



Universitat de Girona

CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL DE RIBONUCLEASES HUMANES

Goretti MALLORQUÍ FERNÁNDEZ

ISBN: 84-688-6949-X

Dipòsit legal: Gi.495-2004

<http://hdl.handle.net/10803/7616>

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

Facultat de Ciències
Departament de Biologia

**CARACTERITZACIÓ
ESTRUCTURAL DE
RIBONUCLEASES HUMANES**

GORETTI MALLORQUÍ FERNÁNDEZ

Girona, Febrer de 2003



Universitat de Girona

Facultat de Ciències
Departament de Biologia

CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL DE RIBONUCLEASES HUMANES

Memòria presentada per GORETTI MALLORQUÍ i FERNÁNDEZ, inscrita en el programa de doctorat de Biotecnologia de l'Institut de Tecnologia Agroalimentària, Campus Agroalimentari de Girona, Institut d'Ecologia Aquàtica, Departament de Biologia i Departament EQATA, per optar al grau de doctora en biologia per la Universitat de Girona.

El present treball s'ha realitzat a l'Àrea de Bioquímica i Biologia Molecular del Departament de Biologia de la Universitat de Girona, sota la direcció del Dr. RAFAEL DE LLORENS i a l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona (CSIC), sota la direcció del Dr. F. XAVIER GOMIS-RÜTH

Vist i plau de,

Dr. Rafael De Llorens
Director de tesi

Dr. F. Xavier Gomis-Rüth
Director de tesi

Goretti Mallorquí

Als meus pares, a la Noemí i a Mamina

“Veles e vents han mos desigs complir
faent camins dubtosos per la mar.
Mestre i ponent contra d'ells veig armar:
xaloc, llevant, los deuen subvenir,
ab llurs amics lo grec e lo migjorn,
fent humils precos al vent tramuntanal
que en son bufar los sia parcial
e que tots cinc completesquen mon retorn”.

Ausias March

Encara que no hàgim navegat sempre d'empopada,
a tots els que m'heu ajudat a acomplir els meus desigs...

Haig d'agrair tantes coses que no sé per on començar...tampoc sé si seré capaç d'expressar tot allò que sento en aquests moments: alegria, satisfacció, també por, certa angoixa...d'entre tots els sentiments i sensacions que m'omplen ara mateix, però, m'agradaria transmetre la meva gratitud i el meu afecte a tots els que heu estat al meu costat al llarg d'aquests anys. Per endavant, i per si aquestes línies se'm fan curtes, MOLTÍSSIMES GRÀCIES A TOTS!!!!!!!!!!!!

Als Drs. Miquel Coll, Rafael de Llorens, F. Xavier Gomis-Rüth i Rosa Peracaula, per l'oportunitat, la confiança, la supervisió...

A tots els Cri's i al grup de BQ, per l'acollida, els consells, l'amistat, les bones estones...

A les nenes-Cri, Rosa, Cristina i Raquel i a les nyenyets-BQ, Marta Sitjà, Glòria, Sílvia i Laura, pel suport al laboratori, per la convivència diària, pels cafès compartits, pels moments de lleure, per les confidències...

A en Xavi Carpena i l'Anna Jofré, per precedir-me, per l'intercanvi d'informació, pel bon "rotllo", per resoldre'm tants dubtes!

A l'Alba, per les converses "transoceàniques", per la visió de la ciència, per l'assessorament en tot moment...

A Pedro y Sandra, por los buenos consejos, la disposición, la generosidad, la simpatía...

A tots els Coffee girls, però especialment a l'Anna, la Gis, en Lluís, la Glòria, la Sílvia, en Pep, la Marta, en Xevi, la Marga, la Maria, la Noe,

en Vicenç, la Ruth i la Noemí, per l'alegria, els ànims, els somriures, l'entusiasme i també les festes!!

A la Marta, per compartir l'experiència dels USA, per aguantar-me, per cuidar-me, per conèixer'm tan bé...gràcies Tiky!!

A la Marta Farró, a la M^a Angels, a les biòlogues, als Llenas, als Menach, als Vilà, al Dr. Pla i Bartina, la Marina Paretas i la Carme Suñol, per la complicitat, l'interès, el seguiment i per omplir facetes de la meva vida sense les quals tampoc hagués arribat aquí!

Als meus pares i a la Noemí, per la paciència, per ajudar-me sempre, per ser com sou, per tot...no canvieu mai!!!!

Per en Joan i l'Albert, sobren les paraules...em sento molt afortunada d'haver-vos tingut com a mestres...per mil coses, mil gràcies!!!!!!!!!!!!

...i a tots, per fer-me sentir tan estimada!!

ÍNDEX

ÍNDEX.....	1
Abreviatures.....	7
Índex de taules i figures	13
Presentació	17
Estructura de la memòria	21
Resum.....	25
1. INTRODUCCIÓ	31
1.1. Presentació i classificació de la superfamília de la RNasa A	31
<i>1.1.1. Ribonucleases humanes</i>	<i>33</i>
<i>1.1.2. Ribonucleases pancreàtiques i activitat ribonucleolítica</i>	<i>36</i>
1.2. Altres activitats biològiques	41
<i>1.2.1. Metàstasi i angiogènesi.....</i>	<i>43</i>
1.3. Estructura de ribonucleases resoltes per difracció de raigs X.....	46
<i>1.3.1. PM7.....</i>	<i>47</i>
<i>1.3.2. PM8.....</i>	<i>49</i>
<i>1.3.3. EDN o RNasa 2</i>	<i>50</i>
<i>1.3.4. (-4)EDN.....</i>	<i>52</i>
<i>1.3.5. ECP o RNasa 3 en complex amb 2',5'-ADP.....</i>	<i>52</i>
<i>1.3.6. RNasa 4</i>	<i>53</i>
<i>1.3.7. Angiogenina o RNasa 5</i>	<i>54</i>
<i>1.3.8. RNases citotòxiques</i>	<i>55</i>
1.3.8.1. Onconasa o proteïna P-30.....	55
1.3.8.2. Ribonucleasa bovina seminal (BS-RNasa).....	56
<i>1.3.9. Complexes amb l'inhibidor de ribonucleases (RI).....</i>	<i>57</i>
1.3.9.1. pRI-RNasa A.....	57
1.3.9.2. hRI-Angiogenina	59

1.4. Presentació de les ribonucleases objecte d'estudi: ECP o RNasa 3 i RNasa 1?N7	
1?N7	60
<i>1.4.1. ECP vs EDN</i>	60
<i>1.4.2. RNasa 1 vs RNasa A i RNasa 1?N7</i>	63
2. OBJECTIUS	69
2.1. Objectiu general i justificació de la globalitat del treball	69
2.2. Objectius metodològics	70
3. MATERIAL I MÈTODES	73
3.1. Cristal·lització	73
3.2. Muntatge dels cristalls	74
<i>3.2.1. Adaptació dels cristalls a l'increment d'agent precipitant</i>	75
<i>3.2.2. Selecció del crioprotector</i>	76
<i>3.2.3. Proves de difracció</i>	76
3.3. Recollida de dades	77
3.4. Processament de les dades	79
3.5. Resolució de les estructures	80
3.6. Afina ment de les estructures	81
4. RESULTATS	85
4.1. Article I: "Three-dimensional Crystal Structure of Human Eosinophil Cationic Protein (RNase 3) at 1.75 Å Resolution"	
4.2. Article II: "Glycosylation of human pancreatic ribonuclease: differences between normal and tumor states"	

4.3. Article III: " Three-dimensional structure of human RNase 1?N7 at 1.9 Å resolution"	
5. DISCUSSIÓ	131
5.1. Discussió conjunta dels resultats dels articles I i III	131
5.1.1. <i>Comparació global de les estructures de l'ECP i de la RNasa 1?N7</i>	131
5.1.2. <i>Comparació de la RNasa 1?N7, l'EDN, l'ECP, la RNasa 4, l'Ang i la RNasa A</i>	132
5.2. Discussió dels resultats de l'article I	136
5.2.1. <i>Característiques del centre actiu de l'ECP</i>	136
5.2.2. <i>Anàlisi de la superfície molecular de l'ECP</i>	136
5.3. Discussió dels resultats dels articles II i III	146
5.3.1. <i>Estructura global de la RNasa 1?N7 en comparació amb la RNasa A</i>	146
5.3.2. <i>Topologia del centre actiu</i>	148
5.3.3. <i>Comparació de la RNasa 1?N7 amb el complex pRI-RNasa A</i>	149
5.3.4. <i>Possible estructura de la RNasa 1 glicosilada</i>	151
6. CONCLUSIONS	155
7. BIBLIOGRAFIA	159

ABREVIATURES

ABREVIATURES**3D:** tridimensional**A:** adenina**ADP:** difosfat d'adenosina**Ang:** angiogenina o RNasa 5**AMoRe:** reemplaçament molecular automàtic (programa informàtic)**B:** lloc de reconeixement de les bases dels àcids ribonucleics a la cavitat del centre actiu de les RNases; també s'utilitza per designar els factors de temperatura de les coordenades atòmiques moleculars (fixers PDB)**BS-RNasa:** ribonucleasa bovina seminal**C:** citosina**CE:** cèl·lules endotelials**CNS:** sistema per afinar coordenades d'estructures cristal·logràfiques i de RMN (programa informàtic)**C-terminal:** carboxi-terminal**DNA:** àcid desoxiribonucleic**d(Tp)₄:** tetradexoxinucleòtid de seqüència T-T-T-T**d(Up):** desoxinucleòtid d'uracil**ECP:** proteïna catiònica d'eosinòfils o RNasa 3**EDN:** proteïna neurotòxica derivada d'eosinòfils o RNasa 2**(-4)EDN:** variant de l'EDN o RNasa 2 que presenta una extensió de 4 residus (SLHV) a l'extrem N-terminal**ESRF:** *European Synchrotron Radiation Facility***F_o (o F_{obs}):** mòdul del factor d'estructura observat**F_c (o F_{obs}):** mòdul del factor d'estructura calculat**FCA:** factors de creixement angiogènics**G:** guanina**HPRNasa:** ribonucleasa pancreàtica humana o RNasa 1

Abreviatures

hRK6: ribonucleasa humana 6

LRSS: repeticions riques en leucines

MxM: estructura quaternària dimèrica formada per l'intercanvi de dominis N-terminal

MMPs: metal·loproteases de la matriu extracel·lular

N-terminal: amino-terminal

p: lloc d'unió als fosfats dels àcids ribonucleics a la cavitat del centre actiu de les RNases

PAGE: electroforesi en gel de poliacrilamida

PEG: polietilenglicol

PDB: banc de dades de coordenades tridimensionals de proteïnes i molècules de DNA

pI: punt isoelèctric

poli(C)/poli(U): àcid policitidílic / àcid poliuridílic

pt/npt: tipus pancreàtic / tipus no pancreàtic

R: lloc d'unió a les riboses dels àcids ribonucleics a la cavitat del centre actiu de les RNases; també s'utilitza per designar el valor que mesura la bondat d'ajust entre el model i les dades experimentals ($R = |F_{obs} - F_{calc}| / \sum F_{obs}$)

RI: inhibidor proteic de ribonucleases

hRI o PRI: inhibidor proteic de ribonucleases d'origen humà

pRI: inhibidor proteic de ribonucleases d'origen porcí

RISBases: ribonucleases que exhibeixen accions biològiques especials

rmsd: desviació quadràtica mitja

RNA: àcid ribonucleic

t-RNA: àcid ribonucleic de transferència

RNasa/RNases: ribonucleasa / ribonucleases

RNasa A: ribonucleasa pancreàtica bovina

RNasa 1?N7: RNasa 1 humana truncada als set primers residus de l'extrem N-terminal

RX: raigs X

T: timina

U: uracil

l : longitud d'ona

Df: graus de rotació que experimenta el cristall durant la recollida d'una imatge de difracció; **f** també s'utilitza per referir-se a la fase d'una reflexió

2q: angle entre un raig incident i el corresponent raig difractat per un pla del cristall

s(A): paràmetre estadístic que estima l'error de les coordenades estructurals d'un model

ÍNDIX DE TAULES I FIGURES

ÍNDIX DE TAULES I FIGURES

- Figura 1.1.** Esquema de la reacció que catalitza la RNasa A.
- Figura 1.2.** Representació esquemàtica del centre actiu de la RNasa A.
- Figura 1.3.** Descripció gràfica del mecanisme catalític que exhibeix la RNasa A.
- Figura 1.4.** Etapes de l'angiogènesi.
- Figura 1.5.** Plegament polipeptídic de les RNases humanes i de la RNasa A
- Figura 1.6.** Estructura 3D de la RNasa A.
- Figura 1.7.** Estructura 3D del dímer de PM8.
- Figura 1.8.** Detall de les interaccions de la RNasa 4 amb l'inhibidor d(Up).
- Figura 1.9.** Estructura 3D de l'onconasa.
- Figura 1.10.** Estructura 3D de la BS-RNasa.
- Figura 1.11.** Estructura 3D del complex format per la RNasa A i el pRI.
- Figura 1.12.** Comparació de les seqüències de les sis RNases humanes i de la RNasa A.
- Figura 1.13.** Importància de la glicosilació anòmala en la progressió del càncer.
- Figura 1.14.** Comparació de la seqüència N-terminal de la RNasa 1 i la RNasa A.
- Figura 3.1.** Imatge dels cristalls de les proteïnes recombinants ECP i RNasa 1ΔN7.
- Figura 3.2.** Rotació del cristall en relació als RX.
- Figura 4.1.** Resum de la cromatografia d'afinitat
- Figura 4.2.** Resum de la cromatografia de bescanvi iònic
- Figura 4.3.** Zimograma i SDS-PAGE de les fraccions pures de RNasa 1

Figura 5.1. Comparació del plegament polipeptídic de l'ECP i de la RNasa 1ΔN7.

Figura 5.2. Alineament de les seqüències de les sis RNases humanes i de la RNasa A, on es mostren els elements d'estructura secundària.

Figura 5.3. Comparació de la His128 de l'ECP amb les corresponents His15 de la RNasa A (a) i His129 de l'EDN (b).

Figura 5.4. Comparació del lloc d'unió B₁ de l'ECP i l'EDN.

Figura 5.5. Comparació de la Gln40 de l'ECP amb els residus equivalents de l'EDN i de la RNasa A.

Figura 5.6. Lloc d'unió B₂ a l'ECP.

Figura 5.7. His64 de l'ECP i comparació amb els residus homòlegs de l'EDN i de la RNasa A.

Figura 5.8. Superfícies de *Connolly* de l'ECP en comparació amb la RNasa A.

Figura 5.9. Comparació de les superfícies de *Connolly* de la RNasa A, la RNasa 4, l'EDN, l'Ang i l'ECP.

Figura 5.10. Superposició de les estructures 3D de la RNasa 1ΔN7 i el complex pRI-RNasa A.

Figura 5.11. Modelat de les estructures glucídiques de la RNasa 1 sobre l'estructura cristal·logràfica de la RNasa 1ΔN7.

Figura 5.12. Esquema de la predicció epitòpica de la RNasa 1.

Taula 1.1. Principals característiques de les RNases humanes.

Taula 3.1. Principals paràmetres relacionats amb la recollida de dades.

Taula 3.2. Paràmetres relacionats amb els cicles d'afinament posicional.

Taula 4.1. Quantificació del procés de purificació de RNasa 1 del medi condicionat de Capan-1.

PRESENTACIÓ

PRESENTACIÓ

El treball presentat en aquesta tesi doctoral s'emmarca dins l'estudi estructural de ribonucleases (RNases) relacionades amb el càncer, així com en les repercussions en la recerca d'un possible diagnòstic i teràpia del mateix.

La realització de la tesi ha estat possible gràcies a la col·laboració establerta entre el grup de Bioquímica del Càncer, que dirigeix el Dr. Rafael de Llorens, al departament de Biologia de la facultat de Ciències, a la Universitat de Girona, i el grup de cristal·lografia, dirigit pels Drs. Miquel Coll i F.X. Gomis-Rüth, a l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC), i ha donat lloc a la publicació de tres articles en revistes d'àmbit internacional (Mallorquí-Fernández *et al.*, 2000, Pous *et al.*, 2001 i Peracaula *et al.*, 2003)

ESTRUCTURA DE LA MEMÒRIA

ESTRUCTURA DE LA MEMÒRIA

Aquesta memòria consta dels següents apartats: Introducció, Objectius, Material i mètodes, Resultats, Discussió, Conclusions i Bibliografia.

1. Introducció. Es presenten les ribonucleases (RNases) en general, les seves característiques més rellevants, algunes funcions especials, i en particular les proteïnes objecte d'estudi: proteïna catiònica d'eosinòfils (ECP o RNasa 3) i RNasa 1?N7, així com les principals estructures de RNases resoltes per difracció de raigs X (RX).

2. Objectius.

3. Material i mètodes. Breu descripció de la metodologia emprada per assolir la determinació de les estructures tridimensionals (3D) de l'ECP i de la RNasa 1?N7.

4. Resultats. S'hi presenten les tres publicacions que responen a l'objectiu principal d'aquest treball, és a dir la determinació de les estructures 3D de l' ECP i de la RNasa 1. Es tracta dels següents articles:

Article I. "Three-dimensional Crystal Structure of Human Eosinophil Cationic Protein (RNase 3) at 1.75 Å Resolution". *Journal of Molecular Biology*. (2000) **300**, 1297-1307.

Article II. "Glycosylation of human pancreatic ribonuclease: differences between normal and tumor states". *Glycobiology*. (2003) **13(1)**, 1-18.

Article III. "Three-dimensional structure of human RNase 1?N7 at 1.9 Å resolution". *Acta Crystallographica Section D*. (2001) **D57**, 498-505.

5. Discussió. Es discuteixen els resultats dels articles presentats.

6. Conclusions.

7. Bibliografia. S'inclouen de forma detallada les referències que apareixen citades als apartats d'Introducció, Material i mètodes i Discussió.

RESUM

RESUM

Les dues proteïnes estudiades en aquest treball (ECP o RNasa 3 i RNasa 1?N7) pertanyen a la superfamília de la RNasa A i resulten d'especial interès per la seva potencial aplicació en la teràpia i/o diagnòstic del càncer.

A més de la seva capacitat ribonucleolítica, l'ECP presenta d'altres activitats, com l'antibacteriana, l'helmitotòxica o la citotòxica contra cèl·lules i teixits de mamífers. Per la RNasa 1 de tipus pancreàtic expressada per les cèl·lules endotelials humanes també s'ha proposat un paper defensiu. La RNasa 1?N7, en canvi, no presenta aquest tipus d'accions biològiques, si bé cal destacar la menor afinitat que exhibeix enfront el seu inhibidor específic en relació a d'altres membres de la família.

Tant l'ECP com la RNasa 1?N7 s'han cristal·litzat emprant la tècnica de la difusió de vapor en gotes penjants, i s'han determinat les seves estructures tridimensionals (3D) mitjançant el mètode del reemplaçament molecular. Per l'afinament de les estructures s'han usat dades fins a 1,75 i 1,90 Å respectivament.

Ambdòs molècules exhibeixen el plegament típic $\alpha + \beta$ que caracteritza a tots els membres de la superfamília de la RNasa A. Tanmateix, les diferències que mostren en comparació amb l'estructura d'altres RNases permeten explicar, d'una banda, la baixa activitat ribonucleolítica d'aquests enzims i, de l'altra, les seves peculiaritats funcionals.

RESUMEN

Las dos proteínas estudiadas en este trabajo (ECP o RNasa 3 y RNasa 1?N7) pertenecen a la superfamilia de la RNasa A y resulta especialmente interesante su aplicación potencial en la terapia y/o diagnóstico del cáncer.

Además de su capacidad ribonucleolítica, ECP presenta otras actividades, tales como la antibacteriana, helmintotoxicidad o citotoxicidad contra células y tejidos de mamíferos. Para la RNasa 1 de tipo pancreático expresada por las células endoteliales humanas también se ha descrito una función defensiva. La RNasa 1?N7, en cambio, no presenta este tipo de acciones biológicas, aunque es relevante su menor afinidad frente al inhibidor específico de ribonucleasas en relación con otros miembros de la familia.

ECP y RNasa 1?N7 se han cristalizado mediante la técnica de difusión de vapor en gota colgante, y se han determinado sus estructuras tridimensionales (3D) con el método del reemplazo molecular. Para el refinamiento de estas estructuras se han usado datos hasta 1,75 y 1,90 Å respectivamente.

Ambas estructuras exhiben el plegamiento típico $\alpha + \beta$ que caracteriza a todos los miembros de la superfamilia de la RNasa A. Sin embargo, las diferencias que muestran en comparación con la estructura de otras RNasas permite explicar, de un lado, la baja actividad ribonucleolítica de estos enzimas y, de otro, sus peculiaridades funcionales.

ABSTRACT

The proteins studied in this work (ECP or RNase 3 and RNase 1?N7) belong to the RNase A superfamily and their potential application in the therapy and diagnosis of cancer is the base of the present study.

Besides its ribonuclease activity, ECP is bactericidal, helminthotoxic and cytotoxic to mammalian cells and tissues. Human endothelial cells express a pancreatic-type ribonuclease (RNase 1) also involved in defensive functions. In contrast, RNase 1?N7 does not present this kind of special activities, but shows a reduced affinity for the specific ribonuclease inhibitor in comparison with other members of the family.

The recombinant proteins have been crystallized by the vapour diffusion method from hanging drops and their crystal structures have been determined by molecular replacement. The refinement of ECP and RNase 1?N7 structures has been performed using X-ray diffraction data up to 1,75 and 1,90 Å respectively.

Both molecules display the $\alpha + \beta$ folding topology typical for members of the RNase A superfamily. However, there are some differences that provide an explanation for their low ribonucleolytic activity and, on the other hand, may explain their other particular properties.

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Presentació i classificació de la superfamília de la RNasa A

Les ribonucleases (RNases) són enzims àmpliament distribuïts a tots els éssers vius (animals, vegetals i també microorganismes) que es caracteritzen, bàsicament, per la capacitat de degradar els àcids ribonucleics. Atesa la globalitat d'aquesta definició, les RNases es poden classificar segons diferents criteris.

En relació a la seva actuació sobre el substrat, l'àcid ribonucleic (RNA), es poden classificar en exoribonucleases, si els mononucleòtids són alliberats als extrems lliures (5' o 3') de la cadena d'RNA substrat, o en endoribonucleases, si l'escisió dels enllaços fosfodiéster té lloc a l'interior de la cadena d'RNA.

Pel que fa a l'especificitat, es diferencia entre RNases inespecífiques, si són capaces de degradar qualsevol tipus d'RNA, o RNases específiques, si actuen sobre un determinat tipus de molècules d'RNA o sobre substrats de seqüència específica, participant en processos de recanvi i processament del mateix.

Segons el lloc on actuen, les RNases també es poden dividir en extracel·lulars, si la seva actuació té lloc fora de la cèl·lula on s'han produït, o bé en intracel·lulars si actuen dins les cèl·lules i estan relacionades amb el metabolisme de l'RNA.

Totes aquestes classificacions resulten bastant àmplies, així que dins de cadascuna d'elles és d'esperar l'existència de subgrups en funció de diferents formes d'actuació, de diversos graus d'especificitat, etc.

Per tal de situar les RNases que es descriuen en aquest treball (ECP o RNasa 3 i RNasa 1ΔN7), cal presentar la superfamília de la RNasa pancreàtica bovina (RNasa A). Aquesta, està constituïda per un grup de proteïnes homòlogues de vertebrats, ben caracteritzades i seqüenciades, que presenten activitat

1. Introducció

endoribonucleolítica i especificitat per pirimidines al costat 3' de l'enllaç escindit. Malgrat la confusió existent a l'entorn de la seva nomenclatura, dins d'aquesta superfamília poden establir-se nou subgrups o famílies (Beintema *et al.*, 1997):

- a) RNases 1 de mamífers o de tipus pancreàtic (pt). Sovint es designen amb el nom de RNases de tipus secretori.
- b) RNases 2 de mamífers (tipus no secretori o de tipus neurotòxic). Aquesta família inclou, entre d'altres, la proteïna neurotòxica derivada d'eosinòfils (EDN) o RNasa 2 humana i la proteïna catiònica d'eosinòfils (ECP) o RNasa 3 humana.
- c) RNases 4 de mamífers. Inclou la RNasa aïllada de la línia cel·lular d'adenocarcinoma humà HT-29.
- d) Angiogenines de mamífers.
- e) RNasa hepàtica de gallina.
- f) RNases de cèl·lules mielomonocítiques i de medul·la òssia.
- g) RNasa pancreàtica de tortuga.
- h) RNasa pancreàtica d'iguana.
- i) RNases de granota.

La referència a tipus secretori i tipus no secretori s'atribueix a un treball previ de Sierakowska i Shugar (1977) que dividia les endoribonucleases específiques per pirimidines de mamífer en aquests dos grans grups. De tipus secretori si eren semblants a la RNasa produïda pel pàncreas i no secretori si s'assemblaven a l'obtinguda del fetge o la melsa.

Tots els membres de la superfamília conserven el mateix tipus de plegament (previsible en els d'estructura desconeguda), així com l'estructura del centre actiu i del nucli hidrofòbic. Tanmateix, mostren una gran variació als *loops* o llaços externs que connecten els elements d'estructura secundària regulars, la qual cosa dificulta les comparacions evolutives per mitjà de l'alineament de seqüències. Les

comparacions entre aquestes proteïnes, però, també es poden realitzar mitjançant la superposició de les estructures tridimensionals (Mosimann *et al.*, 1994).

Referent a l'especificitat pel substrat i a l'activitat enzimàtica, les diferències són més notables entre les RNases de diferents famílies (Sorrentino & Libonati, 1994) que en relació als membres que pertanyen a la mateixa família (Beintema, 1987). D'altra banda, les proteïnes de famílies diferents també difereixen en les seves taxes d'evolució. Aquesta divergència s'atribueix a la duplicació gènica (Beintema, 1998).

