

DISSENY, CONSTRUCCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE ZIMÒGENS DE RIBONUCLEASES

Mariona CALLÍS i FIGUERES

Dipòsit legal: Gi. 976-2015
<http://hdl.handle.net/10803/293044>

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

tesi doctoral

DISSENY,
CONSTRUCCIÓ
I CARACTERITZACIÓ
DE ZIMÒGENS
DE RIBONUCLEASES

mariona callís i figueres

2015

Tesi Doctoral

Disseny, construcció i caracterització de zimògens de ribonucleases

Mariona Callís i Figueres - 2015
Ciències Experimentals i Sostenibilitat

| | |
|---|--|
| <p>Dirigida per</p> <p>Dra. Maria Vilanova Brugués Catedràtica de Bioquímica i Biologia Molecular</p> | <p>Dirigida per</p> <p>Dr. Marc Ribó i Panosa Professor Titular de Bioquímica i Biologia Molecular</p> |
|---|--|

Memòria presentada per optar al títol de doctora per la Universitat de Girona

Aquesta tesi ha estat realitzada amb el suport del Ministerio de Educación y Ciencia (beca AP2006-00808 i projecte BFU2006-15543-CO2-02/BMC) i del Ministerio de Ciencia e Innovación (projecte BFU2009-06935/BMC).

ARA MATEIX

Ara mateix enfilo aquesta agulla
amb el fil d'un propòsit que no dic
i em poso a apedaçar. Cap dels prodigis
que anunciaven taumaturgs insignes
no s'ha complert, i els anys passen de pressa.
De res a poc, i sempre amb vent de cara,
quin llarg camí d'angoixa i de silencis.
I som on som; més val saber-ho i dir-ho
i assentar els peus en terra i proclamar-nos
hereus d'un temps de dubtes i renúncies
en què els sorolls ofeguen les paraules
i amb molts miralls mig estraferem la vida.
De res no ens val l'enyor o la complanta,
ni el toc de displicent malenconia
que ens posem per jersei o per corbata
quan sortim al carrer. Tenim a penes
el que tenim i prou: l'espai d'història
concreta que ens pertoca, i un minúscul
territori per viure-la. Posem-nos
dempeus altra vegada i que se senti
la veu de tots solemnement i clara.
Cridem qui som i que tothom ho escolti.
I en acabat, que cadascú es vesteixi
com bonament li plagui, i via fora!,
que **tot està per fer i tot és possible.**

Miquel Martí i Pol

Als meus pares i germans. I a en Pere.

Agraïments

En tots aquests anys de tesi doctoral dilatada, és elevada la probabilitat de creuar-se amb gent, i s'accentua més si es tracta d'una vida activa. Combinant la realització de la tesi doctoral amb mil i una activitats, i mil i un canvis i situacions personals, és molta, doncs, la gent que m'ha fet ser qui sóc i com sóc, i que m'ha recolzat, ajudat i animat, directament o sense saber-ho. Sense tots vosaltres aquesta tesi no hauria estat possible.

Primer de tot, vull agrair-vos a tu, Maria, i a tu, Marc, la confiança dipositada en mi, fins i tot abans d'acabar la carrera de Biologia, i l'oportunitat que m'heu donat per realitzar una tesi doctoral sota la vostra direcció, podent treballar i conèixer el món de la recerca de prop. Junt amb vosaltres, també tu Toni, per respondre dubtes de bioquímica i temes científics, però també per les complicitats i comprensió en altres temes de la vida, per la proximitat i els ànims i bons consells. Perquè considero que són característiques importants a remarcar d'aquests tres "jefes" que m'heu acompanyat. També cal agrair la dedicació, bona acollida i ajuda aportada d'altres persones en algun dels estudis d'aquest treball, com la Susanna, en la part de microscòpia confocal a l'Autònoma, la Glòria, en els estudis dels zimògens en cèl·lules transfectades, a irsiCaixa, i la Soraya per la resolució estructural d'un dels zimògens. I també, important en aquesta part final, als informàtics de la UdG per ajudar-me en les múltiples jugades del senyor Murphy.

Els meus companys de laboratori de *BQ107*. Vosaltres, Imma, Gerard, Pere, Jess. I Roger, Anna, David, Santi, Vero i Glòria. Cada un de vosaltres m'ha acompanyat en diferents moments de la tesi, i alguns en la seva totalitat. Gràcies als primers, per facilitar-me els primers contactes a un laboratori. I gràcies a tots, sobretot a en Roger, en David i l'Anna, i recentment a en Santi, que són amb qui he compartit més estones (*pupil·los*, que m'heu passat a davant! Hehe), pels bons moments que hem viscut junts, els esmorzars, dinars i sopars, i els tocs-tes-cervesetes compartits, les anades d'olla, les penes i consells, les xerrades, les xafarderies, les posades al dia,... Perquè tots heu estat de tan gran ajuda en molts moments, tant a nivell laboral com personal. També a vosaltres, veïnes del 105 i companys de passadís de biologia, en especial al Papu Gros i la Gaxi, en els inicis, per ser tan inclusius i fer tan fàcil això d'entrar a un grup nou. Per tots els sopars, i les agradables estones i converses dels migdies, que han omplert aquests anys de doctorat d'experiències per recordar.

Reculant en el temps, no vull deixar passar l'oportunitat d'agrair-vos també a certes persones la redescoberta de l'encant per la ciència i la natura que m'heu fet viure, com vosaltres, companys dels cursos de doctorat, en especial tu Sasha, per compartir amb mi múltiples inquietuds, l'interès i la part divertida de la ciència; i companys de carrera que mai oblidaré, com vosaltres, Arantxa, Eloi, Miguel, Albert, Josep, Georgina, Ariana, Raquel, Maria, Víctor,... i en especial la Laia, entre riallada i riallada, comentant els avenços al laboratori en vespres d'estiu de passadís compartit i música alta, combinat amb censos de granotes, de papallones, amunt i avall, fent màgics molts moments. Entre tots vau aconseguir mantenir-me i augmentar-me la passió i fascinació per la natura de quan era petita i no tan petita. I abans de la carrera, a Batxillerat, vas ser tu, Pili, la que em vas fer decantar cap aquest camp gràcies a la

teva passió encomanadissa per la bioquímica. I encara més abans, és gràcies a tu, papa, que amb els mil llibres de ciència que corren per casa i la teva capacitat d'observació ens has fet descobrir i estimar la vida que ens envolta.

Aquesta tesi també va dirigida a vosaltres, amb qui compartim la passió per la música. Perquè m'heu permès una desconexió del laboratori, a vegades tan i tan necessària. D'una banda, *Cor de Teatre* i tots els que ho som i ens hi sentim, perquè he fet un camí més llarg amb vosaltres que sense, ara ja. Alguns m'heu vist créixer, estant en la meua vida des de molt abans de començar aquesta tesi, i m'heu fet costat malgrat no entendre què faig amb els "papus". En especial a la Lali, per la teua preocupació maternal i pel teu suport. Per altra banda, a la *Família d'Àkan*. Perquè vosaltres, el Cor i l'Associació Àkan, heu estat, des del primer moment, un aprenentatge per a mi. Perquè sense saber-ho, m'heu ajudat a tirar endavant en moments complicats. Gràcies a tots: sou un gran exemple, lluitadors, positius, crítics, esperançadors. Gràcies per haver confiat en mi i haver-me ajudat a millorar a nivell humà. A tu Albert, que m'acompanyes per aquesta vida des de fa temps, entre cantades, concerts, confessions, dubtes i consells. I finalment, als que us heu afegit més recentment en la meua vida musical, fent que aquest final de tesi hagi resultat tan i tan intens. Als de *Cor de Teatre – Joves*, a *Les Marín*, i a les *De Calaix*, pel vostre bolangerisme i alegria contagiosa! Gràcies doncs a tots, perquè allò de que "qui canta els seus mals espanta", pot ser veritat quan hi ha gent com vosaltres al voltant.

També gràcies a tu Joan, pel teu saber i respecte, amic. I per creure en mi tantes vegades. A tu Quim, pels cafès, en aquestes últimes etapes de la tesi, i per l'exemple que ets de treball i rigor, combinat amb una millor persona. I a tu, Quim, per entendre'm tan bé tantes vegades només d'entrar per la porta, i a part d'ensenyar-me a cantar, ensenyar-me a viure, ara i aquí, i mostrar-me una altra manera de fer front als problemes.

A vosaltres, la meua colla d'amigues, Sònies, Laura, Raquel, Imma, Aina, Marta, Eva, Neus. Amb qui anem compartint vivències des de l'institut, i que porteu ja massa temps sentint a parlar de la tesi - la tesi - la tesi... Gràcies per aguantar-me els nervis a vegades, i per entendre la meua poca disponibilitat tan sovint i, malgrat tot, ser-hi sempre quan us necessito. Gràcies per la vostra amistat. Espero poder seguir compartint estones i fer un sopar de celebració!

Gràcies també a tu Arcadi, amb qui vam compartir tants anys de la nostra joventut, per haver-me ajudat a ser qui sóc, creixent i madurant plegats, i per ensenyar-me tantes coses. Perquè ja et va tocar sentir a parlar de forma recurrent d'aquesta tesi, als seus inicis. I també a tu Ramon, perquè malgrat el poc temps intens compartit, em vas tornar part de la meua alegria en moments que no m'eren fàcils. I perquè una bona ballaruga ho solucionava tot.

I a vosaltres, les meues nenes, Anna i Iona, per tantes penes compartides i afogades dins les *fondues* de xocolata. Que puguem seguir compartint moments ara que les *fondues* ja no fan tanta falta. Per les posades al dia i pels ànims que m'heu anat enviant, recordant-vos de mi sovint, en aquest esprint final de tancada a casa. Perquè sense vosaltres, aquests últims anys haurien estat molt diferents. En especial a l'Anna, amb qui portem molts anys juntes a l'esquena, i amb qui espero arribar a compartir caminades amb bastó d'aquí a molt temps.

Hi ha hagut moments en què la culminació d'aquesta tesi semblava que mai arribaria. I, mirant aquest recull de fulls de paper, probablement la majoria no podreu entendre tot el pes que suposen i que porten implícit. Segurament només els que em sou més més propers, i que heu patit de ben a prop la meva mala lluna i els meus nervis, podeu entendre una mica tot això. Finalment, i guardant-me el bo i millor pel final, com faig sempre, vull agrair a aquelles persones que han possibilitat que hagi arribat fins aquí, i sense els quals la meva vida no tindria sentit. A vosaltres, la meva família.

Gràcies als meus tiets Carles i Imma, per l'exemple que sou de persona i de parella, i pel recolzament que m'heu ofert tantes vegades, fins i tot a hores intempestives, i als meus cosins, Carles i Mariona, per les ganes i empenedoria que teniu, i per la confiança que dipositeu en mi. I a tu tieta, i padrina, Dolors. Per treure pes als assumptes, i tenir sempre una conversa a punt. Per rebre'm sempre tan bé a casa teva amb les portes obertes, com si fos una filla.

Jeppi i Imma, i vosaltres, Ariunaa i Litus, els meus germans, perquè heu sabut animar-me moltes vegades, i m'heu ofert grans consells en aquesta vida. No acabaria mai d'agrar-vos les xerrades... I perquè a vegades també cal sentir les veritats tal i com ragen, encara que jo no sàpiga reaccionar. Als meus nebots, Carla, Queralt, Mixeel i Oliba, el meu fillol, que porteu l'alegria dels més joves a casa, i que malgrat que fa impossible venir a treballar a cals papes, sempre fa somriure tenir-vos al voltant. En especial, Carla, vull agrair-te les teves grans mostres d'estima malgrat la teva joventut, i per preocupar-te quan m'has vist nerviosa o trista, portant-me fins i tot a passeig per a distreure'm. Perquè són coses que no oblidaré mai. El proper cine convidó jo!

A tu, Pere, perquè malgrat que encara no ens hem posat d'acord de qui va buscar primer a qui, sempre m'has deixat molt clar que sóc important per a tu i que m'estimes. Gràcies per ser-hi, per aguantar-me, per animar-me, per mimar-me, per cuidar-me... i per les demostracions d'afecte. Per les caminades quan m'enfilo per les parets, i per suportar les visites al mar quan necessito veure'l. Perquè ningú em pot entendre millor que tu en aquests moments de finalització de la tesi. Gràcies per saber-me i, sobretot, voler-me entendre. Perquè malgrat la meva gran exigència, sé que t'esforces amb tot el que pots i ho superes amb escreix, tot i que a vegades no t'ho sembli. T'estimo. M'acompanyes?

I sobretot, el meu agraïment més gran als meus pares, Concepció i Josep, per haver-me donat tot i més, una formació i uns valors i inquietuds dels quals n'estic orgullosa, i per estar al meu costat donant-me el vostre suport, il·lusió i amor incondicional i indiscutible, en els bons i mals moments, amb paciència, preocupant-vos i oferint-vos pel que fes falta. Tot aquest temps de la tesi. I des de que vaig néixer.

ÍNDEX GENERAL

| | |
|---|------------|
| ÍNDEX GENERAL | I |
| ÍNDEX DE FIGURES | V |
| ÍNDEX DE TAULES | VI |
| ÍNDEX D'EQUACIONS | VI |
| LLISTA D'ABREVIATURES | VII |
| PUBLICACIONS DERIVADES D'AQUESTA TESI DOCTORAL | IX |
| | |
| 1. RESUM | 3 |
| SUMMARY | 4 |
| RESUMEN | 5 |
| | |
| 2. INTRODUCCIÓ | 9 |
| 2.1. REGULACIÓ DE LA FUNCIÓ PROTEICA | 9 |
| 2.1.1. SÍNTESI PROTEICA I TRANSPORT AL LLOC DEL REQUERIMENT | 9 |
| Síntesi proteica: transcripció i traducció. | 9 |
| Compartimentalització i transport. | 10 |
| 2.1.2. EFECTE DE FACTORS AMBIENTALS | 10 |
| 2.1.3. UNIÓ AMB ALTRES MOLÈCULES I GRUPS | 11 |
| Unió no-covalent a molècules efectores: activadors i inhibidors. | 11 |
| Unió covalent amb grups o biomolècules. | 11 |
| 2.1.4. PROTEÒLISI | 12 |
| Proteòlisi dirigida. | 12 |
| Tall i unió proteic. | 12 |
| Proteòlisi limitada i síntesi de zimògens. | 12 |
| 2.2. LES RIBONUCLEASES (RNases) | 14 |
| 2.2.1. DENOMINACIÓ DE LES RIBONUCLEASES | 15 |
| 2.2.2. FUNCIONS I FUNCIONS BIOLÒGIQUES ESPECIALS | 16 |
| 2.2.3. RIBONUCLEASES CITOTÒXIQUES I MECANISME DE CITOTOXICITAT | 16 |
| 2.2.3.1. RNases amb citotoxicitat natural: L'ONCONASA® | 18 |
| A) Estructura i particularitats de l'ONC | 19 |
| B) Activitat catalítica i subsetis de l'ONC | 23 |
| C) Citotoxicitat de l'ONC i mecanisme citotòxic | 26 |
| D) L'ONC com a agent quimioterapèutic en clínica humana | 28 |
| 2.2.3.2. RNases citotòxiques mitjançant enginyeria de proteïnes: l'HP-RNasa | 28 |
| A) Estructura tridimensional | 29 |
| B) Interacció de l'HP-RNasa amb l'RI d'origen humà (hRI) | 30 |
| C) Activitat catalítica i funció de l'HP-RNasa | 32 |
| D) L'HP-RNasa com a agent terapèutic | 33 |
| E) Variants d'HP-RNasa citotòxiques | 33 |
| F) La variant més estable PM5 | 34 |
| 2.3. LA SÍNDROME DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA ADQUIRIDA (SIDA) | 35 |
| 2.3.1. EL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA (HIV) | 35 |

| | |
|---|-----------|
| Grups i variants de HIV. | 36 |
| Genoma i precursors poliproteínics. | 37 |
| Cicle viral. | 39 |
| Esgotament del sistema immunitari. | 39 |
| Latència del HIV. | 41 |
| Reservoris del HIV. | 41 |
| 2.3.2. LA PROTEASA DEL HIV (HIV-1 PR) | 42 |
| Estructura general de HIV-1 PR. | 42 |
| Substis de la proteasa i tipologies de substrat. | 43 |
| Dianes naturals de la proteasa. | 44 |
| Condicions òptimes i d'estudi de l'activitat. | 45 |
| 2.3.3. TERÀPIA ANTIRETROVIRAL I NOVES ESTRATÈGIES D'APROXIMACIÓ A LA CURA FUNCIONAL DE LA SIDA | 46 |
| Teràpia antiretroviral de gran activitat (HAART). | 46 |
| Tractament de 'xoc i mort'. | 47 |
| Millora i estimulació del sistema immunitari. | 48 |
| Teràpia gènica. | 48 |
| Silenciament permanent del reservori. | 48 |
| Vacunes. | 49 |
| Biomarcadors. | 49 |
| 2.3.4. RIBONUCLEASES EN LA TERÀPIA CONTRA EL VIRUS DE LA SIDA | 50 |
| 2.4. ZIMÒGENS DE RIBONUCLEASES | 51 |
| 3. OBJECTIUS | 55 |
| 4. METODOLOGIA | 59 |
| 4.1. MATERIALS | 59 |
| 4.1.1. MATERIAL NO BIOLÒGIC | 59 |
| 4.1.2. MATERIAL BIOLÒGIC | 59 |
| 4.1.2.1. Soques bacterianes | 59 |
| 4.1.2.2. Vectors procariotes | 60 |
| 4.1.2.3. Línies cel·lulars eucariotes | 61 |
| 4.2. PROTOCOLS GENERALS ESTÀNDARDS | 62 |
| 4.2.1. MÈTODES MICROBIOLÒGICS | 62 |
| 4.2.1.1. Medis de Cultiu i preparació | 62 |
| 4.2.1.2. Antibiòtics | 62 |
| 4.2.1.3. Cultius Líquids de Soques Bacterianes | 63 |
| 4.2.1.4. Manteniment de les Soques | 63 |
| 4.2.2. CULTIU DE CÈL·LULES EUCARIOTES | 64 |
| 4.2.2.1. Medis de Cultiu | 64 |
| 4.2.2.2. Expansió de línies cel·lulars | 64 |
| 4.2.2.3. Congelació i descongelació de les línies cel·lulars | 65 |
| 4.2.2.4. Recompte del nombre de cèl·lules | 66 |
| 4.2.3. TÈCNIQUES DE DNA RECOMBINANT | 67 |
| 4.2.3.1. Manipulació del DNA | 67 |
| 4.2.3.2. Obtenció de DNA Plasmídic (Minipreps) | 67 |
| 4.2.3.3. Electroforesi de DNA en Gel d'Agarosa | 68 |
| 4.2.3.4. Purificació de Fragments de DNA a Partir de Gels d'Agarosa (GeneClean) | 68 |
| 4.2.3.5. Precipitació del producte de PCR | 69 |

| | |
|--|------------|
| 4.2.3.6. Estimació Espectrofotomètrica de la Concentració de DNA | 69 |
| 4.2.3.7. Utilització d'Enzims que Modifiquen el DNA | 69 |
| 4.2.3.8. Mutagènesi Dirigida per Oligonucleòtid per <i>QuikChangeTM</i> | 70 |
| 4.2.3.9. Seqüenciació de DNA | 72 |
| 4.2.3.10. Obtenció de Cèl·lules Competents d' <i>E. coli</i> | 74 |
| 4.2.3.11. Transformació de cèl·lules competents d' <i>E. coli</i> | 75 |
| 4.2.4. ANÀLISI I CARACTERITZACIÓ PROTEICA | 75 |
| 4.2.4.1. Anàlisi de l'expressió de proteïnes en <i>E. coli</i> | 75 |
| 4.2.4.2. Determinació de la Massa Molecular (Mm) | 75 |
| 4.2.4.3. Determinació de la Quantitat de Proteïna | 76 |
| 4.2.4.4. Electroforesi Discontínua en Gel de Poliacrilamida | 77 |
| 4.3. PROCEDIMENTS ESPECÍFICS | 79 |
| 4.3.1. OBTENCIÓ DE LA PROTEASA SK#1 | 79 |
| 4.3.1.1. Construcció del vector d'expressió pSK#1 | 79 |
| 4.3.1.2. Producció i purificació de la proteasa SK#1 | 80 |
| 4.3.1.3. Caracterització cinètica de la proteasa recombinant SK#1 | 83 |
| 4.3.2. DISSENY, CONSTRUCCIÓ, PRODUCCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE ZIMÒGENS DE RIBONUCLEASES | 85 |
| 4.3.2.1. Disseny i modelats moleculars dels zimògens de ribonucleases | 86 |
| 4.3.2.2. Construcció dels vectors d'expressió dels zimògens de ribonucleases | 88 |
| A) Construcció de les variants i zimògens d'ONC. | 88 |
| B) Construcció dels zimògens d'HP-RNasa. | 91 |
| 4.3.2.3. Producció i purificació dels zimògens de ribonucleases | 92 |
| A) Producció i purificació dels zimògens d'ONC, ONC i ONCQ1S. | 95 |
| B) Producció i purificació dels zimògens d'HP-RNasa HGNs i PM5. | 96 |
| 4.3.2.4. Caracterització dels zimògens d'RNasa activables per la proteasa HIV-1 PR | 97 |
| Activació <i>in vitro</i> dels zimògens amb la proteasa SK#1. | 97 |
| Determinació de l'estabilitat conformacional dels zimògens. | 97 |
| Estudi de l'activitat ribonucleolítica dels zimògens. | 99 |
| Internalització dels zimògens en cèl·lules en cultiu. | 100 |
| Capacitat dels zimògens d'evadir l'inhibidor de ribonucleases (RI). | 101 |
| Citotoxicitat dels zimògens en cèl·lules en cultiu. | 101 |
| Estudis estructurals d'ONCFLG per Ressonància Magnètica Nuclear (NMR). | 103 |
| 5. RESULTATS | 109 |
| 5.1. OBTENCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE LA PROTEASA SK#1 | 109 |
| 5.1.1. Producció i purificació de la proteasa recombinant SK#1 | 109 |
| 5.1.2. L'activitat de la proteasa pròpia SK#1 és comparable a la comercial <i>recHIV-1</i> | 111 |
| 5.2. PRODUCCIÓ I CARACTERITZACIÓ DELS ZIMÒGENS BASATS EN ONC | 113 |
| 5.2.1. Disseny, producció i activació del zimogen ONCYP | 113 |
| 5.2.2. Optimització de l'eficiència d'activació. Disseny, producció i activació de noves variants de zimògens d'ONC: -YPs i -FLs | 116 |
| 5.2.3. Eficiència catalítica de les formes intacta i processada dels zimògens ONCFLs | 118 |
| 5.2.4. Disseny i anàlisi de l'activació i l'activitat de nous zimògens ONCFL2s | 121 |
| 5.2.5. Els zimògens d'ONC internalitzen eficientment i evadeixen l'RI <i>in vitro</i> | 122 |
| Internalització del zimogen ONCFLG-S120C. | 122 |
| Capacitat dels zimògens d'evadir l'inhibidor de ribonucleases (RI). | 122 |
| 5.2.6. Els zimògens d'ONC presenten baixa citotoxicitat en cèl·lules en cultiu | 124 |
| Citotoxicitat amb activació <i>in vitro</i> . | 124 |

| | |
|---|------------|
| Citotoxicitat amb activació <i>in vivo</i> , en cèl·lules transfectades. | 125 |
| 5.2.7. Estudi estructural i dinàmica del zimogen ONCFLG per NMR | 126 |
| Resolució de l'estructura tridimensional d'ONCFLG i canvis observats. | 126 |
| Unió d'un anàleg de substrat al zimogen ONCFLG. | 133 |
| La forma processada d'ONCFLG podria estar bloquejant l'accés del substrat al centre actiu. | 134 |
| El segment connector és la zona més dinàmica i flexible d'ONCFLG. | 134 |
| 5.2.8. L'estabilitat conformacional dels zimògens d'ONC és comparable a ONC | 136 |
| 5.3. PRODUCCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE ZIMÒGENS BASATS EN LA RIBONUCLEASA PANCREÀTICA HUMANA | 138 |
| 5.3.1. Disseny, producció i activació de zimògens HGNs basats en PM5 | 138 |
| 5.3.2. Les formes activades dels zimògens HGNs són inhibides per l'RI | 142 |
| 5.3.3. Creació del nou zimogen HGNFL-R31ER91D i anàlisi de la capacitat d'evasió de l'RI | 142 |
| 5.3.4. Anàlisi de la funcionalitat dels zimògens HGNs | 145 |
| Estudi de l'eficiència catalítica dels zimògens HGNs. | 145 |
| Citotoxicitat dels zimògens HGNs, amb activació <i>in vitro</i> . | 147 |
| 5.3.5. Estabilitat conformacional dels zimògens HGNs | 147 |
| | |
| 6. DISCUSSIÓ | 151 |
| A) OPTIMITZACIÓ DELS ZIMÒGENS D'ONC | 159 |
| A.I) Redisseny de la longitud i seqüència del connector. | 159 |
| A.II) Inserció de mutacions que incrementin l'eficiència catalítica. | 160 |
| A.III) Estudi de dianes addicionals a la seqüència connectora. | 160 |
| B) OPTIMITZACIÓ DELS ZIMÒGENS D'HP-RNASES HGNs | 161 |
| B.I) Estudi de dianes addicionals a la seqüència connectora de 15 residus. | 161 |
| B.II) Estudi de les mutacions R39ER91D per escapar a RI. | 162 |
| B.III) Millora de l'estabilitat global de les HP-RNases permutades. | 162 |
| C) ALTRES PUNTS D'ESTUDI | 163 |
| C.I) El HIV afecta a les propietats de la membrana plasmàtica, i podria afectar la capacitat d'internalització dels zimògens en cèl·lules infectades. | 163 |
| C.II) Els zimògens no haurien de ser activats per cap de les proteases humanes de l'interior de les cèl·lules sanes. | 164 |
| C.III) Estudi de la capacitat dels zimògens d'eliminació de reservoris virals. | 164 |
| | |
| 7. CONCLUSIONS | 169 |
| | |
| 8. BIBLIOGRAFIA | 173 |

ÍNDIX DE FIGURES

| | |
|---|-----|
| <i>Figura 1. Esquema dels mecanismes de regulació de la funció proteolítica.</i> | 13 |
| <i>Figura 2. Implicació de les ribonucleases en el flux de la informació biològica.</i> | 14 |
| <i>Figura 3. Mecanisme d'acció de les ribonucleases citotòxiques.</i> | 18 |
| <i>Figura 4. Comparativa entre les ribonucleases RNasa A, HP-RNasa i ONC.</i> | 20 |
| <i>Figura 5. Estructura de l'ONC: Residus implicats en l'estabilitat i la capacitat catalítica de l'enzim.</i> | 22 |
| <i>Figura 6. Cicllació de la glutamina (Gln1) a piroglutàmic (Pyr1).</i> | 24 |
| <i>Figura 7. Mecanisme de citotoxicitat de l'ONC.</i> | 26 |
| <i>Figura 8. Estructura i potencial electrostàtic del complex hRI-HP-RNasa.</i> | 31 |
| <i>Figura 9. Comparació de la variant PM5 respecte l'HP-RNasa salvatge.</i> | 35 |
| <i>Figura 10. Estructura d'una partícula viral del HIV.</i> | 36 |
| <i>Figura 11. Estructura del genoma viral, precursors poliproteínics i funció de la HIV-1 PR per a la obtenció de les proteïnes virals madures.</i> | 38 |
| <i>Figura 12. Cicle viral del HIV i punts d'actuació dels antiretrovirals més habituals.</i> | 40 |
| <i>Figura 13. Estructura de la proteasa HIV-1 PR.</i> | 43 |
| <i>Figura 14. Característiques necessàries per a un zimogen de ribonucleases òptim.</i> | 52 |
| <i>Figura 15. Fotografies de les línies cel·lulars eucariotes emprades a aquest treball, Jurkat i HEK293T.</i> | 61 |
| <i>Figura 16. Construcció de la proteasa SK#1.</i> | 81 |
| <i>Figura 17. Procés de purificació de la proteasa SK#1.</i> | 82 |
| <i>Figura 18. Esquema del substrat fluorogènic DABCYL-EDANS i l'Efecte d'Apantallament (IFE).</i> | 83 |
| <i>Figura 19. Esquema de les construccions base a obtenir mitjançant el procés de permutació circular.</i> | 87 |
| <i>Figura 20. Esquema del procés de construcció dels vectors d'expressió dels zimògens d'ONC.</i> | 90 |
| <i>Figura 21. Esquema del procés de construcció dels vectors d'expressió dels zimògens HGNs.</i> | 93 |
| <i>Figura 22. Esquema global del procés de purificació dels zimògens d'ONC i HP-RNasa.</i> | 96 |
| <i>Figura 23. Esquema del funcionament del substrat fluorogènic 6-FAM-dArUdAdA-6-TAMRA.</i> | 99 |
| <i>Figura 24. Cromatograma d'elució de la proteasa SK#1 a la cromatografia d'intercanvi catiònic HPLC.</i> | 111 |
| <i>Figura 25. Anàlisi electroforètic del procés de purificació de SK#1.</i> | 111 |
| <i>Figura 26. Representació gràfica de l'efecte IFE en la detecció de fluorescència i la seva correcció.</i> | 112 |
| <i>Figura 27. Comparativa de la caracterització cinètica de les proteases SK#1 i recHIV-1 PR.</i> | 113 |
| <i>Figura 28. Comparativa estructural dels zimògens d'ONC amb l'ONC salvatge.</i> | 116 |
| <i>Figura 29. Eficiència de tall dels zimògens d'ONC amb la proteasa SK#1 al llarg del temps.</i> | 119 |
| <i>Figura 30. Activitat ribonucleolítica relativa dels zimògens d'ONC respecte ONC salvatge, abans i després del tractament amb la proteasa SK#1.</i> | 120 |
| <i>Figura 31. Internalització d'ONCFLG-S120C conjugat amb el fluoròfor Alexa Fluor® 488 C5 maleimide</i> | 123 |
| <i>Figura 32. Inhibició de l'activitat ribonucleolítica dels zimògens d'ONC de l'estudi per part de l'hRI.</i> | 124 |
| <i>Figura 33. Corbes de citotoxicitat d'ONCFLG i ONCYPG1 amb activació in vivo.</i> | 125 |
| <i>Figura 34. Estructura tridimensional d'ONCFLG resolta per Ressonància Magnètica Nuclear (2LT5).</i> | 128 |
| <i>Figura 35. Canvis estructurals globals observats al zimogen ONCFLG en comparació amb l'ONC.</i> | 129 |
| <i>Figura 36. Comparació dels residus catalítics d'ONCFLG i de l'ONC lliure i acomplexada a un substrat.</i> | 131 |
| <i>Figura 37. Sobreposició de les conformacions dels residus del cluster hidrofòbic d'ONCFLG amb l'ONC.</i> | 132 |
| <i>Figura 38. Comparació dels ponts disulfur Cys18-Cys96 i Cys15-Cys32 d'ONCFLG amb l'ONC.</i> | 132 |
| <i>Figura 39. Dades de NMR i model estructural del zimogen ONCFLG escindit per la proteasa.</i> | 135 |
| <i>Figura 40. Dinàmica i estabilitat conformacional de les formes del zimogen ONCFLG.</i> | 136 |
| <i>Figura 41. Espectres DSC dels zimògens d'ONC.</i> | 137 |
| <i>Figura 42. Comparativa estructural dels zimògens HGNs amb la variant d'HP-RNasa PM5.</i> | 140 |
| <i>Figura 43. Activació dels zimògens HGNs amb la proteasa SK#1.</i> | 141 |

| | |
|--|------------|
| <i>Figura 44. Inhibició de l'activitat ribonucleolítica dels zimògens d'HP-RNasa per part de l'hRI.</i> | <i>142</i> |
| <i>Figura 45. Activació del zimogen HGNFL-R31ER91D amb la proteasa SK#1, al llarg del temps.</i> | <i>143</i> |
| <i>Figura 46. Comparativa del potencial electrostàtic del modelat del zimogen HGNFL-R31ER91D respecte la seva variant parental HGNFL, la proteïna salvatge HP-RNasa i l'ONC.....</i> | <i>144</i> |
| <i>Figura 47. Activitat ribonucleolítica relativa a PM5 dels zimògens d'HP-RNasa abans i després del tractament amb la proteasa SK#1.</i> | <i>146</i> |
| <i>Figura 48. Comparativa de la disposició del residu 23 entre ONC, ONC-M23L i ONCFLG.</i> | <i>161</i> |

ÍNDIX DE TAULES

| | |
|---|------------|
| <i>Taula 1. Denominació de les ribonucleases segons determinats paràmetres.....</i> | <i>15</i> |
| <i>Taula 2. Propietats de les RNases pancreàtiques estudiades a aquest treball.</i> | <i>19</i> |
| <i>Taula 3. Seqüències naturals reconegudes per la HIV-1 PR als precursors poliproteínics del HIV-1.</i> | <i>44</i> |
| <i>Taula 4. Punts d'estudi actuals per a l'assoliment de la cura funcional de la SIDA.....</i> | <i>49</i> |
| <i>Taula 5. Característiques generals de les línies cel·lulars utilitzades.</i> | <i>61</i> |
| <i>Taula 6. Coeficients d'extinció molar (280 nm) pel càlcul de concentració de les proteïnes estudiades. ..</i> | <i>76</i> |
| <i>Taula 7. Factors de correcció de l'IFE per a les diferents concentracions de substrat.....</i> | <i>84</i> |
| <i>Taula 8. Llistat dels zimògens produïts en aquest treball.</i> | <i>86</i> |
| <i>Taula 9. Oligonucleòtids utilitzats en la construcció dels vectors d'expressió de les proteïnes d'estudi....</i> | <i>94</i> |
| <i>Taula 10. Freqüències de codons de baixa utilització en procarïotes del gen de la proteasa HIV-1 PR. ...</i> | <i>110</i> |
| <i>Taula 11. Massa molecular teòrica i obtinguda per la proteasa SK#1 de l'estudi.</i> | <i>110</i> |
| <i>Taula 12. Paràmetres cinètics de la proteasa SK#1 pròpia comparada amb la comercial rechIV1-PR. ..</i> | <i>112</i> |
| <i>Taula 13. Llistat de les masses moleculars teòriques i obtingudes per les variants i zimògens d'ONC....</i> | <i>118</i> |
| <i>Taula 14. Anàlisi de l'estabilitat i funcionalitat dels zimògens d'ONC.</i> | <i>120</i> |
| <i>Taula 15. Estadística estructural de les 20 millors estructures NMR del zimogen ONCFLG.....</i> | <i>126</i> |
| <i>Taula 16. Llistat de les masses moleculars teòriques i obtingudes per les variants d'HP-RNasa.....</i> | <i>141</i> |
| <i>Taula 17. Anàlisi de l'estabilitat i funcionalitat dels zimògens d'HP-RNasa.</i> | <i>146</i> |

ÍNDIX D'EQUACIONS

| | |
|--|-----------|
| <i>Equació 1. Recompte de cèl·lules eucariotes en cultiu.</i> | <i>67</i> |
| <i>Equació 2. Càlcul de la Tm dels oligos en mutació dirigida.</i> | <i>72</i> |
| <i>Equació 3. Càlcul de la concentració proteica per espectrofotometria.....</i> | <i>76</i> |
| <i>Equació 4. Correcció de l'Efecte d'Apantallament Intern (IFE).</i> | <i>84</i> |
| <i>Equació 5. Equació de Michaelis-Menten.</i> | <i>85</i> |
| <i>Equació 6. Càlcul de k_{cat}/K_M.</i> | <i>99</i> |

LLISTA D'ABREVIATURES

| | | | |
|---------------------|--|--------------------------------------|---|
| Å | àngstrom | FL | seqüència diana de HIV-1 PR amb Phe i Leu al lloc de tall |
| δ | desplaçament químic | FL2 | seqüència diana amb 2 punts de tall per part de la HIV-1 PR, basada en FL |
| ΔG _{HX} | increment d'energia lliure a nivell de residu | fM | femtomolar |
| ε | coeficient d'extinció molar | FPLC | cromatografia líquida de baixa pressió |
| γ-Abu | àcid γ-aminobutíric | FRET | Transferència d'Energia de Fluorescència per Ressonància |
| μg | microgram | g | gram |
| μl | microlitre | GFP | Proteïna Verd Fluorescent |
| μm | micròmetre | Gnd-HCl | clorur de guanidini |
| μM | micromolar | GSH | glutatió reduït |
| °C | grau centígrad | GSSG | glutatió oxidat |
| 2D | bidimensional | h | hora |
| 3D | tridimensional | HAART | Teràpia antiretroviral de gran activitat |
| Abs | absorbància | HAND | desordre neurocognitiu associat al HIV |
| Act | forma activada o processada del zimogen. Ribonucleasa madura | HAT | histona-acetilasa |
| Amph | amfinasa | HDAC | histona-desacetilasa |
| ANG | angiogenina | HDACi | inhibidors de les HDACs |
| Ap | ampicil·lina | HEPES | àcid 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperaziniletansulfònic |
| ATI | interrupció del tractament antiretroviral | HGNs | zimògens construïts amb l'HP-RNasa PM5 com a base |
| ATP | adenosina-5'-trifosfat | HGNYP, HGNFL, HGNFL2, HGNFL-R31ER91D | variants de zimògens construïts amb PM5 com a base |
| BBB | barrera hematoencefàlica | HIV | Virus de la Immunodeficiència Humana |
| BMRB | <i>Biological Magnetic Resonance Bank</i> | HIV-1 | Virus de la Immunodeficiència Humana de tipus 1 |
| bNAb | anticòs neutralitzador genèric | HIV-1 PR | proteasa del Virus de la Immunodeficiència Humana de tipus 1 |
| BS-RNasa | Ribonucleasa bovina seminal | HP-RNasa | Ribonucleasa pancreàtica humana |
| BSA | Albúmina de sèrum boví | HPL | <i>linker</i> genèric amb una diana de reconeixement de la Proteasa de Virus de la Immunodeficiència Humana |
| C-terminal | carboxil terminal | HPLC | cromatografia líquida d'alta resolució |
| CA | càpsida | HSQC | <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> |
| CCR5 | receptor C-C quimoquina de tipus 5 | IC ₅₀ | concentració de proteïna que inhibeix al 50% la viabilitat cel·lular |
| CD4, CD8, CD2, CD3 | cluster de diferenciació 4, 8, 2 o 3 | IDP | Proteïnes intrínsecament desplegades |
| Cèl | cel·lules | IFE | Efecte d'Apantallament Intern |
| CME | endocitosi mediada per clatrina | IMAC | cromatografia d'afinitat de metall immobilitzat |
| CMV | citomegalovirus | IN | integrasa |
| CNS | sistema nerviós central | IPTG | isopropil-β-D-tiogalactopiranosid |
| CO | grup carboxil | iRNA | RNA d'interferència |
| CTL | limfòcit-T citotòxic | kDa | kilodalton |
| CXCR4 | receptor C-X-C quimoquina de tipus 4 | kcal | kilocalories |
| Da | dalton | kcat | constant catalítica |
| DABCYL | àcid 4-(4-dimetilaminofenilazo)benzoic | k _{cat} /K _M | eficiència catalítica |
| DEAE | reïna de cel·lulosa dietilaminoetil. Per a cromatografies d'intercanvi aniònic | Ki | constant d'inhibició |
| DENV | flavivirus causant del dengue | K _M | constant de Michaelis-Menten |
| DMEM | <i>Dulbecco's Eagle modified medium</i> | L | litre |
| DMSO | dimetil sulfòxid | L-Arg | L-arginina |
| DNA | àcid desoxiribonucleic | LB | medi <i>lysogeny broth</i> o Luria-Bertani |
| dNTP | desoxiribonucleòtid-5'-trifosfat | LRR | repeticions riques en leucina |
| ddNTP | didesoxiribonucleòtid | M | molar |
| dsDNA | DNA de doble cadena | M | marcadors |
| DSC | Microcalorimetria Diferencial d'Escombrat | MA | matriu |
| DTT | 1,4-ditio-DL-treitòl | MALDI-TOF | matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry |
| d[UGG] ₃ | dUGGUGUGUG. Substrat ribonucleic | | |
| <E | piroglutàmic | | |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> | | |
| ECP | Proteïna Catiònica d'Eosinòfil | | |
| EDANS | àcid 5-[(2-aminoetil)amino]naftalen-1-sulfònic | | |
| EDTA | àcid etilendiamina-tetraacètic | | |
| Env | proteïnes de l'envolta viral | | |
| FBS | sèrum fetal boví | | |

| | | | |
|--|--|-------------|---|
| MCS | regió de clonatge múltiple | pM | picomolar |
| MES | àcid 2(N-morfolino)etanofulfònic | PM5 | variant d'HP-RNasa amb les mutacions N-terminals Arg4Ala, Lys6Ala, Gln9Glu, Asp16Gly i Ser17Asn |
| MHC II | complex d'histocompatibilitat major tipus II | PM7 | variant d'HP-RNasa amb les mutacions anteriors junt amb Pro50Ser |
| mg | mil·ligram | ppm | parts per milió |
| MHz | megahertz | PR | proteasa |
| min | minuts | psi | unitats de pressió, lliures per polzada quadrada |
| ml | mil·lilitre | Pyr, Pca | piroglutàmic |
| ML | membrana lipídica | RI | inhibidor proteic de ribonucleases |
| Mm | massa molecular | hRI | RI d'origen humà |
| mM | mil·limolar | pRI | RI d'origen porcí |
| mQ | mil·liQ | recHIV-1 PR | proteasa del Virus de la Immunodeficiència Humana de tipus 1, recombinant comercial, de Bachem (Suïssa) |
| mRNA | RNA missatger | RMSD | <i>Root Mean Square Deviation</i> , arrel de la mitjana de les desviacions al quadrat |
| miRNA | microRNA | RNA | àcid ribonucleic |
| MTT | bromur de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli | RNasa | ribonucleasa |
| N-terminal | amino terminal | RNasa A | ribonucleasa de pàncrees boví |
| NA | forma no activada o precursora del zimogen. Proribonucleasa. | rpm | revolucions per minut |
| NC | nucleocàpsida | rRNA | RNA ribosòmic |
| NF-κB | factor nuclear potenciador de la cadena lleugera kappa de les cèl·lules B activades | RT | transcriptasa reversa |
| Ni-NTA | níquel-àcid nitriltriàcètic | s | segon |
| NMR | ressonància magnètica nuclear | SARS | Síndrome Respiratòria Severa Aguda |
| NNRTIs | no-nucleòtids inhibidors de la transcriptasa reversa | SE | error estàndard |
| NOE | <i>Nuclear Overhauser Effect</i> | SDS | dodecilsulfat de sodi |
| NOESY | <i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i> | SIDA | Síndrome de la Immunodeficiència Humana |
| NRTIs | nucleòtids inhibidors de la transcriptasa reversa | SK#1 | proteasa del Virus de la Immunodeficiència Humana de tipus 1 de producció pròpia |
| NLS | senyal de localització nuclear | S-S | enllaç disulfur |
| ng | nanogram | ssRNA | RNA monocatenari |
| nm | nanòmetre | SU | superfície, proteïna 120 del HIV |
| nM | nanomolar | Tm | temperatura mitja de desnaturalització |
| OD | densitat òptica | TM | transmembrana, proteïna gp41 del HIV |
| ONC | Onconasa® | TOCSY | <i>Total Correlation Spectroscopy</i> |
| ONCQ1S | variant d'Onconasa® amb la substitució de la Glutamina N-terminal 1 per una Serina | TFP | proteïna de canvi de marc de lectura |
| ONCYP, ONCYPG1, ONCYPG2, ONCYPGG, ONCFL, ONCFLG, ONCFL2-C15, ONCFL2-C16 | variants de zimògens construïts basats en la ribonucleasa Onconasa® | tRNA | RNA de transferència |
| o/n | <i>overnight</i> | TR | Transferasa Reversa |
| w/v | relació pes-volum | TEMED | N,N,N',N'-tetrametilendiamina |
| P1*P1' | residus contigus al punt de tall de la diana de reconeixement per la proteasa HIV-1 PR | Tris | Tris-hidroximetil-aminometà |
| p1, p2, p6 ^{ag} , p6 ^{pol} , p11 (PR), p17 (MA), p24 (CA), p51 (RT), p66 (RNasa H) | proteïnes virals del HIV | U.D.O. | unitats de densitat òptica |
| p30 | proteïna 30, Onconasa® | UV | ultraviolat |
| PAGE | electroforesis en gel de poliàcrilamida | V | volt |
| PBS | tampó fosfat salí | Vpu | proteïna viral U |
| PCR | reacció en cadena de la polimerasa | VS | sinapsis virològiques |
| PDB | <i>Protein Data Bank</i> , banc de dades de proteïnes | v/v | relació volum/volum |
| pl | punt isoelèctric | Vmax | velocitat màxima de reacció |
| PIC | complex de pre-integració del DNA viral amb la integrasa | xg | força centrífuga relativa |
| | | YP | seqüència diana de HIV-1 PR amb Tyr i Pro al lloc de tall |
| | | ZIM | zimogen |

PUBLICACIONS DERIVADES D'AQUESTA TESI DOCTORAL

Callis, M., Serrano S., et al., *Towards tricking a pathogen's protease into fighting infection: the 3D structure of a stable circularly permuted onconase variant cleaved by HIV-1 protease*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54568.

