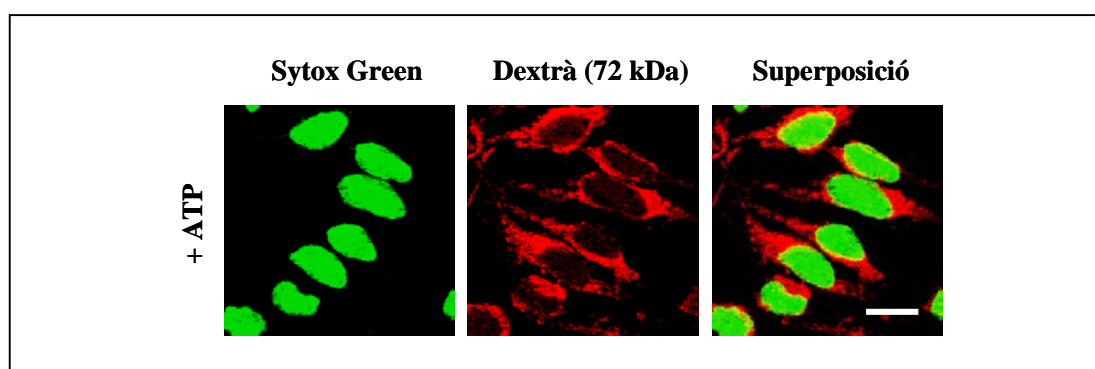
3.13.3. Anàlisi d'importació nuclear de PE5 i PM5 en cèl·lules permeabilitzades

Per la seva mida, tant PM5 com PE5 serien capaces de translocar al nucli per simple difusió passiva. No obstant, els baixos nivells d'internalització d'ambdues proteïnes, sumat al fet que probablement poques de les molècules internalitzades són capaces de translocar a citoplasma, va determinar que els nivells d'acumulació nuclear d'aquestes proteïnes no fossin suficients com per a poder-les detectar en els assajos de trànsit intracel·lular realitzats (APARTAT 3.12), en els quals s'havia observat tan sols acumulació lisosomal

Amb la finalitat de superar aquesta limitació, es va adaptar el protocol d'importació nuclear descrit per Adam *et al.* (1990), sobre cèl·lules de creixement adherent de la línia HeLa. Aquest procediment es va utilitzar per analitzar la importació nuclear de la variant citotòxica PE5 en relació a PM5. L'assaig va consistir en la permeabilització selectiva de les membranes plasmàtiques per mitjà d'un tractament amb digitonina, un detergent que no altera la integritat de l'embolcall nuclear, a fi de superar la limitació que implica el baix rendiment d'endocitosi de les variants estudiades.

A fi de comprovar que el tractament amb digitonina no alterava l'embolcall nuclear, es va analitzar la importació al nucli del Dextrà de 72 kDa marcat fluorescentment (Dextrà-TRITC), tant en presència com en absència d'ATP. Per la seva mida (72 kDa), massa gran per travessar els NPC per simple difusió passiva, i pel fet de no presentar cap seqüència que en determini un transport actiu, aquesta molècula no és capaç de creuar les membranes nuclears. Els resultats obtinguts en presència d'ATP es mostren a la FIGURA 3.26. Es pot observar que aquesta molècula no és capaç de travessar la membrana nuclear ni per difusió passiva ni per transport actiu. El Dextrà no colocalitza en cap de les condicions assajades amb el Sytox Green, un agent fluorescent que s'intercala en el DNA, i que s'ha utilitzat en aquest treball a fi de delimitar el compartiment nuclear. El mateix resultat es va obtenir en absència d'ATP (imatges no mostrades). Aquest experiment va servir per confirmar la integritat de l'embolcall nuclear en l'assaig, fet que ens ha permès validar la tècnica.

FIGURA 3.26.

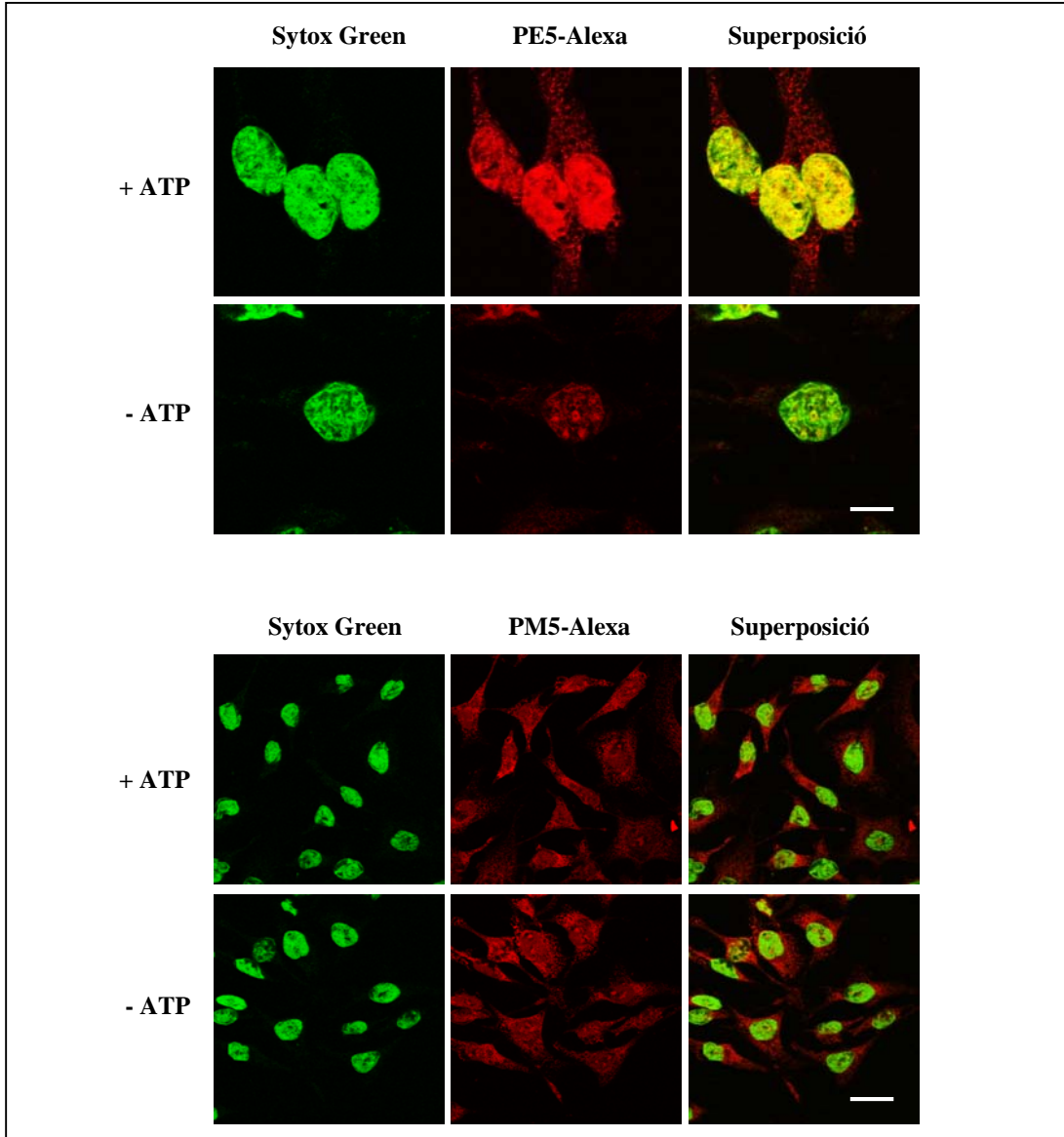


Anàlisi de la localització nuclear del Dextrà-TRITC (72 kDa) en cèl·lules HeLa. Les cèl·lules es van incubar durant 12 min a 30°C amb 1 mg/ml de Dextrà-TRITC, en presència d'un sistema regenerador d'ATP. La barra d'escala representa 20 µm.

La possible utilització del transport actiu per les variants PE5 i PM5 es va analitzar mitjançant dos tractaments. En el primer, la incubació de les cèl·lules amb l'enzim es va realitzar en presència d'un sistema regenerador d'energia (ATP). En el

segon, es va pretractar l'extracte citoplasmàtic amb un enzim capaç d'hidrolitzar l'ATP endogen, l'apirasa, i la incubació de les cèl·lules amb l'enzim es va realitzar en absència d'ATP.

FIGURA 3.27.



Anàlisi de l'acumulació nuclear de PE5 i PM5 en presència o absència d'ATP. Les cèl·lules HeLa s'incubaren 30 min a 30°C en presència de PE5 o de PM5 (2,3 μ M). La barra d'escala representa 10 μ m en la sèrie d'imatges corresponents a PE5, i 30 μ m en la sèrie d'imatges corresponents a PM5.

A la FIGURA 3.27 es presenten les imatges obtingudes en aquests primers assajos per a les variants PE5 i PM5. Tal i com ja s'ha comentat, la mida de les dues proteïnes és prou petita com per a permetre el seu transport al nucli per difusió passiva a través dels NPC. D'acord amb això, s'observa que tant PE5 com PM5 presenten una certa localització nuclear en absència d'ATP, en forma de petits grànuls. Ara bé, s'observa que en presència d'ATP es produeix un increment notable de l'acumulació nuclear de PE5, que no es produeix en el cas de PM5. Aquest resultat suggereix que PE5 és conduïda al compartiment nuclear mitjançant un mecanisme de transport actiu depenent d'energia, a més a més del transport passiu. Mentre que la presència de PM5 en el nucli és tan sols el resultat d'un procés de difusió passiva, que no depèn d'aports energètics.

Aquestes dades semblen indicar que la fracció de PE5 que aconsegueix translocar dels endosomes al citoplasma, és capaç d'emprendre una ruta de trànsit alternativa a la de la seva proteïna parental, que la condueix a un compartiment on l'enzim és capaç de dur a terme la seva acció catalítica sense ser inhibit per l'hRI (de localització citoplasmàtica): el nucli de la cèl·lula.

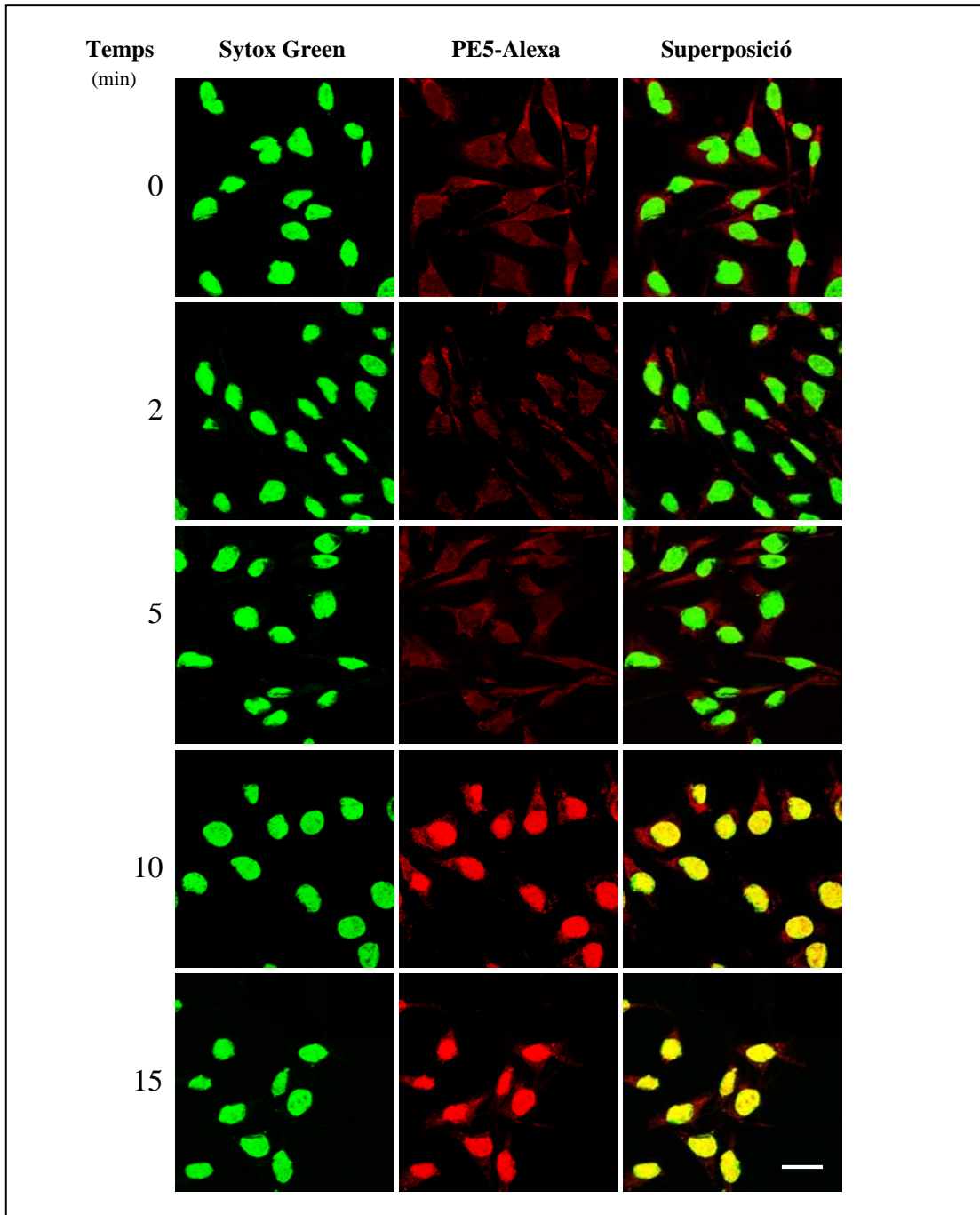
3.13.4. Cinètica d'importació nuclear de PE5 i PM5

A fi d'optimitzar les condicions de l'assaig, es va mesurar la cinètica d'importació a nucli de PE5 i PM5 en cèl·lules HeLa. Es va analitzar diferents temps d'incubació de les cèl·lules amb l'enzim, en un interval de 0 a 45 min, a 30°C i en presència o absència d'ATP. Les imatges obtingudes es presenten a les FIGURES 3.28, 3.29 i 3.30. En totes elles els nuclis s'han marcat amb el Sytox Green, després de la fixació de les cèl·lules.

A la FIGURA 3.28 s'observa que el transport de PE5 al nucli en presència d'ATP és molt ràpid, assolint el màxim als 10 min. No s'observen diferències entre els 0- 5 min, indicant que el procés de transport actiu assoleix el seu màxim entre 5 i 10 min després de l'inici de la incubació.

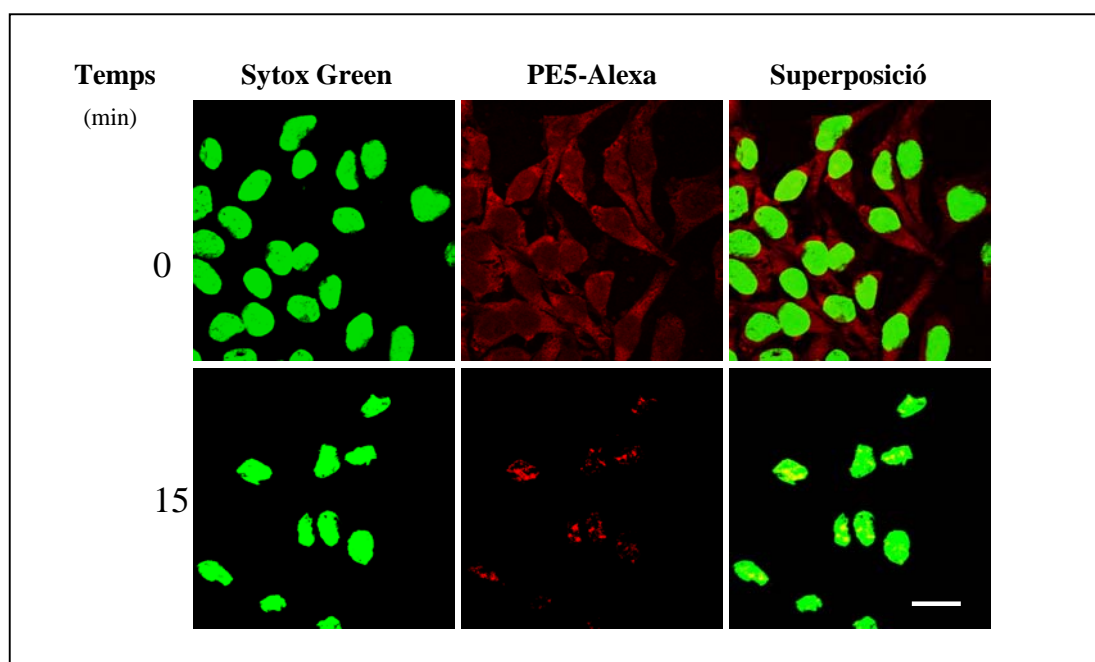
Quan la mateixa cinètica de transport es va repetir en absència d'ATP (a la FIGURA 3.29 es mostren les imatges corresponents als temps 0 i 15 min), s'observà de nou que els nivells d'acumulació nuclear de PE5 eren molt baixos i similars als de PM5 (FIGURA 3.30). Als 0 min d'incubació, el marcatge de PE5 és més intens en el citoplasma que en el nucli. A partir dels 15 min però, el marcatge a l'interior del nucli és superior al del citoplasma (FIGURA 3.29). Cal comentar que es van realitzar incubacions fins a 45 min, però aquestes no mostraren diferències respecte a les mostres incubades 15 min. Aquests resultats suggereixen la unió de PE5 amb algun component nuclear. Aquest segrest generaria un gradient de concentracions que afavoriria la difusió passiva de l'enzim envers l'interior del nucli, determinant una lleu acumulació en aquest compartiment tot i l'absència d'ATP.

FIGURA 3.28.



Anàlisi de l'acumulació nuclear de PE5 en presència d'ATP, a diferents temps (0, 2, 5, 10 i 15 min). La barra d'escala representa 30 μ m.

FIGURA 3.29.

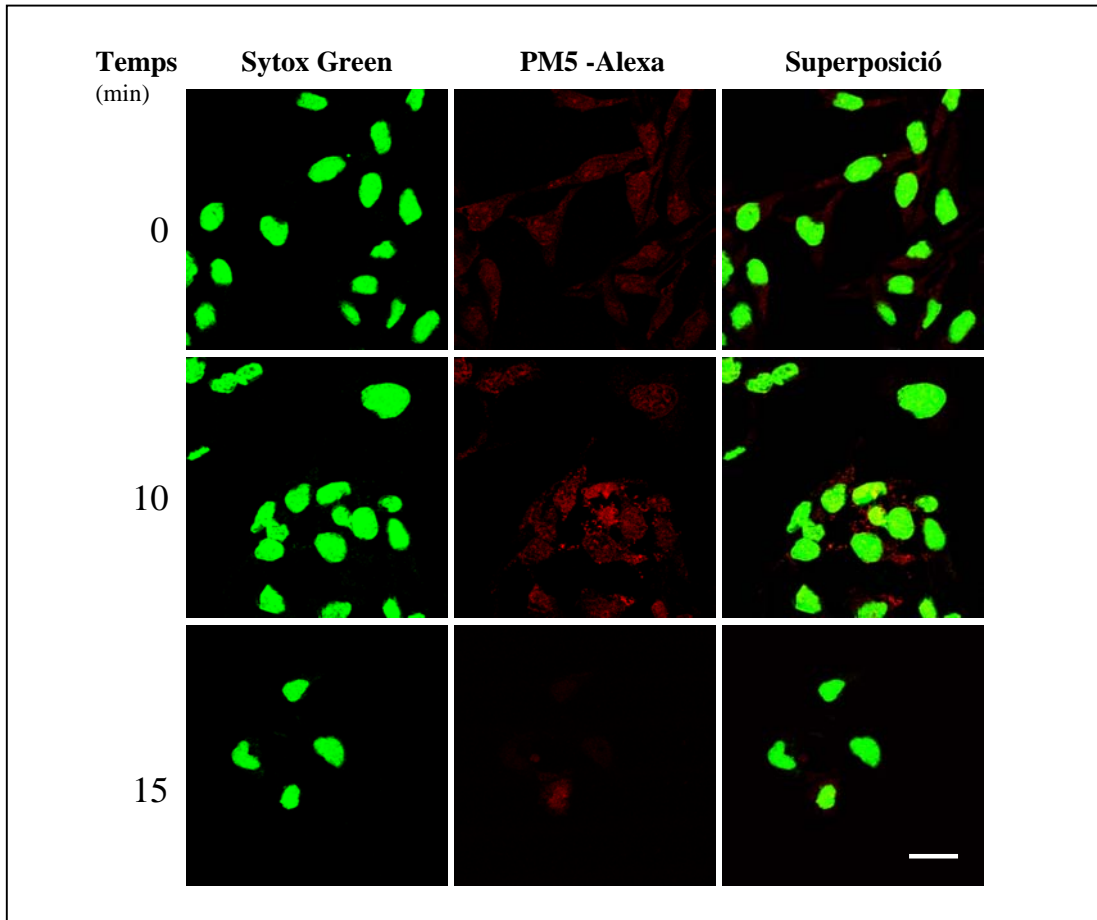


Anàlisi de l'acumulació nuclear de PE5 en absència d'ATP, a 0 i 15 min. La barra d'escala representa 30 μm .

La cinètica de transport de PM5 és la mateixa tant en absència com en presència d'ATP, demostrant que la proteïna és transportada a nucli per difusió passiva. A la FIGURA 3.30 es presenten les imatges per aquest transport en presència d'ATP, com a exemple. No es detecten pràcticament diferències entre el temps 0 i els 15 min, tot i que apareix una lleu acumulació de PM5 en l'interior del nucli a partir dels 10 min, similar a la de PE5 en les mateixes condicions. Aquesta petita acumulació possiblement s'explica per la mateixa raó esmentada anteriorment, o sigui, pel fet que la interacció de l'enzim amb algun component de l'interior del nucli genera un gradient de concentracions favorable a la seva difusió passiva envers aquest compartiment.

A partir d'aquests resultats, es va determinar que el temps òptim d'incubació de PE5 en cèl·lules HeLa era d'entre 5 i 10 min en presència d'ATP, i de 15 min en la seva absència. Com que per a PM5 no existeixen diferències entre els temps 0 i 15 min, es va decidir realitzar a partir d'aquest moment incubacions de 12 min, un temps intermig entre els dos valors corresponents a PE5.

FIGURA 3.30.



Anàlisi de l'acumulació nuclear de PM5 en presència d'ATP, a 0, 10 i 15 min. Barra d'escala: 30 µm.

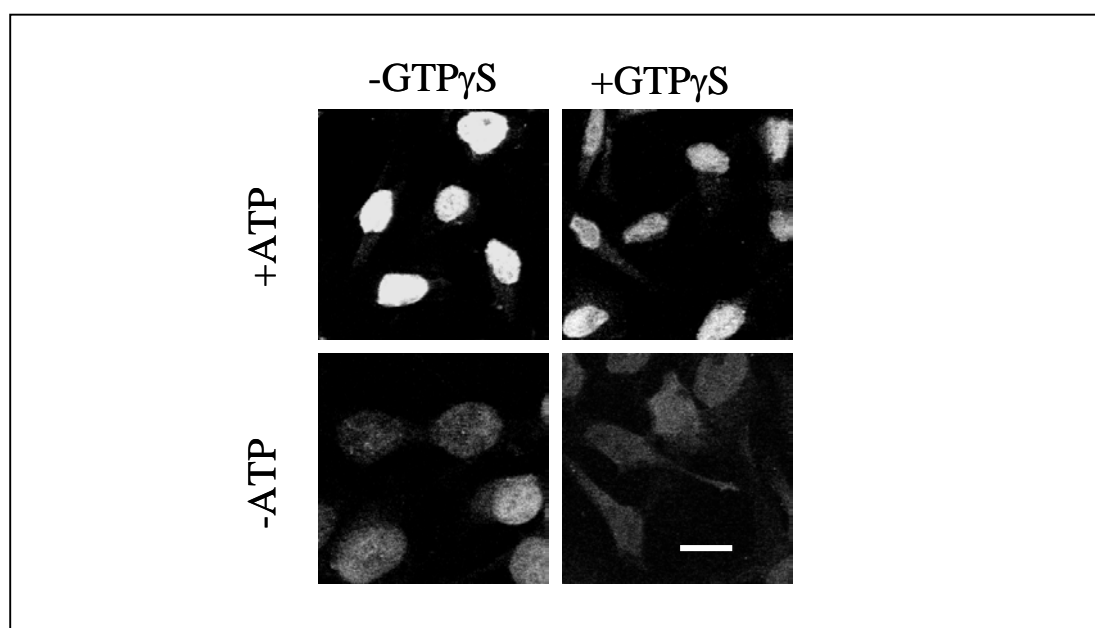
3.13.5. Caracterització del transport nucleocitoplasmàtic de PE5 i PM5

El requeriment energètic del transport de PE5 al nucli suggereix que aquest enzim probablement utilitza la via clàssica d'importació nuclear, dependent Ran. Per comprovar-ho, es van dur a terme diversos assajos de transport nuclear de PE5 i PM5 en presència de $GTP\gamma S$, un anàleg no hidrolitzable del GTP que inhibeix l'acció de Ran, inhibint així la via clàssica de transport nuclear (Efthymiadis *et al.*, 1998).

A fi de confirmar la validesa del disseny experimental, els assajos es van realitzar també per la proteïna BSA-NLS-FITC (amablement cedida pel Dr. Urs Greber, Zurich, Suïssa), una proteïna portadora d'un segment NLS que és conduïda al nucli de les cèl·lules mitjançant la via clàssica de transport actiu, dependent de Ran.