1.1.1. Ribonucleases humanes

Les RNases humanes que pertanyen a la superfamília de la RNasa A s'agrupen en 4 famílies d'acord amb la classificació de Beintema (1997) exposada anteriorment:

- a) RNases de tipus pancreàtic (pt): RNasa 1 o HPRNasa
- b) RNases no pancreàtiques (npt): RNasa 2 (EDN), RNasa 3 (ECP), RNasa 6 (hRK6)
- c) RNases pt/npt: RNasa 4
- d) Angiogenines: RNasa 5 o angiogenina (Ang)

Com a membres de la superfamília de la RNasa A, aquestes RNases humanes tallen les cadenes de ribonucleòtids amb preferència per pirimidines a l'extrem 3' de l'enllaç fosfodièster escindit. A la taula 1.1 s'especifiquen els seus membres, la nomenclatura emprada per designar-les, així com les seves principals característiques.

Encara que es proposà amb anterioritat, la classificació de Zhou i Strydom (1993), basada en la comparació de les estructures primàries de les diferents RNases

1. Introducció

humanes, és cada vegada més utilitzada i per aquest motiu es presenta a continuació:

- a) RNasa 1: RNasa de pàncreas o de tipus secretori (també citada com a HPRNasa)
- b) RNasa 2: EDN o de tipus no secretori
- c) RNasa 3: ECP
- d) RNasa 4: RNasa aïllada de plasma
- e) RNasa 5: Angiogenina

La descripció de la hRK6 o RNasa K6 (Rosenberg & Dyer, 1996) fou posterior a aquesta classificació, però donat l'elevada homologia amb l'EDN (47% d'identitat de seqüència) s'inclouria dins del segon grup.

Recentment també s'han caracteritzat dos enzims més que pertanyen a la superfamília de la RNasa A. Es tracta de les RNases humanes RNasa 7 (Zhang *et al.*, 2003), que s'expressa predominantment al fetge, i RNasa 8 (Zhang *et al.*, 2002), amb un patró d'expressió únic a placenta.

Taula 1.1. Principals característiques biològiques de les RNases humanes (Sorrentino & Libonati, 1997; Futami *et al.*, 1997 i Deming *et al.*, 1998).

Proteïna	pt RNasa 1	npt RNasa 2 (EDN)	npt RNasa 3 (ECP)	pt/npt RNasa 4	angRNasa 5	npt RNasa 6 (hRK6)
Origen	pàncreas (altres teixits somàtics, ovari i testicles)	eosinòfils (i altres teixits)	eosinòfils	fetge (i altres teixits)	fetge (i altres teixits)	monòcits i neutròfils
Identitat de seqüència amb la RNasa A (%)	70	35	31	43	35	47 (amb l'EDN)
N-Glicosilació	sí, a les tres dianes Asn-X _{aa} -Thr/Ser	sí, es coneixen 5 dianes	sí, es coneixen 3 dianes	no	no	?
Preferència pel substrat	poliC>poliU	poliU>poliC	poliU>poliC	poliU>>poliC	poliU>poliC	?
Altres funcions	paper defensiu	neurotòxica helmitotòxica	neurotòxica helmitotòxica antibacteriana antiviral	?	angiogènica immunosupressora	es suggereix un paper defensiu

1. Introducció

1.1.2. Ribonucleases pancreàtiques i activitat ribonucleolítica

L'activitat ribonucleolítica que presenten les RNases s'explica gràcies a l'elevat grau de coneixement assolit amb l'estudi de la RNasa A, un dels enzims més exhaustivament caracteritzats (D'Alessio & Riordan, 1997), que s'utilitza com a model alhora d'analitzar l'arquitectura global del centre actiu i el mecanisme catalític d'aquest tipus d'enzims.

Reacció catalitzada per les RNases pancreàtiques

La reacció d'hidròlisi de l'RNA que catalitzen les RNases pancreàtiques té lloc en dues etapes:

- Reacció de transfosforilació d'un enllaç fosfodiéster, de la posició 5' d'un nucleòtid a la 2' del nucleòtid adjacent. Com a resultat, es forma un nucleòsid 2'3'-fosfat cíclic (figura 1.1).
- Hidròlisi de l'enllaç fosfodiéster 2'3'-cíclic, que permet l'obtenció d'un nucleòsid-3-fosfat (figura 1.1).

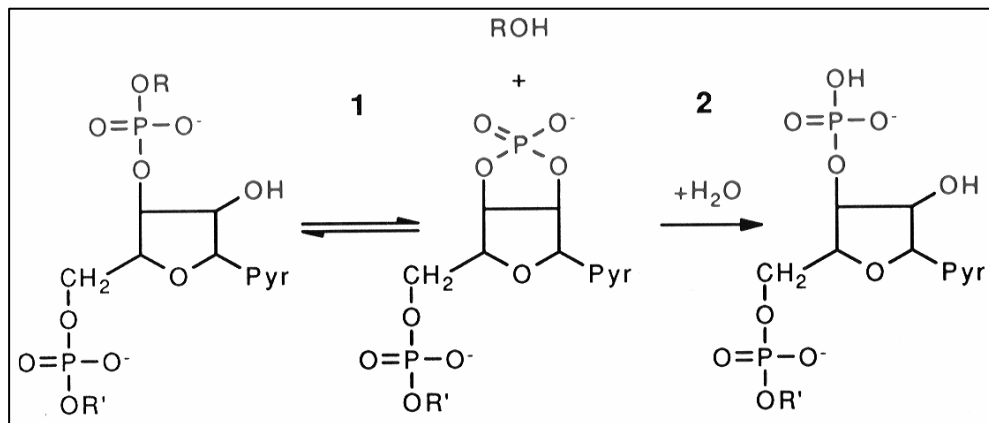


Figura 1.1. Representació esquemàtica de les dues etapes, transfosforilació (1) i hidròlisi (2) que defineixen la reacció catalitzada per la RNasa A (Parés *et al.*, 1991).

El centre actiu de la RNasa A està format per una sèrie de llocs que són responsables de la unió amb les bases (B), les riboses (R) i els fosfats (p) del substrat. El grup fosfat de l'enllaç hidrolitzat s'uneix a p_1 . B_1 és el lloc de reconeixement de la primera base que es situa a l'extrem 3' de l'enllaç que s'ha de trencar i és específic per pirimidines, mentre que B_2 es troba al costat 5' del lloc de tall i mostra preferència per purines. Si bé el centre catalític es situa a l'entorn de R_1p_1 , existeixen d'altres llocs d'unió al substrat no catalítics, al costat 5' de l'enllaç escindit, que s'anomenen p_0 i p_1 . D'altra banda, al costat 3' de p_1 es localitza p_2 (Parés *et al.*, 1991). A la figura 1.2 es presenta un esquema del centre actiu de la RNasa A en presència del substrat.

1. Introducció

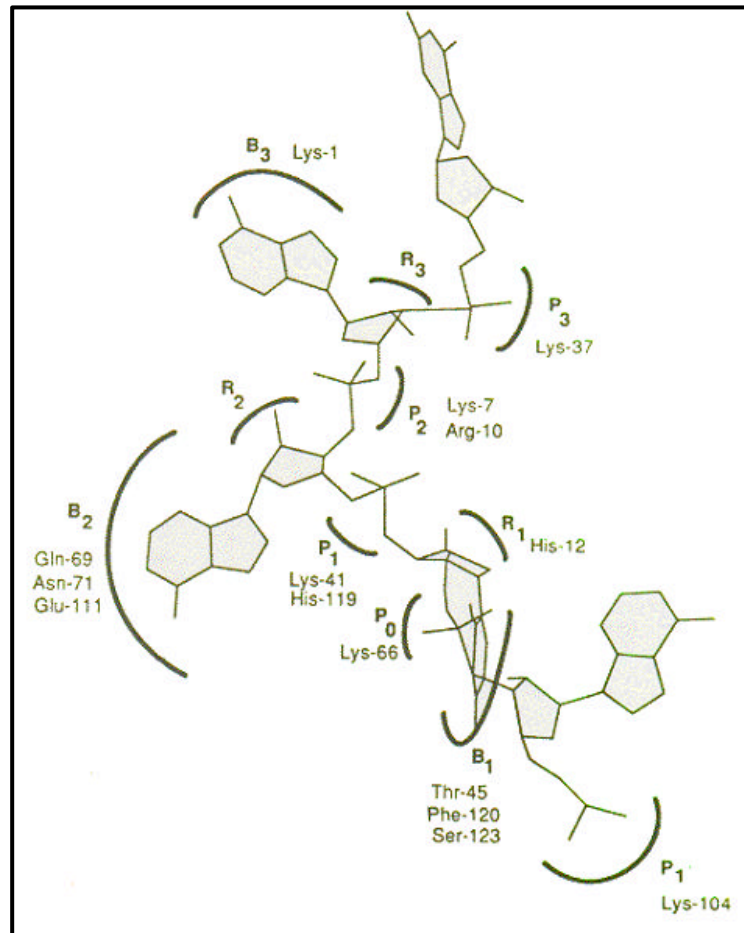


Figura 1.2. Esquema del centre actiu de la RNasa A en presència del substrat. B, R i p s'utilitzen per designar els llocs d'unió de la base, la ribosa i el fosfat respectivament (Parés *et al.*, 1991).

L'especificitat de la reacció per pirimidines a l'extrem 3' de l'enllaç fosfodiéster escindit s'atribueix als residus que formen el lloc B₁. En concret, és mediada per les cadenes laterals de la Thr45 i la Phe120. El grup hidroxil de la Thr45 forma ponts d'hidrogen amb la pirimidina (U o C) i exclou, per raons estèriques, les purines (A i G). L'anell aromàtic (grup benzílic) de la Phe120 estableix contactes de van der Waals amb la pirimidina i amb la cadena lateral de la Thr45. D'altra

banda, la Ser123 també pot formar ponts d'hidrogen amb la pirimidina. A més, els segments Val43-Thr45 i His119-Asp121 contribueixen al posicionament correcte de la base.

En relació al mecanisme catalític, hi participen dues histidines: His12 i His119 (lloc d'unió p_i). La His12 actua com a base en la reacció de transfosforilació, captant un protó de l'hidroxil 2' de la ribosa i, per tant, afavorint l'atac sobre l'àtom de fòsfor (figura 1.3). D'aquesta manera, s'assoleix l'estat de transició pentacoordinat. En canvi, durant la reacció d'hidròlisi la His12 actua com a àcid, facilitant l'atac de l'aigua sobre el mateix fòsfor. La His119 juga el paper d'àcid durant la transfosforilació. A partir d'estudis cristal·logràfics amb la RNasa A es coneix que aquest residu pot ocupar diferents posicions (Richards & Wykoff, 1971). Treballs posteriors mostren que existeixen dues conformacions predominants (Mel *et al.*, 1994). Només una d'aquestes, però, garanteix l'activitat de l'enzim (Zegers *et al.*, 1994).

1. Introducció

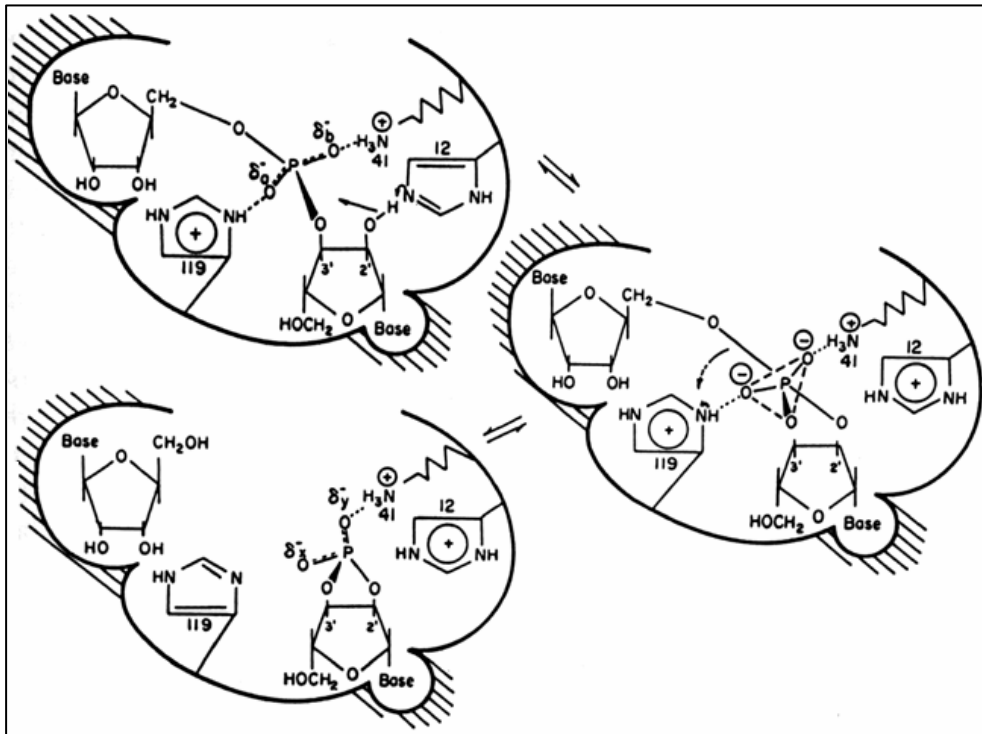


Figura 1.3. Mecanisme químic de la reacció catalitzada per la RNasa A, en la qual participen la His12 i la His119 (Roberts *et al.*, 1969).

A més d'aquests, existeixen d'altres residus implicats en el mecanisme de catàlisi. Els més importants són els següents: (a) Lys41 (p_1). Estabilitza el complex de transició, ja que el grup protonat de la seva cadena lateral interacciona amb la càrrega negativa del fosfat pentacoordinat (Trautwein *et al.*, 1991). (b) Asp121. Contribueix a l'estabilització electrostàtica de la His119 durant el procés de transfosforilació. També facilita el posicionament de les purines a B_2 . (c) Lys7 (p_2) i Lys66 (p_0). Els seus grups laterals, carregats positivament, es localitzen a prop del centre actiu, de manera que faciliten l'orientació i unió del substrat (Matthew & Richards, 1982).

El lloc d'unió a purines (B_2), que està constituït pels residus Gln69, Asn71 i Glu111, pot adoptar múltiples conformacions, si bé és clar l'establiment de ponts d'hidrogen entre aquests residus i la base (Zegers *et al.*, 1994; Fontecilla-Camps *et al.*, 1994).

Encara que els llocs $p_1R_1B_1$ del centre actiu són els responsables de l'especificitat de tall de l'enzim, els residus que formen part dels altres llocs d'unió a fosfat (p_0 i p_1) es conserven a totes les RNases pancreàtiques de mamífers i són essencials perquè la catàlisi sigui efectiva (Nogués *et al.*, 1995).

Els últims treballs sobre activitat ribonucleolítica revelen que la preferència pel mecanisme *exo-* o *endonucleolític* que poden exhibir els membres de la superfamília de la RNasa A depèn de l'estructura dels llocs d'unió i de la grandària del substrat (Cuchillo *et al.*, 2002). Encara que l'enzim natiu no presenta una preferència especial pel tipus de trencament, s'ha comprovat que l'augment de la longitud del substrat afavoreix lleugerament l'activitat *endonucleolítica*. D'altra banda, en el mateix treball, Cuchillo *et al.*, mostren que la pèrdua de p_2 condueix a un patró clarament *exonucleolític*, mentre que l'absència de p_0 potencia el processament *endonucleolític*.

1.2. Altres activitats biològiques

L'interès per l'estudi de les RNases humanes ha augmentat en els darrers anys degut al major coneixement que es té sobre les seves propietats biològiques i les seves possibles aplicacions terapèutiques (Schein, 1997; Rybak & Newton, 1999). A més de la seva activitat ribonucleolítica, algunes RNases humanes mostren d'altres activitats biològiques. Juntament amb membres d'altres famílies de RNases de plantes o microorganismes constitueixen l'anomenat grup de les RISBases (de l'anglès *Ribonucleases endowed with Special Bioactions*). Pel que fa a les RNases humanes es troba l'activitat angiogènica de l'Ang o RNasa 5

1. Introducció

(Strydom *et al.*, 1985), la neurotoxicitat de l'EDN (Durack *et al.*, 1981) i la citotoxicitat de l'ECP (Domachowske *et al.*, 1998). Treballs recents demostren l'activitat antibacteriana exhibida per la RNasa 7 (Zhang *et al.*, 2003), una de les darreres RNases humanes caracteritzades. Encara que l'activitat ribonucleolítica no sempre és una condició necessària per a dur a terme aquestes accions especials (Strydom, 1998; Rosenberg, 1998) es requereix per justificar la citotoxicitat (Vescia *et al.*, 1980; Wu *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1995).

Considerant tota la superfamília de la RNasa A cal destacar especialment la citotoxicitat exhibida enfront cèl·lules canceroses per dos dels seus membres. Es tracta de la RNasa bovina seminal (BS-RNasa) i de l'onconasa. La BS-RNasa presenta diverses activitats, tals com immunosupressora, embriotòxica, espermatogènica i antitumoral (D'Alessio & Riordan, 1997). Concretament, el manteniment de les funcions citotòxiques en les condicions reductores del citosol només és propi d'una forma dimèrica de l'enzim (MxM, estructura quaternària dimèrica formada per l'intercanvi de dominis N-terminal; veure apartat 1.3.8.2; Kim *et al.*, 1995), mentre que el monòmer és reconegut per l'inhibidor proteic de RNases del citosol o RI (Lee *et al.*, 1989) i no presenta aquesta mena d'activitats. L'onconasa o proteïna P-30 és una RNasa aïllada d'òcits de *Rana pipiens*. Es tracta d'un potent agent antitumoral que actualment es troba en assajos clínics de fase II/III (Newton *et al.*, 1998). Tant l'onconasa com la forma dimèrica de la BS-RNasa són resistents a l'acció de l'RI (Wu *et al.*, 1993; Murthy & Sirdeshmurkh, 1992). Precisament, partint de la idea que les RNases citotòxiques escapen a l'acció de l'RI, diversos autors han dissenyat, mitjançant l'enginyeria genètica de proteïnes i tècniques de DNA recombinant, RNases amb aquesta finalitat; bloquejant estèricament els llocs d'unió a l'RI, produint variants dimèriques (Di Donato *et al.*, 1994; Piccoli *et al.*, 1999), o substituint els residus implicats en interaccions múltiples amb l'RI (Leland *et al.*, 1998).

Entre els aconteixements biològics relacionats amb la progressió del càncer resulta d'especial interès l'estudi de l'angiogènesi. Per aquest motiu, i descrita l'existència de l'activitat angiogènica de la RNasa 5, a continuació es presenta aquest procés, així com un resum dels principals esdeveniments cel·lulars que el desencadenen.

1.2.1. Metàstasi i angiogènesi

S'entén per metàstasi l'habilitat que exhibeixen les cèl·lules canceroses per penetrar als vasos limfàtics i sanguinis, migrar pel torrent circulatori i envair i créixer en teixits allunyats del seu origen. El creixement o proliferació de nous vasos sanguinis, procés conegut com angiogènesi, es requereix per abastir les cèl·lules tumorals i permet explicar la capacitat invasiva de molts tumors. Malgrat això, l'angiogènesi és un aconteixement natural que també té lloc en situacions no patològiques, tals com el manteniment i la regeneració dels vasos sanguinis de l'organisme, per exemple durant el cicle reproductiu de la dona, per reconstruir la xarxa sanguínia de l'úter o per formar els vasos de la placenta. En els individus sans, la regulació d'aquest procés s'estableix mitjançant un equilibri perfecte entre els factors de creixement estimuladors de l'angiogènesi i els seus inhibidors.

D'altra banda, a més del càncer, existeixen d'altres malalties associades a la pèrdua de control sobre l'angiogènesi i que poden cursar provocant un creixement excessiu de nous vasos (artritis reumatoide, psoriasis, etc) o bé la insuficiència de noves xarxes vasculars (per exemple en el cas de la malaltia arterial coronària).

A continuació, es presenta una breu descripció dels aconteixements que desencadenen la construcció de nous vasos (veure també figura 1.4):

1. Introducció

1. Els teixits malalts o danyats produeixen i alliberen factors de creixement angiogènics (FCA; factors proteics) que difonen cap als teixits adjacents.
2. Els FCA s'uneixen a receptors específics, situats a les cèl·lules endotelials (CE) dels vasos sanguinis preexistents al voltant d'aquests teixits.
3. Una vegada s'han unit als seus receptors, les CE s'activen. Es transdueix el senyal de la superfície cel·lular al nucli i es posa en marxa la maquinària de síntesi de les CE, que comença a produir noves molècules (incloent enzims).
4. Els nous enzims sintetitzats dissolen les unions de les membranes basals que envolten els vasos sanguinis existents.
5. Les CE comencen a dividir-se, proliferen i migren a través de les unions desfetes en direcció al teixit malalt (pot tractar-se d'un tumor).
6. Molècules d'adhesió especialitzades (de tipus integrines) contribueixen a l'expansió de les CE.
7. D'altres enzims (metal·loproteases de la matriu extracel·lular o MMPs) són produïts per dissoldre el teixit on s'han d'acomodar els nous vasos; una vegada formats i estesos, el teixit en qüestió és remodelat al voltant dels mateixos.
8. Disposició tubular de les CE per formar els nous vasos.
9. Els vasos individuals tubulars es connecten per formar llaços que permetin la circulació sanguínia.
10. Finalment, els nous tubs connectats són estabilitzats per cèl·lules musculars especialitzades (fibres musculars llises o pericits), que proveeixen suport estructural. A partir d'aquest punt pot iniciar-se el flux sanguini

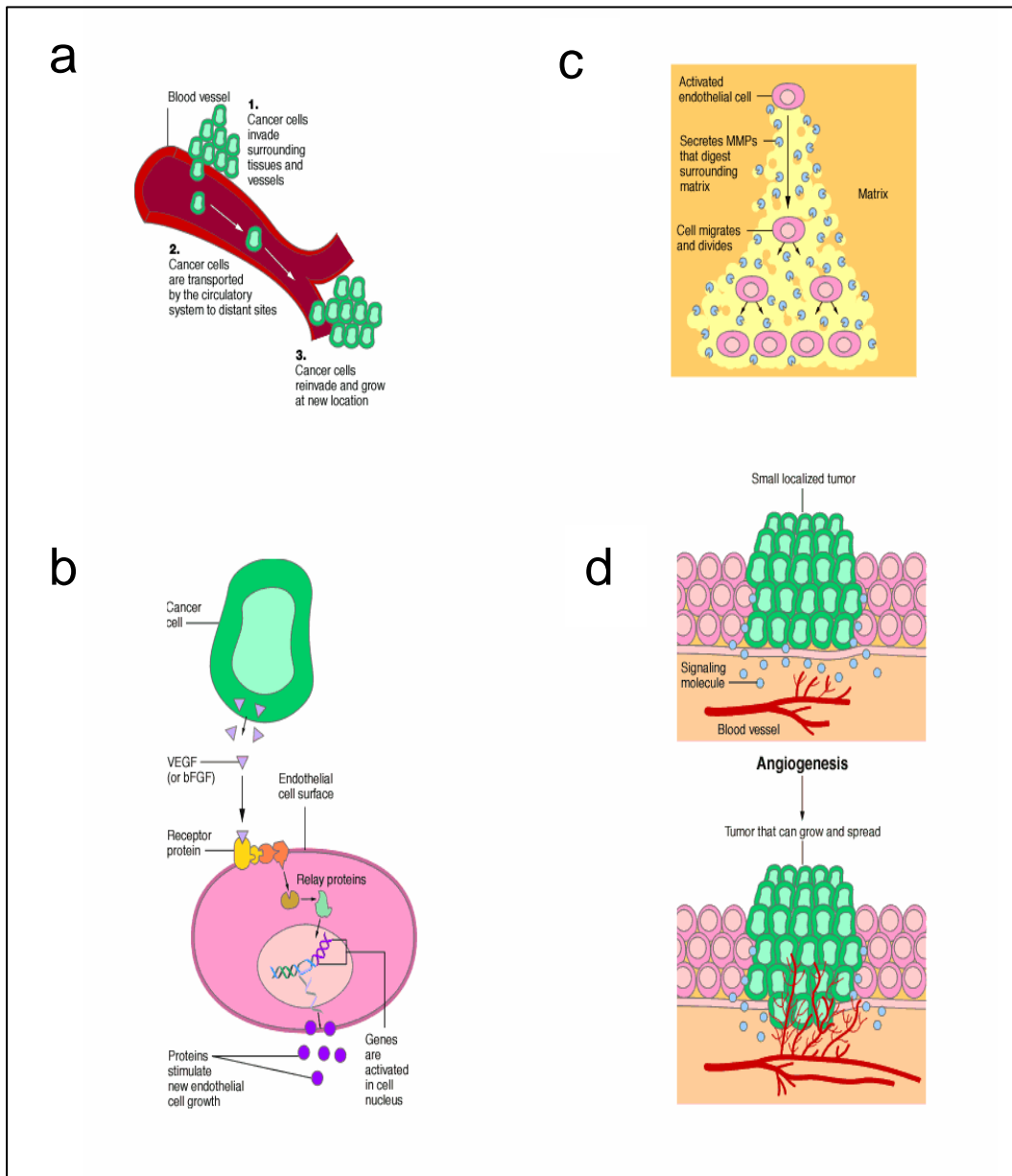


Figura 1.4. Resum gràfic de les etapes que desencadenen l'angiogènesi. (a) Esquema del procés metastàtic, pel qual les cèl·lules canceroses accedeixen al torrent circulatori a fi de créixer i envair teixits allunyats al d'origen. (b) Alliberació dels factors de creixement angiogènics i activació de les CE (punts 1 a 3 del text). (c) En relació al text, s'engloben les etapes 4 i 5, és a dir disgregació de la matriu extracel·lular i proliferació i migració de les CE. (d) Culminació del procés, amb els nous vasos sanguinis que abasteixen el tumor. Figures extretes de la pàgina *web* <http://press2.nci.nih.gov/sciencebehind>.