Serrano, S., Callis, M., et al., *(1)H, (13)C and (15)N resonance assignments of the Onconase FL-G zymogen*. Biomol NMR Assign, 2013. **7**(1): p. 13-5.



1. RESUM SUMMARY RESUMEN



1. RESUM

L'interès per l'estudi de les ribonucleases va en augment gràcies a la seva activitat citotòxica. El disseny i la producció de zimògens de ribonucleases que puguin ser específicament activats per proteases de patògens, constitueix un enginyós mecanisme per controlar la seva activitat enzimàtica i, conseqüentment, la seva citotoxicitat. Aquesta estratègia podria ser utilitzada per la construcció de nous agents quimioterapèutics que puguin evadir els mecanismes de resistència a drogues desenvolupats per alguns organismes patògens, com és el cas del Virus de la Immunodeficiència Humana (HIV).

En aquest treball es descriu la construcció d'un nou agent antiviral basat en zimògens de ribonucleases. S'han construït vuit variants de zimògens d'Onconasa® (ONC, ribonucleasa altament citotòxica d'òcits i embrions primaris de *Rana pipiens*) i quatre variants de zimògens de Ribonucleasa pancreàtica humana (HP-RNasa), homòlogues de la Ribonucleasa de pàncrees boví (RNasa A). En el cas de l'ONC, es pretén treure partit de la seva elevada estabilitat i la gran capacitat d'internalització en cèl·lules eucariotes. En canvi, en l'HP-RNasa s'ha aprofitat el fet de ser esperable una baixa reacció immunològica. Mitjançant permutació circular s'han unit els extrems N- i C- terminals d'aquestes RNases amb diferents seqüències aminoacídiques que contenen una diana de reconeixement i hidròlisi específica per la proteasa del Virus de la Immunodeficiència Humana (HIV-1 PR), i s'han generat nous extrems N- i C- terminals. Les seqüències connectores ocasionen l'obstrucció del centre actiu. Així s'han creat zimògens de RNases activables específicament per la HIV-1 PR, enzim indispensable pel cicle viral del HIV-1.

En presència de la proteasa del HIV-1, els zimògens d'ONC i HP-RNasa s'activen *in vitro* (amb una eficiència d'entre el 10-100% en funció de la diana), mantenint una elevada estabilitat sobretot pels zimògens d'ONC, però resultant, aquesta estabilitat, un dels punts crítics pels zimògens d'HP-RNasa. S'ha caracteritzat l'activitat ribonucleolítica dels zimògens abans i després de la incubació amb HIV-1 PR, i s'ha observat que l'augment de k_{cat}/K_M de la ribonucleasa respecte el zimogen és baix en el cas de les variants d'ONC, però d'unes 150 vegades per les d'HP-RNasa. Mitjançant marcatge fluorescent i microscòpia confocal, s'ha observat que els zimògens d'ONC presenten una molt bona internalització en limfòcits-T humans, a més de no presentar, en cap dels casos, citotoxicitat en cèl·lules *Jurkat* en cultiu abans de l'activació de l'enzim. Finalment, l'estructura i dinàmica de la forma intacta del zimogen ONCFLG, determinada per espectroscòpia per Ressonància Magnètica Nuclear (NMR), així com el modelat de la forma escindida, representen eines de gran vàlua per explicar els canvis en l'eficiència catalítica dels zimògens deguts al processament dut a terme per la HIV-1 PR. La comprensió del context estructural i de la dinàmica del procés d'activació és un primer pas pel desenvolupament de nous fàrmacs més efectius pel tractament de malalties relacionades amb patògens que expressin una proteasa específica clau. Pel fet d'iniciar una cascada citotòxica a partir de l'activitat de la proteasa i no de la seva inhibició, és d'esperar que aquesta estratègia sigui menys susceptible als mecanismes de resistència.

Així doncs, els zimògens d'ONC i d'HP-RNasa representen una estratègia prometedora, nova i versàtil, per a la producció d'una nova classe d'agents pel tractament del HIV/SIDA.

SUMMARY

The interest for the study of ribonucleases is increasing due to its cytotoxicity. Design and production of ribonuclease zymogens that could be specifically activated by proteases of pathogens, would provide an ingenious mechanism to control their activity and, consequently, their cytotoxicity. This strategy could be used to design new chemotherapeutic agents that can evade known mechanisms of drug resistance developed for some pathogenic organisms, like the Human Immunodeficiency Virus (HIV).

Here we report the construction of a new antiviral agent based on ribonuclease zymogens. Eight variants of Onconase® zymogens (ONC, a high cytotoxic ribonuclease from oocytes and primary embryos of *Rana pipiens*) and four variants of Human Pancreatic Ribonuclease (HP-RNase) have been constructed. Both of them are homologues of the Bovine Pancreatic Ribonuclease (RNase A). The interest of ONC lies on its high conformational stability and its quick internalization process in eukaryotic cells, whereas the interest on HP-RNase is based on its low immunologic response. By circular permutation, we connected the amino and carboxyl termini of those enzymes with amino acid sequences that are recognized and cleaved by the Human Immunodeficiency Virus Protease (HIV-1 PR), obstructing their active site and generating new N- and C- termini. In this way, ribonuclease zymogens that can be specifically activated by HIV-1 protease have been created.

ONC- and HP-RNase- zymogens are activated *in vitro* (10-100% of activation efficiency depending on the sequence used), and maintain a high conformational stability mainly in ONC variants, but resulted critical in HP-RNase zymogens. The catalytic efficiency before and after activation has been studied, and the increase of RNase k_{cat}/K_M compared to the precursor has been low in ONC zymogens, but 150-fold for those of HP-RNase. ONC zymogens can internalize in human T-lymphocyte *Jurkat* cells efficiently, and do not show any cytotoxicity in this type of cells before their activation. Finally, the structure and dynamics of intact form of ONCFLG variant, determined by Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (NMR), as well as the cleaved form model, provide valuable insight into the changes in the catalytic efficiency of zymogens caused by the hydrolysis conducted by the HIV-1 protease PR. The understanding of the structural environment and the dynamics of the activation process represents a first step toward the development of more effective drugs for the treatment of diseases related to pathogens expressing a specific key protease. By taking advantage of the protease's activity to initiate a cytotoxic cascade, instead of its inhibition, this approach is thought to be less susceptible to known resistance mechanisms.

ONC and HP-RNase zymogens represent a promising, new and versatile strategy for the production of a new type of anti-HIV/AIDS agents.

RESUMEN

El interés por el estudio de las ribonucleasas va en aumento gracias a su actividad citotóxica. El diseño y la producción de zimógenos de ribonucleasas que puedan ser activables específicamente mediante proteasas de patógenos, constituye un ingenioso mecanismo para controlar su actividad enzimática y, consecuentemente, su citotoxicidad. Esta estrategia podría ser utilizada para la creación de nuevos agentes quimioterapéuticos que puedan evadir los mecanismos de resistencia a drogas desarrollados por algunos organismos patógenos, como es el caso del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV).

En este trabajo se describe la construcción de un nuevo agente antiviral potencial basado en zimógenos de ribonucleasas. Se han construido ocho variantes de zimógenos de Onconasa® (ONC, ribonucleasa altamente citotóxica de oocitos y embriones primarios de *Rana pipiens*) y cuatro variantes de zimógenos de Ribonucleasa Pancreática Humana (HP-RNasa), homólogas de la Ribonucleasa Pancreática Bovina (RNasa A). En el caso de ONC, se pretende sacar partido de su elevada estabilidad y su gran capacidad de internalización en células eucariotas, mientras que para la HP-RNasa es esperable una menor respuesta inmunológica. Mediante permutación circular se han unido los extremos amino y carboxilo terminales de estas enzimas con diferentes secuencias aminoácidas que contienen una diana de reconocimiento e hidrólisis específica para la proteasa del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV-1 PR), ocasionando la obstrucción de su centro activo, y generando nuevos extremos N- y C-terminales. Así se han creado zimógenos de ribonucleasas activables específicamente por la proteasa HIV-1 PR, enzima indispensable en el ciclo viral del HIV-1.

En presencia de la proteasa HIV-1 PR, los zimógenos de ONC y HP-RNasa se activan *in vitro* (con una eficiencia entre el 10-100% en función de la diana), manteniendo una elevada estabilidad sobretodo en el caso de los zimógenos de ONC, pero resultando un punto crítico para los zimógenos de HP-RNasa. Se ha caracterizado su actividad ribonucleolítica antes y después de la incubación con la proteasa HIV-1 PR, y se ha observado que el aumento de k_{cat}/K_M de la ribonucleasa respecto el zimógeno es bajo en el caso de las variantes de ONC, pero de unas 150 veces en las de HP-RNasa. Se ha visto que los zimógenos de ONC presentan una muy buena internalización en linfocitos-T humanos, además de no presentar, en ningún caso, citotoxicidad en células *Jurkat* en cultivo antes de su activación. Finalmente, la estructura y el dinamismo de la forma intacta del zimógeno ONCFLG, determinada por Resonancia Magnética Nuclear (NMR), así como el modelo de la forma procesada, representan herramientas de gran valor para poder explicar los cambios en la eficiencia catalítica de los zimógenos una vez activados por la proteasa HIV-1 PR. La comprensión del contexto estructural y del dinamismo del proceso de activación es un primer paso para el desarrollo de nuevos fármacos más efectivos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con patógenos que expresen una proteasa específica. Debido al hecho de iniciar un proceso citotóxico a partir de la actividad de la proteasa y no de su inhibición, cabe esperar que esta estrategia sea menos susceptible a los mecanismos de resistencia.

Así, los zimógenos de ONC y HP-RNasa representan una estrategia prometedora, nueva y versátil para la producción de una nueva clase de agentes para el tratamiento del HIV/SIDA.



2. INTRODUCCIÓ



2. INTRODUCCIÓ

2.1. REGULACIÓ DE LA FUNCIÓ PROTEICA

Les proteïnes són biomolècules conformades per la polimerització d'aminoàcids, combinant les 20 tipologies diferents d'aquests. Presenten múltiples organitzacions possibles en quatre nivells estructurals (seqüència primària aminoacídica, elements d'estructura secundària, estructura tridimensional i associació de subunitats en l'estructura quaternària) determinats segons la seva seqüència d'aminoàcids i les condicions ambientals. Històricament, es creia que la funció d'una proteïna venia donada per la seva estructura tridimensional, relacionant cada estructura proteica amb una funció específica. Actualment, però, tot i que aquesta premisa és certa en molts casos, es coneixen cada vegada més excepcions. Algunes proteïnes, conegudes com a proteïnes intrínsecament desplegadas (IDP), no tenen una estructura 3D definida i poden dur a terme diferents funcions [1] (revisat a [2]). Altres proteïnes desenvolupen funcions diferenciades (*moonlighting*) activant una o altra funció mitjançant l'associació amb lligands concrets o segons les condicions ambientals [3, 4]. Globalment, hi ha proteïnes tan diverses com el conjunt de funcions que poden dur a terme: suport estructural determinant la morfologia i l'organització interna de la cèl·lula, moviment, funció enzimàtica catalitzant les reaccions bioquímiques, reserva energètica, molècules transportadores, manteniment cel·lular rutinari, defensa contra elements forans, comunicació intercel·lular, resposta intracel·lular, ... Per això, la funció proteica és essencial pel funcionament cel·lular ja que és necessària per una part important de les tasques que es duen a terme a una cèl·lula. Per un bon desenvolupament d'aquesta activitat biològica en cal una regulació altament acurada [5, 6]. En general, una proteïna pot ser regulada a diferents nivells i per més d'una estratègia. Si la necessitat d'una funció proteica concreta és immediata, el procés de síntesi pot resultar excessivament lent. Així, sovint la regulació es dona a nivell post-traducciona, i utilitzant altres mecanismes (revisat a [7]), establint xarxes complexes de regulació entre proteïnes.

2.1.1. SÍNTESI PROTEICA I TRANSPORT AL LLOC DEL REQUERIMENT

Síntesi proteica: transcripció i traducció. El primer punt de control de la funció proteica és a nivell temporal gràcies a l'obtenció de la proteïna al moment en què es requereix. La cèl·lula controla la quantitat de proteïna que es va produint en diferents punts del flux d'informació que va des dels gens del DNA fins a la producció proteica. Així, la quantitat de proteïna dependrà en primer lloc de la taxa de transcripció de DNA a RNA missatger (mRNA), que és regulada per la força del promotor i els operadors que aquest presenta, per l'acció de factors de transcripció específics (repressors o activadors) [8] i per modificadors de l'estructura de la cromatina (a organismes eucariotes). Els mRNAs podran patir modificacions post-

transcripcionals. La quantitat de mRNAs també es pot ajustar, variant la taxa de degradació d'aquests, efectuada per processos d'RNA d'interferència (iRNA) fets per micro RNAs (miRNA) [9] i, també, per les ribonucleases (RNases). Posteriorment, aquests mRNAs es traduiran a proteïnes [10], sintetitzant l'estructura primària, i seguidament en moltes proteïnes es donarà una organització estructural (plegament) per tal d'assolir una conformació tridimensional. En molts casos, aquest plegament donarà lloc a la seva estructura nativa, en la qual serà funcional. Un control acurat de l'inici de la transcripció i la traducció permet sincronitzar la regulació de múltiples gens que codifiquen per productes amb una activitat interdependent.

Compartimentalització i transport. No totes les proteïnes són específiques i és interessant tenir les proteïnes localitzables per a optimitzar la seva funció. Així, el segon nivell de regulació de la funció proteica és espacial, trobant-se la majoria de proteïnes confinades a llocs concrets de la cèl·lula, bé sigui la membrana, un orgànu concret, una vesícula de transport, o mitjançant la unió al citoesquelet o a complexos macromoleculars [11]. Per tal de direccionar les proteïnes específicament a un punt concret, algunes presentaran una seqüència peptídica (pèptid senyal de localització) i altres seran marcades mitjançant la unió post-traduccional de biomolècules o fragments d'aquestes. Aquestes senyalitzacions seran reconegudes per proteïnes transportadores, que les dirigiran al compartiment adequat. Algunes proteïnes seran presents en la seva forma activa només al compartiment on són requerides, inactivant-se per algun dels mecanismes de regulació existents quan es troba a un lloc on no és necessària. Per exemple, els factors nuclears kappa B (NF- κ B) és una família de factors de transcripció expressats de forma ubíqua. Regulen l'expressió de proteïnes essencials en la resposta a l'estrès, el manteniment de la comunicació intercel·lular i la regulació de la proliferació cel·lular i apoptosi. Aquesta proteïna desenvolupa la seva funció al nucli, però quan no és requerida, és segregada al citoplasma en forma inactiva (unida al seu inhibidor (I κ B)) [12].

2.1.2. EFECTE DE FACTORS AMBIENTALS

Les proteïnes estan adaptades per plegar-se i funcionar de forma òptima en les condicions concretes del compartiment cel·lular on operen. Segons si l'ambient és reductor o oxidant, la força iònica, la presència de molècules polars, el pH, la temperatura... la proteïna actuarà a les seves capacitats màximes o la seva activitat es veurà atenuada. Condicions reductores o oxidants propiciaran el trencament o la formació de ponts disulfur entre cisteïnes, respectivament. Segons el pH, es donaran processos de protonació i desprotonació, que poden modificar la càrrega local o global de la proteïna. Aquests canvis podran fer variar la seva estructura i funció i l'associació a altres proteïnes. En condicions extremes de temperatura, salinitat, concentració de desnaturalitzants, deshidratació... els organismes acumulen molècules orgàniques de baix pes molecular, anomenades osmolits (com alguns aminoàcids (Gly, Pro), poliols (glicerol, sorbitol), sucres (sucrosa), metilamines (trimetilamina-N-òxid,

sarcosina)...). Aquestes molècules ajuden a les proteïnes a mantenir el plegament i eviten la formació d'agregats [13, 14]. Si el pH és molt extrem o la temperatura molt elevada respecte el seu òptim, es pot arribar a donar una desnaturalització i un trencament dels enllaços peptídics que formen l'estructura primària (*proteòlisi*) duent a la degradació de la proteïna.

2.1.3. UNIÓ AMB ALTRES MOLÈCULES I GRUPS

Unió no-covalent a molècules efectores: activadors i inhibidors. Un mecanisme molt ràpid i generalitzat de control de la funció d'una proteïna és la inducció de canvis conformacionals reversibles en resposta a molècules específiques efectores, amb les quals pot interaccionar de forma no-covalent. Aquests canvis alteren la capacitat catalítica de la proteïna, duent a la seva forma activa (si són induïts per molècules activadores) o inactiva (si són inhibidors). La molècula efectora pot ser molt petita o molt més gran que la proteïna en qüestió i es pot unir al centre actiu o a altres llocs d'unió. Els inhibidors es poden unir al centre actiu competint amb el substrat (inhibidors competitiu) o a un altre lloc (no competitiu). En moltes rutes metabòliques multienzimàtiques s'utilitza aquest mecanisme de regulació, de manera que el primer enzim es veu inhibit pel producte final de la via. Un altre exemple de regulació per una molècula inhibidora és, per exemple, el NF- κ B i l'inhibidor I κ B (comentat anteriorment) o les RNases i el seu inhibidor citosòlic. En algunes proteïnes, a vegades es donen casos de cooperació positiva o negativa de lligands, en la qual la unió d'un afavoreix o impedeix la unió d'una altra molècula amb l'enzim [15]. Un cas concret d'unió amb molècules reguladores és l'*al·losterisme* [16]. En algunes proteïnes que presenten estructura quaternària formant estructures oligomèriques, una vegada s'ha unit la primera molècula de lligand es pot alterar la conformació de la resta de la proteïna fent que la unió amb els següents efectors es vegi potenciada o inhibida. També existeixen alguns casos d'inhibidors irreversibles, que s'uneixen fortament (de forma covalent o no) o destrueixen un grup funcional de l'enzim essencial per a l'activitat.

Unió covalent amb grups o biomolècules. Una gran majoria de proteïnes són controlades mitjançant la unió covalent de grups (carboxilacions, nitrosilacions, acetilacions, metilacions, hidroxilacions, amidacions, fosforilacions, glicosilacions, sulfatacions, unió amb lípids, a altres proteïnes,...) o bé a través de la seva eliminació. Mitjançant l'addició/eliminació de grups covalents, es pot afectar al reconeixement i associació entre proteïnes i amb altres molècules (senyalització proteica, associació en complexes, ...). Amb aquest mecanisme també es pot regular en forma d'interruptor la funció d'una proteïna, ocasionant un canvi conformacional que la fan capaç o incapaç d'unir-se a un lligand. Per exemple, a través de fosforilació-desfosforilació es regula gran quantitat de proteïnes [17], com el NF- κ B, que podrà activar la transcripció quan es troba fosforilat a un dels dos dominis de transactivació [18]. Un exemple de proteïna regulada per acetilació/desacetilació són les histones. Les histones seran acetilades mitjançant histona-acetilases (HATs), reduint l'afinitat del nucleosoma pel DNA.

D'aquesta forma la cromatina es veurà activada permetent la transcripció. Quan la transcripció del gen ja no és necessària, les histona-desacetilases (HDACs) actuen sobre les histones, restaurant la cromatina a un estat de transcripció inactiu [19].

2.1.4. PROTEÒLISI

Proteòlisi dirigida. Les proteïnes presenten un temps de vida mitja diferent segons la seva estabilitat i la funció que desenvolupen. La degradació proteica es dona de forma extracel·lular (digestió d'aliments) i intracel·lular (regulació de la funció proteica, prevenció de la seva acumulació i renovació de les proteïnes i reciclatge dels aminoàcids). Quan una proteïna deixa de ser necessària serà degradada per part de *proteases*, enzims que hidrolitzaran els enllaços peptídics. L'eliminació de proteïnes de forma intracel·lular es controla a través dos mètodes. Mitjançant el transport al lisosoma (compartiment cel·lular amb concentració de proteases) s'eliminaran proteïnes de membrana, proteïnes extracel·lulars i proteïnes de vida llarga [20]. Les proteïnes de vida més curta i proteïnes defectives, seran degradades a través d'un mecanisme ATP-depenent mediat per ubiquitina. Aquestes proteïnes s'uniran a diverses molècules d'ubiquitina, i un cop poliubiquitinades, seran una diana pel proteasoma, un complex multiproteic que les degradarà [21, 22]. Per exemple, l'inhibidor del NF- κ B, quan no és necessari perquè interessa permetre la transcripció de gens de resposta a l'estrès o apoptosi, serà dirigit al nucleosoma, on serà degradat [12].

Tall i unió proteic. (Revisat a [23]). Algunes proteïnes presenten un domini intern amb la particular capacitat d'autoescindir-se, degradant els enllaços peptídics que el flanquegen i unint els extrems per a formar la proteïna final. Aquesta regió s'anomena inteïna, i les regions que l'envolten, exteïnes. Quan una inteïna s'autocatalitza, parlem d'un procés de tall i unió proteic o *splicing* proteic [24]. Aquest procés és anàleg al tall i unió dels introns que es dona als mRNAs, però ocorre de forma post-traduccional a nivell proteic. A diferència d'altres processos de proteòlisi, aquest mecanisme és autocatalític i és independent de cofactors, d'enzims o d'energia en forma d'ATP [25, 26]. Existeixen dos tipologies de tall i unió segons si la inteïna es troba íntegra (*en cis*) o dividida i s'associa (*en trans*) [27, 28]. Amb aquest mecanisme es poden generar dues proteïnes funcionals a partir d'una sola cadena polipeptídica, una inclosa a la seqüència d'una altra. Un exemple és la ATPasa-H⁺ vacuolar VMA1 de *Saccharomyces cerevisiae*, proteïna en la que fou descobert per primera vegada aquest mecanisme de tall i unió [29, 30].

Proteòlisi limitada i síntesi de zimògens. Moltes proteïnes són modificades de forma post-traduccional mitjançant la digestió d'enllaços peptídics molt específics que duen a una regulació o activació, per exemple l'eliminació de pèptids senyal o de la metionina inicial, l'activació d'enzims, de factors de transcripció, receptors,... Aquest és un tipus de regulació

irreversible, per tant un cop duta a terme l'activació, es requereix d'altres mecanismes de regulació. En els casos de proteòlisi en què es digereix un o alguns punts concrets parlem de *proteòlisi limitada*. Algunes proteïnes, eucariotes o virals, es sintetitzen com un gran precursor poliproteínic, que requereix de la digestió limitada en punts o dianes específiques per a obtenir les proteïnes madures actives. Altres proteïnes es sintetitzen en forma de precursor, inactives, i requeriran també d'un pas d'activació per proteòlisi limitada per a poder desenvolupar la seva funció. Exemples de proteïnes produïdes en forma de proproteïnes són el col·lagen del teixit connectiu, que es sintetitza en forma de procol·lagen; o en la coagulació de la sang es dona una cascada d'activacions proteolítiques, ja que la fibrina es forma a partir del fibrinogen, que és proteolitzat per la trombina, que al seu torn es forma a partir de la protrombina. En el cas concret dels enzims, la proproteïna s'anomena proenzim o *zimogen*.

Els zimògens han estat seleccionats al llarg de l'evolució per controlar l'activitat enzimàtica, concretament dels enzims proteolítics [31]. Com s'ha vist, la digestió d'algunes proteïnes diana per part de proteases és crítica per gran quantitat de processos biològics [31, 32]. Però l'activitat sense control de les proteases pot infligir severos danys, requerint-ne un control estricte. Aquesta regulació es realitza, de forma molt estesa, a través de la biosíntesi i transport de les proteases en forma de zimògens [33-35] (*Figura 1*). Gràcies a la síntesi en forma de proteases inactives, aquests enzims poden ser emmagatzemats sense perill i estar a punt en suficient quantitat per quan siguin necessaris. Típicament, els zimògens són traduïts amb un prosegment que inhibeix l'activitat catalítica, obstructint el lloc d'unió al substrat [36], alterant-lo [37, 38] o distorsionant el centre actiu [33]. És mitjançant l'eliminació del prosegment per part d'altres proteases específiques o a través de mecanismes d'autocatàlisi [33] que els zimògens són activats, rendint una proteasa madura. Aquesta, igualment podrà veure restringida la seva activitat proteolítica a través de la unió amb inhibidors cel·lulars [6, 33]. Exemples de zimògens són la quimotripsina i la tripsina, sintetitzades a partir del quimotripsinogen i el tripsinogen [39].

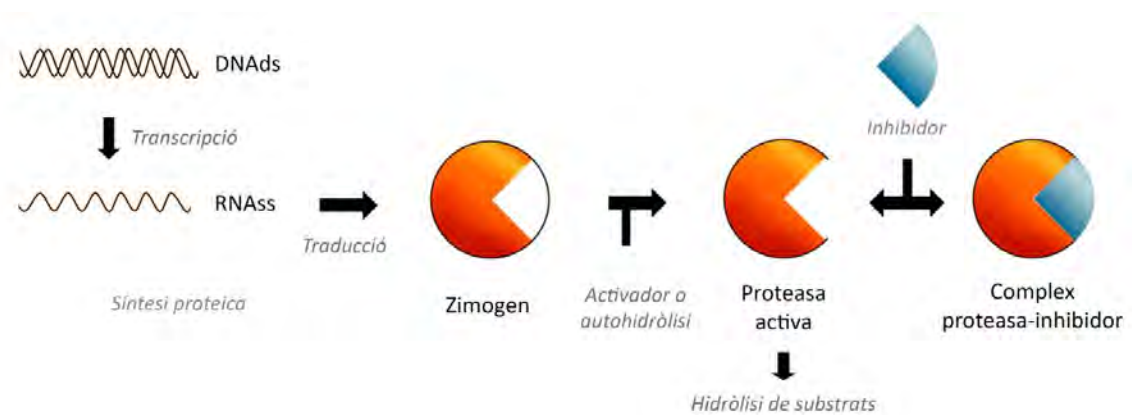


Figura 1. Esquema dels mecanismes de regulació de la funció proteolítica.

Les proteases es regulen a través de l'expressió, al lloc i moment necessaris, en forma de zimògens. El zimogen serà processat per un activador o a través de mecanismes d'autoproteòlisi rendint la proteasa activa, que podrà ser regulada al seu torn per molècules inhibidores, o bé podrà actuar sobre substrats proteics.

L'absència gairebé absoluta de zimògens en enzims no proteolítics podria constituir un indicatiu que la creació d'un zimogen a partir d'un enzim ja existent és més difícil que desenvolupar mecanismes alternatius pel control de l'activitat enzimàtica. A més, l'habilitat exclusiva de les proteases per dur a terme l'activació autocatalítica podria facilitar l'evolució de zimògens de proteases, però no de zimògens d'altres enzims.

De forma similar a les proteases, les ribonucleases regulen gran quantitat de processos del funcionament cel·lular, degradant un biopolímer essencial i manifestant una activitat enzimàtica que pot resultar tòxica [40]. Així doncs, també els cal un control acurat. Sorprenentment, però, a diferència de les proteases no es coneixen zimògens naturals de ribonucleases, i la regulació d'aquestes es duu a terme solament mitjançant molècules inhibidores un cop s'ha produït la seva expressió [41, 42].

2.2. LES RIBONUCLEASES (RNases)

Els nivells d'àcid ribonucleic (RNA) cel·lular, intermediari entre la informació genètica de la cèl·lula i les proteïnes responsables del funcionament cel·lular, es regulen per una banda mitjançant la seva síntesi a partir de la transcripció feta per les RNA polimerases i, per altra banda, la seva degradació és catalitzada per processos d'iRNA i per *ribonucleases* (Figura 2). Les RNases són un grup heterogeni d'enzims que catalitzen el trencament d'enllaços fosfodièster de l'RNA. Les proteïnes d'aquest grup intervenen en multitud de processos biològics i es troben en tots els dominis de la vida i en diversitat de teixits i fluids corporals.

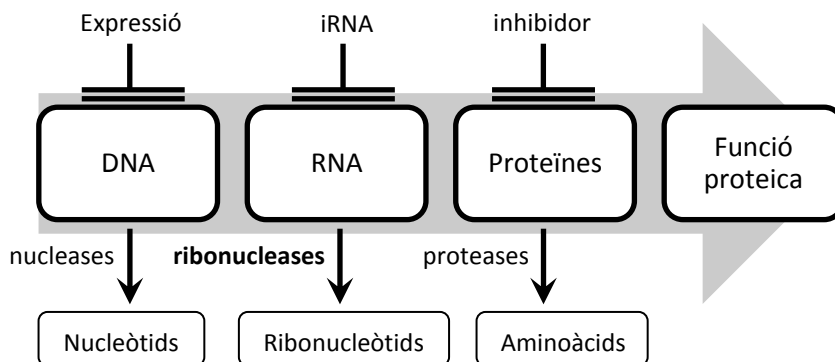


Figura 2. Implicació de les ribonucleases en el flux de la informació biològica.

Les ribonucleases poden ser tòxiques degut a la degradació de l'RNA cel·lular, implicant la traducció dels RNA missatgers (mRNA) a proteïnes i el desenvolupament de la funció proteica, necessària pel funcionament cel·lular.

2.2.1. DENOMINACIÓ DE LES RIBONUCLEASES

Les RNases es poden denominar segons diferents criteris (*Taula 1*). Si duen a terme la seva acció a l'interior o a l'exterior de la cèl·lula que les ha sintetitzat, es distingeixen en RNases intracel·lulars o extracel·lulars. Les extracel·lulars solen ser inespecífiques i de baixa massa molecular, mentre que les intracel·lulars, implicades en el metabolisme de l'RNA cel·lular, tenen elevada especificitat i són estructuralment més complexes. En relació al tipus de catàlisi, distingim les exonucleases, que alliberen mononucleòtids a partir d'un extrem 5' o 3' lliure de la cadena d'RNA, i les endonucleases, que trenquen enllaços fosfodièster interns de la cadena d'RNA, generant oligonucleòtids. Atenent a l'especificitat pel substrat podem diferenciar les ribonucleases inespecífiques, que catalitzen la degradació de tot tipus de molècules d'RNA (com ara la nucleasa estafilococal); les ribonucleases específiques de base, que hidrolitzen les cadenes d'RNA per l'extrem 3' de residus de pirimidina (per exemple la RNasa T1, una endonucleasa que talla amb una elevada especificitat després de la base G [43, 44], o la Ribonucleasa Pancreàtica Bovina (RNasa A) i homòlogues, que tot i no presentar una especificitat de base absoluta sí que mostren una preferència de base); i les ribonucleases específiques, que reconeixen característiques concretes de seqüència o d'estructura, implicades generalment en processos de maduració de l'RNA (com la RNasa III).

Finalment, en funció de paràmetres evolutius, dins les ribonucleases de vertebrats distingim les pancreàtiques i les de tipus no pancreàtic [45]. En el grup de ribonucleases pancreàtiques, diferenciem la superfamília de la RNasa A [46]. Aquesta categoria agrupa RNases endonucleases pirimidina específiques segons la seva homologia de seqüència i estructura i de les propietats catalítiques, amb la tríada catalítica His-Lys-His. La RNasa A, el prototip d'aquesta família, és potser d'entre les RNases l'enzim més ben caracteritzat (Revisat a [47]).

Taula 1. Denominació de les ribonucleases segons determinats paràmetres.

| Paràmetre | Denominació de les RNases | | |
|--|---------------------------|-------------------------|---|
| Lloc d'acció | Extracel·lulars | Intracel·lulars | |
| Tipus de catàlisi | Exonucleases | Endonucleases | |
| Especificitat del substrat | Inespecífiques | Específiques | |
| | | De Base pirimidínica | De caract. concretes de seqüència/estructura. |
| Paràmetres evolutius en vertebrats | No pancreàtiques | Pancreàtiques | |
| Homologia de seqüència, estructura i propietats catalítiques amb RNasa A | | No homòlogues a RNasa A | Superfamília d'homòlogues a RNasa A |

2.2.2. FUNCIONS I FUNCIONS BIOLÒGIQUES ESPECIALS

Les RNases presenten diversitat de funcions. Mentre que algunes RNases estan involucrades en processos degradatius bàsics com la digestió d'RNA en la dieta de manera que pugui ser absorbit i assimilat per les cèl·lules, altres estan implicades en la maduració, renovació i control de qualitat de l'RNA cel·lular, tant en eucariotes com en procariotes, jugant un rol essencial en l'expressió gènica i essent necessari un control acurat de la seva activitat dins la cèl·lula [48]. A més, però, algunes RNases, les anomenades RISBases (Ribonucleases with Special Biological Actions [49]), poden veure's implicades en diverses funcions biològiques especials. La descripció d'aquestes noves funcions, ha possibilitat que els estudis realitzats durant dècades sobre RNases, en especial la RNasa A [47, 50-56], s'hagin reprès amb interès renovat, per tal d'intentar caracteritzar les noves propietats atribuïdes a aquests enzims [40, 57-61].

Algunes de les activitats biològiques especials que es coneixen en RNases, principalment membres de la superfamília de les RNases pancreàtiques, són la maduració cel·lular, la prevenció de l'autopol·linització, l'al·lergenicitat al pol·len o la vascularització i les respostes a l'estrès [62]. Hi ha també RNases amb un paper important en el creixement i desenvolupament eucariotes [61], com l'efecte vascularitzant de l'angiogenina [63], o que s'impliquen en la fertilització [64]. A més, n'és remarcable la citotoxicitat selectiva que presenten alguns d'aquests enzims. S'han descrit RNases amb activitat antibacteriana, antivírica, neurotòxica, helmintotòxica, aspermatogènica, immunosupressora, embriotòxica o citostàtica [45, 57], relacionable amb la defensa de l'hoste [65]. D'entre els diferents tipus d'activitat en destaca l'activitat antitumoral que presenten algunes RNases, essent capaces de matar selectivament les cèl·lules canceroses, la qual cosa les converteix en potencials agents terapèutics (Revisat a [66]).

2.2.3. RIBONUCLEASES CITOTÒXIQUES I MECANISME DE CITOTOXICITAT

La majoria d'RNases citotòxiques s'inclouen en el grup d'RNases pancreàtiques, incloent la superfamília de la RNasa A (Revisat per [67]). Tot i que no és l'únic requisit, l'habilitat d'una RNasa de degradar l'RNA es correlaciona amb la seva citotoxicitat i, en general, és necessària per aquesta [68-70]. És interessant reflectir que existeixen algunes excepcions en les quals una RNasa pot ser citotòxica sense presentar activitat ribonucleolítica, com per exemple la proteïna catiònica d'eosinòfil (ECP) i fragments d'aquesta, els quals resulten citotòxics per a varietat de patògens i cèl·lules de mamífer de forma independent a la seva activitat ribonucleolítica. En aquest cas actuarien desestabilitzant les membranes cel·lulars unint-se a la superfície cel·lular i agregant-hi [71-73]. En relació al mecanisme habitual de citotoxicitat de les RNases, encara que no se'n coneixen amb detall les bases moleculars, és àmpliament

acceptat que es relaciona amb la capacitat d'interaccionar amb la membrana plasmàtica i d'internalitzar a la cèl·lula per endocitosi, mantenint la seva estabilitat conformacional. Una vegada endocitada, una RNasa passa a transitar per l'interior cel·lular. El fet que la RNasa Bovina Seminal (BS-RNasa) sigui internalitzada en cèl·lules tumorals i en cèl·lules normals amb la mateixa eficiència però que només sigui citotòxica sobre les primeres [74-76] fa pensar en l'existència de diferents vies en el seu transport intracel·lular. (Per a una revisió de les rutes de transport intracel·lular de les RNases, veure la revisió [58]). A partir d'un compartiment subcel·lular determinat, el mecanisme de citotoxicitat requereix que les RNases citotòxiques siguin translocades fins al citoplasma, tot i que no es coneix amb exactitud la forma com travessen la bicapa lipídica. En el cas que aquesta translocació no es produeixi, les RNases seran degradades als lisosomes cel·lulars [77, 78] (*Figura 3B*) o seguiran vies no productives (*Figura 3C*) impedit-se la seva acció degradativa i no resultant citotòxiques. Les RNases que aconseguixin arribar al citoplasma poden resultar inhibides per l'Inhibidor proteic de Ribonucleases (RI) present al citosol de les cèl·lules de mamífer. Aquest inhibidor, que representa un 0,01-0,1% de les proteïnes de la cèl·lula, és el regulador natural de RNases intracel·lulars i extracel·lulars, controlant el desenvolupament de la seva activitat degradativa i protegint així la cèl·lula [41, 79] (revisat a [42, 80]). Es pot unir amb múltiples membres de la superfamília de la ribonucleasa A, formant una de les interaccions no-covalents entre biomolècules més fortes conegudes [81]. Així, les RNases que resultin inhibides per l'RI (*Figura 3A*), tampoc resultaran citotòxiques.

L'habilitat d'una RNasa d'escapar de la unió amb l'RI és d'elevada importància per a la seva citotoxicitat [82]. Les RNases citotòxiques, arribaran al citosol i podran evadir l'RI, bé sigui degut a impediments estèrics en la unió (*Figura 3D*) o bé per saturació d'aquest (*Figura 3E*). Alternativament, una RNasa també es pot dirigir cap al nucli, compartiment cel·lular que no compta amb la presència de l'RI (com a mínim en el nuclèol [83, 84]) i on l'enzim podrà dur a terme la seva activitat catalítica de degradació d'RNA. Dos membres de les RNases de vertebrats, la BS-RNasa i l'angiogenina (ANG), han estat localitzades a nucli. La BS-RNasa s'ha trobat al nuclèol de les cèl·lules tumorals SVT2 i HT29 però no en cèl·lules 3T3 normals [76, 85]. L'ANG és translocada contínuament cap a nucli en cèl·lules HeLa [86]. Amb la finalitat de dirigir una RNasa a nucli, es pot modificar artificialment per dotar-la d'aquesta capacitat, mitjançant l'addició d'un senyal de localització nuclear (NLS) que permetrà la interacció amb importines (*Figura 3F*). Una vegada una RNasa desenvolupi la seva funció ribonucleolítica a la cèl·lula, interferirà en les funcions de l'RNA, com la síntesi proteica i la regulació gènica, ocasionant la mort de la cèl·lula per apoptosi. L'eficiència de la RNasa en cada un dels punts del procés determinarà la seva potència com a citotoxina (Revisat a [58, 59, 82]).

Aconseguir zimògens de ribonucleases citotòxiques, podria permetre controlar la seva activitat citotòxica de manera selectiva i localitzada, representant una eina útil potencialment aplicable en biomedicina.