La FIGURA 3.31 mostra els resultats obtinguts en l'assaig d'importació nuclear d'aquesta proteïna, combinant els paràmetres presència/absència d'ATP i presència/absència de GTP γ S. Com es pot comprovar, el nivell d'acumulació de BSA-NLS-FITC en absència d'ATP al nucli és molt baix, disminuint encara més en presència de GTP γ S. En presència d'ATP i absència de GTP γ S s'observa la màxima eficiència d'acumulació nuclear.

FIGURA 3.31.



Anàlisi de l'acumulació nuclear de la BSA-NLS-FITC en cèl·lules HeLa. Les cèl·lules es van incubació de 12 min a 30°C amb 10 μ M de la proteïna, en presència/absència d'ATP, i en presència/absència de GTP γ S 300 μ M. La barra d'escala representa 20 μ m.

La caracterització del transport nucleocitoplasmàtic de PE5 i de PM5 es presenta a les FIGURES 3.32 i 3.33, respectivament. Per a PE5 es pot observar que la màxima eficiència de transport al nucli es produeix en presència d'ATP i absència de GTP γ S, igual que en el cas de la BSA-NLS-FITC. En aquest tractament, després d'una incubació de 12 min a 30°C s'assoleix la saturació completa del nucli. En absència d'ATP, l'acumulació nuclear és menor i no s'arriba a la saturació demostrant, doncs que el transport de PE5 requereix aport d'energia. Per la seva banda, l'acumulació nuclear de PM5 no ha estat afectada ni per l'ATP ni pel GTP γ S, indicant que aquesta variant és conduïda al nucli per un procés de difusió passiva.

Pel que fa al tractament en absència d'ATP de PE5, i als tractaments +/- ATP de PM5, s'observa per a les dues proteïnes una lleu presència nuclear, en forma de petits grànuls. Probablement, la interacció de la fracció d'enzim translocada al nucli per difusió passiva amb algun component subnuclear, genera un gradient de concentració favorable a l'entrada de la proteïna per aquest procés físic (FIGURES 3.32 i 3.33).

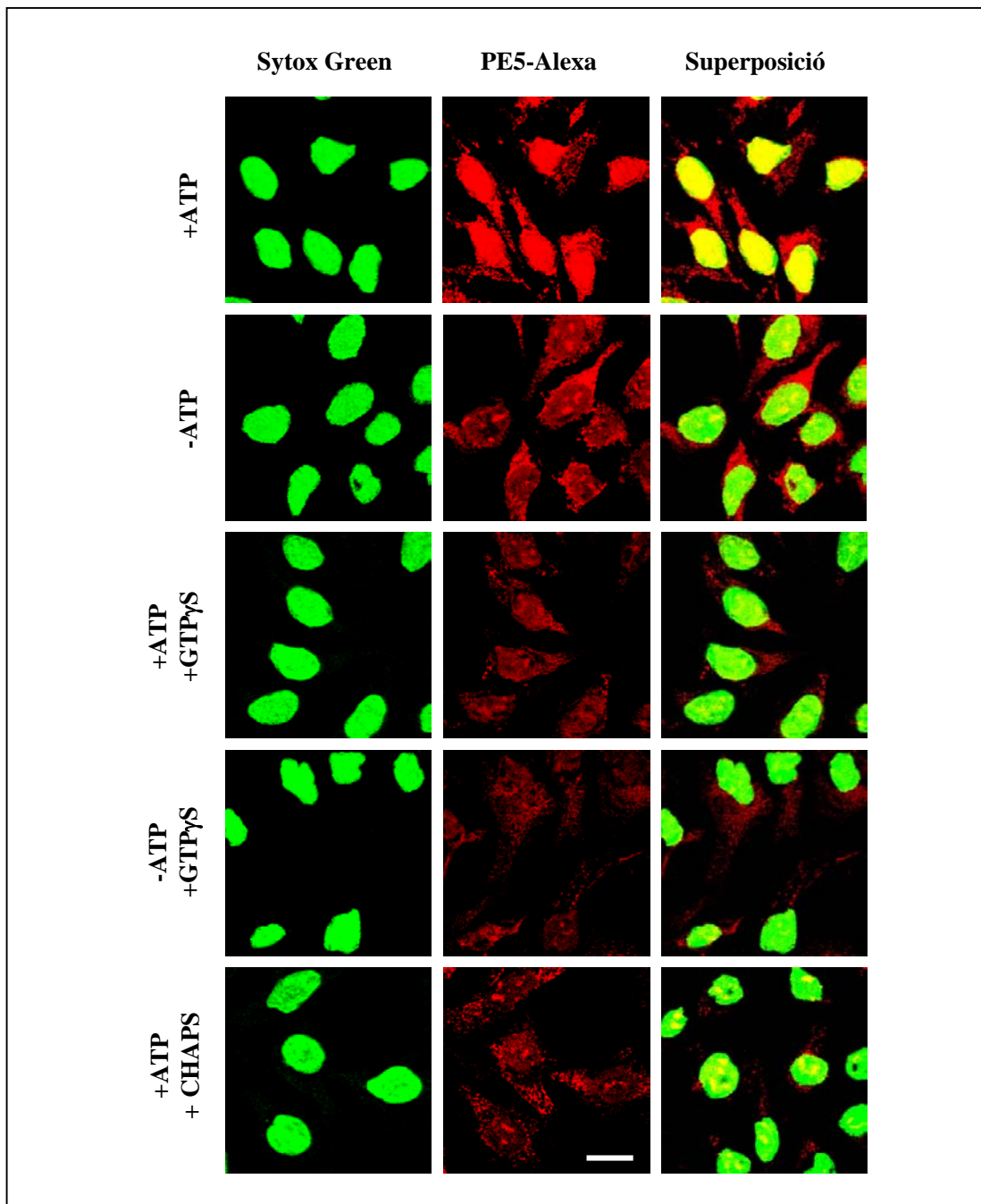
Quan en l'assaig en presència d'ATP s'addiciona $GTP_{\gamma}S$ (tractament "+ATP/+ $GTP_{\gamma}S$ "), l'eficiència de transport al nucli de PE5 disminueix (FIGURA 3.32). La comparació d'aquest resultat amb les dades obtingudes amb la BSA-NLS-FITC suggereixen la participació de Ran en el procés de transport nuclear de PE5, indicant que l'enzim podria emprendre la via clàssica d'importació nuclear. No obstant, en aquestes condicions s'observa encara una certa acumulació de PE5 a nucli (FIGURA 3.32). Aquesta podria ser deguda a que el metabolisme dels nucleòtids d'adenina i de guanidina estan molt relacionats (Kondo *et al.*, 2000), i l'ATP present al medi pot reconstituir els nucleòtids de GTP necessaris per a l'activitat de Ran (Schwoebel *et al.*, 2002).

El tractament més efectiu per inhibir l'acumulació nuclear de PE5 ha demostrat ser la incubació en absència d'ATP i en presència de $GTP_{\gamma}S$ (-ATP/+ $GTP_{\gamma}S$) (FIGURA 3.32). La menor acumulació nuclear de PE5 en aquestes condicions confirma que el seu transport actiu al nucli és dependent de Ran, ja que en aquest tractament, l'activitat de Ran ha estat inhibida per la presència de $GTP_{\gamma}S$ i per l'absència d'ATP al medi. A les imatges s'observa que la presència de l'enzim al citoplasma és superior a la del nucli, tot i que s'intueixen unes petites acumulacions en forma puntejat en l'interior del nucli. Aquestes probablement corresponen a la fracció de PE5 que ha assolit el nucli per difusió passiva, tal i com ja s'ha comentat prèviament.

Així mateix, la caracterització del transport nuclear de PE5 i PM5 es van dur a terme també en presència del detergent CHAPS. Aquest detergent provoca la permeabilització selectiva de l'embolcall nuclear, permetent així la lliure difusió de les molècules entre el nucli i el citoplasma. En aquestes condicions, l'observació d'acumulació nuclear de la molècula estudiada indica que aquesta s'està fixant sobre algun component subnuclear (Baldin *et al.*, 1990).

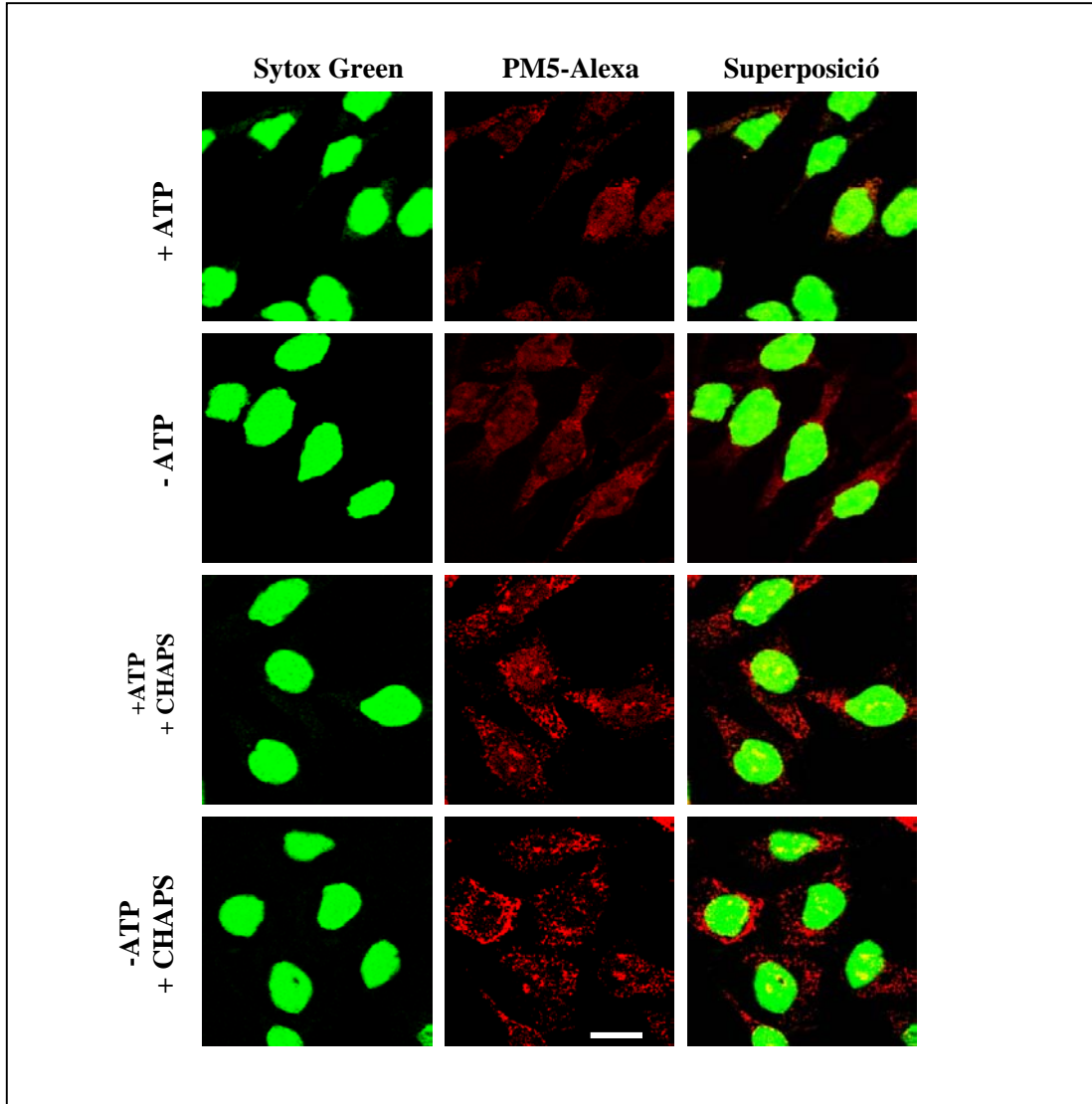
La permeabilització de la membrana nuclear per efecte del CHAPS va proporcionar unes imatges similars a les obtingudes en el tractament en absència d'ATP i en presència de $GTP_{\gamma}S$ ("-ATP/+ $GTP_{\gamma}S$ "). La permeabilització de l'embolcall nuclear permet que els enzims es distribueixin equitativament entre el nucli i el citoplasma, per mitjà de la difusió passiva. En el nostre cas però, s'observa que en l'interior del nucli PE5 i PM5 s'acumulen en forma de petits grànuls, la qual cosa indica que ambdós enzims estan interaccionant amb algun component subnuclear, probablement el nucleòl (FIGURA 3.32 i 3.33). Aquest resultat coincideix amb les dades obtingudes en els estudis inicials, les quals evidenciaven l'existència d'acumulació nuclear de PE5 i PM5 en absència d'ATP.

FIGURA 3.32.



Caracterització de la importació nuclear de PE5 en cèl·lules HeLa. Les cèl·lules HeLa es van incubar amb PE5 (2,3 μ M) 12 min a 30°C. La caracterització de la importació nuclear es va realitzar en presència/absència d'un sistema regenerador d'ATP, en presència/absència de GTP γ S 300 μ M, i en presència/absència de CHAPS 0,025 %. La barra d'escala representa 20 μ m.

FIGURA 3.33.



Caracterització de la importació nuclear de PM5 en cèl·lules HeLa. Les cèl·lules HeLa es van incubar amb PE5 (2,3 μ M) 12 min a 30°C. La caracterització de la importació nuclear es va realitzar en presència/absència d'un sistema regenerador d'ATP, i en presència/absència de CHAPS 0,025 %. La barra d'escala representa 20 μ m.

3.13.6. Caracterització del compartiment subnuclear on s'acumula PE5

Els resultats presentats fins al moment per a PE5 i PM5 mostraven que, en els tractaments en els quals s'inhibia el transport actiu, la difusió passiva era suficient

per provocar una lleugera acumulació de l'enzim a l'interior del nucli en forma de petits grànuls, la morfologia dels quals era similar a la del nuclèol (veure FIGURES 3.32 i 3.33).

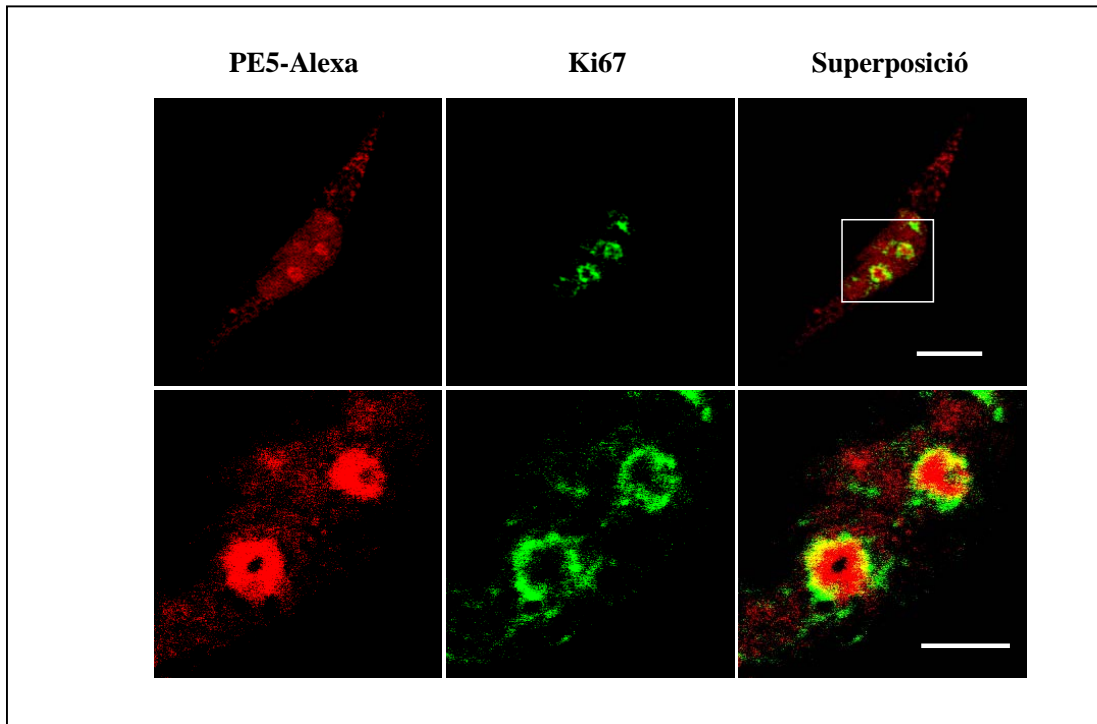
El nucli conté diferents subestructures que es caracteritzen per no posseir membranes que les delimitin, però que poden considerar-se compartiments individualitzats per diferents raons: contenen un seguit de proteïnes residents; poden ésser morfològicament identificables per microscòpia òptica i electrònica; i perquè, almenys per algunes d'elles, poden aïllar-se en una forma enriquida (Dundr i Misteli, 2001). Els compartiments nuclears més estudiats són el nuclèol, el compartiment dels factors de tall i unió (*splicing factor compartment*, SCF) i els cossos de Cajal.

El nuclèol és el compartiment nuclear més important i més fàcil d'identificar. La seva funció principal és la formació de les subunitats ribosomals. Està constituït per tres subestructures amb funcions diferenciades, que es distribueixen de manera concèntrica: el centre fibril·lar, el component fibril·lar dens que embolcalla l'anterior, i el component granular que recobreix tota l'estructura. El nuclèol s'organitza al voltant dels *clústers* dels gens ribosomals o rDNA repetits en tàndem. El processament de l'rRNA es produeix de manera radial, de l'interior cap a l'exterior del nuclèol. Els gens codificants per l'rRNA són transcrits per l'RNA polimerasa I en el centre fibril·lar. Tot seguit, els pre-rRNA són modificats mitjançant metil·lació i transformació d'uridines en pseudouridines, en el component fibril·lar dens. Finalment, en el component granular els rRNA acaben de ser modificats i són ensamblats amb les proteïnes ribosomals (Carmo-Fonseca *et al.*, 2000; Olson *et al.*, 2000; Scheer i Hock, 1999).

Per tal de caracteritzar el compartiment nuclear on s'acumula PE5, es va realitzar l'assaig de transport nuclear en presència de l'enzim i en absència d'ATP durant 12 min i a 30°C, i es va procedir després de la fixació de la preparació, al marcatge amb l'anticòs monoclonal Ki67, dirigit específicament contra el component fibril·lar dens del nuclèol, on s'ha descrit que es produeix part de la maduració l'rRNA (Kill, 1996).

A la FIGURA 3.34 es mostren els resultats d'aquest experiment. Es pot comprovar a les imatges que PE5 (en vermell) se situa just a l'interior del compartiment delimitat per l'anticòs Ki67 (en verd), el centre fibril·lar del nuclèol, precisament on s'ha descrit que es produeix la transcripció de l'rRNA per part de la RNA polimerasa I (Kill, 1996). Així doncs, PE5 s'acumula específicament al subcompartiment nucleolar, en contacte amb el seu substrat d'actuació: l'rRNA, probablement. D'aquesta manera PE5, se situa en la mateixa localització subnuclear que l'angiogenina (Moroianu i Riordan, 1994). En l'apartat anterior, els assajos de permeabilització de les membranes nuclears per efecte del CHAPS posaven de manifest que PM5 presenta també afinitat per algun component subnuclear, probablement l'rRNA. Així doncs, la interacció de les ribonucleases amb l'rRNA seria una propietat intrínseca dels propis enzims, i no una conseqüència del triplet d'Arg present en PE5.

FIGURA 3.34.



Caracterització del compartiment subnuclear on s'acumula PE5. Anàlisi de colocalització seguida per microscòpia confocal de fluorescència de l'anticòs Ki67 (verd) en cèl·lules HeLa sotmeses a una reacció d'importació nuclear en presència de PE5 (vermell) i en absència d'ATP. Les tres figures de la línia superior es mostren ampliades 10 vegades en la línia inferior. Barra d'escala de la sèrie superior: 20 μm . Barra d'escala de la sèrie inferior: 2 μm .

A la mateixa figura s'observa que el marcatge citoplasmàtic corresponent a PE5 té un aspecte puntejat, molt similar al que es va obtenir amb l'anticòs BIP per al marcatge del reticle endoplasmàtic (veure FIGURA 3.20). Això suggereix que la proteïna PE5 incorporada en l'interior de la cèl·lula gràcies a la permeabilització de la membrana plasmàtica, es fixa sobre d'algun component citoplasmàtic, probablement els ribosomes del reticle endoplasmàtic rugós.

El conjunt de resultats obtinguts per la variant PE5 demostren que la proteïna segueix una via activa de transport al nucli, diferent a la utilitzada per l'angiogenina. Per l'angiogenina s'ha descrit un mecanisme d'importació nuclear/nucleolar via transport passiu a través dels NPC, i una acumulació nucleolar mediada per la seqüència NTS, que determina la interacció de l'enzim amb algun component encara desconegut del nuclèol (Efthymiadis *et al.*, 1998). Aquesta interacció determina la formació d'un gradient de concentracions favorable a la difusió de l'angiogenina cap a l'interior del nucli, d'una manera independent d'energia. A diferència de PE5, la

presència d'ATP al medi sembla actuar inhibint l'acumulació nuclear de l'angiogenina (Lixin *et al.*, 2001).

Per a PE5, en canvi, la presència de dos segments de tres Arg (segments 31-33 i 89-91), fruit de l'addició de dues Arg davant de l'Arg91 en PM5, determina l'acumulació nucleolar de l'enzim per mitjà de la via clàssica de transport actiu, actuant probablement com a part d'un NLS. Aquest segment determinaria la interacció de l'enzim amb els receptors d'importines del citoplasma, les quals conduirien el seu transport a nucli per mitjà d'un mecanisme actiu. Alhora, la interacció de PE5 amb les importines podria actuar dificultant la inhibició de PE5 per part de l'hRI, per un simple mecanisme de competència. Així doncs, les substitucions introduïdes en aquesta variant podrien promoure la citotoxicitat de la ribonucleasa a dos nivells: proporcionant una via de transport eficient de l'enzim al seu compartiment diana i permetent superar la inhibició de l'hRI.

No obstant, i donada la naturalesa heterogènia dels NLS, les dades obtingudes fins al moment no són suficients per delimitar la seqüència precisa que constitueix el segment NLS en PE5. El fet de que la majoria d'NLS presents en mamífers tinguin una estructura bipartida suggereix que els dos triplets d'Arg (31-33 i 89-91) podrien formar part d'aquest NLS. Tanmateix, aquests dos segments es troben separats seqüencialment per una distància molt superior a la dels espaiadors típics presents en els NLS bipartits, que són de només 10-12 residus. Així mateix es desconeix quins dels residus adjacents als dos triplets d'Arg formarien també part de l'NLS.

Cal destacar que els dos triplets d'Arg es troben localitzats en regions exposades de la superfície de PE5, justament en dues de les tres superfícies de contacte entre l'enzim i l'hRI. Aquest fet suggereix que, si algun dels dos triplets (o bé tots dos) formen part de l'NLS, és probable que es produeixi un fenomen de competència entre l'hRI i les importines citoplasmàtiques per a la formació del complex, ja que aquestes darreres interaccionen amb l'enzim a nivell del seu NLS. D'aquesta manera, tal i com ja s'ha introduït prèviament, a més de promoure el transport de PE5 al nucli, els receptors citoplasmàtics podrien competir amb l'hRI per la interacció amb l'enzim. Així es podria explicar perquè l'enzim és capaç de dur a terme la seva acció tòxica tot i ser sensible a l'hRI. Amb les dades obtingudes fins al moment però, no es pot confirmar aquesta hipòtesi.

El fet que PE5 no mostri una major internalització respecte la resta de variants, ni resistència a l'hRI, ni una major estabilitat, ni tampoc una càrrega neta positiva superior (almenys respecte a l'HP-RNasa), indica que el transport actiu al nucli és el factor principal que en determina la citotoxicitat. S'obre d'aquesta manera una nova estratègia per al desenvolupament de ribonucleases citotòxiques, per mitjà de l'addició de segments NLS que determinin la seva direccionalització al nucli.

3.14. Discussió general

Un dels interessos del grup de recerca en el qual s'integra aquest treball consisteix en aprofundir en les bases moleculars que determinen la citotoxicitat de certes ribonucleases, a fi d'obtenir variants citotòxiques de l'HP-RNasa les quals, a més llarg termini, puguin ésser emprades com agents quimioterapèutics. Donat el seu origen humà, aquestes proteïnes serien probablement menys immunogèniques que les ribonucleases de reconeguda activitat citotòxica, com l'onconasa, d'origen amfibi, o la BS-RNasa, d'origen boví.

El mecanisme de citotoxicitat de les ribonucleases amb propietats citotòxiques està constituït essencialment per tres etapes. La primera consisteix en la interacció de la proteïna amb la superfície cel·lular i la seva internalització. La segona inclou el seu transport intracel·lular i la seva translocació al citoplasma, on la ribonucleasa té accés al seu substrat, l'RNA. La darrera etapa implica la degradació d'aquest substrat, per la qual cosa l'enzim ha de conservar les seves característiques estructurals i catalítiques, així com evitar el bloqueig de l'hRI (Rybak i Newton, 1999).

Les ribonucleases pancreàtiques, com l'RNasa A i l'HP-RNasa (totes dues sensibles a l'hRI), tot i ser mil vegades més actives sobre l'RNA que l'onconasa (Boix *et al.*, 1996), no són citotòxiques. Només l'onconasa i la forma dimèrica de la BS-RNasa, ambdues resistents a l'acció de l'hRI, presenten propietats citotòxiques (Murthy i Sirdeshmukh, 1992; Wu *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1995; Youle i D'Alessio, 1997). Arran d'aquests resultats, alguns autors han correlacionat la capacitat de resistència a l'hRI amb la toxicitat de les ribonucleases (Haigis *et al.*, 2003; Leland *et al.*, 1998).