1.3. Estructura de ribonucleases resoltes per difracció de raigs X

Són moltes les revisions que s'han fet al respecte. En aquest apartat es pretén oferir un recull de les estructures d'RNases humanes resoltes fins el moment mitjançant la tècnica de difracció de RX (veure figura 1.5), així com una breu descripció d'aquells membres de la superfamília de la RNasa A que resulten d'especial interès per la relació estructural i/o funcional que mantenen amb les dues RNases objecte d'estudi en el present treball.

Seguint aquest criteri, s'han inclòs les variants de la RNasa 1 o HPRNasa (PM7 i PM8), ja que en absència d'una estructura cristal·logràfica per la HPRNasa s'ha cregut convenient presentar aquelles estructures que n'ofereixen una major aproximació i les quals estan estretament lligades amb la RNasa 1 Δ N7, presentada en aquesta tesi doctoral.

A continuació, i seguint l'ordre de la classificació proposada per Zhou i Strydom (1993), basada en la comparació de les estructures primàries de les RNases humanes, s'introdueixen l'EDN, la RNasa 4 i l'Ang.

Per tal d'incloure referències estructurals sobre el fonament de la citotoxicitat d'algunes RNases de la superfamília de la RNasa A també es descriuen breument les estructures de l'onconasa o proteïna P-30 i de la BS-RNasa.

Finalment, també s'introdueixen les bases estructurals de la interacció de les RNases amb el seu inhibidor, mitjançant la descripció de l'estructura tridimensional de l'inhibidor de RNases d'origen porcí (pRI) en complex amb la RNasa A, també resolt per difracció de RX (Kobe & Deisenhofer, 1995), i de l'inhibidor d'origen humà (hRI o PRI) amb l'Ang (Papageorgiou *et al.*, 1997).

Les figures tipus *ribbon* d'aquest capítol s'han realitzat amb el programa MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996).

1.3.1. PM7

Es tracta d'una variant de la HPRNasa que presenta cinc residus de la regió N-terminal substituïts pels corresponents aminoàcids de la RNasa A. A més, presenta una mutació de Ser per Pro a la posició 50, la qual cosa millora l'expressió de la proteïna recombinant i sembla afavorir-ne la cristal·lització (Pous *et al.*, 2000).

La seva estructura cristal·logràfica, resolta amb dades de difracció fins a 1,65 Å de resolució, revela un plegament característic de RNasa, incloent un full β en forma de "V" i tres hèlix α . A la figura 1.6 es mostra aquest el tipus de plegament polipeptídic de la RNasa A. Difereix de la RNasa A principalment a la regió dels llaços, mentre que l'escletxa del centre actiu mostra una arquitectura similar, amb els residus essencials (His12, Lys41 i His119) ocupant posicions equivalents.

La His119, però, es troba lleugerament desplaçada en comparació amb la RNasa A, si bé no existeixen evidències de possibles conformacions alternatives per aquest residu.

Encara que per la RNasa A s'ha mostrat que una sola substitució a la posició 88 del llaç $\beta_4\beta_5$ permet a l'enzim evadir-se de l'inhibidor (Leland *et al.*, 1998), a l'estructura de PM7 els canvis en aquest llaç, altament exposat i flexible, no són suficients per evitar-ne la inhibició.

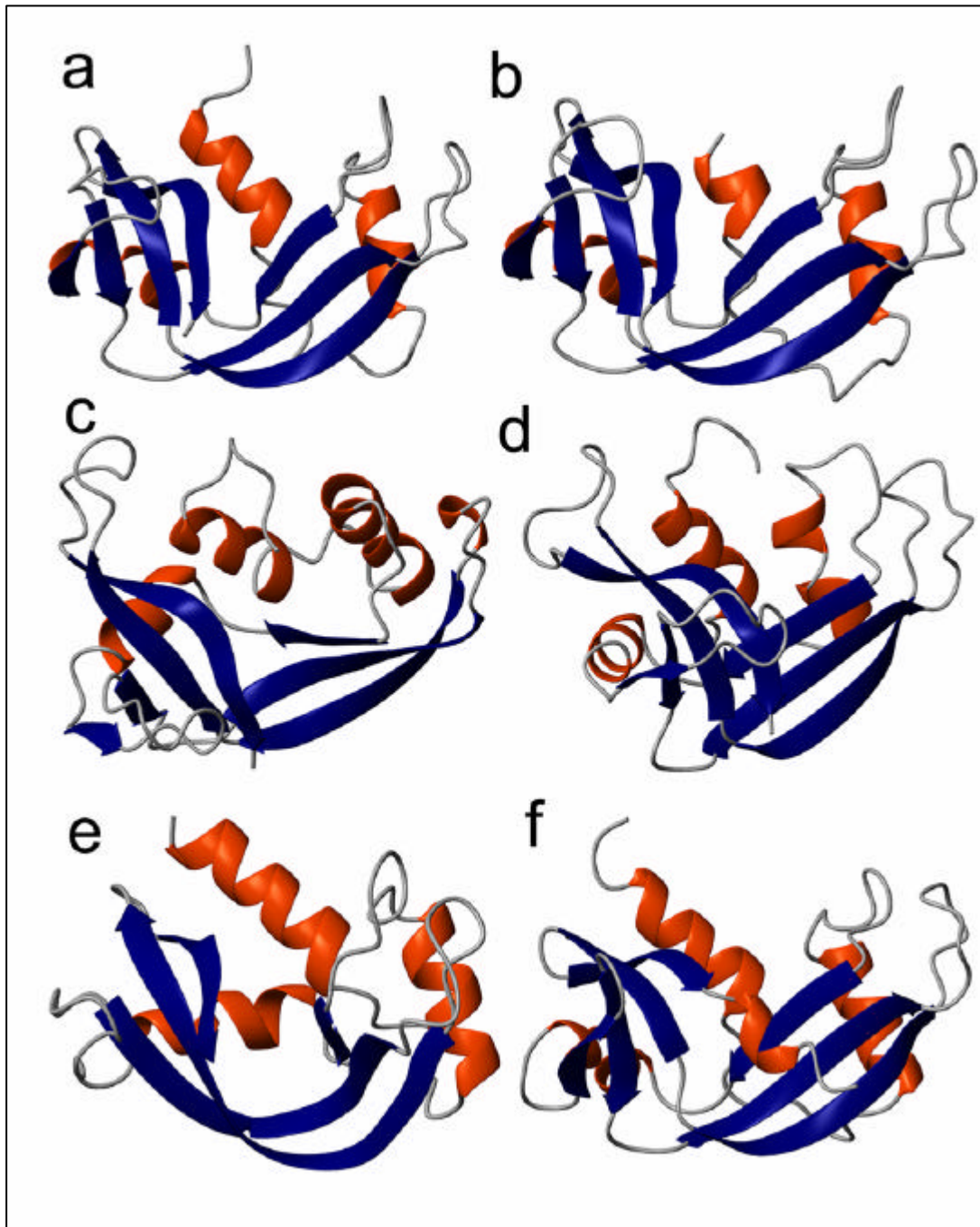


Figura 1.5. Plegament de les RNases humanes en comparació amb la RNasa A (a). RNasa 1ΔN7 (b), RNasa 2 o EDN (c), RNasa 3 o ECP (d), RNasa 4 (e) i Angiogenina (f). Els respectius codis d'accés al PDB són els següents: 7RSA, 1E21, 1HI2, 1DYT, 1RNF i 1ANG.

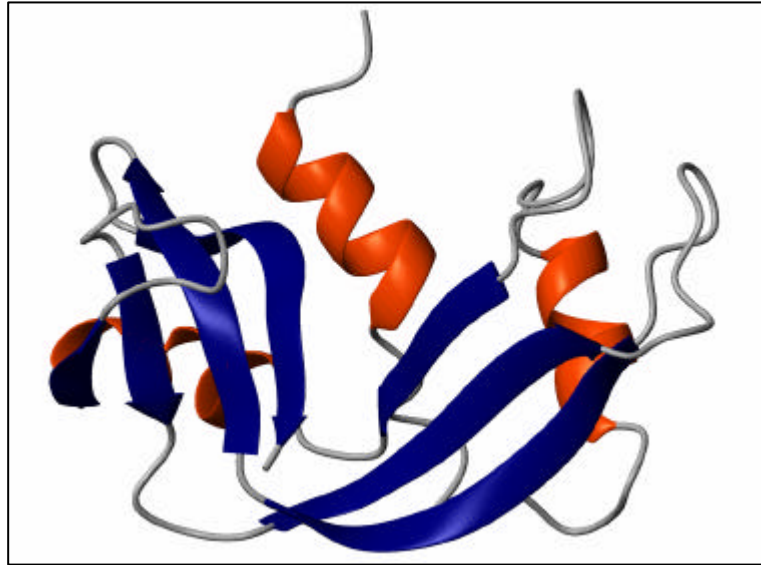


Figura 1.6. Representació del plegament polipeptídic de la RNasa A (Wlodaver *et al.*, 1988). Les tres hèlix α de l'estructura apareixen en taronja, mentre que les sis cadenes que constitueixen el full β i els llaços en blau.

1.3.2. PM8

Amb l'estructura d'aquesta variant de la HPRNasa (Canals *et al.*, 2001) s'explica la formació d'un nou tipus de dímer basat en l'intercanvi de dominis N-terminal de les dues subunitats que el definixen. Aquest intercanvi és afavorit per la introducció d'una Gln a la posició 101, la qual està implicada en l'establiment de dos ponts d'hidrogen intermoleculars i una interacció de tipus *stacking* entre residus de les diferents cadenes. Dos ponts salins antiparal·lels i ponts d'hidrogen mediat per molècules d'aigua completen la nova superfície creada entre les dues subunitats, mentre que el llaç que fa de xarnera s'estructura en una hèlix de tipus 3_{10} .

PM8 no és capaç de degradar l'RNA en presència de l'RI, ja que els llaços $\alpha 2\beta 1$ i $\beta 4\beta 5$, bloquejats en l'estructura citotòxica de la BS-RNasa, són accessibles a l'RI.

1. Introducció

Tanmateix, aquesta estructura, representada a la figura 1.7, resulta de gran interès per entendre la base evolutiva de l'oligomerització proteica i ofereix una via d'estudi relacionada amb l'obtenció d'oligòmers estables amb noves accions biològiques.

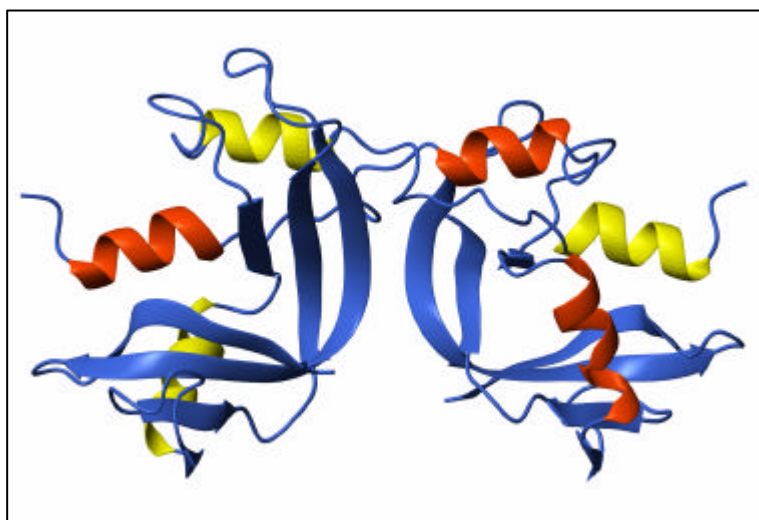


Figura 1.7. Representació *ribbon* del dímer de PM8 (Canals et al., 2001). S'ha respectat el mateix codi de colors que a la figura 1.6 per un dels monòmers, mentre que per l'altre les hèlix α apareixen en groc. D'aquesta manera, es posa de manifest l'intercanvi de dominis que té lloc per formar aquesta estructura.

1.3.3. EDN o RNasa 2

L'estructura cristal·logràfica de l'EDN recombinant (Mosimann, *et al.*, 1996), determinada per mètodes de reemplaçament molecular i afinada amb dades de difracció fins a 1,83 Å, revela un plegament global relacionat al d'altres estructures homòlogues com la RNasa A, l'onconasa, l'Ang i l'ECP.

L'EDN és un dels membres més grans de la superfamília de RNases de vertebrats amb especificitat per pirimidines degut a petites insercions a quatre dels seus set

llaços i a una gran inserció de l'Asp115 a la Tyr123. Aquesta variabilitat en els llaços pot relacionar-se amb les altres funcions biològiques que caracteritzen aquest enzim, donat que les propietats no ribonucleolítiques de les RNases s'han associat amb unions específiques a determinades dianes de la superfície cel·lular (Wu *et al.*, 1993; Hallahan *et al.*, 1991; Titani *et al.*, 1987).

L'any 2001, Leonidas *et al.*, van determinar l'estructura cristal·logràfica de l'enzim natiu a més alta resolució (1,60 Å), així com les estructures de tres complexos amb nucleòtids adenílics. Més recentment, també s'ha determinat per difracció de RX l'estructura 3D de la variant (-4)EDN, que presenta noves activitats biològiques (Chang *et al.*, 2002).

L'estructura de l'EDN a 1,60 Å és molt similar a la descrita prèviament (Mosimann *et al.*, 1996). Permet confirmar la conservació de la tríada catalítica (His15, Lys38 i His129), el manteniment de B₁ (Thr42 i Leu130), el fet que B₂ es conservi parcialment, que no es mantinguin p₀ i p₂ i l'existència de p₁, aparent arran de la interacció amb un dels dos sulfats que apareixen lligats a ambdòs estructures de l'enzim natiu.

Pel que fa a les estructures amb inhibidors (3',5'-ADP, 2',5'-ADP i 5'-ADP), les diferències entre elles no són significatives, es concentren bàsicament als llaços i no estan relacionades amb la presència dels inhibidors. D'aquest estudi es desprèn que cada lligand adopta una conformació diferent per tal d'optimitzar les interaccions amb l'enzim, també afavorides per la flexibilitat de la cadena lateral de la His129 i del lloc d'unió B₂. El Trp10 s'ha confirmat com a únic component de p₂, mentre que l'Asn70 i la His129 són els principals residus implicats en la unió de l'adenina.

1. Introducció

1.3.4. (-4)EDN

Aquesta variant de l'EDN presenta una extensió de 4 residus (SLHV) a l'extrem N-terminal corresponents al pèptid senyal. La seva estructura global, afinada amb dades de difracció fins a 1,83 Å (Chang *et al.*, 2002), és equivalent a la de l'EDN (Mosimann *et al.*, 1996 i Leonidas *et al.*, 2001). Els residus His-2, Arg36 i His129 semblen interferir amb la unió al substrat i l'estructura també presenta els dos ions sulfat d'acord amb les estructures lliures descrites anteriorment per Mosimann *et al.* (1996) i Leonidas *et al.* (2001).

Encara que els residus -4 i -3 no estan inclosos al model final, l'extensió del pèptid SLHV no implica canvis en l'estructura nativa, però sí en l'activitat ribonucleolítica d'aquest enzim, que és d'un 8% en relació a l'EDN. Ambdòs, però, són igualment inhibits per l'RI. La principal diferència d'aquesta nova variant radica en la citotoxicitat que exhibeix vers les cèl·lules del sarcoma de Kaposi (KS Y-1) i altres línies cel·lulars endotelials, la qual s'atribueix a la seqüència SLHV. Aquest pèptid podria promoure la internalització de l'EDN. Paral·lelament a com s'explica per d'altres RNases citotòxiques, com l'onconasa, el motiu SLHV podria reconèixer alguna molècula tipus receptor que li permetés accedir a l'interior de la cèl·lula i interaccionar amb alguna diana intracel·lular desencadenant una resposta que finalment conduís a la mort cel·lular. L'EDN nativa, en canvi, no presenta cap efecte sobre la viabilitat de les cèl·lules KS Y-1.

1.3.5. ECP o RNasa 3 en complex amb 2',5'-ADP

A més dels estudis cristal·logràfics de la forma lliure de l'ECP o RNasa 3 (Boix *et al.*, 1999 i Mallorquí-Fernández *et al.*, 2000), un dels quals es presenta en aquesta tesi, treballs posteriors mostren nous detalls del centre actiu d'aquest enzim a través de la interacció amb inhibidors de substrat (Mohan *et al.*, 2002).

En base a la primera estructura de l'EDN en presència de sulfat (Mosimann *et al.*, 1996), també s'ha proposat pel complex ECP-2',5'-ADP l'existència d'un lloc d'unió p_1 , en aquest cas constituït per l'Arg34, que estableix un pont d'hidrogen amb el grup 5'-fosfat del lligand. Aquest, s'uneix de manera similar a la descrita per l'EDN (Leonidas *et al.*, 2001) i permet corroborar que la regió principalment implicada en la unió al substrat és p_1 -B₂.

1.3.6. RNasa 4

L'estructura tridimensional de la RNasa 4, la més petita de la família, també va ser resolta pel mètode del reemplaçament molecular, tant per la seva forma lliure (sense lligand) com per la del complex amb d(U_p) (Terzyan, *et al.*, 1998). Ambdós estructures permeten explicar l'elevada especificitat de l'enzim per la uridina.

L'Arg101, en una posició no implicada en la catàlisi a les altres RNases, es col·loca afavorint la interacció amb l'O4 del substrat. A més, la voluminosa cadena lateral de la Phe42 força la conformació del rotàmer de l'Asp80 el qual, al seu torn, pot establir un pont d'hidrogen amb la Thr44. D'aquesta manera, la Thr44 esdevé acceptor del pont d'hidrogen i afavoreix la interacció amb el grup donador -NH de la uridina a la posició 3, però no amb el grup acceptor =N de la citidina (veure figura 1.8). Precisament, els dos grups químics que permeten distingir l'uracil de la citosina són els que usa l'enzim per discriminar entre aquestes dues bases.

1. Introducció

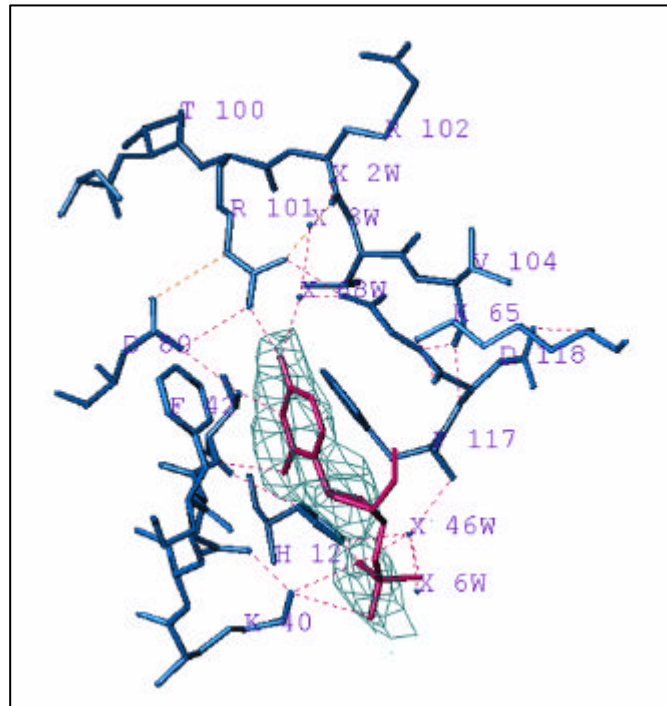


Figura 1.8. Detall dels residus implicats en les interaccions que s'estableixen entre la RNasa 4 i el substrat d(Up); Terzyan *et al.*, 1998.

1.3.7. Angiogenina o RNasa 5

L'estructura de l'Ang, determinada per reemplaçament molecular i afinada amb dades de difracció fins a 2,40 Å, es correspon globalment amb la de la RNasa A, si bé presenta diferències en algunes àrees (Acharya, *et al.*, 1994). La diferència més destacable afecta al lloc d'unió a pirimidines (B₁) anàleg al de la RNasa A (flanquejat per la Thr45 i la Ser123), ja que la cadena lateral de la Gln117 l'obstrueix impedit el posicionament de la base.

El lloc d'unió B₂, específic per purines, presenta els residus Glu111, equivalent al Glu108 de la RNasa A, però no en té cap d'equivalent a l'Asn67 o l'Asn71 de l'homòloga bovina, de manera que aquest lloc tampoc es troba del tot conservat.

Finalment, les altres diferències importants es troben a la regió implicada en l'activitat angiogènica, és a dir als llaços 59-68 i 108-110. Es tracta de dues àrees adjacents, l'estructura de les quals difereix notablement de la resta de membres de la família. Només presenten un residu conservat i aquest fet explica que els seus residus estiguin implicats en la unió a un receptor de superfície cel·lular i no a l'RNA.

1.3.8. RNases citotòxiques.

1.3.8.1. Onconasa o proteïna P-30

La seva estructura cristal·logràfica, resolta per reemplaçament isomòrfic múltiple i afinada amb dades de difracció fins a 1,70 Å, és similar a la de la RNasa A (Mosimann, *et al.*, 1994).

L'esclatxa del centre actiu es localitza a la regió on s'uneixen dos fulls β de tres cadenes cadascun (β_2 , β_5 , β_6 i β_1 , β_3 , β_4) i l'extrem N-terminal de l'hèlix α_1 (figura 1.9). Aquesta estructura està unida, de forma no covalent, a un anió sulfat per mitjà dels residus Lys9, His10 i His97. A més d'aquests, el centre actiu de l'onconasa està constituït pels residus Pyr1, His31, Thr35 i Phe98. Tots ells, exceptuant el Pyr1, tenen els seus homòlegs a la RNasa A. El residu piroglutàmic de l'onconasa o Pyr1, obtingut per ciclació intracatenària de la Gln rendint un extrem N-terminal de la cadena polipeptídica no accessible, a diferència de la Lys1 de la RNasa A, que tendeix a allunyar-se del centre actiu, es plega cap a l'extrem N-terminal de l'hèlix α_1 . D'aquesta manera, l'àtom O ϵ 1 interacciona, via pont d'hidrogen, amb el N ζ de la Lys9 que, al seu torn, s'uneix a l'O2 del sulfat en

1. Introducció

aquesta estructura. D'altra banda, el pont d'hidrogen que s'estableix entre el mateix residu Pyr1 i la Val96 li confereix un plegament més compacte.



Figura 1.9. Diagrama tipus *ribbon* de l'estructura cristal·logràfica de l'onconasa (Mosimann *et al.*, 1994).

1.3.8.2. Ribonucleasa bovina seminal (BS-RNasa)

La BS-RNasa presenta un 80 % d'homologia amb la RNasa A, així com un plegament monomèric del tipus $\alpha + \beta$ (Orengo & Thornton, 1993). Tanmateix, el fet que homodimeritzi de forma natural li confereix unes propietats biològiques atípiques dins el grup de RNases de tipus secretori (Beintema *et al.*, 1988), com per exemple la resistència que mostra enfront l'RI.

L'estructura cristal·logràfica de la forma dimèrica revela que les dues subunitats que s'ensamblen per donar lloc a l'estructura quaternària presenten intercanvi de l'N-terminal (MxM; residus 1-15; figura 1.10), de manera que els respectius centres actius estant constituïts per aminoàcids d'ambdues cadenes (Mazzarella *et al.*, 1993) que, d'altra banda, mantenen la seva unió gràcies a dos ponts disofre consecutius, on participen les Cys31 i Cys32. A més, s'ha descrit l'existència d'un altre dímer, en equilibri amb l'anterior, però minoritari, basat en interaccions que no impliquen l'intercanvi de dominis (Piccoli *et al.*, 1992; Kim & Raines, 1994).

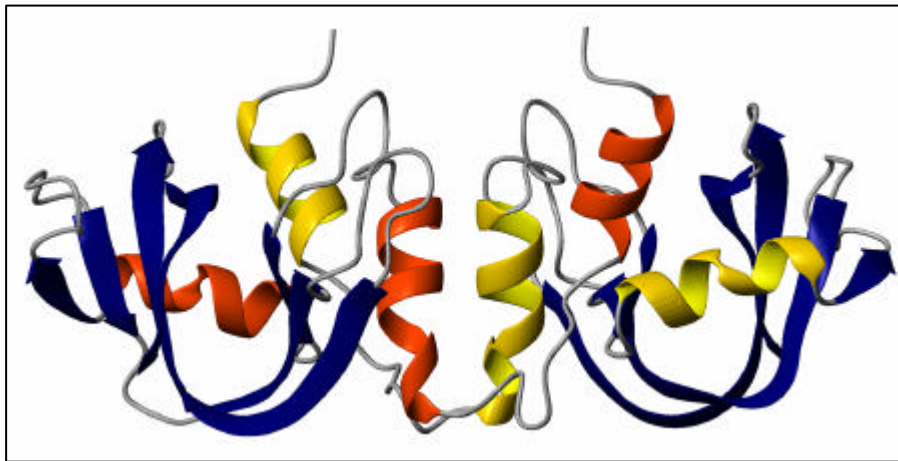


Figura 1.10. Representació *ribbon* del dímer de la BS-RNasa (Orengo & Thornton, 1993). S'ha respectat el mateix codi de colors que a la figura 1.7.

1.3.9. Complexes amb l'inhibidor de ribonucleases (RI)

1.3.9.1. pRI-RNasa A

Abans d'estudiar aquest complex, l'any 1993 Kobe i Deisenhofer van determinar l'estructura cristal·logràfica de la forma lliure de l'inhibidor porcí de RNases (pRI). Presenta 16 regions riques en leucines (LRRs de l'anglès *leucin rich repeats*) cadascuna de les quals constitueix una unitat $\beta\alpha$. Totes aquestes

1. Introducció

unitats s'uneixen entre elles mitjançant una hèlix dextrògira, la qual genera una estructura global en forma de ferradura d'unes dimensions aproximades de 70 x 62 x 32 Å. De l'estructura del complex pRI-RNasa A (Kobe & Deisenhofer, 1995), que es mostra a la figura 1.11, es desprèn que la inhibició té lloc perquè s'impedeix l'accés del substrat al centre actiu. La interacció es produeix a la regió C-terminal de l'RI i està mediada per residus del centre actiu de la RNasa A i dels llaços que l'envolten. En total s'estableixen 56 contactes intermoleculars, on participen 28 residus de l'RI i 24 de l'enzim. El llaç 65-72 de la RNasa A, així com la regió propera a la His119 interaccionen amb la superfície de la ferradura, mentre que la Lys41 i el llaç 86-96 s'uneixen a la cavitat central de l'RI. Malgrat l'existència d'aquestes interaccions no s'observen canvis significatius en les estructures lliures de l'RI ni de la RNasa A (Kobe & Deisenhofer, 1995) i és destacable també que degut al gran nombre de contactes conservats, l'afinitat de la RNasa A per l'inhibidor porcí és similar a l'exhibida enfront l'inhibidor humà d'RNases.