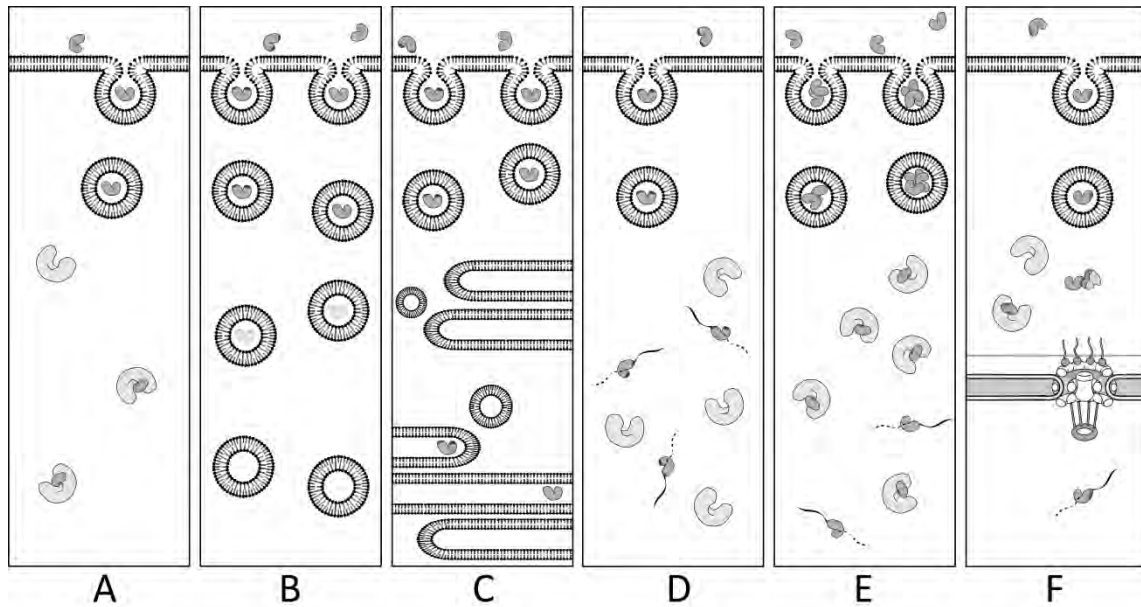


Figura 3. Mecanisme d'acció de les ribonucleases citotòxiques.

A) RNasa no citotòxica internalitzada i capturada per l'RI. **B)** RNases no citotòxiques internalitzades i degradades en lisosomes. **C)** RNases no citotòxiques que segueixen vies no productives. **D)** RNasa citotòxica que és internalitzada i escapa a l'acció de l'RI. En vermell, punts que causen impediments estèrics en la unió amb l'RI. **E)** RNasa citotòxica que és internalitzada de manera molt eficient i arriba a saturar l'RI. **F)** RNasa citotòxica capturada pel sistema d'importació nuclear i dirigida a nucli. En blau es remarca una seqüència de localització nuclear (NLS), que permet la interacció amb les importines i la maquinària d'import nuclear. [87].

2.2.3.1. RNases amb citotoxicitat natural: L'ONCONASA®

Actualment es coneixen diverses RNases amb citotoxicitat natural, com la BS-RNasa, l'Onconasa® (ONC) i l'Amfinasa (Amph) de *Rana pipiens*, les lectines cSBL i jSBL de les granotes *Rana catesbeiana* i *Rana japonica*, les humanes ECP i EDN, alguns oligòmers de la RNasa A etc. [40, 57, 58, 71-73, 88, 89]. En contrast amb la majoria de fàrmacs antitumorals clàssics els quals interfereixen en la síntesi de DNA i la divisió cel·lular, aquestes RNases citotòxiques no són agents mutagènics i en general exerceixen els seus efectes interferint en la síntesi proteica i regulació gènica a nivell d'RNA. Així doncs, representen una bona alternativa a la teràpia convencional antitumoral. Considerant tota la família de la RNasa A cal destacar especialment la citotoxicitat exhibida per dos dels seus membres, la BS-RNasa de l'esperma boví, i l'ONC dels oòcits i embrions primaris de la granota *Rana pipiens*. Tant l'ONC com la forma dimèrica i citotòxica de la BS-RNasa (MxM, forma que presenta intercanvi dels dominis N-terminals) són resistents a l'acció de l'RI [69]. En aquest estudi ens centrarem en l'ONC, paradigma de les RNases amb citotoxicitat natural (Taula 2).

Taula 2. Propietats de les RNases pancreàtiques estudiades a aquest treball.

| RNasa | Procedència | Estabilitat (T _m aprox.) | Internalització | Escapament a RI | Degradació RNA | Citotoxicitat en cèl·lules tumorals |
|------------------------|---|-------------------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------------------------|
| RNasa A | Pancreàtica bovina | 62°C | Baixa | No | Elevada activitat | No |
| ONC (p30 o Ranpirnasa) | Embrions i oòcits primaris <i>Rana pipiens</i> | 87°C | Ràpida | Sí | Baixa activitat | Sí |
| HP-RNasa (o RNasa 1) | Pàncrees humà, cèl. endotelials i fluids corporals | 53°C | Baixa | No | Elevada activitat | No |
| Altres RNases | Angiogenina, Barnasa, RNasa T1, Proteïna Catiònica d'Eosinòfil (ECP), Neurotoxina Derivada d'Eosinòfil (EDN), Lectines de <i>Rana japonica</i> i <i>Rana catesbeiana</i> (JSBL i cSBL), Amfinasa (oòcits de <i>Rana pipiens</i>), Citotoxines i helmintotoxines amb activitat RNasa, oligòmers de RNasa A, ... | | | | | |

A) Estructura i particularitats de l'ONC

L'ONC (EC 3.1.27.5), inicialment denominada proteïna p30 o Ranpirnasa [90], aïllada d'embrions i oòcits primaris de la granota *Rana pipiens* (Granota lleopard del nord, *Lithobates pipiens* o *Pantherana pipiens*). És la més petita de la superfamília de les RNases pancreàtiques, homòlogues de la RNasa A, i presenta citotoxicitat natural. Ha estat extensivament estudiada. L'ONC és excepcionalment estable i molt resistent a la proteòlisi [91], amb un punt mig de desnaturalització entorn els 90°C, essent 30°C major que per la RNasa A (T_m de 62 °C) [91, 92].

La seva estructura, determinada per cristal·lografia i difracció de raigs X (1ONC [93]), consisteix en un únic monòmer bàsic (Z= +5; pI= 9.7), de 104 residus aminoacídics i una massa molecular de 11.8 kDa. Tot i presentar una identitat de seqüència del 30% [94] i 20 residus menys que la seva homòloga RNasa A, la seva estructura terciària global, és molt similar a la topologia arronyonada bilobulada (Figura 4A i C), diferenciant-se per l'elevat grau de compactació [93], pel peculiar residu de piroglutàmic N-terminal (Pyr1, Pca1 o <E1), essencial per l'activitat enzimàtica i citotoxicitat de l'enzim [95, 96], i per un pont disulfur C-terminal característic.

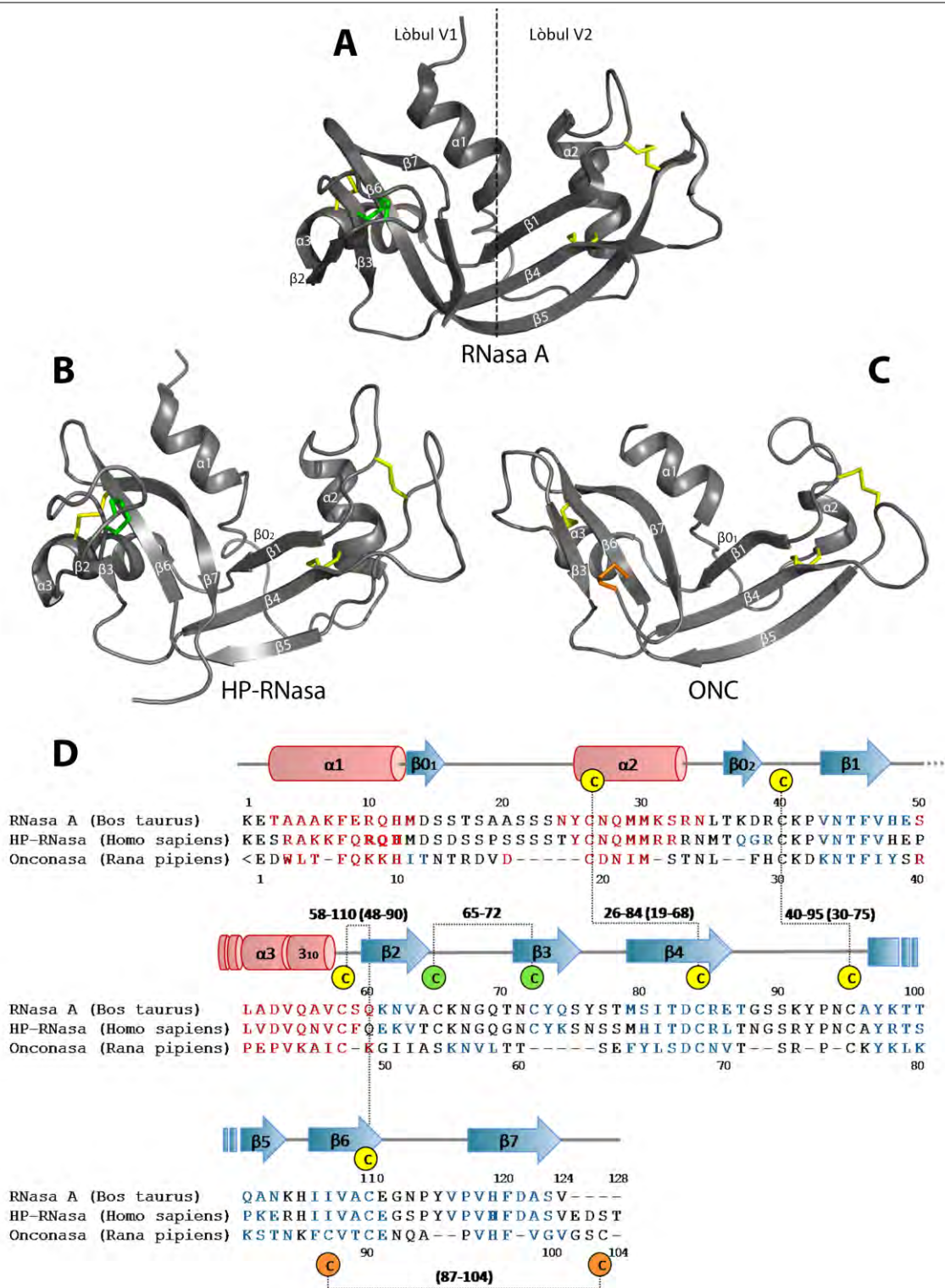


Figura 4. Comparativa entre les ribonucleases RNasa A, HP-RNasa i ONC.

A) Estructura tridimensional de la RNasa A (7RSA [97]). **B)** Estructura 3D de l'HP-RNasa (2K11 [98]). **C)** Estructura 3D de l'ONC (1ONC [93]). S'indiquen els dos lòbuls V1 i V2 a (A), i es mostra la numeració dels elements d'estructura secundària a cada estructura. S'observen els ponts disulfur en barres. **D)** Alineament de les seqüències de les proteïnes anteriors. S'esquematitza l'estructura secundària al diagrama superior, en cilindres rosats per les hèlixs- α i en fletxes blaves per les cadenes- β . A cada proteïna es remarca la localització dels elements d'estructura secundària a través de la mateixa coloració a la seva seqüència. La numeració superior es correspon amb els residus de la RNasa A i l'HP-RNasa. La numeració inferior, amb els d'ONC. Es detallen els ponts disulfur, amb la numeració de la RNasa A i l'HP-RNasa, i en parèntesi, la corresponent a l'ONC. Els ponts disulfur conservats en les tres proteïnes, es mostren en groc, en verd els compartits a RNasa A i HP-RNasa i en taronja el propi de l'ONC (87-104).

Elements d'estructura secundària. De forma similar a la RNasa A [97] (*Figura 4A*), l'ONC presenta cadenes- β antiparal·leles agrupades formant dos fulls- β que li donen l'aparença global bilobulada (lòbuls V1 i V2). Utilitzant la numeració dels elements d'estructura secundària segons l'homologia amb la RNasa A, la primera fulla- β o lòbul V1 està formada per les cadenes $\beta 3$ (residus 55-58), $\beta 6$ (86-91) i $\beta 7$ (96-101) (*Figura 4C i D*). El lòbul V2 el formen les cadenes $\beta 0$ (residus 11-12, no present a la RNasa A), $\beta 1$ (residus 33-38), $\beta 4$ (63-70) i $\beta 5$ (77-84). En el cas de l'ONC, trobem una deleció de la cadena $\beta 2$, essent reemplaçada per un *loop* curt [93, 99, 100]. Conté tres hèlixs- α : $\alpha 1$ (residus 3-10), $\alpha 2$ (19-23) i $\alpha 3$ (41-48), presentant la última una barreja entre hèlix- α i hèlix- 3_{10} . La resta de residus es troben en 4 girs o *loops*, i en un gir irregular a $\alpha 1$ - $\alpha 2$. Els loops de l'ONC en comparació a la RNasa A es redueixen a la llargada mínima necessària per unir els elements d'estructura secundària, preservant la seva estructura terciària global i conferint-li una estructura remarcablement compacta [93].

Ponts disulfur. L'ONC presenta 8 cisteïnes que formen 4 ponts disulfur intracatenaris (posicions 19-68, 30-75, 48-90 i 87-104). D'aquests, els 3 primers són homòlegs als que es troben a l'RNasa A, entre els residus 26-84, 40-95 i 58-110, respectivament. El pont disulfur 87-104 propi a l'extrem C-terminal (*Figura 4C i D*), compartit amb altres RNases d'amfibi, aguanta i compacta l'estructura [93] contribuint en l'elevada estabilitat conformacional [101, 102] i essent iniciador del plegament [103]. El pont disulfur 30-75 és el que es troba més exposat, respecte els altres ponts disulfur d'ONC i de la RNasa A, trobant-se segurament reduït en condicions fisiològiques [104, 105].

Ancoratge dels extrems N- i C- terminals. L'ancoratge de l'extrem N-terminal de la cadena polipeptídica amb el cos de l'ONC [102, 106, 107] és una propietat compartida amb altres RNases d'amfibi (*Figura 5B*). A l'extrem N-terminal trobem una xarxa de ponts d'hidrogen entre el residu Pyr1 i els residus Lys9 i Val96, ocasionant un acostament de l'hèlix- $\alpha 1$ al centre actiu de l'enzim. Tot i que el Pyr1 participa en la compactació de l'extrem N-terminal, canvis en aquest residu afecten principalment a l'activitat catalítica, alterant en menor grau l'estabilitat de la proteïna [96, 106], malgrat que aquest residu redueix la susceptibilitat de la proteïna per les aminopeptidases [108]. A l'extrem C-terminal, els residus Gly100 fins a Cys104 es disposen al mateix pla de la fulla- β de V1 ($\beta 3$, $\beta 6$, $\beta 7$), trobant-se estabilitzats per ponts d'hidrogen i pel pont disulfur C-terminal característic entre els residus Cys87 i Cys104 [101, 102, 107].

Clúster hidrofòbic del lòbul V2. La regió hidrofòbica o *clúster* hidrofòbic situada entre l'hèlix- $\alpha 1$ i el primer full- $\beta 1$, intervé en l'estabilitat i en els processos de plegament i desplegament de l'ONC [91, 101]. Es troba conservada en gran part d'enzims d'aquesta superfamília [109]. Està formada pels residus Val17, Ile22, Met23, Leu27, Phe28 i Phe36 (*Figura 5C*) (corresponents als residus Tyr25, Met29, Met30, Leu35, Thr36 i Phe46 de RNasa A). Malgrat que el residu Thr36 es troba conservat en la majoria de membres de la superfamília de la RNasa A, a l'ONC hi trobem una Phe en posició 28 [110, 111].

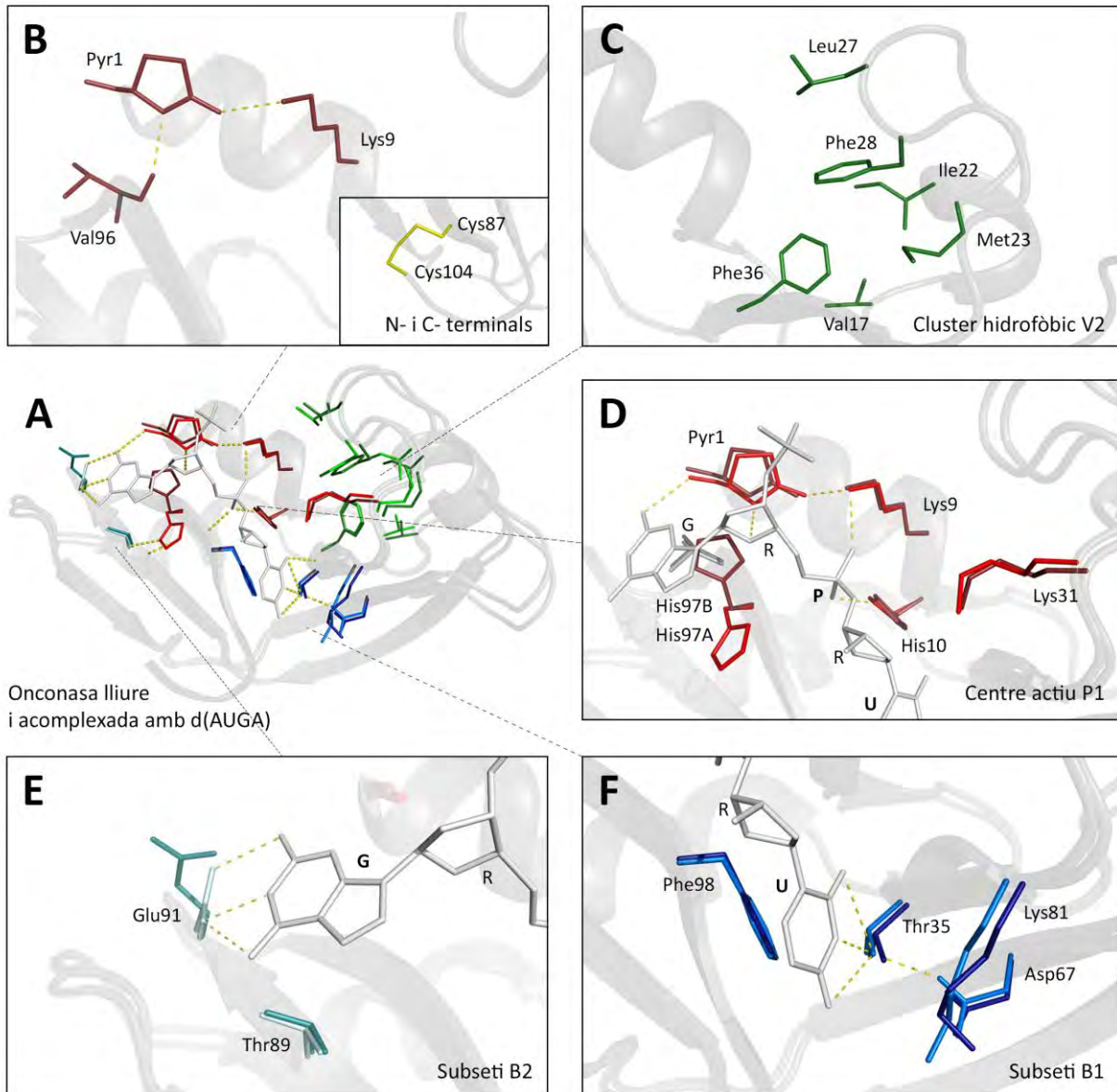


Figura 5. Estructura de l'ONC: Residus implicats en l'estabilitat i la capacitat catalítica de l'enzim.

A) Alineament de l'estructura general de l'ONC lliure (1ONC [93]) i del complex ONC-d(AUGA) (2I5S [70]). Es mostren ampliacions d'A): **B)** Detall de l'ancoratge dels extrems N- i C- terminals de l'ONC, a través de la xarxa de ponts d'hidrogen de Pyr1 i del pont disulfur Cys87-Cys104. **C)** Detall dels residus del nucli hidrofòbic del lòbul V2. **D)** Residus catalítics del centre actiu P1 de l'ONC lliure solapats amb els d'ONC-d(AUGA), per ressaltar les variacions que sofreixen els residus catalítics en acomplexar-se al substrat no hidrolitzable d(AUGA) (en blanc). G. Guanina. R. Ribosa. P. Fosfat. U. Uracil. **E)** Residus del subseti B2 de l'ONC solapats amb els d'ONC-d(AUGA). **F)** Residus del subseti B1 de l'ONC solapats amb els d'ONC-d(AUGA). En cada cas, el color més fosc coincideix amb els residus de l'ONC lliure. La figura s'ha realitzat amb el programa PyMol (<http://pymol.sourceforge.net/>).

B) Activitat catalítica i subsetis de l'ONC

L'ONC presenta una elevada citotoxicitat selectiva per cèl·lules tumorals humanes, de forma considerablement major que les seves homòlogues de mamífer, malgrat presentar una activitat ribonucleolítica d'entre 3 i 5 ordres menor per substrats d'RNA [69, 94, 96]. La baixa activitat de l'ONC en relació a les RNases pancreàtiques homòlogues, està relacionada a nivell global per una banda amb l'elevada rigidesa de l'enzim [96, 99], en el qual no s'ha observat el característic moviment conformacional de la RNasa A lligat a la taxa de recanvi de substrat i considerat important per l'eficiència catalítica [99, 112]. Per altra banda, l'estructura lleugerament més ampla del centre actiu de l'ONC respecte la RNasa A sembla afectar a l'activitat. Finalment, presenta petites modificacions dels subsetis d'unió al substrat [113] que determinen una baixa afinitat pels àcids nucleics de cadena senzilla [96].

Subseti P1 o Centre Actiu. De la mateixa manera que ha estat descrit per a la RNasa A, s'ha proposat que les RNases homòlogues interactuen amb substrats d'RNA a diferents subsetis de l'enzim, situats al llarg de l'esclatxa central enmig dels dos lòbuls característics. Es diferencien subsetis d'unió de grups fosfat (subsetis P; P1 correspon al centre actiu), de riboses (subsetis R), i de les nucleobases (subsetis B) (revisat a [47]). Al centre actiu o subseti P1 de l'ONC s'acomoda la tríada catalítica His10, Lys31 i His97 [94], conservada en els membres de la superfamília de les RNases pancreàtiques (His12, Lys41 i His119 a la RNasa A [47, 93]). Les His10 i His97 funcionen com a base i àcid, respectivament, en la reacció de catàlisi, com a la RNasa A [114, 115] i contribueixen a la unió amb el substrat ribonucleic, essent crítics per la catàlisi [96, 116]. El residu catalític His97 de l'ONC presenta dues posicions possibles, apartant-se del centre actiu quan l'enzim s'acomplexa a un substrat en la conformació His97A, activa (complex ONC-d(AUGA), 2I5S [70], amb el substrat no hidrolitzable d(AUGA)), en contrast amb la conformació His97B, inactiva, que trobem a l'ONC lliure (1ONC [93]) (*Figura 5D*). A la RNasa A, l'aminoàcid equivalent His119, tot i tenir també accés a més d'una conformació [117], es troba més sovint en la conformació A, catalíticament rellevant [118]. Aquest fet és degut a una estabilització de la cadena lateral de His119 mitjançant interaccions electrostàtiques i estèriques amb Asp121 [119], fet que no ocorre entre els residus Val99 i His97 de l'ONC, que es troben més distants. Aquesta conformació atípica de His97, amb més llibertat conformacional que les seves homòlogues més actives de la família de la RNasa A, sembla ser una de les causes de la baixa eficiència catalítica de l'ONC [96].

Al seu torn, la cadena lateral del residu catalític Lys31 presenta una major llibertat conformacional i es troba 1 Å més distant del centre actiu a l'ONC lliure (1ONC [93]; i 3SNF [100]) que a la RNasa A lliure [93, 97, 100], fet que es veu disminuït quan l'enzim s'acomplexa amb un substrat (ONC-d(AUGA); 2I5S [70]) [100]. L'elevada mobilitat de la cadena lateral i la posició natural de Lys31 allunyada del centre actiu, contribueixen a la baixa activitat de l'ONC respecte als seus homòlegs, i indica la importància d'aquest residu en la catàlisi [96, 112].

A més de la tríada catalítica, en el cas de l'ONC s'ha observat la participació d'altres residus importants per l'activitat catalítica i citotoxicitat: Pyr1 i Lys9, la segona dels quals junt amb Lys31, participa en l'estabilització de l'estat de transició [96] (a diferència de la RNasa A on la Lys41 (homòloga de Lys31 d'ONC) faria aquesta funció però la Gln11 (equivalent de Lys9 d'ONC) només intervindria en la unió amb el substrat [120]).

El residu N-terminal característic Pyr1 s'ha observat que és essencial per l'activitat enzimàtica i citotoxicitat de l'enzim, contribuint a la k_{cat}/K_M en un factor de 20 vegades [95, 96]. Aquest residu es forma per la ciclació mitjançant un atac nucleofílic del grup α -amino-terminal de la cadena lateral de la Gln1 sobre el carboni amídic, amb alliberament d'amoniac [121] (Figura 6). Pyr1 forma una xarxa de ponts d'hidrogen N-terminal, amb el N del grup ϵ -amino de la cadena lateral del residu catalític Lys9 i amb el grup CO del residu Val96 situat al full- β 7 de l'extrem C-terminal [93]. El residu Lys9 interactua amb el fosfat principal del substrat durant la catàlisi i essencial per l'activitat de l'enzim [93, 96]. Raines i col·laboradors proposaren que l'establiment del pont d'hidrogen amb Pyr1 estabilitza la cadena lateral d'aquest residu, limitant-ne la rotació i afavorint el seu correcte posicionament respecte el substrat [96]. El pont d'hidrogen del grup NH de l'amida ciclada de Pyr1 amb el grup CO de la Val96 del full- β C-terminal, provoca que l'hèlix- α 1 quedi empaquetada sobre el cos principal de l'ONC i formi part del centre actiu de l'enzim (Figura 5B i Figura 6C). A més, el residu Pyr1 estableix dos enllaços d'hidrogen amb el substrat, un des de la cadena principal i un des de la cadena lateral, afavorint potencialment la seva estabilització.

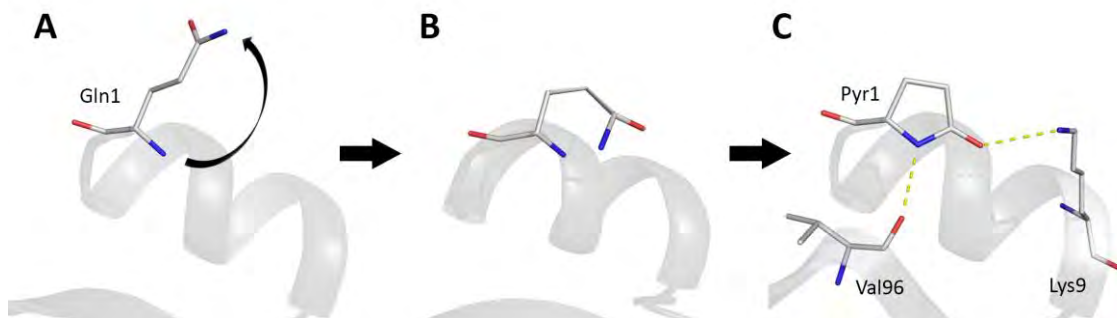


Figura 6. Ciclació de la glutamina (Gln1) a piroglutàmic (Pyr1).

Esquema de l'extrem N-terminal de l'ONC on es representa el procés de ciclació de la glutamina N-terminal a piroglutàmic. **A)** Glutamina a l'extrem N-terminal. **B)** Ciclació de la glutamina, el grup amino de la cadena lateral forma un enllaç amb el C α alliberant-se un grup NH $_3^+$. **C)** Piroglutàmic situat a l'extrem N-terminal formant interaccions amb la Lys9 i la Val96. La figura s'ha fet emprant el programa PyMol (<http://pymol.sourceforge.net/>).

La citotoxicitat de les ribonucleases de granota es veu dramàticament reduïda si es substitueix el residu Pyr1 [106, 113], la qual cosa dificulta el disseny de mutants de l'ONC que incorporin canvis al primer residu [95, 113]. Malgrat tot, el grup de Rybak [95] demostrà mitjançant diferents substitucions del residu N-terminal que, segons la naturalesa d'aquest, es conservava

un percentatge de l'activitat ribonucleolítica suficient com per presentar citotoxicitat, com és el cas dels mutants d'ONC Gln1Tyr o sobretot, Gln1Ser, aquest últim estudiat també per Liao i col·laboradors [106]. Es suggerí que la presència dels àtoms d'oxigen del grup hidroxil de Ser o Tyr és crucial per l'activitat catalítica i citotoxicitat de l'ONC, assumint el rol de l'oxigen del carbonil del Pyr i permetent la formació de la xarxa de ponts d'hidrogen de l'N-terminal [95, 96, 106]. L'estudi de Gorbatyuk i equip [112], en el qual s'observà una flexibilitat molt menor a l'hèlix- α N-terminal del mutant E1S-rONC que a Met-1/Q1/M23L-rONC, sembla corroborar la formació d'aquesta xarxa de ponts d'hidrogen.

Subsetis B1 i B2 i preferència de base. Els dos subsetis B1 i B2 presenten una preferència de bases. La discriminació de les bases a cada subseti es basa en interaccions electrostàtiques o de Coulomb i en un entramat de ponts d'hidrogen amb els residus implicats [70]. L'ONC presenta preferència per Uracil al subseti pirimidínic (B1, base a 5' de l'enllaç que s'ha d'escindir) i per Guanina al subseti de purines (B2, base a 3' del punt de tall) [96, 106] (a diferència de U/C i A, respectivament, de la majoria de RNases de mamífer [122]). El subseti B1 (*Figura 5F*) està format pels residus Lys33, Thr35, Asp67 i Phe98, dels quals el primer no es troba conservat a la RNasa A [70]. En el complex ONC-d(AUGA) [70] es pot apreciar que el grup hidroxil del residu Thr35, essencial pel reconeixement de les pirimidines, forma tres ponts d'hidrogen amb N4 i O2 de la nucleobase d'uracil del complex. En relació a la Lys33, es creu que l'elevada mobilitat de la seva cadena lateral podria ser la causa de la baixa afinitat de l'ONC pels substrats ribonucleics [100]. Per altra banda, al subseti B2 (*Figura 5E*) s'hi localitzen els residus Thr89 i Glu91. Al complex ONC-d(AUGA) els aminoàcids Thr89 i Glu91 es troben més propers a la nucleobase que els d'ONC lliure, establint el primer residu interaccions electrostàtiques i el segon, formant tres ponts d'hidrogen amb la Guanina [70].

Substrats de l'ONC. Tot i que aquest enzim presenta la possibilitat d'unió a DNA i RNA al seu centre actiu [70, 96], el seu substrat natural és RNA intracel·lular. Degrada principalment tRNA [123, 124] (concretament en el loop variable del braç-D [125]) interferint en la síntesi proteica, i miRNA involucrats en la regulació de l'expressió gènica mitjançant processos d'iRNA [126, 127]. L'ONC deixa, en canvi, els rRNA i mRNA intactes (revisat a [126, 128]). La selectivitat de l'ONC per cèl·lules tumorals, les quals s'associen amb alteracions dels nivells de miRNAs [129-131], es pot relacionar amb aquesta capacitat de l'ONC de degradar miRNAs. L'ONC escindeix específicament segons la base (UG>GG>CG) [132], catalitzant el trencament de l'enllaç P-O_{5'} dels nucleòtids situats als subsetis B1-P1-B2 [70].

Mecanisme de catàlisi. El mecanisme de catàlisi de l'ONC sembla ser equivalent al de la RNasa A i a les altres RNases pancreàtiques, a través de les His catalítiques, realitzant una reacció àcid-base i duent-se a terme en dues etapes: La primera, reversible, és una reacció de transfosforilació d'un enllaç fosfodièster, des de la posició 5' d'un nucleòtid a la posició 2' del nucleòtid adjacent, formant-se un extrem amb un nucleòsid 2',3'-fosfat cíclic i un extrem 5'-OH

lliure. En la segona etapa, es trenca l'enllaç fosfodièster 2',3'-cíclic, formant-se un grup nucleòsid 3'-fosfat terminal. La preferència de base a la posició 3' de l'enllaç que es digereix és tant per la RNasa A com per l'ONC, per a pirimidina. La reacció de transfosforilació es produeix a una velocitat molt superior a la de trencament final de l'enllaç [133].

C) Citotoxicitat de l'ONC i mecanisme citotòxic

L'ONC presenta activitats aspermatogènica, embriotòxica i immunosupressora [134], però també elevada activitat citotòxica i citostàtica per cèl·lules tumorals, la qual ha estat demostrada *in vitro* utilitzant diverses línies de cèl·lules canceroses [90] i *in vivo* en diferents models tumorals [135-137]. Està descrit que l'ONC presenta sinergisme en combinació amb determinats agents quimioterapèutics [136, 138, 139] (revisat a [140]). L'elevada citotoxicitat de l'ONC s'atribueix sobretot a la seva habilitat per escapar o evadir l'RI en condicions fisiològiques [82, 113], a més de a la seva inusual elevada estabilitat conformacional deguda a la seva estructura compacta [91, 101], i a l'activitat ribonucleolítica [69, 70, 94]. Finalment, també la seva elevada càrrega neta positiva [94], important per la degradació de l'RNA [141], es relaciona amb la seva capacitat d'internalització [142-144]. El model que actualment es postula que segueix l'ONC per induir el procés de citotoxicitat per apoptosi, es divideix en diverses fases (*Figura 7*), que es detallen a continuació.

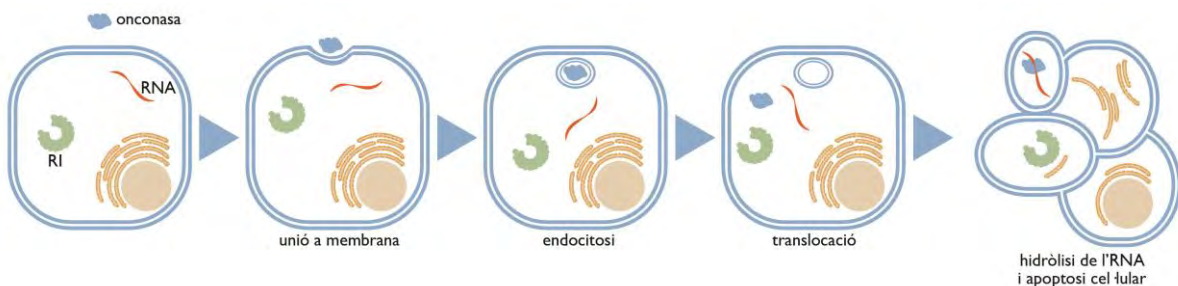


Figura 7. Mecanisme de citotoxicitat de l'ONC.

L'ONC interacciona amb la membrana cel·lular, internalitza per endocitosi, transloca al citosol i evadeix l'RI. Finalment és capaç de degradar l'RNA cel·lular, induint apoptosi.

Interacció amb la membrana plasmàtica i endocitosi. Perquè una RNasa desenvolupi la seva activitat citotòxica, primerament cal que interaccioni amb la membrana cel·lular, de manera específica a través d'un receptor (com el descrit per a les RNases cSBL o jSBL [145]) o bé de forma inespecífica mitjançant interaccions electrostàtiques de Coulomb [146]. El caràcter bàsic de les RNases, com l'ONC, pot afavorir la seva interacció i posterior adsorció a les membranes cel·lulars, les quals presenten càrrega neta negativa. Aquest fet explicaria la selectivitat de l'ONC per les cèl·lules tumorals [146-148] ja que la majoria de cèl·lules canceroses presenten una càrrega neta negativa més elevada que les cèl·lules sanes [149, 150] degut a la major

proporció de fosfolípids d'etanolamina respecte els de colina [151]. L'ONC sembla unir-se a les cèl·lules de forma saturable, i concentrant-se en invaginacions de la membrana (*coated pits*) [142]. Probablement la seva internalització involucra algun receptor de la superfície cel·lular [152], el qual fins el moment no ha estat identificat. Malgrat tot, algun estudi contradiu aquesta qüestió, com una variant d'ONC marcada amb Oregon Green que s'unia de forma no-saturable a la superfície cel·lular de cèl·lules HeLa, indicant l'absència de receptors específics [77]. Per tant, el mecanisme pel qual l'ONC inicia el procés d'internalització és encara motiu de controvèrsia.

Trànsit intracel·lular i translocació a citosol. Malgrat que un estudi proposà que l'entrada de l'ONC a la cèl·lula era clatrina-/dinamina-independent [77], actualment es postula que, una vegada endocitada, l'ONC segueix la ruta d'endocitosis mediada per AP-2/clatrina (Clatrin Mediated Endocytosis, CME) [142]. Llavors és dirigida als endosomes de reciclatge, seguint la mateixa via que la transferrina [142]. Dels endosomes de reciclatge, l'ONC transloca cap a citosol [77, 142, 153], evitant així el reticle endoplasmàtic i l'aparell de Golgi [77, 95, 152]. La translocació és energia-depenent [142, 152], i sembla veure's afavorida per la neutralització del pH dels endosomes, que incrementa la toxicitat d'ONC [142]. En el moment de la translocació a través de la bicapa lipídica semblen ser els residus 49, 73, 76 i 78 els que juguen un paper més important [154]. S'ha observat que algunes ribonucleases poden resultar ser milers de vegades més tòxiques quan s'introdueixen artificialment dins el citosol [153, 155], demostrant que l'eficiència d'internalització i translocació és un factor limitant i clau per la citotoxicitat d'una ribonucleasa [156]. L'estabilitat de l'ONC al citosol, poc susceptible a la proteòlisi, es relaciona també amb la seva citotoxicitat [91, 157].

Evasió de l'Inhibidor de Ribonucleases (RI) i acció catalítica. Una vegada al citosol, l'ONC no és inhibida per l'RI [92, 113, 154], presentant una afinitat molt baixa per aquest, del rang micromolar ($K_i = 0.15 \mu\text{M}$ a baixa força iònica [154]). Degut a aquest fet, l'estructura de l'ONC acomplexada amb l'RI no s'ha resolt fins el moment. L'estructura detallada de l'RI s'explica a l'apartat B) *Interacció de l'HP-RNasa amb l'RI d'origen humà (hRI)*, al punt introductori 2.2.3.2. La capacitat de l'ONC d'evasió de l'RI s'atribueix a la reducció de la longitud d'alguns loops exposats, amb absència o modificació de la gran majoria dels residus responsables de la unió amb l'RI, identificats i conservats a altres RNases que presenten més afinitat [113, 154, 158]. A més, la reducció del pont disulfur C30/C75 de l'ONC una vegada aquesta arriba al citosol [104] podria influir en l'evasió de l'RI. Gràcies a aquesta capacitat, l'ONC pot exhibir la seva activitat catalítica degradant el tRNA i miRNA cel·lular, interferint en la funció d'aquests i induint l'apoptosi cel·lular [40, 123, 159, 160]. Malgrat que aquesta RNasa presenta una activitat ribonucleolítica molt baixa comparada amb la RNasa A o l'HP-RNasa, aquesta és essencial per la seva citotoxicitat [69, 96].

D) L'ONC com a agent quimioterapèutic en clínica humana

Les característiques citotòxiques explicades anteriorment van facilitar que l'ONC fos la primera RNasa a ser estudiada com a fàrmac antitumoral [161, 162] i a ser aplicada en assajos clínics. Assolí la fase de prova II pel càncer de cèl·lules no-petites de pulmó (NSCLC) (revisat per [163, 164]) i la fase confirmatòria IIIb pel tractament del mesotelioma maligne [163], fallida recentment en demostrar la seva inutilitat en pacients [165]. Encara que és una proteïna de granota i és immunològicament tolerada pels humans [89], el seu ús clínic s'ha vist limitat degut a la toxicitat renal que presenta a elevades concentracions [166, 167], probablement lligada a l'elevada estabilitat i resistència a la proteòlisi [91].

S'ha observat que l'ONC, com la BS-RNasa i algunes altres RNases, a concentracions no tòxiques per les cèl·lules presenta activitat antiviral a través de la degradació de l'RNA viral [167-169], essent testada en proves clíniques contra virus patògens, de ssRNA com els flavivirus causants de la febre groga o del dengue (DENV) i el coronavirus de la Síndrome Respiratòria Severa Aguda (SARS), o també de dsDNA, com els citomegalovirus (CMV) i el Papillomavirus humà (HPV). A concentracions subtòxiques d'aquesta ribonucleasa, també s'ha observat la inhibició de la replicació del Virus de la Immunodeficiència Humana de tipus 1 (HIV-1) *in vitro* en cèl·lules leucèmiques H9 [169].

2.2.3.2. RNases citotòxiques mitjançant enginyeria de proteïnes: l'HP-RNasa

El coneixement de les bases moleculars de la citotoxicitat de les RNases amb citotoxicitat natural ha permès el desenvolupament de noves variants d'RNases dissenyades per tenir una acció citotòxica amb interès clínic. Aquestes RNases es podrien aplicar com a alternativa o complement als agents quimioterapèutics antitumorals convencionals que poden danyar el DNA, bé sigui soles o conjugades amb lligants o anticossos. D'entre totes les RNases no citotòxiques, una de les més interessants com a base per a la creació de variants citotòxiques és la Ribonucleasa Pancreàtica Humana (HP-RNasa) (Revisat per [170]).

L'HP-RNasa (RNasa 1 [171] o HPR, EC 3.1.27.5) és l'homòloga humana de la RNasa A, localitzada per primera vegada al pàncrees humà. La seva seqüència d'aminoàcids [46], revelà que aquest enzim és una proteïna bàsica ($pI= 8.9$, $Z= +6$) d'una massa molecular de 14.6 kDa. Està formada per 128 residus aminoacídics, compartint un 70% d'identitat de seqüència amb la RNasa A, i presentant propietats enzimàtiques similars [45]. L'enzim humà difereix de l'homòleg boví en 42 posicions, amb una major proporció de residus bàsics situats sobretot als *loops*, i també a la prolongació de 4 residus C-terminal (-EDST) [172]. La seva temperatura de fusió T_m és d'uns 50 – 57 °C segons l'assaig [40, 173, 174], essent una mica menys termoestable que la RNasa A (T_m de 62 °C).

A) Estructura tridimensional

Mentre que per a la RNasa A hi ha més de 100 entrades al Banc de Dades de Proteïnes (PDB) descrivint estructures de l'enzim lliure, derivats, mutants i proteïnes híbrides i de l'enzim unit a diferents substrats o anàlegs [175], i se'n coneix l'estructura cristal·logràfica lliure [97] i en solució [176], l'HP-RNasa salvatge lliure no ha estat possible de cristal·litzar. Aquesta limitació probablement és deguda a la presència de càrregues positives (Arg4 i Lys6) al seu extrem N-terminal. S'ha pogut obtenir la seva estructura en solució [98, 177] i s'ha aconseguit la resolució de l'estructura cristal·logràfica de mutants d'HP-RNasa, com per exemple la RNasa1ΔN7 (o des1-7 HP-RNasa) (deleció dels 7 primers residus de l'hèlix-α1 que la fan més estable i cristal·litzable [178]) o la variant PM7, que presenta els canvis R4A, K6A, Q9E, D16G, S17N i P50S [172]. Aquestes substitucions milloren tant l'expressió de la proteïna recombinant com semblen també afavorir-ne la cristal·lització [172, 173].