Així, a fi d'obtenir variants citotòxiques de l'RNasa A o de l'HP-RNasa, diversos autors han utilitzat com a estratègia de treball la generació de formes de la proteïna resistents a l'hRI. Aquestes variants s'han obtingut per mitjà de la introducció d'impediments estèrics que bloquegen la unió amb l'hRI, com ara la formació de dímers a partir de ribonucleases monomèriques (Di Donato *et al.*, 1994; Di Gaetano *et al.*, 2001; Piccoli *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 1999), la unió de l'enzim a una molècula transportadora (De Lorenzo *et al.*, 2002; Futami *et al.*, 1999; Jinno *et al.*, 1996; Newton *et al.*, 2001a; Psarras *et al.*, 2000; Psarras *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1999; Youle *et al.*, 1993; Zewe *et al.*, 1997), o bé la substitució de residus situats en la interfície de contacte entre la ribonucleasa i l'hRI (Bretscher *et al.*, 2000; Gaur *et al.*, 2001; Leland *et al.*, 1998; Leland *et al.*, 2001).

L'estructura tridimensional del complex RNasa A + pRI (Kobe i Deisenhofer, 1995; Kobe i Deisenhofer, 1996) mostra que la superfície de contacte entre l'enzim i el seu inhibidor està localitzada en els llaços $\alpha 2\beta 1$, $\beta 2\beta 3$ i $\beta 4\beta 5$. Per a l'RNasa A, s'ha demostrat que les substitucions Gly88Arg o Gly88Asp, en el llaç $\beta 4\beta 5$, permeten que l'enzim escapi de l'acció de l'hRI (Leland *et al.*, 1998). En un treball

del nostre grup, es va construir una variant de l'HP-RNasa que presentava les substitucions Asn88Arg i Gly89Ser (Pous *et al.*, 2000). Amb aquests canvis, la seqüència d'aminoàcids en el llaç $\beta 4\beta 5$ era pràcticament idèntica a la que presentaven les variants de l'RNasa A construïdes per Leland *et al.* (1998) i que escapaven a l'hRI. Tanmateix, la nova variant derivada de la proteïna humana no va arribar a adquirir resistència a l'hRI. Aquest comportament diferencial ens va suggerir que l'HP-RNasa i l'RNasa A interaccionen de manera diferent amb l'inhibidor.

Atès que el nostre grup havia resolt l'estructura d'una variant de l'HP-RNasa (PM7), es va generar un model del complex PM7 + pRI (Pous *et al.*, 2000), utilitzant com a base l'estructura del complex RNasa A + pRI (Kobe i Deisenhofer 1996). Per la qual cosa es van substituir les coordenades atòmiques de l'RNasa A per les de PM7, i es van aplicar simulacions de dinàmica molecular i minimitzacions d'energia (Pous *et al.*, 2000).

En aquest model, es va observar que les interaccions entre l'HP-RNasa i l'hRI es reparteixen de manera més equitativa entre els tres llaços ja esmentats de l'enzim que no pas en els complexos RNasa A + pRI i angiogenina + hRI (Kobe i Deisenhofer, 1996; Papageorgiou *et al.*, 1997) (FIGURA 3.1). Es va observar que el llaç $\beta 2\beta 3$ exerceix un paper més important en la formació del complex PM7+pRI que en els altres dos complexos. Així doncs, per tal d'impedir la interacció de l'HP-RNasa amb l'hRI es va optar per dur a terme substitucions d'aminoàcids en més d'una regió alhora.

D'acord amb això, i utilitzant la variant PM5 de l'HP-RNasa (Canals *et al.*, 1999), en aquest treball s'han adoptat dues estratègies a fi d'obtenir variants citotòxiques. En la primera, es van reemplaçar aminoàcids en els tres llaços implicats en la formació del complex amb l'hRI ($\alpha 2\beta 1$, $\beta 2\beta 3$ i $\beta 4\beta 5$), amb la finalitat de generar variants resistents a l'inhibidor (sèrie PEx). En la segona, es va introduir un motiu RGD (Arg-Gly-Asp) en un o més dels tres llaços, a fi d'afavorir per una banda la seva interacció amb la superfície cel·lular i per tant millorar els seus rendiments d'internalització, i per l'altra afeblir també la interacció amb l'hRI (sèrie PIx). Així mateix, es va dissenyar una sèrie mixta que combinava les dues estratègies anteriors (PExPIx).

Pel que fa a les diferents variants dissenyades seguint la primera estratègia (veure FIGURA 3.2), cal destacar, per les característiques que es descriuen més endavant, les anomenades PE3 i PE5. La variant PE3 incorpora dos canvis aminoacídics, els quals introdueixen impediments electrostàtics i eliminen interaccions de van der Waals en els llaços $\alpha 2\beta 1$ (Arg31Glu) i $\beta 4\beta 5$ (Arg91Ala). La variant PE5 presenta dues substitucions en el llaç $\beta 4\beta 5$ (Gly89Arg i Ser90Arg), les quals generen un impediment estèric amb un grup de tres Trp de l'hRI.

Respecte a la segona estratègia, l'addició de motius RGD en regions de superfície de la proteïna, alguns autors sostenen que el fet que el motiu RGD es trobi a la superfície de la proteïna no és suficient per promoure la seva interacció amb el

receptor de la membrana plasmàtica, sinó que cal que cal que l'RGD se situï en un context compatible (Benito i Villaverde, 1994). En algunes proteïnes, el segment RGD es situa en un llaç llarg i flexible, tot i que amb una conformació definida (com és el cas de la proteïna VP1 del virus de la febre aftosa, Acharya *et al.*, 1989). No obstant, en pèptids sintètics s'han obtingut afinitats més elevades restringint la seva mobilitat amb enllaços disulfur (Zhang *et al.*, 1994). Donada aquesta variabilitat, es va decidir introduir el motiu RGD en diferents llaços de superfície de l'HP-RNasa. En el cas de les variants PE3I2 i PI5, aquest motiu substitueix els residus 66 a 68 situats en el llaç $\beta 2\beta 3$, el qual presenta un punt disulfur entre les Cys 65 i 72. A més, aquest motiu es va introduir en els llaços més flexibles $\alpha 2\beta 1$ i $\beta 4\beta 5$, el primer present en les variants PE3I1 i PI5 (substitucions Gln37Arg i Arg39Asp) i el segon present únicament en PI5 (substitucions Gly89Arg, Ser90Gly i Arg91Asp). Així mateix, aquestes substitucions van permetre eliminar un nombre important d'interaccions amb l'hRI.

En analitzar la resistència a l'hRI de les diferents variants obtingudes en aquest treball, es va observar que només les formes portadores de substitucions en més d'un llaç havien adquirit aquesta habilitat (PE3, PE3I1, PE3I2 i PI5). En concret, la variant PI5, la qual presenta el major nombre de substitucions (tres motius RGD, un a cadascun dels tres llaços), va mostrar la major capacitat d'evasió a l'hRI (FIGURA 3.11 i TAULA 3.4). Així doncs, i d'acord amb treballs previs (Gaur *et al.*, 2001; Leland *et al.*, 2001), es va confirmar que per tal d'incrementar el valor de K_i de l'HP-RNasa per l'inhibidor, és necessari introduir més d'un canvi en les regions implicades en la interfície de contacte proteïna-inhibidor. Pel que fa a la variant PE5, les substitucions realitzades pràcticament no van alterar la seva sensibilitat per l'inhibidor. Aquest resultat és també consistent amb les dades presentades pel treball de Gaur *et al.* (2001), en el qual les substitucions Gly89Arg i Ser90Arg sobre l'HP-RNasa no van modificar la seva afinitat per l'hRI.

Tot i que en el disseny de les variants es va intentar evitar la substitució de residus implicats en el procés de catàlisi, la substitució Lys66 per Arg en les variants PE3I2 i PI5 comportava un canvi en el subeti no catalític (p_0) d'interacció amb un grup fosfat del substrat (Nogués *et al.*, 1998). No obstant això, la substitució conservativa de la Lys per una Arg no va afectar dràsticament l'eficiència catalítica d'aquests dos enzims. Pel que fa a la resta de variants, en tots els casos es va observar una eficiència catalítica superior al 50 % de la presentada per PM5, indicant que probablement l'estructura de llur centre actiu era similar a la de la seva proteïna parental (TAULA 3.5).

Atès que les dades de citotoxicitat que s'obtenen experimentalment són una mesura indirecta del nombre de molècules capaces d'assolir l'interior de la cèl·lula i de dur-hi a terme la seva activitat catalítica, en un primer moment es van considerar com a millors candidates per esdevenir citotoxines, aquelles variants que van exhibir una elevada activitat enzimàtica en presència de l'hRI (PE3I1, PE3I2, PI5 i PE3).

Tanmateix, els resultats obtinguts en els experiments de citotoxicitat sobre les diverses línies cel·lulars assajades no van permetre establir una correlació directa

entre la capacitat de resistència a l'hRI i la citotoxicitat (FIGURES 3.12 i 3.13). De les diferents variants analitzades, només PE3 i PE5 van adquirir propietats citotòxiques sobre les diferents línies cel·lulars tumorals. PE5 va demostrar ser unes 10 vegades més citotòxica que PE3, excepte sobre la línia K562, la qual era sensible per igual a la toxicitat de les dues variants. Els valors d'IC₅₀ de PE5 foren entre 5-15 vegades majors que els de l'onconasa, inclosa en els assajos com a control positiu. PE3 i PE5 van presentar propietats citotòxiques del mateix ordre que les que presenten altres variants citotòxiques de l'HP-RNasa descrites en treballs previs (Gaur *et al.*, 2001; Leland *et al.*, 2001). D'acord amb les dades descrites a la literatura, la citotoxicitat de PE3 pot explicar-se per la seva resistència a l'hRI. No obstant, el fet que la proteïna més citotòxica, PE5, mostri una sensibilitat significativa per l'hRI ens indicaria que la toxicitat de les ribonucleases no requereix necessàriament la capacitat de resistència a l'inhibidor.

El fet que les variants portadores de motius RGD no adquirissin propietats citotòxiques, va indicar que la introducció d'aquest motiu en regions de superfície de les ribonucleases pancreàtiques no és efectiva per tal de promoure l'arribada de les proteïnes al citoplasma de la cèl·lula. Això no obstant, en aquest estudi no es podia descartar la possibilitat que el motiu RGD fos eficaç per promoure la internalització de les proteïnes, però que determinés una via de trànsit intracel·lular no productiva a nivell de translocació al citoplasma, com seria el cas de la via de reciclatge. En aquest sentit, alguns autors afirmen que la internalització de certs receptors d'integrina opera per un mecanisme d'endocitosi (Oh *et al.*, 1998), i que la seva manca de degradació (observada en el transcurs d'experiments de marcatge fluorescent) suggereix que aquestes proteïnes emprenen la via endosomal de reciclatge i no la via degradativa lisosomal (Ghosh *et al.*, 1998). Així, el complex lligand/receptor viatjaria a través del compartiment endosomal de reciclatge de nou cap a la superfície cel·lular. Aquests treballs deixaven la possibilitat, suposant que les variants portadores d'RGD s'unissin als receptors d'integrina de superfície cel·lular, que aquestes fossin internalitzades eficientment per aquests receptors, i que la via de trànsit seguida les allunyés del compartiment on es duu a terme la seva translocació al citoplasma. És a dir, malgrat que es podria afavorir la interacció i l'endocitosi de les variants, s'estaria promovent una via ineficient de transport intracel·lular. Això explicaria perquè la introducció dels motius RDG 37-39 o RGD 66-68 en la variant PE3 (donant lloc a PE3I1 i PE3I2, respectivament) va actuar en detriment de la citotoxicitat que aquesta variant havia adquirit.

L'estabilitat proteica és un paràmetre a tenir en compte a l'hora de dissenyar variants tòxiques de les ribonucleases. En aquest aspecte, s'ha descrit una correlació positiva entre la termostabilitat i la citotoxicitat de les ribonucleases pancreàtiques (Klink i Raines, 2000; Leland *et al.*, 2000). Per aquesta raó, les variants generades en aquest treball es van construir sobre la proteïna PM5, la qual presenta una termostabilitat superior a l'HP-RNasa salvatge (Benito *et al.*, 2002; Canals *et al.*, 1999). No obstant, totes les variants construïdes van mostrar una disminució de la termostabilitat respecte a PM5 (TAULA 3.6). Cal destacar que la variant citotòxica PE5 era la segona variant més inestable enfront de la temperatura. Aquests resultats

mostren que l'estabilitat proteica no és tampoc un requeriment estricte en la citotoxicitat de les ribonucleases, i contradiuen els resultats de treballs anteriors, que correlacionen un augment d'estabilitat d'aquestes amb la citotoxicitat.

En relació a PM5, PE5 presenta una menor termoestabilitat, una menor mobilitat electroforètica en gels de SDS-PAGE no reductors (FIGURA 3.16), i una menor resistència a la degradació per termolisina (FIGURA 3.17). Aquestes propietats diferencials van suggerir que la variant PE5 podria presentar una flexibilitat conformacional més elevada que la proteïna parental. Fet que podria permetre que, a l'internalitzar-se en una cèl·lula, l'enzim experimenti una reorganització estructural com a conseqüència de les condicions de pH i de temperatura que hi troba, facilitant la seva translocació des del compartiment d'endocitosi al citoplasma. En aquest sentit, es coneixen moltes toxines d'origen bacterià o vegetal (com la ricina i la toxina diftèrica) que són objecte d'un cert canvi conformacional una vegada endocitades, el qual els permet interaccionar i translocar a través de les membranes del compartiment que les ha internalitzat i accedir així al citoplasma (Beaumelle *et al.*, 1997; Falnes *et al.*, 1994; Lord i Roberts, 1998).

Pel que fa a la seva internalització, cap de les variants de l'HP-RNasa analitzades va mostrar ésser endocitada de manera significativa per les cèl·lules K562 (FIGURA 3.15). Així doncs, i en consonància amb les dades de citotoxicitat obtingudes, el motiu RGD no va promoure cap increment detectable en la internalització dels enzims. L'onconasa va ser internalitzada de manera eficient per aquestes cèl·lules, probablement com a conseqüència de la seva interacció amb algun component específic de superfície cel·lular (Leland i Raines, 2001). Així, l'elevada citotoxicitat de l'onconasa, en comparació a les diverses ribonucleases, s'explica probablement en part per la seva major eficiència d'internalització (Haigis i Raines, 2003; Wu *et al.*, 1993), a més de la seva capacitat d'evasió a l'hRI. Dels resultats d'internalització obtinguts també es conclou que la major citotoxicitat de PE5 respecte a la resta de variants de l'HP-RNasa no citotòxiques no és deguda a una eficiència d'internalització superior.

Respecte a les vies de trànsit que utilitzen les ribonucleases descrites com a citotòxiques (onconasa i BS-RNasa) per arribar al citoplasma, existeix encara poca informació. En general s'accepta que les ribonucleases assoleixen l'interior cel·lular per mitjà d'algun mecanisme que probablement és similar a l'utilitzat per les toxines vegetals o bacterianes (Roberts i Lord, 1992). Així, l'enzim que interacciona amb la superfície cel·lular i s'internalitza, és transportat a l'interior de la cèl·lula per la via endosomal i és translocat al citoplasma a partir d'algun dels orgànuls subcel·lulars, on podria dur a terme la seva acció catalítica sobre l'RNA.

Es va comprovar si la citotoxicitat de PE5 es podia explicar pel fet que aquest enzim estigués utilitzant una ruta d'internalització diferent a la seguida per les altres variants. Així doncs, es van analitzar les vies d'internalització que les variants emprenen. Per això es va mesurar l'efecte de diverses drogues que actuen modificant el trànsit intracel·lular a diferents nivells, sobre la citotoxicitat de les ribonucleases. Es va comprovar que la utilització de drogues que actuen alterant el gradient de pH

vesicular (monensina, NH_4Cl i bafilomicina A_1) no protegia les cèl·lules de la toxicitat dels enzims, sinó que, ben al contrari, potenciava la seva toxicitat de manera proporcional a l'increment del pH (TAULA 3.8 i FIGURA 3.18). Aquests resultats indiquen que el manteniment d'un pH àcidic en els compartiments del sistema endosomal no és un requeriment necessari per la citotoxicitat de les variants. Així mateix, les dades aportades pel tractament amb BFA mostren que la via de transport retrògrad no està implicada en el mecanisme de toxicitat de les variants assajades (TAULA 3.8 i FIGURA 3.18). Per tant, les diverses variants de l'HP-RNasa transloquen en algun punt pertanyent a la via endocítica o a les xarxes d'interconnexió entre els endosomes i l'AG, sense requerir un AG íntegre ni tampoc el reticle endoplasmàtic. Resultats similars a aquests han estat descrits recentment per una variant citotòxica de l'RNasa A (Gly88Arg RNasa A) i per l'onconasa (Haigis i Raines, 2003). Així mateix, els resultats obtinguts a partir de les mesures de citotoxicitat en presència de drogues no indiquen diferències entre el camí seguit per PE5 i el de les altres variants.

A fi d'estudiar amb més detall la possible existència d'una via alternativa de transport per a PE5 que expliqués la seva major citotoxicitat, es van estudiar les vies de trànsit intracel·lular d'algunes variants marcades fluorescentment PE3I1 (no citotòxica i resistent a l'hRI), PE5 (citotòxica i sensible a l'hRI) i PM5 (control no citotòxic i sensible a l'hRI). La visualització d'aquests enzims a l'interior de cèl·lules A431 per mitjà de microscòpia confocal de fluorescència només va tenir lloc a partir de les 24 h d'incubació, d'acord amb els baixos rendiments d'internalització observats per marcatge radioactiu. Així mateix, no es van detectar diferències pel que fa a la ruta intracel·lular seguida per PE5, PE3I1 i PM5. Les tres proteïnes segueixen la via de degradació que les condueix cap als lisosomes (FIGURES 3.19, 3.20 i 3.21). Donat que no es va observar colocalització de PE3I1 amb marcadors del compartiment de reciclatge, es descarta la hipòtesi apuntada anteriorment, la qual suggeria que el motiu RGD podia promoure la internalització eficient de l'enzim, dirigint-lo per la via de reciclatge cap a l'exterior de la cèl·lula, i per tant allunyant-lo del compartiment en el qual la translocació al citoplasma és viable. Sembla ser, per tant, que els motius RGD no han estat reconeguts eficientment pels receptors d'integrines, almenys en les línies cel·lulars utilitzades.

A més, no es va trobar cap evidència de que els enzims segueixin la via de trànsit retrògrada envers l'AG o envers el reticle endoplasmàtic (FIGURA 3.20). La comparació de les imatges obtingudes per microscòpia confocal en presència i en absència de drogues que alteren la via secretòria (brefeldina A i monensina), no mostra alteracions en la localització dels enzims estudiats, confirmant les dades obtingudes a partir de les anàlisis de citotoxicitat en presència de les mateixes drogues (FIGURA 3.22). Aquest resultat doncs, reforça el fet, prèviament indicat, que la via de trànsit intracel·lular que segueixen aquestes variants per assolir el citoplasma no inclou ni l'AG ni el reticle endoplasmàtic. El lleuger efecte potenciador de la toxicitat d'aquestes proteïnes que van mostrar la monensina i la brefeldina A, fou probablement conseqüència de les alteracions que van provocar aquestes drogues sobre la via de trànsit endosomal, frenant així el transport als

lisosomes. L'increment del pH endosomal, en el cas de la monensina, i la inhibició de processos implicats en la generació de vesícules intermediàries de transport, en el cas de la brefeldina A, explicarien els efectes observats.

La bafilomicina A₁, l'agent més eficient per neutralitzar el gradient de pH endosomal, va demostrar ser la droga amb un efecte potenciador més important sobre la citotoxicitat de les ribonucleases estudiades (TAULA 3.8 i FIGURA 3.18). Tanmateix, per microscòpia confocal es va comprovar que la neutralització del pH endosomal per efecte d'aquesta droga altera només lleugerament la localització intracel·lular de PE5 respecte a la seva localització en la seva absència (FIGURA 3.22). Així, en presència de bafilomicina A₁, PE5 no es localitza només en els lisosomes, sinó també en tots els compartiments previs de la ruta endosomal. Aquest resultat evidencia que la droga no bloqueja totalment la ruta de transport, sinó que només hi provoca un cert retard. Això suposa que un menor nombre de molècules de PE5 assoleix els lisosomes. A aquest fet cal sumar-hi la reducció de la degradació lisosomal, com a conseqüència de la inhibició dels enzims hidrolítics per efecte de la neutralització del pH lisosomal. Així, la potenciació en la citotoxicitat de PE5 en presència de bafilomicina A₁ s'explicaria per una disminució en el nombre de molècules que són degradades pels lisosomes. Aquests resultats confirmen que és en algun dels compartiments la via endocítica on es produeix l'accés de les ribonucleases al citoplasma.

Aquestes dades no descarten la possibilitat que d'altres ribonucleases citotòxiques presentin rutes alternatives de transport. Diversos autors han suggerit l'existència de més d'una ruta de trànsit intracel·lular per l'onconasa i la BS-RNasa (Boix *et al.*, 1996; Bracale *et al.*, 2002; Haigis i Raines, 2003; Newton *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1995). Alguna d'aquestes rutes podria ser eficient per què tingui lloc la translocació de l'enzim al citoplasma i, en conseqüència, per la seva citotoxicitat. Treballs previs suggereixen, d'acord amb les nostres dades, que els dos enzims són internalitzats per endocitosis via vesícules àcides, però no exclouen la participació l'AG per la via retrògrada, ja que la utilització de drogues que el dispersen va potenciar la citotoxicitat d'ambdues ribonucleases. En conseqüència, es va suggerir que la disgregació de la via de trànsit utilitzada per l'enzim en condicions normals per efecte de drogues, com la brefeldina A, determinava que una major quantitat de l'enzim internalitzat emprengués una via alternativa més efectiva a nivell de citotoxicitat. Així, segons diversos autors, la desorganització de l'AG probablement facilita la translocació a través de les seves membranes d'un major nombre d'unitats d'enzim al citoplasma.

L'endocitosis de la variant citotòxica PE5 i de la parental PM5 marcades fluorescentment no va ser inhibida per un excés de la corresponent proteïna no marcada. Això indica que no es va produir competència per la interacció de les ribonucleases amb algun receptor específic. Aquestes dades suggereixen que les dues variants són internalitzades per endocitosis en fase fluïda. Aquest resultat és consistent amb la destinació lisosomal de les ribonucleases endocitades (FIGURES 3.19, 3.20, 3.21 i 3.22), i amb la seva baixa eficiència d'internalització amb relació a

l'onconasa (FIGURA 3.15). Pel que fa a la internalització de l'onconasa i l'RNasa A en cèl·lules K562, el treball de Haigis i Raines (2003) confirma la participació del mecanisme d'endocitosi no saturable i independent de clatrina.

En resum, els resultats obtinguts en aquest punt del treball evidencien que PE5 segueix la mateixa via d'arribada al citoplasma que la resta de variants, de manera que la major citotoxicitat d'aquesta variant no depèn d'una ruta de trànsit intracel·lular alternativa. Per aquesta raó, es va suposar que les propietats tòxiques de PE5 podrien ser conseqüència d'una major eficiència de translocació al citoplasma a través de les membranes endosomals. En treballs previs s'ha observat que existeix una correlació directa entre la càrrega positiva neta de variants de les ribonucleases pancreàtiques i l'increment de la seva citotoxicitat (Futami *et al.*, 2001; Futami *et al.*, 2002), que es relaciona amb una major facilitat d'aquestes proteïnes per interaccionar amb les membranes cel·lulars i per translocar al citoplasma. Així, es va analitzar la càrrega neta de les variants estudiades. Es va comprovar que PE5 és la variant més bàsica de totes les assajades. Això no obstant, PE5 presenta una càrrega neta idèntica a la de l'HP-RNasa salvatge, la qual no és citotòxica. Aquesta observació suggerí que tal vegada el paràmetre que determinava les propietats especials de PE5 no era la càrrega neta en sí mateixa, sinó la seva distribució local en regions de la superfície de la proteïna, ja que a diferència de l'HP-RNasa, en PE5 les càrregues positives es concentren majoritàriament en un sol costat de la molècula (FIGURA 3.23).

Aquesta regió de caràcter extremadament bàsic està constituïda per dos segments de tres Arg (llaços $\alpha 2\beta 1$ i $\beta 4\beta 5$) que, malgrat estar separats a nivell de seqüència per uns 60 amino àcids, en l'estructura tridimensional de la proteïna se situen propers en l'espai. La presència d'aquests triplets d'Arg en PE5 podria actuar com una seqüència de localització nuclear, suggerint la possibilitat de què la citotoxicitat d'aquesta variant fos una conseqüència del seu transport al nucli. Suposant que els baixos rendiments d'endocitosi de PE5 haguessin estat els responsables de la seva manca de detecció a nucli en les anàlisis de trànsit intracel·lular descrits, es va modificar el protocol assajat a fi de permetre l'entrada d'un major nombre de molècules de ribonucleasa al citoplasma de la cèl·lula. Així, es va permeabilitzar de manera selectiva la membrana plasmàtica de cèl·lules A431, tot deixant l'embolcall nuclear intacte. Els resultats van mostrar una intensa acumulació nuclear de PE5, la qual depenia de l'aport d'energia. Aquesta concentració era molt superior a la de PM5 en les mateixes condicions.