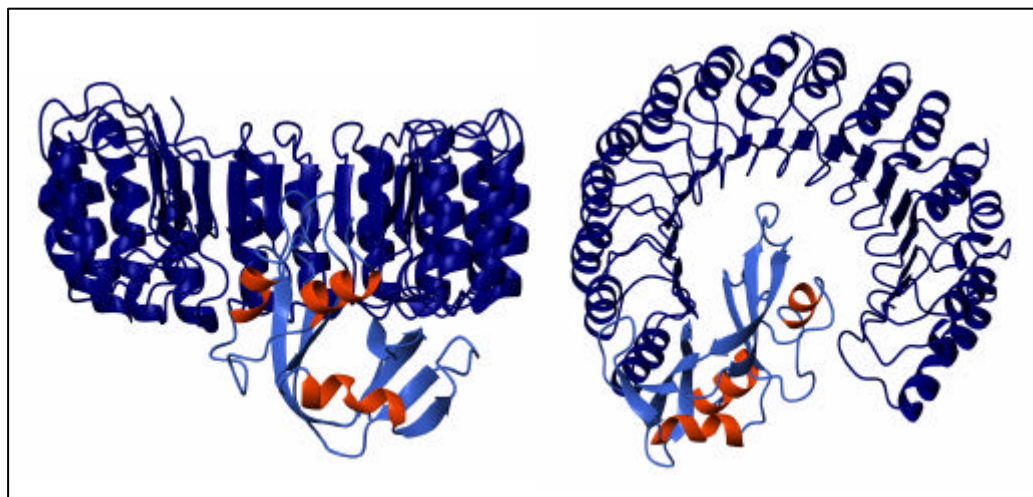


Figura 1.11. Representació de l'estructura tridimensional del complex RNasa A-pRI (Kobe & Deisenhofer, 1995). Vista lateral (a l'esquerra) i visió zenital respecte l'anterior (a la dreta). La RNasa A en taronja i blau, segons el criteri de les figures anteriors i el pRI en blau marí.

1.3.9.2. hRI-Angiogenina

La topologia global del complex entre l'inhibidor de RNases d'origen humà i l'Ang (hRI-Ang) és equivalent a l'observada pel complex pRI-RNasa A (veure figura 1.11), tot i que la majoria d'interaccions que s'estableixen en cada cas són diferents. Malgrat no es disposa d'informació estructural de la forma lliure del hRI, la interacció entre aquest inhibidor i l'Ang provoca, en aquestes molècules, més canvis dels descrits per l'altre complex (pRI-RNasa A).

L'estructura cristal·logràfica de hRI-Ang (Papageorgiou *et al.*, 1997), afinada amb dades de difracció de fins a 2 Å de resolució, revela les bases moleculars d'una interacció que es caracteritza per la seva elevada afinitat (Lee *et al.*, 1989) i a conseqüència de la qual s'inhibeixen les dues activitats de l'angiogenina, tant l'activitat ribonucleolítica com l'angiogènica.

Els contactes energèticament més favorables engloben una petita regió de cada molècula, on hi participen 24 residus de l'angiogenina i 26 del hRI. En relació a l'Ang, la majoria d'interaccions inclouen residus que formen part del centre actiu. Cal destacar el paper de la Lys40 (ubicada al lloc d'unió p_1), que estableix un pont salí amb l'Asp435 del hRI i contactes de van der Waals amb la Tyr434. D'altra banda, la Gln117 de l'Ang, en una posició que obstrueix B_1 (veure apartat 1.3.7), és capaç d'establir contactes amb l'Asp435. A més d'aquests, és important el nombre d'interaccions localitzades a la regió del llaç 85-89. Per part del hRI, és especialment significativa la contribució del llaç 434-440, ja que les interaccions establertes amb els residus d'aquesta regió són responsables de la meitat de l'energia necessària pel manteniment del complex.

Les interaccions del hRI amb d'altres RNases humanes també exhibeixen la gran afinitat de l'inhibidor pel substrat, malgrat aquestes RNases només mantenen un 25-35% d'identitat de seqüència. Aquest fet mostra l'elevada versatilitat i flexibilitat dels llaços implicats en el reconeixement i/o interacció del substrat,

1. Introducció

especialment notable en el cas del llaç 434-440. També es desprèn d'aquestes observacions que aquest reconeixement s'ha de basar en la capacitat per diferenciar les propietats úniques de cada lligand.

1.4. Presentació de les ribonucleases objecte d'estudi: ECP o RNasa 3 i RNasa 1DN7

1.4.1. ECP vs EDN

L'ECP va ser aïllada i caracteritzada per primera vegada a partir de grànuls d'eosinòfils humans (Gleich *et al.*, 1986). A diferència de les altres RNases humanes no s'ha descrit la seva expressió a cap altre tipus cel·lular (Venge & Byström, 1998; Futami *et al.*, 1997).

Es tracta d'una proteïna extremadament bàsica (pI = 10,8) i la seva seqüència aminoacídica mostra una elevada similitud amb la d'una altra proteïna bàsica, l'EDN, que també fou aïllada i caracteritzada de la mateixa font.

D'altra banda, la seqüència d'aminoàcids d'ambdues proteïnes mostra gran homologia (35% d'identitat de seqüència) amb la de les ribonucleases de tipus pancreàtic. Les dues mantenen conservats els residus del centre actiu (His12, Lys41 i His119, segons la numeració de la RNasa A; veure figura 1.12). Conseqüentment, EDN i ECP s'agrupen dins la família de les RNases humanes (no pt, veure l'apartat 1.1.1) i per això també s'anomenen RNasa 2 i 3 respectivament (Beintema, 1998).

1. Introducció

promou l'acumulació de mononucleòtids a l'inici de la reacció i una lenta aparició d'oligonucleòtids intermediaris, s'ha proposat un mecanisme d'exonucleasa per aquest enzim, en contrast amb el mecanisme catalític endonucleasa de la RNasa A. Aquest comportament s'ha atribuït a una estructura diferent dels llocs d'unió de l'esclatxa del centre catalític (Boix *et al.*, 1999).

Les altres activitats biològiques que presenta l'ECP (antiviral, helmintotòxica, neurotòxica, antibacteriana) es relacionen amb la seva toxicitat. En el cas de l'activitat antiviral, que comparteix amb l'EDN, s'ha postulat que es promou de forma dependent de l'activitat ribonucleolítica. S'ha confirmat, per exemple, l'activitat antiviral de l'EDN i l'ECP contra determinats virus respiratoris sincitials (Domachowske *et al.*, 1998). Altres estudis suggereixen que l'helmintotoxicitat i la neurotoxicitat, que presenten tant l'EDN com l'ECP, i l'activitat antibacteriana que exhibeix l'ECP són independents de l'activitat ribonucleolítica (Rosenberg, 1995).

A més, l'ECP és citotòxica contra teixits danyats de l'hoste. Aquesta propietat es relaciona amb la desgranulació dels eosinòfils durant processos inflamatoris provocats per afeccions asmàtiques o de tipus respiratori (Venge & Byström, 1998).

Deixant de banda el mecanisme d'acció que promou aquestes activitats biològiques, però, aquestes proteïnes necessiten d'altres mecanismes funcionals que els permetin accedir a l'interior de les cèl·lules diana. Per l'ECP, s'ha postulat la capacitat d'induir la formació de porus via la desestabilització de membranes, la qual cosa podria atribuir-se a la disposició tridimensional dels seus residus catiònics (Young *et al.*, 1986).

Estudis recents sobre l'efecte de l'ECP enfront diferents línies cel·lulars de mamífers mostren que la inhibició del creixement provocada per aquesta RNasa depèn del tipus cel·lular i és citostàtica (Maeda *et al.*, 2002)

1.4.2. RNasa 1 vs RNasa A i RNasa 1DN7

La RNasa 1 és l'homòloga humana de la RNasa A, un dels enzims més exhaustivament estudiats (D'Alessio & Riordan, 1997) i amb el qual comparteix un 70 % d'identitat. Ambdós proteïnes presenten propietats enzimàtiques similars (Sorrentino & Libonati, 1997) i conserven els residus del centre catalític, si bé la RNasa 1 és més activa enfront l'RNA de doble cadena (dos ordres de magnitud). Aquest fet pot atribuir-se a la major presència de residus bàsics a l'extrem N-terminal, ja que la concentració local de càrregues positives podria afavorir la desestabilització de la doble cadena (Sorrentino & Libonati, 1997).

D'altra banda, la RNasa 1 es troba present en molts teixits del cos humà, i s'expressa especialment al pàncreas (Futami *et al.*, 1997; Fernández-Salas *et al.*, 2000). A diferència de la RNasa A, que participa en la degradació de l'RNA a la dieta dels rumiants, es desconeix fins el moment la seva funció biològica. Existeix una altra RNasa humana de tipus pancreàtic, però, expressada en grans quantitats per part de les CE, que podria jugar un paper important en l'homeostasi vascular (Landré *et al.*, 2002)

Les dues proteïnes també difereixen en el seu patró de glucosilació. Mentre que la RNasa A es troba poc glucosilada i només presenta un lloc de N-glucosilació a l'Asn34 (Beintema, 1986), la homòloga humana té tres llocs potencials d'unió a glicans (Asn34, Asn76 i Asn88), els quals mostren diferent grau de glucosilació depenent del seu teixit d'origen (Yamashita *et al.*, 1986; Beintema *et al.*, 1988; Ribó *et al.*, 1994). A més, els patrons de glucosilació diferents per una mateixa proteïna, com és el cas de la HPRNasa, permeten discernir entre la proteïna produïda en situació normal i l'expressada per cèl·lules tumorals, de manera que el seu estudi pot anar encaminat a la recerca de nous marcadors tumorals (Fernández-Salas *et al.*, 2000; Peracaula *et al.*, 2003).

1. Introducció

Basant-se en la part proteica de l'enzim, de fet, fa molt temps que s'estudia la RNasa 1 com a marcador de l'adenocarcinoma pancreàtic (Fink *et al.*, 1971; Llorens & Cuchillo, 1986; Warshaw, 1987; Kemmer *et al.*, 1991 i Kobayashi & Kawacubo, 1994). Malgrat que els nivells de RNasa 1 en sèrums d'adenocarcinoma pancreàtic són més alts que als sèrums d'individus sans, les diferències detectades no són suficientment específiques per poder usar la quantitat total de RNasa 1 com a marcador tumoral (Reddi & Holland, 1976; Kobayashi & Kawacubo, 1994 i Tabarés, 2000). Per aquest motiu, les noves línies de recerca van encaminades a la detecció d'alteracions en el patró de glucosilació.

L'alteració en el component glucídic de les membranes cel·lulars és un fenomen associat a les modificacions que experimenten les cèl·lules tumorals (Kim & Varki, 1997). Els canvis relacionats amb la glucosilació poden ser de diferents tipus (Singhal & Hakomori, 1990) i són conseqüència de la desregulació en l'expressió de determinades glicosiltransferases (Kim & Varki, 1997). Les estructures glucídiques de les cèl·lules tumorals poden ser noves, és a dir que no estan presents a les cèl·lules progenitores; poden augmentar els nivells d'alguns antígens glucídics en relació al teixit normal o bé presentar estructures glucídiques característiques d'altres teixits (Singhal & Hakomori, 1990). Aquesta glucosilació aberrant es relaciona amb el potencial invasiu dels tumors (Hakomori, 1996), ja que els determinants glucídics fucosilats juguen un paper essencial en l'adhesió de les cèl·lules canceroses a l'endoteli vascular (veure figura 1.13), fet que contribueix a la metàstasi del càncer.

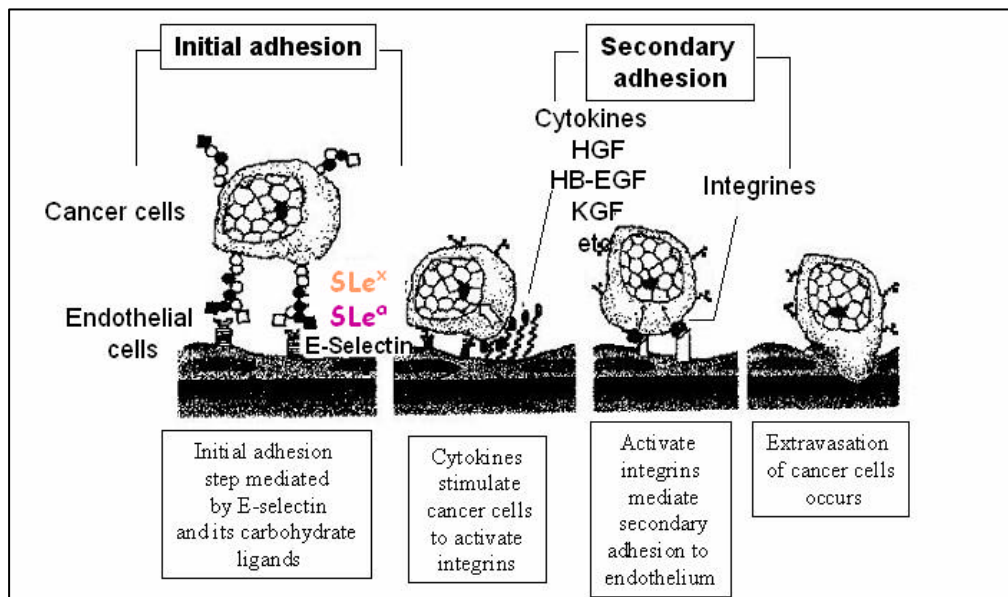


Figura 1.13. S'esquematitza el procés d'extravasació de les cèl·lules canceroses al torrent circulatori. Aquest fenomen és mediat per la interacció de les estructures carbohidratades (antigenes de tipus sialil-Lewis^a i sialil-Lewis^x) amb molècules d'adhesió de la família de les selectines (E-selectines), expressades per part de les CE. Aquesta interacció o adhesió inicial estimula l'activació de diverses citocines les quals, al seu torn, provoquen l'activació d'integrines, directament implicades en l'adhesió secundària de les cèl·lules tumorals a l'endoteli vascular (Kannagi, 1997).

En el cas de la RNasa 1, els glicans de la proteïna expressada pel pàncreas normal es caracteritzen per l'alt contingut en fucoses i per l'absència d'àcid siàlic, mentre que la RNasa 1 tumoral presenta estructures glucídiques carregades, del tipus sialil-Lewis^x o sialil-Lewis^a (Ribó *et al.*, 1994; Fernández-Salas *et al.*, 2000 i Peracaula *et al.*, 2003).

Pel que fa als estudis estructurals, cal destacar que fins el moment no ha estat possible determinar l'estructura cristal·logràfica de la forma nativa de la HPRNasa. A diferència de la RNasa A, que cristal·litza fàcilment (Gilliland,

1. Introducció

1997) i malgrat nombrosos intents, no s'han obtingut cristalls de qualitat suficient per abordar els experiments de difracció.

Es coneix que l'extensió de quatre aminoàcids a l'extrem C-terminal, en relació a la RNasa A, no és essencial per l'activitat ribonucleolítica, però la seva eliminació potencia l'activitat enzimàtica (Bal & Batra, 1997). D'altra banda, l'extrem N-terminal de la proteïna és clau pel desenvolupament de l'activitat catalítica, per la interacció amb l'RI i per la citotoxicitat (Boix *et al.*, 1996).

La concentració de càrregues positives a l'extrem N-terminal de la proteïna, degut a la presència de més residus bàsics en aquesta regió (l'Arg4 i la Lys6 no es troben a la RNasa A, veure figura 1.14) podria ser responsable de la no formació de cristalls. La forma truncada RNasa 1ΔN7, que perd els set primers residus de l'hèlix α1, esdevenint més estable, cristal·litza i ha permès obtenir una bona aproximació a l'estructura de la HPRNasa nativa (Pous *et al.*, 2001). Probablement, degut a l'absència de la Lys7, implicada en la formació del lloc d'unió p₂, la RNasa 1ΔN7 mostra una activitat ribonucleolítica reduïda (aproximadament nou vegades inferior que la RNasa A vers l'RNA de llevat). Donat que aquest residu, a més, està implicat en la interacció amb l'RI (a la RNasa A contribueix, juntament amb la Gln11, a la formació de ponts d'hidrogen amb la Ser456 de l'RI; Kobe & Deisenhofer, 1995), la seva pèrdua també explica la baixa afinitat que exhibeix l'enzim davant el seu inhibidor (Futami *et al.*, 1995). Per aquest motiu resulta una bona candidata com a RNasa citotòxica amb possibles aplicacions terapèutiques.



Figura 1.14. Comparació de la regió N-terminal de la RNasa 1 i RNasa A. S'han assenyalat els residus bàsics de cadascuna de les seqüències.

OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

2.1. Objectiu general i justificació de la globalitat del treball

El principal objectiu d'aquest treball radica en la possibilitat de determinar les estructures tridimensionals (3D) de les RNases humanes RNasa 3 (o ECP) i RNasa 1.

Com s'ha indicat prèviament, malgrat nombrosos intents, no s'han pogut obtenir cristalls de RNasa 1 de qualitat suficient per abordar els experiments de difracció. Per aquest motiu, es plantejà la cristal·lització de la variant recombinant RNasa 1 Δ N7, que perd els set primers residus en relació a la RNasa 1 nativa. D'aquesta manera, es pretenia augmentar l'estabilitat de la proteïna i afavorir-ne el procés de cristal·lització.

Paral·lelament, es plantejà la purificació de RNasa 1 de pàncreas i de dues línies cel·lulars d'adenocarcinoma pancreàtic (MDAPanc-3 i Capan-1), amb la finalitat d'analitzar-ne la fracció glucídica i obtenir una visió global de la seva estructura.

A més, tant per l'ECP com per la RNasa 1 Δ N7, l'objectiu de determinar-ne les estructures 3D també respon a la possibilitat d'elucidar les implicacions que poden tenir aquestes en les funcions no estrictament ribonucleolítiques que presenten. D'una banda, resulta d'especial interès poder aprofundir en el coneixement del mecanisme pel qual aquestes dues RNases exhibeixen la seva citotoxicitat, ja que aquest fet pot obrir nous camins en l'estudi d'agents terapèutics antitumorals. D'altra banda, la caracterització estructural de la variant RNasa 1 Δ N7, així com l'estudi a nivell dels glicans de la RNasa 1 nativa, permet aprofundir en la recerca de nous marcadors tumorals.

2. Objectius

D'aquesta manera, les dues estructures determinades (Mallorquí-Fernández *et al.*, 2000; Pous *et al.*, 2001), així com la participació en el treball de seqüenciació glucídica (Peracaula *et al.*, 2003), s'inclouen dins un marc d'estudi global sobre l'ús de les RNases com a agents de diagnòsi i/o teràpia del càncer.

2.2. Objectius metodològics

Per tal de determinar les estructures 3D de l'ECP i de la RNasa 1?N7 mitjançant la tècnica de difracció de RX s'han d'acomplir els següents objectius parcials:

1. Determinació de les condicions òptimes de cristal·lització de l'ECP i reproducció dels cristalls de RNasa 1?N7 (prèviament cristal·litzada) mitjançant la tècnica de la difusió de vapor.
2. Resolució de les estructures 3D mitjançant el mètode del reemplaçament molecular.
3. Afinament i validació dels models moleculars obtinguts.
4. Anàlisi i interpretació funcional de les estructures 3D obtingudes.

Per tal d'obtenir la visió global de la possible estructura 3D de la RNasa 1 glicosilada s'ha de purificar la RNasa 1 de pàncreas i de les línies cel·lulars d'adenocarcinoma pancreàtic MDAPanc-3 i Capan-1, per dur a terme els estudis de seqüenciació glucídica.

MATERIAL I MÈTODES

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. Cristal·lització

Les proteïnes recombinants ECP i RNasa 1ΔN7 van ser produïdes al departament de Biotecnologia de la facultat d'Enginyeria de la universitat d'Okayama, al Japó, i es van emprar pels experiments de cristal·lització gràcies a la col·laboració establerta amb el Dr. Masaharu Seno.

L'ECP recombinant pura, liofilitzada i dissolta en aigua MilliQ, va ser sotmesa a estudis de cristal·lització. El mètode emprat fou el de difusió de vapor en gotes penjants a 20 °C. Per preparar les cel·les de cristal·lització es van utilitzar plaques de cultiu de vint-i-quatre pouets (Linbro), cubreobjectes de 22 mm x 22 mm, tractats amb diclorodimetilsilà (Merck), i greix (Dow Corning) per segellar-les.

En els assaigs inicials, les solucions de cristal·lització corresponien a les condicions dels *kits* de Hampton Research Crystal Screen I i II. En aquestes proves el volum de les gotes era de 2 µl (1 µl de la proteïna dissolta + 1 µl de la solució del dipòsit o reservori) i s'equilibraven contra 1 ml de la solució de cristal·lització (dipòsit). A partir dels resultats obtinguts amb la condició divuit del Crystal Screen II (10% de Jeffamina M-600, 0,1M de citrat sòdic pH 5,6 i 0,01M de FeCl₃), amb la qual s'observaren microcristalls al cap d'una setmana, es van muntar més plaques per tal d'acotar la condició òptima de cristal·lització. Es va mantenir la concentració de la proteïna (11 mg/ml), però es modificà el volum de les gotes (1-3 µl), així com la concentració de l'agent precipitant (3-30% de Jeffamina M-600; Fluka), de la sal (0,001-0,03M de FeCl₃; Fluka) i el pH de la solució tamponadora (5,0-5,6 pel citrat sòdic; Merck). Finalment, els millors cristalls es van obtenir amb 8% Jeffamina M-600, citrat sòdic pH 5,2 i 0,01M FeCl₃ (veure figura 3.1).

3. Material i mètodes

D'altra banda, en estudis previs s'havia determinat la condició òptima de cristal·lització de la RNasa 1^ΔN7 (Terzyan, comunicació personal). Seguint la mateixa metodologia que en el cas de l'ECP, s'obtingueren nous cristalls que s'empraren durant els experiments de difracció posteriors (figura 3.1). Les gotes contenien 1μl de la proteïna pura liofilitzada, a una concentració de 20 mg/ml en aigua MilliQ, i 1μl de la solució de cristal·lització, és a dir 7% polietilenglicol (PEG) 8K i 0,1M Tris-HCl a pH 8,5.

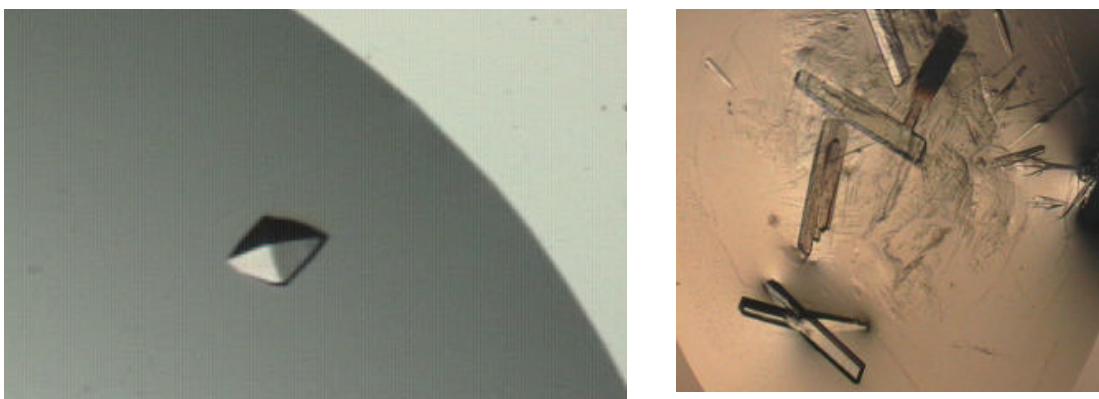


Figura 3.1. La imatge de l'esquerra correspon a un detall d'una de les gotes que contenen els cristalls de la proteïna ECP, mentre que a la dreta es mostra una imatge amb diferents cristalls de la proteïna RNasa 1^ΔN7.

3.2. Muntatge dels cristalls

Donat que es volia disposar de cristalls criorefredats a temperatura de nitrogen líquid (amb nitrogen vapor) pels experiments de difracció, calia trobar les solucions crioprotectors que evitessin la degradació dels mateixos enfront la baixa temperatura del nitrogen vapor del crio-sistema de refredament (110 K).

Alguns compostos orgànics, com l'etilenglicol o el glicerol afavoreixen el procés de vitrificació de l'aigua, impeding la formació de cristalls de gel, que destrueixen internament el cristalls de proteïnes, però, d'altra banda, en no formar part de la condició de cristal·lització, poden provocar alteracions físico-químiques dels cristalls. Per aquest motiu, resulta de gran interès la crioprotecció conjunta dels cristalls amb aquestes substàncies i amb l'agent precipitant emprat per cristal·litzar.

3.2.1. Adaptació dels cristalls a l'increment d'agent precipitant

En ambdós casos, els primers cristalls obtinguts es van usar per testar les propietats de la Jeffamina M-600 i el PEG 8K com a crioprotectors. Amb aquest objectiu, cadascun dels cubreobjectes on hi havia les gotes que contenien els cristalls seleccionats es va col·locar en noves cambres de cristal·lització (plaques de Petri; Falcon), on el reservori, de 0,5 ml, el constituïren les següents solucions: 10% Jeffamina M-600, 10% Jeffamina M-600 + 0,01M FeCl_3 , 15% Jeffamina M-600, 15% Jeffamina M-600 + 0,01M FeCl_3 pels cristalls d'ECP, on es volia corroborar, a més, si el FeCl_3 , necessari per la cristal·lització, podia afectar la naturalesa dels cristalls tractats. Amb els cristalls de la RNasa 1⁹N7 s'assajaren dos tractaments: 10 % PEG 8K i 15% PEG 8K.