Els elements d'estructura secundària definits per la proteïna en solució coincideixen amb els definits a través de l'estructura cristal·logràfica d'aquestes variants. L'HP-RNasa presenta el característic plegament global bilobular de les RNases pancreàtiques amb el centre actiu en l'esclatxa central (*Figura 4B*), amb la tríada catalítica conservada His12, Lys41 i His119 [172, 178]. Els dos fulls-β que formen els dos lòbuls, V1 i V2, es troben estructurats en 7 cadenes-β. El lòbul V1 comprèn les cadenes β1 (V43-V47), β4 (H80-L86) i β5 (Y97-E103), presentant una petita cadena β0 després de la primera hèlix. L'altre lòbul, V2, inclou les cadenes β2 (E61-V63), β3 (C72-K74), β6 (I106-E111) i β7 (V116-S123). Compta també amb la presència de les tres hèlix-α (α1, R4-Q9; α2, Y25-R32; α3, L51-Q60). A la zona final de la darrera hèlix, trobem una regió que es va distorsionant progressivament fins a organitzar-se en una hèlix-3₁₀. L'HP-RNasa conserva els 4 ponts disulfur característics de la RNasa A, formant-se entre les cisteïnes 26-84, 40-95, 58-110 i 65-72 (*Figura 4D*).

Són remarcables també els 7 residus de prolina de la proteïna humana, situats en els girs. Quatre d'aquestes prolines es troben a la mateixa posició que a la RNasa A (prolines 42, 93, 114 i 117), mentre que les altres tres són exclusives de l'HP-RNasa (posicions 19, 50 i 101) [179]. La isomerització *cis-trans* en els grups peptídics X-Pro és un dels passos que determinen la velocitat del plegament [180], i per tant, també del rendiment en processos de purificació. Les prolines essencials pel plegament semblen relacionar-se amb conformació *cis* que sol situar-se en zones amb estructura secundària crítica, en girs estrets o completament enterrades en l'estructura, causant processos de plegament més lent [181-183]. De les prolines extra que presenta l'HP-RNasa respecte a la RNasa A, la Pro19 es localitza en una regió no-estructurada i en la resolució estructural de la variant d'HP-RNasa PM7 no se'n pogué estudiar la conformació [172], però es coneix que aquest residu, present a altres RNases, sol trobar-se en *trans* [184]. Tanmateix, per la regió exposada i flexible on es troba, sembla que no hauria de jugar un rol crític al procés de plegament. Els enllaços peptídics previs a les prolines

Pro50 i Pro101 es troben en conformació *trans* [172]. A la RNasa A, s'ha vist que les prolines essencials pel plegament són *cis*-Pro114, *trans*-Pro117 i *cis*-Pro93 [185], demostrant que una *trans*-Pro pot limitar també el procés de plegament. Així, la Pro50, en conformació *trans*, i que sembla afectar més que no pas la Pro101 en el procés de plegament de l'HP-RNasa [173], podria ser la responsable de les diferències observades en el plegament i rendiment en la producció heteròloga entre l'RNasa A i l'HP-RNasa. Tot i així, amb l'experiència de producció d'aquest tipus de proteïnes recombinants al grup de recerca, la presència d'aquestes prolines extra de l'HP-RNasa no sembla que sigui crítica.

B) Interacció de l'HP-RNasa amb l'RI d'origen humà (hRI)

L'estructura de l'HP-RNasa unida amb l'RI d'origen humà (hRI) (1Z7X.pdb [174]), coincideix molt bé amb els elements d'estructura secundària detallats anteriorment. L'RI és una proteïna de massa molecular d'uns 50 kDa i pl àcid d'aproximadament 4.7 [42]. Presenta una estructura formada per repeticions de motius β - α rics en leucina (LRRs), distribuïts en forma de ferradura [186]. L'estructura cristal·logràfica del complex HP-RNasa - hRI a una resolució de 1.95 Å revelà que, igual que pel complex observat entre la RNasa A i l'RI d'origen porcí (pRI) [186], la inhibició de l'HP-RNasa és deguda a que alguns dels residus implicats en la unió amb l'hRI són residus catalítics que formen part del seu centre actiu [158], junt amb els llaços que l'envolten, impeding l'accés del substrat.

Malgrat la similitud de seqüència amb la RNasa A, s'ha vist que l'HP-RNasa interacciona de forma diferent amb l'RI: s'associen 2 complexos (*Figura 8A*), estabilitzant el dímer mitjançant ponts d'hidrogen formats entre les cadenes- β N-terminals de dues molècules d'hRI. L'hRI, aniónic (*Figura 8E*), treu partit de la cationicitat de l'HP-RNasa [158, 187] (*Figura 8F i G*), qualitat necessària per la unió amb els seus substrats d'RNA aniónics, per a establir inicialment interaccions electrostàtiques o de Coulomb a llarga distància [146]. Llavors, el complex hRI - HP-RNasa seria estabilitzat mitjançant forces específiques de curta distància (interaccions hidrofòbiques, de Van der Waals i ponts d'hidrogen), les quals es formen en major nombre i resulten més curtes i fortes i enterren més superfície exposada que les de la seva homòloga bovina. Així a l'HP-RNasa, dels 24 residus implicats, 13 formen 19 ponts d'hidrogen amb l'hRI (*Figura 8B i C*), establint un complex extremadament estable i incrementant l'afinitat d'unió de l'HP-RNasa a l'hRI fins al rang subfemtomolar ($K_d = 2.9 \times 10^{-16}$ M). Així doncs, l'HP-RNasa es dissocia del seu inhibidor 150 vegades més lentament que la RNasa A [174]. Aquesta elevada afinitat i estabilitat del complex indica la importància evolutiva de controlar l'activitat ribonucleolítica [81, 174] i explica perquè el disseny de variants d'HP-RNasa que evadeixin l'RI resulta més difícil que per la RNasa A [40, 188]. Així, si bé es demostrà per l'enzim boví que una sola substitució Gly88Arg o Gly88Asp al llaç β 4 β 5 permetia evadir l'inhibidor i ser citotòxic [92], la incorporació de canvis solament a aquest llaç o l'única substitució del residu homòleg Gly89Arg a l'HP-RNasa, no és suficient per evitar la inhibició i resultar citotòxica [172, 188].

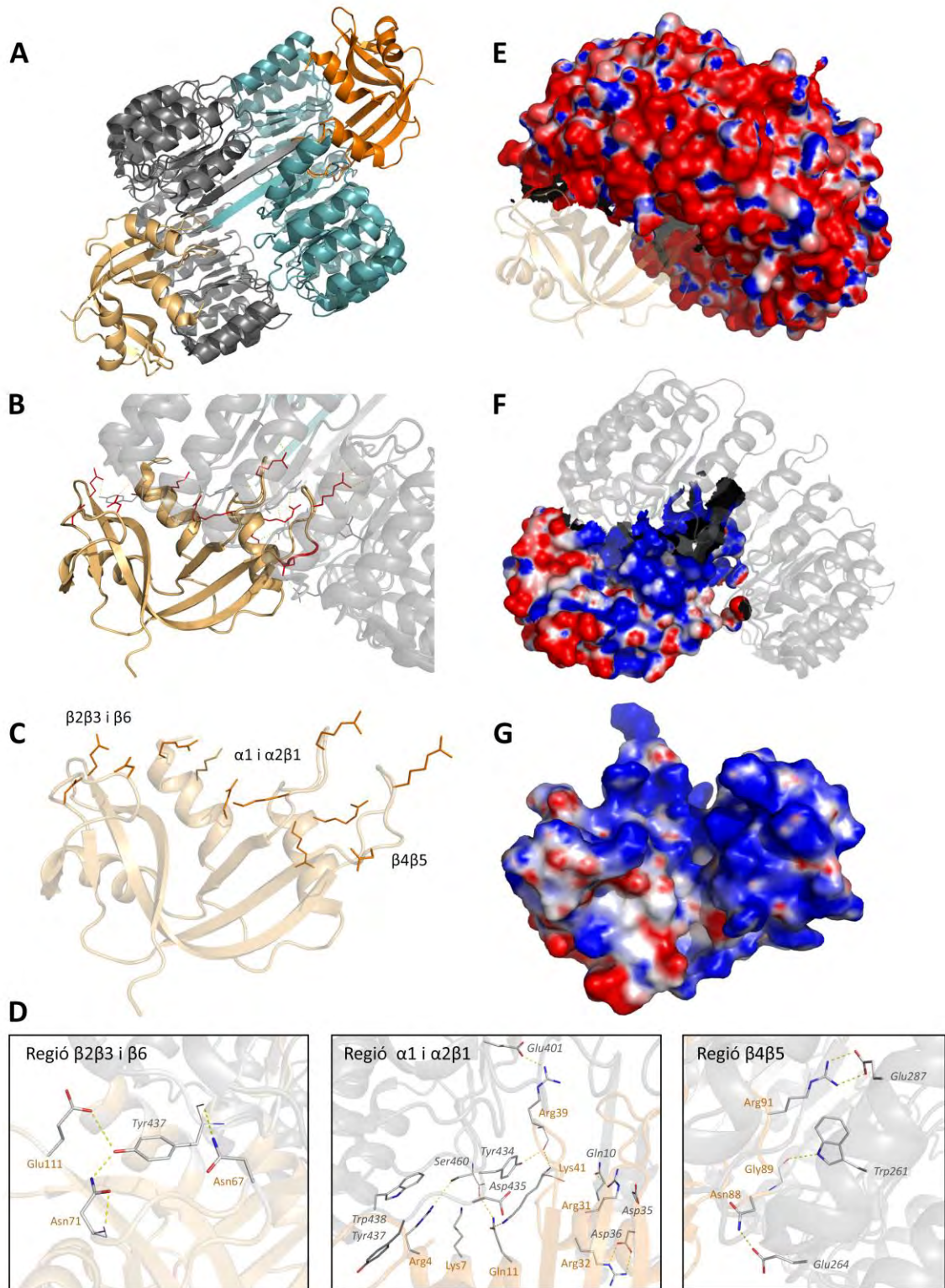


Figura 8. Estructura i potencial electrostàtic del complex hRI-HP-RNasa.

A) Diagrama en cintes de les dues unitats del complex hRI-HP-RNasa (1Z7X [174]). **B)** Detall dels residus de contacte hRI-HP-RNasa. **C)** Estructura de l'HP-RNasa amb els residus implicats en la unió amb l'hRI ressaltats en barres. **D)** Detall dels residus de les regions de contacte hRI-HP-RNasa. Es ressalten els residus implicats en barres (gruixudes per la cadena lateral i fina per l'esquelet principal) i en colors CPK, i s'etiqueten en taronja per a la HP-RNasa i en gris per a l'hRI. **E i F)** Potencial electrostàtic de contacte hRI(E)-HP-RNasa a pH 7.0. **G)** Potencial electrostàtic de l'HP-RNasa a pH 7.0 (2K11). Les superfícies de càrrega positiva es mostren en blau, les negatives, en vermell i les de càrrega neutra, en blanc. En negre s'observa la zona de tall de la superfície. Els potencials electrostàtics s'han calculat amb el [servidor web APBS](http://www.apbs.org/), combinat amb [PROPKA](http://www.propka.org/) [189], a partir del fitxer pdb. Les imatges s'han creat amb PyMol (<http://pymol.sourceforge.net/>).

S'han observat tres regions estructurals (*Figura 8C i D*) on es concentren el major nombre de contactes entre diferents ribonucleases pancreàtiques i l'RI [174, 187, 190]. A l'HP-RNasa, els residus que estableixen ponts d'hidrogen amb l'hRI són Arg4, Lys7 i Gln11 a l'hèlix- α 1 i Arg31, Arg32, Arg39 i Lys41 al *loop* α 2 β 1; el residu Glu111 dins el full- β 6 i Asn67 i Asn71 a la regió β 2 β 3; i finalment, els residus Asn88-Gly89-Arg91 al *loop* β 4 β 5 [174]. El residu Arg91, seguit de Arg39, són els que semblen presentar la més gran contribució, no solament intervenint en la formació del complex per atracció de càrregues sinó també estabilitzant-lo mitjançant ponts d'hidrogen permetent la formació d'altres contactes. La majoria dels residus que intervenen a la unió amb l'RI no es troben conservats a l'ONC (*Figura 4D*) [94, 190], fent evident la seva capacitat d'escapar de la inhibició per part de l'RI i explicant la toxicitat que presenta [113].

C) Activitat catalítica i funció de l'HP-RNasa

L'HP-RNasa catalitza la degradació de l'RNA seguint un mecanisme idèntic al descrit per la RNasa A, presentant propietats enzimàtiques similars i compartint la capacitat de degradar l'RNA específicament a l'extrem 3' de bases pirimidíniques. Així mateix, ambdós enzims coincideixen en presentar una marcada preferència pel trencament del poli(C) en relació al poli(U), amb l'òptim d'activitat a pH 8.0 [45]. No obstant, l'HP-RNasa presenta un comportament molt més endonucleolític que el descrit per la RNasa A [172].

L'HP-RNasa, sintetitzada a la part exocrina del pàncrees, forma part del suc pancreàtic en una quantitat molt menor que no la RNasa A al pàncrees boví (10 μ g/g de teixit, comparat amb 1200 μ g/g de teixit per la RNasa A [191]). Malgrat que inicialment es suggerí que podia ser un vestigi evolutiu en vertebrats no remugants [192], actualment es coneix que les cèl·lules endotelials d'artèries, venes i capil·lars poden expressar quantitats elevades d'HP-RNasa de forma selectiva, suggerint la seva implicació en la regulació de l'homeòstasi vascular i explicant la seva presència a diversos òrgans i fluids corporals [193]. Sembla també intervenir en la maduració de les cèl·lules dendrítiques potenciant la producció de citocines [194] i en la protecció del fetus durant l'embaràs. Com altres RNases humanes, podria estar implicada en la reducció de l'RNA extracel·lular, normalitzant la viscositat del sèrum, i en la defensa de les cèl·lules davant RNA patògen [195] (revisat a [65]) gràcies a la capacitat d'inactivació de virus, com per exemple el HIV [196].

En relació a aquesta activitat antiviral s'ha observat que l'HP-RNasa participa en la degradació de RNA tant de cadena senzilla (ssRNA) com doble (dsRNA) [45, 195], i d'híbrids DNA-RNA [197]. En condicions fisiològiques, l'HP-RNasa és la RNasa de vertebrats més activa enfront l'RNA de doble cadena (dos ordres més que la RNasa A) [198]. Aquest fet pot atribuir-se a la major presència de residus bàsics a l'enzim (R4, K6, R32, R39 i K102), sobretot a l'extrem N-

terminal, junt amb Gly38, que de forma cooperativa contribueixen a la desestabilització del dsRNA i estabilització de la cadena senzilla de RNA [195, 199, 200].

D) L'HP-RNasa com a agent terapèutic

Les raons de l'interès per dotar de citotoxicitat a l'HP-RNasa radiquen, per una banda, en el seu origen humà, que fa preveure una menor immunogenicitat en ser aplicada en clínica humana, en comparació amb les homòlogues d'altres espècies [201]. Per altra banda, aquesta proteïna no presenta acumulació *in vivo* als ronyons [57, 166, 202], i la seva activitat catalítica es troba entre tres i cinc ordres de magnitud per sobre l'ONC en funció del substrat [40]. Malgrat la seva elevada activitat i la capacitat d'internalització, de forma natural l'HP-RNasa no és tòxica per a les cèl·lules [146]. Tot i que es postula que la seva ruta de transport cel·lular pot contribuir a la seva baixa citotoxicitat [77, 203], la característica que sembla limitar més aquesta activitat és la forta inhibició causada per l'hRI una vegada la proteïna arriba al citosol [40] (*Figura 3A*). Aquest conjunt de característiques han encaminat diferents grups al disseny i la producció de variants que presentessin citotoxicitat per tal de generar nous agents terapèutics millor tolerats pel pacient.

E) Variants d'HP-RNasa citotòxiques

Per a la construcció de les variants citotòxiques d'HP-RNasa cal considerar múltiples atributs bioquímics, entre ells l'activitat ribonucleolítica, la càrrega catiònica, l'estabilitat conformacional i, especialment, l'evasió de l'hRI [204] (revisat a [58]). L'enorme afinitat de l'HP-RNasa per l'hRI dificulta el disseny de variants citotòxiques de l'HP-RNasa, que han de superar una inhibició major per part de l'RI que la RNasa A per esdevenir citotòxiques [188].

La primera forma d'evitar la inhibició per part de l'hRI, és disminuir l'afinitat de l'HP-RNasa per aquest (*Figura 3D*). Aquesta qualitat s'ha aconseguit introduint canvis puntuals mitjançant mutagènesi dirigida, que ocasionin impediments estèrics o incompatibilitats electrostàtiques a la unió amb l'RI. En són destacables les variants citotòxiques R39D/N67D/N88A/G89D/R91D [174] i ERDD (L86E/N88R/G89D/R91D) [40]. La primera provocà una disminució en l'afinitat per l'hRI (K_d) de 6×10^9 vegades, arribant al rang micromolar, i resultà tòxica per cèl·lules eritroleucèmiques (IC_{50} de 13 μ M). La segona disminuí unes 100 vegades l'afinitat per l'RI presentant una IC_{50} de 7 μ M. Alternativament, s'han inserit els residus necessaris per a fomentar la dimerització espontània, imitant la BS-RNasa [205]. Finalment destacar també QBI-139 (EVade™ RNase Technology de Quintessence Bioscience Inc.), una variant d'HP-RNasa que evadeix l'RI i que es troba actualment en fase I de proves en clínica humana [206].

Però tot i que una RNasa sigui sensible a l'RI *in vitro*, pot presentar citotoxicitat *in vivo* seguint altres mecanismes d'evasió. Així doncs, una altra estratègia per dotar l'HP-RNasa de citotoxicitat és incrementar la internalització, aconseguint una concentració d'enzim a citosol que arribi a saturar a l'RI (*Figura 3E*). Aquesta estratègia s'ha aconseguit bé sigui mitjançant la seva cationització en alguns residus concrets [143, 144, 146, 207], facilitant l'adsorció a la membrana, o bé afavorint la internalització específica mitjançant la unió amb lligands associats a tumors que afavoreixen la interacció amb la membrana cel·lular, com la transferrina, factors de creixement o anticossos [155, 201, 208]. Finalment, s'ha dotat una variant d'HP-RNasa de citotoxicitat dirigint-la a nucli (Revisat per [209]) (*Figura 3F*). La variant d'HP-RNasa anomenada PE5 [203], o l'optimització NLSPE5 [210], malgrat ser sensible a l'RI *in vitro*, mitjançant un senyal de localització nuclear (NLS) interaccionava amb la maquinària d'import nuclear [211] i era dirigida a nucli, específicament cap al nuclèol on l'RI no hi és present, i resultà citotòxica en diverses línies cel·lulars tumorals [203, 212] induint apoptosi [213].

F) La variant més estable PM5

La purificació d'HP-RNasa és difícil degut al baix contingut d'aquest enzim al pàncrees [191]. Al nostre grup es comprovà que l'expressió heteròloga del gen de l'HP-RNasa salvatge era baixa degut a una estructura no optimitzada de l'extrem 5' del mRNA. Atès que per la BS-RNasa succeïa just el contrari [214], es dissenyà una HP-RNasa híbrida, anomenada PM5 [173]. PM5 es construï a partir d'un gen amb la seqüència 5' del gen de la BS-RNasa (triplets codificants per l'N-terminal des del residu 1 al 20) i la resta (residus 21 a 128) de l'HP-RNasa. Degut a l'elevat grau d'homologia entre les dues ribonucleases, PM5 és una variant que conté solament 5 mutacions puntuals respecte l'HP-RNasa salvatge a l'extrem N-terminal: Arg4Ala, Lys6Ala, Gln9Glu, Asp16Gly i Ser17Asn (*Figura 9*). PM5 permet l'obtenció de proteïna pura i homogènia, presentant característiques cinètiques comparables a les d'HP-RNasa i una termoestabilitat 5 °C superior, amb una T_m de 58.3 °C [173, 215], afavorida per les mutacions R4A i K6A. Aquestes substitucions eliminen dos residus bàsics aconseguint incrementar la capacitat de formació d'hèlix- α a l'extrem N-terminal de la proteïna ($Z= +4$) [216].

Tenint en compte totes les característiques que fan de l'HP-RNasa una eina de potencial interès terapèutic, es partí de la variant PM5 com a base per a la creació de zimògens d'HP-RNasa activables per proteases de patògens, per la seva major facilitat d'obtenció.

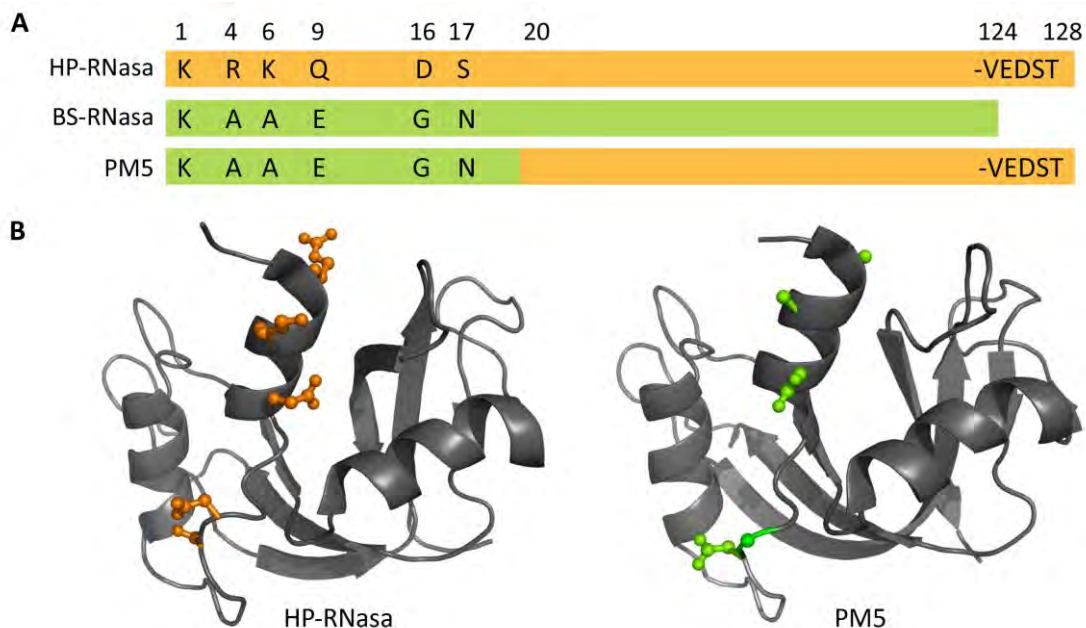


Figura 9. Comparació de la variant PM5 respecte l'HP-RNasa salvatge.

A) Representació esquemàtica de PM5 [173] en relació a l'HP-RNasa i la BS-RNasa on es mostren les 5 posicions en què difereixen. **B)** Estructura tridimensional de PM5 (modelada a partir de la variant PM7 (1DZA.pdb), dreta) en comparació a l'HP-RNasa salvatge (2K11.pdb, esquerra). Es remarquen les 5 substitucions en barres verdes a PM5, en relació als 5 residus originals, en taronja a la HP-RNasa. Estructures realitzades emprant el programa PyMol (<http://pymol.sourceforge.net/>).

2.3. LA SÍNDROME DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA ADQUIRIDA (SIDA)

La Síndrome de la Immunodeficiència Adquirida (SIDA) en Humans és la manifestació d'un conjunt d'infeccions oportunistes que apareixen pel debilitament i descens del sistema immunitari, causant finalment la mort. Aquesta malaltia és provocada pel Virus de la Immunodeficiència Humana (HIV).

2.3.1. EL VIRUS DE LA IMMUNODEFICIÈNCIA HUMANA (HIV)

El HIV és l'agent causant de la SIDA [217]. El HIV és un virus que pertany a la família *Retroviridae*, dins el grup de lentivirus citopàtics. Forma partícules esfèriques d'uns 100 nm de diàmetre. La seva estructura està composta per tres capes (*Figura 10A*): (1) envolta lipoproteica (ML, procedent de la membrana de la cèl·lula hoste), on s'hi ancoren les proteïnes virals de l'envolta (Env) gp120, de reconeixement i unió al receptor CD4 de limfòcits T, gp41 (domini transmembrana) (*Figura 10B*) i proteïnes que provenen de la membrana de la cèl·lula hoste; (2) la matriu (MA) esfèrica intermitja (formada per la proteïna p17) (*Figura 10C*); i (3) la

càpsida (CA) central amb morfologia de con truncat (pentàmers i hexàmers de p24). A l'interior, hi ha el material genètic envoltat per la nucleocàpsida (NC) (*Figura 10D*) i els enzims necessaris per les primeres fases del cicle viral. Infecta principalment limfòcits-T i macròfags. La patogenicitat del HIV-1 *in vivo* sembla estar directament relacionada amb el nivell d'expressió viral [218].

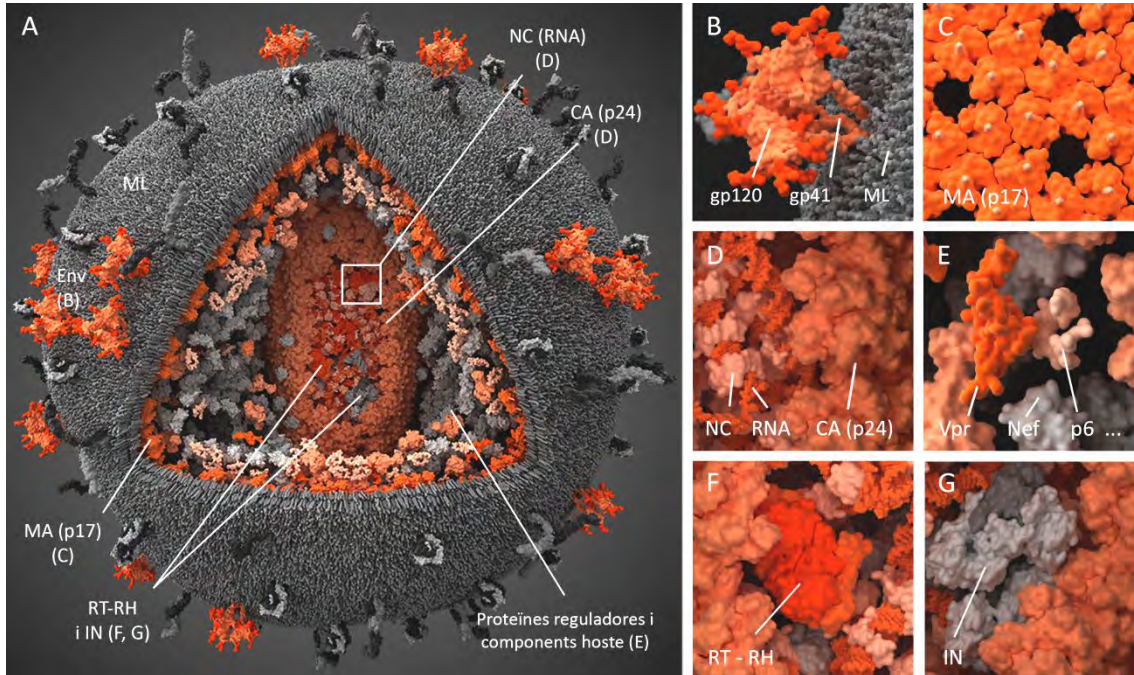


Figura 10. Estructura d'una partícula viral del HIV.

A) Esquema general d'una partícula viral del HIV. S'indiquen les capes de l'envolta: bicapa lipídica (ML) amb les glicoproteïnes de reconeixement (Env) (ampliat i detallant gp120-gp41 a **B**); matriu (MA o p17, ampliat a **C**); Càpsida (CA o p24, ampliat a **D**); nucleocàpsida (NC) envoltant l'RNA (ampliat a **D**). S'observen també els enzims necessaris per la replicació viral: proteïnes reguladores (ampliat a **E**), transcriptasa reversa i RNasa H (RT-RH) (ampliat a **F**) i integrasa (IN, ampliat a **G**). Les imatges individuals s'han extret de <http://visual-science.com>.

Grups i variants de HIV. Existeixen dues tipologies d'aquest virus: HIV-1 i HIV-2. El primer és el que presenta major incidència, i fou aïllat per primera vegada paral·lelament per Luc Montagnier i Robert Gallo, al 1983 [217]. El HIV-2 es troba bastant confinat a l'oest d'Àfrica, i causa una malaltia similar al HIV-1 però el virus és menys transmissible i el davallament del sistema immunitari és més lent [219]. Del primer n'existeixen diferents grups (M, N, O i P). Els grups N, O i P es troben restringits a l'oest d'Àfrica. El grup M, causant de la pandèmia global, es desenvolupa fa aproximadament un segle, i presenta 9 subtipus: A-D, F-H, J i K. El subtipus C predomina a Àfrica i Índia (un 48% dels casos de HIV-1 del 2007). El subtipus B predomina a Europa, Amèrica i Austràlia. La circulació de subtipus recombinants cada vegada és més comuna [220]. La marcada diversitat genètica del HIV-1 és a conseqüència de la funció de la transcriptasa reversa sense correcció d'error, resultant en una elevada taxa de mutació.

Genoma i precursors poliproteínics. El genoma viral està constituït per dues molècules d'RNA monocatenari de polaritat positiva (ssRNA+), poliadenilades a l'extrem 3' i amb l'estructura *cap* (Gppp) a l'extrem 5'. Presenta diferents punts amb marc obert de lectura (ORFs), que permeten expressar uns o altres gens (*Figura 11A*). A la regió central del genoma es troben els tres gens principals del HIV, comuns a tots els retrovirus, denominats *gag*, *pol* i *env* [221], seqüenciats per primera vegada per Ratner i col·laboradors [222]. Aquests gens s'expressaran en forma dels precursors poliproteínics Pr55Gag, Pr160GagPol i Env o gp160, respectivament (*Figura 11B*). Un cop processats, rendiran les proteïnes madures que configuraran els virions infectius (*Figura 11D*). La fosforilació dels precursors Gag i Gag-Pol sembla alterar la susceptibilitat a la digestió per part de la proteasa [223].

El polipèptid Pr55Gag donarà lloc a les proteïnes estructurals de la matriu, de la càpsida i de la nucleocàpsida i p6, p1 i p2 [224]. p6 és essencial per l'alliberament dels virions madurs [225] i p2 sembla intervenir en l'activació i afinitat de la proteasa per les diverses dianes, fent que el procés de maduració es doni de forma seqüencial [226]. Els enzims codificats a *pol* es sintetitzen a partir d'un canvi en el marc de lectura durant la traducció prop del C-terminal de Pr55Gag [227], obtenint el precursor poliproteínic Pr160GagPol. Aquest precursor conté les proteïnes estructurals de Gag i també els enzims involucrats en la replicació viral: proteasa (PR o p11), transcriptasa reversa (RTp51) i RT-RNasa H (RTp66) (*Figura 10F*) i integrasa (IN) (*Figura 10G*). A més, en resulta una proteïna a causa del canvi en el marc de lectura (*transframe protein*, TFP) [228]. Tant les proteïnes madures estructurals de Gag com els enzims de Pol s'obtenen a partir del processament post-traduccionals dels polipèptids precursors dut a terme per la proteasa específica del virus, HIV-1 PR [229]. El tercer gen, *env*, codifica per glicoproteïnes de l'envolta externa (Env) [222], sintetitzant-se també en forma de poliproteïna, gp160. Aquesta, però, a diferència de Gag i Pol, és digerida per una proteasa cel·lular durant la ruta d'Env cap a la superfície cel·lular, resultant en la generació de la proteïna gp120 de la superfície de l'envolta (SU) i la glicoproteïna gp41 transmembrana (TM). gp120 conté els determinants que interactuen amb receptors de membrana de l'hoste, mentre que gp41 ancora el complex gp120/gp41 a la membrana i conté dominis indispensables per catalitzar la fusió de membranes entre les bicapes del virus i de l'hoste durant la infecció viral. A més, el HIV-1 també presenta gens addicionals, com altres lentivirus: dos reguladors (*tat* i *rev*) i quatre gens accessoris (*nef*, *vpr*, *vpu* i *vif*). Tat és crítica per la retrotranscripció i Rev juga un rol important en el transport de l'RNA viral des del nucli fins al citoplasma. Vpu, Vif, Vpr i Nef s'han denominat com a accessoris o auxiliars, reflectint el fet que no són uniformement requerides per la replicació viral (Revisat a [230]). Vpr i especialment Vpu [231] semblen estar implicades en la formació de canals iònics transmembrana que ocasionen la dissipació del potencial electrostàtic (revisat a [232]) afavorint l'exocitosi dels virions [233].

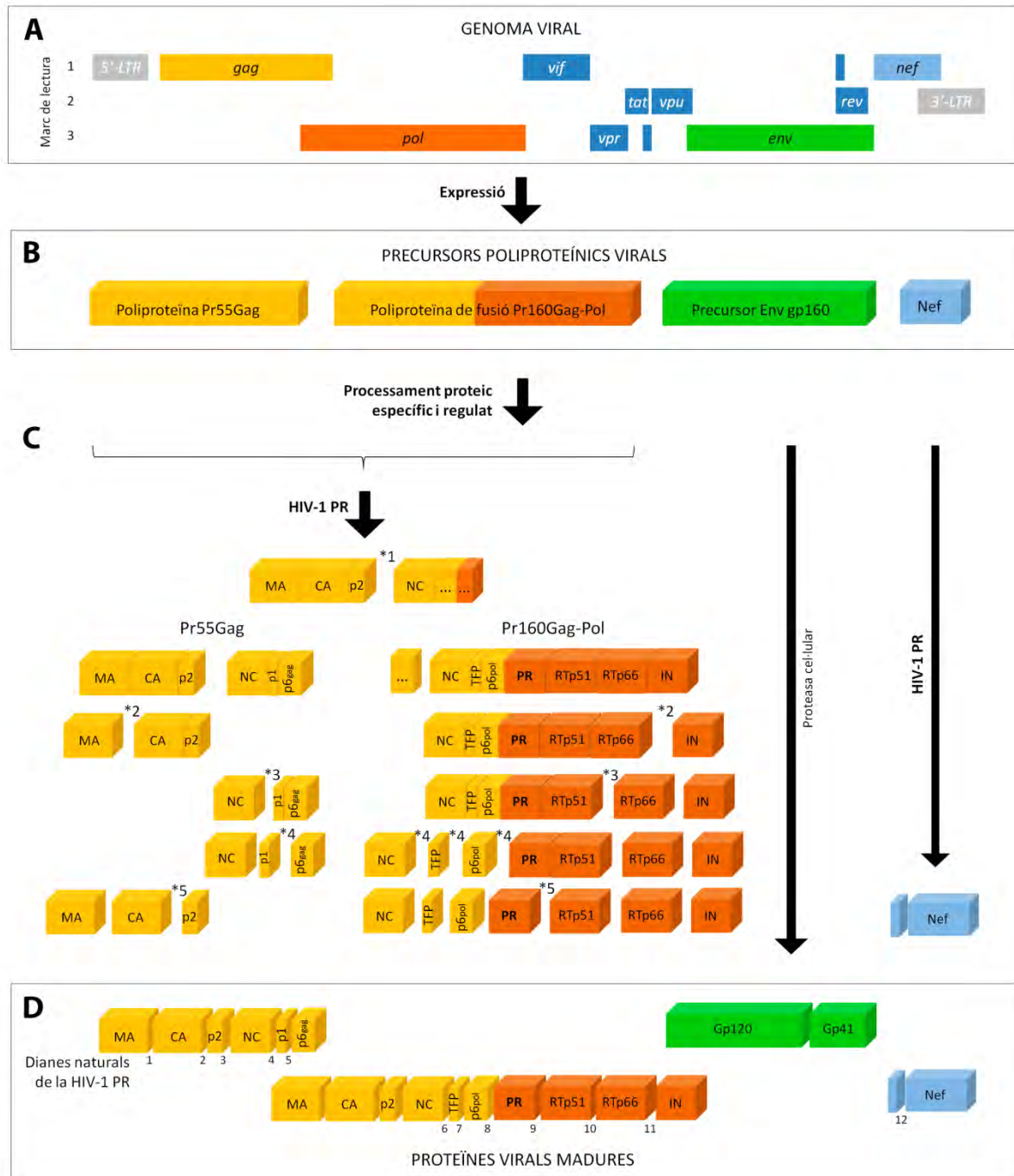


Figura 11. Estructura del genoma viral, precursors poliproteínics i funció de la HIV-1 PR per a la obtenció de les proteïnes virals madures.

A) Estructura gènica als 3 marcs de lectura possibles del genoma viral. **B)** Precursors poliproteínics principals resultants de l'expressió: Pr55Gag, Pr160Gag-Pol i Env. Es mostra també Nef per ser un polipèptid que serà processat per la proteasa. **C)** Processament proteic dels precursors per part de la proteasa HIV-1 PR. *n indica l'ordre d'actuació a les dianes. Cal esmentar que Env és digerit per una proteasa cel·lular de l'hoste. **D)** Proteïnes virals madures. Es numera els diferents punts de tall específics o dianes de la proteasa, el qual es corresponen amb les seqüències de la Taula 3. Proteïnes estructurals: MA, matriu. CA, càpsida. NC, nucleocàpsida. Enzims: PR, proteasa. RTp51, transcriptasa reversa. RTp66, RT-RNasaH. IN, integrasa. Proteïnes de l'envolta: Gp120 i Gp41. Proteïnes reguladores i altres: p2, p1, p6^{gag} o p6^{pol}, Nef (*Negative factor*), TFP (*Transframe Protein*).

Cicle viral. El cicle viral del HIV es regula mitjançant miRNAs virals i cel·lulars [234], i succeeix de forma similar a la resta de retrovirus, dividint-se en dues fases: la fase primària i la fase tardana. A la primera de les fases, la proteïna de reconeixement gp120 s'uneix al receptor CD4. Degut a un canvi estructural de gp120, aquesta proteïna es podrà unir també a un coreceptor dels limfòcits-T (CCR5 o CXCR4) (també presents en altres tipus cel·lulars). Aquesta unió provocarà canvis conformacionals a gp41 i ocasionarà la fusió de membranes [235]. Posteriorment, es duu a terme l'entrada i infecció de la cèl·lula. El virus es desencapsula i, quan el material viral es troba a citoplasma, la transcriptasa reversa inicia la retrotranscripció d'RNA a DNA, sembla ser que utilitzant l'oligonucleòtid tRNA(3Lys) de l'hoste com a encebador, alterant abans la seva estructura tridimensional [236]. Es forma un híbrid RNA-DNA. La RNasa H llavors degradarà el component d'RNA mentre la transcriptasa reversa sintetitza el segon brau de DNA. Un cop retrotranscrit a DNA de doble cadena, es formarà el complex de pre-integració (PIC) amb la integrasa i Rev, que es dirigirà al nucli cel·lular. El material genètic viral podrà quedar-se lliure o ser integrat al genoma de l'hoste com a provirus, gràcies a l'acció de la integrasa [237]. El provirus pot mantenir-se latent en aquesta situació durant anys, actuant com a reservori viral. A la fase tardana, i mitjançant la maquinària cel·lular de l'hoste, el genoma viral serà transcrit a mRNAs. Els mRNAs virals intactes formaran el genoma dels nous virions i altres mRNAs duran a terme un procés de tall i unió i seran aquests els que es traduiran per obtenir les poliproteïnes virals. Env, que formarà els receptors gp120 i gp41 dels nous virions, serà processada per una proteasa cel·lular i passarà pel reticle endoplasmàtic sofrint modificacions post-traduccionals. Les proteïnes madures migraran, incloses en la membrana de vesícules, cap a la membrana de la cèl·lula. Les altres poliproteïnes també es dirigiran cap a la superfície cel·lular i els virions immadurs aniran alliberant-se. Aquests virions seran alliberats a l'exterior cel·lular, enduint-se fragments de membrana de l'hoste com a envolta, i proteïnes del citosol preses, i seguiran infectant nous hostes. Durant l'assemblatge dels virions, la proteasa HIV-1 PR anirà realitzant una proteòlisi limitada a les dianes específiques, generant les proteïnes madures i funcionals (com s'ha explicat anteriorment) que compondran la progènie viral infectiva. A la *Figura 12* s'esquematisa el cicle viral del HIV.

Esgotament del sistema immunitari. (Revisat a [238]). Principalment, les cèl·lules que infecta el HIV són els macròfags, cèl·lules grans que deriven dels monòcits (glòbuls blancs), quan han entrat en teixits. Els macròfags fagociten (engloben i digereixen) microorganismes invasors i cèl·lules mortes o afectades. Generalment, quan engloben un patògen aquest queda atrapat en una vesícula que es fusiona a un lisosoma, i serà digerit mitjançant enzims i peròxids tòxics. Després de la digestió, el macròfag porta antígens cap a la membrana (MHC II) i els presenta a cèl·lules limfòcits-T-CD4⁺, per tal de potenciar l'eliminació de la infecció. En la infecció pel HIV, però, els macròfags són les primeres cèl·lules que resulten infectades i queden com a reservori del virus acoblat dins uns compartiments cel·lulars [239, 240]. Des d'aquí escamparan el virus.

