

**CAPÍTOL 4**  
(pàgines: 71-92)

**Surface exposed amino acids of eosinophil cationic protein play a key role on the inhibition of mammalian cells proliferation**

Esther Carreras<sup>1</sup>, Ester Boix<sup>1</sup>, Susanna Navarro<sup>1</sup>, Helene F. Rosenberg <sup>2</sup>, Claudi M. Cuchillo<sup>1</sup>, and M. Victoria Nogués<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Spain and <sup>2</sup>Laboratory of Host Defenses, NIAID, National Institute of Health, Bethesda, Maryland 20892, USA

\*Author for correspondence.

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Facultat de Ciències

Universitat Autònoma de Barcelona

08193-Bellaterra. Spain

E-mail: victoria.nogues@uab.es Phone: 34-93-5811256 Fax: 34-93-5811264

Key words: eosinophils, cytotoxicity, ribonuclease, eosinophil cationic protein, cell proliferation inhibition

## **Abstract**

Eosinophil cationic protein (ECP) is a ribonuclease secreted from activated eosinophils that may cause tissue injury as a result of eosinophilic inflammation. ECP possesses bactericidal, antiviral and helminthotoxic activity and inhibits mammalian cell growth. The mechanism by which ECP exerts its toxicity is not known but it has been related to the ability of the protein to destabilize lipid bilayers. We have assessed the involvement of some cationic and aromatic surface exposed residues of ECP in the inhibition of proliferation of mammalian cell lines. We have constructed ECP mutants for the selected residues and assayed their ability to prevent cell growth. W10 and W35 together with the adjacent stacking residue are critical for the damaging effect of ECP on mammalian cell lines. These residues are also crucial for the membrane disruption activity of ECP. Other exposed aromatic residues packed against arginines (R75F76 and R121Y122) and specific cationic amino acids (R101 and R104) of ECP play a secondary role in the cell growth inhibition. This may be related to the ability of the protein to bind carbohydrates such as those found on the surface of mammalian cells.

## **1. Introduction**

Eosinophil cationic protein (ECP) is a small cationic protein (pI  $\approx$ 10.8) contained in the secondary granules of human eosinophils [1]. Eosinophils release their granule content as a result of activation by many stimuli such as complement and immunoglobulins [reviewed in 2]. ECP is a single polipeptide with a molecular mass of 15.5 kDa but glycosylated forms with Mr values ranging from 16 to 21 kDa have also been purified from eosinophils. The amino acid sequence [3] and three dimensional structure show that ECP belongs to the pancreatic-type RNase family [4]. However, its ribonucleolytic activity is low [5 and 6] and does not appear to be related to many of its biological properties. ECP levels in body fluids is currently used as a marker of eosinophil activity and turnover, with high counts of ECP being associated with the pathogenesis of many inflammatory diseases [reviewed in 7]. Extracellular deposits of ECP are found in tissues undergoing eosinophilic inflammation and correlate well with tissue damage [8, 9, 10, and 11]. Intraventricular injection of ECP in guinea pig brains induce the destruction of the surrounding nervous tissue producing a characterized syndrome known as the Gordon phenomenon [12]. ECP besides its detrimental effects on host tissue can also act as a host defense protein due to its bactericidal [13], helminthotoxic [14, 15 and 16] and antiviral activities [17]. A growth inhibitory effect by ECP on lymphocyte and mammalian cell lines has also been described [18, 19 and 20] .

Interestingly, the other RNase of eosinophils, eosinophil-derived neurotoxin (EDN), which shares 67 % amino acid identity with ECP, has 50 - 100 times more enzymatic activity [21 and 22] but less drastic biological properties than ECP.

The molecular basis of the ECP effect on eukaryotic cells remain unknown; ECP cytotoxicity has been related to the high number of Arg residues on the molecular surface that allows the protein to interact with negatively charged target molecules on

the cell membrane and with destabilization of the phospholipid bilayer [13, 23 and 24]. Two Trp residues have also been related with the pathogenic activity of ECP [20 and 24]. It is still unclear whether cell death is the direct result of membrane disturbance produced by ECP or if the ribonucleolytic activity of the enzyme is also a necessary factor. Although the RNase activity is required for ECP to be neurotoxic [25] and to reduce viral infectivity [17] the cytosolic RNase inhibitor does not abolish the toxicity of ECP for *Trypanosoma cruzi* [15] and a mutagenesis constructed variant of ECP with no RNase activity keeps its toxicity to bacteria [26]

The present study evaluates the contribution of specific basic and aromatic amino acid residues located on the protein surface (W10K-, W35A/R36A-, R75A/F76A- and R101A/R104A-ECP) and at the loop D115-Y122 on the ECP effect on mammalian cell viability (Figure 1). The loop region 115-122 is absent in RNases A, 1, 4 and 5 and it is in this region where more differences of sequence and structure between ECP and EDN are found. These mutants had been previously selected to analyse the bactericidal and membrane-lytic activities of ECP [24]. To assess the role of specific amino acids we have selected two mammalian cell lines: HL-60 cells (human acute promyelocytic leukaemia cell line) that grow in suspension and show a strong growth inhibition by ECP [20] and HeLa cells (human cervix adenocarcinoma cell line) that grows adhered. The effect of ECP mutant forms has been compared to those obtained with wild type recombinant ECP (rECP).

## **2. Materials and Methods**

### *Site-directed mutagenesis, expression and purification of ECP variants*

A human ECP synthetic gene was used to obtain rECP and the mutants [6]. Mutants were constructed using either standard PCR techniques or Quick Change Site-Directed

Mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) following the procedure described by Carreras et al. (2003) [24]. The recombinant proteins were expressed in *E.coli* BL21(DE3) strain (Novagen, Madison, WI) using the pET11c expression vector and were purified from inclusion bodies as described previously [6]. The homogeneity of the purified proteins which contain an additional formyl-methionine residue at the N-terminus was checked with 15% SDS-PAGE and Coomassie Blue staining and by MALDI-TOF mass spectrometry.

#### *Cell growth assay*

Human acute promyelocytic leukemia cell line HL-60 and cervix HeLa adenocarcinoma cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (USA). HeLa cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) (Vitacell, USA) and HL-60 cells were maintained in RPMI 1640 medium (Vitacell, USA) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5 % CO<sub>2</sub>. Both media were supplemented with 10 % heat inactivated fetal calf serum, 2500 units/mL penicillin and 2.5 mg/mL streptomycin. The effect of rECP and the mutants on the growth of cells was determined by a colorimetric assay using the Cell Proliferation kit I (MTT) (Roche, USA). 3,000 to 10,000 cells/well were plated in 96-well dishes (Orange Scientific, Belgium) and incubated overnight at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. The effect of rECP and variants on the cell growth was assayed treating the cells with protein concentrations ranging from 0.1 μM to 125 μM. Protein samples were diluted in PBS and filtered (0.2 μm filters, Orange Scientific). Negative controls of cell growth were carried out adding the same volume of PBS in media without protein and positive controls by addition of 0.1 % (v/v) Triton in PBS. The effect of RNase A to the culture under identical conditions was also assayed as a negative control. Six days after treatment, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) was added following the working instructions supplied

by Roche, and cell growth was monitored by measuring the difference in absorbance between 540 nm and 690 nm. In each set of assays, analyses were carried out in duplicate or triplicate.

#### *Cell viability*

The effect of rECP and variants on the cell viability was assessed by the trypan blue exclusion test. 0.5% (w/v) of trypan blue in water was added to cells cultured for six days under the conditions described in the cell growth assay. Viable and non-viable cells were counted with a hemocytometer. Cell morphology changes associated to the effect of rECP with respect to control cells were observed with a phase-contrast inverted microscope (Olympus IX70).

#### *Data analysis*

IC<sub>50</sub> (protein concentration required for 50% growth inhibition) for ECP and mutants was calculated using the Grafit 5.0 program. Data were expressed as the mean  $\pm$  SE of duplicate assays. The Student's test was used to estimate the significance of the values determined for mutants with respect to those of rECP. A *p* value  $< 0.01$  was considered statistically significant. Wilcoxon matched pairs signed ranks test was used to compare the effect on the cell growth between a mutant and rECP when the initial cell numbers were different.

### **3. Results and Discussion**

#### *Effect of rECP on mammalian cell lines*

ECP has toxic effects on different mammalian cell types. This capacity was first described from the strong correlation between the ECP release from eosinophils associated to eosinophil inflammatory condition and tissue necrosis in different organs [10]. ECP dose-related damage was observed in tracheal epithelium [11] and ECP also

inhibits in a dose-dependent manner the proliferation of human plasma cell lines related to the immunoglobulin production inhibition [18 and 19]. Recently, the ECP effect has also been studied in different mammalian cell lines and an inhibitory growth effect dependent on cell line was observed [20]. To study ECP inhibitory effect on eukaryotic cell growth we have selected two mammalian cell lines, HL-60 and HeLa cells that grow in suspension and adhered, respectively.

The effect of rECP on HL-60 cell cultures was checked by means of the trypan blue exclusion test using protein concentrations up to 20  $\mu\text{M}$  (Figure 2 A). The decrease in the number of alive cells is dependent on the rECP concentration. The number of dead cells, even though it can be underestimated as dead cells may have disappeared by the time the measure is made, only shows a slight increase with protein concentration. These profiles suggest that rECP has a cytostatic effect on HL-60 cells. The same effect was described by Maeda et al., 2002 [20] using K562 and A431 cell lines. Nevertheless, we have to consider the presence of a non negligible cytotoxic effect at high protein concentration. This cytotoxic effect is observed when the morphology of the cells treated with 20  $\mu\text{M}$  of rECP is compared to that of the control cells (Figure 2 B) and when it is found that the number of alive cells after treatment with 20  $\mu\text{M}$  of ECP is lower than the initial cell number. The growth inhibitory effect of rECP was determined for HL-60 and HeLa cells using the MTT assay. rECP shows an  $\text{IC}_{50}$  value (concentration that produces 50% inhibition) of  $\sim 5 \mu\text{M}$  for HL-60 cells (Figure 3 and Table I) and  $\sim 10 \mu\text{M}$  for HeLa cells (data not shown). These results indicate a slight difference in the growth inhibitory activity of rECP depending on whether the cells grow either in suspension or adhered. No detectable effect was observed for RNase A under the same conditions.



### *Effect of ECP mutants on the mammalian cell growth*

In order to identify the key residues involved in the growth inhibitory effect of ECP we have tested ECP mutants with substitutions at specific basic or aromatic residues located on the protein surface (W10K-, W35A/R36A-, R75A/F76A- and R101A/R104A-ECP) and at the loop D115-Y122 (Figure 1). This loop is a large insertion (with respect to RNase A) specific for ECP, EDN and RNases 6, 7 and 8. The mutants in this latter region corresponded to the deletion of the whole sequence (( $\Delta$ 115-122)-ECP mutant), the substitution of ECP specific amino acids for the corresponding EDN residues ((115-122 EDN)-ECP mutant) and changes in specific amino acids (R121A- and R121A/Y122A-ECP mutants), respectively. In all cases the selected amino acid substitutions do not alter the protein overall structure nor its RNase activity [24]. Maintenance of the RNase activity in all mutants eliminates any relationship between the changes observed on cell growth and enzymatic activity.

Figure 3 shows the effect of different protein concentrations of rECP and mutants on the cell growth of HL-60 cells. The  $IC_{50}$  value was determined for each variant and the results are summarized in Table I. The statistical significance for the  $IC_{50}$  value differences of mutants in comparison to rECP is very high ( $p < 0.002$ ) for W35A/R36A- and W10K-ECP and high ( $p < 0.01$ ) for R101A/R104A-, R75A/F76A-, R121A/Y122A- and  $\Delta$ 115-122-ECP. In all cases the observed changes in the growth inhibitory activity for each mutant were maintained in assays with different number of initial cells (Wicoxon  $p < 0.05$ ).

The interaction of a protein at the cell surface is a key step in the appearance of a pathogenic activity. This process has also been studied with other members of the pancreatic-type RNase family such as bovine seminal RNase (BS-RNase) and frog RNases. BS-RNase is a dimeric protein, selectively cytotoxic for malignant cells (28),

that binds to the cell surface of mammalian cells and can destabilize negatively charged membranes, in the same way as it is observed for ECP [24]. The results on the cellular growth inhibitory activity of rECP and mutants have been compared to the study on their membrane-lytic and bactericidal activity [24]. For ECP, the Pearson coefficient between  $IC_{50}$  value and the membrane-lytic activity (Table I) shows a quite high negative correlation ( $\rho = -0.84$ ); these results might mean that the growth inhibition of ECP on mammalian cells is mainly due to its membrane-lytic activity. The Pearson coefficient has been also determined between the ECP bactericidal activity against *E. coli* and *S. aureus* strains and the membrane-lytic activity (Table I) and a moderate ( $\rho = -0.81$ ) and low ( $\rho = -0.57$ ) correlation values were obtained, respectively. This difference might be due to a particular binding or other specific effect on the surface of the bacteria cell, depending on whether it is a Gram-positive or Gram-negative species. A study on the cationization of RNase A and human RNase 1 has concluded that the increase in the protein net charge facilitates their cellular uptake [29]. However, our results indicate that specific basic amino acids on the ECP protein surface might play different roles, as the abolition of some positive charges gives rise to variable increases for the corresponding  $IC_{50}$  values and in some cases such as that of the R121A-mutant this effect is not even observed.