Per comprovar si PE5 seguia la via clàssica de transport nuclear actiu, es va comparar la seva translocació al nucli amb la que experimenta la proteïna BSA-NLS-FITC, utilitzada com a control positiu. Els resultats van evidenciar que el nivell d'acumulació nuclear de les dues proteïnes era idèntic, tal i com es pot observar si es comparen les imatges obtingudes de l'anàlisi del transport actiu de PE5 (FIGURA 3.32) i de la BSA-NLS-FITC (FIGURA 3.31). Confirmant aquest resultat, l'acumulació nuclear de PE5 era inhibida per l'absència d'ATP i per la presència de GTP γ S, evidenciant que el procés de transport nuclear actiu de PE5 segueix la via clàssica, dependent de Ran. Així, la presència dels dos triples d'Arg presents en PE5

podrien dotar aquesta proteïna amb una seqüència NLS, promovent la interacció de l'enzim amb els receptors nucleocitoplasmàtics, les importines. El transport actiu de l'enzim al nucli permetria la degradació de l'rRNA del nuclèol, ja que aquest compartiment no presenta l'hRI (Hofsteenge, 1997; Lee i Vallee, 1993).

PM5 en canvi, no va demostrar seguir la via activa de transport nuclear, dependent d'energia. Això no obstant, la seva mida li permet difondre passivament a l'interior del nucli, on s'acumula en determinades regions del nucleoplasma (FIGURA 3.33). Així mateix, la inhibició del transport nuclear actiu de PE5 va mostrar que les molècules d'enzim translocades al nucli per difusió passiva també s'acumulen en forma de petits agregats a l'interior d'aquest compartiment (FIGURA 3.32). Segons la caracterització immunocitoquímica, les estructures on s'acumula la proteïna són els nuclèols, el compartiment en el qual es produeix la síntesi i el processament dels rRNAs de la cèl·lula (FIGURA 3.34).

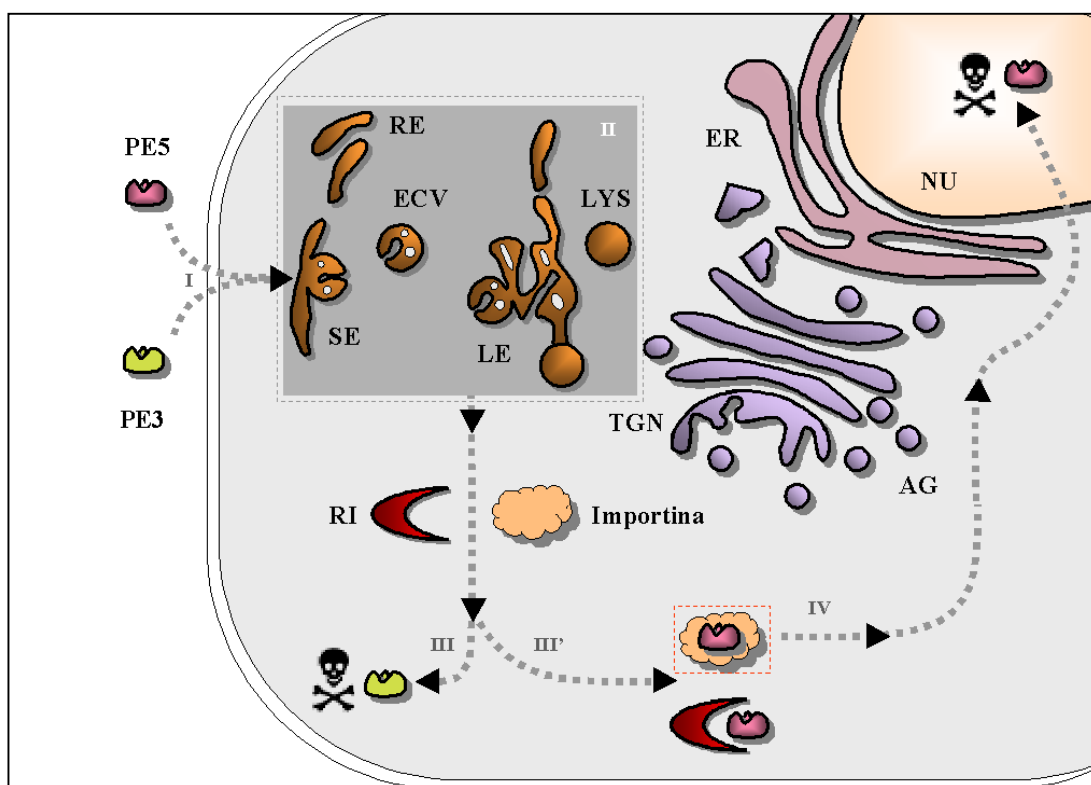
L'acumulació de PE5 al nucli per la via clàssica de transport sembla ser el resultat de les substitucions d'aminoàcids dutes a terme, les quals han permès dotar l'enzim amb una seqüència reconeguda per la maquinaria d'importació nuclear. La seqüència d'aquesta regió que actua com a NLS es desconeix. Podria incloure els dos segments de tres Arg, 31-33 i 89-91, així com alguns residus adjacents a aquests dos segments, o bé només la regió del voltant dels residus substituïts. Donat que el triplet d'Arg addicional (fruit de la introducció de les Arg 89 i 90) està situat en el llaç $\beta_4\beta_5$, el qual és una de les tres regions de contacte entre l'enzim i l'hRI, es pot hipotetitzar que es podria produir una certa competència entre les importines citoplasmàtiques (que s'uneixen a l'enzim gràcies a la seqüència NLS) i l'hRI a l'hora de formar el complex amb l'enzim. Aquest fenomen podria explicar perquè la variant PE5, tot i ser significativament sensible a l'hRI, és capaç de defugir la seva acció inhibidora en el citoplasma de la cèl·lula.

En resum, la substitució de dos residus en la seqüència de PM5 per dues Arg, generant la variant citotòxica PE5, no promou significativament la resistència a l'hRI, ni un augment de la termostabilitat, ni una major eficiència d'internalització en relació a la resta de variants descrites. No obstant, PE5 és reconeguda per la maquinaria d'importació nuclear. Les característiques que distingeixen PE5 de la resta de variants són una certa flexibilitat estructural i la seva acumulació nuclear/nucleolar. Considerant els resultats obtinguts en aquest treball, a la FIGURA 3.35 es presenta el mecanisme de citotoxicitat que es proposa per a les variants citotòxiques PE3 i PE5.

El procés s'inicia amb la interacció dels enzims a la membrana plasmàtica de la cèl·lula, i per la seva internalització via endosomal per endocitosi en fase fluïda. En algun punt de la ruta endocítica de trànsit intracel·lular, previ als lisosomes, un cert nombre de molècules d'enzim aconsegueix travessar les membranes endosomals i translocar al citoplasma, defugint així de la degradació lisosomal. Una vegada en el citoplasma, PE3 i PE5 actuen de manera diferent. Gràcies a la capacitat d'eludir l'acció inhibidora de l'hRI, PE3 pot dur a terme la seva activitat enzimàtica sobre els RNAs que es troben en el citoplasma, conduint a la mort de la cèl·lula. Pel que fa a

PE5, tot i que pot ésser inhibida per l'hRI, una certa fracció interacciona amb una família de receptors nucleocitoplasmàtics, les importines, les quals envien l'enzim al nucli. L'afinitat de PE5 per les importines resta encara per caracteritzar. Probablement el procés d'interacció de l'enzim amb les importines i amb l'hRI té lloc al mateix moment, establint-se així una certa competència. Una vegada PE5 assoleix el nucli, i donada la seva afinitat per l'rRNA, aquesta proteïna s'acumula al nuclèol (FIGURA 3.34), on duu a terme la seva activitat catalítica sense impediments (el nucli està desprovist d'hRI), probablement inhibint la síntesi dels ribosomes i provocant la mort de la cèl·lula. És probable que la translocació al nucli d'un nombre reduït de ribonucleases sigui suficient per desencadenar un efecte citotòxic en la cèl·lula.

FIGURA 3.35.



Model de les vies de trànsit intracel·lular següents per les variants PE3 i PE5. **I.** Ambdós enzims interaccionen amb la superfície de la cèl·lula diana i són endocitats per pinocitosi en fase fluïda. **II.** Tot seguit entren en la via de trànsit endosomal, en algun punt d'aquesta ruta un cert nombre d'unitats d'enzim aconsegueixen travessar la bicapa lipídica dels endosomes i translocar al citoplasma. **III.** Una vegada en el citoplasma, PE3 escapa a l'hRI i catalitza la degradació de l'rRNA cel·lular, provocant la mort de la cèl·lula. **III'.** PE5 en canvi, és acomplexada per l'hRI i per les importines citoplasmàtiques, establint-se una competència per la interacció amb l'enzim. **IV.** Les importines s'acomplexen amb una fracció de molècules de PE5 a partir d'una regió que actuaria com un NLS, i el condueixen al nucli/nuclèol, on l'enzim duu a terme la seva acció catalítica sobre l'rRNA, provocant així la mort de la cèl·lula.

En aquest treball de tesi es presenta una nova estratègia per a l'obtenció de variants de l'HP-RNasa citotòxiques, la qual es basa en la introducció, via mutagènesi dirigida, de motius de transport al nucli. Aquest sistema és d'esperar que permeti superar les limitacions fins ara descrites en la bibliografia, com ara la reduïda internalització de les variants i la presència de l'hRI citoplasmàtic.

4. Conclusions

4. *Conclusions*

1. L'expressió heteròloga del gen de PM5 no es troba alterada per les diverses mutacions dirigides a obtenir variants citotòxiques de l'HP-RNasa. Així mateix, el rendiment de purificació de les variants no es troba afectat, a excepció de la variant PI5, la qual mostra una recuperació lleugerament inferior.
2. El procés d'expressió heteròloga, purificació i activació de la (M23L)-onconasa mostra ser vàlid i eficaç per la producció, de manera ràpida i simple, d'una quantitat important d'enzim recombinant. La proteïna és catalíticament activa i presenta propietats citotòxiques idèntiques a les de la forma no recombinant.
3. Els experiments d'interacció de les HP-RNases variants amb l'hRI revelen que només aquelles proteïnes que presenten substitucions en més d'un dels llaços implicats en la formació del complex adquireixen resistència a l'hRI. Es el cas de les variants PE3I1, PE3I2, PI5 i PE3.
4. La caracterització de les propietats citotòxiques de les ribonucleases en estudi sobre diverses línies cel·lulars tumorals, utilitzant PM5 i onconasa com a

4. Conclusions

controls, mostra que les variants PE5 i PE3 son citotòxiques. PE5 és més citotòxica que PE3, exceptuant la línia K562, on ambdues proteïnes presenten un valor d'IC50 equivalent. L'activitat citotòxica adquirida per PE5 és només entre 10 i 15 vegades inferior a la de l'onconasa. Així doncs, la generació de variants resistents a l'hRI no és un requeriment imprescindible per obtenir una ribonucleasa pancreàtica citotòxica.

5. L'estudi i comparació del procés d'internalització del conjunt de variants, així com de l'onconasa, marcades radioactivament, mostra que no existeixen diferències d'internalització entre les diverses variants assajades, i que l'onconasa és internalitzada de manera molt més eficient. Això suggereix que la major citotoxicitat observada per l'onconasa es deu probablement a que un major nombre de molècules assoleixen l'interior de la cèl·lula.
6. Els paràmetres cinètics determinats per cadascuna de les variants quan s'utilitzen els substrats C>p i poli(C), indiquen que aquestes proteïnes presenten una eficiència catalítica superior al 50 % de la presentada per l'enzim parental, fet que suggereix que l'estructura del seu centre actiu és, si bé no idèntica, similar.
7. L'anàlisi del procés de desplegament, enfront d'un augment gradual de temperatura, de les diferents variants, així com de PM5, mostra que les substitucions introduïdes actuen en detriment de l'estabilitat proteica. La diferència de termostabilitat ($\Delta T_{1/2}$) de les variants PI5, PE5 i PE3I2 és superior a 10°C.
8. La generació de variants citotòxiques més inestables que la proteïna parental suggereix que l'estabilitat proteica enfront de la temperatura no està sempre directament relacionada amb la citotoxicitat (sempre que no es superi el dintell de la seva integritat estructural).
9. La comparació de la citotoxicitat de les diverses variants de l'HP-RNasa i de l'onconasa, en presència de drogues disruptores de les vies de trànsit intracel·lular, indica que el manteniment d'un pH endosomal acídic no és essencial per la translocació de les ribonucleases al citoplasma, i indica que totes elles segueixen una mateixa via d'internalització. També s'observa que la via de trànsit retrògrada no està implicada en la via de transport efectiva a citoplasma.
10. La colocalització de les variants de l'HP-RNasa amb diferents marcadors d'òrgànuls intracel·lulars, seguida per microscòpia confocal de fluorescència, indica que aquestes proteïnes segueixen la ruta endocítica que condueix als lisosomes, sense que tingui lloc un transport retrògrad envers l'AG o el reticle endoplasmàtic.

4. Conclusions

11. La neutralització del gradient de pH endosomal per efecte de la bafilomicina A₁, i en menor grau per la monensina i el clorur amònic, potencia la citotoxicitat de les variants PE5 i PE3, així com de l'onconasa. Això pot ser degut a un alentiment del procés de transport dels enzims als lisosomes.
12. L'absència de competència en el procés d'internalització de les variants assajades demostra que aquestes no interaccionen amb components específics de superfície cel·lular, i que probablement són endocitades per pinocitosis en fase fluïda. Aquest fet és consistent amb la baixa eficiència d'internalització d'aquestes variants en relació amb l'onconasa, per la qual s'ha descrit un seti específic d'unió a la superfície cel·lular.
13. La introducció d'un segon motiu de tres Arg en el llaç $\beta 4\beta 5$ (variant PE5) dota la proteïna amb una senyal de tipus NLS reconeguda per la maquinaria de transport nuclear. L'enzim, que arriba al citoplasma a partir d'algun punt del sistema endosomal, és conduït ràpidament al nucli de la cèl·lula per mitjà d'un mecanisme de transport actiu dependent d'ATP, i es concentra al nuclèol, on probablement catalitza la degradació de l'rRNA, provocant així la mort de la cèl·lula.
14. La direccionalització de la HP-RNasa al nucli representa una nova estratègia d'obtenció de ribonucleases humanes citotòxiques. Aquesta estratègia permet superar els dos factors limitants que fins al moment havien dificultat l'obtenció de ribonucleases pancreàtiques amb propietats citotòxiques: la sensibilitat a l'hRI i l'eficiència d'internalització.

5. Bibliografia

5. Bibliografia

- Adam, S.A., Marr, R.S. i Gerace, L. (1990) Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J Cell Biol*, **111**, 807-816.
- Adinolfi, B.S., Cafaro, V., D'Alessio, G. i Di Donato, A. (1995) Full antitumor action of recombinant seminal ribonuclease depends on the removal of its N-terminal methionine. *Biochem Biophys Res Commun*, **213**, 525-532.
- Aguilar, C.F., Thomas, P.J., Mills, A., Moss, D.S. i Palmer, R.A. (1992) Newly observed binding mode in pancreatic ribonuclease. *J Mol Biol*, **224**, 265-267.
- Alami, M., Taupiac, M.P., Reggio, H., Bienvenue, A. i Beaumelle, B. (1998) Involvement of ATP-dependent *Pseudomonas* exotoxin translocation from a late recycling compartment in lymphocyte intoxication procedure. *Mol Biol Cell*, **9**, 387-402.
- Aleksandrowicz, J. (1958) Intracutaneous ribonuclease in chronic myelocytic leukaemia. *Lancet*, **1**, 420-422.
- Allewel, N.M., Mitsui, Y. i Wyckoff, H.W. (1973) *J Biol Chem*, **248**, 5291-5298.
- Anfinsen, C.B., Flavin, M. i Fansworth, J. (1952) *Biochim Biophys Acta*, **9**, 468.

5. Bibliografia

- Aniento, F. i Gruenberg, J. (1995) Membrane transport from early to late endosomes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **60**, 205-209.
- Aniento, F., Emans, N., Griffiths, G. i Gruenberg, J. (1993) Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J Cell Biol*, **123**, 1373-1387.
- Ardelt, W., Mikulski, S.M. i Shogen, K. (1991) Amino acid sequence of an anti-tumor protein from *Rana pipiens* oocytes and early embryos. Homology to pancreatic ribonucleases. *J Biol Chem*, **266**, 245-251.
- Argent, R.H., Roberts, L.M., Wales, R., Robertus, J.D. i Lord, J.M. (1994) Introduction of a disulfide bond into ricin A chain decreases the cytotoxicity of the ricin holotoxin. *J Biol Chem*, **269**, 26705-26710.
- Aridor, M. i Hannan, L.A. (2000) Traffic jam: a compendium of human diseases that affect intracellular transport processes. *Traffic*, **1**, 836-851.
- Badet, J. (1999) Angiogenin, a potent mediator of angiogenesis. Biological, biochemical and structural properties. *Pathol Biol (Paris)*, **47**, 345-351.
- Bal, H.P. i Batra, J.K. (1997) Human pancreatic ribonuclease--deletion of the carboxyl-terminal EDST extension enhances ribonuclease activity and thermostability. *Eur J Biochem*, **245**, 465-469.
- Bannykh, S.I. i Balch, W.E. (1997) Membrane dynamics at the endoplasmic reticulum-Golgi interface. *J Cell Biol*, **138**, 1-4.
- Barker, R.L., Loegering, D.A., Ten, R.M., Hamann, K.J., Pease, L.R. i Gleich, G.J. (1989) Eosinophil cationic protein cDNA. Comparison with other toxic cationic proteins and ribonucleases. *J Immunol*, **143**, 952-955.
- Barnard, E.A. (1969) Biological function of pancreatic ribonuclease. *Nature*, **221**, 340-344.
- Bartholeyns, J. i Baudhuin, P. (1976) Inhibition of tumor cell proliferation by dimerized ribonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 573-576.
- Bartholeyns, J., Peeters-Joris, C. i Baudhuin, P. (1975a) Hepatic nucleases. Extrahepatic origin and association of neutral liver ribonuclease with lysosomes. *Eur J Biochem*, **60**, 385-393.
- Bartholeyns, J., Peeters-Joris, C., Reychler, H. i Baudhuin, P. (1975b) Hepatic nucleases. 1. Methods for the specific determination and characterization in rat liver. *Eur J Biochem*, **57**, 205-211.
- Batey, R.T. i Doudna, J.A. (2002) Structural and energetic analysis of metal ions essential to SRP signal recognition domain assembly. *Biochemistry*, **41**, 11703-11710.
- Bayer, N., D. Schober, et al. (1998). Effect of bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: implications for viral uncoating and infection. *J Virol*, **72**, 9645-55.

5. Bibliografia

- Beaumelle, B., Alami, M. i Hopkins, C.R. (1993) ATP-dependent translocation of ricin across the membrane of purified endosomes. *J Biol Chem*, **268**, 23661-23669.
- Beaumelle, B.D., Gibson, A. i Hopkins, C.R. (1990) Isolation and preliminary characterization of the major membrane boundaries of the endocytic pathway in lymphocytes. *J Cell Biol*, **111**, 1811-1823.
- Beintema, J.J. i Kleinedam, R.G. (1998) The ribonuclease A superfamily: general discussion. *Cell Mol Life Sci*, **54**, 825-832.
- Beintema, J.J., Schuller, C., Irie, M. i Carsana, A. (1988) Molecular evolution of the ribonuclease superfamily. *Prog Biophys Mol Biol*, **51**, 165-192.
- Beintema, J.J., Wietzes, P., Weickmann, J.L. i Glitz, D.G. (1984) The amino acid sequence of human pancreatic ribonuclease. *Anal Biochem*, **136**, 48-64.
- Bénichou, S. i Benmerah, A. (2003) Protéines Nef du VIH et K3/K5 du virus associé au sarcome de Kaposi: des "parasites" de la voie d'endocytose. *Medicine/Sciences*, **19**, 100-106.
- Benito, A., Bosch, M., Torrent, G., Ribó, M. i Vilanova, M. (2002) Stabilization of human pancreatic ribonuclease through mutation at its N-terminal edge. *Protein Eng*, **15**, 887-893.
- Benner, S.A. i Allemann, R.K. (1989) The return of pancreatic ribonucleases. *Trends Biochem Sci*, **14**, 396-397.
- Bilge, A., Warner, C.V. i Press, O.W. (1995) Translocation of ricin A-chain into proteoliposomes reconstituted from Golgi and endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **270**, 23720-23725.
- Blackburn, P. i Moore, S. (1982) A "The enzymes" (Ed. Boyer, P. D.). **15**, 317-433.
- Blackburn, P., Wilson, G. i Moore, S. (1977) Ribonuclease inhibitor from human placenta. Purification and properties. *J Biol Chem*, **252**, 5904-5910.
- Boix, E., Wu, Y., Vasandani, V.M., Saxena, S.K., Ardelt, W., Ladner, J. i Youle, R.J. (1996) Role of the N terminus in RNase A homologues: differences in catalytic activity, ribonuclease inhibitor interaction and cytotoxicity. *J Mol Biol*, **257**, 992-1007.
- Bomsel, M., Parton, R., Kuznetsov, S.A., Schroer, T.A. i Gruenberg, J. (1990) Microtubule- and motor-dependent fusion in vitro between apical and basolateral endocytic vesicles from MDCK cells. *Cell*, **62**, 719-731.
- Boque, L., Gracia Coll, M., Vilanova, M., Cuchillo, C.M. i Fita, I. (1994) Structure of ribonuclease A derivative II at 2.1-Å resolution. *J Biol Chem*, **269**, 19707-19712.
- Borkakoti, N., Palmer, R.A., Haneef, I. i Moss, D.S. (1983) *J Mol Biol*, **169**, 743-755.

5. Bibliografia

- Bracale, A., Spalletti-Cernia, D., Mastronicola, M., Castaldi, F., Mannucci, R., Nitsch, L. i D'Alessio, G. (2002) Essential stations in the intracellular pathway of cytotoxic bovine seminal ribonuclease. *Biochem J*, **362**, 553-560.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Bravo, J., Fernandez, E., Ribó, M., de Llorens, R. i Cuchillo, C.M. (1994) A versatile negative-staining ribonuclease zymogram. *Anal Biochem*, **219**, 82-86.
- Bretscher, L.E., Abel, R.L. i Raines, R.T. (2000) A ribonuclease A variant with low catalytic activity but high cytotoxicity. *J Biol Chem*, **275**, 9893-9896.
- Canals, A., Pous, J., Guasch, A., Benito, A., Ribó, M., Vilanova, M. i Coll, M. (2001) The structure of an engineered domain-swapped ribonuclease dimer and its implications for the evolution of proteins toward oligomerization. *Structure (Camb)*, **9**, 967-976.
- Canals, A., Ribó, M., Benito, A., Bosch, M., Mombelli, E. i Vilanova, M. (1999) Production of engineered human pancreatic ribonucleases, solving expression and purification problems, and enhancing thermostability. *Protein Expr Purif*, **17**, 169-181.
- Carreras, E., Boix, E., Rosenberg, H.F., Cuchillo, C.M. i Nogués, M.V. (2003) Both aromatic and cationic residues contribute to the membrane-lytic and bactericidal activity of eosinophil cationic protein. *Biochemistry*, **42**, 6636-6644.
- Chege, N. W. and S. R. Pfeffer (1990). Compartmentation of the Golgi complex: brefeldin-A distinguishes trans-Golgi cisternae from the trans-Golgi network. *J Cell Biol*, **111**, 893-9.
- Clague, M. J., S. Urbe, et al. (1994). Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J Biol Chem*, **269**, 21-4.
- Cohen, S.N., Chan, A.C.Y. i Hsu, L. (1972) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**, 2110.
- Conde, F.P., Orlandi, R., Canevari, S., Mezzanzanica, D., Ripamonti, M., Munoz, S.M., Jorge, P. i Colnaghi, M.I. (1989) The Aspergillus toxin restriction is a suitable cytotoxic agent for generation of immunoconjugates with monoclonal antibodies directed against human carcinoma cells. *Eur J Biochem*, **178**, 795-802.
- Conner, S.D. i Schmid, S.L. (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, **422**, 37-44.
- Crider, B. P., X. S. Xie, et al. (1994). Bafilomycin inhibits proton flow through the H⁺ channel of vacuolar proton pumps. *J Biol Chem* **269**, 17379-81.
- Crook, E.M., Mathias, A.P. i Rabin, B.R. (1960) *Biochem.*, **74**, 234-238.
- Cuchillo, C., Vilanova, M. i Nogués, M.V. (1997) *A "Ribonucleases: Structures and Functions"*. Academic Press, New York.

5. Bibliografia

- Cuchillo, C.M., Pares, X., Guasch, A., Barman, T., Travers, F. i Nogués, M.V. (1993) The role of 2',3'-cyclic phosphodiesterases in the bovine pancreatic ribonuclease A catalysed cleavage of RNA: intermediates or products? *FEBS Lett*, **333**, 207-210.
- D'Alessio, G. (1993) *Trends Cell Biol*, **3**, 106-109.
- D'Alessio, G.i.R., J. F. (1997) *Ribonucleases, Structures and Functions*. Academic Press, New York.
- D'Arrigo, A., C. Bucci, et al. (1997). Microtubules are involved in bafilomycin A1-induced tubulation and Rab5-dependent vacuolation of early endosomes. *Eur J Cell Biol* **72**, 95-103.
- Darzynkiewicz, Z., Carter, S.P., Mikulski, S.M., Ardelt, W.J. i Shogen, K. (1988) Cytostatic and cytotoxic effects of Pannon (P-30 Protein), a novel anticancer agent. *Cell Tissue Kinet*, **21**, 169-182.
- De Duve, C. (1991) *Blueprint for a Cell: The Nature and Origin of Life*. Patterson, Burlington, North Carolina.
- de Kreij, A., van den Burg, B., Veltman, O.R., Vriend, G., Venema, G. i Eijnsink, V.G. (2001) The effect of changing the hydrophobic S1' subsite of thermolysin-like proteases on substrate specificity. *Eur J Biochem*, **268**, 4985-4991.
- de Lamirande, G. (1961) Action of deoxyribonuclease and ribonuclease on the growth of Ehrlich ascites carcinoma in mice. *Nature*, **192**, 52-53.
- delCardayre, S.B. i Raines, R.T. (1994) Structural determinants of enzymatic processivity. *Biochemistry*, **33**, 6031-6037.
- Deonarain, M.P. i Epenetos, A.A. (1998) Design, characterization and anti-tumour cytotoxicity of a panel of recombinant, mammalian ribonuclease-based immunotoxins. *Br J Cancer*, **77**, 537-546.
- Deutscher, M.P. (1988) The metabolic role of RNases. *Trends Biochem Sci*, **13**, 136-139.
- Deutscher, M.P. (1993) Ribonuclease multiplicity, diversity, and complexity. *J Biol Chem*, **268**, 13011-13014.
- Deutscher, M.P. i Li, Z. (2001) Exoribonucleases and their multiple roles in RNA metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **66**, 67-105.
- D'Hondt, K., Heese-Peck, A. i Riezman, H. (2000) Protein and lipid requirements for endocytosis. *Annu Rev Genet*, **34**, 255-295.
- Di Donato, A., Cafaro, V. i D'Alessio, G. (1994) Ribonuclease A can be transformed into a dimeric ribonuclease with antitumor activity. *J Biol Chem*, **269**, 17394-17396.
- Dodge, R.W. i Scheraga, H.A. (1996) Folding and unfolding kinetics of the proline-to-alanine mutants of bovine pancreatic ribonuclease A. *Biochemistry*, **35**, 1548-1559.