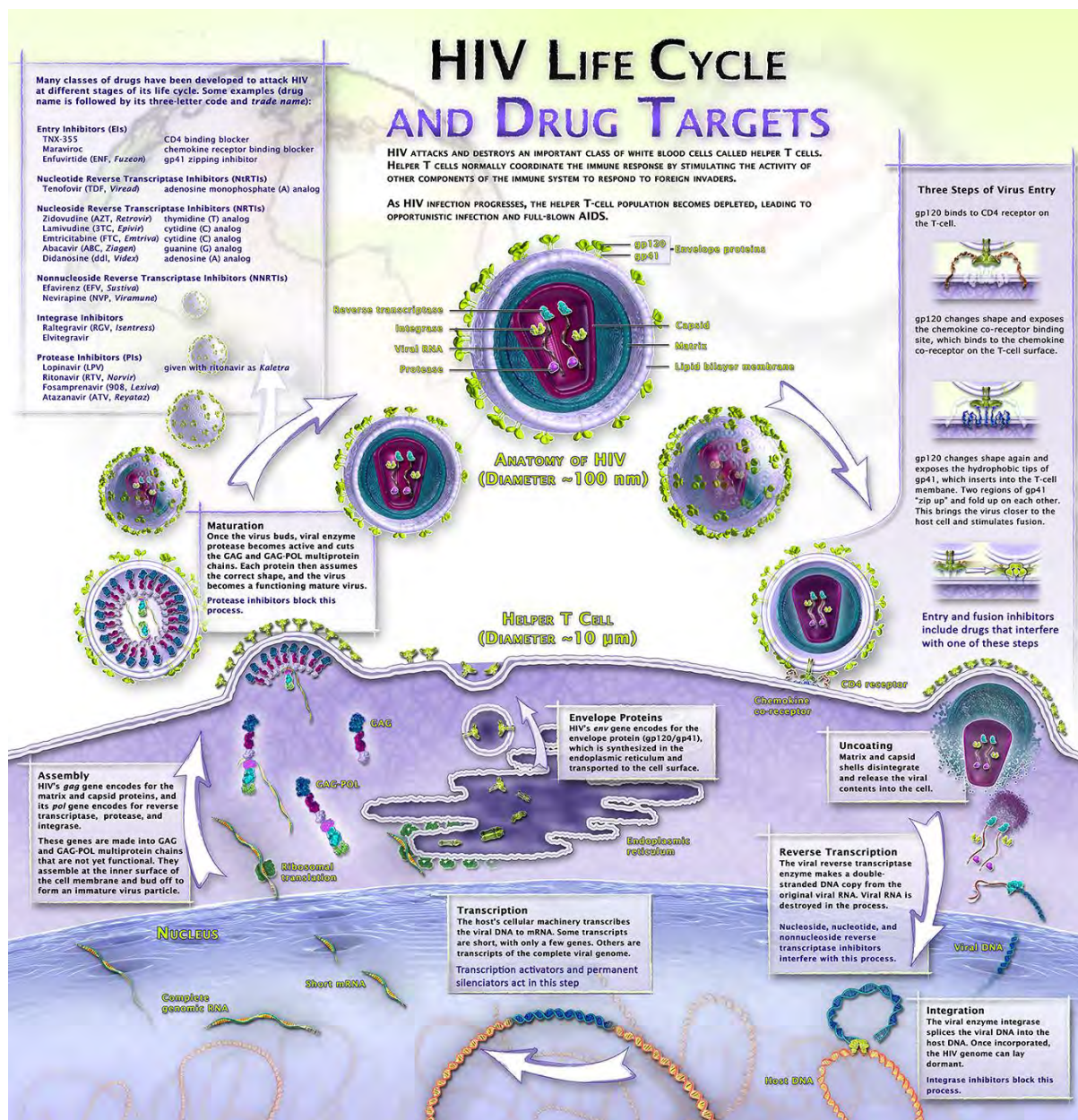


Figura 12. Cicle viral del HIV i punts d'actuació dels antiretrovirals més habituals.

Imatge de Biointeractive (<http://www.hhmi.org/biointeractive/>), recursos gratuïts per a estudis de ciència [241].

Les següents cèl·lules a ser infectades pel virus seran els limfòcits-T, a través d'unes sinapsis virològiques (VS) ràpides i transitòries [242], compostes per complexos multimoleculars entre proteïnes de l'envolta del virus, presents en una cèl·lula infectada, i (co)receptors d'una cèl·lula sana [243]. La transmissió del virus fundador de la població viral d'un organisme a altres cèl·lules seguirà amb un ràpid increment de la replicació viral i una elevada inducció de citocines i quimiocines de la reacció inflamatòria [244]. Aquest estat d'infecció aguda i major càrrega viral (nombre de còpies de RNA del HIV-1 per ml de plasma) és el moment més propens per transmetre la infecció [245]. La càrrega viral llavors disminueix fins a establir-se, controlada per la resposta immunològica (innata i adaptativa). Al llarg dels anys la infecció

provoca una davallada del sistema immunitari (per mort cel·lular natural i deguda al virus) i una pèrdua de funció d'aquest per una activació permanent esgotadora [246]. Els anticossos neutralitzadors es detecten aproximadament als 3 mesos després de la transmissió [247]. L'expressió dels gens virals té un rol important en algunes patogènesis relacionades, com el desordre neurocognitiu associat al HIV (HAND) [248].

Latència del HIV. La latència es defineix com la integració del DNA viral dins el genoma de l'hoste, en absència de producció viral. Aquesta infecció latent roman invisible pel sistema immunitari i no es veu afectada pels antiretrovirals habituals. Recentment s'ha vist que el punt del genoma on es duu a terme la integració pot resultar crític en l'expansió i la persistència de les cèl·lules del reservori, essent major en casos en què la integració es duu a terme en gens involucrats en el control del creixement i divisió cel·lular [249]. La transcripció del provirus integrat es troba restringida per diversos factors, incloent la localització sub-nuclear del provirus, l'absència de factors de transcripció (com NF- κ B, que queda segregat al citoplasma), la presència de repressors de transcripció, les modificacions del promotor del HIV (acetilacions i metilacions de les histones i modificacions al DNA) i concentracions sub-òptimes de la proteïna viral Tat [250]. Aquesta latència es pot donar en diferents tipus cel·lulars, alguns d'ells confinats a llocs de difícil accés per les drogues habituals, que actuaran de reservoris del HIV. Les característiques del reservori varien en funció del pacient, de l'estat de la malaltia i de l'interval de temps transcorregut entre el moment de la infecció i l'inici del tractament HAART, que afecta tant a la quantitat de cèl·lules en latència com en la tipologia d'aquestes [251] (revisat a [252, 253]). A partir del reservori el virus és disseminat per tot el cos a través de la sang perifèrica, fent que quan s'interromp el tractament el virus torni a rebrotar.

Reservoris del HIV. El reservori de HIV de l'organisme es situa en diferents regions (revisat a [254]). El que s'infecta més directament són cèl·lules del sistema immunitari, com les cèl·lules-T de memòria, de llarga vida [255, 256]. D'altra banda, també les cèl·lules dendrítiques, la medul·la òssia, i teixits i ganglis limfàtics són un reservori important. Així, no és d'estranyar que el tracte genital i gastrointestinal, amb un sistema limfàtic important associat, també ho siguin [257, 258], causant presència de virus a fluids corporals com el semen, fluids vaginals i saliva, a més de a la llet materna i a la sang. Blackard i col·laboradors identificaren mutacions del HIV específiques localitzades a la població viral del fetge, donant suport a la hipòtesi que el fetge és un compartiment del reservori diferenciat [259]. I més recentment, s'ha observat que els macròfags dels pulmons resulten també un reservori independent [260]. A més, també el sistema nerviós central (CNS) [261, 262], pot presentar soques de HIV diferents a la perifèria de l'organisme [263]. El CNS és un dels reservoris de més difícil eradicació per les seves peculiars característiques, que poden alterar els resultats d'algunes teràpies. Presenta diferents tipus cel·lulars, com macròfags, microglia, astròcits, oligodendròcits, neurones... alguns dels quals són específics. Els dos últims tipus semblen ser resistents a la infecció per HIV [264]. A més, també alguns factors de transcripció són propis (altres, compartits amb altres

tipus cel·lulars, com el NF- κ B). Hi ha un menor nombre de cèl·lules del sistema immunitari. I presenta un difícil accés degut a la barrera hematoencefàlica (BBB) (revisat a [265]), una barrera física i enzimàtica que controla el pas de molècules de la sang al cervell. Per a la introducció de drogues al CNS, el pes molecular, la lipofilicitat i la unió a proteïnes de la sang són els factors que influencien més a la distribució d'aquestes en el teixit del CNS [266]. Per tal d'incrementar la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica, a part de mecanismes de transcitosi mediada per receptor, s'han creat nous mecanismes com l'aplicació d'interferència electromagnètica o per ultrasons, solucions hipertòniques d'urea o manitol que inhibeixen el reflux causat pels transportadors, nanopartícules diana i nanoHAART mediada per cèl·lules (Revisat a [267, 268]).

2.3.2. LA PROTEASA DEL HIV (HIV-1 PR)

La proteasa HIV-1 PR, codificada al material genètic del virus, catalitza el processament dels precursors poliproteínics virals (Pr55Gag i Pr160GagPol, i Nef) de forma altament específica i regulada, donant lloc a les proteïnes madures aïllades [269]. És sintetitzada integrada en la poliproteïna Gag-Pol i s'escindeix de forma autocatalítica [270]. Sense l'actuació d'aquesta proteasa, per eliminació, mutació o inhibició, els virions produïts no són infectius [271, 272]. Així, la replicació del HIV és depenent de l'acció específica de la HIV-1 PR, essent aquest enzim una de les principals dianes d'actuació dels fàrmacs utilitzats per combatre la infecció del HIV.

Estructura general de HIV-1 PR. La HIV-1 PR presenta una estructura nativa homodimèrica, formada per dos monòmers idèntics de 99 residus, amb una massa molecular d'11 kDa cada un [273] i un punt isoelèctric de 8.7. L'estructura tridimensional de la proteasa (*Figura 13*) es va predir per modelat molecular [272] i es confirmà per cristal·lització i difracció per raigs X (3HVP [274]). S'engloba a la família de les aspartil-proteases [271] i compta amb la presència de dos residus aspàrtics catalítics (posicions 25 i 25') al seu centre actiu. Aquests residus formen part de la seqüència consens Asp-Thr-Gly (posicions 25-27) característica de les aspartil-proteases [274]. A diferència de les aspartil-proteases conegudes en eucariotes, les proteases retrovirals són dimèriques (*Figura 13A*), essent la dimerització imprescindible per la seva activitat proteolítica. El dímer es forma mitjançant una interdigitació dels extrems amino i carboxil terminals dels dos monòmers, formant un full- β estabilitzat per una xarxa de ponts d'hidrogen [274]. L'enzim presenta dos *flaps* o loops, rics en Gly que els fa altament flexibles, estabilitzats per contactes intermoleculares. Quan la proteasa s'uneix al substrat, els dos *flaps* es mouen fins a 7 Å, permetent l'ancoratge d'aquest al centre actiu de l'enzim [275] (*Figura 13B*).

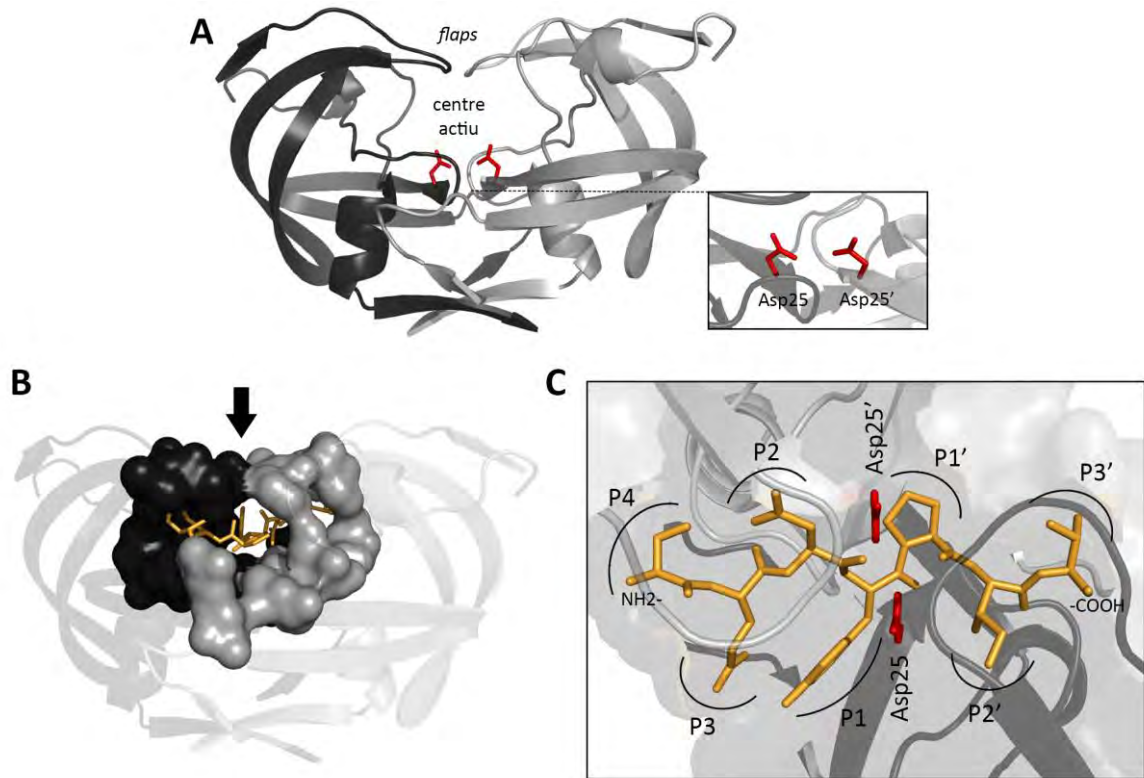


Figura 13. Estructura de la proteasa HIV-1 PR.

A) Estructura general (1HVP) [276]. Es mostra una ampliació dels residus catalítics d'aspartat Asp₂₅ i Asp_{25'}, ressaltats en barres vermelles. **B)** Superfície del centre actiu de l'enzim, amb l'heptapèptid substrat SQNYPIV al seu interior. **C)** Disposició de l'heptapèptid substrat (P4 – P3') al centre actiu. Es visualitza des del punt de mira que marca la fletxa negra de B. Es mostra la localització dels aspàrtics catalítics entre P1 i P1', el punt d'escissió. Es diferencien els dos monòmers de la proteasa en dos tons de gris. L'heptapèptid SQNYPIV s'ha acolorit en taronja.

Subsetis de la proteasa i tipologies de substrat. La HIV-1 PR reconeix i acomoda el substrat peptídic a la interfase dels dos monòmers, requerint un mínim de 7 residus aminoacídics (de P4 a P3') per a la hidròlisi específica, tal i com s'ha analitzat bioquímicament [277] i cristal·logràficament (revisat per [278]). L'esclatxa del centre actiu de la proteasa conté 8 llocs d'unió (S4, S3, S2, S1, S1', S2', S3', S4') pels residus de l'octapèptid (P4, P3, P2, P1 * P1', P2', P3', P4') que serà tallat entre P1 i P1' (Figura 13C) (nomenclatura de [279]), mitjançant un mecanisme d'hidròlisi àcid ± base. En aquesta reacció catalítica els dos residus Asp₂₅ i Asp_{25'} activen una molècula d'aigua per a realitzar un atac nucleofílic sobre l'enllaç amida-carbonil entre P1 i P1', aconseguint digerir específicament diversos substrats peptídics [280, 281].

En funció dels residus contigus al lloc de tall, distingim dues tipologies de substrats peptídics, proposada per Pettit i col·laboradors [282], característics de les proteases retrovirals: Substrats de tipus 1, que contenen aminoàcids aromàtics a la posició P1 i prolina a la posició P1'; i substrats de tipus 2, amb aminoàcids hidrofòbics tant a P1 com a P1'. Els pèptids que formen els diferents llocs d'escissió presenten una estructura secundària superposable, molt similar, que encaixa amb els subsetis d'unió de la HIV-1 PR. No obstant, cada substrat presenta una

estructura única i hi ha diferències subtils en la manera en què els aminoàcids sobresurten. Es pensa que aquestes petites diferències en l'estructura, afecten l'afinitat de la proteasa viral, que exhibeix una especificitat context-depenent [282-284]. Així, la proteòlisi que durà a terme no depèn només dels residus contigus al punt de tall, sinó també dels residus adjacents. Gràcies a aquesta qualitat, es dóna una regulació del processament poliproteínic, en què totes les escissions es produeixen a diferents velocitats i de forma ordenada [226, 285].

Dianes naturals de la proteasa. De forma natural, la proteasa reconeix i digereix 12 seqüències a les poliproteïnes Gag i Gag-Pol [286-288], essent les seqüències que componen aquests punts de tall altament diverses [280]. Aquestes seqüències es recullen a la *Taula 3*.

Taula 3. Seqüències naturals reconegudes i digerides per la proteasa HIV-1 PR localitzades als precursors poliproteínics del HIV-1.

| Diana | Punt de tall | Seqüència ^a | Ordre de digestió ^b |
|--------------------|-----------------------|---|--------------------------------|
| | | P5 P4 P3 P2 P1 * P1' P2' P3' P4' P5' | |
| Pr55Gag | | | |
| 1 | MA/CA (p17/p24) | VSQNY*PIVQN | 2 |
| 2 | CA/p2 (p24/p2) | KARVL*AEAMS | 5 |
| 3 | p2/NC | STAIM*MQKGN SATIM*MQRGN (B) NTNIM*MQKSN (C) | 1 |
| 4 | NC/p1 | ERQAN*FLGKI | 4 |
| 5 | p1/p6 ^{gag} | RPGNF*LQSRP | 3 |
| Pr160GagPol | | | |
| 6 | NC/TFP | ERQAN*FLREN | 4 |
| 7 | TFP/p6 ^{pol} | ENLAF*QQGEA ENLAF*PQGKA (B) ENLAF*PQGEA (C) | 4 |
| 8 | p6 ^{pol} /PR | TSFSF*PQITC VSFSF*PQITL (B) GTLNF*PQITL (C) | 4 |
| 9 | PR/RTp51 | CTLNF*PISPI | 5 |
| 10 | RTp51/RTp66 | GAETF*YVDGA | 3 |
| 11 | RTp66/IN | IRKVL*FLDGI | 2 |
| Nef | | | |
| 12 | Nef | PDCAW*LEAQE ADCAW*LEAQE (B) ADCAW*LEAQE (C) | - |

^a Es mostra la seqüència consens (residus de P5 a P5') de les dianes naturals de HIV-1 PR. En els casos d'elevada variabilitat es llisten les seqüències més habituals trobades en altres subtipus de HIV-1 B i C.

^b Ordre de processament de les dianes. Esquematitzat a la *Figura 11C*.

* Indica el punt de tall a la seqüència diana per la proteasa HIV-1 PR.

El processament seqüencial de les poliproteïnes Gag i GagPol (*Figura 11C*) s'inicia amb la digestió de l'enllaç entre p2 i NC. A Gag, anirà seguit de la separació MA/CA i de p1/p6. Finalment, els dos petits pèptids espaiadors s'eliminen (presentant la velocitat més limitant), primer NC/p1 i finalment CA/p2 (revisat a [289]). A GagPol, després de la digestió entre p2/NC i de forma paral·lela a la digestió MA/CA de Gag, es durà a terme la separació RTp66/IN. Després es tallarà la diana RTp51/RTp66, seguida del processament de les dianes entorn la TFP (p6^{pol}/TFP i TFP/PR). Finalment, el punt més tardà serà PR/RTp51 (revisat a [285]).

Els 7 punts de tall que defineixen les principals proteïnes estructurals i enzimàtiques del HIV-1 (p17/p24, p24/p2, NC/p1, NC/TFP, PR/RTp55, RTp55/RTp66, i p66/INT) es troben molt conservats. La forta pressió selectiva exercida en aquest grup és, presumiblement, un reflex de la necessitat de mantenir la conformació espacial enzim-substrat, la natura hidrofòbica de l'enllaç a escindir i l'activitat biològica. En canvi, les 5 dianes de digestió restants presenten pressió selectiva positiva, diversificant i exhibint variabilitat entre diferents subtipus de virus i dins d'aquests. La diana p1/p6^{gag} presenta variabilitat moderada i p2/NC, TFP/p6^{pol}, p6^{pol}/PR i Nef són altament variables [288]. D'aquestes, les 4 primeres s'involucren en la regulació del processament poliproteic, i TFP/p6^{pol}, en l'activació de la proteasa [226, 290-292]. La diana que és digerida inicialment i de forma més eficient és p2/NC, i és la que presenta més variabilitat de totes [288] (revisat a [289]). Els polimorfismes als punts de tall podrien, amb el temps, ocasionar un impacte diferent en la patogènesi dels subtipus virals de HIV-1 i, degut a una major tendència a mutar, també en l'aparició de resistències a la teràpia antiretroviral.

A la recerca de dianes diferents de les naturals, que poguessin ser més eficients com a substrat en assajos d'activitat de la proteasa HIV-1 PR i en el disseny d'inhibidors, Beck i col·laboradors [280] assajaren diferents seqüències aminoacídiques empleant una llibreria de fags. Aquest mètode permeté analitzar una gran quantitat de seqüències hexamèriques i aleatòries, identificant substrats digerits eficientment per la proteasa HIV-1 PR en condicions pròximes a les fisiològiques (pH 6.7 i 0.2 M NaCl). S'identificaren 11 substrats escindits de forma més eficient que la seqüència del lloc natural d'escissió MA/CA de les poliproteïnes Gag i Gag-Pol. Això va permetre proposar nous substrats peptídics a partir d'aquests i la seqüència consens. La seqüència hidrolitzada de forma més eficient per la proteasa fou Ac-GSGIF*LETSL-NH₂.

Condicions òptimes i d'estudi de l'activitat. Les condicions que són òptimes per l'activitat *in vivo* per part de la proteasa HIV-1 PR encara estan per definir. Així, molts estudis d'activitat de la proteasa o de caracterització de substrats i anàlegs d'aquests, s'han realitzat a pH més baix i concentracions salines més elevades en relació a les condicions fisiològiques [293, 294]. S'ha observat que la proteasa és una proteïna de baixa estabilitat conformacional, presentant una activitat més elevada en solucions amb elevada força iònica (1 M NaCl) i a pH àcid proper a 5.0, condicions que afecten l'afinitat pel substrat i les constants K_M i k_{cat} [273]. La seva activitat

proteolítica sovint causa autodegradació del mateix enzim principalment entre els llocs Leu5-Trp6, Leu33-Glu34, Leu63-Ile64 [295, 296], essent Leu5-Trp6 el primer a ser processat [295]. Aquesta capacitat autoproteolítica s'ha de tenir en compte en processos de producció i caracterització de l'enzim, ja que porta a una pèrdua d'activitat irreversible.

El paper essencial de la proteasa en el cicle i la infectivitat del virus l'ha dut a ser la diana més utilitzada pels fàrmacs contra la SIDA. Una estratègia basada en l'activació d'una toxina per part de la proteasa HIV-1 PR enloc de la seva inhibició, podria reduir l'aparició de resistències. Com a exemples d'aquesta estratègia es poden esmentar dos treballs, el primer es tractava una variant de caspasa-3 activable per la proteasa del HIV que matava selectivament cèl·lules infectades pel virus [297]. El segon, dut a terme per Falnes i col·laboradors, modificaren la toxina diftèrica per tal que fos activada per la HIV-1 PR de forma específica [298].

2.3.3. TERÀPIA ANTIRETROVIRAL I NOVES ESTRATÈGIES D'APROXIMACIÓ A LA CURA FUNCIONAL DE LA SIDA

Més de trenta anys després de la notificació de la primera prova clínica de la SIDA, la pandèmia encara representa un gran repte per a la salut pública. Des de que es va detectar, més de 60 milions de persones s'han infectat pel HIV. Els primers casos de HIV van ser descrits a inicis dels anys 80 [299], i d'aleshores ençà s'ha avançat molt per incrementar la supervivència dels afectats. Desgraciadament, malgrat que el nombre de morts per SIDA a Catalunya, a l'Estat Espanyol i a nivell mundial disminuï significativament durant els anys 90, el nombre de persones vivint amb SIDA no ha disminuï degut a un relaxament en l'atenció de la població envers aquesta malaltia [300] i a l'augment de l'esperança de vida. El nombre de persones vivint amb SIDA arribà a 35.3 milions el 2012 [301].

Teràpia antiretroviral de gran activitat (HAART). Les primeres drogues desenvolupades contra la SIDA van ser anàlegs de nucleòsids, dissenyats per obstruir la transcripció reversa (com la zidovudina o Retrovir®) i inhibidors de la HIV-1PR (com el saquinavir) [302]. Actualment existeixen quatre tipologies de fàrmacs (revisat a [238]): inhibidors de la fusió de membrana i antagonistes del coreceptor CCR5 o CXCR4, que bloquegen l'entrada viral; nucleòsids i no-nucleòsids inhibidors de la transcriptasa reversa (NRTIs i NNRTIs) que bloquegen la transcripció inversa del genoma viral d'RNA a DNA; inhibidors de la integrasa, que prevenen la integració en forma de provirus al genoma de l'hoste; i inhibidors de la proteasa, que interfereixen en el procés de maduració dels virions. Els diversos tipus d'inhibidors del cicle viral i els seus punts d'actuació es mostren a la *Figura 12*. Recentment alguns autors han proposat la creació de nous inhibidors que tinguin com a diana altres enzims dels estadis tardans d'assemblatge i maduració dels virions [303] o de la seva alliberació (inhibidors de la Vpu) [304]. La combinació de diverses tipologies de fàrmacs portà a la Teràpia Antiretroviral de

Gran Activitat (HAART), resultant en una elevada reducció de la població viral, i en conseqüència, en una reducció dels símptomes i de la morbiditat i mortalitat associats a la malaltia [305]. Així, la SIDA ha passat de ser una malaltia letal a ser crònica manejable. El règim convencional combina dos nucleòsids inhibidors de la transcriptasa reversa (emtricitabina o lamivudina, junt amb abacavir, tenofovir o zidovudina) amb un inhibidor no-nucleòsid de la transcriptasa reversa, un inhibidor de la proteasa o un inhibidor de la integrasa.

Malgrat que les drogues antivirals aplicades en la teràpia HAART han demostrat ser efectives a curt termini, s'ha vist que l'aplicació durant llargs períodes presenta algunes problemàtiques, actualment ja àmpliament conegudes. En primer lloc, la teràpia HAART no presenta una capacitat total de supressió de la replicació viral, que combinada amb la plasticitat genètica que presenta el HIV-1 resulta en una selecció de sub-poblacions de HIV amb mutacions que confereixen resistència a les drogues emprades [306]. Una altra qüestió són els efectes secundaris severs del tractament, especialment afectacions del metabolisme dels lípids, que representen una problemàtica creixent en els pacients que van allargant l'esperança de vida, atès que desenvolupen malalties cardiovasculars [302, 307]. En alguns casos, l'eventual disminució dels nivells de proteïnes virals degut a la resposta immunològica contra aquestes, causa dificultats en l'aplicació d'algunes drogues. També, malgrat la teràpia HAART, la recuperació del sistema immunològic no és completa. Finalment, la SIDA resta com a malaltia crònica degut a l'existència de reservoris virals al cos humà en cèl·lules farmacològicament inaccessibles pels antivirals existents ocasionant una necessitat de tractament permanent al llarg de la vida [253].

Tots aquests factors són encara un problema, existint un ampli marge pel refinament de tractaments i el desenvolupament de noves estratègies amb menys possibilitats de ser eludides pel virus. Tot i els resultats recents de re-creixement de la càrrega viral després d'una remissió prolongada en els coneguts casos de "el pacient de Berlin" [308, 309], "el nen de Mississipi" que inicià la teràpia poc després del seu naixement [310] i "els pacients de Boston" [311, 312], aquests casos d'aparent cura temporal han inspirat el desenvolupament de diverses estratègies i nous punts de recerca futura (*Taula 4*) per intentar assolir la cura de la SIDA definitiva, denominada com a '*cura funcional*'.

Tractament de 'xoc i mort'. Aquesta estratègia té l'objectiu de tractar pacients amb compostos que reactiven la transcripció dels provirus latents de HIV per tal de que expressin les proteïnes i les partícules virals [313] i deixin de ser invisibles al sistema immunitari, que eliminarà la cèl·lula reduint el reservori viral. Aquesta estratègia s'ha d'aplicar en combinació a teràpia antiretroviral per evitar la infecció de noves cèl·lules. Inicialment, per encarar la part de 'xoc' i activació de la transcripció viral, s'estudià l'activació de les cèl·lules-T mitjançant anticossos anti-CD3 o en combinació amb citocines TNF- α , IL-2, IL-6 i IL-7 [314-317]. Actualment existeixen diversos agents activadors del HIV latent, testats tant en models *in vitro*

com *ex vivo* en cèl·lules T CD4⁺ de pacients, amb alguns candidats que avancen en proves clíniques (revisat a [318, 319]). En són exemples inhibidors de histona-acetilases (HDACi) [320], com el vorinostat, el panobinostat i la romidepsina [321-323]. Un altre tipus de compost que activa la transcripció dels gens provirals són els activadors del promotor de la transcripció del factor nuclear κ B (NF- κ B), com la prostratina i anàlegs [324, 325] i la briostatina i anàlegs [326]. Per tal de veure si el virus va remetent en les diverses proves clíniques contra la SIDA es fan interrupcions del tractament HAART (ATI, *Analytical Treatment Interruption*) [253]. L'eliminació de les cèl·lules on el virus es reactiva, s'efectua gràcies al sistema immunitari.

Millora i estimulació del sistema immunitari. Paral·lelament a la teràpia antiretroviral o a l'estratègia anterior de 'xoc i mort', sovint cal reforçar el sistema immunitari, concretament els limfòcits-T específics anti-HIV citotòxics (CTL), esgotats per la seva activació permanent. S'està estudiant la regeneració externa de cèl·lules CTL autòlogues i la seva reintroducció a l'organisme. N'és un exemple l'estudi que combina la teràpia HAART primerenca amb la infusió de CTL del pacient regenerades (NCT02231281), a Xina, en fase III de proves clíniques. Per altra banda, es coneix que una minoria de pacients generen un tipus d'anticossos (bNAbs) més potents i que neutralitzen un rang més ampli de subtipus virals que els anticossos convencionals produïts per la majoria de pacients [327]. Actualment, la producció d'anticossos neutralitzadors genèrics com a nova estratègia immunogènica contra el HIV és un dels majors focus d'estudi per a vacunes [328]. Per exemple, els anticossos PGT121 o VRC01 bNAbs, el darrer dels quals en simis s'associa a l'envolta del virus en el lloc de reconeixement de CD4⁺ i evita la unió de partícules virals a les cèl·lules CD4⁺, inhibint l'entrada a la cèl·lula [329, 330]. També s'ha estudiat la creació d'anticossos biespecífics, artificials, compostats de dos fragments d'unió a antigen, per exemple d'unió a proteïnes de l'envolta del HIV expressades en cèl·lules infectades i a la proteïna CD3, present a totes les cèl·lules-T, incloses les CD8⁺ citotòxiques, facilitant així l'eliminació de cèl·lules infectades per part de les segones [253, 331].

Teràpia gènica. Imitant la deficiència per CCR5 a la que es sotmeté "el pacient de Boston" a través d'un transplant de medul·la, a qui no es detectà càrrega viral al plasma durant més de 6 anys, s'ha eliminat l'expressió d'aquest receptor en cèl·lules mare i limfòcits-T de pacients mitjançant teràpia gènica amb noves tecnologies com nucleases *dits-de-zinc* [332] amb uns resultats inicials exitosos [333].

Silenciament permanent del reservori. Una alternativa al tractament per xoc i mort podria ser la prevenció de la reactivació del provirus quan s'interromp el tractament antiretroviral. En un estudi en fase inicial, s'ha trobat l'existència de tres proteïnes cel·lulars que semblen ser repressores de la transcripció del HIV latent en presència d'estímuls per a la reactivació viral (SMYD2, SUV39H1 i SETDB1) [253, 334].

Vacunes. Fins ara, les vacunes per aconseguir poder interrompre la teràpia antiretroviral no han obtingut resultats massa rellevants (revisat a [335]). Algunes vacunes han incrementat la resposta de l'organisme contra el HIV [336], però no permeten la interrupció total de la teràpia HAART. La prova RV144 [337] feta a Tailàndia, sembla ser la més reeixida, arribant a un 31% de reducció en la infecció per HIV. Actualment, però, algunes proves recents amb cèl·lules dendrítiques i amb citomegalovirus [338] o amb lentivirus [339] com a vector, aquest últim combinat amb l'estímul del sistema immunitari, o les sinèrgies de tractament de 'xoc i mort' amb vacunes (en fase I/II de proves clíniques: Medical Research Council and Research into Viral Eradication of HIV Reservoirs (MRC RIVER), Anglaterra (Prime: ChAd.V63.HIVconsv; boost:MVA.HIVconsv); i Dinamarca (EudraCT número 2013-004747-23) semblen prometedores.

Biomarcadors. Un punt interessant a investigar [340] és l'existència de biomarcadors que distingeixin les cèl·lules infectades de les sanes. Sembla ser que hi ha grans diferències entre l'expressió gènica de les cèl·lules sanes i les que presenten infecció latent (gens relacionats amb la proliferació cel·lular, cicle cel·lular, supervivència, regulació de la transcripció i de la post-transcripció, metabolisme bàsic...) suggerint múltiples bloqueigs bioquímics i metabòlics que contribueixen a la prevenció de l'expressió dels gens provirals. En estudis inicials, sembla que cèl·lules-T CD4⁺ que presenten infecció latent sobreexpressen més proteïnes CD2 [341].

Taula 4. Punts d'estudi actuals per a l'assoliment de la cura funcional de la SIDA.

| Factor d'estudi | Estat actual | Direcció futura |
|---|---|--|
| Identificació d'agents que revertixin la latència | Múltiples agents estan essent identificats en sistemes model. Molts encara no s'han testat en pacients. | Combinació i descoberta de nous agents. Tests en cèl·lules de pacients. |
| Prevenió de la infecció de noves cèl·lules després de revertir la latència | La teràpia HAART modera sembla ser suficient per la prevenció d'infeccions <i>de novo</i> . | L'anàlisi de l'efecte d'intensificació de la teràpia HAART durant la reversió de latència podria reduir l'amenaça de noves infeccions. |
| Promoció de la mort de cèl·lules infectades una vegada revertida la latència | Múltiples mecanismes de vacunació i reforç del sistema immunitari estan actualment en desenvolupament. | Immunització terapèutica abans de la reversió de la latència, desenvolupament de nous agents que es dirigeixin a cèl·lules infectades productives. |
| Mesura de la mida del reservori latent | Els assajos actuals sobreestimen o subestimen la mida del reservori. La virèmia residual reflecteix la mida del reservori, però en força pacients no és detectable. | Desenvolupament de nous assajos que permetin una millor estimació. |
| Reservoris addicionals | S'han proposat gran quantitat de reservoris addicionals del HIV, però no s'ha confirmat l'aïllament d'aquests en alguns casos. | Estudis en simis podrien aportar millors evidències dels reservoris addicionals que persisteixen amb la teràpia HAART. |
| Incertesa del moment de reactivació natural del HIV quan s'atura la teràpia HAART | Es requereix de l'anàlisi continuat dels nivells d'RNA viral en plasma, reiniciant la teràpia HAART quan els nivells augmenten, abans que el virus pugui augmentar els reservoris . | Desenvolupament d'assajos que mesurin la càrrega viral de forma més simple. Desenvolupament de models que prediguin el moment de reactivació natural del virus . |

2.3.4. RIBONUCLEASES EN LA TERÀPIA CONTRA EL VIRUS DE LA SIDA

Diverses proteïnes citotòxiques naturals de plantes, bacteris o fongs, entre les quals cal destacar les RNases, juguen un rol important en la prevenció d'infeccions víriques. És conegut que algunes infeccions virals indueixen l'expressió de RNases en l'hoste, bloquejant la replicació viral [342]. Algunes RNases presenten activitat antiviral a través de la degradació de l'RNA viral a concentracions subtòxiques per les cèl·lules, en les quals l'enzim pot establir contacte amb la superfície cel·lular però no aconsegueix internalitzar a les cèl·lules. Sembla ser que es dona un procés d'internalització mediada pel mateix virus en el moment de la infecció, actuant com a element transportador i facilitant l'entrada de la RNasa fins al citosol, com s'ha vist per algunes RNases fúngiques [343]. Un cop dins la cèl·lula, l'enzim degradaria l'RNA viral i/o cel·lular inhibint la replicació viral [169]. Així, algunes RNases s'han proposat com a agents terapèutics potencials pel tractament contra la SIDA (Revisat a [344]).

S'han trobat RNases antivirals contra el HIV-1 en diversos dominis de la vida. Entre els fongs, són destacables la RNasa de *Lyophyllum shimeji*, que inhibia l'activitat de la transcriptasa reversa del HIV-1 [345], i la TG-RNasa, de *Thelephora ganbajun* [346]. En plantes també s'han estudiat algunes RNases de ginseng per a l'aplicació en la teràpia contra el HIV-1 [347-349]. En animals, en destaquen l'ONC i la BS-RNasa, conegudes sobretot per la seva activitat antitumoral [69, 74, 135]. L'ONC i la BS-RNasa, inhibeixen la replicació del HIV-1 *in vitro* en cèl·lules leucèmiques H9 en un 90-99.9% a unes concentracions innòcues per a les cèl·lules infectades [169]. Algunes RNases humanes manifesten també certa activitat antiviral contra el HIV, com l'ECP (Proteïna Catiònica d'Eosinòfil) [350] o l'EDN (Neurotoxina Derivada d'Eosinòfil) [351], però la ECP és efectiva contra un ampli rang de patògens, suggerint una acció poc específica [73], i ambdues proteïnes causen a vegades danys a teixits de l'hoste [352-356]. Aquests fets limiten la seva possible utilització com a possibles fàrmacs antivirals. Finalment i de forma interessant, la RNasa H retroviral exhibeix també una potent activitat anti-HIV. Després de la seva activació per un oligodesoxiribonucleòtid, la RNasa H redueix significativament el nivell d'RNA del HIV al plasma, resultant en l'auto-destrucció dels virions. Aquest fet revela que l'activació prematura, enlloc d'inhibir enzims del HIV, pot ser una via útil per a lluitar contra la SIDA [357].

L'activitat anti-HIV-1 d'aquestes ribonucleases aniria dirigida principalment contra l'RNA viral i/o cel·lular per part d'aquests enzims hidrolítics, inhibint la transcripció reversa i la síntesi proteica requerides pel cicle viral i/o cel·lular [358]. D'aquesta manera s'impediria la replicació viral de forma més directa o, en el cas d'afectar majoritàriament el funcionament cel·lular, s'induiria el procés d'apoptosi i mort cel·lular, interrompent igualment el cicle viral. Aquesta activitat característica fa que les ribonucleases resultin atractives, a més de com a agents antitumorals, també com a anti-HIV-1 que podrien ser utilitzats soles o en combinació amb altres quimioterapèutics, facilitant el disseny i desenvolupament de drogues associades [359].

En contrast amb els severs efectes secundaris i aparició de resistències dels agents quimioterapèutics habituals, amb la utilització de ribonucleases antivirals, existint homòlegs humans o essent algunes d'elles d'origen humà, seria d'esperar un menor nombre d'efectes secundaris i una menor resposta immunològica en ser aplicades en clínica humana. Una problemàtica de les RNases contra la SIDA és que, com la majoria d'antiretrovirals actuals, no poden atacar el virus quan aquest es troba en forma de provirus. De la mateixa manera que s'està estudiant la combinació de la teràpia HAART amb activadors de la transcripció viral, també es podria dur a terme amb les RNases.

2.4. ZIMÒGENS DE RIBONUCLEASES

La creació de zimògens proporciona una opció versàtil per al control de l'activitat enzimàtica, permetent desenvolupar noves aplicacions d'enzims en biotecnologia i biomedicina. Tenint en compte les funcions especials que presenten algunes RNases, la creació d'un "Cavall de Troia" basat en un zimogen de ribonucleasa podria tenir una clara aplicació farmacològica, estenent la seva utilitat terapèutica. Inspirat pels zimògens de proteases, Raines i col·laboradors van aplicar aquesta estratègia a la RNasa A [360-362], creant un zimogen a partir d'un procés de permutació circular. La permutació circular consisteix a grans trets a clonar els gens duplicats d'una proteïna de forma consecutiva i amplificar a partir d'uns residus escollits generant nous extrems N- i C- terminals. Aquesta nova proteïna ha de recuperar el plegament proteic. A partir de l'enzim salvatge, es fusionà el gen de la RNasa amb un fragment codificant per un pèptid que contenia la diana d'una proteasa concreta. Es connectaren així els extrems N- i C- terminals originals amb aquesta seqüència peptídica específica que, alhora, bloquejava el centre actiu i actuava com un pro-segment d'un zimogen natural inhibint així l'activitat ribonucleolítica. Amb la digestió d'aquest segment per part d'una proteasa d'un patogen, es recuperà gran part de l'activitat ribonucleolítica comparable a l'enzim salvatge.

Un zimogen de ribonucleasa funcional i òptim ha de presentar les següents característiques (*Figura 14*): El zimogen ha de mantenir suficient estabilitat conformacional abans i després de l'activació, i tant a fora com a l'interior cel·lular. El zimogen o precursor ha d'internalitzar de forma eficient i ha de resultar innocu per les cèl·lules sanes, presentant una activitat i una citotoxicitat baixes. El zimogen ha de ser afí a la proteasa del patogen que l'activarà, de manera que a una cèl·lula infectada, que comptarà amb presència d'aquesta, es pugui dur a terme la digestió específica de la seqüència de bloqueig del centre actiu del zimogen, obtenint la seva forma activa. Un cop activat, no ha de ser inhibit per l'RI que es troba a l'interior cel·lular, podent així desenvolupar unes activitats ribonucleolítica i citotòxica substancialment superiors a la forma precursora, portant a la mort per apoptosi de les cèl·lules infectades pel patogen.