The  $IC_{50}$  values for the modified forms of ECP (Table I) show that the region Trp35-Arg36 (Figure 4A) followed by that of Trp10 (Figure 4B) have a critical implication in the inhibition of HL-60 cells proliferation. These results correlate well with the involvement of these regions in the membrane disruption properties of ECP (Table I). Besides, the affinity of ECP for heparin, a negatively charged glycosaminoglycan found on the surface of some mammalian cells, is partly dependent on its Trp residues [20]. The Trp35-Arg36 region is also necessary for the bactericidal activity of ECP on both

gram positive and gram negative bacteria [24 and Table I]. Thus, it seems reasonable to state that the regions where the two Trp of the molecule are localized, specially the Trp35 region, are critical for the ECP cytostatic and/or cytotoxic properties on cells. The effect would be due to the disruption of the cell membrane.

In the ECP molecule we can find other surface exposed aromatic residues close to the side chain of contiguous Arg residues, which have also been analyzed by mutagenesis (Figure 1). This is the case of regions Arg75-Phe76 (Figure 4C) and Arg121-Tyr122 (Figure 4E) that show a slight contribution to the membrane-lytic activity of ECP and play a secondary role in the ECP's inhibitory growth effect (Table I). The involvement of these exposed aromatic residues which do not participate in the membrane-lytic activity of ECP (Phe76 and Tyr122) on cell growth inhibition might be explained from the results reported for the recognition of membrane carbohydrates by legume lectins (*Phytolacca americana*). In this case stacking interactions between hydrophobic residues (Phe, Tyr, Trp or Leu) of the lectin and the pyranose ring of N-acetylglucosamine from the carbohydrates are critical for stabilizing the interaction between the protein and the sugar [30]. The involvement of the loop 115-122, specific for ECP, has also been analyzed. Substitution by the corresponding EDN sequence does not reduce the ECP's cellular growth inhibitory properties. The effect of the deletion of the region 115-122 (( $\Delta$ 115-122)-ECP mutant) (Figure 4 F) might be mainly related to the involvement of residue Tyr122 (Table I).

#### *Structural analysis*

The exposed surface residues here studied are unique to ECP in the pancreatic-type RNase family and were identified as key residues considering the ECP and EDN evolutionary divergence [26 and 31]. While the combination Trp-Arg is unique for ECP in this protein family, it is a common feature in many cytotoxic peptides [32]. Stacking

interactions with the side chain of Arg36 (Figure 4A) maintain the orientation of the aromatic ring of Trp35 in the tertiary structure of ECP. A synergistic effect between both residues (Trp35 and Arg36) could explain their critical contribution to the disrupting properties on the cell membrane (Table I). The positive charge of Arg can interact electrostatically with the negative charges on the cell surface. Besides, the bulky hydrophobic part of the side chain of Arg can orientate Trp in the correct geometry to interact with phospholipid or carbohydrate ligands present in the membrane. On the other hand, the affinity of ECP for heparin, a negatively charged glycosaminoglycan found on the surface of mammalian cells, is partly dependent on its Trp residues [20]. The presence of structures with bulky or hydrophobic side-chains, such as Arg or Lys, concentrated around aromatic residues have also been described in the carbohydrate-binding site of lectins from pokeweed (*Phytolacca americana*) [30].

The cationic residues Arg101 and Arg104 (Figure 4D) have a complementary role in both membrane-lytic activity and growth inhibitory activity. These two cationic residues could bind by electrostatically to either negatively charged phospholipid or negatively charged carbohydrates, or both. In this context, positively charged residues of lectins are known to establish electrostatic interactions with negatively charged carbohydrates. Just to mention an example, six arginine residues of the lectin endostatin participate in the binding to heparin [33]. Increasing the net positive charge of sialic acid-binding lectins increases both its internalization and anti-tumor action [34].

In summary, the two Trp residues in the ECP molecule can bind both phospholipids and carbohydrates on the cell surface and this mediate the protein uptake by the cell. Exposed cationic residues such as Arg101 and Arg104 can establish electrostatic interactions and bind negatively charged molecules on the surface of cell (anionic phospholipid and sugars). The exposed aromatic residues, which do not participate in

the membrane lytic activity of ECP (Phe76 and Tyr122), could promote stacking contacts with carbohydrates. Our results also indicate that the RNase activity only is not enough to justify the ECP toxicity against eukaryotic cells, as mutants with impaired cellular growth inhibitor activity keep their RNase activity.

### **Acknowledgements**

This work was supported by Grants 2000SGR-00064 and 2001SGR-00196 from the Direcció General de Recerca of the Generalitat de Catalunya and BMC2000-0138-C02-01 and BMC2003-08485-C02-01 from the Dirección General de Investigación of the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain). Esther Carreras was a recipient of a predoctoral fellowship from Universitat Autònoma de Barcelona and Susanna Navarro from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain).

### **References**

- [1] M.S. Peters, M. Rodriguez, G.J. Gleich, Localization of human eosinophil granule major basic protein, eosinophil cationic protein, and eosinophil-derived neurotoxin by immunoelectron microscopy, *Lab Invest.* 54 (1986) 656-662.
- [2] M.A Giembycz, M.A Lindsay Pharmacology of the eosinophil, *Pharmacol Rev.* 51 (1999) 213-339
- [3] R L. Barker, D.A. Loegering, R.M. Ten, K.J. Hamann, L.R. Pease, G.J. Gleich, Eosinophil cationic protein cDNA. Comparison with other toxic cationic proteins and ribonucleases, *J Immunol.* 143 (1989) 952-955
- [4] E. Boix, D.D. Leonidas, Z. Nikolovski, M.V. Nogués, C.M Cuchillo. K.R Acharya, Crystal structure of eosinophil cationic protein at 2.4 Å resolution, *Biochemistry* 38 (1999) 16794-16801

- [5] S. Sorrentino, D.G. Glitz, Ribonuclease activity and substrate preference of human eosinophil cationic protein (ECP), *FEBS Lett* 288 (1991) 23-26
- [6] E. Boix, Z. Nikolovski, G. P. Moiseyev, H. F. Rosenberg, C. M. Cuchillo, M. V. Nogués, Kinetic and product distribution analysis of human eosinophil cationic protein indicates a subsite arrangement that favors exonuclease-type activity *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 15605-15614
- [7] P. Venge, J. Byström, M. Carlson, L. Håkansson, M. Karawacjzyk, C. Peterson, L. Sevés, A. Trulsson Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease *Clin Exp Allergy* 29 (1999)1172-1186
- [8] P.C. Tai, D.J. Hayes, J.B. Clark, C.J.F. Spry, *Biochem J.* 204 (1982) 75-80
- [9] P.C. Tai, S.J. Ackerman, C.J.F. Spry, S. Dunnette, E.G.J. Olsen, G.J. Gleich Toxic effects of human eosinophil products on isolated rat heart cells in vitro *The Lancet* 21 (1987) 643-647
- [10] K. Fredens, H. Dybdahl, R. Dahl, U. Baandrup, Extracellular deposit of the cationic proteins ECP and EPX in tissue infiltrations of eosinophils related to tissue damage, *APMIS* 96 (1988) 711-719
- [11] S. Motojima, E. Frigas, D.A. Loegering, G.J. Gleich, Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium in vitro, *Am Rev Respir Dis* 139 (1989) 801-805
- [12] K. Fredens, R. Dahl, P. Venge, The Gordon phenomenon induced by the eosinophil cationic protein and eosinophil protein X *J Allergy Clin Immunol* 70 (1982) 361-366
- [13] R. I. Lehrer, D. Szklarek, A. Barton, T. Ganz, K. J. Hamann, G. J. Gleich Antibacterial properties of eosinophil major basic protein and eosinophil cationic protein *J Immunol* 142 (1989) 4428-4434

- [14] D. J. McLaren, C. G. B. Peterson, P. Venge, *Schistosoma mansoni*: further studies of the interaction between schistosomula and granulocyte-derived cationic proteins in vitro *Parasitology* 88 (1984) 491-503
- [15] H. A. Molina, F. Kierszenbaum, K.J. Hamann, G.J. Gleich, Toxic effects produced or mediated by human eosinophil granule components on *Trypanosoma cruzi* *Am J Trop Med Hyg* 38 (1988) 327-384
- [16] K. J. Hamann, G. J. Gleich, J. L. Checkel, D. A. Loegering, J. W. McCall, R. L. Barker, In vitro killing of microfilariae of *Brugia pahangi* and *Brugia malayi* by eosinophil granule proteins *J Immunol.* 144 (1990) 3166-3173
- [17] J. B. Domachowske, K. D. Dyer, A. G. Adams, T. L. Leto, H. F. Rosenberg, Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNase A-family ribonuclease with direct antiviral activity, *Nucleic Acid Res* 24 (1998) 3507-3513
- [18] C.G.B. Peterson, V. Skoog, P. Venge, Human eosinophil cationic proteins (ECP and EPX) and their suppressive effects on lymphocyte proliferation *Immunobiol.* 171 (1986) 1-13
- [19] H. Kimata, A. Yoshida, C. Ishioka, Y. Jiang, H. Mikawa, Eosinophil cationic protein inhibits immunoglobulin production and proliferation in vitro in human plasma cells *Cell Immunol* 141 (1992) 422-432
- [20] T. Maeda, M. Kitazoe, H. Tada, R. Llorens, D.S. Salomon, M. Ueda, H. Yamada, M. Seno, Growth inhibition of mammalian cells by eosinophil cationic protein *Eur J Biochem.* 269 (2002) 307-316
- [21] N.R. Slifman, D.A. Loegering, D.J. McKean, G.J. Gleich, Ribonuclease activity associated with human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein *J Immunol.* 137 (1986) 2913-2917

- [22] U. Gullberg, B. Widegren, U. Arnason, A. Egesten, I. Olsson, The cytotoxic eosinophil cationic protein (ECP) has ribonuclease activity *Biochem Biophys Res Commun.* 139 (1986) 1239-1242
- [23] J.D. Young, C.G. Peterson, P. Venge, Z.A. Cohn, Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein *Nature.* 321 (1986) 613-616
- [24] E. Carreras, E. Boix, H.F. Rosenberg, C.M. Cuchillo, M.V. Nogués, Both aromatic and cationic residues contribute to the membrane-lytic and bactericidal activity of eosinophil cationic protein *Biochemistry.* 42 (2003) 6636-6644
- [25] S. Sorrentino, D.G. Glitz, K.J. Hamann, D.A. Loegering, J.L. Checkel, G. J. Gleich, Eosinophil-derived neurotoxin and human liver ribonuclease. Identity of structure and linkage of neurotoxicity to nuclease activity *J Biol Chem.* 267 (1992) 14859-14865.
- [26] H.F. Rosenberg, Recombinant human eosinophil cationic protein. Ribonuclease activity is not essential for cytotoxicity, *J Biol Chem* 270 (1995) 7876-7881
- [27] P. J. Kraulis, *J. Appl. Crystallogr.* 24 (1991) 946-950
- [28] P. Laccetti, G. Portella, M.R. Mastronicola., A. Russo, R. Piccoli, G. D'Alessio, G. Vecchio, In vivo and in vitro growth-inhibitory effect of bovine seminal ribonuclease on a system of rat thyroid epithelial transformed cells and tumors *Cancer Res.* 52 (1992) 4582-4586.
- [29] J. Futami, T. Maeda, M. Kitazoe, E. Nukui, H. Tada, M. Seno, M. Kosaka, H. Yamada, Preparation of potent cytotoxic ribonucleases by cationization: enhanced cellular uptake and decreased interaction with ribonuclease inhibitor by chemical modification of carboxyl groups, *Biochemistry.* 40 (2001) 7518-7524



- [30] M. Hayashida, T. Fujii, M. Hamasu, M. Ishiguro, Y. Hata, Similarity between protein-protein and protein-carbohydrate interactions, revealed by two crystal structures of lectins from the roots of pokeweed *J Mol Biol.* 334 (2003) 551-565
- [31] J. Zhang, H.F. Rosenberg, Complementary advantageous substitutions in the evolution of an antiviral RNase of higher primates, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 (2002) 5486-5491
- [32] L. Zhang, A. Rozek, R.E. Hancock, Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes, *J Biol Chem.* 276 (2001) 35714-35722
- [33] S. Ricard-Blum, O. Feraud, H. Lortat-Jacob, A. Rencurosi, N. Fukai, F. Dkhissi, , D. Vittet, A. Imberty, B.R. Olsen, M. Van Der Rest, Characterization of endostatin binding to heparin and heparan sulfate by surface plasmon resonance and molecular modeling: role of divalent cations *J Biol Chem.* 279 (2004) 2927-2936
- [34] Y. Ogawa, M. Iwama, K. Ohgi, T. Tsuji, M. Irie, T. Itagaki, H. Kobayashi, N. Inokuchi, Effect of replacing the aspartic acid/glutamic acid residues of bullfrog sialic acid binding lectin with asparagine/glutamine and arginine on the inhibition of cell proliferation in murine leukemia P388 cells, *Biol Pharm Bull.* 25 (2002) 722-727.