5. Bibliografia

- Domachowske, J.B. i Rosenberg, H.F. (1997) Eosinophils inhibit retroviral transduction of human target cells by a ribonuclease-dependent mechanism. *J Leukoc Biol*, **62**, 363-368.
- Doms, R. W., G. Russ, et al. (1989). Brefeldin A redistributes resident and itinerant Golgi proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **109**, 61-72.
- Donaldson, J. G., R. A. Kahn, et al. (1991). Binding of ARF and beta-COP to Golgi membranes: possible regulation by a trimeric G protein. *Science* **254**, 1197-9.
- Eftink, M. i Biltonen, R. (1987a) *A "hydrolytic enzymes"*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York and Oxford.
- Eftink, M. i Biltonen, R. (1987b) *A "Hydrolytic enzymes"*, Elsevier Science Publishers. **7**, 333-375.
- Eftink, M.R. i Biltonen, R.L. (1983) Energetics of ribonuclease A catalysis. 3. Temperature dependence of the hydrolysis of cytidine cyclic 2',3'-phosphate. *Biochemistry*, **22**, 5140-5150.
- Endo, Y., Gluck, A. i Wool, I.G. (1993a) Ribosomal RNA identity elements for recognition by ricin and by alpha-sarcin: mutation in the putative CG pair that closes a GAGA tetraloop. *Nucleic Acids Symp Ser*, 165-166.
- Endo, Y., Oka, T., Yokota, S., Tsurugi, K. i Natori, Y. (1993b) The biosynthesis of a cytotoxic protein, alpha-sarcin, in a mold of *Aspergillus giganteus*. II. Maturation of precursor form of alpha-sarcin in vivo. *Tokushima J Exp Med*, **40**, 7-12.
- Falnes, P.O., Choe, S., Madshus, I.H., Wilson, B.A. i Olsnes, S. (1994) Inhibition of membrane translocation of diphtheria toxin A-fragment by internal disulfide bridges. *J Biol Chem*, **269**, 8402-8407.
- Fett, J.W., Strydom, D.J., Lobb, R.R., Alderman, E.M., Bethune, J.L., Riordan, J.F. i Vallee, B.L. (1985) Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry*, **24**, 5480-5486.
- Finbow, M.E. i Harrison, M.A. (1997) The vacuolar H⁺-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. *Biochem J*, **324 (Pt 3)**, 697-712.
- Findlay, D., Herries, D.G., Mathias, A.P., Rabin, B.R. i Ross, B.C. (1962) *Biochem J.*, **85**.
- Findlay, D., Herries, D.G., Mathias, A.P., Rabin, B.R. i Ross, C.A. (1961) *Nature (London)*, **190**, 781-785.
- Follmann, H., Wieker, H.J. i Witzel, H. (1967) *Eur J Biochem*, **1**, 234-250.
- Fraker, P.J. i Speck, J.C., Jr. (1978) Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphrenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun*, **80**, 849-857.

5. Bibliografia

- Futami, J., Maeda, T., Kitazoe, M., Nukui, E., Tada, H., Seno, M., Kosaka, M. i Yamada, H. (2001) Preparation of potent cytotoxic ribonucleases by cationization: enhanced cellular uptake and decreased interaction with ribonuclease inhibitor by chemical modification of carboxyl groups. *Biochemistry*, **40**, 7518-7524.
- Futami, J., Nukui, E., Maeda, T., Kosaka, M., Tada, H., Seno, M. i Yamada, H. (2002) Optimum modification for the highest cytotoxicity of cationized ribonuclease. *J Biochem (Tokyo)*, **132**, 223-228.
- Futami, J., Seno, M., Kosaka, M., Tada, H., Seno, S. i Yamada, H. (1995) Recombinant human pancreatic ribonuclease produced in *E. coli*: importance of the amino-terminal sequence. *Biochem Biophys Res Commun*, **216**, 406-413.
- Futter, C.E., Pearse, A., Hewlett, L.J. i Hopkins, C.R. (1996) Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J Cell Biol*, **132**, 1011-1023.
- Gaur, D., Swaminathan, S. i Batra, J.K. (2001) Interaction of human pancreatic ribonuclease with human ribonuclease inhibitor. Generation of inhibitor-resistant cytotoxic variants. *J Biol Chem*, **276**, 24978-24984.
- Ghetie, M.A. i Vitetta, E.S. (1994a) Recent developments in immunotoxin therapy. *Curr Opin Immunol*, **6**, 707-714.
- Ghetie, V. i Vitetta, E. (1994b) Immunotoxins in the therapy of cancer: from bench to clinic. *Pharmacol Ther*, **63**, 209-234.
- Gibson, T.J. (1984) Ph.D. Thesis.
- Gill, S.C. i von Hippel, P.H. (1989) Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino Acid Sequence Data. *Anal Biochem*, **182**, 319-326.
- Gilliland, G.L. (1997) *A "Ribonucleases: Structures and Functions"*. Academic Press, Nova York.
- Gleich, G.J., Jacoby, D.B. i Fryer, A.D. (1995) Eosinophil-associated inflammation in bronchial asthma: a connection to the nervous system. *Int Arch Allergy Immunol*, **107**, 205-207.
- Gruenberg, J. (2001) The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 721-730.
- Gruenberg, J. i Maxfield, F.R. (1995) Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 552-563.
- Gu, F. i Gruenberg, J. (1999) Biogenesis of transport intermediates in the endocytic pathway. *FEBS Lett*, **452**, 61-66.
- Gu, F. i Gruenberg, J. (2000) ARF1 regulates pH-dependent COP functions in the early endocytic pathway. *J Biol Chem*, **275**, 8154-8160.

5. Bibliografia

- Gullberg, U., Widegren, B., Arnason, U., Egesten, A. i Olsson, I. (1986) The cytotoxic eosinophil cationic protein (ECP) has ribonuclease activity. *Biochem Biophys Res Commun*, **139**, 1239-1242.
- Haigis, M.C. i Raines, R.T. (2003) Secretory ribonucleases are internalized by a dynamin-independent endocytic pathway. *J Cell Sci*, **116**, 313-324.
- Haigis, M.C., Kurten, E.L. i Raines, R.T. (2003) Ribonuclease inhibitor as an intracellular sentry. *Nucleic Acids Res*, **31**, 1024-1032.
- Haigis, M.C., Kurten, E.L., Abel, R.L. i Raines, R.T. (2002) KFERQ sequence in ribonuclease A-mediated cytotoxicity. *J Biol Chem*, **277**, 11576-11581.
- Harada, M., S. Shakado, et al. (1997). Bafilomycin A1, a specific inhibitor of V-type H⁺-ATPases, inhibits the acidification of endocytic structures and inhibits horseradish peroxidase uptake in isolated rat sinusoidal endothelial cells. *Liver*, **17**, 244-50.
- Harder, J. i Schroder, J.M. (2002) RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem*, **277**, 46779-46784.
- Helms, J. B. and J. E. Rothman (1992). Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature*, **360**, 352-4.
- Herries, D.G., Mathias, A.P. i Rabin, B.R. (1962) *Biochem. J.*, **85**, 127-134.
- Herschlag, D. (1994) *J Am Chem Soc*, **116**, 11631-11635.
- Hofsteenge, J. (1997) *Ribonuclease Inhibitor en "Ribonucleases: Structures and Functions"*. Academic Press, Nova York.
- Houry, W.A., Rothwarf, D.M. i Scheraga, H.A. (1994) A very fast phase in the refolding of disulfide-intact ribonuclease A: implications for the refolding and unfolding pathways. *Biochemistry*, **33**, 2516-2530.
- Hu, G.F., Riordan, J.F. i Vallee, B.L. (1997) A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 2204-2209.
- Huang, F., Yang, Z. i Yarus, M. (1998) RNA enzymes with two small-molecule substrates. *Chem Biol*, **5**, 669-678.
- Hudson, T. H. and F. G. Grillo (1991). Brefeldin-A enhancement of ricin A-chain immunotoxins and blockade of intact ricin, modeccin, and abrin. *J Biol Chem*, **266**, 18586-92.
- Hunziker, W. i Geuze, H.J. (1996) Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *Bioessays*, **18**, 379-389.
- Hunziker, W., J. A. Whitney, et al. (1991). Selective inhibition of transcytosis by brefeldin A in MDCK cells. *Cell*, **67**, 617-27.

5. Bibliografia

- Hunziker, W., J. A. Whitney, et al. (1992). Brefeldin A and the endocytic pathway. Possible implications for membrane traffic and sorting. *FEBS Lett*, **307**, 93-6.
- Huttner, W.B. i Zimmerberg, J. (2001) Implications of lipid microdomains for membrane curvature, budding and fission. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 478-484.
- Ilinskaya, O.N., Dreyer, F., Mitkevich, V.A., Shaw, K.L., Pace, C.N. i Makarov, A.A. (2002) Changing the net charge from negative to positive makes ribonuclease Sa cytotoxic. *Protein Sci*, **11**, 2522-2525.
- Iordanov, M.S., Ryabinina, O.P., Wong, J., Dinh, T.H., Newton, D.L., Rybak, S.M. i Magun, B.E. (2000) Molecular determinants of apoptosis induced by the cytotoxic ribonuclease onconase: evidence for cytotoxic mechanisms different from inhibition of protein synthesis. *Cancer Res*, **60**, 1983-1994.
- Irie, M. (1997). En: "Structures and functions of ribonucleases". *Yakugaku Zasshi*, **117**, 561-582.
- Irie, M., Mikami, F., Monma, K., Ohgi, K., Watanabe, H., Yamaguchi, R. i Nagase, H. (1984a) *J Biochem (Tokyo)*, **96**, 89-96.
- Irie, M., Watanabe, F., Ohgi, K., Tobe, M., Matsumura, G., Arata, Y., Hirose, T. i Inamaya, S. (1984b) *J Biochem (Tokyo)*, **95**, 751-759.
- Iversen, T.G., Skretting, G., Llorente, A., Nicoziani, P., van Deurs, B. i Sandvig, K. (2001) Endosome to Golgi transport of ricin is independent of clathrin and of the Rab9- and Rab11-GTPases. *Mol Biol Cell*, **12**, 2099-2107.
- Jackson, M.R., Nilsson, T. i Peterson, P.A. (1993) Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmatic reticulum. *J Cell Biol*, **121**, 317-333.
- Jahraus, A., Storrie, B., Griffiths, G. i Desjardins, M. (1994) Evidence for retrograde traffic between terminal lysosomes and the prelysosomal/late endosome compartment. *J Cell Sci*, **107 (Pt 1)**, 145-157.
- Jinno, H., Ueda, M., Ozawa, S., Kikuchi, K., Ikeda, T., Enomoto, K. i Kitajima, M. (1996) Epidermal growth factor receptor-dependent cytotoxic effect by an EGF-ribonuclease conjugate on human cancer cell lines--a trial for less immunogenic chimeric toxin. *Cancer Chemother Pharmacol*, **38**, 303-308.
- Johannes, L. i Lamaze, C. (2002) Clathrin-dependent or not: is it still the question? *Traffic*, **3**, 443-451.
- Juan, G., Ardelt, B., Li, X., Mikulski, S.M., Shogen, K., Ardelt, W., Mittelman, A. i Darzynkiewicz, Z. (1998) G1 arrest of U937 cells by onconase is associated with suppression of cyclin D3 expression, induction of p16INK4A, p21WAF1/CIP1 and p27KIP and decreased pRb phosphorylation. *Leukemia*, **12**, 1241-1248.

5. Bibliografia

- Juncosa, M., Pons, J., Dot, T., Querol, E. i Planas, A. (1994) Identification of active site carboxylic residues in *Bacillus licheniformis* 1,3-1,4-beta-D-glucan 4-glucanohydrolase by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, **269**, 14530-14535.
- Kamiya, Y., Oyama, F., Oyama, R., Sakakibara, F., Nitta, K., Kawauchi, H., Takayanagi, Y. i Titani, K. (1990) Amino acid sequence of a lectin from Japanese frog (*Rana japonica*) eggs. *J Biochem (Tokyo)*, **108**, 139-143.
- Katoh, H., Yoshinaga, M., Yanagita, T., Ohgi, K., Irie, M., Beintema, J.J. i Meinsma, D. (1986) Kinetic studies on turtle pancreatic ribonuclease: a comparative study of the base specificities of the B2 and P0 sites of bovine pancreatic ribonuclease A and turtle pancreatic ribonuclease. *Biochim Biophys Acta*, **873**, 367-371.
- Kawauchi, H., Sakakibara, F. i Watanabe, K. (1975) Agglutinins of frog eggs: a new class of proteins causing preferential agglutination of tumor cells. *Experientia*, **31**, 364-365.
- Kim, J.S. i Raines, R.T. (1993) Bovine seminal ribonuclease produced from a synthetic gene. *J Biol Chem*, **268**, 17392-17396.
- Kim, J.S., Soucek, J., Matousek, J. i Raines, R.T. (1995a) Mechanism of ribonuclease cytotoxicity. *J Biol Chem*, **270**, 31097-31102.
- Kim, J.S., Soucek, J., Matousek, J. i Raines, R.T. (1995b) Structural basis for the biological activities of bovine seminal ribonuclease. *J Biol Chem*, **270**, 10525-10530.
- Klausner, R. D., J. G. Donaldson, et al. (1992). Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol*, **116**, 1071-80.
- Klink, T.A. i Raines, R.T. (2000) Conformational stability is a determinant of ribonuclease A cytotoxicity. *J Biol Chem*, **275**, 17463-17467.
- Klink, T.A., Woycechowsky, K.J., Taylor, K.M. i Raines, R.T. (2000) Contribution of disulfide bonds to the conformational stability and catalytic activity of ribonuclease A. *Eur J Biochem*, **267**, 566-572.
- Kobe, B. i Deisenhofer, J. (1993) Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *Nature*, **366**, 751-756.
- Kobe, B. i Deisenhofer, J. (1995) A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature*, **374**, 183-186.
- Kobe, B. i Deisenhofer, J. (1996) Mechanism of ribonuclease inhibition by ribonuclease inhibitor protein based on the crystal structure of its complex with ribonuclease A. *J Mol Biol*, **264**, 1028-1043.
- Koradi, R., Billeter, M. i Wuthrich, K. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph*, **14**, 51-55, 29-32.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

5. Bibliografia

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lamaze, C. i Schmid, S.L. (1995) The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 573-580.
- Le Borgne, R. i Hoflack, B. (1998) Protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, **1404**, 195-209.
- Ledoux, L. (1955) Action of ribonuclease on two solid tumors in vivo. *Nature*, **176**, 36-37.
- Ledoux, L. i Revel, S.H. (1955) Action of ribonuclease on neoplastic growth. I. Chemical aspects of normal tumor growth: the Landschutz ascites tumour. *Biochim Biophys Acta*, **18**, 416-421.
- Lee, J. E. i Raines, R. T. (2003) Contribution of active-site residues to the function of onconase, a ribonuclease with antitumoral activity. *Biochemistry*, **42**, 11443-11450.
- Leland, P.A. i Raines, R.T. (2001) Cancer chemotherapy--ribonucleases to the rescue. *Chem Biol*, **8**, 405-413.
- Leland, P.A., Schultz, L.W., Kim, B.M. i Raines, R.T. (1998) Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10407-10412.
- Leland, P.A., Staniszewski, K.E., Kim, B. i Raines, R.T. (2000) A synapomorphic disulfide bond is critical for the conformational stability and cytotoxicity of an amphibian ribonuclease. *FEBS Lett*, **477**, 203-207.
- Leland, P.A., Staniszewski, K.E., Kim, B.M. i Raines, R.T. (2001) Endowing human pancreatic ribonuclease with toxicity for cancer cells.
- Lewis, M.T., Hunt, L.T. i Barker, W.C. (1989) Striking sequence similarity among sialic acid-binding lectin, pancreatic ribonucleases, and angiogenin: possible structural and functional relationships. *Protein Seq Data Anal*, **2**, 101-105.
- Li, X.M., Trinh, K.Y. i Hew, C.L. (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**, 995-1002.
- Lin, J.J., Newton, D.L., Mikulski, S.M., Kung, H.F., Youle, R.J. i Rybak, S.M. (1994) Characterization of the mechanism of cellular and cell free protein synthesis inhibition by an anti-tumor ribonuclease. *Biochem Biophys Res Commun*, **204**, 156-162.
- Lippincott-Schwartz, J., L. C. Yuan, et al. (1989). Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell*, **56**, 801-13.

5. Bibliografia

- Lippincott-Schwartz, J., L. Yuan, et al. (1991). Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell*, **67**, 601-16.
- Liu, Y., Hart, P.J., Schlunegger, M.P. i Eisenberg, D. (1998) The crystal structure of a 3D domain-swapped dimer of RNase A at a 2.1-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3437-3442.
- Maeda, T., Mahara, K., Kitazoe, M., Futami, J., Takidani, A., Kosaka, M., Tada, H., Seno, M. i Yamada, H. (2002) RNase 3 (ECP) is an extraordinarily stable protein among human pancreatic-type RNases. *J Biochem (Tokyo)*, **132**, 737-742.
- Mancheno, J.M., Gasset, M., Onaderra, M., Gavilanes, J.G. i D'Alessio, G. (1994) Bovine seminal ribonuclease destabilizes negatively charged membranes. *Biochem Biophys Res Commun*, **199**, 119-124.
- Mastronicola, M.R., Piccoli, R. i D'Alessio, G. (1995) Key extracellular and intracellular steps in the antitumor action of seminal ribonuclease. *Eur J Biochem*, **230**, 242-249.
- Matousek, J. (2001) Ribonucleases and their antitumor activity. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **129**, 175-191.
- Mazzarella, L., Capasso, S., Demasi, D., Di Lorenzo, G., Mattia, C.A. i Zagari, A. (1993) *Acta Crystallogr A*, **D 49**, 389-402.
- McPherson, A., Brayer, G., Cascio, D. i Williams, R. (1986) *Science*, **232**, 765-768.
- Mikulski, S.M., Ardelt, W., Shogen, K., Bernstein, E.H. i Menduke, H. (1990) Striking increase of survival of mice bearing M109 Madison carcinoma treated with a novel protein from amphibian embryos. *J Natl Cancer Inst*, **82**, 151-153.
- Mikulski, S.M., Costanzi, J.J., Vogelzang, N.J., McCachren, S., Taub, R.N., Chun, H., Mittelman, A., Panella, T., Puccio, C., Fine, R. i Shogen, K. (2002) Phase II trial of a single weekly intravenous dose of ranpirnase in patients with unresectable malignant mesothelioma. *J Clin Oncol*, **20**, 274-281.
- Mikulski, S.M., Viera, A., Deptala, A. i Darzynkiewicz, Z. (1998) Enhanced in vitro cytotoxicity and cytostasis of the combination of onconase with a proteasome inhibitor. *Int J Oncol*, **13**, 633-644.
- Misumi, Y., K. Miki, et al. (1986). Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem*, **261**, 11398-403.
- Mitsui, Y., Urata, Y., Torii, K. i Irie, M. (1978) *Biochem Biophys Acta*, **535**, 229-308.
- Moenner, M., Vosoghi, M., Ryazantsev, S. i Glitz, D.G. (1998) Ribonuclease inhibitor protein of human erythrocytes: characterization, loss of activity in response to oxidative stress, and association with Heinz bodies. *Blood Cells Mol Dis*, **24**, 149-164.

5. Bibliografia

- Montecucco, C., Papini, E. i Schiavo, G. (1994) Bacterial protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism. *FEBS Lett*, **346**, 92-98.
- Mosimann, S.C., Ardelt, W. i James, M.N. (1994) Refined 1.7 Å X-ray crystallographic structure of P-30 protein, an amphibian ribonuclease with anti-tumor activity. *J Mol Biol*, **236**, 1141-1153.
- Moussaoui, M., Guasch, A., Boix, E., Cuchillo, C. i Nogués, M. (1996) The role of non-catalytic binding subsites in the endonuclease activity of bovine pancreatic ribonuclease A. *J Biol Chem*, **271**, 4687-4692.
- Mukherjee, S., Ghosh, R.N. i Maxfield, F.R. (1997) Endocytosis. *Physiol Rev*, **77**, 759-803.
- Murthy, B.S., De Lorenzo, C., Piccoli, R., D'Alessio, G. i Sirdeshmukh, R. (1996) Effects of protein RNase inhibitor and substrate on the quaternary structures of bovine seminal RNase. *Biochemistry*, **35**, 3880-3885.
- Nebenfuhr, A. (2002) Vesicle traffic in the endomembrane system: a tale of COPs, Rabs and SNAREs. *Curr Opin Plant Biol*, **5**, 507-512.
- Neira, J.L. i Rico, M. (1997) Folding studies on ribonuclease A, a model protein. *Fold Des*, **2**, R1-11.
- Newton, D. L., G. Kaur, et al. (2001). RNA damage and inhibition of neoplastic endothelial cell growth: effects of human and amphibian ribonucleases. *Radiat Res*, **155**, 171-174.
- Newton, D. L., L. Boque, et al. (1998). Single amino acid substitutions at the N-terminus of a recombinant cytotoxic ribonuclease markedly influence biochemical and biological properties. *Biochemistry*, **37**, 5173-83.
- Newton, D.L. i Rybak, S.M. (1998) Unique recombinant human ribonuclease and inhibition of Kaposi's sarcoma cell growth. *J Natl Cancer Inst*, **90**, 1787-1791.
- Newton, D.L., Boque, L., Wlodawer, A., Huang, C.Y. i Rybak, S.M. (1998) Single amino acid substitutions at the N-terminus of a recombinant cytotoxic ribonuclease markedly influence biochemical and biological properties. *Biochemistry*, **37**, 5173-5183.
- Newton, D.L., Hansen, H.J., Mikulski, S.M., Goldenberg, D.M. i Rybak, S.M. (2001) Potent and specific antitumor effects of an anti-CD22-targeted cytotoxic ribonuclease: potential for the treatment of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, **97**, 528-535.
- Newton, D.L., Walbridge, S., Mikulski, S.M., Ardelt, W., Shogen, K., Ackerman, S.J., Rybak, S.M. i Youle, R.J. (1994) Toxicity of an antitumor ribonuclease to Purkinje neurons. *J Neurosci*, **14**, 538-544.
- Newton, D.L., Xue, Y., Boque, L., Wlodawer, A., Kung, H.F. i Rybak, S.M. (1997) Expression and characterization of a cytotoxic human-frog chimeric ribonuclease: potential for cancer therapy. *Protein Eng*, **10**, 463-470.

5. Bibliografia

- Newton, D.L., Xue, Y., Olson, K.A., Fett, J.W. i Rybak, S.M. (1996) Angiogenin single-chain immunofusions: influence of peptide linkers and spacers between fusion protein domains. *Biochemistry*, **35**, 545-553.
- Nichols, B.J. i Lippincott-Schwartz, J. (2001) Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol*, **11**, 406-412.
- Nishi, T. i Forgac, M. (2002) The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 94-103.
- Nitta, K., Ozaki, K., Hagioita, K., Tsukamoto, Y., Terasaki, Y., Suzuki, N., Sano, A., Hosono, M., Kawauchi, H. i Takayanagi, Y. (1993) Purification and some properties of ribonuclease from *Xenopus laevis* eggs. *Biol Pharm Bull*, **16**, 353-356.
- Nitta, K., Ozaki, K., Ishikawa, M., Furusawa, S., Hosono, M., Kawauchi, H., Sasaki, K., Takayanagi, Y., Tsuiki, S. i Hakomori, S. (1994) Inhibition of cell proliferation by *Rana catesbeiana* and *Rana japonica* lectins belonging to the ribonuclease superfamily. *Cancer Res*, **54**, 920-927.
- Nogués, M.V., Moussaoui, M., Boix, E., Vilanova, M., Ribó, M. i Cuchillo, C.M. (1998) The contribution of noncatalytic phosphate-binding subsites to the mechanism of bovine pancreatic ribonuclease A. *Cell Mol Life Sci*, **54**, 766-774.
- Nogués, M.V., Vilanova, M. i Cuchillo, C. (1995) *Biochim Biophys Acta*, **1253**, 16-24.
- Nogués, M.V., Vilanova, M. i Cuchillo, C.M. (1995) Bovine pancreatic ribonuclease A as a model of an enzyme with multiple substrate binding sites. *Biochim Biophys Acta*, **1253**, 16-24.
- Notomista, E., Cafaro, V., Fusiello, R., Bracale, A., D'Alessio, G. i Di Donato, A. (1999) Effective expression and purification of recombinant onconase, an antitumor protein. *FEBS Lett*, **463**, 211-215.
- Notomista, E., Catanzano, F., Graziano, G., Di Gaetano, S., Barone, G. i Di Donato, A. (2001) Contribution of chain termini to the conformational stability and biological activity of onconase. *Biochemistry*, **40**, 9097-9103.
- Olmo, N., Turnay, J., Gonzalez de Buitrago, G., Lopez de Silanes, I., Gavilanes, J.G. i Lizarbe, M.A. (2001) Cytotoxic mechanism of the ribotoxin alpha-sarcin. Induction of cell death via apoptosis. *Eur J Biochem*, **268**, 2113-2123.
- Olson, B.H. i Goerner, G.L. (1965) Alpha-sarcin, a new antitumor agent. I. Isolation, purification, chemical composition and the identity of a new amino acid. *Appl Microbiol*, **13**, 314-321.
- Olson, B.H., Jennings, J.C., Roga, V., Junek, A.J. i Schuurmans, D.M. (1965) Alpha-sarcin, a new antitumor agent. II. Fermentation and antitumor spectrum. *Appl Microbiol*, **13**, 322-326.