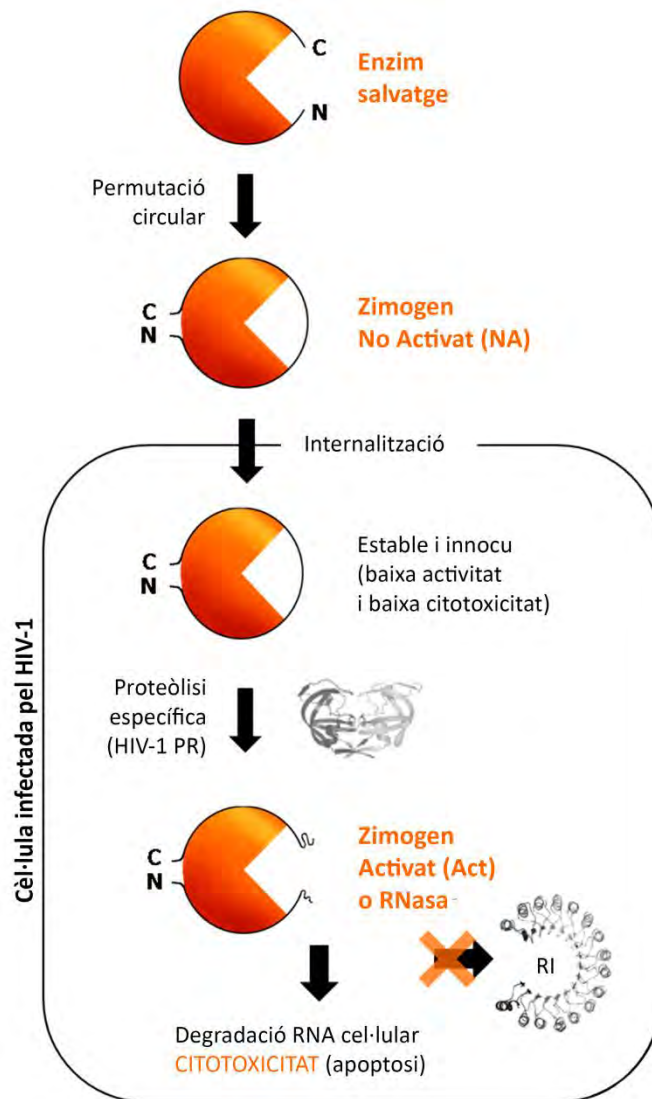


Figura 14. Característiques necessàries per a un zimogen de ribonucleases òptim.

Un zimogen creat per permutació circular a partir de l'enzim salvatge ha de mantenir una elevada estabilitat conformacional, internalitzar a les cèl·lules resultant innocu en la seva forma inactiva, i activar-se eficientment a través d'una proteòlisi específica. Gràcies a la capacitat d'evasió de l'inhibidor de ribonucleases (RI), ha de poder desenvolupar finalment la seva activitat ribonucleolítica, duent a la cèl·lula a mort cel·lular per apoptosi.



3. OBJECTIUS



3. OBJECTIUS

Les cèl·lules controlen la funció de les proteases mitjançant la inhibició o bé mitjançant la seva síntesi en forma de proenzims o zimògens. Basant-nos en l'estratègia que de forma natural tenen les proteases per tal de regular la seva activitat quan són sintetitzades en forma de zimògens, en aquesta tesi es proposà la construcció de variants de zimògens de ribonucleases, basats en l'Onconasa® (ONC) i la Ribonucleasa Pancreàtica Humana (HP-RNasa), per tal que fossin activables específicament per la proteasa del Virus de la Immunodeficiència Humana de tipus 1 (HIV-1 PR). Aquests zimògens estarien dissenyats per tal de dirigir la seva activitat citotòxica específicament a cèl·lules infectades pel HIV. A aquestes cèl·lules, la proteasa del virus estaria disponible per a activar-los i desencadenar el procés citotòxic, portant la cèl·lula a fase d'apoptosi, interrompent el cicle viral i impedit la infecció per HIV de les cèl·lules circumdants.

En el cas de l'ONC es pretengué treure partit de la seva estabilitat i citotoxicitat natural i la gran capacitat d'internalització en cèl·lules eucariotes. L'interès en l'obtenció de zimògens d'HP-RNasa recaigué en el fet que presenta 1000 vegades més d'activitat ribonucleolítica que l'ONC i en què, pel seu origen humà, seria d'esperar una menor resposta immunològica en cas de poder ser utilitzada en clínica humana. La funció imprescindible de la HIV-1 PR en el cicle viral fa que aquest enzim pugui ser una bona eina activadora dels zimògens. A través de l'activació dels zimògens de RNases per part de la proteasa HIV-1 PR, s'aconsegueix una estratègia que es basa en la funció d'un enzim viral per provocar toxicitat enlloc de la seva inhibició. La proteasa del HIV-1 no és un enzim que pel que respecta a la seva activitat pugui patir mutacions i, per tant, és d'esperar que l'aparició de mecanismes de resistència a aquest fàrmac potencial per part del virus es veuria disminuïda, aportant un pas inicial vers una nova tipologia d'agents antivirals pel tractament de la SIDA.

Per tant l'**objectiu general** d'aquesta tesi fou:

- Dissenyar, construir, caracteritzar i optimitzar un agent terapèutic tipus "Cavall de Troia" basat en zimògens de RNases activables específicament per una proteasa, centrat en l'ONC i l'HP-RNasa, que sigui aplicable a malalties provocades per organismes patògens que expressen una proteasa clau, concretament la malaltia de la SIDA.

Per això, els **objectius concrets** del treball que es marcaren van ser:

1. Dissenyar, construir i obtenir variants de zimògens d'ONC i HP-RNasa, activables per la proteasa HIV-1 PR, i caracteritzar-les en relació a la seva estabilitat conformacional, la capacitat d'internalització en limfòcits-T, d'evasió de l'RI, l'eficiència d'activació *in vitro* amb la proteasa HIV-1 PR, i l'activitat ribonucleolítica i citotoxicitat, abans i després del processament amb la proteasa HIV-1 PR.
2. Expressar, purificar i caracteritzar la proteasa HIV-1 PR, com a eina activadora dels zimògens.
3. Resoldre l'estructura tridimensional d'un dels zimògens com a model per aprofundir en el coneixement de l'activitat presentada pels zimògens d'ONC i les seves variants.



4. METODOLOGIA



4. METODOLOGIA

4.1. MATERIALS

4.1.1. MATERIAL NO BIOLÒGIC

El substrat de ribonucleases 6-FAM-dArUdAdA-6-TAMRA es va obtenir de Novagen (Madison, WI, EUA). Els oligonucleòtids emprats per la mutagènesi dirigida i els enzims que modifiquen el DNA (de restricció, lligasa, polimerasa...) eren de Roche (Basel, Suïssa). El kit de *QuikChangeTM* s'adquirí de Stratagene (EUA). L'isopropil- β -D-tiogalactopiranosid (IPTG) s'obtingué de Thermo Fisher Scientific (EUA). Els altres reactius utilitzats eren de Sigma (ST. Louis, MO, EUA). Les columnes Mono-S HR 5/5 es compraren a Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EUA). La proteasa comercial *recHIV-1 PR* i el substrat de la proteasa HIV-1 DABCYL- γ -Abu-Ser-Gln-Asn-Tyr*Pro-Ile-Val-Gln-EDANS, s'adquiriren a Bachem (Suïssa), i la reïna DEAE a BioRad (EUA). Les membranes de difluorur de polivinilidè (PVDF) eren de Millipore (EUA), la llet en pols utilitzada al tampó BLOTTO es va obtenir de Nestlé (Suïssa), l'anticòs primari anti-HIV1-PR es va comprar a Acris Antibodies GMBH (Alemanya) i l'anticòs secundari anti-IgG-ratolí conjugat amb peroxidasa fou de Calbiochem (EUA). La solució de detecció *SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate* era de Pierce (EUA). L'Inhibidor de Ribonucleases (RI) utilitzat fou de Promega (EUA) i el substrat 16S- 23S- rRNA era de Roche (EUA). El fluoròfor *Alexa Fluor[®] 488 C5 maleimide* s'adquirí de Molecular Probes Life Technologies (EUA). El medi mínim *M9* es comprà a Cambridge Isotope Labs, i l'anàleg no hidrolitzable del substrat 5'd[UGGUGGUGG]3' (d[UGG]₃), a Thermal-Fisher (Ulm, Alemanya). El medi *RPMI GlutaMAXTM-I* i la penicil·lina-estreptomicina eren de Gibco[®] (Invitrogen Life Sciences, Carlsbad, CA, EUA), i el sèrum fetal boví (FBS) s'obtingué de Hyclone (Logan, UT, EUA). El substrat per l'assaig de citotoxicitat per reducció de l'MTT *Celltiter 96[®] Aqueous* fou de Promega (Madison, WI, EUA). La *LipofectamineTM2000* i el medi *Opti-MEM[®]I Reduced Serum Medium* s'adquiriren a Invitrogen Life Sciences (Carlsbad, CA, EUA).

4.1.2. MATERIAL BIOLÒGIC

4.1.2.1. Soques bacterianes

Per a la realització d'aquest treball s'empraren les següents soques de l'espècie bacteriana *Escherichia coli*, obtingudes de Novagen (Madison, WI, EUA):

E. coli DH5 α . Aquesta soca s'utilitzà per a l'obtenció de les diferents construccions realitzades a nivell de DNA. Aquesta soca presenta una elevada taxa de transformabilitat, a més del caràcter genotípic *hsdR17(rk-,mk+)*, que li proporciona la capacitat de metilar el DNA propi i alhora l'incapacita de destruir qualsevol DNA forà. Aquesta característica és essencial per tal d'obtenir el DNA que serà utilitzat com a

motlle a les reaccions de mutagènesi dirigida per oligonucleòtid, el qual ha d'estar metilat a la seqüència reconeguda per l'enzim de restricció *DpnI*.

Genotip: *F⁻, ø80ΔlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk⁻, mk⁺), phoA, supE44, λ⁻, thi-1, gyrA96, relA1*

***E. coli* BL21(DE3).** Aquesta soca s'emprà en l'expressió de les diferents construccions obtingudes a partir del vector pET22b(+). Presenta la particularitat que el gen *int* del genoma bacterià porta inserit el profag DE3 (derivat del fag λ). Conseqüentment, el gen *int* bacterià resta inactivat. Aquesta inactivació fa que el profag DE3 no es pugui escindir del genoma ni tornar-se a integrar, de manera que resta com a lisogen estable. El profag DE3 consisteix en un fragment de DNA que conté el promotor *lacUV5*, un fragment inicial del gen *lacZ* i el gen que codifica per la RNA polimerasa de T7. En aquestes condicions, l'únic promotor capaç de conduir la transcripció de la RNA polimerasa de T7 és el promotor *lacUV5*, el qual és induïble amb IPTG. En afegir IPTG a un cultiu d'aquesta soca en fase exponencial de creixement, es transcriu la RNA polimerasa de T7, la qual transcriurà el gen que ha estat clonat darrera del promotor reconegut per aquesta polimerasa.

Genotip: *F⁻, ompT, hsdS(r_B⁻ m_B⁻), dcm⁺, gal, λ(DE3), lon⁻*

***E. coli* RosettaTM(DE3).** El gen de la proteasa del HIV presenta un 20% dels codons de baixa freqüència d'utilització en procarïotes. Per tal d'augmentar els seus nivells d'expressió es va expressar a aquesta soca. *Rosetta* és la denominació d'una sèrie d'hostes d'expressió creats a partir de la transformació de la línia BL21(DE3) d'*E. coli* amb el plasmidi pRARE. Aquest vector codifica per 7 tRNAs que reconeixen 7 codons de baixa freqüència d'ús a *E. coli* (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC i CGG) [363], aconseguint augmentar la seva presència a la cèl·lula hoste, i incrementant els nivells d'expressió de la proteïna heteròloga eucariota [364]. El vector pRARE incorpora un gen de resistència a Cloramfenicol com a marcador de selecció.

Genotip: *F⁻, ompT, hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻), dcm, gal, λ(DE3), pRARE (Cam^R)*

4.1.2.2. Vectors procarïotes

Els vectors base utilitzats en aquesta tesi provenen de Novagen (Madison, WI, EUA).

Vectors derivats de pET22b(+). Els vectors d'expressió que s'utilitzaren per la proteasa SK#1, per l'ONC i les seves variants i zimògens, i per l'HP-RNasa, són derivats del vector pET22b(+) [365]. Aquest vector presenta un origen de replicació d'*E. coli* (ori) i un promotor del tipus T7lacUV5, regulable (important per minimitzar citotoxicitats, sobretot en el cas de la proteasa [366, 367]) i és d'elevada expressió, com la majoria de vectors de la sèrie pET [368]. Darrera d'aquesta seqüència presenta una zona policonnectora (MCS) amb deu possibles dianes, on es poden inserir els gens forans, expressant-se la proteïna per la qual codifiquen. Aquest vector porta el gen de resistència a l'ampicil·lina, que es podrà emprar com a marcador de selecció.

Vectors derivats de pET28c(+). Els zimògens d'HP-RNasa s'expressaren en vectors derivats de pET28c(+). Els vectors pET28(a-c(+)), porten una cua d'histidines N-terminal, amb una diana per la trombina a

continuació, seguida d'una cua T7. Darrere aquesta seqüència presenta una zona policonnectora (MCS) amb onze dianes úniques, on es poden inserir els gens forans, expressant-se la proteïna per la qual codifiquen amb una cua N-terminal d'histidines. Com els vectors de la sèrie pET, presenta un origen de replicació d'*E. coli* (ori) i un promotor del tipus T7lacUV5 i és d'elevada expressió [368]. Porta el gen de resistència a la kanamicina, antibiòtic que s'utilitza com a marcador de selecció.

4.1.2.3. Línies cel·lulars eucariotes

Les línies cel·lulars eucariotes emprades van ser obtingudes de American Type Culture Collection (Manassas, VA, EUA). A la *Taula 5* es descriuen les línies cel·lulars eucariotes del present treball i les seves característiques. A la *Figura 15* es mostren imatges de les cèl·lules vistes al microscopi invertit.

Taula 5. Característiques generals de les línies cel·lulars utilitzades.

| Nom | Codi ATCC | Organisme | Tipus cel. | Morfologia | Creixement | Sembra (96 pous) | Medi |
|--------------------|-----------------|---------------------|-----------------------|-------------|--------------|------------------|------|
| Jurkat, Clone E6-1 | TIB-152 | <i>Homo sapiens</i> | Limfòcits-T | Limfoblasts | En suspensió | 6000 cèl./pou | RPMI |
| HEK293T | CRL-3216 | <i>Homo sapiens</i> | Cèl. ronyó embrionari | Epitelial | Adherents | 50000 cèl./pou | DMEM |

Informació obtinguda de l'*American Type Culture Collection* (ATCC).

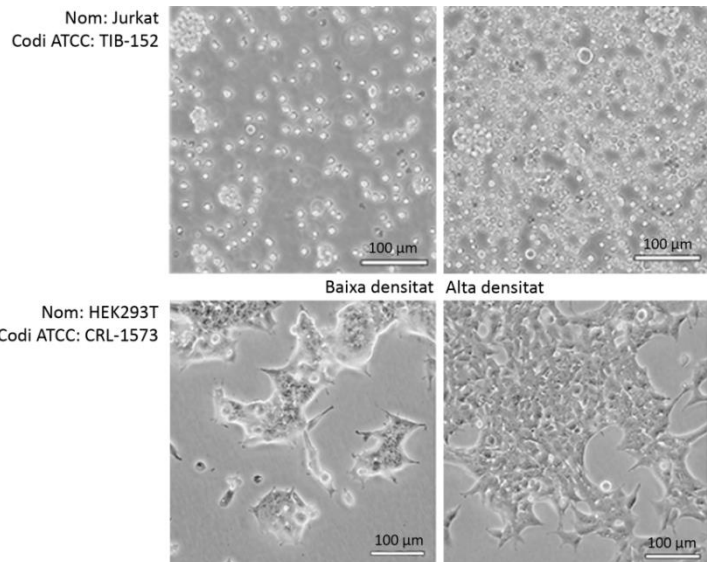


Figura 15. Fotografies de les línies cel·lulars eucariotes emprades a aquest treball, Jurkat i HEK293T.

Es mostren imatges a baixa densitat cel·lular (esquerra) o elevada (dreta). Les fotografies s'han extret de l'*American Type Culture Collection* (ATCC).

4.2. PROTOCOLS GENERALS ESTÀNDARDS

4.2.1. MÈTODES MICROBIOLÒGICS

4.2.1.1. Medis de Cultiu i preparació

Pel creixement i propagació de les diferents soques bacterianes s'ha utilitzat el medi de cultiu LB (*lysogeny broth*). Les composicions per un litre són:

Medi LB.

| | |
|--------------------|------|
| Triptona | 10 g |
| Extracte de llevat | 5 g |
| NaCl | 10 g |

Enrasar a un volum final de 1 litre amb aigua destil·lada. Cal ajustar el pH a 7.2 amb NaOH, esterilitzant posteriorment a l'autoclau durant 20 min a 121°C. Per a l'obtenció de medi sòlid per plaques de cultiu s'afegeixen 15 g d'agar per litre de medi (1.5% final).

4.2.1.2. Antibiòtics

Quan es treballa amb soques transformades amb vectors, els medis de cultiu s'han de suplementar amb els antibiòtics pels quals el vector confereix resistència. D'aquesta manera creixen només les cèl·lules portadores del vector. En la suplementació dels medis es parteix d'una solució mare esterilitzada d'antibiòtic. Si cal suplementar medi sòlid, l'antibiòtic s'afegeix al medi ja fred, just abans de distribuir-lo a les plaques.

Ampicil·lina. L'antibiòtic de selecció de les cèl·lules que contenen el plasmidi pET22b(+) o derivats és l'ampicil·lina, la qual es prepara en una solució d'emmagatzematge 100 mg/ml en aigua destil·lada. Una vegada preparada aquesta solució, s'esterilitza per filtració (0.22 µm de diàmetre de porus) i es guarda alíquotada a -20°C. Per al seu ús, la solució mare es descongela i s'addiciona al medi en condicions estèrils a una concentració de treball de 100 µg/ml.

Kanamicina. Pels vectors derivats de pET28, l'antibiòtic de selecció és la kanamicina, preparada a 50 mg/ml en aigua destil·lada. Com en el cas anterior, s'esterilitza per filtració de forma posterior a la seva preparació, i es guarda alíquotada a -20 °C. La seva concentració de treball és de 50 µg/ml.

Cloramfenicol. En transformar la soca *Rosetta2*TM(DE3) amb el vector corresponent, a part del marcador de selecció del plasmidi, esmentats anteriorment, s'ha afegit cloramfenicol com a

antibiòtic de selecció específic del vector pRARE. El cloramfenicol s'ha preparat a una solució d'emmagatzematge de 35 mg/ml en etanol. Una vegada preparada la solució es guarda aliquidada a -20°C. Quan s'utilitza, s'addiciona al medi en condicions estèrils, a una concentració de treball de 35 µg/ml.

4.2.1.3. Cultius Líquids de Soques Bacterianes

Tot el material que s'usa per a la manipulació de microorganismes ha de ser estèril. El material i la majoria de reactius s'esterilitzen a l'autoclau amb l'excepció dels antibiòtics, que s'esterilitzen per filtració a través d'un filtre de 0.22 µm. En general, les condicions d'esterilització a l'autoclau són de 20 min a 121 °C. Totes les manipulacions s'han de fer a la cabina de flux laminar. Aquesta s'esterilitza per irradiació durant 10 min amb llum ultraviolada i mentre no s'atura el flux es pot considerar estèril. La nansa de Kolle s'esterilitza flamejant-la al bunsen i la de Digrafsky, flamejant-la amb l'ajut d'etanol 95%.

El volum del medi de cultiu ha estat sempre com a màxim 1/5 part de la capacitat del flascó. Els cultius de menys de 10 ml s'han preparat sempre a partir d'una colònia única aïllada en placa de Petri o bé d'un glicerinat. Per a cultius de volum superior sempre s'ha fet créixer abans un pre-inòcul de volum adequat, referit normalment com a cultiu *overnight* (O/N), per després afegir-lo al medi de cultiu a una relació 1:100 (inòcul:medi). El temps d'incubació dels cultius O/N ha estat sempre d'entre 12 i 15 h. No s'han realitzat incubacions de més durada, ja que pot veure's reduïda la població de cèl·lules portadores del vector d'interès, a favor de la població de cèl·lules sense vector. Tot els cultius s'han incubat a 37 °C i en agitació constant d'entre 180 i 250 rpm.

4.2.1.4. Manteniment de les Soques

Per al manteniment a curt termini de les soques d'*E. coli*, portadores o no de plasmidis, es cultiven en plaques de Petri amb medi LB. Les plaques han d'estar etiquetades convenientment (soca, plasmidi i data de sembra) i seques (si és necessari es poden deixar obertes dins de la cabina de flux laminar per tal d'assecar-les). Un cop sembrades, les plaques s'incuben en posició invertida a 37 °C durant una nit fins que les colònies siguin visibles i després es guarden a 4 °C protegides amb parafilm, també en posició invertida.

Per a la conservació a llarg termini es poden fer glicerinars a partir d'un cultiu saturat (cultiu de nit), ajustant el glicerol del medi fins al 15%. El procediment consisteix en inocular una colònia de la soca desitjada en 10 ml de medi LB, incubar a 37 °C en agitació (250 rpm) O/N, prendre una alíquota de 800 µl del cultiu saturat, transferir-la a un tub Eppendorf estèril i afegir 200 µl

d'una solució de glicerol 80% esterilitzada a l'autoclau (15% final). S'homogeneïtza i es guarda a -80 °C.

Per inocular un cultiu a partir d'un d'aquests estocs congelats, es toca la superfície del glicerinat (superficialment descongelat) amb una nansa de Kolle, esterilitzada a la flama, i es realitza una estria en medi sòlid. Posteriorment, un cop crescudes les colònies, se'n selecciona una i s'inocula a un nou medi líquid. El glicerinat es retorna al congelador sense que s'hagi deixat descongelar completament.

4.2.2. CULTIU DE CÈL·LULES EUCARIOTES

4.2.2.1. Medis de Cultiu

La línia cel·lular *Jurkat* s'ha fet créixer amb medi RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) (Gibco[®]) i la línia cel·lular *HEK293T*, amb medi DMEM-L-glutamina (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco[®]). Pel creixement dels cultius s'ha completat els medis amb 10% de sèrum boví fetal (FBS; Fetal Calf Serum Gold, PAA laboratories) i 50 U/ml de penicil·lina-estreptomicina (P/S) (Gibco[®]). Totes les solucions amb les quals s'ha suplementat el medi han estat filtrades amb filtres de 0.22 µm de diàmetre.

Per tal de preparar els medis suplementats amb el 10% de FBS i els antibiòtics P/S es descongela el sèrum boví fetal prèviament inactivat i dispensat en vials de 50 ml, es tempera el medi DMEM o RPMI (500 ml) i se'n descarten 50 ml. S'hi addicionen 47.5 ml de sèrum boví fetal inactivat prèviament filtrat amb filtre de 0.22 µm i 2.5 ml de solució estoc de penicil·lina-estreptomicina.

4.2.2.2. Expansió de línies cel·lulars

Quan les cèl·lules arriben a condicions de confluència es procedeix a subcultivar per a assegurar-ne el seu creixement exponencial. Les incubacions s'han realitzat a un incubador amb ambient saturat d'aigua, a 37 °C i 5 % de CO₂. Les dues línies cel·lulars que s'han emprat en aquest treball, en el moment de ser subcultivats s'han de trobar en un estat de semiconfluència d'entre el 75 i el 90 %. Si es dilueixen més tard, el fenomen d'inhibició per contacte entre les cèl·lules atura el seu creixement i, finalment, condueix a la seva mort. Si se subcultiven abans, obtindrem una fase de latència més llarga del normal, alentint-se l'establiment del cultiu.

Per a subcultivar o propagar la línia de creixement en suspensió (*Jurkat*), es pot realitzar un procés de dilució, afegint medi complet fresc, o bé reemplaçar el medi a partir de centrifugació (5 min a 1500 rpm) i aïllament de les cèl·lules i, posteriorment, resuspendre-les a una concentració de 1×10^5 cèl·lules viables/ml. És important que les cèl·lules no excedeixin la densitat de 3×10^6 cèl·lules/ml. Sol ser necessari realitzar la subcultivació cada 2 o 3 dies.

Per a la línia de creixement adherent (*HEK293T*), el primer pas per al subcultiu de les cèl·lules, que creixen en monocapa, és desenganxar-les del substrat mitjançant un tractament amb tripsina. La suspensió de cèl·lules resultant pot ser subdividida o diluïda tot seguit en medi fresc. Cal inicialment eliminar el medi vell amb una pipeta estèril, rentar la monocapa de cèl·lules adherides al flascó amb 10 ml de PBS (Gibco[®]) estèril per tal d'eliminar les restes de FBS del medi, que inhibirien l'acció de la tripsina, i afegir la solució de tripsina 1 M (Gibco[®]) a 37 °C fins que cobreixi la monocapa de cèl·lules adherida a la superfície del flascó. Incubar el flascó a 37 °C i 5% CO₂, controlant regularment al microscopi el moment en què les cèl·lules deixen d'estar adherides. Una vegada les cèl·lules s'han deslligat de la superfície del flascó, afegir 10 ml de medi complet fresc i temperat a 37 °C, pipetejant la suspensió de cèl·lules repetidament. Aquesta acció mecànica permet dissociar les cèl·lules que encara romanen lligades entre elles o a la superfície del flascó. El FBS que conté el medi inhibirà l'acció de la tripsina, evitant que aquesta malmeti les cèl·lules. En aquest punt es pot realitzar la dilució que correspongui en nous flascons. Cal subcultivar cada vegada que les cèl·lules assoleixin la pre-confluència, que sol ser cada 2-3 dies.

4.2.2.3. Congelació i descongelació de les línies cel·lulars

Al llarg del temps, les cèl·lules cultivades pateixen canvis en el seu creixement, morfologia i característiques genètiques. Aquests canvis afecten negativament la reproductibilitat dels resultats experimentals. La criopreservació de les línies cel·lulars és una tècnica que permet preservar i retenir la integritat de les línies cel·lulars subjectes a estudi. Congelant les cèl·lules s'evita la senescència cel·lular, la transformació i la pèrdua accidental d'una línia per mort o contaminació.

Els cultius seleccionats per a la criopreservació han d'estar en fase exponencial de creixement. La suspensió de cèl·lules es congela en presència de dimetil sulfòxid (DMSO; Sigma, USA) com a agent crioprotector que evita la formació de cristalls de gel que malmetrien les cèl·lules. La composició del medi de congelació pot variar lleugerament d'una línia cel·lular a una altra, en funció de la seva sensibilitat als processos de congelació i descongelació. El medi pot estar compost simplement amb medi de cultiu suplementat amb un 10% de DMSO, sense els antibiòtics P/S. Tot i això, en augmentar la quantitat de sèrum la viabilitat és major, de manera que en el cas de treballar amb cèl·lules més sensibles és millor utilitzar medi amb 20% de

sèrum i suplementat amb un 10% de DMSO o bé, en els casos de més sensibilitat, només sèrum suplementat amb un 10% de DMSO.

Passat un mínim de 4 h i un màxim d'un mes a -80°C les cèl·lules es transfereixen a un tanc amb nitrogen líquid (-196°C) on s'emmagatzemen durant llargs períodes de temps sense deteriorament cel·lular apreciable. L'emmagatzematge a -80°C és possible tot i que es detecta deteriorament de les cèl·lules després de poques setmanes o mesos.

Congelació de línies cel·lulars. Primerament cal aspirar el medi d'un flascó amb cèl·lules crescudes fins a un 80% de confluència, i segons el tipus cel·lular, desadherir les cèl·lules mitjançant un tractament amb tripsina. Després, centrifugar 5 min a 1500 rpm i eliminar el sobrenedant. A continuació, resuspendre el sediment en el volum necessari de medi (preferiblement fred) per tal de tenir $2 - 4 \times 10^6$ cèl·lules/ml. En un criotub posar 900 μl de medi amb cèl·lules i afegir tot seguit 100 μl (10% del volum final) de DMSO. Cal tenir en compte que els agents crioprotectors, malgrat ser imprescindibles en el procés de congelació, són altament tòxics per les cèl·lules a temperatura ambient i a concentracions superiors al 2%. Per aquest motiu és aconsellable realitzar la congelació i descongelació amb la màxima rapidesa possible per tal de garantir-ne la viabilitat cel·lular. Homogeneïtzar i congelar en un dipòsit de congelació gradual d'isopropanol a -80°C durant 24 h. Transferir els vials a una cambra de nitrogen líquid per a una conservació a llarg termini.

Descongelació de línies cel·lulars. Per tal de recuperar les cèl·lules congelades i minimitzar l'efecte de la mort cel·lular és imprescindible realitzar una descongelació ràpida i fer una sembra a una alta densitat. Agafar el vial del recipient de nitrogen líquid, i col·locar-lo immediatament en un vas de precipitats amb gel fins que es pugui començar a apreciar una descongelació del menisc. Llavors, afegir gota a gota amb una pipeta *pasteur* medi de descongelació (DMEM o RPMI suplementat amb 20% FBS) en fred fins que estigui totalment descongelat. Llavors, transferir ràpidament el contingut del vial a un tub de centrifuga estèril i diluir el DMSO fins a 1% addicionant un mínim de 9 ml del mateix medi de descongelació. Seguidament centrifugar 10 min a 1500 rpm a temperatura ambient i descartar el sobrenedant. Aquest rentat es realitza per tal d'eliminar el DMSO residual del medi fresc. Resuspendre suaument el sediment en 1 ml de medi complet, i transferir a un flascó de cultiu amb 9 ml de medi.

4.2.2.4. Recompte del nombre de cèl·lules

El recompte cel·lular es porta a terme mitjançant la utilització del blau tripà a l'1% (Sigma, EUA). Les cèl·lules vives apareixen refringents i clares, mentre que les mortes s'observen

tenyides de blau. Això es deu a què el colorant no pot penetrar a les cèl·lules vives, mentre que sí que ho pot fer a les mortes.

Partint d'un cultiu en flascó, tripsinitzar les cèl·lules en el cas de soques de creixement adherent. Posteriorment, afegir la suspensió cel·lular a un tub estèril de centrífuga, centrifugar 10 min a 1500 rpm i resuspendre les cèl·lules amb 5 ml de medi de cultiu. Preparar un Eppendorf amb 40 µl de blau tripà 0.1% i 10 µl de suspensió cel·lular assegurant una perfecta homogeneïtzació de la suspensió per evitar alteracions en el resultat del recompte. Preparar l'hemocitòmetre (Cambra de Neubauer) amb la col·locació d'un cobreobjectes i aplicar la mostra sota el cobreobjectes per capil·laritat. Finalment, disposar l'hemocitòmetre en el microscopi invertit i realitzar el recompte de cèl·lules que apareixen als 4 quadrants, els quals a la vegada estan subdividits en 16 quadrats. Per obtenir la concentració de cèl·lules s'aplica l'Equació 1.

Equació 1. Recompte de cèl·lules eucariotes en cultiu.

$$N = \frac{\bar{n} \cdot FD}{V}$$

On N = nombre de cèl·lules per ml, \bar{n} = nombre mitjà de cèl·lules per quadrant, FD = factor de dilució en afegir el blau tripà i V = volum del quadrant (ml).

4.2.3. TÈCNiques DE DNA RECOMBINANT

4.2.3.1. Manipulació del DNA

A l'hora de treballar amb àcids nucleics és important l'esterilitat del material i la cura amb què ha de treballar qui el manipula, per tal d'evitar contaminacions amb nucleases que podrien degradar la mostra o amb altres fragments de DNA que podrien donar lloc a resultats no desitjats. Per això, cal esterilitzar a l'autoclau les puntes de pipeta, tubs Eppendorf i qualsevol altre material que hagi de tenir un contacte directe amb el DNA. Pel mateix motiu també cal sotmetre a un procés d'autoclavat totes les solucions que hagin de prendre contacte amb el DNA i, si això no és possible, esterilitzar-les per filtració. Així mateix, és recomanable manipular les solucions amb guants.

4.2.3.2. Obtenció de DNA Plasmídic (Minipreps)

A aquest treball s'ha utilitzat el kit comercial, *QIAprep® Spin Miniprep Kit* (Qiagen), seguint el protocol que indica la casa comercial. Breument, es transfereix 1.5 ml d'un cultiu de nit de cèl·lules transformades amb el vector d'interès a un tub Eppendorf. Centrifugar a 12000 g

durant 30 s i eliminar el sobrenedant per aspiració. Resuspendre el sediment amb 250 µl de la solució de resuspensió del kit. En aquest pas es produeix el trencament de les cèl·lules i l'eliminació de l'RNA. Aplicar 250 µl de solució de lisi cel·lular. La solució esdevindrà viscosa i lleugerament clara per la desnaturalització del DNA. Afegir 350 µl de solució neutralitzadora. La solució es tornarà tèrbola i blanquinosa degut a la precipitació del DNA genòmic. Centrifugar 10 min a 12000 g. Aplicar el sobrenedant a les columnes d'adsorció de sílica i centrifugar durant 60 s. La sílica de les columnes reté el DNA. Rentar del DNA amb 750 µl de solució de rentat, que conté etanol. Es fan dues centrifugacions de 60 s per eliminar les restes d'etanol. Assecar durant 15 min a 37°C per acabar d'eliminar l'etanol, el qual podria interferir en les reaccions enzimàtiques posteriors, i eluir el DNA amb 60 µl d'aigua mil·liQ estèril.

4.2.3.3. Electroforesi de DNA en Gel d'Agarosa

Aquesta tècnica s'ha utilitzat per analitzar preparacions de DNA plasmídic, productes de digestió amb enzims de restricció i productes de PCR, a banda de ser l'etapa preliminar per a la purificació de fragments de DNA. Pel què fa al percentatge d'agarosa per a la preparació del gel, es determina en funció de la mida dels fragments que es volen separar. Com més gran és el fragment de DNA d'interès menys percentatge cal utilitzar d'agarosa. En aquest treball s'han emprat gels d'1% i 1.2% d'agarosa.

Per a la preparació dels gels d'1% d'agarosa es barrejà 0.5 g agarosa de baixa electroendosmosi (Ecogen, Espanya) amb 50 ml del tampó d'electroforesi TAE (Tris-Acetat 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0). Pels de l'1.2% se'n barrejaren 0.6 g en la mateixa quantitat de TAE. En aquestes condicions el DNA es mou en base a la seva càrrega i se separa en funció de la longitud i conformació de les molècules. S'escalfa en un erlenmeyer la barreja, fins a fondre l'agarosa en pols, i després d'uns 5-10 min temperant, s'hi afegeix 5 µl de bromur d'etidi (concentració final de 0.5 µg/ml) tot homogeneïtzant suaument. El bromur d'etidi és un agent que s'intercala entre les bases del DNA i en permetrà la visualització dels fragments. S'aboca la barreja d'agarosa amb el bromur d'etidi en el motlle del gel, i es deixa refredar. Es posa el gel a la cubeta, i aquesta s'omple de TAE x1. Es carreguen les mostres i s'aplica un corrent de 110 V durant aproximadament 30 min per fer córrer les mostres. El DNA, de càrrega negativa, anirà migrant cap al pol positiu. Podrem veure els fragments de DNA transil·luminant el gel amb llum UV, gràcies al bromur d'etidi intercalat que emet fluorescència.

4.2.3.4. Purificació de Fragments de DNA a Partir de Gels d'Agarosa (GeneClean)

Per dur a terme la purificació de fragments de DNA s'ha utilitzat el kit comercial *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Quiagen), que permet purificar fragments d'entre 70 pb i 10 Kpb, seguint el

protocol de la casa comercial. Tallar la banda de DNA minimitzant al màxim la mida del fragment escindit, posar la banda de gel a un tub Eppendorf i pesar-la. Solubilitzar el fragment amb 300 µl de tampó de solubilització per cada 100 mg de gel. Incubar 20 min a 50–60 °C o fins que el fragment de gel estigui totalment dissolt, i carregar la solució a la columna d'adsorció de sílica. Centrifugar 60 s a 12000xg, eliminar el sobrenedant i addicionar 750 µl de tampó de rentat (conté etanol). Centrifugar dues vegades 60 s a 12000 g i evaporar les restes d'etanol mantenint 15 min a 37°C. Finalment, eluir el DNA amb 60 µl d'aigua mil·liQ estèril.

4.2.3.5. Precipitació del producte de PCR

La reacció en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) permet l'obtenció d'un gran elevat nombre de còpies d'un motlle de DNA. Per tal de concentrar el producte de la PCR, afegir-hi 0.1 volums d'acetat sòdic 3 M pH 5.5 i 3 volums d'etanol absolut refredat a -20°C. Agitar en vòrtex i guardar a -80°C durant 1 h o a -20°C tota la nit (~10 h). Passat aquest temps, centrifugar durant 25 min a 12000xg i eliminar el sobrenedant. Afegir-hi 500 µl d'etanol 70% refredat a -20°C i centrifugar durant 5 min a 12.000 g. Aspirar el sobrenedant i deixar assecar el sediment a 37°C durant 10-15 min. Finalment, resuspendre el sediment en el volum desitjat d'aigua mil·liQ estèril.

4.2.3.6. Estimació Espectrofotomètrica de la Concentració de DNA

Per a fer una estimació de la quantitat de DNA present a una dissolució, s'ha mesurat l'absorbància a 260 nm d'una dilució de la solució de DNA de la qual es vol determinar la concentració. S'accepta de forma general que una unitat de densitat òptica (D.O.) a 260 nm equival a una concentració de 50 µg/ml de DNA de doble cadena i a 20 µg/ml d'un oligonucleòtid. En el cas dels oligonucleòtids comercials, adquirits a Roche Diagnostics S.L. (Roche Molecular Biochemicals, Alemanya), s'han emprat les equivalències de dades D.O.₂₆₀ i concentració subministrades en el document que ve junt amb l'oligo.

4.2.3.7. Utilització d'Enzims que Modifiquen el DNA

Tractament amb enzims de restricció. Durant aquest treball s'han utilitzat enzims de restricció de tipus II per obtenir fragments de DNA amb extrems cohesius, els quals es poden purificar i unir per donar lloc a molècules de DNA quimèriques. L'activitat dels enzims de restricció i la seva especificitat es troba directament relacionada amb el pH, la força iònica i la temperatura a la qual la reacció es duu a terme. Així, les condicions òptimes d'incubació per a cada digestió dependran dels requeriments específics de l'enzim a fi d'assolir el seu màxim d'activitat i un

correcte reconeixement de la seva diana específica. Tanmateix, les condicions generals que s'han emprat es resumeixen a continuació.

El volum d'enzim de restricció addicionat a la reacció no ha sigut mai superior al 10% del volum final de la digestió. Això és degut a que els enzims de restricció són subministrats en solucions al 50% de glicerol i per a molts d'ells, una concentració de glicerol superior al 5% en la barreja de reacció els fa perdre l'especificitat de reconeixement (conegut com a activitat *star*). Aquesta pèrdua d'especificitat també es pot manifestar, si la concentració d'enzim respecte la de DNA és massa elevada (> 25 U/μg de DNA). Les barreges de restricció s'han incubat a 37°C entre 3 i 12 h. En el cas de reaccions amb dos enzims de restricció diferents, l'addició dels enzims era simultània quan tots dos presentaven activitat òptima en les mateixes condicions, és a dir, en el mateix amortidor. Una vegada realitzada la digestió caldrà separar els fragments obtinguts mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa seguida d'una purificació d'aquests fragments.

Reacció de lligament amb la DNA lligasa de T4. Per tal d'unir fragments de DNA, prèviament purificats a partir d'un gel d'agarosa, cal barrejar els fragments de DNA que es volen lligar amb el volum necessari d'amortidor de la DNA lligasa de T4 (Roche). Aquest amortidor el proporciona concentrat deu vegades la casa comercial juntament amb l'enzim, i és recomanable guardar-lo en alíquotes de 5-10 μl a -20 °C. En el cas d'extrems cohesius és aconsellable utilitzar una relació entre vector i insert de 1:4. Afegir la lligasa de DNA de T4 (Roche) en una proporció de 0.1 - 0.5 unitats per μg de DNA. Incubar la reacció de lligament a 18 °C durant 15 - 20 h. Si es treballa amb concentracions més elevades de lligasa (fins a 5 U/μg de DNA), es pot optar, sobretot en lligaments d'extrems cohesius, per incubacions de 2-4 h a temperatura ambient, cosa que redueix el risc de degradació dels components de la reacció. En el cas d'un lligament vector-insert que no requereixi manipulacions posteriors, aquesta mescla pot utilitzar-se directament per a transformar cèl·lules competents. Si no s'ha d'utilitzar immediatament, es pot guardar a -20 °C.

4.2.3.8. Mutagènesi Dirigida per Oligonucleòtid per *QuikChange*TM

La mutagènesi dirigida per oligonucleòtid és una tècnica que permet introduir la mutació que es desitgi a una seqüència de DNA coneguda. Existeixen diverses variants de la tècnica, de les quals en aquest treball se ha utilitzat el mètode *QuikChange*TM. Aquest mètode, desenvolupat per Stratagene (EUA), permet introduir una mutació específica a una seqüència de DNA coneguda, utilitzant DNA de doble cadena amb la modificació desitjada com a motlle. El procés consta de dues etapes: una amplificació no exponencial amb un termociclador per tal de produir DNA mutat i una digestió amb l'enzim de restricció *DpnI* per tal d'eliminar el DNA parental.

Per a aquest mètode és necessari un vector de doble cadena portador del gen a modificar i dos encebadors sintètics que continguin la seva seqüència amb la mutació desitjada. Aquests dos encebadors han de ser complementaris entre ells i d'aquesta manera es generen, utilitzant la reacció en cadena de la polimerasa, plasmidis portadors dels gens amb la mutació desitjada.

Reacció d'amplificació

| | |
|-----------------------------|-------|
| Amortidor de Reacció 10x | 5 µl |
| DNA motlle (1 ng/ml) | 10 µl |
| Oligonucleòtid Mutagènic #1 | 4 µl |
| Oligonucleòtid Mutagènic #2 | 4 µl |
| dNTPs 10 mM (0.2 mM final) | 1 µl |
| DeepVent DNA Polimerasa | 1 µl |
| Aigua mil·liQ | 25 µl |

Programa (Termociclador)

| | | |
|---------------------------|----------------------|---------------|
| Desnaturalització inicial | 30 s a 95°C | |
| Desnaturalització | 30 s a 95°C | } x 20 cicles |
| Hibridació | 1 min a 55°C | |
| Extensió | 12 min a 68°C | |
| Final | Indefinidament a 4°C | |

Calen uns dos min d'extensió per cada quilobase de longitud del plasmidi sobre el qual s'introdueix la mutació.

Digestió amb DpnI

Una vegada s'ha dut a terme la reacció d'amplificació del *QuikChangeTM*, el producte és tractat amb l'enzim de restricció *DpnI*, la funció del qual és digerir DNA metilat. *DpnI* és un enzim de restricció de tipus II que reconeix la diana GATC únicament quan la guanina es troba metilada a la posició 6'. D'aquesta manera, es selecciona el DNA recent sintetitzat que conté la mutació, no metilat, i s'elimina el DNA parental, metilat o hemimetilat. S'afegeixen 10 U / µl de l'enzim de restricció *DpnI* al producte del *QuikChangeTM*, homogeneïtzant, i la reacció de digestió s'incuba a 37 °C durant un mínim d'1 h. El producte digerit pot ser transformat directament sobre cèl·lules d'*E. coli*.