## Figure legends

Figure 1. Representation of three-dimensional structure of ECP (1QMT.pdb) obtained by X-ray crystallography showing the position of the mutated residues. The figure was drawn with MOLSCRIPT program [28].

Figure 2. Effect of rECP on HL-60 cultured cells. A. Cells were treated with different rECP concentrations ranging from 0 to 20  $\mu\text{M}$ . In this assay  $3 \times 10^3$  initial cells /well were used. On day 6 of incubation viable and non-viable cell numbers were counted by trypan blue exclusion ( $\bullet$  alive and  $\circ$  dead cells). B. Effect of rECP on the morphology of HL-60 cells. Control cell culture (B.1) and cell culture containing 20  $\mu\text{M}$  rECP (B.2) were observed after 6 days. Original magnifications are x 40.

Figure 3. Effect of rECP and mutants on the cell growth of HL-60 cells determined by MTT assay (Roche). For each ECP mutant different protein concentrations ranging from 0.1  $\mu\text{M}$  to 125  $\mu\text{M}$  were assayed and in each case the effect was expressed as the percentage of viable cells respect to the control. In this set of experiments 3,000 cells/well were plated. Experimental values were adjusted using Grafit 5.0 program. In each figure (A, B and C) the effect of rECP is presented as reference and the ECP variants are indicated at the right.

Figure 4. Detailed pictures of the ECP structure at the selected studied regions. The figures were drawn using PyMol, DeLano Scientific©. Dashed lines indicate hydrogen bonds;  $\alpha$ -helices are coloured in red and  $\beta$ -sheets are coloured in cyan. Neighbour residues to the mutated amino acids are labelled and shown in sticks.

**Table I: IC<sub>50</sub> values for HL60-cells and comparison of the effect on bacterial survival and membrane-lytic activities of ECP and its mutants**

Protein	IC <sub>50</sub> (μM) HL60-cells <sup>a</sup>	Fold increase in bacterial survival due to the effect of the mutations <sup>b</sup>		Membrane-lytic activity
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	% Leakage on liposome vesicles <sup>c</sup>
rECP	5.4 ± 0.2	1	1	100
W35A/R36A	29.4 ± 0.8**	26	89	35
W10K	13.5 ± 0.8**	13	1.3	65
R101A/R104A	10.6 ± 0.3*	1.2	30.4	50
R75A/F76A	9.3 ± 0.8*	1.1	16.7	80
R121A	2 ± 1.1	5	1	96
R121A/Y122A	11.3 ± 1.3*	16.2	3.2	80
(Δ115-122)-ECP	10 ± 0.5*	13.6	4.7	73
(115-122 EDN)-ECP	3.3 ± 0.2	0.8	1.9	78

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values were obtained using the Grafit 5.0 program. \* p < 0.01 and \*\* p < 0.002 versus rECP.

<sup>b, c</sup> Values were taken from Carreras et al., (2003). <sup>b</sup> In each case the effect on the bactericidal activity was analysed using a 2 μM protein concentration. Cultures were maintained with the protein for 4 h and the CFU/mL were determined after 12 h culture. The effect of a mutant on the bacterial survival was expressed as the ratio between the values (CFU/mL) obtained for this mutant and those for rECP.

<sup>c</sup> Effect of 5 μM protein concentration on the leakage of liposome vesicles.

Figure 1

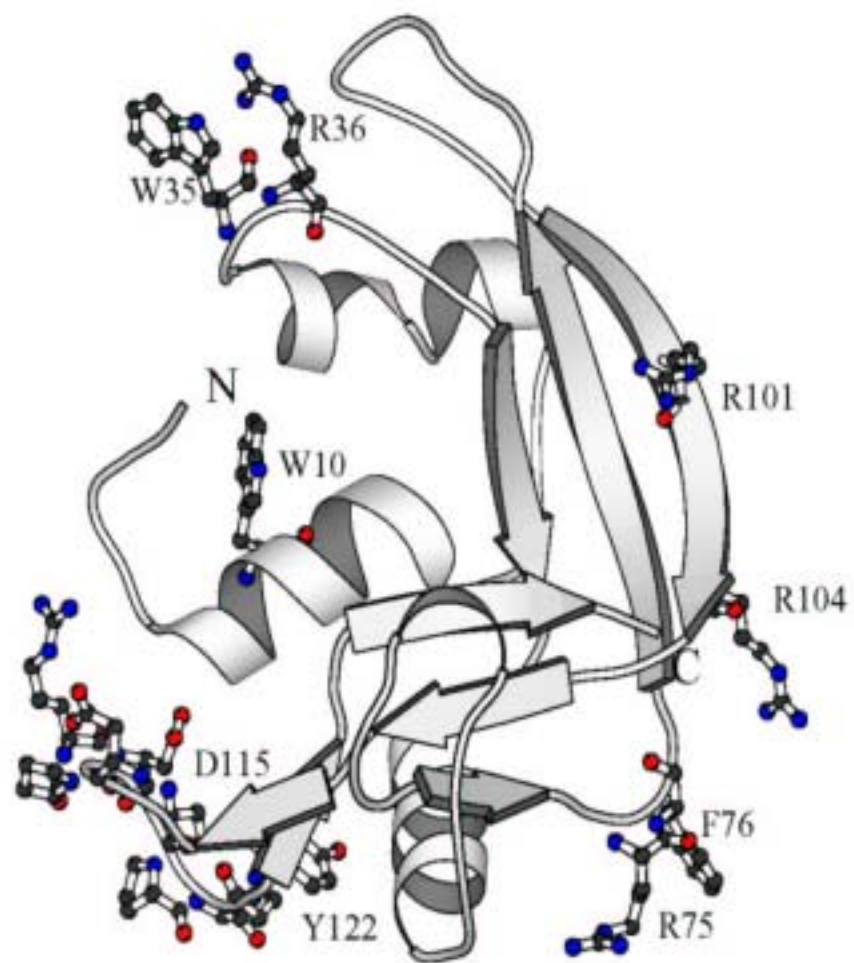
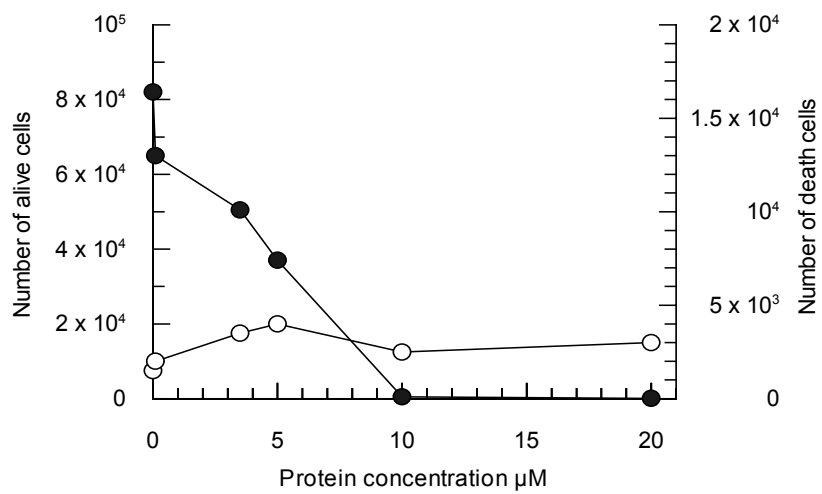


Figure 2

A



B

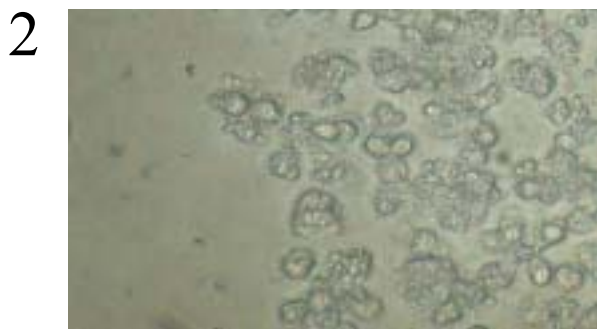
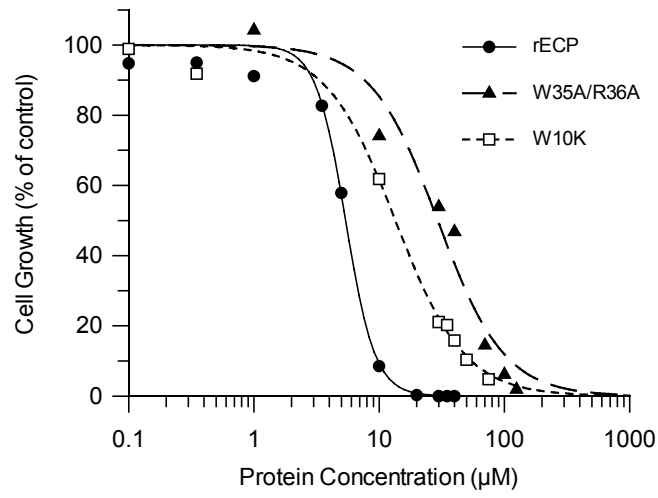
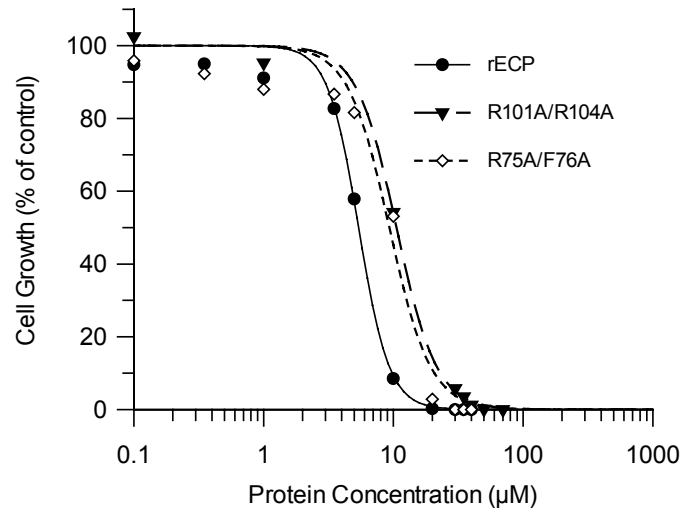