5. Bibliografia

- Papadopoulos, G.K., Ouzounis, C. i Eliopoulos, E. (1998) RGD sequences in several receptor proteins: novel cell adhesion function of receptors? *Int J Biol Macromol*, **22**, 51-57.
- Papageorgiou, A.C., Shapiro, R. i Acharya, K.R. (1997) Molecular recognition of human angiogenin by placental ribonuclease inhibitor--an X-ray crystallographic study at 2.0 Å resolution. *Embo J*, **16**, 5162-5177.
- Parés, X., de Llorens, R., Arús, C. i Cuchillo, C. (1980) *Eur J biochem*, **105**, 571-579.
- Parés, X., Nogués, M.V., de Llorens, R. i Cuchillo, C. (1991) *Essays in Biochemistry*, **24**, 89-103.
- Pasqualini, R., Koivunen, E. i Ruoslahti, E. (1997) Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nat Biotechnol*, **15**, 542-546.
- Pastan, I., Chaudhary, V. i FitzGerald, D.J. (1992) Recombinant toxins as novel therapeutic agents. *Annu Rev Biochem*, **61**, 331-354.
- Pelham, H. R. (1991). Multiple targets for brefeldin A. *Cell*, **67**, 449-51.
- Pelham, H.R. (1992) The Florey Lecture, 1992. The secretion of proteins by cells. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **250**, 1-10.
- Peng, S.B., Zhang, Y., Tsai, S.J., Xie, X.S. i Stone, D.K. (1994) Reconstitution of recombinant 33-kDa subunit of the clathrin-coated vesicle H(+)-ATPase. *J Biol Chem*, **269**, 11356-11360.
- Piccoli, R., Di Gaetano, S., De Lorenzo, C., Grauso, M., Monaco, C., Spalletti-Cernia, D., Laccetti, P., Cinatl, J., Matousek, J. i D'Alessio, G. (1999) A dimeric mutant of human pancreatic ribonuclease with selective cytotoxicity toward malignant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7768-7773.
- Piccoli, R., Di Gaetano, S., De Lorenzo, C., Grauso, M., Monaco, C., Spalletti-Cernia, D., Laccetti, P., Cinatl, J., Matousek, J. i D'Alessio, G. (1999) A dimeric mutant of human pancreatic ribonuclease with selective cytotoxicity toward malignant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7768-7773.
- Piccoli, R., Tamburrini, M., Piccialli, G., Di Donato, A., Parente, A. i D'Alessio, G. (1992) The dual-mode quaternary structure of seminal RNase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 1870-1874.
- Pillay, C.S., Elliott, E. i Dennison, C. (2002) Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem J*, **363**, 417-429.
- Pous, J., Canals, A., Terzyan, S.S., Guasch, A., Benito, A., Ribó, M., Vilanova, M. i Coll, M. (2000) Three-dimensional structure of a human pancreatic ribonuclease variant, a step forward in the design of cytotoxic ribonucleases. *J Mol Biol*, **303**, 49-60.

5. Bibliografia

- Presley, J.F., Mayor, S., McGraw, T.E., Dunn, K.W. i Maxfield, F.R. (1997) Bafilomycin A1 treatment retards transferrin receptor recycling more than bulk membrane recycling. *J Biol Chem*, **272**, 13929-13936.
- Psarras, K., Ueda, M., Yamamura, T., Ozawa, S., Kitajima, M., Aiso, S., Komatsu, S. i Seno, M. (1998) Human pancreatic RNase1-human epidermal growth factor fusion: an entirely human 'immunotoxin analog' with cytotoxic properties against squamous cell carcinomas. *Protein Eng*, **11**, 1285-1292.
- Raines, R.T. (1998) Ribonuclease A. *Chem Rev*, **98**, 1045-1066.
- Ran, S., Downes, A. i Thorpe, P.E. (2002) Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels. *Cancer Res*, **62**, 6132-6140.
- Reddi, K.K. (1975) Nature and possible origin of human serum ribonuclease. *Biochem Biophys Res Commun*, **67**, 110-118.
- Ribó, M., Beintema, J.J., Osset, M., Fernandez, E., Bravo, J., De Llorens, R. i Cuchillo, C.M. (1994) Heterogeneity in the glycosylation pattern of human pancreatic ribonuclease. *Biol Chem Hoppe Seyler*, **375**, 357-363.
- Ribó, M., Benito, A., Canals, A., Nogués, M.V., Cuchillo, C.M. i Vilanova, M. (2001) Purification of engineered human pancreatic ribonuclease. *Methods Enzymol*, **341**, 221-234.
- Ribó, M., delCardayre, S.B., Raines, R.T., de Llorens, R. i Cuchillo, C.M. (1996) Production of human pancreatic ribonuclease in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, **7**, 253-261.
- Richards, F.M. i Wyckoff, H.W. (1971) A "The enzymes" (Ed. Boyer, P. D.). **4**, 647-806.
- Roberts, G.C.K., Dennis, E.A., Meadows, D.H., Cohen, J.S. i Jardetzky, O. (1969) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**, 1151-1158.
- Rohn, W.M., Rouille, Y., Waguri, S. i Hoflack, B. (2000) Bi-directional trafficking between the trans-Golgi network and the endosomal/lysosomal system. *J Cell Sci*, **113** (Pt 12), 2093-2101.
- Rosenberg, H.F. (1995) Recombinant human eosinophil cationic protein. Ribonuclease activity is not essential for cytotoxicity. *J Biol Chem*, **270**, 7876-7881.
- Rosenberg, H.F. i Dyer, K.D. (1996) Molecular cloning and characterization of a novel human ribonuclease (RNase k6): increasing diversity in the enlarging ribonuclease gene family. *Nucleic Acids Res*, **24**, 3507-3513.
- Rosenberg, N.L. (1987) ATP as an alternative inhibitor of bacterial and endogenous nucleases and its effect on native chromatin compaction. *Mol Cell Biochem*, **76**, 113-121.
- Roth, J.S. (1963) Ribonuclease activity and cancer: a review. *Cancer Res*, **23**, 657-666.

5. Bibliografia

- Roth, J.S. i Juster, H. (1972) On the absence of ribonuclease inhibitor in rat liver nuclei. *Biochim Biophys Acta*, **287**, 474-476.
- Rushizky, G.W., Knight, C.A. i Sober, H.A. (1961) *J Biol Chem*, **236**, 2732-2737.
- Russo, N., De Nigris, M., Di Donato, A. i D'Alessio, G. (1993) Expression of native dimers of bovine seminal ribonuclease in a eukaryotic cell system. *FEBS Lett*, **318**, 242-244.
- Rybak, S.M. i Newton, D.L. (1999) Natural and engineered cytotoxic ribonucleases: therapeutic potential. *Exp Cell Res*, **253**, 325-335.
- Rybak, S.M. i Newton, D.L. (1999a) Natural and engineered cytotoxic ribonucleases: therapeutic potential. *Exp Cell Res*, **253**, 325-335.
- Rybak, S.M. i Newton, D.L. (1999b) Uncloaking RNases. *Nat Biotechnol*, **17**, 408.
- Rybak, S.M., Saxena, S.K., Ackerman, E.J. i Youle, R.J. (1991) Cytotoxic potential of ribonuclease and ribonuclease hybrid proteins. *J Biol Chem*, **266**, 21202-21207.
- Sachse, M., Urbe, S., Oorschot, V., Strous, G.J. i Klumperman, J. (2002) Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes. *Mol Biol Cell*, **13**, 1313-1328.
- Sakakibara, F., Takayanagi, G., Kawauchi, H., Watanabe, K. i Hakomori, S. (1976) An anti-A-like lectin of *Rana catesbiana* eggs showing unusual reactivity. *Biochim Biophys Acta*, **444**, 386-395.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. i Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning, a Laboratory Manual.*, Nova York.
- Sandvig, K. and B. van Deurs (2002). Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett* **529**,(1): 49-53.
- Sandvig, K. i van Deurs, B. (1999) Endocytosis and intracellular transport of ricin: recent discoveries. *FEBS Lett*, **452**, 67-70.
- Sandvig, K., K. Prydz, et al. (1991). Ricin transport in brefeldin A-treated cells: correlation between Golgi structure and toxic effect. *J Cell Biol* **115**,(4): 971-81.
- Sandvig, K., S. Grimmer, et al. (2002). Pathways followed by ricin and Shiga toxin into cells. *Histochem Cell Biol* **117**,(2): 131-41.
- Sanger, F. i Coulson, A.R. (1978) The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS Lett*, **87**, 107-110.
- Sanger, F., Nicklen, S. i Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.

5. Bibliografia

- Saxena, S.K., Gravell, M., Wu, Y.N., Mikulski, S.M., Shogen, K., Ardelt, W. i Youle, R.J. (1996) Inhibition of HIV-1 production and selective degradation of viral RNA by an amphibian ribonuclease. *J Biol Chem*, **271**, 20783-20788.
- Saxena, S.K., Rybak, S.M., Winkler, G., Meade, H.M., McGray, P., Youle, R.J. i Ackerman, E.J. (1991) Comparison of RNases and toxins upon injection into *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*, **266**, 21208-21214.
- Saxena, S.K., Sirdeshmukh, R., Ardelt, W., Mikulski, S.M., Shogen, K. i Youle, R.J. (2002) Entry into cells and selective degradation of tRNAs by a cytotoxic member of the RNase A family. *J Biol Chem*, **277**, 15142-15146.
- Schaegger, H. i von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, **166**, 368-379.
- Schein, C.H. (1997) From housekeeper to microsurgeon: the diagnostic and therapeutic potential of ribonucleases. *Nat Biotechnol*, **15**, 529-536.
- Schwarze, S.R. i Dowdy, S.F. (2000) In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. *Trends Pharmacol Sci*, **21**, 45-48.
- Schwarze, S.R., Hruska, K.A. i Dowdy, S.F. (2000) Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? *Trends Cell Biol*, **10**, 290-295.
- Sela, M. i Anfinsen, C.B. (1957) Some spectrophotometric and polarimetric experiments with ribonuclease. *Biochem Biophys Acta*, **24**, 229.
- Shapiro, R. (2001) Cytoplasmic ribonuclease inhibitor. *Methods Enzymol*, **341**, 611-628.
- Shapiro, R. i Vallee, B.L. (1989) Site-directed mutagenesis of histidine-13 and histidine-114 of human angiogenin. Alanine derivatives inhibit angiogenin-induced angiogenesis. *Biochemistry*, **28**, 7401-7408.
- Shapiro, R., Harper, J.W., Fox, E.A., Jansen, H.W., Hein, F. i Uhlmann, E. (1988) Expression of Met(-1) angiogenin in *Escherichia coli*: conversion to the authentic less than Glu-1 protein. *Anal Biochem*, **175**, 450-461.
- Sierakowska, H. i Shugar, D. (1977) Mammalian nucleolytic enzymes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **20**, 59-130.
- Smith, M.R., Newton, D.L., Mikulski, S.M. i Rybak, S.M. (1999) Cell cycle-related differences in susceptibility of NIH/3T3 cells to ribonucleases. *Exp Cell Res*, **247**, 220-232.
- Smyth, D.G., Stein, W.H. i Moore, S. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 227-234.
- Sorrentino, S. (1998) Human extracellular ribonucleases: multiplicity, molecular diversity and catalytic properties of the major RNase types. *Cell Mol Life Sci*, **54**, 785-794.

5. Bibliografia

- Sorrentino, S. i Libonati, M. (1994) Human pancreatic-type and nonpancreatic-type ribonucleases: a direct side-by-side comparison of their catalytic properties. *Arch Biochem Biophys*, **312**, 340-348.
- Sorrentino, S. i Libonati, M. (1997) Structure-function relationships in human ribonucleases: main distinctive features of the major RNase types. *FEBS Lett*, **404**, 1-5.
- Soucek, J., Pouckova, P., Matousek, J., Stockbauer, P., Dostal, J. i Zadinova, M. (1996) Antitumor action of bovine seminal ribonuclease. *Neoplasma*, **43**, 335-340.
- Steinman, R.M., Silver, J.M. i Cohn, Z.A. (1974) Pinocytosis in fibroblasts. Quantitative studies in vitro. *J Cell Biol*, **63**, 949-969.
- Stone, S.R. i Hofsteenge, J. (1986) Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin. *Biochemistry*, **25**, 4622-4628.
- Straus, W. i Keller, J.M. (1986) Unusual binding sites for horseradish peroxidase on the surface of cultured and isolated mammalian cells. Suppression of binding by certain nucleotides and glycoproteins, and a role for calcium. *Histochemistry*, **85**, 277-285.
- Strous, G. J., P. van Kerkhof, et al. (1993). Differential effects of brefeldin A on transport of secretory and lysosomal proteins. *J Biol Chem*, **268**, 2341-7.
- Studier, F.W. i Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, **189**, 113-130.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. i Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*, **185**, 60-89.
- Suzuki, H., Parente, A., Farina, B., Greco, L., La Montagna, R. i Leone, E. (1987) Complete amino-acid sequence of bovine seminal ribonuclease, a dimeric protein from seminal plasma. *Biol Chem Hoppe Seyler*, **368**, 1305-1312.
- Suzuki, M., Saxena, S.K., Boix, E., Prill, R.J., Vasandani, V.M., Ladner, J.E., Sung, C. i Youle, R.J. (1999) Engineering receptor-mediated cytotoxicity into human ribonucleases by steric blockade of inhibitor interaction. *Nat Biotechnol*, **17**, 265-270.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. i Gibson, T.J. (1994a) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4673-4680.
- Thompson, J.E., Venegas, F.D. i Raines, R.T. (1994b) Energetics of catalysis by ribonucleases: fate of the 2',3'-cyclic phosphodiester intermediate. *Biochemistry*, **33**, 7408-7414.
- Titani, K., Takio, K., Kuwada, M., Nitta, K., Sakakibara, F., Kawauchi, H., Takayanagi, G. i Hakomori, S. (1987) Amino acid sequence of sialic acid binding lectin from frog (*Rana catesbeiana*) eggs. *Biochemistry*, **26**, 2189-2194.

5. Bibliografia

- Torrent, J., Connelly, J.P., Coll, M.G., Ribó, M., Lange, R. i Vilanova, M. (1999) Pressure versus heat-induced unfolding of ribonuclease A: the case of hydrophobic interactions within a chain-folding initiation site. *Biochemistry*, **38**, 15952-15961.
- Tsomides, T.J. i Eisen, H.N. (1993) Stoichiometric labeling of peptides by iodination on tyrosyl or histidyl residues. *Anal Biochem*, **210**, 129-135.
- Usher, D.A., Richardson, D.I. i Eckstein, F. (1970) *Nature (London)*, **228**, 663-665.
- Vallee, B.L. i Riordan, J.F. (1997) Organogenesis and angiogenin. *Cell Mol Life Sci*, **53**, 803-815.
- van Deurs, B., P. K. Holm, et al. (1996). Inhibition of the vacuolar H(+)-ATPase with bafilomycin reduces delivery of internalized molecules from mature multivesicular endosomes to lysosomes in HEp-2 cells. *Eur J Cell Biol* **69**, 343-50.
- van Deurs, B., Petersen, O.W., Olsnes, S. i Sandvig, K. (1989) The ways of endocytosis. *Int Rev Cytol*, **117**, 131-177.
- van Weert, A. W., K. W. Dunn, et al. (1995). Transport from late endosomes to lysosomes, but not sorting of integral membrane proteins in endosomes, depends on the vacuolar proton pump. *J Cell Biol*, **130**, 821-34.
- Vasandani, V.M., Castelli, J.C., Hott, J.S., Saxena, S., Mikulski, S.M. i Youle, R.J. (1999) Interferon enhances the activity of the anticancer ribonuclease, onconase. *J Interferon Cytokine Res*, **19**, 447-454.
- Voulhoux, R., Taupiac, M.P., Czjzek, M., Beaumelle, B. i Filloux, A. (2000) Influence of deletions within domain II of exotoxin A on its extracellular secretion from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **182**, 4051-4058.
- Wagner, F.W., Chung, A. i Ray, L.E. (1972) Characterization of the aminopeptidase from *Bacillus subtilis* as an extracellular enzyme. *Can J Microbiol*, **18**, 1883-1891.
- Watts, C. i Marsh, M. (1992) Endocytosis: what goes in and how? *J Cell Sci*, **103 (Pt 1)**, 1-8.
- Weickmann, J.L. i Glitz, D.G. (1982) Human ribonucleases. Quantitation of pancreatic-like enzymes in serum, urine, and organ preparations. *J Biol Chem*, **257**, 8705-8710.
- Weickmann, J.L., Elson, M. i Glitz, D.G. (1981) Purification and characterization of human pancreatic ribonuclease. *Biochemistry*, **20**, 1272-1278.
- Wigler, P.W. (1968) *Biochem. Prep.*, **12**, 107.
- Witzel i Barnard, E.A. (1962) *Biochem Biophys Res Commun*, **7**, 289-294.
- Wlodawer, A. i Sjolín, L. (1983) *Biochemistry*, **22**, 2720-2728.

5. Bibliografia

- Wool, I.G. (1997) *Structure and mechanism of action of cytotoxic ribonuclease alfa-sarcin*. Academic Press, San Diego.
- Wu, J. i Watson, J.T. (1997) A novel methodology for assignment of disulfide bond pairings in proteins. *Protein Sci*, **6**, 391-398.
- Wu, Y., Mikulski, S.M., Ardelt, W., Rybak, S.M. i Youle, R.J. (1993) A cytotoxic ribonuclease. Study of the mechanism of onconase cytotoxicity. *J Biol Chem*, **268**, 10686-10693.
- Wu, Y., Saxena, S.K., Ardelt, W., Gadina, M., Mikulski, S.M., De Lorenzo, C., D'Alessio, G. i Youle, R.J. (1995) A study of the intracellular routing of cytotoxic ribonucleases. *J Biol Chem*, **270**, 17476-17481.
- Yamashita, K., Hitoi, A., Irie, M. i Kobata, A. (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**, 263-266.
- Yoshimori, T., A. Yamamoto, et al. (1991). Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J Biol Chem*, **266**, 17707-12.
- Youle, R.J. i D'Alessio, g. (1997) *Antitumor RNases in "Ribonucleases: Structures and Functions"*. Academic Press, Nova York.
- Youle, R.J., Newton, D., Wu, Y.N., Gadina, M. i Rybak, S.M. (1993) Cytotoxic ribonucleases and chimeras in cancer therapy. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, **10**, 1-28.
- Zanetti, M., Filaci, G., Lee, R.H., del Guercio, P., Rossi, F., Bacchetta, R., Stevenson, F., Barnaba, V. i Billetta, R. (1993) Expression of conformationally constrained adhesion peptide in an antibody CDR loop and inhibition of natural killer cell cytotoxic activity by an antibody antigenized with the RGD motif. *Embo J*, **12**, 4375-4384.
- Zewe, M., Rybak, S.M., Dubel, S., Coy, J.F., Welschof, M., Newton, D.L. i Little, M. (1997) Cloning and cytotoxicity of a human pancreatic RNase immunofusion. *Immunotechnology*, **3**, 127-136.
- Zhang, J., Dyer, K.D. i Rosenberg, H.F. (2002) RNase 8, a novel RNase A superfamily ribonuclease expressed uniquely in placenta. *Nucleic Acids Res*, **30**, 1169-1175.
- Zhou, H.M. i Strydom, D.J. (1993) The amino acid sequence of human ribonuclease 4, a highly conserved ribonuclease that cleaves specifically on the 3' side of uridine. *Eur J Biochem*, **217**, 401-410.

*Apèndix A:
Protocols de laboratori*

Apèndix A: Protocols de laboratori

A1. Medis de cultiu

A2. Tècniques de DNA recombinant

- A2.1. Obtenció de DNA plasmídic
- A2.2. Electroforesi de DNA en gel d'agarosa
- A2.3. Purificació de fragments de DNA
- A2.4. Precipitació de DNA
- A2.5. Reacció de lligament
- A2.6. Obtenció de competents *E. coli*
- A2.7. Transformació de cèl·lules competents d'*E. coli*
- A2.8. Amplificació de DNA mitjançant PCR
- A2.9. Mutagènesi dirigida per oligonucleòtid
- A2.10. Seqüenciació de DNA

A3. Mètodes de purificació de proteïnes

- A3.1. Expressió de les proteïnes
- A3.2. Purificació de les proteïnes

A4. Mètodes d'anàlisi i caracterització de proteïnes

- A4.1. Determinació de la concentració de proteïna
- A4.2. Electroforesi de proteïnes en gel glicina de poliacrilamida-SDS
- A4.3. Electroforesi de proteïnes en gel tricina de poliacrilamida-SDS
- A4.4. Zimograma
- A4.5. Determinació espectrofotomètrica de les constants catalítiques

A1. Medis de cultiu

Durant aquest treball s'ha utilitzat bàsicament el medi LB per als cultius bacterians.

Composició dels medi LB (1 litre):

10 g	Bactotripton
5 g	Extret de llevat
10 g	NaCl
1 l	Aigua destil·lada

Per a l'obtenció de medi sòlid per plaques de cultiu s'han d'afegir 15 g d'agar (1,5% final). Cal ajustar el pH a 7,5 amb NaOH i posteriorment esterilitzar amb autoclau a 120°C durant 20 minuts.

A2. Tècniques de DNA recombinant

A2.1. Obtenció de DNA plasmídic

En el present treball s'ha utilitzat majoritàriament el Kit comercial Quantum Plasmid Miniprep, de Bio-Rad, que proporciona un DNA lliure de RNA. El kit empra exoesquelets de diòxid de silici de diatomees com a matriu per a unir el DNA. El DNA plasmídic purificat per aquest sistema fou emprat en el present treball o bé directament per a transformar cèl·lules, o bé per a ésser modificat mitjançant enzims de restricció

PROCEDIMENT

1. Transferir 1,5 mL d'un cultiu de nit de cèl·lules transformades amb el vector d'interès a un tub eppendorf. Centrifugar a 12.000.xg durant 30 s, i eliminar el sobrenedant per aspiració.
2. Afegir 200 mL de la solució de resuspensió, i resuspendre el sediment.
3. Afegir 250 mL de la solució de lisis cel·lular i mesclar-la amb cura per inversió. La solució esdevindrà viscosa i clara si la lisi s'ha donat correctament.
4. Afegir 250 mL de la solució de neutralització i mesclar també invertint el tub eppendorf 10 vegades. Es formarà un precipitat visible.
5. Centrifugar durant 5 min a 12.000.xg.
6. Posar un filtre dins d'un tub eppendorf net. Tot seguit, resuspendre la suspensió de matriu, i prendre'n 200 mL que s'afegeixen al tub del pas 5 que contenia el precipitat blanc. Evitant el contacte amb la paret de l'eppendorf que conté el precipitat, pipetejar la suspensió de matriu amunt i avall un parell de vegades. Immediatament, prendre la suspensió resultant i avocar-la acuradament en el filtre. Centrifugar aquest tub 30 s a 12.000.xg
7. Retirar per un moment el filtre dels eppendorfs, descartar el filtrat que apareix en el fons del tub, i retornar el filtre al seu lloc. Afegir llavors 500 mL de la solució de rentat i rentar la matriu per centrifugació a 12.000.xg durant 30 s.
8. Descartar altra vegada el filtrat. Afegir 500 mL de la solució de rentat, i rentar la matriu per centrifugació a 12.000.xg durant 2 min. D'aquesta manera es retiren possibles traces residuals d'etanol.
9. Col·locar el filtre en un nou tub eppendorf, afegir 100 mL d'H₂O desionitzada o de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8,0). Eluir el DNA per centrifugació durant 30 s. Si es vol incrementar el rendiment de la purificació es pot repetir aquest pas un parell de vegades.
10. S'emmagatzema el DNA a -20°C fins a la seva utilització.

A2.2. Electroforesi de DNA en gel d'agarosa

Aquesta tècnica s'ha utilitzat per analitzar preparacions de DNA plasmídic, productes de digestió amb enzims de restricció i productes de PCR, a banda de ser l'etapa preliminar per a la purificació del DNA i un mètode excel·lent d'estimació de la concentració de DNA.