Disseny dels oligonucleòtids. De manera general, quan es vol substituir una única base per una altra, els oligonucleòtids utilitzats per a la mutagènesi han de tenir una longitud de 21 bases, amb la mutació centrada. En el cas d'insercions, delecions o canvis de més d'una base consecutiva, els oligonucleòtids han de tenir com a mínim una longitud de 15 bases a cada costat de la regió de mutació. La longitud de cada braç s'ha d'ajustar de manera que la

temperatura teòrica d'hibridació (o temperatura de fusió, T_m) sigui superior a 42 °C, d'acord amb l'Equació 2 indicada pel fabricant.

Equació 2. Càlcul de la T_m dels oligos en mutació dirigida.

$$T_m = 81.5 + 0.41 \cdot (\%GC) - 675 / N - \%desaparellament$$

On T_m = temperatura de fusió, %GC és el percentatge de bases G o C del total, N és el nombre de nucleòtids totals de l'oligonucleòtid, i %desaparellament és el percentatge de nucleòtids que no hibriden amb la seqüència patró.

El protocol de *QuikChangeTM* recomana que els oligonucleòtids tinguin una T_m per sobre de 70 °C (s'ha aproximat a 78 °C sempre que fos possible), per tal de poder ajustar la temperatura d'hibridació de la PCR. Els oligonucleòtids han estat subministrats, de manera liofilitzada, per Roche Diagnostics S.L. (Roche Molecular Biochemicals, Alemanya). Aquests liofilitzats s'han resuspès amb 200 µl d'aigua mil·liQ, s'ha determinat la seva concentració espectrofotomètricament, i s'han preparat alíquotes de cada oligonucleòtid a la concentració de treball per a cada metodologia.

4.2.3.9. Seqüenciació de DNA

Per a validar els clons obtinguts en aquest treball s'ha fet mitjançant la seqüenciació del DNA de les construccions. S'ha seguit l'anomenat mètode del didesoxiribonucleòtid, emprant el kit comercial *ABI PRISM® dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems, EUA), el qual utilitza l'enzim *AmpliTaq® DNA polymerase*. La tècnica es basa en reaccions de seqüenciació cíclica, sintetitzant una cadena complementària a la cadena motlle, per part de la polimerasa, fins que s'incorpora un didesoxiribonucleòtid marcat fluorescentment (ddNTP) al qual li manca el grup OH en 3' de la ribosa, de manera que s'atura la síntesi. Com que la variant de la polimerasa *AmpliTaq® DNA polymerase*, de *Thermus aquaticus*, no presenta activitat correctora 3'→5', s'evita que elimini aquests didesoxiribonucleòtids (ddNTPs) que s'incorporen a la cadena. D'aquesta manera es van generant fragments de diferents mides aleatòriament, els quals són posteriorment separats segons la longitud i identificats mitjançant un seqüenciador automàtic que detecta la presència dels fluoròfors. Hi ha quatre tipus de ddNTP, un per cada nucleòtid, els quals porten incorporat un fluoròfor diferent, per facilitar la seva identificació.

Per portar a terme aquesta tècnica, cal obtenir prèviament gran quantitat del fragment de DNA a seqüenciar. Les còpies del DNA s'aconsegueixen utilitzant la reacció en cadena de la polimerasa PCR amb encebadors en direcció 5' i 3' als extrems de la zona d'interès. En vectors de al sèrie pET, com els utilitzats en aquest treball, podem emprar els *primers* universals T7term i T7prom, els quals són complementaris a les regions del promotor i finalitzador dels

gens clonats. Llavors, un cop amplificat el fragment de DNA a seqüenciar, es realitza una segona PCR amb els ddNTPs i l'enzim *AmpliTaq*[®] *DNA polimerase*. Sovint podem realitzar la segona PCR directament a partir de minipreps si aquestes contenen una quantitat elevada de DNA. A continuació es detallen les condicions per a dur a terme la primera i la segona PCR.

Primera PCR (amplificació de l'insert).

Barreja de reacció

| | |
|-------------------------------|--------|
| DeepVent Buffer (x10) | 10 µl |
| dNTPs 10 mM (0.2 mM final) | 2 µl |
| dsDNA motlle (~50 ng) | 5 µl |
| T7Prom (5 pmol/µl) | 5 µl |
| T7Term (5 pmol/µl) | 5 µl |
| Aigua mil·liQ estèril | 73 µl |
| DeepVent DNA Polimerasa (1 U) | 0.5 µl |

Programa (Termociclador)

| | | |
|---------------------------|----------------------|---------------|
| Desnaturalització inicial | 2 min a 94°C | |
| Desnaturalització | 1 min 15 s a 94°C | } x 30 cicles |
| Hibridació | 1 min a 50°C | |
| Extensió | 1 min 15 s a 72°C | |
| Extensió final | 5 min a 72°C | |
| Final | Indefinidament a 4°C | |

El DNA amplificat es precipita i es purifica a partir d'un gel d'agarosa. El DNA s'elueix en 40 µl d'aigua mil·liQ estèril escalfada prèviament a 65°C.

Reacció de seqüenciació (PCR asimètrica o 2a PCR). S'ha utilitzat el kit comercial *ABI PRISM*[®] *dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems), com a motlle el dsDNA obtingut en la primera PCR i com a encebador T7Prom o T7Term.

Barreja de reacció

| | |
|---------------------------------------|--------|
| dsDNA motlle | 5.5 µl |
| Encebador (T7term / T7prom, 5pmol/µl) | 0.5 µl |
| Ready Mix | 4 µl |

La *Ready Mix* és subministrat per la casa comercial i conté ddNTPs, dNTPs, Tris-HCl (pH 9.0), MgCl₂ i la polimerasa *AmpliTaq DNA*.

Programa (Termociclador)

| | | |
|---------------------------|----------------------|---------------|
| Desnaturalització inicial | 2 min a 96°C | |
| Desnaturalització | 30 s a 96°C | } x 25 cicles |
| Hibridació | 15 s 50°C | |
| Extensió | 4 min a 60°C | |
| Final | Indefinidament a 4°C | |

Precipitació de la reacció de seqüenciació. Utilitzant el T7 Term i el T7 Prom per separat com a encebadors s'aconsegueix la seqüenciació de cada una de les cadenes, un inicia pel promotor i l'altre pel final del gen, la qual cosa permet seqüenciar-ne la seva totalitat. Els diferents fragments marcats amb ddNTPs es precipiten afegint al producte de la reacció 0.1 volums d'acetat de sodi 3 M pH 5.2 i 3 volums d'etanol absolut. Es vorteja suaument i es deixa 15 min a temperatura ambient. Transferir a un Eppendorf. Centrifugar 15 min a 15000 rpm, aspirar el sobrenedant, afegir-hi 250 µl d'etanol 70% fred i vortejar suaument. Centrifugar 5 min a 15000 rpm, aspirar el sobrenedant i assecar 15 min a l'estufa a 37 °C. Resuspendre amb 10 µl de formamida, vortejar suaument i deixar 10 min a temperatura ambient, fent un pols de centrifuga posterior per recollir tot el volum. A aquest treball s'ha realitzat el pas final de seqüenciació d'àcids nucleics als Serveis Tècnics de Recerca de la Universitat de Girona.

4.2.3.10. Obtenció de Cèl·lules Competents d'*E. coli*

Posar 10 ml de medi LB a una ampolla de 75 ml o a un tub Falcon, i inocular-hi la soca desitjada d'*E. coli* procedent del socari, partint del glicerinat. Incubar durant tota la nit a 37 °C i 180 rpm. L'endemà, reinocular a una dilució 1/100 a partir del cultiu de nit (100 µl de cultiu de nit en 10 ml de medi) i incubar a 37 °C i 180 rpm fins a assolir una D.O.₅₅₀ de 0.6 – 0.7 (aproximadament 2 h). Aliquotar en tubs Eppendorf o transferir a un tub Falcon de manera estèril. Centrifugar a 4000 rpm a 4°C durant 10 min. Descartar el sobrenedant de manera estèril. Resuspendre el sediment amb el mateix volum de CaCl₂ 100 mM fred i estèril. Incubar en gel durant un mínim de 30 min. Centrifugar novament a 4000 rpm a 4 °C durant 10 min. Descartar el sobrenedant de manera estèril. Resuspendre el sediment amb 1/10 del volum de CaCl₂ 100 mM fred i estèril. Si s'escau, aliquotar el volum en tubs Eppendorf de 100 µl. A partir d'aquí es poden transformar les cèl·lules competents o emmagatzemar-les a -80 °C. En cas de guardar-les, en el pas final s'ha d'utilitzar una solució de CaCl₂ 100 mM amb glicerol per obtenir-ne una concentració final del 15%.

4.2.3.11. Transformació de cèl·lules competents d'*E. coli*

Afegir estèrilment, a cada alíquota de 100 µl de cèl·lules competents, 2 µl de DNA plasmídic si prové de minipreps o 10 µl de DNA si prové de la reacció amb *DpnI* posterior al *QuikChange*TM o d'un lligament (un màxim de 50 ng de DNA a un volum que no sobrepassi 1/10 del volum de la fracció o alíquota). Agitar suaument, colpejant amb un dit, per tal d'homogeneïtzar la solució. Incubar en gel durant 1-2 h (mínim 20 min) i efectuar un xoc tèrmic posant els tubs Eppendorf al bany a 42 °C durant 1-2 min. Incubar els tubs en gel durant 10 min. Realitzar una recuperació fenotípica, afegint 300 µl (transformants de minipreps) o 600 µl (transformants de *QuikChange*TM i lligaments) de medi LB líquid a cada tub Eppendorf. Incubar a 37 °C en agitació suau durant 1 h. Centrifugar 1 min a 12000 rpm, eliminar el volum de medi necessari fins un volum final de 200 µl i fer una sembra en plaques d'agar LB suplementades amb l'antibiòtic pel qual el vector que s'està manipulant proporcioni resistència (marcador de selecció). Incubar les plaques en una estufa a 37 °C O/N, fins que s'observin les colònies transformants (12-15 h).

4.2.4. ANÀLISI I CARACTERITZACIÓ PROTEICA

4.2.4.1. Anàlisi de l'expressió de proteïnes en *E. coli*

Per tal d'analitzar la producció de proteïna recombinant durant la inducció, es prenen mostres d'1 ml de cultiu en el moment anterior a la inducció i al finalitzar el temps d'inducció. Les mostres se centrifuguen a 12000xg durant 1 min, s'elimina el sobrenedant per aspiració i es resuspèn el sediment cel·lular en 100 µl de tampó d'aplicació de proteïnes x1 amb β-mercaptoetanol. L'anàlisi de l'expressió es duu a terme electroforèticament, utilitzant gels de poliacrilamida SDS tenyits amb blau de Coomassie i/o revelats mitjançant el mètode western.

4.2.4.2. Determinació de la Massa Molecular (Mm)

La massa molecular de les proteïnes recombinants estudiades a aquest treball s'ha comprovat per espectrometria de masses MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*) en un equip Bruker-Biflex al Servei de Proteòmica de la Unitat CientíficoTècnica de Suport (UCTS) de l'Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona (per les proteases SK#1 i *reCHIV-1PR*) i un Ultraflex-TOF de Bruker Daltonics, dels Serveis Tècnics de Recerca del Parc Científic i Tecnològic de la Universitat de Girona (pels zimògens de RNases).

4.2.4.3. Determinació de la Quantitat de Proteïna

Mètode espectrofotomètric. A partir de l'absorbància a 280 nm d'una mostra proteica, es calculà la seva concentració segons la llei de Lambert-Beer (*Equació 3*).

Equació 3. Càlcul de la concentració proteica per espectrofotometria.

$$\text{Abs}_{280} = [\text{proteïna}] \cdot \epsilon_{280} \cdot l$$

On Abs_{280} = absorbància a 280 nm, [proteïna]= concentració de la proteïna a la mostra, ϵ_{280} = coeficient d'extinció molar a 280 nm i l= longitud de pas de la cubeta utilitzada en cm.

Els coeficients d'extinció molar ϵ_{280} s'obtingueren de la predicció feta per l'aplicació ProtParam del portal ExPASy, que són calculats segons el mètode de Pace [369]. A la *Taula 6* es mostren els ϵ_{280} utilitzats per a cada proteïna.

Taula 6. Coeficients d'extinció molar (280 nm) pel càlcul de concentració de les proteïnes d'aquest treball.

| Proteïna | Coeficient d'extinció molar (ϵ) a 280 nm ^a |
|----------------|--|
| ONC | 10470 M ⁻¹ cm ⁻¹ |
| ONCQ1S | |
| ONCFL | |
| ONCFLG | |
| ONCFL2-C15 | |
| ONCFL2-C16 | |
| ONCYP | 11960 M ⁻¹ cm ⁻¹ |
| ONCYPG1 | |
| ONCYPG2 | |
| ONCYPGG | |
| HP-RNasa | 7950 M ⁻¹ cm ⁻¹ |
| HGNFL | |
| HGNFLG | |
| HGNFL-R31ER91D | |
| HGNYP | 9440 M ⁻¹ cm ⁻¹ |

^a Extrets del portal ExPASy, calculats segons Pace et al. 1995 [369].

Mètode de Bradford. La determinació de la quantitat de proteïna total també s'ha dut a terme utilitzant el mètode de Bradford [370]. Aquest mètode es basa en el canvi del màxim d'absorció, de 465 nm a 595 nm, del colorant *Coomassie Brilliant Blue G-250* (Bio-Rad, EUA) en solució àcida quan s'uneix a proteïnes.

Inicialment cal preparar 1 ml de BSA (Sigma) a una concentració de 1 mg/ml en aigua mil·liQ i dispensar en tubs Eppendorf 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 i 4 µl de la solució de BSA. Ajustar els volums fins a 400 µl amb aigua mil·liQ. Aquests tubs s'utilitzaran per a confeccionar una recta

patró amb la qual determinar la concentració de la mostra problema. A part, preparar una solució de la mostra problema que contingui idealment 0.4 mg/ml i preparar en tubs Eppendorf les dilucions d'aquesta mostra, afegint a 400 µl d'aigua mil·liQ diferents volums de proteïna 0.4 mg/ml (1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 µl). Diluir 1:5 amb aigua mil·liQ el reactiu de Bradford i afegir 600 µl de reactiu de Bradford diluït a cada un dels tubs Eppendorf. Incubar a temperatura ambient durant 5 min i fer una lectura de l'absorbància a 595 nm.

4.2.4.4. Electroforesi Discontínua en Gel de Poliacrilamida

Com a mètode analític per la determinació del contingut proteic de mostres, s'ha utilitzat de forma rutinària l'electroforesi discontínua en gel de poliacrilamida en presència d' SDS (SDS-PAGE). L' SDS envolta les proteïnes de càrrega negativa, i a conseqüència, en aplicar un camp elèctric migraran totes cap al pol positiu de forma proporcional a la seva massa molecular, permetent separar-les segons aquesta característica. S'ha seguit el mètode d'electroforesi discontínua descrit per Lane i Harlow [371]. Aquest mètode es caracteritza per la utilització d'un gel superior o gel apilador (amb una concentració d'acrilamida insuficient per separar les proteïnes) que té com a funció concentrar les proteïnes abans que entrin en el gel inferior o gel separador (amb una concentració superior d'acrilamida) el qual permetrà separar les proteïnes segons la massa molecular.

En aquest treball es van emprar gels separadors de dos percentatges diferents d'acrilamida, segons la mida de les proteïnes a analitzar. Es polimeritzaren gels separadors al 15% d'acrilamida i 0.75 mm de gruix, pel seguiment dels processos de purificació de la proteasa SK#1 i de les diverses variants de zimògens i per la determinació del grau de puresa de les mostres obtingudes al final del procés. En el cas de l'anàlisi de l'activació *in vitro* dels zimògens per part de la proteasa, reacció en la qual aquests zimògens es fragmentaven en dos pèptids petits s'utilitzaren gels separadors al 20% d'acrilamida i 1.5 mm de gruix. Es detalla el protocol de confecció dels gels, apilador i separador, i segons el gruix i % d'acrilamida del gel separador.

Es prepara la barreja de components del gel separador, sense afegir inicialment el TEMED i el Persulfat amònic 10%, que faran iniciar la polimerització. Un cop el suport de polimerització amb els vidres està muntat, s'afegeix aquests dos components restants i s'aboca la barreja enmig dels vidres del gel, evitant la formació de bombolles. S'afegeix una capa fina d'aigua mil·liQ per facilitar la polimerització i evitar malformacions del front. Una vegada el gel separador (inferior) hagi polimeritzat, es pot retirar la capa d'aigua. Llavors es passa a la preparació del gel apilador (superior) que, com en el cas anterior, s'hi afegeix el TEMED i el Persulfat amònic 10% quan estigui tot a punt. Una vegada dins el motlle, es posa la pinta formadora de butxaques. S'omple la cubeta d'electroforesi amb l'amortidor d'elució (100 ml d'amortidor d'elució x10 (Tris-HCl 0.25M, SDS 1%, glicina 1.92 M, pH 8.5) en 900 ml d'aigua

mil·liQ). Posteriorment, es posa els vidres amb el gel polimeritzat a la zona d'encaix dels accessoris del kit. Llavors es preparen les mostres com s'indica a continuació i es carrega el gel. Per a induir el desplaçament de les proteïnes en funció de la seva massa molecular, es connecta la font d'alimentació a un voltatge constant (inicialment baix, i un cop en el gel separador es pot apujar fins a uns 120 V). Quan el colorant del tampó d'aplicació assoleixi l'extrem inferior del gel, podem aturar el pas de corrent. A partir d'aquí es pot tenyir amb Blau de Coomassie o realitzar algun altre tipus de revelat, com electrotransferència tipus western.

Preparació del gel separador al 15% d'acrilamida (5 ml, 0.75 mm gruix)

| | |
|---|---------|
| Acrilamida 30 % – Bisacrilamida 0.8% | 2.5 ml |
| Tampó de gel separador (Tris/HCl 1.5M, pH 8.8 SDS 0.4%) | 1.35 ml |
| Aigua mil·liQ | 1.1 ml |
| TEMED | 2 µl |
| Persulfat amònic 10% (p/v) | 50 µl |

Preparació del gel separador al 20% d'acrilamida (12 ml, 1.5 mm gruix)

| | |
|---|--------|
| Acrilamida 30 % – Bisacrilamida 0.8% | 8 ml |
| Tampó de gel separador (Tris/HCl 1.5M, pH 8.8 SDS 0.4%) | 3 ml |
| Aigua mil·liQ | 1 ml |
| TEMED | 4 µl |
| Persulfat amònic 10% (p/v) | 100 µl |

Preparació del gel apilador (2 ml, 0.75 mm gruix) (per a 1.5 mm gruix, doblar quantitats)

| | |
|---|---------|
| Acrilamida 30 % – Bisacrilamida 0.8% | 0.33 ml |
| Tampó de gel separador (Tris/HCl 1.5M, pH 8.8 SDS 0.4%) | 0.27 ml |
| Aigua mil·liQ | 1.4 ml |
| TEMED | 2 µl |
| Persulfat amònic 10% (p/v) | 20 µl |

Preparació de les mostres

Les mostres es preparen aplicant amortidor d'aplicació de mostres x4 (Tris HCl 50mM SDS 8% glicerol 20% blau de bromofenol 0.02%) a una relació de 3:1. Si es vol que l'amortidor tingui caràcter reductor s'afegeix β - mercaptoetanol (15% v/v) al tampó d'aplicació i es bullen les mostres 5' a 90 °C.

Tinció del gel de poliacrilamida amb blau de Coomassie

Per a la tinció del gel de poliacrilamida amb blau de Coomassie, es submergeix el gel, preferiblement en agitació, en solució Coomassie (0.1% (p/v) Coomassie Blue, 45% (v/v) metanol, 10% (v/v) àcid acètic). Posteriorment s'elimina l'excés de colorant amb diversos rentats amb àcid acètic al 7% fins que les bandes proteiques es vegin ben contrastades.

4.3. PROCEDIMENTS ESPECÍFICS

A aquest treball es van dissenyar, construir, produir i purificar 8 variants de zimògens d'ONC i 4 d'HP-RNasa, activables específicament per la proteasa HIV-1 PR. Posteriorment, es van caracteritzar aquests zimògens en relació a la seva estabilitat, activació *in vitro* amb la proteasa HIV-1 PR, internalització en cèl·lules *Jurkat* en cultiu, evasió de l'RI, i activitat enzimàtica i citotoxicitat abans i després de l'activació amb la proteasa. Per a tot això, i també atès el seu preu de mercat, va ser necessària la construcció, obtenció i caracterització de la proteasa del HIV-1 pròpia (SK#1), com a eina per a realitzar les activacions dels zimògens de ribonucleases.

4.3.1. OBTENCIÓ DE LA PROTEASA SK#1

El plasmidi pSK#1, el qual dirigeix la producció de la proteasa SK#1, va ser construït per ampliació conjunta del gen de la proteasa HIV-1 PR i de vuit residus addicionals (MGTVSNF-) a l'N-terminal del gen de la proteasa. S'utilitzà la soca *Rosetta*TM2(DE3) per a l'expressió. La proteasa SK#1 es purificà a partir de cossos d'inclusió, i combinant els protocols descrits per Hong i col·laboradors [372] i per l'equip de Gustafson [373].

4.3.1.1. Construcció del vector d'expressió pSK#1

El gen que codifica per la proteasa HIV-1 PR [374, 375] utilitzat per la construcció del nostre vector d'expressió va ser ampliat per PCR a partir del vector pSK616, derivat de pBlueScript. El vector pSK616 va ser cedit pel Dr. Antonio Villaverde (Universitat Autònoma de Barcelona). Els oligonucleòtids utilitzats en la PCR per l'ampliació del gen de la proteasa van ser 5HIV_*NdeI* i 3HIV_*Sall*, i es detallen a la *Taula 9*. Aquests oligos van ser dissenyats per incorporar les dianes de restricció *NdeI* a l'extrem 5' del gen de la proteasa, i *Sall* a l'extrem 3'. A més, seguint l'estratègia de Gustafson [373], s'amplificà conjuntament el gen de la proteasa del HIV-1 i la seqüència codificant pels 7 residus aminoacídics (incorporant una metionina inicial) (M)GTVSFNF- (*Figura 16A*), que es troba a l'extrem N-terminal de la poliproteïna Gag-Pol del virus HIV-1, i correspon al punt d'autoprocessament per a rendir proteasa madura [270, 375]. Posteriorment, el producte de l'ampliació va ser digerit amb els enzims de restricció *NdeI* i *Sall* i es va subclonar a la regió de clonatge múltiple (MCS) del vector pET22b(+) prèviament digerit amb els mateixos enzims. El vector d'expressió de la proteasa obtingut es va denominar pSK#1 (*Figura 16B*). La validesa de la construcció (*Figura 16C*) es va comprovar per seqüenciació d'àcids nucleics als Serveis Tècnics de Recerca de la Universitat de Girona.

4.3.1.2. Producció i purificació de la proteasa SK#1

Per a la producció de la proteasa HIV-1 PR, inicialment es va transformar la soca *Rosetta*TM2(DE3) amb el vector d'expressió de la proteasa pSK#1 [376]. Aquesta soca és portadora del plasmidi pRARE, que codifica per tRNAs de baixa freqüència d'ús en procarïotes i permet utilitzar cloramfenicol com a marcador de selecció.

Es van suplementar 25 ml de medi líquid LB amb ampicil·lina 50 µg/ml i cloramfenicol 35 µg/ml i es van inocular amb una colònia de *Rosetta*TM2(DE3)-pSK#1. Després de 5 h en agitació a 37 °C, el cultiu transformant en creixement es va utilitzar per inocular 2 L de medi LB, suplementat amb els antibiòtics prèviament esmentats, utilitzant una dilució 1/100 (v/v). Quan el cultiu va assolir una OD_{550nm} de 1.5-2.0 U.D.O. (aproximadament després d'unes 4-5 hores incubant a 37 °C en agitació a 220 rpm), es va induir l'expressió del gen de la proteasa mitjançant l'addició d'isopropil-β-D-tiogalactopiranosid (IPTG) a una concentració final de 1 mM. Després de 4 h de producció (temps descrit com a òptim [377]), es van recollir les cèl·lules per centrifugació (7 min a 7000 rpm) i es resuspengué el pellet en 30 ml de Tris-acetat 50 mM, pH 8.0, EDTA 10 mM. Es van llsar les cèl·lules utilitzant la premsa de French a 1100 psi, lisant les membranes cel·lulars per canvis de pressió i alliberant el contingut intracel·lular, trobant-se la proteasa majoritàriament en la fracció insoluble en forma de cossos d'inclusió.

Com s'esquematitza a la *Figura 17*, posteriorment a la lisi es van aïllar els cossos d'inclusió per centrifugació (45 min a 10000 rpm a 4 °C) i es van dissoldre en *Tampó de Solubilització* 20 mM Tris-acetat, pH 8.0, 8 M urea, 10 mM 1,4-dithio-DL-treitol (DTT), fins a una concentració final de 10 mg/ml de cossos d'inclusió. La solució es va incubar durant 2 h en agitació, i es descartà la part no solubilitzada per centrifugació a 12000xg durant 30 min a 4 °C. Posteriorment, es feu un primer pas de purificació carregant el sobrenedant a una cromatografia d'intercanvi aniònic amb 50 ml de reïna DEAE, prèviament equilibrada amb el *Tampó de Solubilització* i a un flux de 0.4 ml/min. Les fraccions recollides corresponents al través es van dialitzar durant tota la nit a 4 °C, enfront el tampó 100 mM Na₂HPO₄, pH 6.7, 0.01% CHAPS, 1 mM EDTA, 1 mM DTT i 25 % (v/v) glicerol. Seguidament, es van fer dos canvis de diàlisi enfront 25 mM Na₂HPO₄, pH 6.7, 1 mM EDTA, 1 mM DTT i 1 % (v/v) glicerol. S'aïllà la proteïna solubilitzada mitjançant un últim pas de centrifugació a 12000xg durant 30 min a 4 °C. Finalment, es realitzà l'últim pas de purificació, corresponent a una cromatografia d'intercanvi catiònic a través d'una columna Mono-STM HR 5/5 FPLC, equilibrada amb el mateix tampó. L'elució de la proteasa es realitzà mitjançant un gradient salí de 0-400 mM NaCl en 15 min. A la fracció corresponent a la proteasa (aproximadament elueix a 250 mM NaCl, essent aquest el segon pic aparegut en el cromatograma) se li va afegir un 10% (v/v) de glicerol i es va emmagatzemar en alíquotes a -80 °C. La proteasa de HIV-1 obtinguda, expressada de pSK#1, es va anomenar SK#1 (*Figura 16D*).

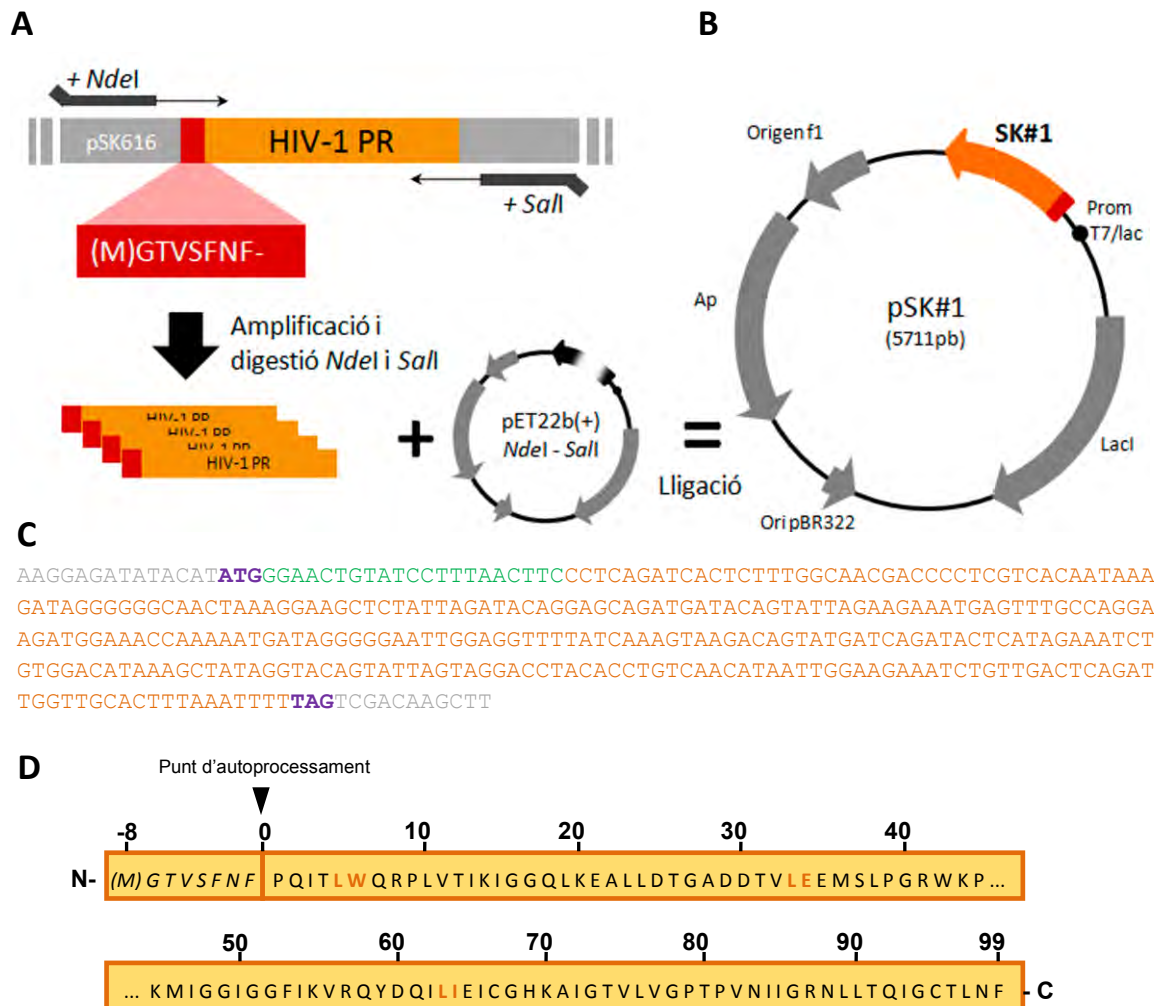


Figura 16. Construcció de la proteasa SK#1.

A) Procés de construcció del vector pSK#1 d'expressió de la proteasa SK#1, mitjançant l'amplificació del gen de la proteasa a partir del vector pSK616 i els passos de digestió i lligació en el vector pET22b(+). En vermell es ressalten els 8 residus N-terminals addicionals amplificats junt amb el gen de la proteasa, per retardar la inactivació per autoproteòlisi. **B)** Esquema final del vector d'expressió de la proteasa pSK#1. **C)** Seqüència de DNA del vector pSK#1 amb el gen de la proteasa integrat en la zona de clonatge múltiple. En gris: fragment de seqüència del vector pET22b(+). En vermell: seqüència de la proteasa SK#1. En verd: seqüència codificant pels 7 residus N-terminals GTVSFNF-. En lila: Metionina inicial i codó de stop. **D)** Esquema i seqüència aminoacídica de la proteasa SK#1, amb els 8 residus N-terminals, ressaltant el punt d'autoprocessament. En blau: els tres punts d'autohidròlisi habituals de la proteasa Leu₅-Trp₆, Leu₃₃-Glu₃₄ i Leu₆₃-Ile₆₄.

La concentració de la proteïna obtinguda va ser determinada mitjançant l'assaig Bradford [370], paral·lelament amb la *rechIV-1 PR* comercial. La puresa i l'homogeneïtat es confirmà per SDS-PAGE 15%, amb tinció Coomassie-Blue i mitjançant electrotransferència amb revelat tipus Western-Blot. La massa molecular de la proteasa SK#1 madura i de la proteasa comercial *rechIV-1 PR* van ser confirmades per espectrometria de masses MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-light), utilitzant un equip Bruker-Biflex al Servei de Proteòmica de la Unitat CientíficoTècnica de Suport (UCTS) de l'Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona.

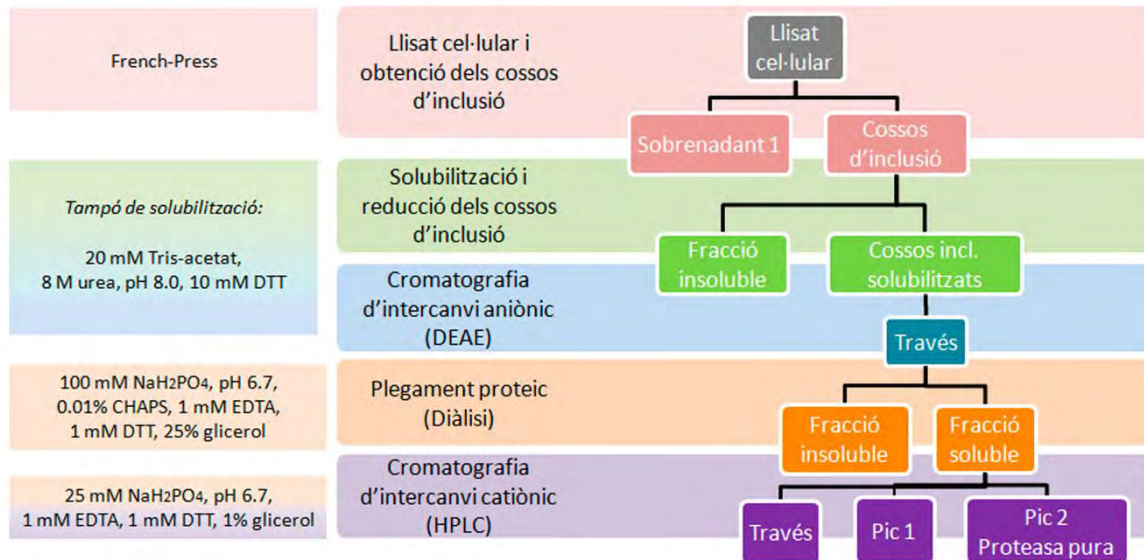


Figura 17. Procés de purificació de la proteasa SK#1.

S'esquematitza el procés de purificació a partir del llistat cel·lular del cultiu transformant *Rosetta*TM2(DE3)-pSK#1.

Per a la realització del Western-blot, i de forma posterior a una electroforesi convencional, les proteïnes immerses en el gel de poliacrilamida es transferiren a una membrana de difluorur de polivinilidè (PVDF) (Millipore, EUA), aplicant un camp elèctric perpendicular. Inicialment, les membranes de PVDF s'activaren submergint-les 15 seg en metanol 100% i després rentant-les 2 min amb aigua mil·liQ. Les membranes activades i les esponges es submergiren mínim 5 min en *tampó d'electrotransferència* (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% v/v metanol, pH 8.3), i els papers Whatmann o de filtre durant 30 seg. Llavors es feu el muntatge evitant la formació de bombolles, en l'ordre d'elements següent: suport de plàstic del pol negatiu, esponja, paper Whatmann, gel de poliacrilamida amb les proteïnes, membrana activada, paper Whatmann, esponja i suport de plàstic del pol positiu. L'electrotransferència es realitzà a 100 V durant 2 h amb la cubeta per Western-blot *Mini Trans-Blot* de Bio-Rad (EUA), plena de *tampó d'electrotransferència* i en agitació, refrigerada a 4 °C. Les membranes s'incubaren 1 h en agitació en *tampó BLOTTO* (Tris-HCl 10mM, NaCl 100mM, Tween 0.1% amb llet en pols 3% (Nestlé, Suïza)), per evitar unions inespecífiques dels anticossos. Posteriorment s'incubà la membrana durant unes 12-15 h en agitació suau i a 4 °C, amb una dilució 1:20000 en *tampó BLOTTO* de l'anticòs primari IgG1 anti-HIV1-PR de ratolí (Acris Antibodies GMBH, Alemanya). Aquest anticòs reconeix específicament la regió N-terminal de la proteasa HIV-1 madura. Un cop passat aquest temps, s'incubà la membrana 1 h a temperatura ambient i en agitació amb l'anticòs secundari de cabra anti-IgG-ratolí (Calbiochem, EUA) conjugat amb peroxidasa, a una dilució 1:50000 en el *tampó* anterior. Pel revelat, s'utilitzà el kit de detecció *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce, EUA), deixant reaccionar durant 5 min. Aquesta solució conté luminol, que serà oxidat per la peroxidasa rendint 3-aminoftalat, originant finalment una emissió lluminosa. Aquesta emissió fou detectada i fotografiada a 425 nm amb el quimioluminòmetre FluorChemTM SP (Alpha Innotech, EUA) amb càmera incorporada.

4.3.1.3. Caracterització cinètica de la proteasa recombinant SK#1

Assaig FRET amb el substrat Dabcyl-Edans. Per tal de caracteritzar l'activitat enzimàtica de la proteasa SK#1 produïda i comparar-la amb la proteasa *rech*HIV-1 PR comercial, es va realitzar un assaig de transferència d'energia de fluorescència per ressonància (FRET) [378], molt sensible, utilitzant el substrat fluorogènic DABCYL- γ -Abu-Ser-Gln-Asn-Tyr*Pro-Ile-Val-Gln-EDANS (Bachem, Suïssa), i segons el protocol establert per Matayoshi i col·laboradors [379]. Aquest substrat consta d'un octapèptid amb un fluoròfor i un *quencher* o acceptor d'energia units als seus extrems. L'octapèptid presenta la seqüència SQNY*PIVQ, diana de reconeixement i hidròlisi natural per part de la proteasa HIV-1 entre matriu/càpsida (MA/CA o p17/p24) corresponent als residus 129-136 de la poliproteïna Pr55gag. La digestió es dona en l'enllaç peptídic Tyr*Pro i es tradueix en un increment de la intensitat de fluorescència (excitació a 335 nm, emissió a 470 nm) (Figura 18). Els assajos es van realitzar amb una cubeta de quars Suprasil, de 100 μ l i 10 mm de pas de llum (Hellma, Espanya) i un espectrofluorímetre termoestabilitzat Lambda LS50 amb un detector UV-Vis, controlat pel software KinLab (Perkin-Elmer, Waltham, MA, EUA).

Les reaccions de trencament del substrat per part de les dues proteases (pròpia o comercial) van ser realitzades en *Tampó d'Assaig* 0.1 M acetat sòdic, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% DMSO, 1 mg/ml BSA, pH 4.7, en un volum final de 120 μ l, a 30 °C. El rang de concentracions de substrat assajat fou de 0 a 130 μ M (0, 1, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80, 100, 130 μ M) i la concentració de proteasa es va establir a 1.45 nM (afegint 1.2 μ l de proteasa 145 nM). Es va seguir l'increment de fluorescència per degradació del substrat monitoritzant cada segon durant 5 minuts després d'afegir la proteasa. Les taxes de degradació del substrat ($V_{obs,FI}$ en unitats de fluorescència/segon) per les dues proteases i per cada concentració de substrat es van determinar per triplicat.

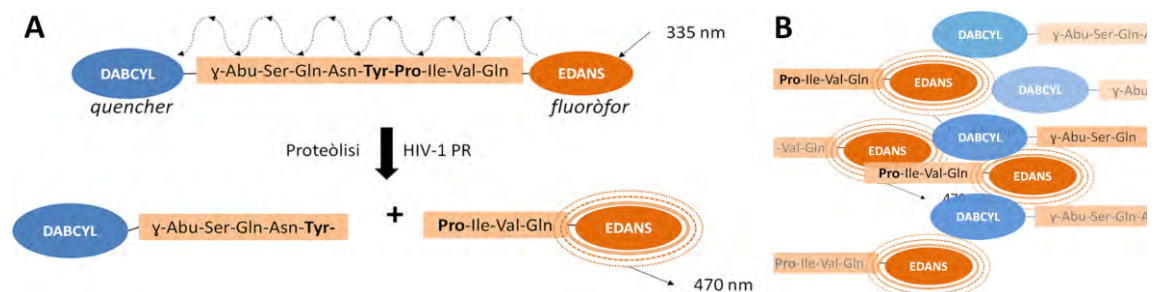


Figura 18. Esquema del substrat fluorogènic DABCYL- γ -AbuSQNY*PIVQ-EDANS i l'Efecte d'Apantallament (IFE).

A) El substrat DABCYL-EDANS emet fluorescència després d'un procés de proteòlisi específica per part de la proteasa HIV-1 PR. **B)** Efecte d'apantallament de la fluorescència (IFE) que ocorre a elevades concentracions de substrat, causat pels *quenchers* de molècules veïnes. Al requadre taronja, l'octapèptid diana, amb el punt de tall en negreta. En oval taronja, el fluoròfor EDANS ($\lambda_{exc/em}$ = 335/470 nm). En oval blau, el *quencher* DABCYL.

Correcció de l'efecte d'apantallament intern (Inner Filter Effect, IFE). Existeixen dos tipus d'IFE que es manifesten en condicions d'elevada densitat òptica [380, 381] subestimant la fluorescència d'emissió i , per tant, els valors de K_M i V_{max} . En primer lloc, l'ocasionat per una absorció de la fluorescència per part del mateix fluoròfor; i en segon lloc, el causat per l'absorció de la fluorescència per part del *quencher* de molècules veïnes de producte ja digerit, important en els assajos FRET amb substrats fluorogènics [380, 382]. Així, es va observar i corregir l'IFE com es descriu a la bibliografia [382]. Breument, es va mesurar la fluorescència de les concentracions de substrat descrites anteriorment, amb un compost de referència i sense aquest. La reducció de la fluorescència observada reflecteix l'IFE per a cada concentració de substrat de forma específica. S'utilitzà com a compost de referència EDANS_{lliure} (presenta un espectre similar al producte de digestió PIVQ-EDANS) a una concentració final fixada de 0.8 μM (2 μl d'EDANS 50 μM , a un volum de 120 μl totals), emprant el coeficient d'extinció molar de 5438 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 335 nm en *Tampó d'Assaig* [379] per determinar la concentració. Els factors de correcció de l'IFE per a cada concentració de substrat es detallen a la *Taula 7* i són el quocient de la fluorescència de EDANS_{lliure} dividida per la fluorescència del mateix EDANS_{lliure} en absència del substrat. La fórmula per obtenir les velocitats corregides es detalla a l'*Equació 4* [382].