Figure 3

A



B



C

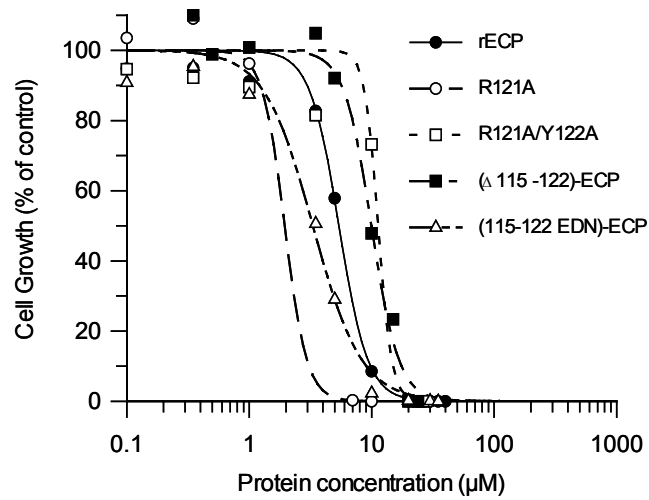
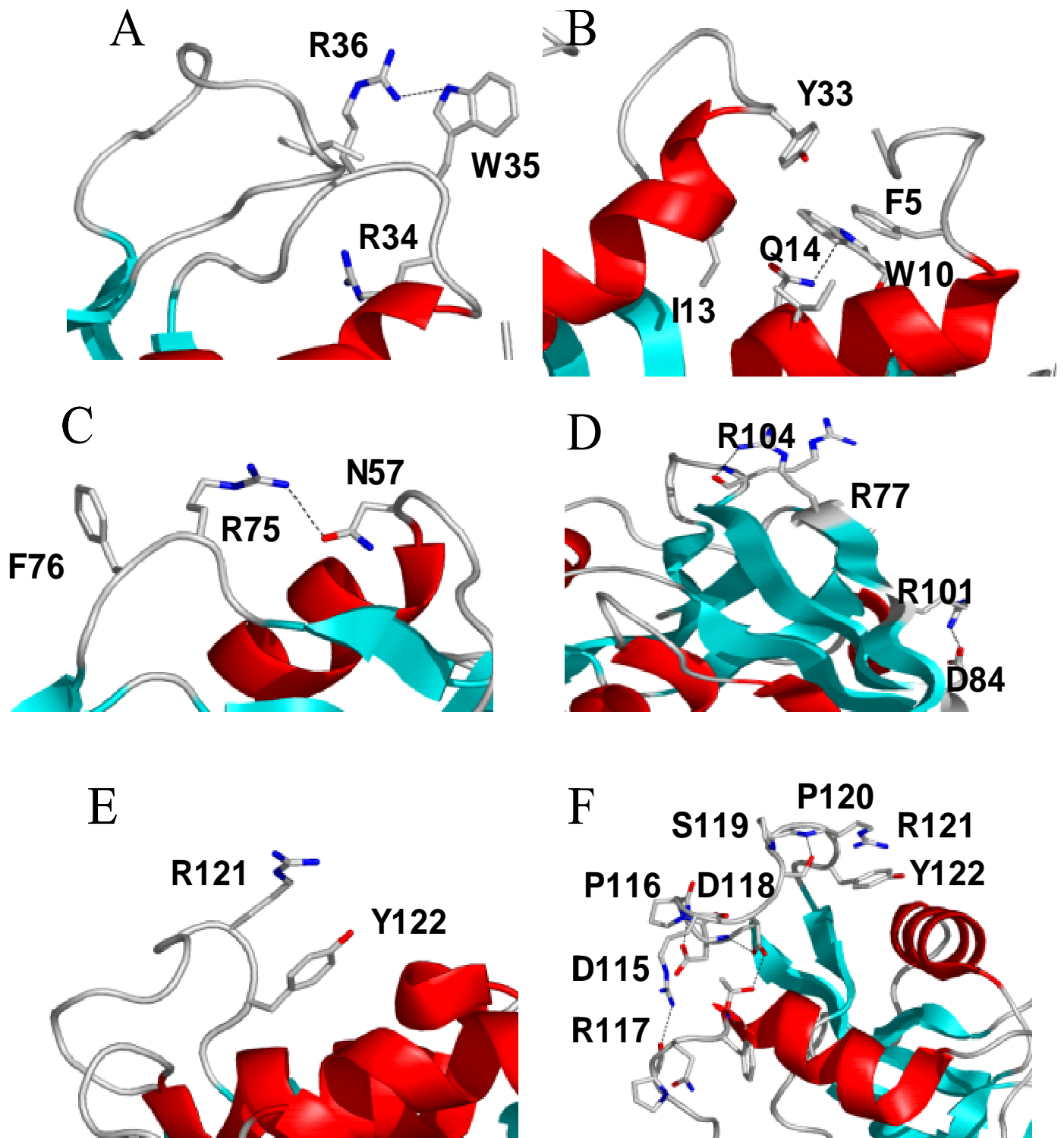


Figure 4



## **CAPÍTOL 5**



## RESULTATS I DISCUSSIÓ

La identificació de regions i residus únics en l'ECP i, per tant, potencialment involucrats en l'especificitat immunològica i/o funcions biològiques de la proteïna s'ha basat en l'estudi estructural i funcional de l'ECP en relació amb altres proteïnes de la superfamília de la RNasa A. Aquesta identificació s'ha portat a terme a partir de la superposició de l'esquelet de la seqüència primària de l'ECP en l'estructura tridimensional de l'EDN, l'anàlisi de l'homologia de seqüències entre l'ECP i diferents RNases i l'estructura tridimensional de l'ECP.

### 1 DETECCIÓ IMMUNOLÒGICA DE L'ECP PER UN ANTICÒS ESPECÍFIC

El eosinòfils són cèl·lules efectores en processos infecciosos, principalment per paràsits, i en malalties d'hipersensibilitat (Gleich i col·l.,1993). Els eosinòfils s'activen en resposta a diferents estímuls per alliberar el contingut dels seus grànuls que exerceixen moltes de les seves funcions. En conseqüència, cal que algun marcador de l'estat d'activació dels eosinòfils i la seva relació amb diversos estats patològics. Tai i col·l.,(1984) van desenvolupar dos anticossos monoclonals, EG1 i EG2, que prometien distingir entre les formes secretades i emmagatzemades de l'ECP. EG1, que s'havia obtingut a partir d'immunitzar ratolins amb extractes d'eosinòfils en repòs, reconeix tant la forma secretada com emmagatzemada de l'ECP. EG2, obtingut a partir de la immunització de ratolins amb les proteïnes secretades dels eosinòfils, només reconeix les formes secretades de l'ECP però no diferencia entre ECP i EDN. A partir d'aquí, s'han publicat més de 150 articles on s'ha utilitzat EG2 com a marcador d'eosinòfils activats. Les conclusions d'aquests treballs són diverses, però, en general, assenyalen la presència d'eosinòfils activats en diferents estats patològics i els implica amb la patogènesi de la malaltia corresponent.

Posteriorment, però, s'ha demostrat en diferents treballs que EG2 no discrimina immunohistoquímicament entre eosinòfils activats i en repòs i que la seva reactivitat depèn, principalment, del mètode utilitzat en la preparació de la mostra i la concentració d'anticòs que s'utilitza (Jahnsen i col·l.,1994 a i b, Jahnsen i col·l.,1995 i

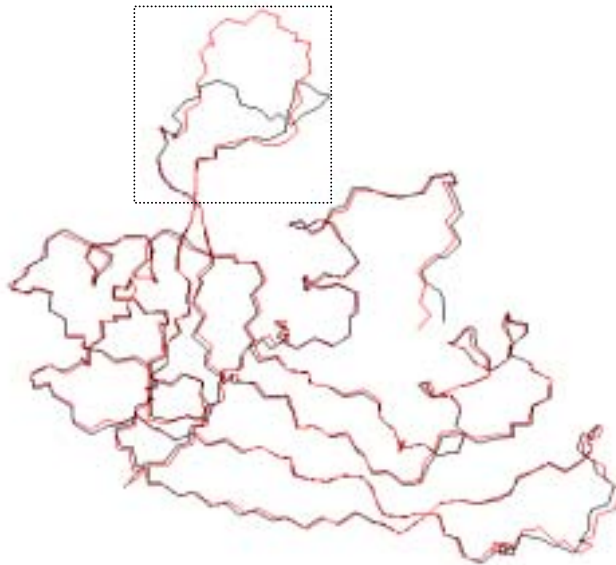
Nakajima i col·l.,1999). A més, no s'han aclarit quines són les diferències estructurals, si és que n'hi ha, entre les formes secretades i emmagatzemades de l'ECP. Rosenberg i Tiffani (1994) van determinar que l'EG2 només detecta la forma completament deglicosilada de l'ECP i l'EDN i la forma glicosilada de menor massa molecular de l'ECP (18 kDa) i l'EG1 pot detectar les tres formes glicosilades de l'ECP (18, 20, 22 kDa) la qual cosa suggereix que l'activació està lligada a la deglicosilació de les proteïnes dels grànuls. Nakajima i col·l.,(1999), però, no van poder reproduir els resultats de Rosenberg i Tiffani (1994).

### 1.1 Disseny i obtenció d'un anticòs específic per a l'ECP

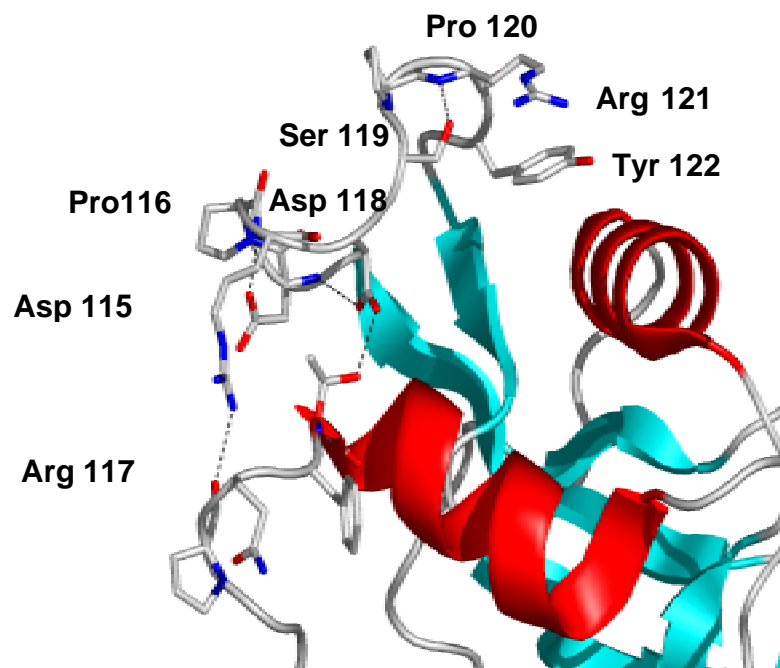
Per detectar immunològicament l'ECP s'ha escollit la regió D115-Y122 de la proteïna com a epítot per obtenir anticossos específics per la proteïna. La regió D115-Y122 forma un bucle exposat al solvent en les RNases d'eosinòfil (ECP i EDN) i és on es diferencia més l'esquelet de les dues proteïnes. Aquest bucle no es troba en les RNases A, 1, 4 i 5. La cerca al banc de dades de seqüències de proteïnes ha indicat que la seqüència escollida només té homologia amb altres seqüències d'ECP de mamífers. Mentre es realitzava aquest treball, es va resoldre l'estructura tridimensional de l'ECP per cristal·lografia i difracció de raigs X (Boix i col·l.,1999). L'estructura tridimensional de la proteïna ha permès confirmar que el bucle 116–119 (L 7 *loop* 7,) és una de les regions on l'esquelet de l'ECP es desvia més del de l'EDN (figura 8.A) i on es troben les diferències principals entre l'estructura global de les RNases d'eosinòfil i les RNases 1, 4 i 5. El bucle L7 forma una gran inserció entre les cadenes  $\beta$  4 i  $\beta$  5 (figura 8.B) i s'empaqueta mitjançant ponts d'hidrogen amb l'extrem N-terminal (Boix i col·l.,1999).

Neosystem Laboratoire (Estrasburg, França) va obtenir anticossos policlonals utilitzant com a antigen un pèptid sintètic conjugat a una proteïna transportadora, que comprèn el bucle 115-122 de l'ECP i uns aminoàcids extres de la seqüència de la proteïna (D112-P123). Vam purificar el sèrum immunitzat mitjançant una cromatografia d'afinitat amb l'ECP immobilitzada per assegurar que els anticossos interaccionaven amb la corresponent regió de la proteïna quan es troba en l'estructura tridimensional nativa i no amb la proteïna transportadora o amb altres conformacions que el pèptid pogués adoptar.

A



B



**Figura 8.** A. Sobreposició de l'esquelet de l'ECP (en negre) i l'EDN (en vermell). La regió del bucle D115-Y122 s'ha senyalat amb un requadre. B. Imatge detallada de la regió D115-Y122 de l'ECP. La figura s'ha fet utilitzant PyMol, DeLano Scientific ©. Els ponts d'hidrogen s'han marcat amb línies discontinues, les hèlix- $\alpha$  en vermell i les fulles  $\beta$  en blau clar. Els àtoms de carboni estan marcats en gris, els d'oxigen en vermell i els de nitrogen en blau fosc.