SOLUCIONS NECESSÀRIES

Amortidor TAE 50x (1 L):

Tris-base	242 g
Àcid acètic glacial	157,1 ml
EDTA	18,6 g
Aigua destil·lada	fins a 1L

Amortidor de càrrega 10x (100 ml):

Ficoll-400	15 g
Blau de bromofenol	250 mg
Xilen cianol	250 mg
Aigua milli-Q	fins a 100 ml

PROCEDIMENT

1. Pesar la quantitat necessària d'agarosa d'acord amb el percentatge final desitjat del gel i ficar-ho en un contenidor de tipus erlenmeyer.
2. Afegir-hi aigua destil·lada igual al volum final del gel menys el volum d'amortidor concentrat que cal afegir després de l'ebullició. Bullir en un microones, per fondre l'agarosa. És important que tota l'agarosa estigui fosa i no quedin partícules en suspensió.
3. Afegir-hi l'amortidor concentrat (TAE x50) i, un cop la solució s'ha refredat fins aproximadament 50°C, el bromur d'etidi, a una concentració final de 0,5 µg/ml. Mesclar bé abocar-ho en el motllo. En aquest procés d'abocar l'agarosa, prèviament al qual haurem col·locat la pinta per la formació de les butxaques, cal anar amb compte que no es formin bombolles que podrien interferir en el posterior recorregut de les mostres.
4. Un cop abocat es deixa gelificar l'agarosa, procés que pren més temps com menor sigui el percentatge del gel. Mentre està gelificant es prepara l'amortidor d'elució diluint l'amortidor concentrat utilitzat en la preparació del gel.
5. Afegir a les mostres que es volen carregar 1/10 (v/v) d'amortidor de càrrega x10. Opcionalment les mostres es poden escalfar a 65°C durant 10 minuts, i refredar-les a continuació en gel picat.
6. Carregar les mostres en les butxaques, juntament amb un marcador de massa molecular adient en funció dels requeriments de cada cas. En tots dos casos són subministrats dissolts sense amortidor de càrrega per la qual cosa s'han de diluir en un volum igual d'amortidor de càrrega i 8 volums d'aigua destil·lada. De la dissolució resultant se n'apliquen 10 µl.
7. Per a l'electroforesi s'ha utilitzat un voltatge de 80-100 mV. L'electroforesi es perllonga fins que el primer colorant (BPB) assoleix aproximadament els 3/4 del recorregut del gel.
8. Els gels situats sobre un transil·luminador UV es fotografien amb una Polaroid MP-4+ equipada amb un filtre taronja Wratten 23A.

A2.3. Purificació de fragments de DNA

L'aïllament i purificació d'un fragment de DNA de doble cadena lineal, provinent de la digestió d'un vector amb enzims de restricció, esdevé un pas imprescindible per a moltes manipulacions posteriors com ara digestions amb altres enzims de restricció i lligaments. La purificació de DNA ha estat també necessària per obtenir DNA plasmídic sencer d'un grau de puresa suficient per a qualsevol manipulació delicada, com la seqüenciació o l'amplificació per PCR d'una regió del plasmidi. S'ha optat pel sistema GENECLAN (BIO101 Inc., EUA), un sistema per purificar dsDNA o ssDNA amb una longitud superior a 200 pb, a partir d'un gel d'agarosa. També és un mètode vàlid per a la concentració del DNA.

PROCEDIMENT

1. Realitzar una electroforesi de les mostres de DNA en un gel d'agarosa utilitzant TAE com a amortidor d'elució de l'electroforesi.
2. Il·luminar el gel amb llum ultraviolada d'ona llarga i un cop localitzada la banda d'interès, retallar-la amb una ganiveta estèril i introduir-la en un tub eppendorf que prèviament s'haurà pesat. S'ha de procurar agafar la menor quantitat d'agarosa possible i evitar temps d'exposició massa llargs del DNA a la llum ultraviolada.
3. Tornar a pesar l'eppendorf que conté la banda i afegir-hi 3 ml de la solució saturada de NaI per a cada gram de banda d'agarosa.
4. Incubar l'eppendorf en un bany escalfat anteriorment a 55°C, fins que tota l'agarosa es fongui (5-10 minuts).
5. Per recomanació de la casa comercial és aconsellable, afegir 10 µl d'una solució d'àcid acètic glacial 10% (v/v) un cop l'agarosa està fosa, quan es volen eluir fragments de DNA amb longituds compreses entre els 250 i 500 pb. Aquest fet millora el rendiment d'unió del fragment de DNA a les partícules de sílica.
6. Afegir a continuació 5 µl de solució de la suspensió de partícules de sílica. Agitar en vòrtex uns segons, i tot seguit incubar en gel picat durant 5 minuts, agitant en vòrtex cada 1-2 minuts.
7. Centrifugar 5 segons a 12.000 xg a la minifuga. Descartar el sobrenedant per aspiració amb una pipeta pasteur.
8. A continuació rentar 3 cops el precipitat amb 0,6 ml de la solució alcohòlica que haurà estat guardada en gel durant tot el procés. En cada rentat resuspendre el precipitat pipetejant amunt i avall per a seguidament centrifugar durant 5 segons en minifuga i descartar el sobrenedant.
9. Després del tercer rentat afegir al sediment 10-20 µl d'amortidor TE o aigua destil·lada autoclavada. Resuspendre amb cura amb una pipeta automàtica i incubar a 45-55°C durant 2-3 minuts.

10. Centrifugar durant 2-3 minuts en una minifuga a 12.000 xg. El sobrenedant, on es troba el DNA es transvasa a un nou tub eppendorf estèril.

11. Opcionalment es poden repetir els punts 9 i 10.

A2.4. Precipitació de DNA

Aquest mètode és útil tant per a precipitar petites quantitats de DNA (de 100 a 1 ng), com per DNA poc concentrat. En el nostre cas, s'ha fet sempre una extracció prèvia amb cloroform. El protocol seguit ha estat el següent:

1. Recuperar 90 µl del producte de PCR sense arrossegar oli mineral (eixugar l'exterior de la punta de pipeta amb paper Tracipcel si hi queden restes d'oli).
2. Afegir-hi 90 µl d'una barreja de fenol: cloroform:alcohol isoamílic (25:24:1).
3. Agitar en vòrtex.
4. Centrifugar durant 5 min a 12.000 r.p.m.
5. Recuperar 85 µl de la fase aquosa
6. Afegir-hi 9 µl d'acetat sòdic 3 M i 8 µl d'acrilamida al 0,25%.
7. Agitar en vòrtex.
8. Afegir-hi 275 µl d'etanol absolut.
9. Invertir unes quantes vegades
10. Deixar a -80°C durant 1 hora o bé a -20°C durant la nit.
11. Centrifugar durant 10 minuts a 12.000 r.p.m.
12. Eliminar el sobrenedant per aspiració
13. Afegir al tub 1 ml d'etanol 70%.
14. Centrifugar 5 minuts a 12.000 r.p.m.
15. Eliminar el sobrenedant per aspiració.
16. Deixar assecat el sediment.
17. Resuspendre amb el volum desitjat d'aigua Milli-Q autoclavada (generalment 15 µl).

El protocol per a la preparació de l'acrilamida al 0,25% és el següent:

1. Per a un volum final de 25 ml de solució estoc, barrejar:

- 1,25 g acrilamida
- 1 ml Tris base 1 M
- 167 µl acetat sòdic 3 M
- 100 µl EDTA 0,5 M pH 7,8
- Aigua destil·lada fins a 25 ml

La solució resultant és acrilamida 5 % en Tris 40 mM, Acetat sòdic 3 M, EDTA 2 mM.

2. Polimeritzar la solució anterior afegint-hi 250 µl de persulfat amònic al 10% i 25 µl de TEMED. Deixar a temperatura ambient durant 30 minuts, fins a la completa polimerització.
3. Agafar una alíquota de 5 ml d'aquesta solució i afegir-hi acetat sòdic fins a una concentració final de 0,3 M.
4. Afegir-hi 3 volums d'etanol absolut i precipitar el polímer deixant-lo a -20°C durant 5 min.
5. Centrifugar durant 5 min a 10.000 xg. Retirar el sobrenedant.
6. Rentar el sediment amb etanol 70 %, centrifugar en minífuga durant 5 min a 10.000 xg i retirar el sobrenedant.
7. Deixar assecar el sediment i dissoldre'l amb 100 ml d'aigua destil·lada (el que donarà una concentració final d'acrilamida 0,25%).
8. Les solucions es guarden a -20°C (tant l'estoc com la de treball), tot i que la solució de treball es pot mantenir a temperatura ambient, o a 4°C. Es recomana aliquotar-la en tubs eppendorf.

A2.5. Reacció de lligament

Aquesta tècnica permet unir molècules de DNA a fi d'obtenir construccions per a un determinat propòsit. En el nostre cas, l'enzim utilitzat ha estat sempre la DNA lligasa de T4 (Roche).

Les variables més importants que cal tenir en compte són les concentracions de DNA del vector i de l'insert, la durada i la temperatura del lligament.

PROCEDIMENT

1. En amortidor de lligasa, es barregen els fragments de DNA que es volen lligar, purificats preferentment a partir d'electroforesi en gel d'agarosa. Idealment s'aconseja, que la concentració sigui 1 pmol/ml de DNA de vector per 4 pmol/ml de DNA d'insert, quan els extrems són cohesius. S'ha utilitzat l'amortidor que proporciona la casa comercial (Roche). Aquest amortidor és també recomanable guardar-lo en alíquotes de 5-10 µl a -20°C.
2. Afegir la DNA lligasa de T4 en una proporció de 0,1-0,5 Unitats/µg de DNA.
3. Incubar la reacció de lligament a 15°C durant 15-20 hores. Sovint, degut al fet que se sol treballar amb concentracions més elevades de lligasa (fins a 5 Unitats/µg de DNA), es pot optar, sobretot en lligaments d'extrems cohesius, per incubacions de 2-4 hores a temperatura ambient.
4. Aquesta mescla pot utilitzar-se directament per a transformar cèl·lules competents. S'aconseja no utilitzar mai tota la mescla de lligació en una única transformació. En el cas que no es pensi utilitzar immediatament, es pot guardar a -20°C.

A2.6. Obtenció de competents *E. coli*

En el protocol que es descriu a continuació cal fer especial esment de la necessitat que el procés s'ha de dur a terme amb les màximes garanties d'esterilitat.

PROCEDIMENT

1. Incubar 5 ml de LB líquid, inoculats a partir d'una colònia de la soca desitjada crescuda en placa, durant tota la nit a 37°C i 250 r.p.m.
 2. L'endemà, inocular 20 ml de medi LB líquid fresc amb 200 µl de cultiu de nit. Incubar a 37°C i 250 r.p.m fins que el cultiu assoleixi un valor d'absorbància a 550 nm d'aproximadament 0,5 unitats de densitat òptica, la qual cosa per a la majoria de les soques equival a 4-5 hores d'incubació a 37°C i 250 r.p.m.
 3. Transferir el cultiu a un tub de centrifuga autoclavable estèril i mantenir i centrifugar 10 min a 3.000 xg a 4°C.
 4. Descartar el sobrenedant. Resuspendre el sediment cel·lular en 10 ml de CaCl₂ 100 mM estèril i refredat en gel. És convenient afegir primer 1-2 ml de la dissolució de CaCl₂, resuspendre pipetejant amunt i avall de forma lenta i afegir els ml restants i mesclar suaument.
 5. Deixar en gel durant 30 min.
 6. Centrifugar novament durant 10 min a 3.000 xg i 4°C.
 7. Decantar el sobrenedant. Resuspendre el sediment en 1 ml de CaCl₂ 100 mM estèril que s'haurà guardat en gel.
 8. Distribuir en tubs eppendorf (prèviament refredats en gel) en alíquotes de 50 o 100 µl i guardar-les a 4°C.
- Les cèl·lules conserven les seves propietats de competents durant unes 48 hores. L'eficiència de transformació s'incrementa de 4 a 6 vegades entre les 12 i les 24 hores després de la preparació de les cèl·lules competents, per la qual cosa és recomanable fer-les servir durant el període comprès entre aquestes hores.
- Aquest protocol pot ésser escalat per obtenir una major quantitat de cèl·lules competents amb la finalitat d'emmagatzemar les alíquotes per temps llargs a -80°C. En aquest cas, cal substituir la solució de CaCl₂ 100 mM del punt 7 per una solució de CaCl₂ 100 mM, glicerol 15 % freda, i guardar les alíquotes a -80°C.

A2.7. Transformació de cèl·lules competents d'*E. coli*

1. Si es fan servir cèl·lules competents congelades a -80°C es descongelen les alíquotes que s'hagin de menester segons el número de transformacions que es vulguin fer, transferint els tubs eppendorf a gel picat.
2. Afegir a cada fracció de cèl·lules competents (50 µl), un màxim de 50 ng de DNA en un volum que no sobrepassi 1/10 del volum de la

fracció o alíquota. Agitar suaument per tal de mesclar bé la solució del DNA amb les cèl·lules.

3. Incubar en gel durant 30 min.
4. Transferir els tubs eppendorf a un bany a 42°C durant 2 min.
5. Incubar els tubs en gel durant 10 min.
6. A continuació, afegir 0,2 ml de medi LB líquid fresc a cada tub eppendorf i incubar a 37°C en agitació suau com a mínim durant 45 min.
7. Sembrar alíquotes de 0,1 ml en plaques de LB-agar, suplementades amb ampicil·lina.
8. Incubar les plaques a l'estufa a 37°C fins que s'observin les colònies transformants (12-15 hores). Cal evitar incubacions massa llargues par tal que no apareguin colònies satèl·lit que dificultarien la selecció dels transformants.

A2.8. Amplificació de DNA mitjançant PCR

Durant aquest treball s'han hagut d'amplificar per PCR fragments de DNA, generalment insertats al plasmidi de clonatge pET17b. A banda de l'amplificació com a tal, la PCR ha estat també utilitzada en aquest treball per a la seqüenciació del DNA i la mutagènesi dirigida per oligonucleòtid. Cada cas requereix unes condicions diferents, però per una descripció general del procés seguit normalment, vegeu la descripció següent:

PROCÉS GENERAL PER A UNA PCR

BARREJA DE REACCIÓ

- 10 µl Deep Vent Buffer x10
- 2 µl dNTPs 10 mM (0,2 mM final) (Roche)
- 10 µl dsDNA motllo
(50-100 ng pET17b+insert)
- 5 µl Oligonucleòtid 5'
- 5 µl Oligonucleòtid 3'
- 68 µl Aigua Milli-Q autoclavada
- 0,5 µl *Deep Vent* DNA Polimerase
(1 Unitat)
- 40 µl Oli mineral

PROGRAMA (TERMOCICLADOR):

- 1 min a 94°C
- Repetició de 30 cicles:
 - 1 min 15 sec a 94°C (desnaturalització)
 - 1 min a temperatura d'anellament
 - 1 min a 72°C (extensió)
 - 5 min a 72°C (extensió final)
- Indefinidament a 4°C

Per a totes les PCR cal dispensar en un tub per a termociclador els components indicats, en condicions d'asèpsia i preferiblement en un bany de gel. El volum final de les barreges de reacció és sempre 100 µl, cosa que s'aconsegueix, si cal, ajustant el volum d'aigua Milli-Q.

L'últim component de la reacció en afegir-se ha de ser la DNA polimerasa *Deep Vent*, que pel fet de tenir activitat exonucleasa podria degradar els oligonucleòtids abans d'iniciar-se el programa del termociclador. Tan bon punt s'ha afegit la polimerasa, es dispensa l'oli mineral i el tub es posa al termociclador, ja a 94°C. Cal assenyalar que aquestes han estat les condicions de partida, però això no vol dir que en casos puntuals no s'hagi hagut de jugar amb les proporcions de primers i DNA motllo, així com amb la temperatura de l'etapa d'anellament.

A2.9. Mutagènesi dirigida per oligonucleòtid

La FIGURA A1 mostra el procediment que es va seguir per a l'obtenció dels mutants del gen PM5 mitjançant PCR

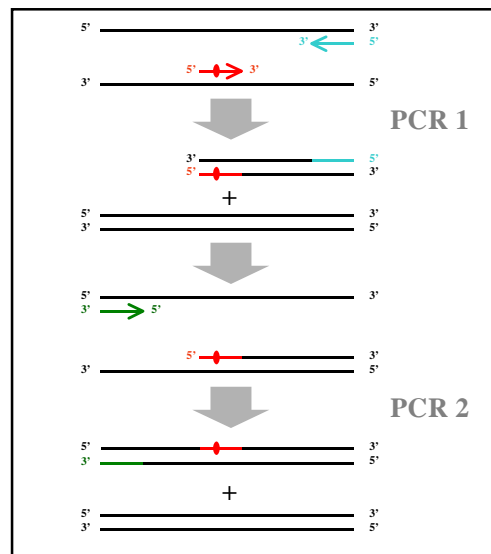


FIGURA A1: Representació del procés de mutagènesi dirigida per oligonucleòtid (SDM) per mitjà de PCR.

Es parteix del fragment que es vol mutar (DNA motllo), inserit en un vector adequat per al qual es tenen dos oligonucleòtids que s'hibriden als extrems del gen, a cadenes complementàries (oligonucleòtids universals, FUP i RUP). En una primera PCR s'amplifica una part del fragment inserit, la compresa entre les regions a les que s'hibriden l'oligonucleòtid mutagènic i un dels oligonucleòtids universals. Una de les cadenes del producte d'aquesta primera PCR, degudament purificat, servirà com a encebador per a una segona PCR, en la que el DNA motllo segueix essent el vector que porta incorporat el fragment a mutar, i el segon encebador és l'oligonucleòtid universal contrari

al que s'ha utilitzat en la primera PCR. El producte final de la segona PCR és digerit amb dos enzims de restricció, i inserit a un vector de clonatge amb el que es transformen cèl·lules competents.

D'entre les colònies transformants obtingudes, se selecciona les que han incorporat correctament la mutació, fet que es comprova per seqüenciació del DNA.

Tot seguit es detallen els programes del termociclador utilitzats per a dur a terme les dues PCRs, així com la composició de les mescles de reacció.

Convé ressaltar que les dues reaccions són molt similars, i que la diferència principal és la utilització dels oligonucleòtids. El fet d'emprar el producte de la primera PCR com a oligonucleòtid per a la segona fa canviar les condicions, obligant a baixar la temperatura d'anellament del programa per a la segona PCR.

PRIMERA PCR:

MESCLA DE LA REACCIÓ:

Afegir els components en l'ordre indicat i en condicions d'asèpsia. Totes les reaccions es fan a un volum final de 100 µl.

És aconsellable que aquest procés es dugui a terme entre 0-4°C, utilitzant un bany de gel. L'enzim s'addiciona just abans d'iniciar la PCR.

10µl	Deep Vent Buffer x10
2 µl	dNTPs 10 mM (0,2 mM final)
10 µl	dsDNA motllo (50-100 ng pET17b+insert)
5 µl	Oligonucleòtid universal (20 pmol de FUP ó RUP)
5 µl	Oligonucleòtid mutagènic (20 pmol)
68 µl	Aigua Milli-Q autoclavada
0,5 µl	Deep Vent DNA Polimerase (1 Unitat)
40 µl	Oli mineral

PROGRAMA (1ª PCR):

1 min a 94°C
Repetició de 30 cicles:
1 min 15 sec a 94°C (desnaturalització)
1 min a la temperatura d'anellament
1 min a 72°C (extensió)
5 min a 72°C (extensió final)

SEGONA PCR:

MESCLA DE LA REACCIÓ:

10 µl	Deep Vent Buffer x10
4 µl	dNTPs 10 mM (0,4 mM final)
10 µl	dsDNA motllo (50-100 ng pET17b+insert)
10 µl	Producte purificat de la 1ª PCR
5 µl	Oligonucleòtid universal (20 pmol de FUP ó RUP)
60 µl	Aigua Milli-Q autoclavada
0,5 µl	Deep Vent DNA Polimerase (1 Unitat)
40 µl	Oli mineral

PROGRAMA (2ª PCR):

1 min a 94°C
Repetició de 30 cicles:
1 min 15 sec a 94°C (desnaturalització)
1 min 30 sec a 45°C (anellament)
1 min 15 sec a 72°C (extensió)
10 min a 72°C (extensió final)

Cal utilitzar sempre l'oligonucleòtid universal de sentit contrari al mutagènic durant la 1ª PCR, i l'altre durant la 2ª PCR.

Cal assenyalar que aquestes han estat les condicions de partida, però això no vol dir que en casos puntuals no s'hagi hagut de jugar amb les proporcions de primers i DNA motllo, així com amb la temperatura de l'etapa d'annealing. El producte de la reacció es tracta com s'indica a l'apartat següent.

A2.10. Seqüenciació de DNA

S'ha emprat el kit comercial ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin Elmer, P/N 402078), que utilitza l'Ampli Taq DNA Polymerase, FS. Aquest sistema es basa en reaccions de seqüenciació cíclica amb dideoxinucleòtids marcats amb un fluoròfor, i s'ha emprat amb mostres de DNA provinents de PCR. L'enzim Ampli Taq DNA Polymerase FS es caracteritza perquè no té activitat correctora 5' a 3', d'aquesta manera s'evita l'eliminació dels ddNTPs que s'incorporen a la cadena còpia, i es pot aturar la síntesis.

El principi de la tècnica es basa en la capacitat de la DNA polimerasa de sintetitzar una cadena de DNA complementària a un DNA motllo. La síntesi s'inicia quan un encebador hibrida específicament amb el DNA motllo, i segueix fins que s'incorpora un dideoxinucleòtid marcat fluorescència (ddNTP) al qual li manca el grup OH en l'extrem 3', necessari per al creixement de la cadena que s'està copiant. Els fragments així generats, de diferents tamanyos, són separats

mitjançant un gel de poliacrilamida desnaturalitzant, i visualitzats mercès la capacitat fluorescent del seu ddNTP terminal.

PREPARACIÓ DEL DNA:

1. Per a cada clon seleccionat es realitza una extracció de DNA plasmídic (segons l'apartat A2.1)
2. El DNA plasmídic es purifica mitjançant un GeneClean (segons l'apartat A2.3)
3. El DNA se sotmet a una amplificació per PCR utilitzant els encebadors T7PROM i T7TERM. Aquests hibriditzen en els extrems 5' de cada una de les cadenes de DNA del gen. Les condicions dels cicles de PCR segueixen les guies exposades en l'apartat A2.8.
4. Posteriorment, el DNA amplificat es precipita i es purifica seguint les metodologies exposades en els apartats A2.3 i A2.4, i es dissol en 20 mL d'aigua milli-Q autoclavada.

MESCLA DE SEQÜENCIACIÓ:

1. En un tub de microcentrífuga es prepara la mescla següent, en un volum final de 20 µl, sempre mantenint les condicions d'esterilitat adequades,

Terminator Ready Reaction Mix	8,0 mL
dsDNA, 0,1 mg/mL.	0,5-1,0 mL (50-100 ng)
Encebador (T7PROM o T7TERM)	0,2 pmol
Aigua milli-Q autoclavada	fins a 20 mL

2. S'afegeix l'oli mineral a la mescla, i se sotmet a PCR. D'aquesta manera s'aconsegueix, per a cada reacció de PCR (temperatura d'hibridació: 56°C), l'amplificació d'una sola de les cadenes del DNA motlle.

3. El ssDNA amplificat es precipita, i s'envia a seqüenciar al servei tècnic convenient.

A3. Mètodes de purificació de proteïnes

A3.1. Expressió de les proteïnes

DIA 0 (OPCIONAL)

A partir d'un glicerinat del clon que expressa la proteïna que es vol purificar, sembrar una placa d'LB+Ap.

DIA 1

1. Posar cultiu de nit de més de 10 ml d'LB+Ap 400 µg/ml a 37°C i 250 r.p.m. a partir de la placa sembrada el dia anterior o bé directament d'un glicerinat.

DIA 2

1. Inocular 1 l de medi LB + Ap 50 µg/ml (5 erlenmeiers d'1 L amb 200 ml de LB) amb 2 ml de cultiu de nit per erlenmeier.

2. Deixar créixer a 37°C i 250 r.p.m. fins a $Abs_{550} > 1$ (aproximadament 4-5 hores).

3. Prendre mostra de cultiu sense induir (1 mL, centrifugar, eliminar sobrenedant, resuspendre el sediment amb 100 µl d'amortidor d'aplicació x1, i desar a -20°C).

4. Induir el cultiu amb IPTG 1 mM (1 mL d'IPTG 200 mM per erlenmeier).

5. Deixar créixer a 37°C i 250 r.p.m. durant 3-4 hores.

6. Prendre mostra de cultiu després d'induir (0,5 ml, centrifugar, eliminar sobrenedant, resuspendre el sediment amb 100 µl d'amortidor d'aplicació x1, i desar a -20°C).

7. Acumular les cèl·lules del cultiu per centrifugació (20 min, 8000 r.p.m.).

8. Desar els sediments a -20°C fins que es comenci el procés de purificació.

Atenció: Abans de començar a purificar, donat que es tracta d'un procediment car, val la pena comprovar que hi hagi hagut sobre-expressió fent un SDS-PAGE al 15% amb les mostres abans i després d'induir.

A3.2. Purificació de les proteïnes

DIA 1

1. Resuspendre les cèl·lules del cultiu amb 30 ml de Tris-HCl 50 mM EDTA 10 mM pH 8.0. Repartir en dos tubs de centrifuga.

2. Realitzar la lisi cel·lular per French Press. Es duur a terme la lisi per mitjà de tres cicles de presurització a 1000 psi, dipositant la mostra en gel després de cada cicle per evitar que s'escalfi massa.

3. Centrifugar els tubs 10 min a 12000.xg. Descartar el sobrenedant.

4. Resuspendre el sediment amb 5 ml de Gnd-HCl 6M, Tris-Acetate 100 mM, EDTA 2 mM, pH 8,5. Comprovar el pH (aprox. 8,15).

5. Afegir 0,154 g GSH a cada tub (concentració final GSH 0,1 M).

6. Ajustar pH amb Tris sòlid fins a 8,5 (es recomana prendre 40 µl de mostra per a posteriors anàlisis).

7. Deixar el tub tancat durant dues hores en atmosfera inert de N₂ (per evitar oxidacions).

8. Centrifugar la mostra a 10000.xg durant 35 min a 4°C.

9. Diluir el sobrenedant gota a gota en 1 L de Tris-acetat 100 mM (12,1 g), L-Arg 0,5 M (87,1 g), GSSG 1 mM (0,6 g), EDTA 2mM (4 ml EDTA 0,5 M), pH 8,5.