L'augment de la concentració dels agents precipitants permetia disminuir el contingut d'aigua de la solució sense allunyar-se excessivament de la condició òptima de cristal·lització (8% i 7% respectivament). Com que calia comprovar si aquest increment modificava les característiques dels cristalls, es van deixar dotze hores en les noves condicions.

3. Material i mètodes

3.2.2. Selecció del crioprotector

Després del període d'adaptació, els cristalls es conservaren en totes les condicions citades anteriorment. No s'observaren canvis morfològics que denotessin fractures o dissolució dels mateixos i tampoc es detectaren diferències entre els diferents tractaments aplicats. Es van preparar solucions de crioprotector amb un 10% i un 15% de Jeffamina M-600 o PEG 8K i concentracions creixents (5, 10 i 15%) d'etilenglicol (Fluka) o de glicerol (Fluka). Es descartaren les solucions que formaven anells de gel en ser exposades al feix de RX i al nitrogen vapor d'un crio-sistema de refredament d'Oxford Cryosystems. Això es verificava a partir dels patrons de difracció d'aquestes solucions, recollits amb un generador d'ànode rotatori de coure (ubicat a l'IBMB-CSIC de Barcelona). Finalment, es van escollir com a crioprotectors la solució 15% Jeffamina M-600 + 15% etilenglicol pels cristalls d'ECP i 15% PEG 8K + 15% etilenglicol pels de RNasa 1?N7.

3.2.3. Proves de difracció

Les primeres proves de difracció es van dur a terme al mateix generador de Barcelona (IBMB-CSIC) i es realitzaren amb nous cristalls, els quals es criorefredaren *in situ* (sota el feix de nitrogen del sistema Oxford connectat al generador). Es tractava d'afegir una gota del crioprotector (5-10 μ l) al costat de la gota que contenia el/s cristall/s (gota mare). Després de treure'ls de la gota mare amb una nansa de niló, es passava aquesta nansa amb el cristall per la gota del crioprotector amb la finalitat de rentar el cristall de la solució de cristal·lització i d'estabilitzar-lo amb la nova solució (crioprotectora).

Amb els cristalls d'ECP es va tenir especial cura en els rentats, ja que la solució de cristal·lització formava un tel rogenc al voltant dels mateixos, degut a la presència del FeCl_3 , el qual dificultava la seva crioprotecció. D'altra banda, amb els cristalls d'ambdós proteïnes la qualitat dels conjunts de dades recollits millorà notablement

després d'interrompre breument la incidència del nitrogen líquid sobre els cristalls una vegada muntats al generador (tècnica *anneal*; Harp *et al.*, 1998). D'aquesta manera, s'aconseguia un perfil més nítid de les taques de difracció.

3.3. Recollida de dades

Altres cristalls d'ECP i de RNasa 1?N7, de dimensions aproximades 0,15 mm x 0,11 mm x 0,07 mm i 0,30 mm x 0,25 mm x 0,05 mm respectivament, van ser estabilitzats sobre nanses de 0,1-0,2 mm de diàmetre de manera equivalent a l'anteriorment exposada, però es van criorefredar amb nitrogen líquid per ser emmagatzemats i posteriorment transportats i muntats a diferents línies de difracció de RX: a la 5.2R del sincrotró Elettra (Trieste, Itàlia), on es van recollir les dades a partir de les quals es va resoldre l'estructura de l'ECP i a la línia de difracció ID14-EH2 de l'ESRF (Grenoble, França), on es recolliren les dades de la RNasa 1?N7.

La informació obtinguda a partir de les primeres imatges de difracció (paràmetres de la cel·la cristal·lina i grup espacial) permet ajustar la posició del cristall abans que comenci la recollida de dades. Així, coneixent la simetria cristal·lina s'estableixen els graus d'oscil·lació que ha d'experimentar el cristall per poder recollir dades completes (rang d'oscil·lació de ϕ), i els graus d'oscil·lació entre imatges consecutives ($\Delta\phi$).

En el cas de l'ECP, les dades de difracció dels RX es van recollir amb un detector tipus Image Plate (300 mm; MAR Research) de la línia d'Elettra. Degut a l'elevada intensitat del feix, amb les primeres proves es va notar que treballant a dosis elevades es perdien algunes taques de baixa resolució (el centre de les imatges apareixia cremat). Per aquest motiu, el primer grup de fotografies (rang d'oscil·lació de $\phi = 1-72^\circ$) es va recollir a una dosi inferior. Com que no es detectaren diferències notables en relació a la informació de baixa resolució però

3. Material i mètodes

si que es guanyaren reflexions d'alta resolució, es va tornar a recollir un segon grup de fotografies (rang d'oscil·lació de $\phi = 73-119^\circ$) a una dosi elevada. Finalment, per tal de disposar d'un tercer grup d'imatges que facilités l'escalat conjunt dels dos grups anteriors es va recollir un tercer grup amb un rang d'oscil·lació de $\phi = 49-73^\circ$ també a una dosi elevada.

Per la RNasa l'N7 es recolliren un total de 100 imatges, a un detector d'àrea electrònic (Quantum CCD), que foren processades conjuntament .

A la taula 3.1 es presenten els paràmetres més importants relacionats amb la recollida de dades al sincrotró Elettra.

Taula 3.1. Principals paràmetres relacionats amb la recollida de dades de l'ECP. L'angle ϕ fa referència als graus de rotació que experimenta el cristall entre la recollida de dues imatges consecutives, mentre que 2θ representa l'angle entre un raig incident i el corresponent raig difractat per un pla del cristall. La dosi fa referència al nombre de fotons incident per cada exposició.

Paràmetres de la recollida	
Mètode de recollida	dosi
ϕ a la primera imatge (graus)	0
Variació de ϕ per imatge (graus)	1
Distància cristall-detector (mm)	200
λ (Å)	1,05
Resolució màxima (Å)	1,66
2θ màxima (graus)	36,87

3.4. Processament de les dades

El processament de les dades (indexat i escalat) de l'ECP es va dur a terme amb el paquet de programes HKL (DENZO i SCALEPACK; Otwinowski & Minor, 1997), mentre que per la RNasa 1?N7 es va utilitzar el programa MOSFLM (Leslie, 1991).

L'indexat i el posterior afinament dels paràmetres d'orientació del cristall i del detector, així com la integració de totes les imatges de l'ECP es va realitzar amb DENZO. En aquest programa, que accepta la selecció de pics d'una imatge per indexar, existeixen tres paràmetres que especifiquen l'orientació del cristall en relació al feix de RX (rotx, roty i rotz; veure figura 3.2). El seu afinament pot ser controlat per l'usuari definint el límit de resolució, l'ordre i el nombre de paràmetres que es volen afinar conjuntament, etc. En canvi, els paràmetres relacionats amb l'orientació del detector (distància cristall-detector, 2θ) són afinats automàticament pel programa, ja que els seus valors han de ser coneguts abans de començar el processament.

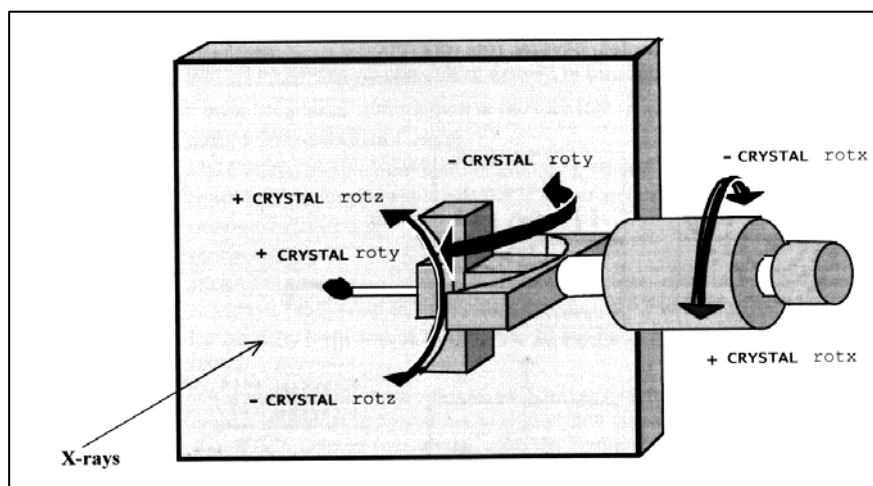


Figura 3.2. Paràmetres de rotació del cristall en relació al feix de RX (manual de DENZO).

L'escalat de les imatges de l'ECP es va realitzar amb el programa SCALEPACK. D'una banda, es van escalar totes les imatges considerant els intervals *1 to 72* i *73 to 119* per diferenciar els dos grups de fotografies recollides a diferent dosi, i de l'altra, es va escalar el tercer rang d'imatges recollit (*49 to 73*). A continuació, a partir d'aquests dos grups de reflexions escalades per separat es va generar un conjunt final de reflexions (en termes d'intensitat) el format de les quals es va modificar amb el programa TRUNCATE (CCP4, 1994), que calcula els factors d'estructura (amplituds) corresponents a les intensitats de les reflexions escalades.

3.5. Resolució de les estructures

Les estructures dels dos enzims es van resoldre per reemplaçament molecular amb el paquet de programes AMoRe (Navaza, 1994), usant com a models de cerca la proteïna EDN, modificada d'acord amb la seqüència d'aminoàcids de l'ECP, i la RNasa A, modificada en funció de la seqüència de la RNasa 1?N7.

El reemplaçament molecular es basa en l'anàlisi de proteïnes homòlogues (>30% d'identitat de seqüència) i consisteix en determinar la posició que ocupa la molècula model (d'estructura coneguda) a l'interior de la cel·la unitat del cristall (de la molècula d'estructura desconeguda), els paràmetres de la qual s'obtenen del processament de les dades de difracció. El programa informàtic tracta al model com a un cos rígid que és desplaçat, mitjançant funcions de rotació i translació (funcions de Patterson), mentre és comparat amb les dades experimentals (informació de les reflexions). D'aquesta manera, es calculen els factors d'estructura del model ($F_{\text{calc}} + \phi_{\text{calc}}$). El càlcul de mapes de densitat electrònica (funció periòdica que representa el nombre d'electrons associats a cada posició atòmica) permet comparar la informació experimental amb el model inicial.

Aquestes funcions de rotació i translació van ser calculades usant dades d'un rang de resolució de 10 a 3 Å per l'ECP i de 15 a 3 Å per la RNasa 1?N7. Després d'un afinament de cos rígid per cada cas, es van obtenir solucions clares amb uns coeficients de correlació, entre el model i les dades experimentals, del 48,4% i 49,7% (39,5% i 32,7% per les segones solucions) i un factor R cristal·logràfic (indicador de la bondat d'ajust entre el model i les dades experimentals) del 43,8% i 44,4% (47,1% i 51,9% per les segones) respectivament.

Els mapes calculats, del tipus $2F_o - F_c$ i $F_o - F_c$ (σA), utilitzant les fases provinents dels models de cerca correctament orientats i traslladats, mostraven la correcció d'aquestes solucions i diferències de densitat positiva pels residus i les cadenes laterals que no es trobaven al model de partida.

3.6. Afinament de les estructures

L'afinament d'ambdós estructures es va realitzar amb el paquet CNS v0.9 a (Brünger, 1998). L'estratègia de l'afinament consistí en alternar cicles d'afinament posicional i d'afinament dels factors de temperatura amb el traçat i correcció manual de la molècula, usant els mapes $2F_o - F_c$ i $F_o - F_c$ (σA), en estacions de treball Silicon Graphics amb el programa TURBO-FRODO (Roussel & Cambilleau, 1989). A la taula 3.2 s'especifiquen els paràmetres més rellevants alhora de dur a terme els cicles d'afinament automàtic. Durant els darrers passos de l'afinament, es van col·locar les molècules de solvent en posicions estereoquímicament raonables, considerant la presència conjunta de densitat en els dos tipus de mapes $2F_o - F_c$ (1σ) i $2F_o - F_c$ ($2,5\sigma$).

3. Material i mètodes

Taula 3.2. Principals paràmetres relacionats amb els cicles d'afinament posicional duts a terme amb els protocols *minimize* i *bindividual* del programa CNS v0.9a (Brünger, 1998).

Paràmetres de l'afinament automàtic	
Rang de resolució (Å)	20-1,75 (ECP)/ 20-1,9 (RNasa 1ΔN7)
Reflexions rebutjades	cap
Correcció dels factors de temperatura (B)	anisotròpica
Límit inferior de resolució per la correcció anisotròpica (Å)	6,0
Aplicació de la correcció del solvent	si
Selecció d'àtoms fixos	molècules de solvent en posicions especials (per l'ECP)
Tipus d'afinament	<i>maximum likelihood target using amplitudes</i>
Pes dels raigs X	determinat automàticament
Pes pels factors B	determinat automàticament

RESULTATS

4. RESULTATS

En aquest capítol s'inclouen els tres articles científics que constitueixen els resultats d'aquesta tesi doctoral.

Al primer article, que porta per títol "Three-dimensional Crystal Structure of Human Eosinophil Cationic Protein (RNase 3) at 1.75 Å Resolution", s'hi presenta l'estructura cristal·logràfica de l'ECP, així com les implicacions funcionals que es deriven del seu estudi.

D'altra banda, durant el desenvolupament d'aquesta tesi doctoral s'ha establert la modificació del protocol de Fernández-Salas *et al.* (2000), amb l'objectiu d'obtenir RNasa 1 pura per l'anàlisi i posterior caracterització de la seva fracció glucídica. Per aquest motiu, es presenta l'article II, titolat "Glycosilation of human pancreatic ribonuclease: differences between normal and tumour states". Al final del mateix, també s'inclou una descripció més detallada de la metodologia emprada durant la purificació de RNasa 1 del medi condicionat de la línia cel·lular Capan-1, així com els resultats més significatius de les etapes del procés. D'aquesta manera, a més dels estudis estructurals, s'ha treballat amb algunes de les tècniques que permeten l'obtenció de proteïna pura i que s'utilitzen habitualment abans d'abordar un procés de cristal·lització.

Al tercer article, " Three-dimensional structure of human RNase 1?N7 at 1.9 Å resolution", es descriu l'estructura 3D de la RNasa 1?N7 i les peculiaritats funcionals derivades del seu anàlisi.

4.1. ARTICLE I

Acta crystallographica Section D: Biological crystallography

Volume 57, Part 4 (April 2001) p. 498-505

“Three-dimensional Crystal Structure of Human Eosinophil Cationic Protein (RNase 3) at 1.75 Å Resolution”. J. Pous, G. Mallorquí-Fernández, R. Peracaula, S. S. Terzyan, J. Futami, H. Tada, H. Yamada, M. Seno, R. de Llorens, F. X. Gomis-Rüth and M. Coll

4.2. ARTICLE I I

Glycobiology

Vol 13 no 1 2003 pp. 1-18

“Glycosilation of human pancreatic ribonuclease: differences between normal and tumour states”. Rosa Peracaula, Louise Royle, Glòria Tabarés, Goretti Mallorquí-Fernández, Sílvia Barrabés, David J. Harvey, Raymond A. Dwek, Pauline M. Rudd, and Rafael de Llorens

4.3. ARTICLE I II

Journal of molecular biology

Vol. 300 no. 5 (July 2000) p. 1297-1307 [doi:10.1006/jmbi.2000.3939](https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3939)

“Three-dimensional structure of human RNase 1?N7 at 1.9 Å resolution”. Goretti Mallorquí-Fernández, Joan Pous, Rosa Peracaula, Joan Aymamí, Takashi Maeda, Hiroko Tada, Hidenori Yamada, Masaharu Seno, Rafael de Llorens, F. X. Gomis-Rüth and Miquel Coll

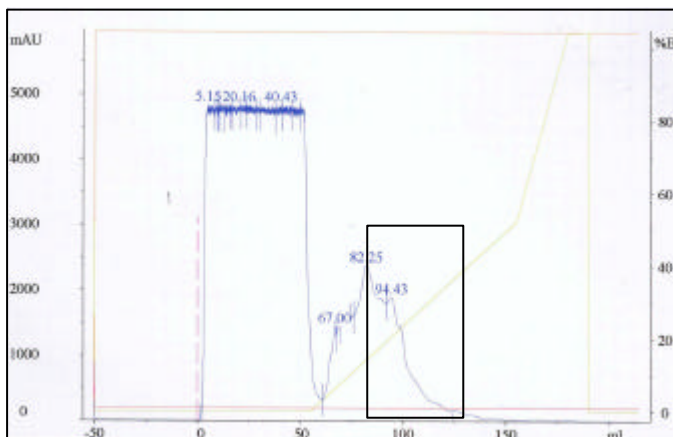
PURIFICACIÓ DE RNasa 1 DEL MEDI CONDICIONAT DE CAPAN-1

El medi condicionat de Capan-1 (3,5 l) es processà com s'indica a continuació:

1. Centrifugar a 9000 rpm durant 30 minuts. Descartar el sediment.
2. Filtrar amb filtres de 0,22 μm de diàmetre de porus (Millipore)
3. Concentrar mitjançant filtració tangencial (Millipore amb *Prep/Scale-TFF Cartridges*)

Amb **el medi Capan concentrat** (45 ml) es procedí de la següent manera:

4. Dialitzar enfront l'amortidor A de la cromatografia d'afinitat (veure figura 4.1).
5. Cromatografia d'afinitat amb la columna d'heparina (HiTrapTM, Amersham Pharmacia). El resultat de la mateixa es presenta a la figura 4.1.



Amortidor A: 50 mM TrisHCl, pH 7, 20 mM NaCl

Amortidor B: 50 mM TrisHCl, pH 7, 1M NaCl

Elució RNasa 1: 20-40% de B

Flux: 1 ml/min

Pressió màxima: 0,3 MPa

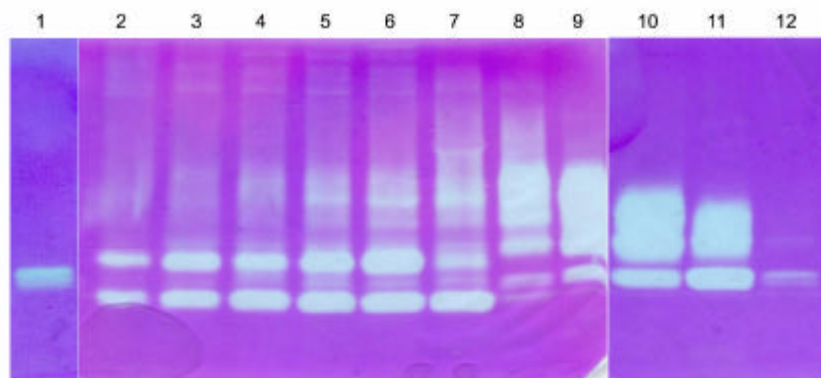


Figura 4.1. (a) Principals característiques de la cromatografia d'afinitat. Al cromatograma s'assenyala la regió on s'elueixen les fraccions de RNasa 1 glucosilades que foren dialitzades per continuar amb la segona etapa de la purificació. Les fraccions reunides corresponen als carrils 3 a 12 del zimograma (b), on també es mostra un carril de referència (#1) amb 5ng de RNasa 1 recombinant pura.

4. Resultats

6. Dialitzar enfront d'aigua milliQ i liofilitzar

7. Cromatografia de bescanvi iònic amb columna MONO-S HR 5/5 (Amersham Pharmacia). El resultat d'aquesta es presenta a la figura 4.2.

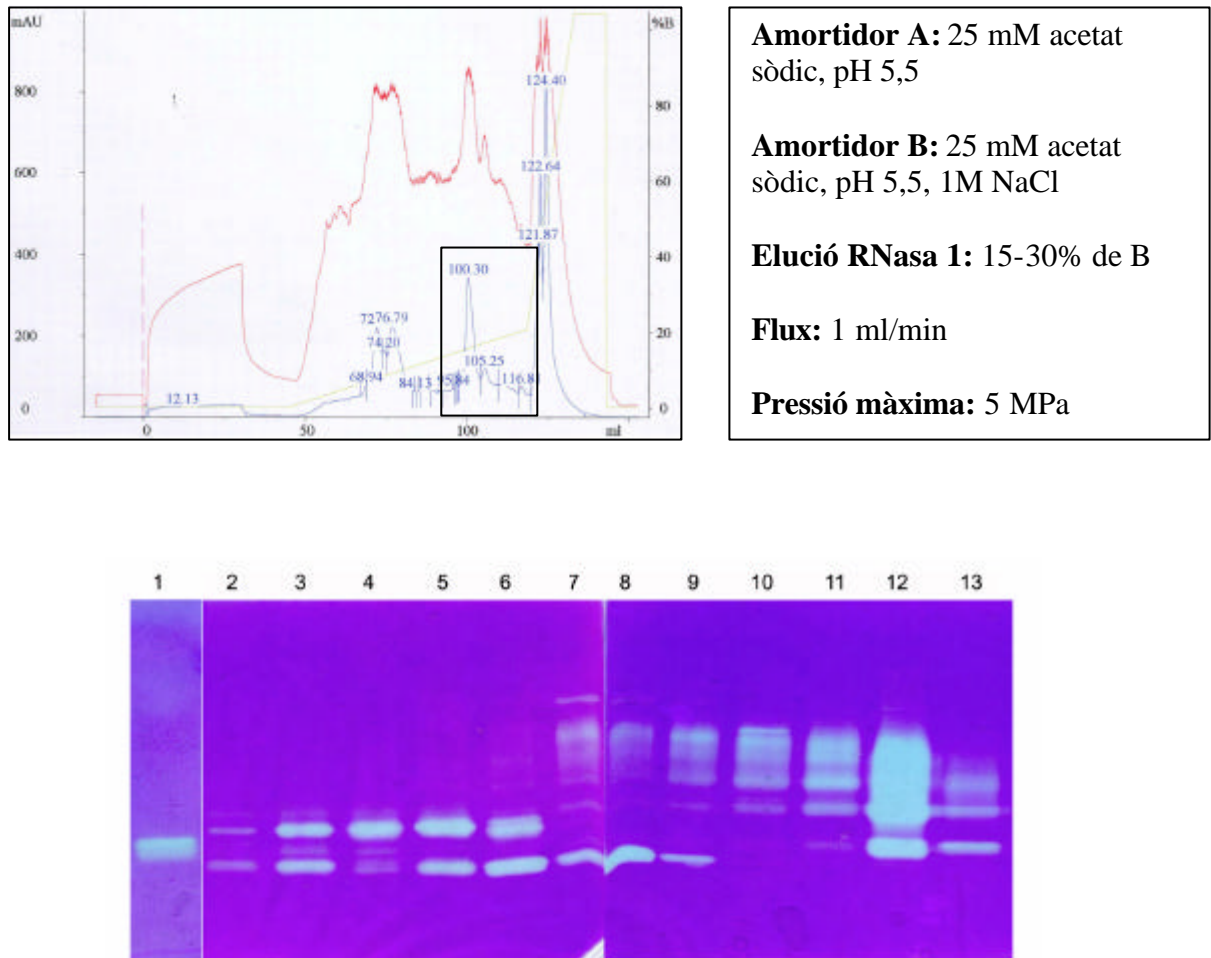


Figura 4.2. (a) Principals característiques de la cromatografia de bescanvi iònic. Al cromatograma s'assenyala la regió on s'elueixen les fraccions de RNasa 1 glucosilades que foren dialitzades per continuar amb la tercera etapa de la purificació. Les fraccions reunides corresponen als carrils 7 a 13 del zimograma (b), on també es mostra un carril de referència (#1) amb 5ng de RNasa 1 recombinant pura.

8. Dialitzar enfront d'aigua milliQ i liofilitzar

9. Cromatografia de fase reversa amb la columna Vydac C4

Després de la cromatografia de fase reversa es van reunir les fraccions de RNasa 1 pura en diferents grups, en funció del seu grau de glucosilació, la qual cosa s'avaluà amb un zimograma i un gel d' SDS-PAGE tenyit amb plata que es mostren a la figura 4.3. A la taula 4.1 es presenta un resum final del procés de purificació, on s'indiquen la quantitat de proteïna total i de RNasa 1 després de cada etapa.

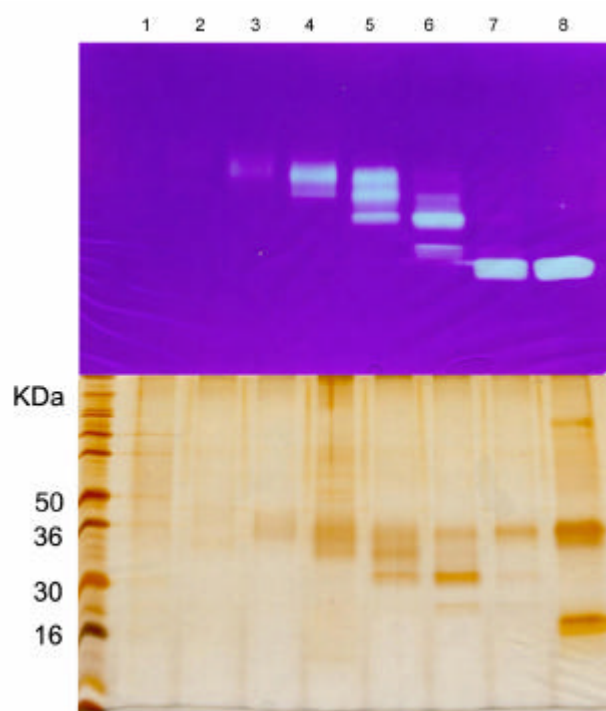


Figura 4.3. Fraccions de RNasa 1 pures, obtingudes després de la cromatografia de fase reversa. Es van reunir en funció dels diferents graus de glucosilació i van ser usades pels experiments posteriors de seqüenciació glucídica.

Taula 4.1. Les mesures es realitzaren mitjançant el mètode de Bradford (Bradford, 1976) i el de l'ELISA sandvitx (Tabarés, 2000) respectivament després de cada cromatografia.