### 1.2 Caracterització de l'anticòs D112 – P123

S'ha assajat la reactivitat de l'anticòs D112–P123 pel pèptid sintètic D112–P123 i l'ECP recombinant en estat nadiu i desnaturalitzat i amb altres proteïnes control. La tècnica d'ELISA ha permès comprovar que l'anticòs reconeix el pèptid sintètic i l'ECP correctament plegada. Per transferència Western s'ha comprovat que l'anticòs reconeix l'ECP desnaturalitzada en condicions reductores i no reductores. L'absència de reactivitat creuada de l'anticòs amb l'RNasa A, EDN o altres proteïnes control s'ha verificat tant per transferència Western com per transferència blot. Per tant, es pot concloure que la regió D115–Y122 permet discriminar immunològicament l'ECP de l'EDN i l'RNasa A. Fins al moment de la publicació del treball les úniques RNases humanes que contenen el bucle 115–122 eren l'ECP l'EDN i l'RNasa 6. Recentment, s'ha identificat dues noves RNases humanes (RNasa 7 i 8) que també contenen aquest bucle amb diferent grau d'homologia de seqüència amb l'ECP (Harder i Schröder 2002, Zhang i col·l.,2002 i Zhang i col·l.,2003) i amb les que la possible reactivitat creuada amb l'anticòs D112–P123 està per determinar. Això no obstant, si tenim en compte que l'anticòs és capaç de discriminar entre l'ECP i l'EDN, que tenen conservats 9 aminoàcids en la regió 112–123, sembla poc probable que l'anticòs pugui reconèixer les RNases 6, 7 i 8 que només conserven 4 aminoàcids o menys en la seqüència amb la qual interacciona l'anticòs (figura 8).

D'altra banda, l'origen cel·lular d'aquestes RNases humanes és diferent. En eosinòfils s'expressen únicament l'ECP i l'EDN, mentre que en monòcits i neutròfils s'ha trobat mRNA que codifica per a l'RNasa 6. Les RNases 7 i 8 no s'expressen en leucòcits.

	112	123
RNasa 1	EGS	-----P
RNasa 2	DNRDQRRDPPQYP	
RNasa 3	DNRD - PRDSPRYP	
RNasa 4	EGN	-----P
RNasa 5	ENG	-----
RNasa 6	DPPQ - KSDPP - YK	
RNasa 7	KPPQ - KKDSQQFH	
RNasa 8	DPPQ - QGDPG - YP	

**Figura 9.** Alineació de la seqüència d'aminoàcids corresponent a la regió 112–123 de l'ECP o (RNasa 3) de les proteïnes humanes de la superfamília de la RNasa A.

La quantitat mínima d'antigen (rECP) necessària per poder ser detectada per l'anticòs es troba entre 1 i 50 ng segons la tècnica i les condicions utilitzades.

La sensibilitat de l'anticòs D112–P123 per l'ECP és comparable a la d'altres anticòsos descrits (Tai i col·l., 1984).

Utilitzant l'rECP com a antigen i en condicions no reductores, l'anticòs EG1 a una concentració final 10 µg/mL dóna un senyal lleugerament inferior al que s'observa per a una concentració final 0.2 µg/mL de l'anticòs D112–P123.

### 1.3 Detecció de l'ECP en fluids corporals per l'anticòs D112–P123

Un cop provat que l'anticòs D112–P123 pot detectar l'ECP recombinant produïda en un sistema procariota tant en condicions reductores com no reductores, era important examinar quines isoformes de l'ECP nativa són reconegudes per l'anticòs. En les mostres de granulòcits i esput analitzades amb l'anticòs anti D112– P 123, es pot detectar, per transferència Western, una banda del mateix pes molecular que la rECP i que correspondria a la forma no glicosilada de l'ECP i unes bandes de pes molecular superior que es poden associar a les formes glicosilades de la proteïna (figura 4.B del capítol 2). En les mostres de plasma només es detecta la banda que correspon a la forma no glicosilada de l'ECP, segurament perquè la concentració de l'ECP glicosilada en plasma està per sota del límit de detecció de l'anticòs (figura 4.B.

del capítol 2). En conclusió, es pot afirmar que la reactivitat de l'anticòs anti-D112-P123 no està afectada per la glicosilació de la proteïna i, per tant, es pot utilitzar en estudis encaminats a analitzar les diferents isoformes de l'ECP o quantificar els nivells d'ECP en diferents condicions fisiològiques.

Els nivells d'ECP en fluids corporals s'utilitza com a marcador en processos inflamatoris (revisió Venge i col·l.,1999). Això no obstant, s'ha observat que la concentració d'ECP en fluids biològics varia molt segons el mètode de col·lecció de la mostra (Grebski i col·l.,1998, Klimek i Rasp 1999). S'ha comercialitzat un sistema automatitzat per detectar l'ECP en fluids corporals (sistema UniCap). Aquest mètode compta amb un protocol estandarditzat que està resultant molt útil en estudis clínics ja que permet la reproducció i comparació de resultats. La falta, però, d'informació sobre l'epítop que reconeix l'anticòs d'aquests sistemes limita molt la utilització d'aquests anticossos en investigació bàsica.

Per veure la possible aplicació de l'anticòs D112-P123 en estudis quantitius s'ha examinat la reproductivitat del mètode. S'ha fet una densitometria de les bandes obtingudes per transferència Western de diferents concentracions de proteïna en quatre experiments independents i s'ha obtingut una recta de regressió amb una  $r^2 = 0,9999$  (figura 3, capítol 2).

La determinació dels nivells d'ECP en esput mitjançant el sistema UniCap i amb l'anticòs D112-P123 ha mostrat una bona correlació entre tots dos mètodes.

## **2 DETERMINANTS ESTRUCTURALS D' ACTIVITATS BIOLÒGIQUES ESPECÍFIQUES DE L'ECP**

El següent que ens vam plantejar va ser identificar els determinants estructurals de la toxicitat de l'ECP, l'altre aspecte de la proteïna amb més repercussions fisiològiques. Amb aquest objectiu s'ha considerat quins són els passos limitants, descrits a la bibliografia, perquè una RNasa sigui tòxica i s'han analitzat respecte a la informació de què es disposa per l'ECP i altres pèptids antimicrobians. A partir d'aquí, hem escollit aquells residus o regions de la proteïna que per les seves característiques (posició en l'estructura tridimensional, absència en RNases no tòxiques, residus implicats en la citotoxicitat d'altres pèptids i proteïnes amb activitat antimicrobiana) podrien estar involucrats en alguns dels passos clau dels mecanisme de citotoxicitat de l'ECP.

Dins la família de la RNasa A hi ha, com a mínim, cinc representants (ribonucleasa seminal bovina (BS–RNasa), tres RNases d'amfibis altament relacionades: onconasa, i les lectines de *Rana japonica* (RJE–RNasa) i *Rana catesbeiana* (RCE–RNasa) i l'ECP amb activitat citotòxica enfront de diferents tipus cel·lulars.

S'ha dedicat molts esforços a estudiar la BS-RNasa i l'onconasa per la seva potencialitat en el tractament de diferents càncers. El mecanisme d'actuació d'aquestes RNases no està completament definit, però sembla que presenten alguns punts en comú. La BS-RNasa és l'única proteïna dimèrica de la família de la RNasa A i presenta una toxicitat selectiva davant de cèl·lules tumorals (revisió a D'Alessio i col·l.,1997). La proteïna s'uneix específicament a llocs d'unió de la matriu extracel·lular i entra a la cèl·lula per un mecanisme d'endocitosi (Mastronicola i col·l.,1995). RNases no citotòxiques, com la RNasa A, no tenen llocs d'unió a la matriu extracel·lular i no poden penetrar a l'interior de la cèl·lula. La BS-RNasa un cop a l'endosoma pot arribar al trans Golgi i d'aquí al citosol. El pas del trans Golgi al citosol no és evident però l'habilitat de la proteïna per permeabilitzar membranes (Mancheño i col·l.,1994), propietat no compartida per la RNasa A, li podria permetre travessar la membrana del trans Golgi. L'efecte final al citosol és degradar l'rRNA, inhibint la síntesi de proteïna (Mastronicola i col·l.,1995) i, al mateix temps, induir l'apoptosi a la cèl·lula diana (Sinatra i col·l.,2000).

L'onconasa o proteïna P30 es va purificar per primer cop dels extractes d'òocits de *Rana pipiens* a partir de la seva activitat anticancerígena in vitro i in vivo (Ardelt i col·l.,1991). Actualment es troba en estudis clínics en fase III per la teràpia de diferents carcinomes. Wu i col·l. (1993) van observar que l'onconasa s'uneix a la membrana citoplasmàtica de la cèl·lula diana per dos llocs d'afinitat diferents, però, fins al moment, no s'ha identificat el seu receptor a la superfície cel·lular. Al citosol, l'onconasa degrada el tRNA i inhibeix la síntesi de proteïna (Iordanov i col·l.,2000). Per un mecanisme alternatiu, l'onconasa també pot induir l'apoptosi a la cèl·lula diana (Iordanov i col·l.,2000). Una característica comuna de l'onconasa i la BS-RNasa és la seva resistència a l'inhibidor d'RNases que es localitza al citosol de les cèl·lules de mamífer (Boix i col·l.,1996 i Murthy i col·l.,1996).

L'efecte tumoricida i citostàtic de les RNases de *Rana catesbeiana* i *Rana japonica* es deu a la unió a les glicoproteïnes de la superfície cel·lular, internalització i degradació de l'RNA (Irie i col·l.,1998).

En resum, dos dels punts decisius perquè una RNasa sigui tòxica són una via d'entrada a la cèl·lula diana i una activitat RNasa funcional a l'interior de la cèl·lula, que implica l'habilitat d'escapar de l'inhibidor de RNases. De fet, RNases no tòxiques (RNasa A i EDN) poden adquirir activitat citotòxica, enfront de dianes específiques, quan es conjuguen químicament o es fusionen amb lligands de receptors que s'internalitzen (revisió a Rybak i Newton, 1999).

Quan vam iniciar aquest treball, l'ECP era l'única RNasa humana amb una activitat clarament citotòxica per un ampli espectre de dianes que comprèn cèl·lules procariotes, eucariotes i virus. L'EDN té una activitat tòxica molt reduïda per la majoria de tipus cel·lulars. L'activitat patogènica de l'ECP s'havia associat a la naturalesa catiònica de la proteïna, que li permetria interaccionar amb la superfície negativa de les cèl·lules (Rosenberg i Dyer, 1995) i a la capacitat de la proteïna per fer porus en membranes (Young i col·l.,1986). Lehrer i col. (1989) van observar que l'activitat bactericida de l'ECP es correlaciona amb la permeabilització seqüencial de la membrana externa i interna d'*E. coli*. La relació entre l'activitat citotòxica i ribonucleasa és tema de debat. Mentre l'activitat enzimàtica és intrínseca a l'activitat antivírica i neurotòxica, no és necessària per l'activitat parasitocida i bactericida (revisió Boix, 2001). D'altra banda, l'activitat enzimàtica de l'ECP, a diferència de la BS-RNasa i l'onconasa, és inhibida per l'inhibidor de ribonucleases (Domachowske i col·l.,1998).

Amb tot, la interacció entre l'ECP i la membrana cel·lular sembla que és decisiva per explicar, almenys en part, el caràcter tòxic de la proteïna.

### **2.1 Model per l'estudi de l'activitat sobre membranes de l'ECP**

En aquest treball s'ha posat a punt un model per estudiar l'efecte de l'ECP en membranes cel·lulars.

Aquest model es basa a avaluar l'habilitat de l'ECP per desestabilitzar membranes a partir de l'anàlisi de l'alliberament d'un marcador fluorescent de l'interior de vesícules lipídiques. Hem comprovat que l'ECP té la propietat de permeabilitzar els liposomes, a diferència de l'EDN i la RNasa A. A fi d'estudiar si l'efecte desestabilitzador de membranes es deu al caràcter catiònic de la proteïna, tal com s'havia proposat, s'han preparat liposomes amb diferent proporció de lípids aniònics respecte de neutres. L'activitat de l'ECP sobre la bicapa lipídica depèn fortament de la càrrega negativa neta de la membrana sintètica. Aquest resultat és anàleg a l'observat



en estudis amb pèptids antimicrobians on s'observa una baixa afinitat per fosfolípids neutres en comparació amb fosfolípids àcids (revisió a Oren i Shai,1998). D'altra banda, la resistència d'alguns bacteris s'ha associat a nivells baixos de fosfolípids aniònics a la seva membrana (revisió a Andreu i Rivas, 1998).

## 2.2 Disseny de les variants de l'ECP

Per analitzar la contribució de regions i aminoàcids específics en l'activitat patogènica de l'ECP s'ha considerat que en la unió entre proteïnes i membranes poden estar involucrades tant interaccions hidrofòbiques com electrostàtiques (Sitaram i Nagaraj, 1999). S'han obtingut formes modificades, per mutagènesi dirigida (taula 2), de l'ECP en aquells residus hidrofòbics i catiònics més exposats en l'estructura tridimensional de la proteïna (Boix i col·l.,1999) i que són específics de l'ECP, ja que poden ser regions potencials d'interacció amb la membrana cel·lular. S'han seleccionat especialment aquells aminoàcids que són diferents en l'EDN, que comparteix un 67% d'homologia de seqüència amb l'ECP, però que no és bactericida. Els valors del percentatge d'àrea superficial accessible als solvents (SASA) ha confirmat que els residus específics de l'ECP, W35, R36, R75, F76, R101, R104 i R121, es troben a la superfície de la molècula (vegeu taula 1 del capítol 3 i figura 10.A). També s'ha seleccionat l'altre triptòfan de la molècula (W10) que es troba parcialment exposat i pròxim al centre actiu.