10. Deixar la mostra diluïda incubant-se a 10°C, durant 24 hores.

DIA 2

1. Muntar aparell d'ultrafiltració tangencial durant el matí.
2. Centrifugar la mostra incubada durant 24 h a 6000 r.p.m. durant 30 min.
3. Ajustar el pH de la mostra a 5,0 amb àcid acètic.
4. Concentrar des d'1 L fins a poc més de 50 mL per ultrafiltració tangencial (ATP=14-15 psi). Es triga entre 2 i 4 hores. Deixar l'equip net amb aigua Milli-Q durant la nit.
5. Mesurar el volum final, i prendre'n 1 ml (desar-lo a 4°C).
6. Dialitzar durant la nit contra 5 L d'acetat sòdic 50 mM pH 5,0 a 4°C.

DIA 3

1. Canvi de diàlisi (haurà aparegut precipitat blanc) també contra 5 L d'acetat sòdic 50 mM pH 5,0 a 4°C.
2. Rentar l'aparell d'ultrafiltració tangencial amb NaOH 1.5% i fer un test de fluxos abans de desmuntar-lo.
3. Centrifugar el contingut del sac de diàlisi durant 30 min a 10000 r.p.m. per tal d'eliminar el precipitat blanc (guardar-ne una punta d'espàtula a 4°C).
4. Segon canvi de diàlisi contra 5 L d'acetat sòdic 50 mM pH 5,0 a 4°C.

DIA 4

1. Treure la mostra del sac de diàlisi, i filtrar-la amb un filtre de 0,22 µm.
2. Preparar amortidors per a la cromatografia de bescanvi catiònic per HPLC:

Bomba A: 1 L Acetat sòdic 50 mM pH 5
Bomba B: 0,5 L Acetat sòdic 50 mM, NaCl 1M, pH 5,0

3. Cromatografia de bescanvi iònic per HPLC en una columna HR 5/5 (Pharmacia Biotech) de la mostra.

- Flux:	1 ml/min
- Rentat:	10 min amb l'amortidor A
- Gradient:	0-25 % B en 60 min 25-100 % B en 5 min 100 % B durant 10 min

4. Recollir el pic principal de cada punxada. Anotar el volum final. Prendre'n uns 100 µl per fer un assaig de Bradford.

5. Dialitzar els pics principals recollits contra aigua Milli-Q, per després poder liofilitzar.

6. Fer un assaig de Bradford per mirar el rendiment final.

DIA 5 (OPCIONAL)

Fer una punxada analítica a una columna de bescanvi aniònic per HPLC, per tal de comprovar l'homogeneïtat de la mostra.

A4. Mètodes d'anàlisi i caracterització de proteïnes

A4.1. Determinació de la concentració de proteïna

1. Preparar, amb la major exactitud possible, una dissolució 0,1 mg/ml d'albumina sèrica bovina (BSA) en aigua destil·lada.
2. A partir de la dilució anterior, preparar una recta patró amb les dilucions de 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 i 24 µg/ml de proteïna en 800 µl d'aigua Milli-Q.
3. Preparar diferents dilucions de les mostres a analitzar en un volum final de 800 µl en aigua.
4. Afegir 200 µl de Reactiu de Bradford (Bio-Rad) sense diluir i s'agita immediatament, invertint el tub diverses vegades.
5. Esperar un mínim de 5 min i un màxim de 15 min, ja que el color disminueix per la precipitació de la proteïna en medi àcid (aquest procés s'accentua a concentracions de proteïna elevades) i mesurar l'absorbància a 595 nm enfront d'un blanc preparat amb 800 µl d'aigua Milli-Q i 200 µl del reactiu.
6. Finalment es construeix el gràfic d' A_{595} respecte la concentració de proteïna (µg/ml) per a la recta patró, i s'hi interpolen les diferents mostres, tenint en compte el factor de dilució utilitzat per a cadascuna.

A4.2. Electroforesi de proteïnes en gel glicina de poliacrilamida-SDS

L'electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS ha estat el mètode analític utilitzat per la determinació del contingut proteic de cadascuna de les fraccions cel·lulars, i el seguiment dels processos de purificació, així com per a la determinació del grau de puresa de les mostres obtingudes al final del procés. En aquest treball s'ha utilitzat el mètode d'electroforesi discontinua descrit per Laemmli (1970).

Els gels de poliacrilamida-SDS es preparen i es tenyeixen amb les següents dissolucions:

Dissolució A: Acrilamida 30 %-bisacrilamida 0,8 %

Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0,8 g
Aigua Milli-Q	fins a 100 ml

Dissolució B: Amortidor del gel separador (4x)

SDS	0,4 g
Tris	18,2 g
Aigua Milli-Q	fins a 100 ml
Ajustar el pH a	8,6-8,8 amb HCl.

La composició de la solució preparada concentrada 4x és: Tris-HCl 1,5 M; pH 8,8; SDS 0,4 %.

Dissolució C: Amortidor del gel concentrador (4x)

SDS	0,4 g
Tris	6,0 g
Aigua Milli-Q	fins a 100 ml
El pH s'ajusta a	6,8 amb HCl

La composició de la solució preparada concentrada 4x és: Tris-HCl 0,5 M; pH 6,8; SDS 0,4 %

Dissolució D: Amortidor d'elució (x10)

Tris	30,3 g
Glicina	144,1 g
SDS	10 g
Aigua Milli-Q fins a 1 litre	

Aquesta barreja sol donar un pH al voltant de 8,3-8,5 i no s'ha d'ajustar amb HCl.

La composició de la solució preparada concentrada 10x és: Tris 0,025 M; glicina 0,192 M; pH 8,3-8,5; SDS 0,1 %.

Dissolució E: Amortidor d'aplicació de mostres (4x)

Tris	15 g
Glicerol 87%(v/v)	40 ml
SDS	8 g
Blau de Bromfenol	0,05 g
Aigua Milli-Q	fins a 100 ml
El pH s'ajusta a	6,8 amb HCl.

Si es vol que l'amortidor d'aplicació de mostres tingui caràcter reductor s'hi afegeixen 7,5 ml de beta-mercaptoetanol. La composició final de l'amortidor d'aplicació de mostres 4x és: Tris-HCl 120 mM, pH 6,8; glicerol 40% (v/v); SDS 8% (p/v); beta-mercaptoetanol 7,5 % (v/v) (opcional); blau de bromofenol 0,05 % (p/v).

Dissolució de blau de Coomassie

Metanol	45 ml
Àcid acètic	10 ml
Coomasie Blue	0,1 g
Aigua Milli-Q	fins a 100 ml

La composició final de la solució és metanol 45 % (v/v), àcid acètic 10 % (v/v), Coomasie Blue (Sigma) 0,1 % (p/v)

Cal dissoldre el blau de Coomassie en el metanol abans d'afegir l'aigua i l'àcid acètic.

PREPARACIÓ DELS GELS

1. Rentar amb aigua i detergent els vidres, separadors i pintes que estaran en contacte amb el gel, i després esbandir-los amb aigua destil·lada. Finalment, passar-hi etanol al 70 %.

2. Muntar i alinear bé els vidres al seu suport. És recomanable assegurar-se que no hi ha pèrdues omplint la cavitat formada pels vidres i separadors amb aigua destil·lada.

3. Preparar el gel inferior o separador (15 %), barrejant les següents dissolucions:

Dissolució A	3,0 ml
Dissolució C	1,5 ml
Aigua Milli-Q	1,5 ml
TEMED	3 µl
Persulfat amònic 10%	36 µl

Cal afegir el TEMED i el persulfat amònic en últim terme, i ràpidament dispensar la barreja entre els vidres.

4. Omplir la cavitat formada per vidres i separadors amb la barreja fins al nivell desitjat, amb l'ajut d'una pipeta pasteur. Cobrir amb un petit volum d'aigua destil·lada que evitarà que l'oxigen alenteixi el procés de polimerització i permet que el front no es deformi. Esperar fins que el gel estigui completament polimeritzat.

5. Enretirar l'aigua destil·lada de la part superior del gel, i procedir a la preparació del gel superior o concentrador, barrejant:

Dissolució A	0,6 ml
Dissolució B	1,5 ml
Aigua Milli-Q	3,9 ml
TEMED	6 µl
Persulfat amònic 10%	72 µl

Dispensar la barreja al damunt del gel inferior, col·locar correctament la pinta que haurà de formar les butxaques, i deixar polimeritzar el temps que sigui necessari.

ELECTROFORESI

6. Un cop els gels han polimeritzat, l'amortidor d'elució 10x (Dissolució D) es dissol 1/10 amb aigua Milli-Q i s'omple la cubeta d'electroforesi evitant la formació de bombolles en l'extrem inferior dels gels, perquè aquestes podrien afectar l'electroforesi de les mostres.

7. Per preparar les mostres s'afegeix 1 volum d'amortidor d'aplicació de mostres (Dissolució E) per cada 3 volums de mostra. Les mostres s'escalfen durant 5 min a 90-100°C abans d'ésser carregades en el gel.

8. Carregar les mostres al gel fent ús d'una xeringa Hamilton, tenint cura d'esbandir-la amb àcid nítric al 30 % i aigua Milli-Q entre mostra i mostra.

9. Connectar la cubeta a la font d'alimentació. Les electroforesis s'han fet rutinàriament a temperatura ambient i amb una intensitat de corrent de 20-30 mA per gel fins que el colorant de l'amortidor de càrrega surt per la part inferior del gel.

10. Treure els suports de la cubeta, i separar els vidres per poder-ne treure els gels. Eliminar el gel superior, i procedir a la tinció del gel inferior, havent-lo marcat amb un tall a un dels extrems per poder identificar correctament cada carril.

TINCIÓ

A continuació es detallen les dissolucions i condicions emprades per a la tinció dels gels de poliacrilamida amb blau de Coomassie, mètode al que s'atribueix un límit de detecció d'entre 0,3 µg i 1 µg per banda de proteïna.

Totes les etapes es duen a terme a temperatura ambient amb agitació suau.

11. Submergir el gel separador en una solució metanol 50%, àcid acètic 10 % (dissolució fixadora) durant un mínim de 30 min.

12. Retirar la solució fixadora i cobrir el gel amb una dissolució de blau de Coomassie durant 10-15 min.

13. Eliminar la solució de tinció i dur a terme diversos rentats amb àcid acètic 7 %, per tal de decolorar la poliacrilamida. Els gels poden conservar-se per temps perllongats en aquesta solució. El procés de decoloració es pot accelerar submergint el gel en una dissolució de metanol 30 %, àcid acètic 12 % i incubant-ho a 37°C.

A4.3. Electroforesi de proteïnes en gel de tricina i poliacrilamida-SDS

Els gels de tricina i poliacrilamida-SDS es van preparar seguint el protocol de Schaeffer i Jagow (1987), que es descriu tot seguit.

Dissolució A: Acrilamida 40 % -bisacrilamida 2,43 %

Dissolució B: Amortidor del gel

SDS	0,6 g
Tris	72,0 g
Aigua Milli-Q	fins a 200 ml
Ajustar el pH a	8,45 amb HCl

La composició de la solució preparada és: Tris-HCl 3 M; pH 8,45, SDS 0,3 %.

Dissolució C: Amortidor ànode (5x)

Tris	121,0 g
Aigua Milli-Q	fins a 1000 ml
El pH s'ajusta a	8,9

La composició final de la solució 1x serà: Tris-HCl 0,2 M; pH 8,9.

Dissolució D: Amortidor càtode (5x)

Tris	60,5 g
Tricina	90 g
SDS	5 g
Aigua Milli-Q	fins a 1 litre

La composició final de la solució 1x serà: Tris 0,1 M; tricina 0,1 M; SDS 0,1 %.

Dissolució E: Amortidor d'aplicació de mostres (4x). Té la mateixa composició que la descrita a l'apartat A4.2.

Dissolució de blau de Coomassie. Té la mateixa composició que la descrita a l'apartat A4.2.

PREPARACIÓ DELS GELS

Les composicions dels gels són:

1. Preparar el gel inferior o separador (12,5 %), barrejant les següents dissolucions:

Dissolució A	3,1 ml
Dissolució B	3,3 ml
Aigua Milli-Q	2,6 ml
Glicerol 100 %	1,0 ml
TEMED	5 µl
Persulfat amònic 10%	50 µl

Cal afegir el TEMED i el persulfat amònic en últim terme, i ràpidament dispensar la barreja entre els vidres.

2. Preparar el gel superior o apilador, barrejant les següents dissolucions:

Dissolució A	0,6 ml
Dissolució B	1,0 ml
Aigua Milli-Q	4,6 ml
TEMED	5 µl
Persulfat amònic 10%	50 µl

ELECTROFORESI

3. Un cop els gels han polimeritzat, dissoldre l' amortidor del càtode 5x (Dissolució D) 1/5 amb aigua Milli-Q i omplir la cubeta superior d'electroforesi evitant la formació de bombolles en l'extrem inferior dels gels, perquè aquestes podrien afectar l'electroforesi de les mostres.

4. Dissoldre l' amortidor de l' ànode 5x (Dissolució C) 1/5 amb aigua Milli-Q i omplir la cubeta inferior d'electroforesi

5. Per preparar les mostres, afegir 1 volum d' amortidor d' aplicació de mostres (Dissolució E) per cada 3 volums de mostra. Escalfar-les durant 5 min a 90-100°C abans d' ésser carregades en el gel.

6. Carregar les mostres al gel fent ús d' una xeringa Hamilton, tenint cura d' esbandir-la amb àcid nítric al 30 % i aigua Milli-Q, entre mostra i mostra.

7. Connectar la cubeta a la font d' alimentació. Les electroforesis s' han fet rutinàriament a temperatura ambient i amb una intensitat de corrent de 20-30 mA per gel fins que el colorant de l' amortidor de càrrega surt per la part inferior del gel.

8. Treure els suports de la cubeta, i separar els vidres per poder-ne treure els gels. Eliminar el gel superior, i procedir a la tinció del gel inferior, havent-lo marcat amb un tall a un dels extrems per poder identificar correctament cada carril.

TINCIÓ

Es segueix el mateix procediment que el descrit a l' APARTAT A4.2.

A4.4. Zimograma

És imprescindible que el material estigui molt net per la qual cosa els vidres, separadors i pintes s' han de netejar exhaustivament amb etanol 70%, abans de l' electroforesi. Tots els gels d' activitat s' han realitzat emprant separadors de 0,75 mm.

1. Es prepara un gel del percentatge desitjat segons s' ha descrit anteriorment en l' apartat A4.2., amb lleugeres modificacions:

- Es dispensa en un vas de precipitats l' aigua i en un altre l' amortidor del gel de separació i la solució d' acrilamida.

b. En el vas de precipitats que conté l' aigua es dissol el poli(C) (prèviament s' haurà pesat utilitzant dues pinces fetes netes submergint-les un parell de minuts en àcid nítric diluït i esbandides amb aigua destil·lada) que ha de tenir una concentració final en el gel de 0,3 mg/ml de gel.

c. Aquesta dissolució s' incuba tapada amb paper d' alumini, en una estufa a 55°C durant 10 min. Aquest pas facilita la dissolució del poli(C).

d. Un cop dissolt el poli(C), s' aboca sobre el vas que el conté la barreja de solució d' acrilamida i d' amortidor del gel separador.

e. S' afegeixen les quantitats de TEMED i persulfat amònic 10% que pertoquin i s' agita la solució fent girar el vas sobre una superfície plana, sempre d' una forma suau.

f. S' aboca la dissolució del gel separador en el suport i s' hi afegeix una capa d' aigua que facilita la polimerització i permet que el front del gel no es deformi. El gel es deixa polimeritzar com a mínim durant 30 min.

2. El gel concentrador es prepara com s' ha descrit en l' APARTAT A4.2.

3. Les mostres es preparen amb amortidor d' aplicació de mostres 4x sense beta-mercaptoetanol.

4. Les condicions d' electroforesi són les mateixes que les d' una electroforesi discontinua de poli(acrilamida)-SDS.

5. Revelat del gel:

a. Eliminar l' SDS és eliminat del gel submergint aquest en amortidor Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; 20 % isopropanol, amb agitació suau. Es fan dos rentats de 15 min cada un utilitzant uns 50-100 ml per a cada rentat.

b. L' isopropanol s' elimina incubant el gel en amortidor Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, amb agitació suau. Aquest rentat és de 15 min, es fa dues vegades, i en cada rentat s' utilitzen 50-100 ml.

c. Incubar el gel s' incuba, en agitació suau, a temperatura ambient en amortidor Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. El temps d' incubació és variable depenent de la concentració de la mostra i oscil·la entre 30 min i 1 hora a temperatura ambient fins a tota la nit a 4°C. Aquesta incubació és interessant dur-la a terme amb agitació molt suau per evitar al màxim la difusió.

d. Incubar el gel durant 10 min amb agitació, en amortidor Tris-HCl 10mM, pH8,0.

e. Els gels es tenyeixen per un període de 10-15 min, submergint-los en una dissolució de blau de toluidina 0,1 %, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. Aquest pas tenyeix el poli(C) que no ha estat digerit. Les zones o bandes d' activitat apareixen, després d' eliminar l' excés de colorant, com a bandes clares sobre un fons blau.

f. Per a eliminar l'excés de colorant el gel es renta, fent-ne diversos canvis, amb aigua corrent. Si es vol accelerar el procés de decoloració el gel se submergeix en una dissolució d'àcid acètic 7%. Alternativament al sistema de tinció que s'ha descrit, l'aparició de les bandes d'activitat es pot seguir col·locant el gel sobre una placa de capa fina de cel·lulosa amb l'indicador fluorescent F254 (Merck), la qual ha estat embolicada amb paper transparent (Glad). Tot seguit s'il·lumina amb llum ultraviolada de 254 nm mitjançant una font UVatom 70 (Atom). Les bandes d'activitat s'observen com zones clares en un entorn més fosc.

Aquest sistema té l'avantatge que permet seguir l'aparició de les bandes d'activitat a mesura que aquestes es van generant alhora que pot ésser fotografiat en les mateixes condicions amb què es fotografia el DNA en un gel d'agarosa. S'utilitza una obertura de diafragma de 4,5 i un temps d'exposició de 2 min i 30 segons.

A4.5. Determinació espectrofotomètrica de les constants catalítiques

SEGUIMENT ESPECTROFOTOMÈTRIC DE LA HIDRÒLISI DE CITIDINA 2',3'-FOSFAT CÍCLIC (C>P):

Els paràmetres cinètics de les ribonucleases utilitzant com a substrat C>p s'han determinat pel mètode espectrofotomètric de Crook i col. (1960) amb algunes modificacions (Herries i col. 1962). En aquest mètode la hidròlisi del substrat C>p, corresponent a la segona etapa del mecanisme de catàlisi de la ribonucleasa, es mesura seguint l'increment d'absorbància a 296 nm produït pel trencament de l'enllaç cíclic i la formació de 3'-CMP. Les condicions d'assaig foren les següents:

Amortidor: Acetat sòdic 0,2 M (pH 5,5)

Enzim: La concentració final d'enzim fou de 0,1 μM.

Substrat: S'assagen 8 dilucions de C>p (Sigma Chemical Co., EUA) entre 0,1 i 3 mM en amortidor acetat sòdic 0,2 M (pH 5,5). Les concentracions de les diferents solucions es comproven a partir del coeficient d'extinció molar del substrat C>p a 268 nm: $\epsilon_{268} = 8650 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Wigler, 1968).

Volum de reacció: 1 mL de la reacció de substrat + 25 μl d'enzim. Les cubetes utilitzades són de quars, amb 1 cm de pas de llum.

Temps de reacció: La reacció és lineal durant 3-5 min a partir dels 20-30 s. Es prenen mesures durant 300 s.

Unitats: V_{\max} en mM/min, K_M en mM i k_{cat} en min^{-1} . S'utilitza l'increment d'absorció del 3'-CMP respecte al cCMP a 296 nm: $\text{De}_{296} = 516,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Arús, 1981).

SEGUIMENT ESPECTROFOTOMÈTRIC DE LA HIDRÒLISI DE POLI(C):

Els paràmetres cinètics es van determinar també espectrofotomètricament, utilitzant poli(C) com a substrat, mitjançant el mètode de mesura de la disminució d'absorbància a 294 nm (Boix, 1993). La determinació de l'activitat utilitzant com a substrat el poli(C) permet estudiar el mecanisme catalític de la RNasa A enfront de substrats d'alt pes molecular. Les condicions d'assaig es descriuen a continuació:

Amortidor: acetat sòdic 0,2 M (pH 5,5)

Substrat: S'assagen 8 dilucions de poli(C) (Sigma) entre 0,1 i 2,5 mg/mL en amortidor acetat sòdic 0,2 M (pH 5,5). Cal tenir molta cura al pesar el poli(C), utilitzant guants i pinces prèviament submergides en àcid nítric al 30% i esbandides amb aigua destil·lada.

Temps de reacció: La reacció és lineal durant 2-3 min a partir dels 10-20 s. Es prenen mesures durant 160 s.

Unitats: V_{\max} en disminució d'Abs/min, K_M en mg/mL i Rel. $V_{\max}/[E_0]$ en % respecte a la proteïna control ($[E_0]$ és la concentració final d'enzim).

Pel càlcul dels paràmetres K_M i V_{\max} , tant en els assajos amb poli(C) com amb C>p, s'utilitza el programa d'anàlisi ENZFITTER, (Leatherbarrow, 1987). Les velocitats inicials es calculen a partir de la tangent a l'origen de la progressió cinètica.

Apèndix B: Publicacions

Protein Expression and Purification **17**, 169–181 (1999)
Article ID prep.1999.1112, available online at <http://www.idealibrary.com> on
<http://dx.doi.org/10.1006/pep.1999.1112>

**PRODUCTION OF ENGINEERED HUMAN PANCREATIC
RIBONUCLEASES, SOLVING EXPRESSION AND
PURIFICATION
PROBLEMS, AND ENHANCING THERMOSTABILITY**

Albert Canals,* Marc Ribo´,* Antoni Benito,* Montserrat Bosch,*
Enrico Mombelli,† and Maria Vilanova*,¹

**Laboratori d'Enginyeria de Proteýnes, Departament de Biologia, Facultat de
Cie`ncies, Universitat de Girona,
Campus de Montilivi, 17071 Girona, Spain; and †INSERM U128, IFR 24,
19191 Route de Mende, F-34293 Montpellier Cedex 5, France*

Received April 7, 1999, and in revised form June 9, 1999

Protein Engineering, Vol. 15, No. 11, 887-893, November 2002

© 2002 [Oxford University Press](#)

<http://peds.oupjournals.org/cgi/content/full/15/11/887>

STABILIZATION OF HUMAN PANCREATIC RIBONUCLEASE THROUGH MUTATION AT ITS N-TERMINAL EDGE

A. Benito, M. Bosch, G. Torrent, M. Ribó and M. Vilanova*

**Laboratori d'Enginyeria de Proteïnes, Departament de Biologia, Facultat de Ciències,
Universitat de Girona,
Campus de Montilivi, 17071 Girona, Spain*

Received March 8, 2002; revised August 7, 2002; accepted August 26, 2002.

**QUANTITATIVE ANALYSIS USING MALDI-TOF MASS
SPECTROMETRY OF THE HYDROLYSIS AND CYCLIZATION
OF THE ACTIVATION PROCESS OF ONCONASE**

Marc Ribó[‡], Montserrat Bosch[‡], Gerard Torrent[‡], Antoni Benito[‡], Bruno
Beaumelle[§] and Maria Vilanova[‡]

Submitted

[‡]Laboratori d'Enginyeria de proteïnes, Departament de Biologia, Facultat de Ciències, Universitat de Girona, Campus de Montilivi, 17071 Girona, Spain

[§]UMR 5539 CNRS, Dept Biologie-Santé, Université Montpellier II, 34095
Montpellier Cedex 05, France

To whom correspondence should be addressed

Fax: +37-972-418150 – E-mail: maria.vilanova@udg.es

Running Title: MALDI-TOF MS characterization of onconase activation

This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnologia (BMC2000-017-0138-CO2, HF2000-0017), and from the Generalitat de Catalunya (SGR2000-64 and SGR2001-00196). M. Bosch gratefully acknowledges a pre-doctoral fellowship grant from CIRIT, Generalitat de Catalunya. We are also indebted to Fundació "M. F. de Roviralta", Barcelona, Spain, for equipment-purchasing grants.

A NUCLEAR LOCALIZATION SEQUENCE ENDOWS HUMAN PANCREATIC RIBONUCLEASE WITH CYTOTOXIC ACTIVITY

Montserrat Bosch[‡], Antoni Benito[‡], Marc Ribó[‡], Teresa Puig[‡], Bruno Beaumelle[§]
and Maria Vilanova[‡]



Submitted

[‡]Laboratori d'Enginyeria de proteïnes, Departament de Biologia, Facultat de Ciències, Universitat de Girona, Campus de Montilivi, 17071 Girona, Spain

[§]UMR 5539 CNRS, Dept Biologie-Santé, Université Montpellier II, 34095
Montpellier Cedex 05, France

To whom correspondence should be addressed

Fax: +37-972-418150 – E-mail: maria.vilanova@udg.es

Running Title: A cytotoxic HP-RNase variant targeted to the nucleus.

This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (BMC2000-017-0138-CO2, HF2000-0017), and from the Generalitat de Catalunya (SGR2000-64 and SGR2001-00196). M. Bosch gratefully acknowledges a pre-doctoral fellowship grant from CIRIT, Generalitat de Catalunya. We are also indebted to Fundació "M. F. de Roviralta", Barcelona, Spain, for equipment-purchasing grants.