	Proteïna total	RNasa 1
Capan concentrat	5,3 g	143,7 µg
HiTrap Heparina	42,5 mg	132,8 µg
MONO-S	6,3 mg	98,3 µg
Vydac C4	18 µg	18 µg

DISCUSSIÓ

5. DISCUSSIÓ

5.1. Discussió conjunta dels resultats dels articles I i III

5.1.1. Comparació global de les estructures de l'ECP i de la RNasa 1DN7

Ambdós proteïnes presenten un plegament polipeptídic del tipus $\alpha+\beta$, unes dimensions aproximades de 30 x 40 x 40 Å i una forma característica de "V" amb el centre actiu al mig d'una cavitat en forma d'esclatxa (figura 5.1). Les dues molècules estan constituïdes per tres hèlix α ($\alpha 1$ - $\alpha 3$), situades a l'extrem N-terminal, i set cadenes β ($\beta 1$ - $\beta 7$) en el cas de la RNasa 1DN7 i sis ($\beta 1$ - $\beta 6$) a l'ECP. A les dos estructures la primera cadena β ($\beta 1$) es situa entre les hèlix $\alpha 2$ i $\alpha 3$ i les altres després de l'hèlix $\alpha 3$. Cadascuna també presenta una hèlix 3_{10} , de la Val57 a la Gln60 i de la Ile93 a l'Asn95 a la RNasa 1DN7 i l'ECP respectivament. Les cadenes ($\beta 3$ + $\beta 4$) i ($\beta 5$ + $\beta 6$) de la RNasa 1DN7 i ($\beta 2$ + $\beta 3$) i ($\beta 4$ + $\beta 5$) de l'ECP s'extenen, de forma antiparal·lela, d'un extrem a l'altre de l'estructura, quedant delimitades per les dues darreres làmines β ($\beta 1$ i $\beta 7$ a la RNasa 1DN7 i $\beta 1$ i $\beta 6$ a l'ECP). D'altra banda, les hèlix $\alpha 2$ i $\alpha 3$ s'empaqueten de manera que limiten, per costats oposats, amb l'esclatxa que defineix el centre actiu.

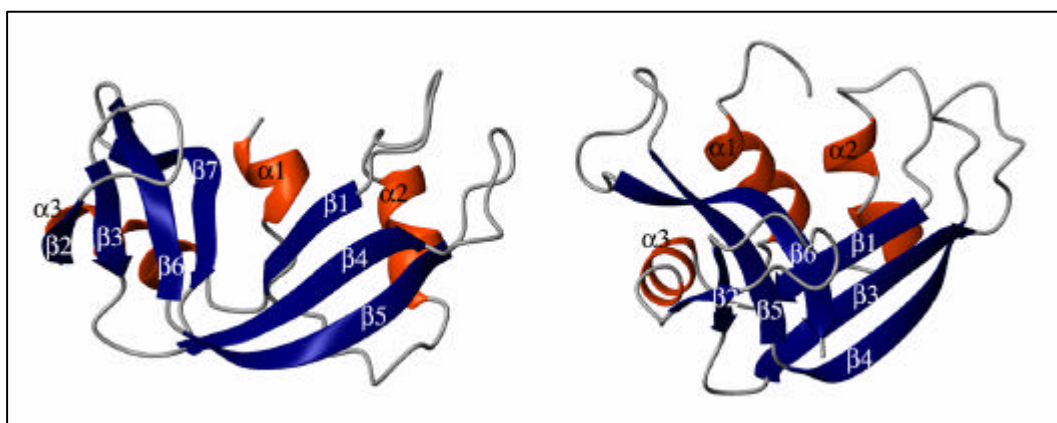


Figura 5.1. Representació del plegament polipeptídic de la RNasa 1DN7 (a l'esquerra) i l'ECP (a la dreta). En ambdós casos s'indiquen les hèlix α i les cadenes β .

5. Discussió

Els elements d'estructura secundària estan connectats per set llaços (L1-L7) a la RNasa 1ΔN7 i vuit (L1-L8) a l'ECP, els quals contenen quasi el 30 i el 50% dels residus de cada proteïna respectivament. A més, aquestes estructures estan estabilitzades per quatre ponts disulfur. A la RNasa 1ΔN7: Cys26-Cys84 que uneix l'hèlix $\alpha 2$ i la làmina $\beta 4$, Cys40-Cys95 unint els llaços L2 i L6, Cys58-Cys110 que connecta l'hèlix $\alpha 3$ i la làmina $\beta 6$ i Cys65-Cys72 entre el llaç L4 i $\beta 3$, mentre que a l'ECP: Cys23-Cys83 unint l'hèlix $\alpha 2$ i la làmina $\beta 3$, Cys37-Cys96 entre els llaços L3 i L7, Cys55-Cys111 que connecta el llaç L5 i la làmina $\beta 5$ i Cys62-Cys71 connectant el llaç L5 i $\beta 2$.

5.1.2. Comparació de la RNasa 1ΔN7, l'EDN, l'ECP, la RNasa 4, l'Ang i la RNasaA

Les dues estructures estudiades (RNasa 1ΔN7 i ECP) presenten un plegament comú al de totes les RNases descrites (RNasa 2 o EDN, Mosimann *et al.*, 1996; RNasa 4, Terzyan *et al.*, 1998; angiogenina, Acharya *et al.*, 1994 i RNasa A, Wlodawer *et al.*, 1988). Per comparar-les s'ha utilitzat l'opció *rigid* del programa TURBO-FRODO (Roussel & Cambilleau, 1989), que permet superposar les estructures en funció d'un nombre mínim d'àtoms (3 C_{α}). Quan és possible, s'escullen C_{α} que pertanyen a residus conservats. En relació a la desviació estadística existent entre les parelles comparades es desprèn que les estructures més similars entre elles són les de l'EDN i l'ECP (desviació quadràtica mitja o rmsd 0,67Å) d'una banda, i de l'altra la de la RNasa 1ΔN7 i la RNasa A (rmsd 1,08Å).

La superposició d'aquestes estructures mostra la coincidència entre els elements d'estructura secundària regulars, mentre que alguns elements no regulars, principalment els llaços, mostren gran divergència (tots els elements d'estructura

secundària comparats s'han definit amb el programa PROCHECK; Laskowski *et al.*, 1993).

A la RNasa 1ΔN7, l'hèlix $\alpha 1$ comença al residu Phe8 i acaba al residu His12 (seguir a la figura 5.2). Malgrat que el començament d'aquesta hèlix és encara desconegut per la forma sencera de la RNasa 1, l'acabament a la His12 per l'extrem C-terminal, es correspon amb el de la resta de RNases humanes i de la RNasa A. A l'ECP, l'hèlix $\alpha 1$ comença al residu Arg7 i acaba a la His15, de manera que té la mateixa longitud que la corresponent hèlix de l'EDN i la RNasa A, però és tres residus més curta que l' $\alpha 1$ de la RNasa 4 i un residu més curta que l' $\alpha 1$ de l'Ang.

Quan es comparen les hèlix $\alpha 2$, la més llarga correspon a l'EDN, amb dotze residus, seguits dels deu de la RNasa 4 i l'Ang, nou de l'ECP i vuit a la RNasa 1ΔN7 i la RNasa A. En comparació amb la RNasa 1ΔN7 i la RNasa A, a la RNasa 4 i l'Ang, aquesta hèlix s'extén cap a l'extrem N-terminal de la cadena polipeptídica, mentre que en l'EDN i l'ECP s'allarga en direcció contrària. A la RNasa 1ΔN7, com en el cas de la RNasa A i la RNasa 4, els tres últims residus de l'hèlix $\alpha 3$ corresponen a una hèlix 3_{10} ; aquesta hèlix és un residu més llarga que l' $\alpha 3$ de l'Ang i dos residus més que l' $\alpha 3$ de l'ECP.

Tant el full β de la RNasa 1ΔN7 com el de l'ECP són discontinus, ($\beta 3 + \beta 4$; $\beta 5 + \beta 6$) i ($\beta 2 + \beta 3$; $\beta 4 + \beta 5$) respectivament, i similars als que presenten l'EDN ($\beta 2 + \beta 3$; $\beta 4 + \beta 5$), l'Ang ($\beta 3 + \beta 4$; $\beta 5 + \beta 6$) i la RNasa A ($\beta 3 + \beta 4$; $\beta 5 + \beta 6$). De fet, la RNasa 4 és l'únic membre de la família que presenta les cadenes $\beta 2$ i $\beta 3$ contínues (Terzyan *et al.*, 1998). La cadena $\beta 2$ és més curta a l'Ang, la RNasa 1ΔN7 i a la RNasa A en relació a la resta de membres de la família.

Entre les sis estructures analitzades, un dels segments que presenta més diferències és el llaç que connecta les hèlix $\alpha 1$ i $\alpha 2$ (L1), de set residus a l'ECP i

5. Discussió

l'EDN, nou a la RNasa 4 i l'Ang, deu a la RNasa 1ΔN7 i dotze a la RNasa A. A més, el llaç L6 (Thr87-Ala96) de la RNasa 1ΔN7, que uneix les cadenes β4 i β5, presenta una conformació diferent al de les altres RNases humanes. D'altra banda, la conformació del llaç que uneix l'hèlix α2 i la cadena β1 (L2) és molt similar a totes les estructures excepte a l'EDN, degut a l'elongació de l'hèlix α2.

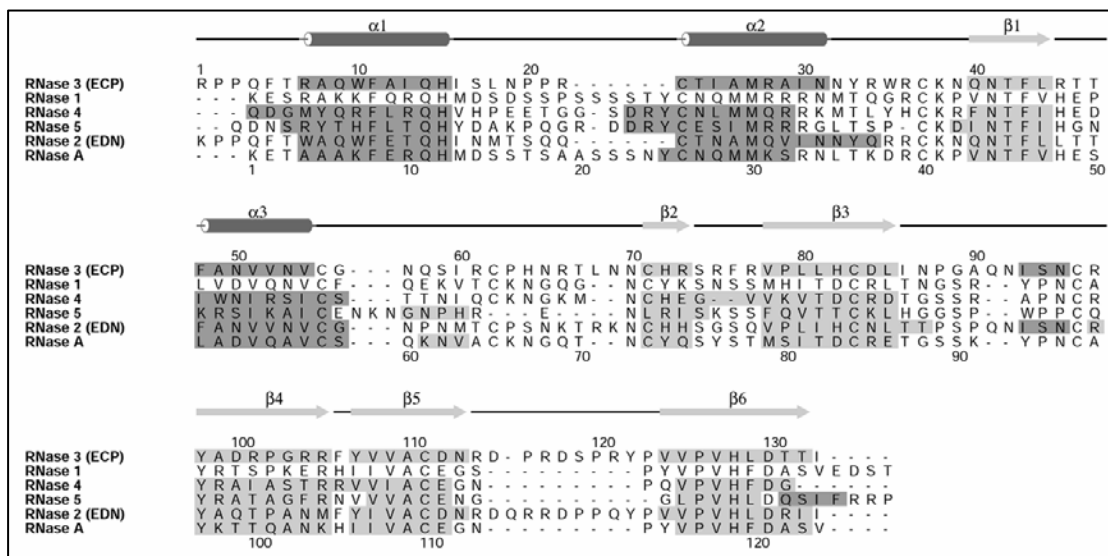


Figura 5.2. Alineament de seqüències de les RNases humanes i la RNasa A. Es representen les hèlix α i els fulls β en forma de cilindres (gris fosc) i fletxes (gris clar) respectivament. A més, s'indiquen amb les mateixes tonalitats de gris els elements d'estructura secundària de les RNases humanes d'estructura coneguda. Figura realitzada amb el programa Alscript (Barton, 1993).

Encara que la majoria de residus que formen part dels llaços no pertanyen al centre actiu de les RNases, la conformació que adopten pot relacionar-se amb algunes propietats bioquímiques i/o funcionals d'aquests enzims.

En el cas de la RNasa A, per exemple, el llaç L2 (residus 15-25) no té cap implicació directa en la geometria del centre catalític, però la seva disposició 3D és important alhora d'explicar el processament proteolític que sofreix aquesta proteïna en presència de subtilisina (Richards & Wickoff, 1971). Aquesta proteasa talla la RNasa A entre l'Ala20 i la Ser21, generant la RNasa S, enzimàticament activa, i que comprèn el pèptid-S (residus 1-20) unit a la proteïna-S (residus 21-124). D'altra banda, estudis mutagènics amb la RNasa A de rata han determinat que l'orientació del llaç L5 (residus 65-72) pot afectar l'afinitat de l'enzim pel substrat (Gupta *et al.*, 1999), ja que aquest llaç conté residus implicats en el reconeixement del substrat a B₂. A més, la unió amb l'RI té lloc mitjançant interaccions predominantment electrostàtiques, la majoria de les quals s'estableixen amb residus dels llaços. Concretament, per la RNasa A es formen gran nombre de contactes amb residus de L3, L4 i L5 (Kobe & Deisenhofer, 1996).

En el cas de la RNasa 1ΔN7 resulta de gran interès la conformació diferencial dels llaços 16-23 i 66-70, ja que pel primer es justifica l'absència de catàlisi per part de la subtilisina, mentre que pel segon s'explica la baixa afinitat de l'enzim per l'RI (veure apartat 5.3.3).

Per l'ECP, i donat que algunes arginines de la molècula es troben repartides entre els llaços L3, L5, L6, L7 i L8, també calia analitzar el paper d'aquests elements estructurals (i dels seus residus) en les altres activitats biològiques que es descriuen per aquesta RNasa, especialment per la seva citotoxicitat.

5.2. Discussió dels resultats de l'Article I

5.2.1. Característiques del centre actiu de l'ECP

Per tal d'estudiar els trets principals del centre actiu de l'ECP s'ha comparat aquest amb el de l'EDN i el de la RNasa A. Amb l'EDN, perquè es tracta d'una RNasa de la mateixa família que presenta un 67 % d'identitat de seqüència amb l'ECP, amb la que també comparteix algunes de les seves activitats biològiques especials (bàsicament neurotoxicitat). Malgrat que ambdues pertanyen al tipus de RNases no pancreàtiques (veure apartat 1.1.1) i les seves característiques estructurals són similars, el seu comportament cinètic és, en alguns casos, notablement diferent. L'EDN recombinant és 2000 vegades més activa catalíticament que l'ECP recombinant amb t-RNA com a substrat (Rosenberg & Dyer, 1997). Tanmateix, mantenen la mateixa preferència pel substrat (poli(U) sobre poli(C)).

La comparació amb la RNasa A obeeix al fet que es tracta de l'enzim amb capacitat ribonucleolítica millor caracteritzat. En comparació amb les RNases de tipus pancreàtic, prefereixen l'uridina a la citidina en substrats llargs (poli(U) sobre poli(C)), però al revés en substrats curts com dinucleòtids (CpA sobre UpA; Sorrentino & Libonati, 1997; Boix *et al.*, 1999).

L'ECP mostra un comportament particular quan s'estudia el seu patró de digestió sobre poli(U). L'acumulació de mononucleòtids des del començament de la reacció i la baixa aparició d'oligonucleòtids intermediaris són interpretats com a activitat exonucleasa en relació a l'activitat endonucleasa de les ribonucleases de tipus pancreàtic (Boix *et al.*, 1999).

L'anàlisi del centre actiu de l'estructura cristal·logràfica de l'ECP revela algunes característiques de l'enzim que podrien explicar els seus principals paràmetres catalítics. En aquest treball s'ha superposat la seva estructura tridimensional amb

la de l'EDN (Mosimann *et al.*, 1996) i la del complex RNasa A-d(ApTpApApG) (Fontecilla-Camps *et al.*, 1994) per tal d'identificar les similituds i les desviacions en els residus implicats en el reconeixement, unió i catàlisi del substrat. (Per la nomenclatura dels llocs d'unió veure figura 1.2).

Com passa amb tots els membres de la superfamília de la RNasa A, els residus del centre catalític són conservats (His15, Lys38 i His128, segons la numeració de l'ECP). Mentre que la His15 i la Lys38 ocupen posicions similars, la disposició de la His128 és diferent respecte la que presenta el residu equivalent de la RNasa A i l'EDN (figura 5.3a i 5.3b). La His119 de la RNasa A pot adoptar dues conformacions alternatives, una de les quals és activa (Zegers *et al.*, 1994). Quan s'estableix la interacció entre el nucleòtid i l'enzim en la seva forma activa, el N δ 1 de la His119 estableix un pont d'hidrogen amb l'O5' de l'anell de ribosa a R₂ (figura 5.3a), participant en la catàlisi (Fontecilla-Camps *et al.*, 1994). El residu de l'EDN topològicament equivalent (His129) adopta la conformació inactiva de la RNasa A, però pot adoptar la conformació activa fàcilment, mitjançant una petita rotació dels angles de torsió χ_1 i χ_2 (Mosimann *et al.*, 1996; veure figura 5.3b). La conformació de la His128 de l'ECP, si bé inactiva, és diferent d'aquestes dues, ja que la seva cadena lateral no seria capaç d'establir contactes ni amb l'anell de ribosa a R₂ ni amb el lloc d'unió p₁. Per tant, aquí també caldria una rotació al voltant dels angles χ_1 i χ_2 per tal que aquest residu pogués interaccionar amb l'O5' de la ribosa a R₂, adjacent a l'enllaç que s'escindeix, de manera similar a com s'explica per la catàlisi en la RNasa A-d(ApTpApApG).

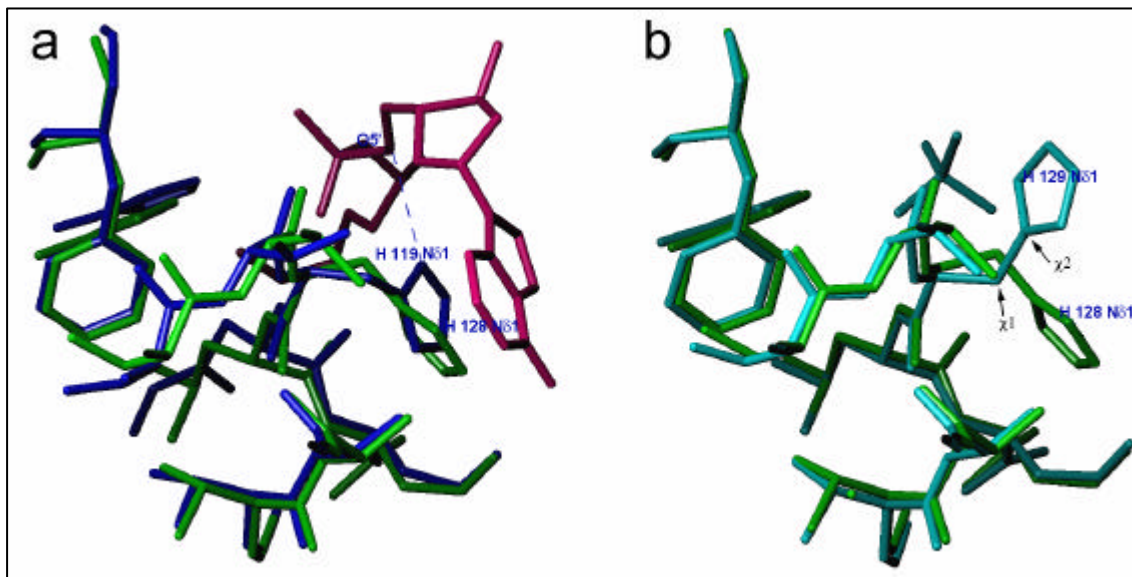


Figura 5.3. (a) Superposició de l'ECP (verda) amb la RNasa A-d(ApTpApApG) (la proteïna en blau i l'oligonucleòtid en vermell). S'assenyala la interacció de la His119 de la RNasa A amb l'oligonucleòtid. (b) Superposició de l'ECP amb L'EDN (blau cel). Es mostren els angles de rotació que permeten el canvi de conformació descrit per la His129 de l'EDN.

Respecte el lloc d'unió B₁, implicat en el reconeixement de pirimidines, la Thr45 està conservada però no la Phe120 ni la Ser123 (numeració de la RNasa A). El residu de l'ECP topològicament equivalent a la Thr45 (Thr42) ocupa una posició similar i podria explicar el contacte amb la base: l'Oγ1 amb el N3 i l'O4 de la pirimidina i el N (de la cadena principal) amb l'O2, com es descriu pel complex RNasa A-d(ApTpApApG); figura 5.4.

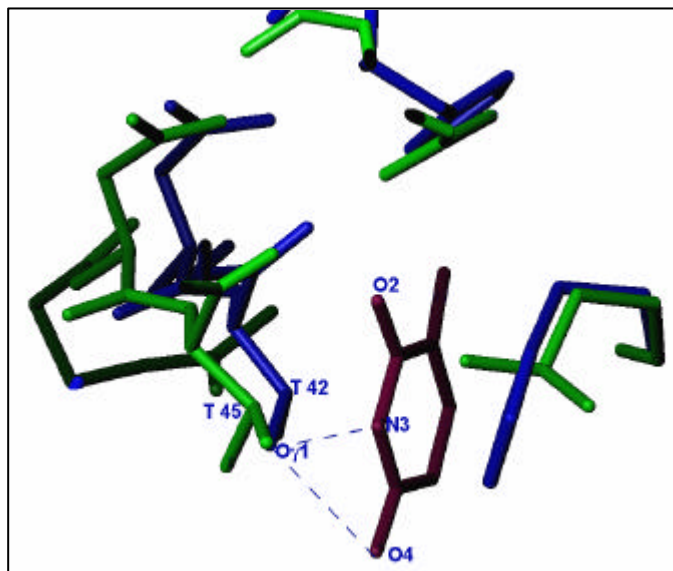


Figura 5.4. Comparació del lloc d'unió B_1 a les dues estructures analitzades (ECP, en verd, i RNasa A-d(ApTpApApG); la proteïna en blau i l'oligonucleòtid en vermell). Es mostren les interaccions que s'estableixen en aquest complex.

Tanmateix, a l'ECP hi ha un altre residu que podria jugar un paper important a B_1 : Gln40. Com s'observa amb l'EDN, aquest residu pot interaccionar amb la base pirimidina, ja que el seu $O\epsilon$ pot formar un pont d'hidrogen amb els àtoms N3 i N1 de l'uridina o amb el N1 de la citidina. Això podria explicar que ambdós bases puguin acomodar-se al lloc d'unió B_1 . A més, es poden establir d'altres interaccions entre el nitrogen amida de la Gln40 i l' $O4'$ de R_1 i el nitrogen N1 de la base (figura 5.5). D'altra banda, la substitució de la Phe120 de la RNasa A per la Leu129 de l'ECP pot explicar la baixa activitat catalítica contra dinucleòtids, donada la possible formació, no favorable, de contactes de Van der Waals amb l'anell aromàtic de la base. A l'Ang humana, el reemplaçament de la leucina

5. Discussió

d'aquesta posició per una fenilalanina incrementa la seva activitat contra nucleòtids petits més de 100 vegades (Harper *et al.*, 1988).

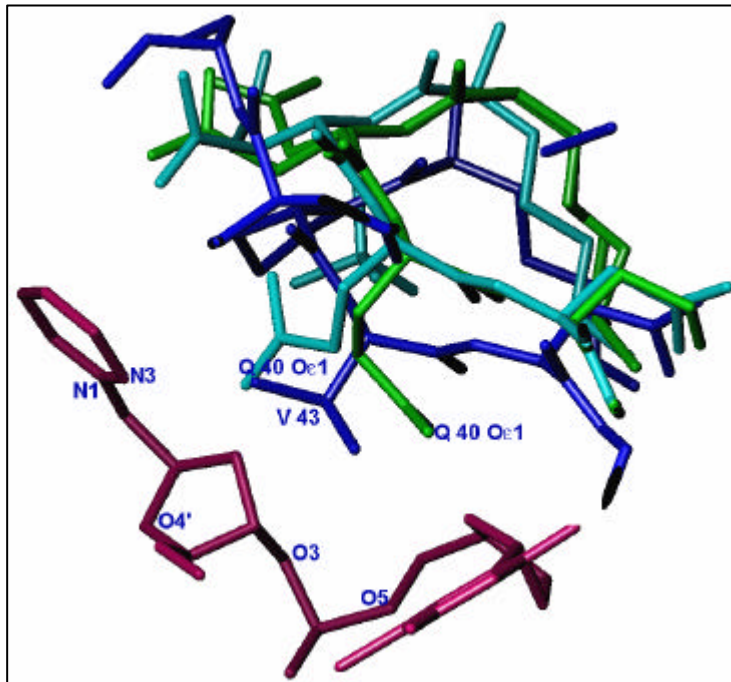


Figura 5.5. Comparació del residu Gln40 de l'ECP (verda) amb els residus equivalents de la RNasa A (la proteïna en blau i l'oligonucleòtid en vermell) i l'EDN (blau cel).

La diferència més destacable en el centre actiu es troba al lloc d'unió B₂ (preferència per purines). L'Asn71 és conservada, però no ho són la Gln69 ni la Glu111 (segons la numeració de la RNasa A). La posició equivalent a la Glu111 l'ocupa l'Asp112 (com a l'EDN) que estableix un pont salí amb l'Arg7 (la distància Asp112 Oδ²-Arg7 Nη¹ és de 2,89 Å), la cadena lateral de la qual es plega cap a l'interior de la cavitat que forma el lloc d'unió B₂ (figura 5.6).

A l'EDN, però, un triptòfan (Trp7) ocupa la posició de l'Arg7, el qual participa mitjançant interaccions de van der Waals amb els anàlegs de substrat 3',5'-ADP i 5'-ADP (Leonidas *et al.*, 2001). L'existència de l'estructura cristal·logràfica del complex binari de l'ECP amb 2',5'-ADP confirma l'establiment del pont Asp112-Arg7 i la interacció, mediada per molècules d'aigua, de la cadena lateral de l'Arg7 amb el substrat (Mohan *et al.*, 2002). En la present estructura l'àtom N η 2 del grup guanidini també sembla trobar-se en una posició favorable per tal d'interaccionar amb el N3 de la purina, permetent la unió del substrat. Malgrat això, el lloc d'unió p₂ de l'ECP també està alterat degut al reemplaçament de la Lys7 i l'Arg10 (segons la numeració de la RNasa A) per Trp10 i Ile13. Com passa amb l'EDN, aquests residus no poden unir-se al grup fosfat a p₂.