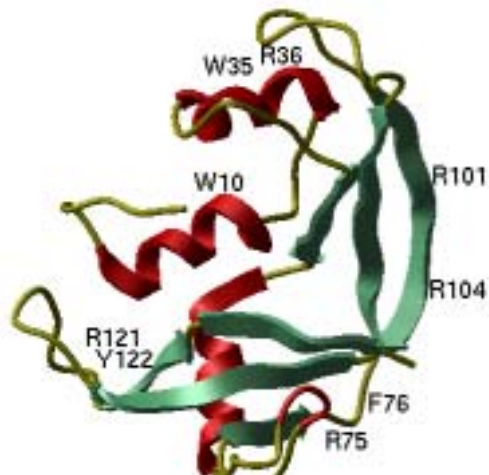
D'altra banda, després de comprovar que la regió D112-P123 permet diferenciar immunològicament l'ECP ens hem interessat a examinar quina pot ser la implicació d'aquesta regió en les funcions biològiques de la proteïna. Per estudiar la funció d'aquesta regió s'han construït les variants següents: un mutant on s'ha eliminat tota la regió D115-Y122 ( $\Delta$  115-122)-ECP (figura 10.B), un on s'ha substituït la regió del bucle D115-Y122 pels aminoàcids d'aquesta regió en l'EDN (115-122 EDN)-ECP (figura 10. B), un mutant puntual de l'aminoàcid R121 per a A i un de doble mutant dels residus R121/Y122 per a A.

La predicció de l'estructura tridimensional dels mutants de l'ECP per *Internal Coordinate Modeling* (ICM MolSoft), ha mostrat que no s'han produït desviacions significatives en l'estructura respecte de l'ECP salvatge. Per tant, les possibles diferències en les activitats biològiques de les variants de l'ECP respecte a l'ECP

## Resultats i discussió

salvatge es poden atribuir a l'efecte de la modificació en els aminoàcids substituïts i no a un canvi secundari que alteri de forma significativa l'estructura tridimensional.

A



B



**Figura 10.** A. Diagrama esquemàtic de l'estructura de l'ECP resolta per difracció de raigs X (1QMT.pdb) on es mostren els residus que s'han canviat en les diferents variants.

B. Figura detallada de la regió del bucle D115-Y122 en l'ECP wt (gris), el mutant: ECP wt es mostra en gris, el mutant ( $\Delta$  115-122)-ECP es mostra en groc i el mutant (115-122 EDN)-ECP, en vermell.

## 2.3 Activitat RNasa de les variants de l'ECP

Els valors dels paràmetres cinètics de les variants que hem construït han indicat que no s'han produït canvis rellevants en l'activitat RNasa de les proteïnes. Això no obstant, cal mencionar que la variant R101A/R104A té un valor d'eficiència catalítica aproximadament el doble que l'ECP salvatge (taula 2). Mallorquí-Fernández i col·l.,(2000) proposen que les càrregues positives de la superfície cel·lular, com és el cas dels residus R101 R104, podrien ser un dels factors que expliquen la baixa activitat catalítica de l'ECP en dificultar l'accés de l'RNA al centre actiu. L'activitat enzimàtica de l'ECP davant de substrats d'RNA assajats és inferior a la de l'EDN i l'RNasa A. Rosenberg i Dyer (1995) proposen que els gens de l'EDN i l'ECP provenen d'una duplicació d'un gen ancestral *EDN-like*. Els dos gens paràlegs van estar sotmesos a una selecció positiva darwiniana que va resultar en una proteïna altament catiònica i tòxica (ECP) i una proteïna amb un activitat enzimàtica superior (EDN) però amb una toxicitat inferior. Una eficiència catalítica relativament baixa no descarta la seva implicació en una activitat biològica (Shapiro i col·l.,1986).

## 2.4 Efecte de les mutacions sobre les activitats biològiques de l'ECP

Un cop analitzat que no s'han produït alteracions significatives ni en l'estructura tridimensional ni en l'activitat RNasa de les proteïnes com a conseqüència de les mutacions, s'ha avaluat l'efecte d'aquestes variants en activitats biològiques específiques de l'ECP.

Concretament, s'ha assajat l'efecte de l'ECP recombinant obtinguda en un sistema procariota i les seves variants en l'estabilitat de les membranes sintètiques, viabilitat de bacteris grampositius i gramnegatius i en el creixement d'una línia cel·lular derivada de carcinoma. Els canvis que s'ha observat en algunes variants en aquestes activitats biològiques no es poden explicar per canvis en l'activitat RNasa ja que els paràmetres cinètics són similars en les variants i l'ECP salvatge (apartat 2.3).

### 2.4.1 Disrupció de vesícules lipídiques

S'ha analitzat l'efecte de les variants de l'ECP sobre el model de membrana descrit anteriorment (apartat 2.1 de la discussió). L'anàlisi de l'efecte de les variants sobre els liposomes ha assenyalat que la regió W35R36 i en menor grau, el W10 i els

residus catiónics R101 i R104 estan implicats en la permeabilització de les vesícules lipídiques (taula 2).

La interacció de l'ECP amb les membranes sintètiques i la implicació dels dos residus de triptòfans i aminoàcids catiónics específics en aquesta unió fan de l'ECP un model per estudiar la unió i la interacció de proteïnes amb membranes. No només per les repercussions en l'àmbit fisiològic i les aplicacions en el clínic, sinó també, perquè tant els triptòfans com els residus catiónics s'han confirmat decisius per a l'acoblament i l'estructura de proteïnes de membrana (Wimley i White, 1993).

Mesures experimentals amb pèptids completament hidrofílics (pèptids de lisines), on només es produeixen interaccions electrostàtiques, mostren que els pèptids no poden introduir-se més enllà de la regió polar del fosfolípid. En l'escala d'hidrofobicitat dels aminoàcids de Wimley i White (1996) s'observa que els residus aromàtics estan especialment afavorits a la interfase de la bicapa lipídica. En la transferència dels aminoàcids des de la interfase de la bicapa lipídica a l'aigua el triptòfan dona el valor positiu més elevat d'energia lliure. Estudis de cristal·lografia i difracció de raigs X de proteïnes de membrana permeten observar que la cadena lateral del triptòfan tendeix a situar-se entre els caps polars i les cues hidrofòbiques de les bicapes lipídiques (Wallace i Janes, 1999).

La disposició estructural de l'ECP a la membrana es pot proposar com el resultat del compromís entre interaccions electrostàtiques i hidrofòbiques.

S'han descrit dos models per explicar la disposició dels pèptids en les membranes i la seva consegüent desintegració.

1. Model "*barrel-stave*": consisteix en la formació de porus transmembrana gràcies a la col·locació transversal dels pèptids a la bicapa lipídica. L'observació de canvis en la conductància de la membrana demostra el transport d'ions pel porus i la possible causa de mort de la cèl·lula (Christensen i col·l.,1988). L'any 1986, Young i col. van descriure la formació de porus transmembrana insensibles al voltatge per l'ECP.

2. Model "*carpet-like*": les proteïnes s'uneixen a la superfície de la membrana i la cobreixen parcialment (Pouny i col·l.,1992). Quan s'arriba a una concentració crítica de proteïna la bicapa es desestabilitza i perd la seva estructura.

### 2.4.2 Activitat bactericida

Durant la preparació del manuscrit del treball presentat en el capítol 2 es va publicar l'existència d'una nova RNasa humana (RNasa 7) amb activitat antimicrobiana per un ampli espectre de microorganismes (Harder i Schröder (2002) i Zhang i col·l., (2003)). Les dues RNases humanes amb activitat antimicrobiana ECP i RNasa 7 tenen un *pI* sorprenentment elevat. Però, mentre l'elevat *pI* de l'ECP és el resultat d'un elevat nombre d'arginines, a la molècula de l'RNasa 7 és conseqüència d'un elevat nombre de lisines. Per tant, la cationicitat i l'activitat antimicrobiana d'aquestes dues proteïnes sembla que s'ha adquirit independentment durant l'evolució de l'ECP i la RNasa 7. Això no obstant, la cationicitat per si sola no és suficient perquè una RNasa sigui citotòxica ja que, per exemple, l'angiogenina (o RNasa 5) té un *pI* de 10,4 semblant al de la RNasa 7 (*pI* 10,5) i no és bactericida.

S'ha assajat l'efecte de l'ECP i les seves variants a concentracions fisiològiques (0,5 µM a 2 µM) en la viabilitat d'*E. coli* i *S. aureus* (taula 2). En l'estudi de l'efecte de l'ECP recombinant sobre cultius bacterians s'ha observat un efecte bactericida (i no només bacteriostatic) sobre *E. coli* comparable a l'efecte descrit per Lehrer i col·l.,(1989) per a l'ECP nativa purificada d'eosinòfils.

De l'anàlisi de l'efecte de les diferents variants de l'ECP es pot destacar que el mutant W35A/R36A té una activitat bactericida sensiblement inferior a la proteïna salvatge. Es produeix un augment aproximat de dues unitats logarítmiques en la supervivència (CFU/mL) quan es tracten els bacteris amb la variant W35A/R36A respecte del tractament amb la proteïna salvatge. Canvis d'una unitat logarítmica es consideren significatius en l'experiment d'activitat bactericida.

Les altres variants de l'ECP provoquen canvis diferents segons si es tracta de bacteris grampositius o gramnegatius.

La regió D115-Y122 i el W10 tenen una implicació en la toxicitat per a *S. aureus* però no per a *E. coli*. El tractament de *S. aureus* amb la variant on s'ha eliminat la regió D115-122, el doble mutant R121A/Y122A i el mutant simple W10K augmenten aproximadament una unitat logarítmica la supervivència (CFU/mL) de *S. aureus* respecte de la incubació amb l'ECP salvatge.

Els residus catiónics R101 i/o R104, R75 i/o alifàtic F76 intervenen en la toxicitat de la proteïna per a *E. coli* però no per a *S. aureus*. El tractament d'*E. coli* amb els doble mutants R101A/R104A i R75A/F76A augmenten aproximadament una unitat

logarítmica (CFU/mL) la supervivència d'*E. coli* respecte del tractament amb la proteïna salvatge.

La regió W35R36 de l'ECP que es troba molt exposada al solvent té una implicació rellevant en la toxicitat de la proteïna per bacteris grampositius i gram negatius que es pot correlacionar amb l'efecte observat sobre liposomes com a model membrana.

L'efecte del W10 sobre les vesícules lipídiques pot explicar també la importància d'aquest residu per la toxicitat de la proteïna per a *S. aureus*.

La relació del residu R101 i/o R104 en la toxicitat de la proteïna per a *E. coli* s'entén per la importància que hem observat que tenen aquests residus en les interaccions electrostàtiques entre l'ECP i els lípids carregats negativament de les vesícules lipídiques.

L'embolcall dels bacteris proporciona a les cèl·lules una barrera mecànica i de permeabilitat, protegeix la cèl·lula de les possibles influències perjudicials de l'ambient i manté l'elevada pressió osmòtica interna. El peptidglicà de la paret cel·lular es considera el responsable de la integritat mecànica mentre que la membrana citoplasmàtica constitueix la barrera de permeabilitat. Això no obstant, s'ha proposat que el peptidglicà és el responsable de la lenta difusió de proteïnes a través del periplasma (revisió a Dijkstra i col·l., 1996).

L'ECP per poder interaccionar amb la membrana citoplasmàtica ha de travessar les capes més externes de l'embolcall cel·lular. Es creu que el reconeixement dels pèptids antimicrobians i *E. coli* es dona per interaccions electrostàtiques entre el pèptid catiònic i el lipopolisacàrid (LPS) de la membrana externa d'*E. coli* (Piers i col·l., 1994). Els pèptids desplacen els cations divalents que mantenen els LPS units i es perd la integritat de la membrana externa (Peterson i col·l., 1987), això facilita l'accés del pèptid a la membrana citoplasmàtica on exerceix la seva acció.

La superfície externa dels bacteris grampositius també té una càrrega neta negativa per la presència dels àcids teicòids i una paret cel·lular que es caracteritza per moltes capes de peptidglicà amb molts entrecreuaments.

Els residus que no estan relacionats amb la permeabilització de la membrana ni amb l'activitat RNasa però sí en l'activitat bactericida podrien estar implicats en la interacció amb la superfície cel·lular. La regió R75F76 podria interaccionar amb el LPS, mentre que la regió D115-122 podria afavorir la difusió de la proteïna per la capa de peptidoglicà dels bacteris grampositius.

### 2.4.3 Inhibició de la proliferació de línies cel·lulars tumorals

La toxicitat de l'ECP per a les cèl·lules de mamífer es coneix des de l'any 1988 (Fredens i col·l.,1988). En diferents estudis s'ha relacionat l'ECP amb el dany tissular resultat d'una inflamació per eosinòfils (Motojima i col·l.,1988).

També s'ha descrit l'efecte inhibitori que produeix la proteïna en la proliferació de limfòcits (Kimata i col·l.,1992). Però no ha estat fins a l'any 2002 que s'ha fet un estudi in vitro de l'efecte de l'ECP en la proliferació de diferents línies cel·lulars de mamífer (Maeda i col·l.,2002). Els resultats suggereixen que l'ECP té un efecte citostàtic que depèn del tipus cel·lular. Utilitzant proteïna marcada, els autors observen que l'ECP, a diferència de l'RNasa A, s'uneix a la superfície cel·lular i s'acumula al citoplasma. Els nostres resultats han corroborat que l'ECP inhibeix la proliferació de la línia cel·lular HL60 i l'efecte és principalment citostàtic igual que per a la línia de carcinoma humà d'epidermis (cèl·lules A431) i per a la línia cel·lular mieloide (cèl·lules K562) (Maeda i col·l.,2002) i han afegit que també té un efecte inhibitori per a la línia cel·lular d'adenocarcinoma humà HeLa. Els valors d'IC<sub>50</sub> de les diferents variants per a la línia HL60 permeten destacar la importància de la regió W35R36 i, menys accentuadament, del residu W10 en la inhibició de la proliferació. Altres aminoàcids catiònics i aromàtics R75 + F76, R101 + R104 i Y122 i la regió D115–Y122 tenen un paper menys evident en la inhibició del creixement de la línia cel·lular eucariota.

La implicació de la regió W35R36 de l'ECP en la inhibició del creixement cel·lular s'explica per la participació d'aquesta regió en l'efecte observat sobre liposomes com a model membrana.

L'altre Trp de la proteïna, el W10, que presenta una àrea d'exposició menor al solvent té, en comparació amb el W35, una participació menor en la interacció de la proteïna amb la bicapa lipídica, que coincideix amb una menor contribució en la inhibició de la proliferació de les cèl·lules.

La intervenció dels residus R101 i/o R104 en la inhibició del creixement de la línia cel·lular de leucèmia es pot explicar per l'aparent participació d'aquests residus en la interacció electrostàtica entre la proteïna i els fosfolípids aniònics de la membrana.

En el costat extracel·lular de les membranes plasmàtiques de les cèl·lules eucariotes trobem els carbohidrats de glicolípid i glicoproteïnes de membrana que intervenen amb el reconeixement intercel·lular. En el reconeixement i interacció entre proteïnes i glúcids són necessàries interaccions electrostàtiques entre les càrregues

## Resultats i discussió

positives dels residus catiónics i les càrregues negatives dels glúcids (Ricard-Blum i col·l.,2004) i interaccions d'apilament (*stacking interactions*) entre els anells dels residus aromàtics de la proteïna i els anells dels glúcids (Hayashida i col·l.,2003).

Els aminoàcids que es relacionen amb la inhibició del creixement però no amb l'activitat sobre membranes són residus aromàtics o catiónics (R75F76 i Y122) que podrien interaccionar amb els glúcids de la superfície cel·lular afavorint la unió de la proteïna a la cèl·lula.

No es pot excloure que residus que intervenen en la desestabilització de la membrana (R101 i/o R104, W35 i/o R36, W10) també puguin jugar algun paper en la interacció amb la superfície cel·lular. Maeda i col. (2002) observen que la unió de l'ECP a l'heparina depèn, en part, dels triptòfans de la proteïna.

L'efecte de les diferents variants sobre la desestabilització de membranes es relaciona millor amb l'activitat antiproliferativa de línies tumorals que antimicrobiana, probablement, perquè les cèl·lules eucariotes no tenen paret cel·lular i, en concret, en la línia cel·lular HL60, en créixer en suspensió, no es dona la cohesió cel·lular i arquitectura que trobaríem en un teixit i l'única estructura que trobem a la superfície cel·lular és el glicocàlix.

**Taula 2. Propietats biològiques i activitat enzimàtica de l'ECP i les seves variants**

Proteïna	IC <sub>50</sub> HL60 <sup>a</sup>	<i>S. aureus</i> CFU/mL <sup>b</sup>	<i>E. coli</i> CFU/mL <sup>b</sup>	Disrupció liposomes (%) <sup>c</sup>	Activitat RNAsa kcat/K <sub>m</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>
ECPwt	5,4	2,4x10 <sup>4</sup>	6,7x10 <sup>3</sup>	100	8.500
W35A/R36A	29,4 ***	6,3x10 <sup>5</sup> **	6x10 <sup>5</sup> **	35 **	13.700
W10K	13,5 ***	3,2x10 <sup>5</sup> ***	8,9x10 <sup>3</sup>	65 *	4.000
R101A/R104A	10,6 **	3,1x10 <sup>4</sup>	2x10 <sup>5</sup> *	50 *	19.200
R75A/F76A	9,35 **	2,6x10 <sup>4</sup>	1,1x10 <sup>5</sup> **	80	3.900
R121A	2	1,2x10 <sup>5</sup>	6,9x10 <sup>3</sup>	95	9.000
R121A/Y122A	11,3 **	4x10 <sup>5</sup>	2,2x10 <sup>4</sup>	80	10.700
(Δ 115-122) ECP	9,97 **	3,3x10 <sup>5</sup> **	3,2x10 <sup>4</sup>	73	5.700
(115-122EDN)ECP	3,32	1,8x10 <sup>4</sup>	1,3x10 <sup>4</sup>	78	8.400

<sup>a</sup>Inhibició del creixement de la línia cel·lular derivada de leucèmia HL60. <sup>b</sup>CFU/mL de *S. aureus* o *E. coli* que queden després d'incubar durant 5 h a 37 °C els bacteris amb 2 μM de proteïna. <sup>c</sup>Disrupció de vesícules lipídiques DOPC/DOPG per l'ECP i les seves variants. <sup>d</sup> Paràmetres cinètics utilitzant (Up)<sub>4</sub>U > p com a substrat.  
\*\*\*  $p < 0,002$ , \*\*  $p < 0,02$ , \*  $p < 0,05$ .



## 2.5 Mecanisme d'acció de l'ECP

En diferents treballs s'ha descrit una falta de correlació directa entre l'activitat sobre les membranes sintètiques i l'activitat antimicrobiana (Wu i col·l.,1999). D'altra banda, està àmpliament acceptat que en l'activitat antimicrobiana dels pèptids catiónics està implícita i és necessària l'activitat sobre la membrana citoplasmàtica. No obstant això, és motiu de controvèrsia si la disrupció de la membrana cel·lular és la causa directa i única de la mort de la cèl·lula o una activitat desestabilitzadora de la bicapa lipídica és necessària per produir una certa permeabilització de la membrana, que permeti l'accés de la proteïna a la seva diana intracel·lular. Friedrich i col·l.,(2000) proposen que els pèptids antimicrobians, a banda de la membrana citoplasmàtica, poden interaccionar amb altres dianes aniòniques com són ara la paret cel·lular, el DNA i l'RNA. El mecanisme exacte d'acció de l'ECP és avui encara una incògnita. A més, si es té en compte que la relació entre l'activitat enzimàtica i citotòxica varia en funció del tipus de diana ens podem plantejar que l'ECP té diferents mecanismes d'actuació depenent de si actua sobre bacteris, paràsits, cèl·lules de mamífer o virus.

## 2.6 Possibles aplicacions terapèutiques de l'ECP

El problema de la creixent resistència dels microbis als antibiòtics clàssics urgeix el desenvolupament de nous agents antimicrobians. Els pèptids bactericides són components importants de la resposta innata d'organismes superiors (Boman i col·l.,1995), i han sorgit com una nova classe d'agents terapèutics per complementar els antibiòtics existents o utilitzar-los com a alternativa. La gran varietat d'estructures, mecanismes d'acció i ampli espectre d'activitat tòxica d'aquests pèptids obre un gran ventall de possibilitat per al desenvolupament de noves estratègies terapèutiques.

La utilització d'aquests pèptids com a agents clínics presenta, però, dos inconvenients principals; la poca selectivitat pel tipus cel·lular de molts d'aquests pèptids, que dificultaria la seva administració sistèmica, i la reacció immunològica que produeix a l'hoste. Les característiques de l'ECP il·lustren la potencialitat i problemàtica del desenvolupament d'aquests nous fàrmacs. L'ECP en ser una proteïna humana produiria una resposta immunològica menor al pacient en comparació a l'administració de proteïnes que provenen d'altres espècies. El gran ventall d'activitats tòxiques d'aquesta molècula permet plantejar-se la seva possible utilització en el tractament d'infeccions per bacteris, paràsits o virus. Això no obstant, la toxicitat de l'ECP per

cèl·lules de l'hoste (teixit nerviós i epitel·li de la tràquea, entre altres) en limita molt l'ús clínic (Youle i col·l.,1993).

S'han observat diferències en els requeriments estructurals per diferents dianes cel·lulars d'un mateix pèptid, per exemple, la pèrdua de l'estructura en hèlix- $\alpha$  dels pèptids antimicrobians mellitin i paradoxin comporta la pèrdua de l'activitat hemolítica però no bactericida (Oren i Shai 1998).

El coneixement dels diferents determinants estructurals de l'ECP implicats en la toxicitat per a cada tipus de diana (p. ex., els estudiats en aquesta tesi) i la seva relació amb el mecanisme d'acció permetria el disseny de toxines basades en regions de l'ECP implicades en la citotoxicitat per a un tipus cel·lular concret.

### 2.7 Funció fisiològica de l'ECP

L'estudi dels eosinòfils s'ha centrat principalment en els efectes perjudicials que tenen aquestes cèl·lules per a l'organisme en l'asma i altres malalties inflamatòries. El paper dels eosinòfils en la defensa de l'organisme és motiu de molta controvèrsia i el coneixement d'aquestes cèl·lules és encara avui molt incomplet. La funció clàssica que s'havia atorgat a aquestes cèl·lules és la defensa enfront de paràsits, però alguns treballs han demostrat que in vivo els eosinòfils no són els components principals de defensa davant d'helminths (Sher i col·l.,1990).

El paper dels eosinòfils en la immunitat enfront de bacteris no s'ha confirmat in vivo, tanmateix, la identificació de proteïnes en els grànuls dels eosinòfils amb activitat bactericida en diferents ordres animals (Watanabe i col·l.,1995, Lehrer i col. 1989, Fondati (2003) i Fondati i col 2004) fa pensar en una funció de defensa enfront d'infeccions bacterianes comuna per als eosinòfils de diferents espècies.

Els grànuls secundaris dels eosinòfils humans contenen quatre proteïnes (MBP, ECP, EDN i EPO) amb conegudes activitats citotòxiques. Una possible activitat sinèrgica entre elles no es pot descartar.

La relació entre la inflamació i el càncer es coneix des de l'any 1863. L'organisme respon al dany tissular amb una resposta inflamatòria que es caracteritza per una acumulació de cèl·lules inflamatòries, factors de creixement i agents que promouen el dany del material genètic que, sens dubte, potencien el risc de creixement tumoral (revisió a Coussens i col·l.,2002). L'activitat antiproliferativa de l'ECP en línies cel·lulars tumorals (Maeda i col·l.,2002 i resultats d'aquesta tesi) i, per extensió dels eosinòfils,

podria tenir algun paper en la disminució del risc de creixement cancerós en teixits sotmesos a inflamació crònica per eosinòfils.

Rosenberg i Domachowske (2001) proposen que els eosinòfils, gràcies a les dues ribonucleases dels seus grànuls (ECP i EDN), poden ser un component de la defensa enfront d'infeccions víriques.

L'estudi de les proteïnes dels grànuls dels eosinòfils pot ajudar a entendre la funció fisiològica dels eosinòfils.

## BIBLIOGRAFIA

Andreu, D. & Rivas, L. (1998) Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers*. **47**, 415-433.

Ardelt, W., Mikulski, S. M. & Shogen, K. (1991) Amino acid sequence of an anti-tumor protein from *Rana pipiens* oocytes and early embryos. Homology to pancreatic ribonucleases. *J. Biol. Chem.* **266**, 245-251

Boix, E. (2001) Eosinophil cationic protein. *Methods. Enzymol.* **341**, 287-305

Boix, E., Wu, Y., Vasandani, V. M., Saxena, S. K., Ardelt, 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., 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

Boman, H. G. (1995) Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 61-92

Christensen, B., Fink, J., Merrifield, R. B. & Mauzerall, D. (1988) Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 5072-5076.