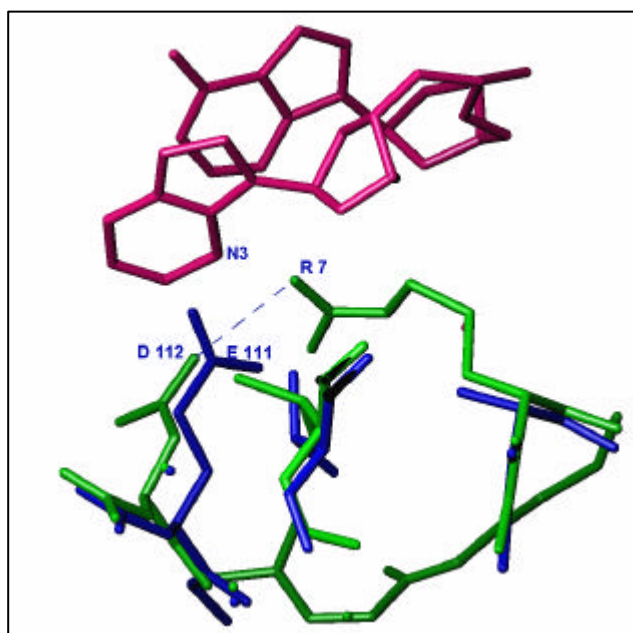


Figura 5.6. Representació del pont salí que s'estableix entre l'Arg7 i l'Asp112 de l'ECP. En aquest cas, també s'ha superposat l'estructura amb la del complex RNasa A-d(ApTpApApG).

L'ECP també mostra altres diferències a la regió dels llocs p_0 i p_{-1} . Al complex RNasa A-d(ApTpApApG), la Lys66 pot establir contactes febles amb el fosfat 5' de la pirimidina: l'àtom $N\zeta$ estableix una interacció, a través d'una molècula d'aigua, amb l'O5' del fosfat a p_0 (Fontecilla-Camps *et al.*, 1994). A l'ECP, aquest residu és substituït per la His64, el nitrogen de l'anell imidazol de la qual podria formar contactes polars amb aquest fosfat (figura 5.7). A l'EDN, en canvi, no és possible un contacte d'aquest tipus, ja que té una Ser en aquesta posició i la seva cadena lateral és massa curta per contactar amb els oxigens del fosfat a p_0 . D'altra banda, l'ECP té l'Asn39, també conservada a l'EDN i que equival a la Pro42 de la RNasa A, la qual podria estar involucrada en la unió del fosfat a p_{-1} . En el complex RNasa A-d(Tp)₄, la Pro42 estableix interaccions de Van der Waals amb el fosfat a p_{-1} (Birsdall & McPherson, 1992).

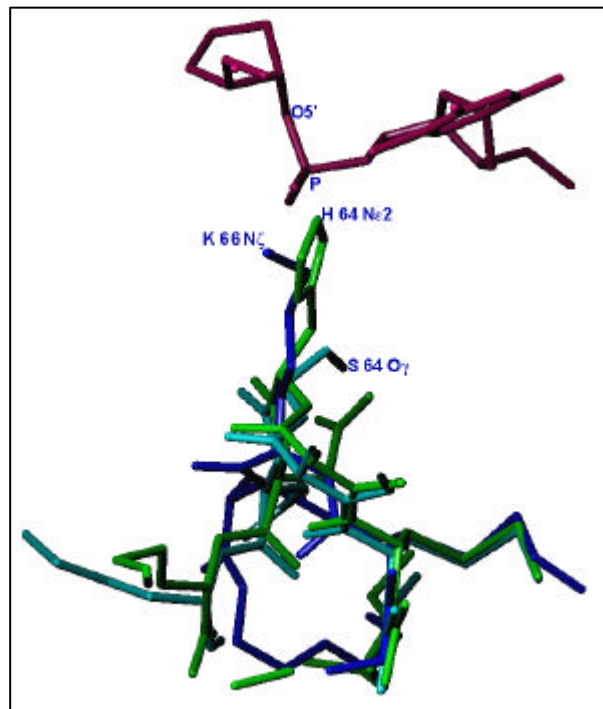


Figura 5.7. Comparació de la His64 de l'ECP amb els residus topològicament equivalents de l'EDN (Ser64) i de la RNasa A (Lys66).

A l'ECP, l'Asn39 pot adoptar dues conformacions, de manera que la seva cadena lateral podria establir ponts d'hidrogen amb el fosfat a p_{-1} . El paper de la His64 i l'Asn39, juntament amb el deteriorament de p_2B_2 , podrien afavorir l'activitat de l'ECP com a exonucleasa. Per tant, un substrat hauria d'alinejar-se al costat 5' del centre catalític p_1B_1 i el tall a p_{-1} resultaria en l'alliberament dels mononucleòtids.

5.2.2. Anàlisi de la superfície molecular de l'ECP

Els membres de la superfamília de la RNasa A constitueixen un grup de proteïnes bàsiques amb punts isoelèctrics (pI) compresos entre 9 i 11. L'ECP és la més bàsica de totes (pI = 10.8), la qual cosa pot atribuir-se al seu elevat nombre d'arginines. De les dinou que presenta, només quatre (Arg36, Arg97, Arg114 i Arg117) es troben en la mateixa posició que en l'EDN. Per tal d'analitzar la influència d'aquests residus, es va construir el mapa del potencial de superfície (superfície de *Connolly*) de l'ECP amb el programa GRASP (Nicholls *et al.*, 1993), que permet la representació dels potencials electrostàtics dels residus carregats a sobre de la superfície molecular de la proteïna.

En el cas de l'ECP, gairebé tota la superfície molecular apareix carregada positivament, essent especialment notable al llarg de β_2 , L6, β_4 , α_2 i L7. Aquests segments contenen un total de deu arginines, les cadenes laterals de les quals estan exposades al solvent. Al costat oposat d'aquestes, al llarg de L8, hi ha tres arginines més que constitueixen una altra zona positiva. Les altres àrees es localitzen en ambdós costats de l'esqueleta del centre actiu. Corresponen als residus Arg61 i Arg66 (L5), Arg34 i Arg36 (L3), que també són exposats al solvent. Finalment, es troben l'Arg1 i l'Arg7, que es situen a un dels extrems de l'esqueleta del centre actiu. Concretament, l'Arg7 es plega cap a l'interior del lloc d'unió B_2 .

Aquesta distribució de càrregues és bastant diferent a la dels altres membres de la superfamília de la RNasa A. Per exemple, en comparació amb l'ECP, les regions

positives de la RNasa A estan principalment restringides a l'escletxa del centre actiu (figura 5.8).

Comparant les superfícies de *Connolly* d'altres RNases humanes d'estructura coneguda també s'observen diferències significatives. L'EDN presenta molta menys càrrega positiva que l'ECP i, com en el cas de la RNasa A, les àrees positives es localitzen bàsicament a l'escletxa del centre actiu. La RNasa 4 i l'Ang també tenen un potencial electrostàtic més alt a la superfície molecular exposada al solvent, però molt menys extens que a l'ECP (figura 5.9). La distribució de càrregues positives en aquestes RNases homòlogues, dins l'escletxa del centre actiu, podria influenciar favorablement la seva capacitat d'acoblar els substrats de ribonucleòtids a l'interior del centre actiu. A l'ECP, en canvi, l'elevada extensió d'àrees positives a la superfície de la molècula podria ser un dels factors responsables de la seva baixa activitat catalítica, ja que podria dificultar l'accés de l'RNA, carregat negativament, a l'interior de l'escletxa del centre actiu (Mallorquí-Fernández *et al.*, 2000). D'altra banda, aquesta superfície molecular catiònica podria reforçar el mecanisme de citotoxicitat, via desestabilització de membranes, que s'ha postulat per l'ECP (Young *et al.*, 1986). El paper específic de les arginines en la creació de porus cel·lulars no és completament clar, però aquets residus semblen crítics alhora de formar contactes amb les molècules negatives de les membranes. Si bé la cationicitat no sembla suficient per justificar la funció citotòxica, la caracterització de la RNasa 7 humana també posa de manifest la relació existent entre l'elevat contingut de residus bàsics i la citotoxicitat (Zhang *et al.*, 2003).

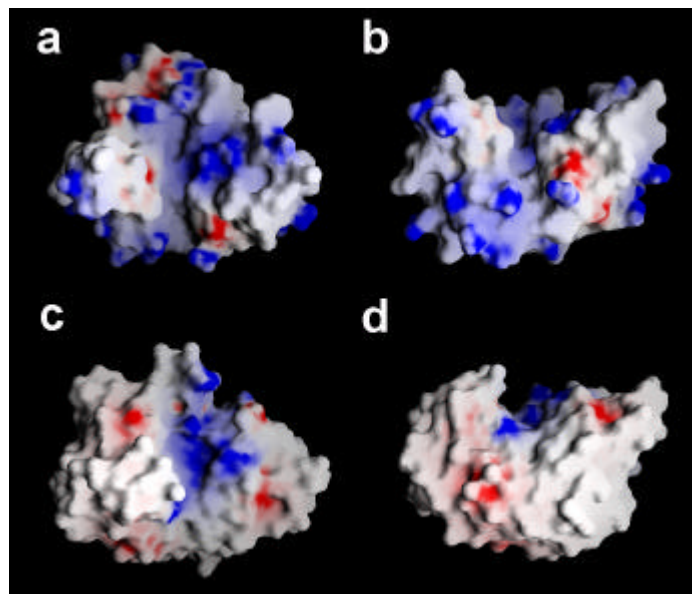


Figura 5.8. Superfícies de *Connolly* mostrant el potencial electrostàtic [de $-15 k_B T/e$ (vermell, per les càrregues negatives) a $+15 k_B T/e$ (blau, per les càrregues positives)] de l'ECP (a dalt), vista frontal (a) i al llarg de l'esletxa del centre actiu (b), i de la RNasa A (a baix), vista frontal (a) i al llarg de l'esletxa del centre actiu (b).

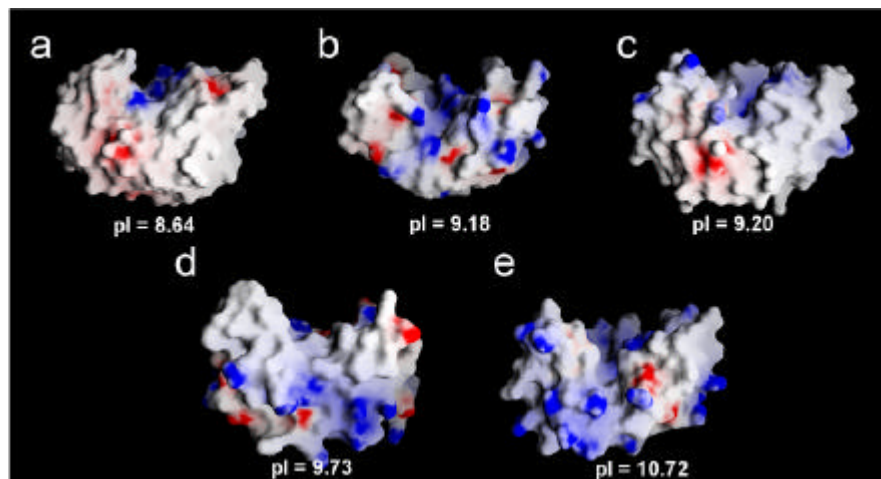


Figura 5.9. Superfícies de *Connolly* mostrant el potencial electrostàtic [de $-15 k_B T/e$ (vermell, per les càrregues negatives) a $+15 k_B T/e$ (blau, per les càrregues positives)] de la RNasa A (a), RNasa 4 (b), EDN (c), angiogenina (d) i ECP (e) al llarg de l'esletxa del centre actiu. L'ordenació de les superfícies representades s'atribueix al pI creixent d'aquestes proteïnes.

5.3. Discussió dels resultats dels articles II i III

5.3.1. Estructura global de la RNasa 1 Δ N7 en comparació amb la RNasa A

La RNasa A i la RNasa 1 són RNases de tipus secretor que presenten un 70 % de similitud de seqüència entre elles, així com una activitat ribonucleolítica comparable (Sorrentino & Libonati, 1997). Si bé la desviació quadràtica mitja (rmsd) dels àtoms C α després de superposar les seves estructures tridimensionals és de 1,08 Å, la qual cosa corrobora la semblança topològica global, la comparació de les estructures cristal·logràfiques de la RNasa A (Wlodaver *et al.*, 1988) i la RNasa 1 Δ N7 revelen algunes diferències. S'observa una conformació diferencial en dos llaços (16-23 i 66-70), amb variacions de fins a 6 Å entre els àtoms de les cadenes principals de residus topològicament equivalents.

El llaç 16-23 conté el lloc de tall per la subtilisina a la RNasa A, entre els residus Ala20 i Ser21, però el tractament de la RNasa 1 amb subtilisina no transforma la RNasa 1 en proteïna-S i pèptid-S (Pous *et al.*, 2001), comportament que també s'observa en d'altres RNases pancreàtiques com la de ratolí (Gupta *et al.*, 1999) i l'Ang (Harper & Vallee, 1988). La seqüència aminoacídica d'aquesta regió (residus 15-25) és bastant variable en aquestes RNases, com també en la RNasa 1 Δ N7, i alhora difereix de la RNasa A. A la RNasa 1 Δ N7, la cadena principal d'aquesta regió segueix un camí clarament diferent al de la RNasa A. La divergència comença al residu Asn16 de la RNasa 1 Δ N7 (la RNasa A té una serina en aquesta posició) i s'observa, a més, un desplaçament d'un residu entre ambdós proteïnes (RNasa 1 Δ N7 i RNasa A), amb una divergència de 4,50 Å entre els residus Ser17 (RNasa 1 Δ N7) i Ser18 (RNasa A). La cadena principal es torna a unir dos residus més amunt (18 i 19 segons la numeració de la RNasa 1 Δ N7) i es separen una altra vegada entre la Ser21 (RNasa 1 Δ N7) i la Ser22 (RNasa A), amb una divergència màxima de 6,20 Å. A partir de la Ser23 les dues cadenes

principals es tornen a superposar. Aquestes diferències podrien explicar el comportament diferencial dels dos enzims enfront de la subtilisina, ja que en el cas de la RNasa 1ΔN7 aquesta regió presenta impediments estèrics per interaccionar amb el centre actiu de la subtilisina.

El llaç L4 (residus 66-71) també mostra una conformació diferent, probablement deguda a la presència de dues glicines a les posicions 68 i 70 en comptes de la Gly68 que es troba a la RNasa A. Aquest llaç es troba entre dues cisteïnes (Cys65 i Cys72), que formen un pont disulfur que és conservat a la majoria de membres de la superfamília, excepte a l'Ang i les RNases de granota (Youle & D'Alessio, 1997). Mentre que els residus anteriors a la Cys65 i els posteriors a la Cys72 formen part de la cadena rígida de la molècula (backbone), els residus del llaç són molt flexibles. Les orientacions de les cadenes laterals de la Lys66, Asn67 i Gln69 no estan ben definides als mapes de densitat electrònica, la qual cosa reflecteix la seva mobilitat inherent. Aquest canvi conformacional era inesperat tant per l'àtom Asn71 Oδ com pel Gln69 Oε, ja que tots dos juguen un paper clau al centre actiu de la RNasa A establint ponts d'hidrogen amb l'adenina del substrat al lloc d'unió B₂ (Fontecilla-Camps *et al.*, 1994). A la RNasa 1ΔN7 aquests residus semblen adoptar conformacions que difereixen substancialment de les de la RNasa A i les seves cadenes laterals no estan directament dirigides cap al centre actiu de l'enzim. La cadena lateral de l'Asn71, clarament definida als mapes de densitat electrònica, està exposada a la superfície. Tanmateix, la variació de conformació observada en aquest llaç podria permetre la interacció de l'O carbonil del residu Gln69 amb l'adenina de B₂, de manera similar al paper jugat per l'Oε del residu Gln69 al complex RNasa A-d(ApTpApG) (Fontecilla-Camps *et al.*, 1994). Aquest canvi també podria explicar la baixa activitat ribonucleolítica de la RNasa 1ΔN7 vers dinucleòtids com CpA.

5.3.2. Topologia del centre actiu

La RNasa 1 Δ N7 presenta tots els residus característics del centre actiu, excepte la Lys7. Els principals residus del centre catalític (Gln11, His12, Lys41 i His119) ocupen posicions similars a les de la RNasa A, exceptuant la His119, que adopta la conformació inactiva descrita al complex RNasa A-3'-CMP (Zegers *et al.*, 1994). Amb la seva forma activa, s'estableix una interacció entre el nucleòtid i l'enzim via pont d'hidrogen entre l'O5' de l'anell de ribosa, ubicat a R₂, i el N δ 1 de la His119. La His119 de la RNasa 1 Δ N7, però, podria adoptar la conformació activa fàcilment per rotació dels angles de torsió χ_1 i χ_2 a fi d'interaccionar amb l'O5' de la ribosa (R₂) adjacent a l'enllaç que s'escindeix i participar així en la catàlisi, de manera similar a la descrita pel complex RNasa A-d(ApTpApG). El lloc d'unió p₂ està alterat per la pèrdua de la Lys7, la qual és responsable de la unió al grup fosfat de p₂ a l'estructura de la RNasa A-d(ApTpApG). El lloc B₂ també està alterat degut a la conformació diferencial de la proteïna al llaç que conté la Gln69 i l'Asn71. Per aquest motiu, la interacció de les cadenes laterals d'aquests dos residus amb l'adenina no sembla possible. Aquests canvis significatius trobats als llocs p₂ i B₂ de la RNasa 1 Δ N7 podrien explicar la baixa activitat ribonucleolítica d'aquest enzim en relació a la RNasa A i la RNasa 1 nativa. Proporcionalment, la RNasa 1 Δ N7 és molt menys activa enfront CpA (24 vegades menys que la RNasa 1) que vers l'RNA de llevat (nou vegades inferior que la RNasa 1) (Futami *et al.*, 1995) suggerint que la topologia diferencial de B₂ podria ser la responsable de la baixa activitat enfront dinucleòtids que contenen una adenina.

5.3.3. Comparació de la RNasa 1 Δ N7 amb el complex pRI-RNasa A

La RNasa 1 Δ N7 mostra una baixa afinitat per l'inhibidor de RNases d'origen humà (hRI o PRI), la qual cosa es relaciona amb la seva major citotoxicitat en comparació amb d'altres RNases (Futami *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 1999). Es requereixen tres vegades més PRI per observar un 50 % d'inhibició de la RNasa 1 Δ N7 enfront RNA de llevat si la comparem amb la RNasa 1. Per tal d'investigar quins residus podrien ser responsables de la baixa afinitat de l'enzim per l'inhibidor, s'han superposat l'estructura de la RNasa 1 Δ N7 amb la dels complexos pRI-RNasa A (Kobe & Deisenhofer, 1995) i hRI-Ang (Papageorgiou *et al.*, 1997; veure figura 5.10).

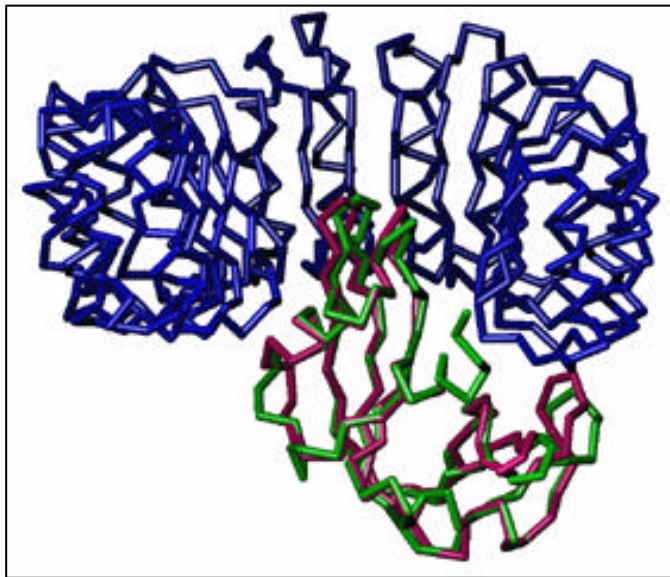


Figura 5.10. Superposició de les estructures tridimensionals de la RNasa 1 Δ N7 (en color rosat) i del complex pRI-RNasa A. La RNasa A es mostra de color verd, mentre que l'estructura de l'inhibidor es representa en color blau.

En ambdós estructures, l'RI s'uneix a les RNases de manera similar, establint contactes amb alguns residus del centre actiu, impedit estèricament l'accés del substrat al mateix i inhibint per tant, la seva activitat enzimàtica. Tanmateix, ambdós complexes mostraven diferències pel que fa als residus d'inhibidor que interaccionen amb el centre actiu o als altres llaços responsables de la unió. La interacció entre l'RI i els diferents membres de la superfamília de ribonucleases revela una elevada flexibilitat d'algunes regions de l'inhibidor, la qual cosa permet unir-se amb gran afinitat a cada membre de la família.

La superposició de la RNasa 1ΔN7 amb la RNasa A en el seu complex amb l'inhibidor porcí (Kobe & Deisenhofer, 1995) dona un valor de rmsd de 0,37 Å. La Lys7 és un dels residus que més contribueix a l'energia d'unió al complex pRI-RNasa A, concretament interacciona amb la Ser456 de l'inhibidor, però aquesta interacció no pot tenir lloc amb la RNasa 1ΔN7, degut a l'absència de la Lys7. D'altra banda, tampoc existeix cap altre residu suficientment proper a la Ser456 com per poder-hi interaccionar. Per tant, la pèrdua de la Lys7 és probablement la responsable de la baixa afinitat de la RNasa 1ΔN7 per el PRI. Al complex PRI-Ang s'estableix un contacte similar entre la His8 de l'Ang i la Ser360 de l'inhibidor, si bé en aquest cas la interacció no és tan forta com amb la RNasa A. D'altra banda, el llaç L4 (residus 66-71), també implicat en la unió de la RNasa A a l'inhibidor (regió Cys404-Tyr433) presenta una conformació diferent a la RNasa 1ΔN7. La majoria d'aminoàcids de L4 no poden establir els mateixos contactes que es formen amb la RNasa A. Malgrat això, la flexibilitat d'aquest llaç li permetria adaptar-se a l'àrea d'interacció amb l'inhibidor, la qual cosa no esdevé rellevant alhora d'explicar la baixa afinitat de la RNasa 1ΔN7.

Altres àrees d'interès, com el llaç L6 (residus 88-91), el llaç L2 (residus 34-39) o els aminoàcids del centre actiu de la RNasa 1ΔN7 no difereixen significativament

dels residus homòlegs de la RNasa A i probablement podrien establir interaccions similars amb l'inhibidor.

5.3.4. Possible estructura de la RNasa 1 glicosilada

La seqüenciació de les cadenes de carbohidrats de la RNasa 1 (veure resultats de l'article II, Peracaula *et al.*, 2003), juntament amb el coneixement de l'estructura 3D de la RNasa 1ΔN7 (veure resultats de l'article III, Pous *et al.*, 2001), van permetre el modelat de l'estructura glicosilada que es mostra a la figura 5.11.

El volum de les cadenes glucídiques és notable, i considerant la seva mobilitat (en base als estudis de dinàmica molecular amb la cadena de glúcids de la RNasa B; Dwek, 1996) es pot explicar la dificultat de reconeixement exhibida pels anticossos que es dirigeixen contra la part proteica de l'enzim. Examinant la predicció d'epítops per la RNasa 1 s'aprecien diferents regions antigèniques (figura 5.12). De tots, el fragment 100-104 és el que apareix més allunyat dels punts majoritàriament glicosilats (Asn34 i Asn76) i donat que el lloc de glucosilació de l'Asn88 és el que es mostra freqüentment menys glicosilat, aquests residus (100-104) podrien resultar de gran utilitat per a la producció d'un anticòs de captura per la RNasa 1.

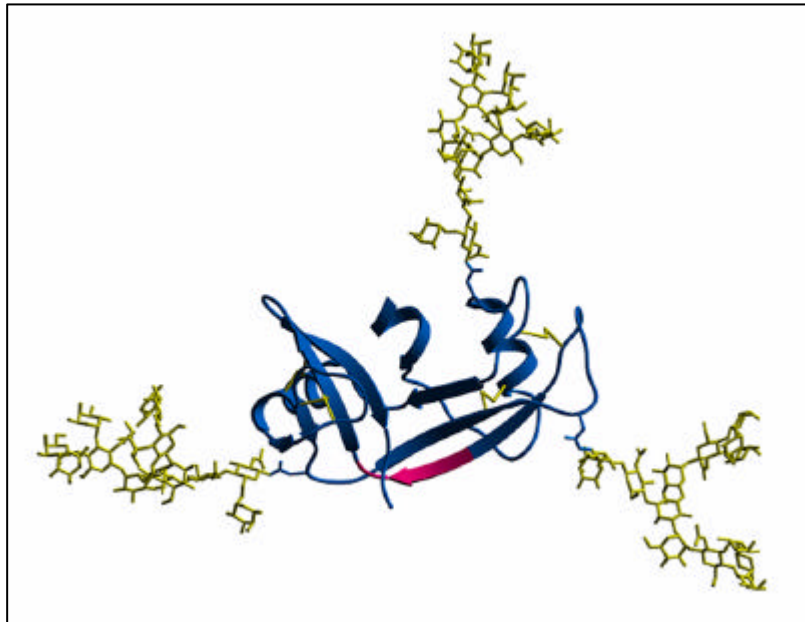


Figura 5.11. Modelat de les estructures glucídiques seqüenciades a partir de la RNasa 1 nativa, purificada de pàncreas i de les línies cel·lulars d'adenocarcinoma pancreàtic MDAPanc-3 i Capan-1, sobre l'estructura cristal·logràfica de la RNasa 1ΔN7. En color rosat s'assenyala la regió corresponent als residus 100-104 de la RNasa 1ΔN7. Figura realitzada amb el programa Render (Merrit & Bacon, 1997).