Coussens, L. M. & Werb, Z. (2002) Inflammation and cancer. *Nature.* **420**, 860-867.

D'Alessio, G., Di Donato, A., Mazzarella, L. & Piccoli, R. (1997) Seminal ribonucleases: the importance of diversity a "Ribonucleases: Structures and Functions" (D'Alessio, G & Riordan, J.F., eds), pp. 383-423. Academic Press, New York

Dijkstra, A. J. & Keck, W. (1996) Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport. *J. Bacteriol.* **178**, 5555-5562

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. Res.* **26**, 3358-3363

Fondati, A (2003) Pathogenetic studies on feline eosinophilic granuloma complex. *Tesis doctoral.* Universitat Autònoma de Barcelona

Fondati, A. Carreras, E. Fondevila, M. D. Ferrer, Ll. Cuchillo C. M. and Nogués M. V. Characterization of biological activities of feline eosinophil granule proteins A.J.V.R. In press.

Fredens, K., Dybdahl, H., Dahl, R. & Baandrup, U. (1988) Extracellular deposit of the cationic proteins ECP and EPX in tissue infiltrations of eosinophils related to tissue damage. *APMIS* **96**, 711-719

- Friedrich, C. L., Moyles, D., Beveridge, T. J. & Hancock, R. E. (2000) Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **44**, 2086-2092
- Gleich, G. J., Adolphson, C. R., Leiferman, K. M. (1993) The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu. Rev. Med.* **44**, 85-101
- Grebski, E., Graf, Ch., Hinz, G., Wüthrich, B. & Medici, T. C. (1998) Eosinophil cationic protein in sputum is dependent on temperature and time. *Eur. Respir. J.* **11**, 734-737
- Harder, J. & Schröder, J. M. (2002) RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J. Biol. Chem.* **48**, 46779-46784
- Hayashida, M., Fujii, T., Hamasu, M., Ishiguro, M. & Hata Y. (2003) Similarity between protein-protein and protein-carbohydrate interactions, revealed by two crystal structures of lectins from the roots of pokeweed. *J. Mol. Biol.* **334**, 551-565
- Iordanov, M. S., Ryabinina, O. P., Wong, J., Dinh, T-H., Newton, D. L., Rybak, S. M. & Magun, B. E. (2000) Molecular determinants of apoptosis induced by the cytotoxic ribonuclease onconase: evidence for cytotoxic mechanisms different from inhibition of protein synthesis. *Cancer. Res.* **60**, 1983-1994
- Irie, M., Nitta, K. & Nonaka, T. (1998) Biochemistry of frog ribonucleases. *Cell. Mol. Life. Sci.* **54**, 775-784.
- Jahnsen, F. L., Brandtzaeg, P. & Halstensen, T. S. (1994a) Monoclonal antibody EG2 does not provide reliable immunohistochemical discrimination between resting and activated eosinophils. *J. Immunol. Methods.* **175**, 23-36
- Jahnsen, F. L., Halstensen, T. S. & Brandtzaeg, P. (1994b) Erroneous immunohistochemical application of monoclonal antibody EG2 to detect cellular activation. *Lancet.* **344**, 1514-1515 (Letter)
- Jahnsen, F., Halstensen, T. S. & Brandtzaeg, P. (1995) Immunostaining with monoclonal antibodies to eosinophil cationic protein (EG1 and EG2) does not distinguish between resting and activated eosinophils in formalin-fixed tissue specimens. *Adv. Exp. Med. Biol.* **371A**, 283-286
- Kimata, H., Yoshida, A., Ishioka, C., Jiang, Y. & Mikawa, H. (1992) Eosinophil cationic protein inhibits immunoglobulin production and proliferation *in vitro* in human plasma cells. *Cell. Immunol.* **141**, 422-432
- Klimek, L. & Rasp, G (1999) Norm values for eosinophil cationic protein in nasal secretions: influence of specimen collection. *Clin. Exp. Allergy.* **29**, 367-374
- Lehrer, R. I., Szklarek, D., Barton, A., Ganz, T., Hamann, K. J. & Gleich, G. J. (1989) Antibacterial properties of eosinophil major basic protein and eosinophil cationic protein. *J. Immunol.* **142**, 4428-4434
- 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

- Mallorqui-Fernández, G., Pous, J., Peracaula, R., Aymami, J., Maeda, T., Tada, H., Yamada, H., Seno, M., de Llorens, R., Gomis-Ruth, F. X. & Coll, M. (2000) Three-dimensional crystal structure of human eosinophil cationic protein (RNase 3) at 1.75 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **300**, 1297-1307
- Mancheño, J. M., Gasset, M., Oñaderra, M., Gavilanes, J. G. & D'Alessio, G. (1994) Bovine seminal ribonuclease destabilizes negatively charged membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 119-124
- Mastronicola, M. R., Piccoli, R. & D'Alessio, G. (1995) Key extracellular and intracellular steps in the antitumor action of seminal ribonuclease. *Eur. J. Biochem.* **230**, 242-249
- Motojima, S., Frigas, E., Loegering, D. A. & Gleich, G.J. (1989) Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium in vitro. *Am. Rev. Respir. Dis.* **139** 801-805
- Murthy, B. S., De Lorenzo, C., Piccoli, R., D'Alessio, G. & Sirdeshmukh, R. (1996) Effects of protein RNase inhibitor and substrate on the quaternary structures of bovine seminal RNase. *Biochemistry.* **35**, 3880-3885
- Nakajima, H., Loegering, D. A., Kita, H., Kephart, G. M. & Gleich, G. J. (1999) Reactivity of monoclonal antibodies EG1 and EG2 with eosinophils and their granule proteins. *J. Leukoc. Biol.* **66**, 447-454
- Oren, Z. & Shai, Y. (1998) Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers.* **47**, 451-463
- Peterson, A. A., Fesik, S. W. & McGroarty, E. J. (1987) Decreased binding of antibiotics to lipopolysaccharides from polymyxin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **31**, 230-237
- Piers, K. L. & Hancock, R. E. (1994) The interaction of a recombinant cecropin/melittin hybrid peptide with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **12**, 951-958
- Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P. & Shai, Y. (1992) Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry.* **31**, 12416-12423
- Ricard-Blum, S., Feraud, O., Lortat-Jacob, H., Rencurosi, A., Fukai, N., Dkhissi, F., Vittet, D., Imbert, A., Olsen, B. R. & Van Der Rest, M. (2004) Characterization of endostatin binding to heparin and heparan sulfate by surface plasmon resonance and molecular modeling: role of divalent cations. *J. Biol. Chem.* **279**, 2927-2936
- Rosenberg, H. F. & Domachowske, J. B. (2001) Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. *J. Leukoc. Biol.* **70**, 691-698
- Rosenberg, H. F. & Dyer, K. (1995) Eosinophil cationic protein and eosinophil-derived neurotoxin. Evolution of novel function in a primate ribonuclease gene family. *J. Biol. Chem.* **270**, 21539-21544

Rosenberg, H. F. & Tiffany, H. L. (1994) Characterization of the eosinophil granule proteins recognized by the activation-specific antibody EG2. *J. Leukoc. Biol.* **56**, 502-506

Rybak, S. M. & Newton, D. L. (1999) Natural and engineered cytotoxic ribonucleases: therapeutic potential. *Exp. Cell. Res.* **253**, 325-335

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

Sher, A., Coffman, R. L., Hieny, S. & Cheever, A. W. (1990) Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. *J. Immunol.* **145**, 3911-3916.

Sinatra, F., Callari, D., Viola, M., Longombardo, M. T., Patania, M., Litrico, L., Emmanuele, G., Lanteri, E., D'Alessandro, N. & Travali, S. (2000) Bovine seminal RNase induces apoptosis in normal proliferating lymphocytes. *Int. J. Clin. Lab. Res.* **30**, 191-196

Sitaram, N & Nagaraj, R. (1999) Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. *Biochim. Biophys. Acta.* **1462**, 29-54

Tai, P.-C., Spry, C. J., Peterson, C., Venge, P. & Olsson, I (1984) Monoclonal antibodies distinguish between storage and secreted forms of eosinophil cationic protein. *Nature* **309**, 182-184

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

Wallace, B. A. & Janes, R. W. (1999) Tryptophans in membrane proteins. X-ray crystallographic analyses. *Adv. Exp. Med. Biol.* **467**, 789-799

Watanabe, M., Nittoh, T., Suzuki, T., Kitoh, A., Mue, S. & Ohuchi, K. (1995) Isolation and partial characterization of eosinophil granule proteins in rats--eosinophil cationic protein and major basic protein. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* **108**, 11-18

Wimley, W. C. & White, S. H. (1993) Membrane partitioning: distinguishing bilayer effects from the hydrophobic effect. *Biochemistry* **32**, 6307-6312

Wimley, W. C. & White, S. H (1996) Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 842-848

Wu, M., Maier, E., Benz, R. & Hancock, R. E. (1999) Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **38**, 7235-7242

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

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

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

Zhang, J., Dyer, K. D. & Rosenberg, H. F. (2002) RNase 8, a novel RNase A superfamily ribonuclease expressed uniquely in placenta. *Nucleic. Acids. Res.* **30**, 1169-1175

Zhang, J., Dyer, K. D. & Rosenberg, H. F. (2003) Human RNase 7: a new cationic ribonuclease of the RNase A superfamily. *Nucleic. Acids. Res.* **31**, 602-607



## CONCLUSIONS

1. S'ha obtingut un anticòs policlonal per a l'ECP a partir d'un pèptid sintètic d'una regió específica de la proteïna (aminoàcids D112-P123).

2. L'anticòs D112-P123 reconeix específicament l'ECP en condicions reductores i no reductores i no té reactivitat creuada amb l'altra RNasa d'eosinòfil, l'EDN, amb la qual comparteix un 67% d'homologia de seqüència, ni amb l'RNasa A ni amb altres proteïnes control.

3. L'anticòs D112-P123 pot detectar les formes natives glicosilades i no glicosilades de l'ECP en fluids corporals i granulòcits.

4. L'ECP, a diferència de l'EDN i l'RNasa A, pot desestabilitzar vesícules lipídiques i aquest efecte augmenta amb la càrrega negativa neta de les membranes sintètiques.

5. S'han construït proteïnes modificades en els aminoàcids catiònics i aromàtics més exposats de la superfície de la proteïna i en la regió del bucle D115-Y122.

6. L'anàlisi de l'estructura tridimensional dels mutants estudiats indica que no s'han produït alteracions importants en l'estructura de la molècula.

7. Les variants de l'ECP que hem obtingut no modifiquen de forma important els paràmetres cinètics i, per tant, els canvis en les activitats biològiques que s'observa en els mutants respecte de l'ECP salvatge no s'expliquen per canvis en l'activitat ribonucleasa.

8. Els aminoàcids de la proteïna que s'han implicat en les activitats bactericides i citostàtiques es poden relacionar amb la seva funció en la desestabilització de membranes sintètiques i/o amb la interacció amb altres dianes de la superfície cel·lular.

## Conclusions

---

9. L'ECP conté residus que poden interaccionar amb components comuns de la superfície cel·lular d'eucariotes i procariotes (bicapa lipídica) i residus que interaccionen amb components específics de cada tipus cel·lular.

10. La regió W35R36 té un paper principal en l'activitat desestabilitzadora de membranes de l'ECP que coincideix amb una funció central d'aquesta regió en les activitats bactericides per grampositius i gramnegatius i d'inhibició de la proliferació de línies cel·lulars tumorals de la proteïna.

11. El W10 (l'altre triptòfan de la proteïna) i els aminoàcids catiónics R101R104 participen en la disrupció de membranes i contribueixen d'igual manera en la inhibició de la proliferació de línies cel·lulars tumorals.

12. L'activitat bactericida de l'ECP depèn tant de residus amb una acció sobre la desestabilització de membranes, W35R36 i W10 per a *S. aureus* i W35R36 i R101R104 per a *E.coli*, com de residus que interaccionen amb altres dianes cel·lulars, regió 115-122 en *S. aureus* i R75F76 en *E. coli*.

13. L'activitat citostàtica de l'ECP sobre cèl·lules de mamífer es deu en part a les regions on es troben els dos Trp de la proteïna (W10 i W35), que tenen una funció en l'activitat sobre membranes i, secundàriament, a altres regions on hi ha aminoàcids aromàtics i/o catiónics, R101R104, R75F76, regió 115-122, i específicament, Y122, probablement implicats amb la interacció de la proteïna amb els carbohidrats de la superfície cel·lular.