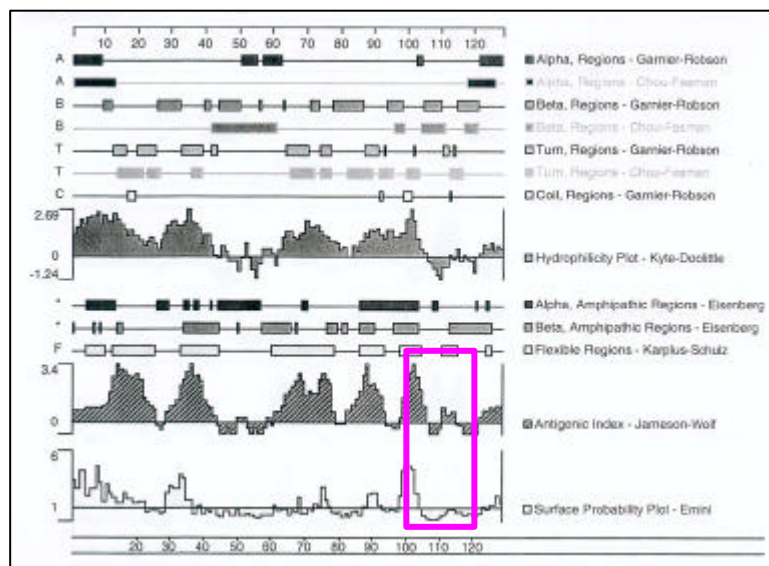


Figura 5.12. Predicció d'epítops per la RNasa 1. També s'ha marcat amb color rosat la fracció corresponent als residus 100-104.

CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

De la realització d'aquest treball es pot concloure:

1. L' ECP o RNasa 3 recombinant cristal·litza amb 8% de Jeffamina M-600, citrat sòdic pH 5,2 i 0,01M FeCl₃, seguint la simetria tetragonal i el grup espacial P4₃2₂.
La proteïna recombinant RNasa 1ΔN7 cristal·litza amb 7% de PEG 8K i 0,1 M Tris-HCl a pH 8,5, seguint la simetria ortoròmbica i el grup espacial P2₁2₁2₁.
2. S'han determinat les estructures tridimensionals de l'ECP o RNasa 3 i de la RNasa 1ΔN7 recombinants mitjançant el mètode del reemplaçament molecular i s'han afinat aquestes estructures fins a uns valors de R cristal·logràfics de 0,22 i 0,19 respectivament.
3. De l'anàlisi de l'estructura de l'ECP es conclou que:
 - 3.1. La proteïna exhibeix un plegament global característic de les RNases de la superfamília de la RNasa A.
 - 3.2. Les peculiaritats estructurals del centre actiu de l'enzim, especialment el deteriorament del lloc d'unió p₂B₂ i les conformacions dels residus His64 i Asn39, permeten explicar la baixa activitat de l'ECP com a endonucleasa.
 - 3.3. La disposició espacial de les arginines pot dificultar l'accés del substrat al centre catalític de l'enzim i, d'altra banda, potenciar el seu mecanisme citotòxic.

6. Conclusions

4. De l'anàlisi de l'estructura de la RNasa 1ΔN7 es conclou que:

- 4.1. El plegament de la proteïna també és comú al de les RNases d'estructura coneguda que pertanyen a la superfamília de la RNasa A.
- 4.2. La conformació particular del llaç L1 (residus 15-25) de la RNasa 1ΔN7 pot explicar el seu comportament diferencial enfront de la subtilisina. A diferència del que s'observa amb la RNasa A, el tractament de la RNasa 1ΔN7 amb subtilisina no rendeix en l'obtenció del pèptid-S (residus 1-20) unit a la proteïna-S (residus 21-124). Aquest comportament s'ha atribuït, precisament, a la conformació del llaç L1.
- 4.3. El canvi topològic que experimenta B₂, degut a la conformació del llaç 66-71 i a la pèrdua de la Lys7, permet explicar la baixa activitat de l'enzim vers dinucleòtids del tipus CpA.
- 4.4. De la comparació de l'enzim amb el complex pRI-RNasa A es desprèn que no hi ha cap residu capaç d'establir un contacte com el de la Lys7, la qual cosa s'ha relacionat amb la baixa afinitat de la RNasa 1ΔN7 per l'inhibidor i, per tant, amb el seu potencial citotòxic.

BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

- Acharya, K.R., Shapiro, R., Allen, S.C., Riordan, J.F. & Vallee, B.L. (1994). Crystal structure of human angiogenin reveals the structural basis for its functional divergence from ribonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2915-2919.
- Avey, H.P., Boles, M.O., Carlisle, C.H., Evans, S.A., Morris, S.J., Palmer, R.A., Woolhouse, B.A. & Shall, S. (1967). Structure of ribonuclease. *Nature*, **213**, 557-562.
- Bal, H.P. & 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.
- Barton, G.J. (1993). Alscript, a tool to format multiple sequence alignments. *Protein Engineering*, **6**, 37-40.
- Beintema, J.J. (1986). Evolutionary role of posttranslational modifications of proteins, as illustrated by the glycosylation characteristics of the digestive enzyme pancreatic ribonuclease. *J. Mol. Evol.* **24**, 118-120
- Beintema, J.J. (1987). Structure, properties and evolution of pancreatic-type ribonucleases. *Life Chem. Rep.* **4**, 333-389.
- Beintema, J.J., Blank, A., Schieven, G.L., Dekker, C.A., Sorrentino, S. & Libonati, M. (1988). Differences in glycosylation pattern of human secretory ribonucleases. *Biochem. J.* **255**, 501-505.
- Beintema, J.J., Breukelman, H.J., Carsana, A. & Furia, A. (1997). Evolution of vertebrate ribonucleases: Ribonuclease A superfamily. In *Ribonucleases: structures and functions*. (D'Alessio, G. & Riordan, J.F, eds.), pp. 245-269, Academic Press, New York.

7. Bibliografia

- Beintema, J.J. (1998). Introduction: the ribonuclease A superfamily. *CMLS, Cell. Mol. Life. Sci.* **54**, 763-765.
- Birsdall, D.L. & McPherson, A. (1992). Crystal structure disposition of thymidylic acid tetramer in complex with ribonuclease A. *J. Biol. Chem.* **267**, 22230-22236.
- Boix, E., Wu, Y., Vasandani, V.M., Saxena, S.K., Ardel, W., Ladner, J. & 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.
- Boix, E., Nikolovski, Z., Moiseyev, G.P., Rosenberg, H.F., Cuchillo, C.M. & Nogués, M.V. (1999). Kinetic and product distribution analysis of human eosinophil cationic protein indicates a subsite arrangement that favors exonuclease-type activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 15605-15614.
- Boix, E., Leonidas, D.D., Nikolovski, Z., Nogués, M.V., Cuchillo, C.M. & Acharya, K.R. (1999). Crystal structure of eosinophil cationic protein at 2.4 Å resolution. *Biochemistry*, **38**, 16794-16801.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**, 248-254.
- Brünger, A.T. (1998). Crystallography and NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. sect D*, **54**, 905-921.
- Canals, A., Pous, J., Guash, A., Benito, A., Ribo, M., Vilanova, M. & Coll, M. (2001). The structure of an engineered domain-swapped ribonuclease dimer and its implications for the evolution of proteins toward oligomerization. *Structure*, **9**, 967-976.

- CCP4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallog. Sect. D* **50**, 760-763.
- Chang, C., Newton, D.L., Rybak, S.M. & Wlodawer, A. (2002). Crystallographic and functional studies of a modified form of eosinophil-derived neurotoxin (EDN) with novel biological activities. *Journal of Molecular Biology*, **317**, 119-130.
- Cuchillo C.M., Moussaoui M., Barman T., Travers F. & Nogues M.V. (2002). The exo- or endonucleolytic preference of bovine pancreatic ribonuclease A depends on its subsites structure and on the substrate size. *Protein Sci.* **11(1)**, 117-28.
- D'Alessio, G. & Riordan, J. F. (1997). Ribonucleases: Structures and Functions. New York: academic Press.
- De Llorens, R. & Cuchillo, C.M. (1986). La ribonucleasa como marcador del cáncer de páncreas. *Neoplasia*, **3**, 80-87.
- Deming, M.S., Dyer, K.D., Bankier, A.T., Piper, M.B., Dear, P.H. & Rosenberg, H.F. (1998). Ribonuclease k6: Chromosomal Mapping and Divergent Rates Evolution within the RNase Gene Superfamily. *Genome Research*, **8**, 599-607.
- Di Donato, A., Cafaro, V. & D'Alessio, G. (1994). Ribonuclease A can be transformed into a dimeric ribonuclease with antitumor activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 17394-17396.
- Domachowske, J.B., Dyer, K.D., Adams, A.G., Leto, T.L. & Rosenberg, H.F. (1998). Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNase A-family ribonuclease with direct antiviral activity. *Nucleic Acids Research*, **26**, 3358-3363.
- Durack, D. T., Ackerman, S. J., Loegering, D. A. & Gleich, G. J. (1981). Purification of human eosinophil-derived neurotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **78**, 5165-5169.

7. Bibliografia

- Dwek, R.A. (1996). Glycobiology: toward understanding the function of sugars. *Chemical Reviews*. **96**(2), 683-720.
- Fernández-Salas, E., Peracaula, R., Frazier, M. L. & de Llorens, R. (2000). Ribonucleases expressed by human pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1484-1494.
- Fink, K., Adams, W.S. & Skoog, W.A. (1971). Serum ribonuclease in multiple myeloma. *Am. J. Med.* **50** (4), 450-457.
- Fontecilla-Camps, J.C., de Llorens, R., le Du, M.H. & Cuchillo, C.M. (1994). Crystal structure of ribonuclease A-d(ApTpApApG) complex. *J. Biol. Chem.* **269**, 21526-21531.
- Futami, J., Seno, M., Kosaka, M., Tada, H., Seno, S. & Yamada, Y. (1995). Recombinant human pancreatic ribonuclease produced in E. coli: importance of the amino-terminal sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 406-413.
- Futami, J., Tsushima, Y., Murato, Y., Tada, H., Sasaki, J., Seno, M. & Yamada, H. (1997). Tissue-specific expression of pancreatic-type RNases and RNase inhibitor in humans. *DNA Cell Biol.*, **16**, 413-419.
- Futami, J., Seno, M., Ueda, M., Tada, H. & Yamada, H. (1999). Inhibition of cell growth by a fused protein of human ribonuclease 1 and human basic fibroblast growth factor. *Protein Eng.* 1999 Nov;12(11):1013-9. *Protein Eng.*, **12**, 1013-1019.
- Gilliland, G. L. (1997). Crystallographic Studies of Ribonuclease Complexes. In *Ribonucleases: Structures and Functions*, edited by G. D'Alessio & J. F. Riordan. New York: Academic Press.
- Gleich, G.J., Loegering, D.A., Bell, M.P., Checkel, J.L., Ackerman, S.J. & McKean, D.J. (1986). Biochemical and functional similarities between human

- eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein: Homology with ribonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3146-3150.
- Gupta, V., Muyldermans, S., Wyns, L. & Salunke, D.M. (1999). The crystal structure of Recombinant Rat Pancreatic RNase A. *PROTEINS: Structure, Function and Genetics*, **35**, 1-12.
- Hakomori, S. (1996). Tumor malignancy defined by aberrant glycosilation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res.* **56 (23)**, 5309-5318.
- Hallahan, T.W., Shapiro, R., Vallee, B.L. (1991). Dual site model for the organogenic activity of angiogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88(6)**, 2222-2226.
- Harp, J.M., Timm, D.E. & Bunick, G.J. (1998). Macromolecular Crystal Annealing: Overcoming Increased Mosaicity. *Acta Cryst.* **D54**, 622-628.
- Harper, J.W., & Vallee, B.L. (1988). Conformational characterization of human angiogenin by limited proteolysis. *J. Protein Chem.* **7(4)**, 355-363.
- Harper, J.W., Auld, D.S., Riordan, J.F. & Vallee, B.L. (1988). Enzymatically active angiogenin/ribonuclease A hybrids formed by peptide interchange. *Biochemistry*, **27**, 219-226.
- Kannagi, R. (1997). Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. *Glycoconjugate Journal.* **14**, 577-584.
- Kartha, G., Bello, J. & Harker, D. (1967). Tertiary structure of ribonuclease. *Nature*, **213**, 862-865.
- Kemmer, T.P., Malfertheiner, P., Büchler, M., Kemmer, M.L. & Ditschuneit, H. (1991). Serum ribonuclease activity in the diagnosis of pancreatic disease. *Int. J. Pancreatol.* **8(1)**, 23-33.

7. Bibliografia

- Kim, J.S., & Raines, R. (1994). A misfolded but active dimer of bovine seminal ribonuclease. *Eur. J. Biochem.* **224**, 109-114.
- Kim, Y.J. & Varki, A. (1997). Perspectives on the significance of altered glycosilation of glycoproteins in cancer. *Glycoconjugates J.* **14**, 569-576.
- Kim, J.S., Soucek, J., Matousek, J. & Raines, R. (1995). Mechanism of ribonuclease cytotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, **270** (52), 31097-31102.
- Kobayashi, T., & Kawakubo, T. (1994). Prospective investigation of tumor markers and risk assessment in early cancer screening. *Cancer*, **73**, 1946-1953.
- Kobe, B. & Deisenhofer, J. (1993). Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *Nature.* **366(6457)**, 751-756.
- Kobe, B. & Deisenhofer, J. (1995). A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature (London)*, **374**, 183-186.
- Kobe, B. & Deisenhofer, J. (1996). Mechanism of Ribonuclease Inhibitor 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. & Wütrich, K. (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphics.* **14**, 51-55.
- Landré, J.B.P., Hewett, P.W., Olivot, J-M, Friedl, P., Ko, Y., Sachinidis, A. & Moehner, M. (2002). Human endothelial cells selectively express large amounts of pancreatic-type ribonuclease (RNase 1). *Journal of Cellular Biochemistry.* **86**, 540-552.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. & Thornton, J.M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallog.* **26**, 283-291.

- Lee, F.S., Auld, D.S. & Vallee, B.L. (1989). Tryptophan fluorescence as a probe of placental ribonuclease inhibitor binding to angiogenin. *Biochemistry*. **28**, 219-224.
- Leland, P.A., Schultz, L.W., Kim, B.M. & Raines, R.T. (1998). Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95 (18)**, 10407-10412.
- Leonidas, D.D., Boix, E., Prill, R., Suzuki, M., Turton, R., Minson, K., Swaminathan, G.J., Youle, R.J. & Acharya, K.R. (2001). Mapping the ribonucleolytic active site of eosinophil-derived neurotoxin (EDN). High resolution crystal structures of EDN complexes with adenylic nucleotide inhibitors. *J. Biol. Chem.* **276(18)**, 15009-15017.
- Leslie, A. (1991). *Crystallographic Computing V*, edited by D. Moras, A.D. Podjarny & J.C. Thierry, pp. 27-38. Oxford University Press.
- Maeda, T., Kitazoe, M., Tada, H., de Llorens, R., Salomon, D.S., Ueda, M., Yamada, H. & Seno, M. (2002). Growth inhibition of mammalian cells by eosinophil cationic protein. *Eur. J. Biochem.* **269**, 307-316.
- Mallorquí-Fernández G., Pous J., Peracaula R., Maeda T., Tada H., Yamada H., Seno M., de Llorens R., Gomis-Rüth F.X., Coll M. (2000). Three-dimensional crystal structure of human eosinophil cationic protein (RNase 3) at 1.75 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **300**, 1297-1310.
- Matthew, J.B. & Richard, F.M. (1982). Anion binding and pH-dependent electrostatic effects in ribonuclease. *Biochemistry* **21**, 4989-4999.
- Mazzarella, L., Capasso, S., Demasi, D., Di Lorenzo, G., Mattia, C.A. & Zagari, A. (1993). Bovine seminal ribonuclease: Structure at 1.9 Å resolution. *Acta Crystallographica D* **49**, 389-402.

7. Bibliografia

- Mel, V.S.J., Doscher, M.S., Martin, P.D. & Edwards, B.F.P. (1994). The occupancy of two distinct conformation by active-site histidine-119 in crystals of ribonuclease is modulated by pH. *FEBS Lett.* **349**, 155-160.
- Merritt, E.A. & Bacon, D.J. (1997). Raster 3D: photo-realistic molecular graphics. *Methods in Enzymology.* **277**, 505-524.
- Mohan, C.G., Boix, E., Evans, H.R., Nikolovski, Z., Nogues, M.V., Cuchillo, C.M., Acharya, K.R. (2002). The crystal structure of eosinophil cationic protein in complex with 2',5'-ADP at 2.0 Å resolution reveals the details of the ribonucleolytic active site. *Biochemistry*, **41**, 12100-12106.
- Mosimann, S.C., Ardelt, W., & James, M.N.G. (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.
- Mosimann, S.C., Newton, D.L., Youle, R.J. & James, M.N.G. (1996). X-ray crystallographic structure of recombinant eosinophil-derived neurotoxin at 1.83 Å Resolution. *J. Mol. Biol.*, **260**, 540-552.
- Murthy, B.S. & Sirdeshmurkh, R. (1992). Sensitivity of monomeric and dimeric forms of bovine seminal ribonuclease to human placental ribonuclease inhibitor. *Biochem. J.* **281**, 343-348.
- Navaza, J. (1994). AMoRe: An automated package for molecular replacement. *Acta Crystallog. Sec. A*, **50**, 157-163.
- Newton, D.L., Boque, L., Wlodawer, A., Huang, C.Y. & Rybak, S.M. (1998). Single amino acid substitutions at the N-terminus of a recombinant cytotoxic ribonuclease markedly influence biochemical and biological properties. *Biochemistry*. **137(15)**, 5173-83.
- Nicholls, A., Bharadwaj, R., Honig, B. (1993). GRASP: graphical representation and analysis of surface properties. *Biophys. J.*, **64**, A166-A166.

- Nogués, M.V., Vilanova, M. & 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.
- Orengo, C.A. & Thornton, J.M. (1993). Alpha plus beta folds revisited: Some favoured motifs. *Structure*, **1**, 105-120.
- Otwinowski, Z., & Minor, W. (1997). Processing X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307-326.
- Papageorgiou, A. C., Shapiro, R. & 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., Nogués, M.V., de Llorens, R. & Cuchillo, C.M. (1991). Structure and function of ribonuclease A binding subsites. *Essays in Biochemistry*, **26**, 89-103.
- Peracaula, R., Royle, L., Tabares, G., Mallorquí-Fernández, G., Barrabes, S., Harvey, D.J., Dwek, R.A., Rudd, P.M. & de Llorens, R. (2003). Glycosylation of human pancreatic ribonuclease: differences between normal and tumour states. *Glycobiology*, **13(1)**, 1-18.
- Piccoli, R., Tamburrini, M., Piccialli, G., Di Donato, A., Parente, A. & D'Alessio, G. (1992). The dual-mode quaternary structure of seminal RNase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 1870-1874.
- Piccoli, R., *et al.* (1999). A dimeric mutant of human pancreatic ribonuclease with selective cytotoxicity toward malignant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 7768-7773.
- Pous, J., Canals, A., Terzyan, S.S., Guasch, A., Benito, A., Ribo, M., Vilanova, M. & Coll, M. (2000). Three-dimensional structure of a human pancreatic

7. Bibliografia

ribonuclease variant, a step forward in the design of cytotoxic ribonucleases. *J. Mol. Biol.* **303**, 49-59.

Pous, J., Mallorquí-Fernández, G., Peracaula, R., Terzyan, S.S., Futami, J., Tada, H., Yamada, H., Seno, M., de Llorens, R., Gomis-Rüth, F.X. & Coll, M. (2001). Three-dimensional structure of human RNase 1ΔN7 at 1.9 Å resolution. *Acta Cryst.*, **D57**, 498-505.

Reddi, K.K. & Holland, J.F. (1976). Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73**, 2308-2310.

Ribó, M., Beintema, J. J., Osset, M., Fernández, E., Bravo, J., de Llorens, R. & Cuchillo, C. M. (1994). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **375**, 357-363.

Richards, F.M. & Wyckoff, H.W. (1971). Bovine pancreatic ribonuclease. In "The Enzymes" (P.D. Boyer, ed.), Vol.4, pp. 647-806. Academic Press, New York.

Roberts, G.C.K., Dennis, E.A., Meadows, D.H., Cohen, J.S. & Jardetzky, O. (1969). The mechanism of action of ribonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **62**, 1151-1158.

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

Rosenberg, H. F. & Dyer, K. D. (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, H. F. (1998). The eosinophil ribonucleases. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**, 795-803.

Rosenberg, H.F. & Dyer, K.D. (1997). Diversity among the primate eosinophil-derived neurotoxin genes: a specific carboxy-terminal sequence is necessary for enhanced ribonuclease activity. *Nucleic Acids Research*, **25**, 3532-3536.

- Roussel, A., & Cambilleau, C. (1989). TURBO-FRODO. *In Silicon Graphics Geometry Partners Directory*, pp. 77-79, Silicon Graphics, Mountain View, CA.
- Rybak, S.M. & Newton, D.L. (1999). Natural and engineered cytotoxic ribonucleases. Therapeutic potential *Experimental Cell Research*, **253**, 325-335.
- Schein, C.H. (1997). From housekeeper to microsurgeon: The diagnostic and therapeutic potential of ribonucleases. *Nature Biotech.* **17**, 529-436.
- Sierakowska, H & Shugar, D. (1977). Mammalian nucleolytic enzymes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **20**, 59-130.
- Singhal, A. & Hakomori, S. (1990). Molecular changes in carbohydrate antigens associated with cancer. *Bioessays.* **12(5)**, 223-30.
- Sorrentino, S. & Libonati, M. (1994). Human pancreatic-type and nonpancreatic-type ribonucleases: A direct side-by-side comparison of their catalytic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **312**, 340-348.
- Sorrentino, S. & Libonati, M. (1997). Structure-function relationships in human ribonucleases: main distinctive features of the major RNase types. *FEBS Lett.* **404**, 1-5.
- Strydom, D.J (1998). The angiogenins. *Cell. Mol. Life. Sci.* **54**, 811-824.
- Strydom, D.J., Fett, J.W., Lobb, R.R., Alderman, E.M., Bethune, J.L., Riordan, J.F. & Vallee, B.L. (1985). Amino acid sequence of human tumor derived angiogenin. *Biochemistry*, **24**, 5486-5494.
- Tabarés, G. (2000). Detecció de ribonucleasa en sèrums humans. Máster. Universitat de Girona.
- Terzyan, S. S., Peracaula, R., de Llorens, R., Tsushima, Y., Yamada, H., Seno, M., Gomis-Ruth, F. X. & Coll, M. (1998). The three-dimensional structure of

7. Bibliografia

- human RNase 4, unliganded and complexed with d(Up), reveals the basis for its uridine selectivity. *J. Mol. Biol.* **285**, 205-214.
- Titani, K., Takio, K., Kuwada, M., Nitta, K., Sakakibara, F., Kawauchi, H., Takayanagi, G. & Hakomori, S. (1987). Amino acid sequence of sialic acid binding lectin from frog (*Rana catesbeiana*) eggs. *Biochemistry*, **26**, 2189-2194.
- Trautwein, K., Holliger, P., Stackhouse, J. & Benner, S.A. (1991). Site-directed mutagenesis of bovine pancreatic ribonuclease: Lys41 and aspartate-121. *FEBS. Lett.* **281**, 275-277.
- Venge, P. & Byström, J. (1998). Molecules in focus: Eosinophil cationic protein (ECP). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **30**, 433-437.
- Vescia, S., Tramontano, D., Augusti-Tocco, G. & D'Alessio, G. (1980). In vitro studies on selective inhibition of tumor cell growth by seminal ribonuclease. *CancerRes.* **40(10)**, 3740-4.
- Warshaw, A.L. (1987). Lowering the level of uncertainty in late pancreatitis. *Gastroenterology*, **93(6)**, 1434-1437.
- Watanabe, Y., Ueda, M., Psarras, K., Ikeda, T., Enomoto, K., Kitajima, M., Futami, J. & Seno, M. (1999). *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **40**, No. 151.
- Wlodaver, A., Svensson, L.A., Sjolín, L. & Gilliland, G.L. (1988). Structure of phosphate-free ribonuclease A refined at 1.26Å. *Biochemistry*, **27**, 2705-2717.
- Wu, Y., Mikulski, S.M., Ardelt, W., Rybak, S.M. & Youle, R.J. (1993). A cytotoxic ribonuclease. Study of the mechanism of onconase cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **268**, 10686-10693.
- Yamashita, K., Hitoi, A., Irie, M. & 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.
- Youle, R.J. & D'Alessio, G. (1997). Antitumor RNases. In *Ribonucleases: structures and functions*. (D'Alessio, G. & Riordan, J.F, eds.), pp. 491-509, Academic Press, New York.
- Young, J. D., Peterson, C. G., Venge, P. & Cohn, Z. A. (1986). Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature*, **321**, 613-616.
- Zegers, I., Maes, D., Dao-Thi, M.H., Poortmans, F., Palmer, R. & Wyns, L. (1994). The structure of RNase A complexed with 3'-CMP and d(CpA): active site conformation and conserved water molecules. *Protein Sci.*, **3**, 2322-2339.
- Zhang, J., Dyer, K.D. & Rosenberg, H.F. (2002). RNase 8, a novel RNase A superfamily ribonuclease expressed uniquely in placenta. *Nucleic Acids Research*. **30(5)**, 1169-1175.
- Zhang, J., Dyer, K.D. & Rosenberg, H.F. (2003). Human RNase 7: a new cationic ribonuclease of the RNase A superfamily. *Nucleic Acids Research*. **31(2)**, 602-607
- Zhou, H.M. & Strydom, D.J. (1993). The amino acid sequence of human ribonuclease 4, a highly conserved ribonuclease that cleaves specifically on the 3' side of uridine. *Eur J Biochem.*, **217(1)**, 401-10.