Equació 4. Correcció de l'Efecte d'Apantallament Intern (IFE).

$$V_{corr_i} = \frac{V_{obs_i}}{\frac{F_{ED+S_i} - F_{S_i}}{F_{ED+S_0} - F_{S_0}}}$$

On V_{corr} és la velocitat corregida a la concentració de substrat i ; V_{obs_i} representa la velocitat observada a la concentració de substrat i ; F_{ED+S_i} és la suma de la fluorescència d'EDANS_{lliure}+substrat detectada a la concentració i ; F_{S_i} es correspon a la fluorescència del substrat detectada a la concentració i ; F_{ED+S_0} , fluorescència de EDANS_{lliure} en absència de substrat; i F_{S_0} és la fluorescència basal del tampó en absència de substrat i EDANS (*background*).

Taula 7. Factors de correcció de l'IFE per a les diferents concentracions de substrat.

| Concentració de substrat (μM) ^a | Fluorescència del substrat ^b | Fluorescència Substrat+EDANS _{ll} ^{b, c} | Fluorescència EDANS _{ll} | Correcció IFE |
|---|---|--|-----------------------------------|----------------------|
| 0 | 0.041 ± 0.041 | 179.814 ± 1.846 | 179.773 ± 1.887 | 1.000 ± 0.021 |
| 1 | 0.811 ± 0.171 | 173.090 ± 2.846 | 172.279 ± 3.017 | 0.958 ± 0.027 |
| 5 | 3.676 ± 0.295 | 158.545 ± 5.373 | 154.868 ± 5.667 | 0.861 ± 0.041 |
| 10 | 7.240 ± 0.133 | 152.734 ± 3.821 | 145.494 ± 3.954 | 0.809 ± 0.030 |
| 15 | 10.557 ± 0.193 | 143.493 ± 0.007 | 132.936 ± 1.200 | 0.739 ± 0.014 |
| 20 | 12.403 ± 0.749 | 132.001 ± 4.641 | 119.598 ± 5.390 | 0.665 ± 0.037 |
| 40 | 15.423 ± 0.309 | 100.266 ± 2.184 | 84.843 ± 2.493 | 0.471 ± 0.019 |
| 60 | 15.901 ± 0.081 | 72.363 ± 1.837 | 56.463 ± 1.918 | 0.314 ± 0.014 |
| 80 | 15.248 ± 0.512 | 62.359 ± 2.631 | 47.111 ± 3.143 | 0.262 ± 0.020 |
| 100 | 12.659 ± 0.472 | 41.239 ± 4.158 | 28.580 ± 4.630 | 0.159 ± 0.027 |
| 130 | 8.197 ± 1.227 | 32.533 ± 3.142 | 24.336 ± 4.369 | 0.135 ± 0.026 |

^a En un volum total de 120 μl , en *Tampó d'Assaig* 0.1 M acetat sòdic, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% DMSO, 1 mg/ml BSA, pH 4.7.

^b La fluorescència es determinà a 30 °C, amb un espectrofluorímetre Perkin-Elmer Lambda Bio 20, equipat amb càmera de cubetes termostatitzada amb un detector UV-Vis.

^c Concentració EDANS_{lliure} fixada a 0.8 μM . Coeficient extinció molar (ϵ) = 5438 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 335 nm en *Tampó d'Assaig* [379].

Conversió d'unitats, de V_{FI} a V . Per a convertir les velocitats $V_{corr_{FI}}$ ($UFI \text{ seg}^{-1}$) a V ($\mu M \text{ min}^{-1}$) es va realitzar una recta patró amb substrat a baixa concentració, on l'efecte IFE és mínim (0, 0.1, 0.2, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0 μM), afegint-hi proteasa a una concentració final de 425 nM, deixant completar la degradació del substrat. La fluorescència final detectada correspon a la fluorescència del producte PIVQ-EDANS format, estant aquest a la mateixa concentració que el substrat inicial, permetent la conversió d'unitats de fluorescència a unitats de concentració.

Ajust de les dades a Michaelis-Menten. Finalment, una vegada corregit l'efecte IFE i convertides les unitats de V a $\mu M \text{ min}^{-1}$, les dades s'ajustaren a l'Equació 5, de Michaelis-Menten, i es calcularen els dobles inversos o de Lineweaver-Burk. Es determinaren així els paràmetres cinètics V_{max} , K_M i k_{cat}/K_M per les dues proteases, *rechIV-1* comercial i SK#1 produïda en aquest treball.

Equació 5. Equació de Michaelis-Menten.

Pel càlcul dels paràmetres cinètics V_{max} , K_M i k_{cat}/K_M .

$$v = \frac{v_{max} [S]}{K_M + [S]}$$

On v_0 és la velocitat de reacció a l'inici, v_{max} és la velocitat màxima assolida, $[S]$ es correspon a la concentració de substrat i K_M és la constant de Michaelis-Menten.

4.3.2. DISSENY, CONSTRUCCIÓ, PRODUCCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE ZIMÒGENS DE RIBONUCLEASES

Per a la obtenció dels zimògens d'ONC i d'HP-RNasa, i seguint l'estratègia de Raines i col·laboradors [360], es construïren els vectors d'expressió dels zimògens unint els extrems N- i C- terminals de la proteïna salvatge mitjançant diverses seqüències aminoacídiques que contenien una diana per la proteasa HIV-1 PR, i es generaren nous extrems amino i carboxil terminals mitjançant permutació circular de la cadena polipeptídica. Una vegada plegada la proteïna, el centre actiu de la ribonucleasa quedà obstruït. Es produïren i purificaren les diverses construccions obtenint zimògens d'ONC i d'HP-RNasa activables específicament per la proteasa HIV-1 PR. La caracterització es realitzà en base al grau d'activació *in vitro* amb la proteasa pròpia SK#1, l'estabilitat conformacional, la capacitat d'internalització a les cèl·lules i d'evasió de l'RI, i finalment, l'eficiència catalítica i citotoxicitat abans i després de l'activació amb la proteasa. També es resolgué l'estructura d'un dels zimògens basats en l'ONC.

4.3.2.1. Disseny i modelats moleculars dels zimògens de ribonucleases

Seqüències diana de la proteasa HIV-1 PR i de bloqueig del centre actiu dels zimògens. Es van utilitzar tres tipologies de seqüències *linker* reconegudes específicament per la proteasa HIV-1 PR amb la finalitat de bloquejar el centre actiu dels zimògens (Taula 8). D'una banda, les seqüències de tipologia YP, SQNY*PIVQ (on l'asterisc indica el punt de tall), reconeguda i digerida de forma natural per la proteasa HIV-1 PR [270, 383, 384]. D'altra banda, les de tipologia FL, GSGIF*LETSL. I per últim, es va dissenyar una variació de les seqüències FL anomenant-les de tipus FL2, IF*LETSGIF*LET, les quals presenten dos llocs de tall per part de la proteasa HIV-1 PR. Finalment, en cada tipologia seleccionada es va variar la longitud dels connectors entre 14 i 16 residus, amb la finalitat d'obtenir unes construccions més accessibles per la proteasa, o amb una relació d'eficiència catalítica ribonucleasa / proribonucleasa més elevada. Es va allargar la longitud de la diana de la proteasa, de 7 residus, fins a la longitud desitjada mitjançant un petit braç espaciador, dissenyat per afavorir la flexibilitat i solubilitat, contenint residus de glicina (Gly, G) i serina (Ser, S).

Taula 8. Llistat dels zimògens produïts en aquest treball.

A cada zimogen es mostra l'RNasa d'origen i la seqüència aminoacídica *linker* que conté el lloc d'escissió per la HIV-1 PR, detallant-ne la tipologia i longitud.

| Vector/Zimogen | RNasa | Seqüència <i>linker</i> ^a | Tipologia | Longitud |
|--|-------|--|-----------|----------|
| pONCYP/ ONCYP | ONC | SC ₁₀₄ GSGSQNY*PIVQSAGS ₁ D | YP | 14 |
| pONCYPG1/ ONCYPG1 | ONC | SC ₁₀₄ GSGG S QNY*PIVQSAGS ₁ D | YP | 15 |
| pONCYPG2/ ONCYPG2 | ONC | SC ₁₀₄ GSGSQNY*PIVQ G SAGS ₁ D | YP | 15 |
| pONCYPGG/ ONCYPGG | ONC | SC ₁₀₄ GSGG S QNY*PIVQ G SAGS ₁ D | YP | 16 |
| pONCFL/ ONCFL | ONC | SC ₁₀₄ GSGSGIF*LETSLSAGS ₁ D | FL | 15 |
| pONCFLG/ ONCFLG | ONC | SC ₁₀₄ GSGG S GIF*LETSLSAGS ₁ D | FL | 16 |
| pONCFL2C15/ ONCFL2-C15 | ONC | SC ₁₀₄ GSG I F*LETSGIF*LET S ₁ D | FL2 | 15 |
| pONCFL2C16/ ONCFL2-C16 | ONC | SC ₁₀₄ GSG I F*LETSGIF*LET G ₁ D | FL2 | 16 |
| p6His-HGNYP/ HGNYP | PM5 | AS ₁₂₃ GSGSQNY*PIVQSAGK ₁ E | YP | 14 |
| p6His-HGNFL/ HGNFL | PM5 | AS ₁₂₃ GSGSGIF*LETSLSAGK ₁ E | FL | 15 |
| p6His-HGNFL2/ HGNFL2 | PM5 | AS ₁₂₃ GSG I F*LETSGIF*LET G K ₁ E | FL2 | 16 |
| p6His-HGNFL-R31ER91D / HGNFL-R31ER91D | PM5 | AS ₁₂₃ GSGSGIF*LETSLSAGK ₁ E | FL | 15 |

^a Els residus corresponents als extrems carboxil i amino d'ONC o de PM5 estan indicats en negreta i numerats (segons la numeració de la proteïna salvatge respectiva). La seqüència de reconeixement per part de la proteasa HIV-1 PR es troba subratllada. Els residus separats per un asterisc corresponen als residus P1 i P1' i flanquegen l'enllaç peptídic d'escissió per la proteasa. Els residus espaciadors de Gly per allargar la seqüència *linker* estan remarcats en vermell. A la Taula 9 es llisten els oligos formadors dels *cassettes* de cada seqüència.

Posició dels extrems N- i C- terminals de nova creació. Seguidament, va ser necessari escollir la posició dels extrems N- i C- terminals no nadius dels zimògens. Els residus seleccionats van ser Ser72/Arg73, en el cas de l'ONC, i Asn88/Gly89, per a l'HP-RNasa (Figura 19). Aquestes posicions van ser elegides perquè són les homòlogues a les que van permetre l'obtenció del zimogen més efectiu de la RNasa A a l'estudi de Plankum i col·laboradors [360]. Posteriorment, es van generar els models estructurals dels zimògens desitjats tant basats en l'ONC com en l'HP-RNasa.

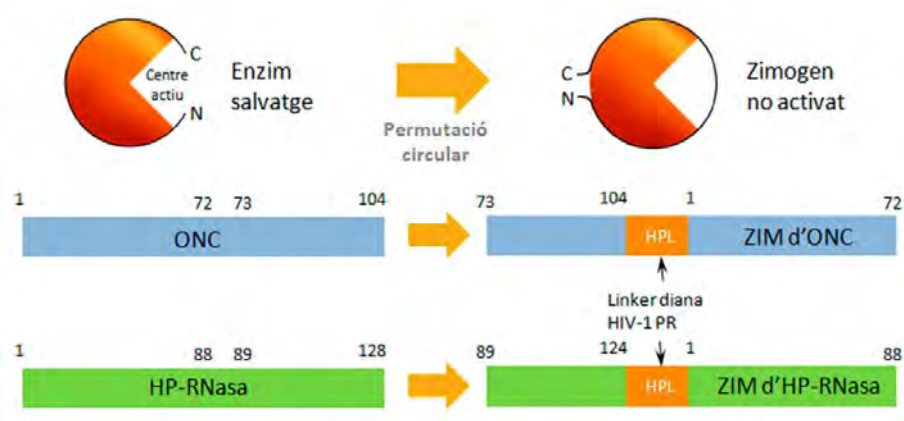


Figura 19. Esquema de les construccions base a obtenir mitjançant el procés de permutació circular.

Model estructural dels zimògens d'ONC. Per tal d'ajudar en el disseny de les variants amb permutació circular de zimògens d'ONC, es van crear models estructurals modificant les coordenades atòmiques de la proteïna salvatge. Per a la obtenció dels models estructurals dels zimògens basats en l'ONC, per una banda es va treballar amb el fitxer de les coordenades atòmiques d'ONC salvatge, extret del Banc de Dades de Proteïnes (Protein Data Bank (PDB)) (codi *pdb* d'accés 1ONC) [93]. Es va introduir al fitxer *pdb* una mutació Gln1Ser *in silico* utilitzant el Swiss-Pdb Viewer, creant un nou fitxer *pdb*. Llavors, utilitzant un processador de textos, les coordenades atòmiques des de Arg73 fins a Cys104 es van retallar i enganjar just abans de les coordenades atòmiques restants (des de la Ser1 fins la Ser72) creant un nou fitxer *pdb*, que serà utilitzat com a plantilla de l'estructura. Paral·lelament, a partir de la seqüència en format *fasta* d'ONC es va realitzar el mateix procés de modelat, afegint les diferents seqüències *linker* proposades en format *fasta* entre els residus Cys104 i Ser1, obtenint així l'estructura primària desitjada per les diferents variants de zimògens d'ONC, amb els nous extrems peptídics en els residus Arg73 i Ser72 de la proteïna salvatge i la seqüència connectora unint els terminals N- i C- originals. Mitjançant el programa *Swiss-Pdb Viewer* es va poder fer un alineament manual entre l'esborrany de la seqüència de cada zimogen en format *fasta* i el fitxer *pdb* plantilla de la proteïna salvatge (1ONC) amb les coordenades atòmiques arranjades. A continuació, es va sol·licitar el model d'estructura mitjançant el *SWISS-MODEL*, un servidor automàtic de modelatge per homologia. Finalment, el model s'optimitzà minimitzant l'energia en 3000 passos amb l'aplicació *GROMOS 96* del *Swiss-Pdb Viewer* [385]. Pel desenvolupament

de les variants de zimògens d'ONC es van considerar només els models que no eren distorsionats i que no mostraren energia positiva global després de la minimització d'energia.

Model estructural dels zimògens d'HP-RNasa. Per al modelat dels zimògens d'HP-RNasa, es va obtenir el fitxer *pdb* d'una variant d'HP-RNasa del banc de dades (codi *pdb* 1DZA), anomenada PM7 [172]. Es va escollir aquesta estructura degut a la seva similitud (tan sols presenta la substitució extra Pro50Ser) respecte PM5 [203], l'HP-RNasa seleccionada com a base pels zimògens per la seva major estabilitat i facilitat de producció. Com s'ha explicat a la introducció, PM5 presenta 5 mutacions a l'extrem N-terminal respecte l'HP-RNasa salvatge: R4A, K6A, Q9E, D16G, S17N (*Figura 9*). Seguint el procediment anterior, en el fitxer *pdb* primerament s'introduí una mutació *in silico* Ser50Pro, i seguidament, es feu deleció dels 5 aminoàcids C-terminals –VEDST, obtenint així la seqüència d'una proteïna de 123 residus. Els nous extrems es van situar en els residus Asn88/Gly89, retallant les coordenades atòmiques des de Gly89 fins a Ser123 i enganxant-les a l'inici de la resta de coordenades atòmiques (des de Lys1 fins a Asn88). Igual que en el cas de l'ONC, a partir de la seqüència *fasta* de la proteïna base es va realitzar el mateix procés de modelat, i per a cada un dels zimògens, afegint les diferents seqüències connectores proposades en format *fasta* entre els residus Ser123 i Lys1. Una vegada obtinguda l'estructura primària desitjada, amb els nous N- i C- terminals als residus Gly89 i Asn88 de la proteïna salvatge i la seqüència *linker* unint els terminals originals (tenint en compte la deleció a partir del residu 124), igual que en el cas anterior, es va utilitzar el fitxer *pdb* de la proteïna parental (1DZA) com a plantilla. Es va fer un alineament manual entre la nova seqüència i la plantilla per, finalment, sol·licitar el model estructural, optimitzar-lo minimitzant-ne l'energia i seleccionar els zimògens que complien els requeriments.

4.3.2.2. Construcció dels vectors d'expressió dels zimògens de ribonucleases

Per a l'obtenció de les construccions a nivell de DNA dels zimògens d'ONC i HP-RNasa es van crear, mitjançant permutació circular, seguint l'estratègia de Plainkum i col·laboradors [360], els extrems N- i C- terminals no natiu Ser72/Arg73 i Asn88/Gly89, a l'ONC i l'HP-RNasa, respectivament (*Figura 19*). Els fragments així amplificats es van clonar en vectors de la sèrie pET per a la seva expressió. Tots els oligonucleòtids emprats en les construccions d'aquest treball es llisten a la *Taula 9*. La validesa de totes les construccions es va comprovar per seqüenciació d'àcids nucleics als Serveis Tècnics de Recerca de la Universitat de Girona.

A) Construcció de les variants i zimògens d'ONC.

Tots els plasmidis que dirigeixen la producció de les variants i dels zimògens d'ONC es van construir sobre pONC [107], derivat de pET22b(+) que permet l'expressió, sota el control de T7, del gen codificant per l'ONC.

Variant ONCQ1S. Es va construir el mutant ONCQ1S com a control, reemplaçant el residu Gln1 per un residu de Ser. Per a la construcció del vector d'expressió pONCQ1S, es va amplificar el gen codificant per l'ONC amb els oligos detallats a la *Taula 9*, OncSer1, que introdueix la diana *MluNI* (subratllada a la seqüència de l'oligo) i la substitució Q1S (en negreta a l'oligo), i el terminador de T7. El producte de PCR va ser purificat i digerit amb els enzims de restricció *MluNI* i *Sall*. Posteriorment s'inserí el producte obtingut en el vector pET22 b(+) (Novagen, Madison, WI, EUA).

Zimògens d'ONC. Els vectors que permeten produir els zimògens d'ONC es van construir mitjançant permutació circular, com es mostra a la *Figura 20*. A nivell general consisteix en obtenir un vector amb els gens duplicats, inserir el connector enmig dels dos gens i realitzar l'amplificació a partir dels punts que es desitgen com a extrems no-natius.

Duplicació dels gens. Primerament, per a la obtenció del vector amb els gens duplicats (ONC-ONC), s'utilitzaren els oligos Promotor de T7 i oncPM51 (*Taula 9*) per amplificar la primera còpia d'ONC de pONC, treure el codó d'*stop* i inserir una diana per a *BamHI* (subratllada a l'oligo) després del codó que codifica per a la Cys104 (en cursiva a l'oligo). El producte de l'amplificació es va digerir amb els enzims de restricció *NdeI* i *BamHI* i es va subclonar el fragment resultant al vector pET22b(+), obtenint el vector pONC_BamHI. La segona còpia del gen ONC es va amplificar també a partir de pONC, utilitzant els oligos PM5onc2 i el T7Term (detallats a la *Taula 9*), inserint una diana per *EclXI* (subratllada a l'oligo) i substituint Gln1 per Ser (en negreta a l'oligo). El producte d'amplificació es va purificar i digerir amb les endonucleases de restricció *EclXI* i *Sall*, i es va inserir i lligar al vector pONC_BamHI digerit amb *EclXI* i *XhoI*, obtenint el vector pBONC amb els gens duplicats.

Inserció dels linkers. Es llisten a la *Taula 9* els diferents oligos utilitzats per a la construcció dels *cassettes* de DNA codificants per les diferents seqüències aminoacídiques, d'unió dels amino i carboxil terminals natius i de reconeixement-hidròlisi per part de la proteasa HIV-1 PR. Per a la construcció dels *cassettes* es van barrejar els oligos corresponents a una relació equimolar, s'escalfaren fins a 90 °C i es deixaren refredar fins a 25 °C en 30 min. Per a la inserció dels diferents fragments de DNA enmig dels dos gens ONC-ONC del vector pBONC s'utilitzaren les dianes *BamHI* i *EclXI*. Els plasmidis que contenien les dues còpies del gen de l'ONC disposats en tàndem i connectats pels *linkers* es van anomenar pBONCYP, pBONCYPG1, pBONCYPG2, pBONCYPGG, pBONCFL, pBONCFLG, pBONCFL2-C15 i pBONCFL2-C16.

Creació dels extrems no-natius. Els zimògens o onconases permutades que presenten els nous terminals no natius Arg73/Ser72 (respecte la salvatge), amb les diferents seqüències connectores, es van crear mitjançant PCR a partir dels vectors mencionats al paràgraf anterior com a motlle i amplificant amb els oligos denominats ONCS72G735 (a partir de la posició 73 del primer gen) i ONCS72G733 (a partir de la posició 72 del segon gen), detallats a la *Taula 9*,

que contenen les dianes *NdeI* i *Sall* (subratllades als oligos), respectivament (Figura 20). El producte de PCR es va purificar i digerir amb les endonucleases anteriorment esmentades i es va lligar al vector pET22b(+) digerit amb els mateixos enzims de restricció. Es van obtenir finalment els vectors d'expressió pONCYP, pONCYPG1, pONCYPG2, pONCYPGG, pONCFL, pONCFLG, pONCFL2-C15 i pONCFL2-C16, que són els que permetran l'obtenció dels diferents zimògens d'ONC.

Variant de zimogen ONCFLG-S120C. La variant ONCFLG-S120C va ser dissenyada per a estudiar la internalització del zimogen després de conjuguar-lo amb *Alexa Fluor® 488 C5 maleimide* (Molecular Probes Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). El plasmidi utilitzat per expressar aquesta variant va ser construït mitjançant mutació dirigida per *QuikChange™* a partir del vector pONCFLG com a motlle. Així, es van utilitzar els oligonucleòtids 5FLGCys i 3FLGCys per a substituir la Ser C-terminal d'ONCFLG per Cys (en negreta als oligos, junt amb el codó de finalització o *stop*, en cursiva).

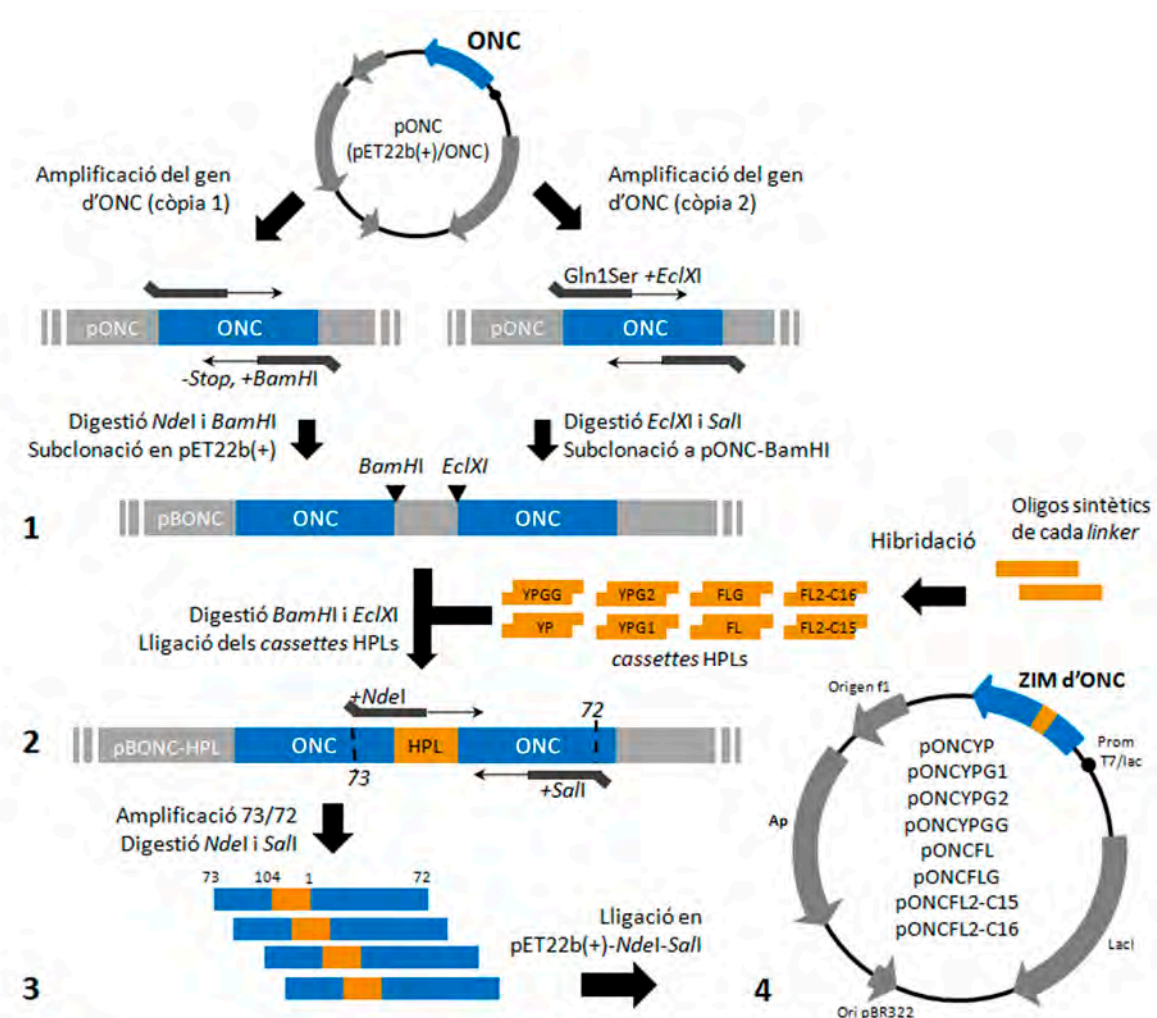


Figura 20. Esquema del procés de construcció dels vectors d'expressió dels zimògens d'ONC.

1. A partir del vector pONC, duplicació dels dos gens d'ONC. 2. Els *linkers* de reconeixement per la proteasa HIV-1 PR (HPLs) de diferents tipologies es clonen enmig dels dos gens duplicats d'ONC. 3. Els extrems no-natius de la construcció permutada es situen a Arg73/Ser72 mitjançant una amplificació. 4. S'obté el vector d'expressió dels diferents zimògens d'ONC.

B) Construcció dels zimògens d'HP-RNasa.

Construcció dels zimògens. La construcció de les variants i zimògens d'HP-RNasa es va dur a terme de manera similar que per les variants d'ONC, mitjançant permutació circular. Tots els plasmidis que dirigeixen la producció de les variants i dels zimògens d'HP-RNasa es van construir a partir del vector pPM5, obtingut prèviament al nostre grup de recerca [173]. S'esquematitza el procés de construcció dels zimògens d'HP-RNasa a la *Figura 21*.

Duplicació dels gens. Per a la obtenció del vector amb els gens duplicats (PM5-PM5), s'utilitzaren els oligos Promotor de T7 i PM5onc1 (*Taula 9*) per amplificar la primera còpia de PM5 de pPM5, treure el codó *stop* i inserir una diana per a *BamHI* (subratllada a l'oligo). El producte de l'amplificació es va digerir amb els enzims de restricció *NdeI* i *BamHI* i es va subclonar el fragment resultant al vector pET22b(+), obtenint el vector pPM5_BamHI. La segona còpia del gen de PM5 es va amplificar també a partir de pPM5, utilitzant els oligos oncPM52 i oncPM53, introduint les dianes *EclXI* i *Sall*, respectivament (subratllades als oligos, *Taula 9*). El segon oligo, a més, afegia també un codó de finalització de la traducció (remarcats en cursiva). El resultat de l'amplificació es digerí amb els enzims de restricció esmentats, i es subclonà el fragment obtingut al vector pPM5_BamHI prèviament digerit amb *EclXI* i *XhoI*. S'obtingué el vector pPM5PM5, en el qual trobem els gens duplicats de l'HP-RNasa PM5 localitzats consecutivament, amb la diana *BamHI* al final del primer dels gens i la diana *EclXI* a l'inici de la segona còpia del gen.

Obtenció del vector base pels zimògens. Es digerí el vector pPM5PM5 amb les dianes *BamHI* i *EclXI*, i es va clonar enmig dels dos gens duplicats el *cassette* YP (oligos detallats a la *Taula 9*), obtenint el vector pPM5PM5-HPL. S'obtingué la construcció base d'HP-RNasa permutada amb el primer dels *linkers* i amb els extrems no nadius a Gly89/Asn88 (respecte a l'HP-RNasa), mitjançant PCR a partir del plasmidi anterior i amplificant amb els oligos HG89N88_5 i HG89N88_3, que introdueixen les dianes *NdeI* i *Sall* (subratllades als oligos) respectivament. El producte de l'amplificació es va purificar i digerir amb els enzims de restricció *NdeI* i *Sall* i es subclonà en pET22b(+) obtenint el vector pHGN-HPL.

Obtenció dels zimògens HGNs (del124). Es realitzà una digestió del vector pHGN-HPL amb *Sall* i *XhoI* (que rendeixen extrems cohesius que podran unir-se) per tal d'eliminar la diana *EclXI* (*EagI*) present a pET22b(+), ja que és l'enzim de restricció que s'utilitzarà per a dur a terme les mutacions en *cassette* de les seqüències *linker*. S'obtingué així el nou vector pHGNHPL-XS. Sobre aquest vector es va fer mutació dirigida per *QuikChangeTM* tal i com indica el fabricant, amb els oligos del1245 i del1243 (*Taula 9*) per tal d'eliminar els residus C-terminals originals de l'HP-RNasa salvatge -VEDST, reduint la construcció de 128 a 123 residus. S'obtingué d'aquesta manera el vector d'expressió pHGNYP, del primer dels zimògens HGNs. Per construir les

diferents variants de zimògens d'HP-RNasa permutats, amb les diverses dianes de la proteasa HIV-1 PR (*Taula 8*), es va digerir el vector pHGNYP amb els enzims de restricció *Bam*HI i *Ecl*XI, i s'hi relligaren els *cassettes* FL i FL2, respectivament (oligos detallats a la *Taula 9*). Els vectors s'anomenaren, respectivament, pHGNFL i pHGNFL2.

Obtenció de les variants 6His-HGNs. Amb la intenció d'optimitzar la purificació dels zimògens d'HP-RNasa, i per tal d'afegir-los a l'N-terminal una cua de 6 histidines, es va amplificar els diferents zimògens a partir dels vectors pHGNYP, pHGNFL, i pHGNFL2, utilitzant els oligonucleòtids T7Prom i 3HGN-*Eco*RI, que alhora afegia una diana *Eco*RI al final del gen amplificat (subratllada a l'oligo, *Taula 9*). El producte d'amplificació de cada una de les variants es va digerir amb els enzims de restricció *Nde*I i *Eco*RI i es va clonar al vector pET28c(+) prèviament digerit amb els mateixos enzims. S'obtingueren els vectors codificants pels zimògens amb cua d'histidines, que permeteren la seva expressió, anomenats p6His-HGNYP, p6His-HGNFL i p6His-HGNFL2, expressant respectivament els zimògens HGNYP, HGNFL i HGNFL2.

Construcció del mutant HGNFL-R31E91D. Per a l'obtenció del mutant HGNFL-R31E91D es van realitzar dos *QuikChange*TM successius a partir del vector p6His-HGNFL. S'utilitzaren els oligonucleòtids R31E_1 i R31E_2 per a mutar l'Arg31 per un Glutàmic (triplet remarcat en negreta als oligos); i HGN_R91D_5 i HGN_R91D_3 per a canviar l'Arg91 per un Aspàrtic (codó remarcat en negreta als oligos) (*Taula 9*).

4.3.2.3. Producció i purificació dels zimògens de ribonucleases

La producció i purificació dels zimògens d'ONC i d'HP-RNasa es realitzà seguint protocols descrits prèviament al nostre laboratori, incorporant algunes modificacions. A la *Figura 22* s'il·lustra un esquema general del procés de purificació dels zimògens. La puresa i homogeneïtat de les proteïnes es va confirmar per SDS-PAGE. Les masses moleculars dels zimògens i variants d'ONC i HP-RNasa (PM5) i les respectives proteïnes salvatges es van confirmar per espectrometria de masses MALDI-TOF amb l'equip Ultraflex-TOF de Bruker Daltonics, dels Serveis Tècnics de Recerca del Parc Científic i Tecnològic de la Universitat de Girona. La concentració de cada variant era determinada mitjançant l'assaig Bradford [370] o bé per espectroscòpia UV, com es detalla a l'apartat 4.2.4.3. *Determinació de la Quantitat de Proteïna* de Metodologia.

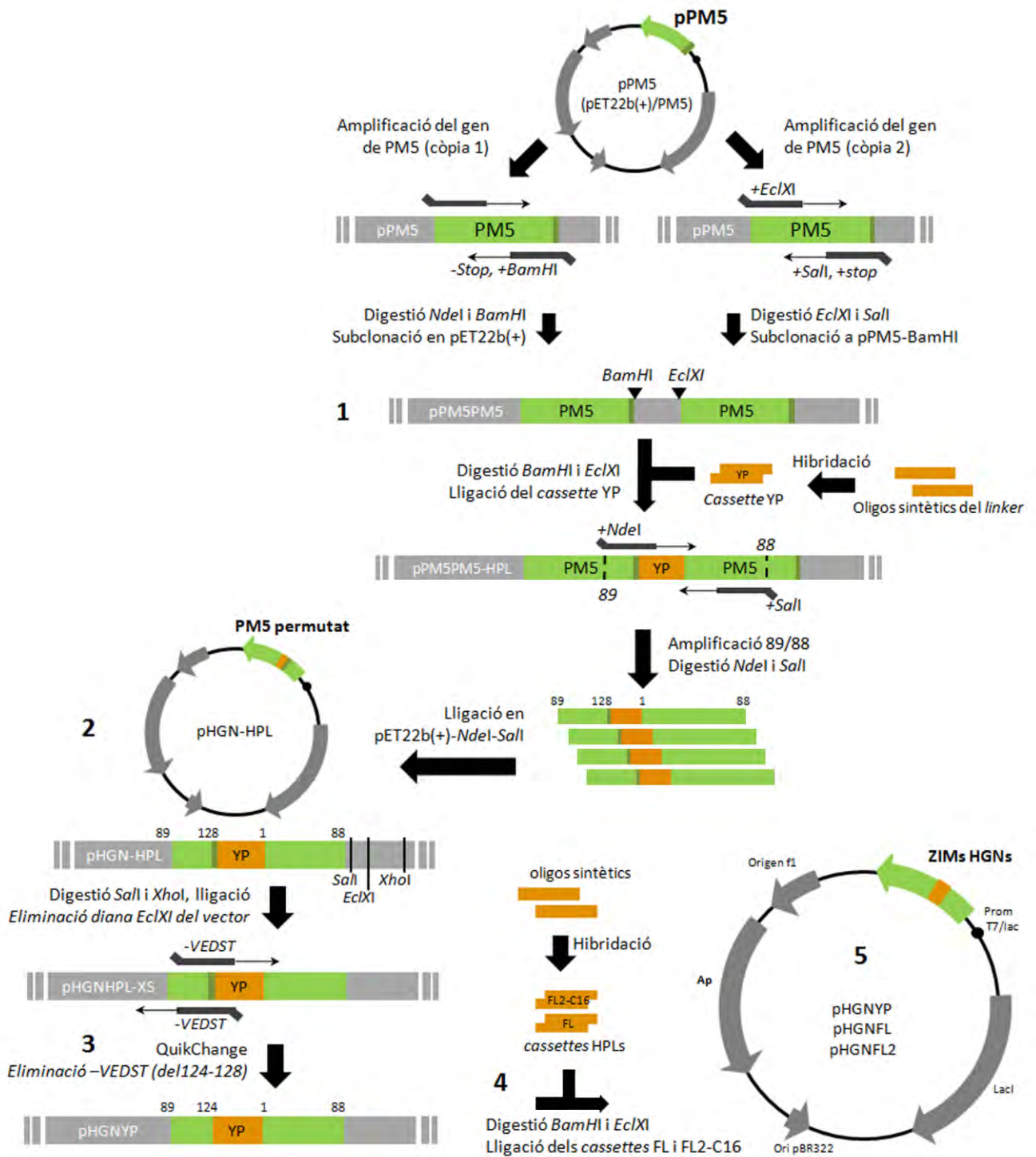


Figura 21. Esquema del procés de construcció dels vectors d'expressió dels zimògens HGNs.

1. A partir del vector pPM5, duplicació dels gens. **2.** Els extrems no-natius de la construcció permutada es situen a Gly89/Asn88 mitjançant una amplificació, per permutació circular. **3.** Es realitza una deleció dels residus 124-128 (-VEDST) del C-terminal de l'HP-RNasa. **4.** Es clonen els linkers connectors (HPLs) de diferents tipologies. **5.** S'obté el vector d'expressió dels diferents zimògens de la variant PM5.

Taula 9. Oligonucleòtids utilitzats en la construcció dels vectors d'expressió de les proteïnes d'aquest treball.

Es detalla el motiu de la seva utilització i el vector motlle en el qual s'han utilitzat, així com la seqüència peptídica dels *linkers* formada pels oligos utilitzats com a *cassettes*.

| Utilització dels oligos ^a | Vector motlle | Nom de l'oligo ^b | Seqüència de l'oligonucleòtid ^{ab} |
|--|----------------------|-----------------------------|---|
| Amplificació gen de la proteasa | pSK616 | 5HIVP_ <i>NdeI</i> | 5'-ccccccccc <u>catatggga</u> actgtatccttt-3' |
| | | 3HIVP_ <i>Sall</i> | 5'-ccccccctg <u>cgact</u> aaaaatttaaagtgc-3' |
| Mutació dirigida Q15 per construir ONC-Q15 | pONC | OncSer1(<i>MluNI</i>) | 5'-gccagccggcgtatggcagcactgctgctgac-3' |
| | | T7 Term (<i>Sall</i>) | 5'-gctagttattgctcagcg-3' |
| Amplificació de ONC (1a còpia duplicats) | pONC | T7 Prom (<i>NdeI</i>) | 5'-taatacactcactataggg-3' |
| | | oncPM51(<i>BamHI</i>) | 5'-cccccccccc <u>ggatcc</u> gcaagaaccaaccaac-3' |
| Amplificació de ONC (Q15) (2a còpia duplicats) | pONC | PM5onc2(<i>EclXI</i>) | 5'-cccccccccc <u>ggcgcgctccg</u> actgctgactttcc-3' |
| | | T7 Term (<i>Sall</i>) | 5'-gctagttattgctcagcg-3' |
| Permutació circular ZIM-ONC Extrems no-natiu Ser72/Arg73 | pBONCs | ONCS72G735 (<i>NdeI</i>) | 5'-ctgactgcaactgcatatgctgctgcaaatc-3' |
| | | ONCS72G733 (<i>Sall</i>) | 5'-cagttgtatttgcgactaagaagtaactgtgc-3' |
| Mutació dirigida S120C per construir ONCFLG-S120C | pONCFLG | 5FLGCys | 5'-tctgactgcaactgactgctagctgagcaccacc-3' |
| | | 3FLGCys | 5'-ggtggtgctcactgactgcaagtaactgctcagcaga-3' |
| Amplificació de PM5 (1a còpia duplicats) | pPM5 | T7 Prom (<i>NdeI</i>) | 5'-taatacactcactataggg-3' |
| | | PM5onc1 (<i>BamHI</i>) | 5'-cccccccccc <u>ggatcc</u> gactagaacttcaacgc-3' |
| Amplificació de PM5 (2a còpia duplicats) | pPM5 | oncPM52 (<i>EclXI</i>) | 5'-cccccccccc <u>ggcgcgctccg</u> actgctgactttcc-3' |
| | | oncPM53 (<i>Sall</i>) | 5'-cccccccccc <u>gtcgact</u> agtgcaacttcaacgc-3' |
| Permutació circular ZIM-HGNs Extrems no-natiu Asn88/Gly89 | pPM5PM5-HPL | HG89N88_5 (<i>NdeI</i>) | 5'-cccccccccc <u>catatgggtt</u> ctagatccct-3' |
| | | HG89N88_3 (<i>Sall</i>) | 5'-ccccccctg <u>cgact</u> taattagctcagctac-3' |
| Mutació dirigida <i>del124</i> Eliminació –VEDST C-terminals | pHGN-HPLXS | <i>del1245</i> | 5'-gttcattttgatgctagcgttgatccggttctcagaac-3' |
| | | <i>del1243</i> | 5'-gttctgagaaccgactcaacgctagcatcaaatgaac-3' |
| Amplificació zimògens <i>HGNs</i> per clonar en pET28 (cua 6His) | pHGNY pHGNFL pHGNFL2 | T7 Prom (<i>NdeI</i>) | 5'-taatacactcactataggg-3' |
| | | 3HGN- <i>EcoRI</i> | 5'-ggtggtggtggtggtggaattctaattagctcagctac-3' |
| Mutació dirigida R31E per construir HGFL-R31ER91D | pHGFL | R31E_1 | 5'-ctgtaatacaatgatggagcgcgcaaatatgactcaag-3' |
| | | R31E_2 | 5'-cttgagctatattcggcgctccatcattgattacag-3' |
| Mutació dirigida R91D per construir HGFL-R31ER91D | pHGFLR31E | HGN_R91D_5 | 5'-gcagccataggggttctgattaccctaattgtgc-3' |
| | | HGN_R91D_3 | 5'-gcacaattagggtaactcagaaccatagggctgc-3' |
| Seqüència aminoàcida <i>linker</i> ^c | Nom <i>linker</i> | Nom de l'oligo | Seqüència oligonucleòtid formador del <i>cassette</i> |
| GSGSQNY*PIVQSAG | YP | YP_5 | 5'-gatccggttctcagaactaccgatcgttcagtc-3' |
| | | YP_3 | 5'-ggccgactgaacgatcgggtagttctgagaaccg-3' |
| GSGGSQNY*PIVQSAG | YPG1 | YPG1_5 | 5'-gatccggtggttccagaactaccgatcgttcagtc-3' |
| | | YPG1_3 | 5'-ggccgactgaacgatcgggtagttctggaaccaccg-3' |
| GSGSQNY*PIVQGSAG | YPG2 | YPG2_5 | 5'-gatccggttccagaactaccgatcgttcagggttc-3' |
| | | YPG2_3 | 5'-ggcgaaccctgaacgatcgggtagttctggaaccg-3' |
| GSGGSQNY*PIVQGSAG | YPGG | YPGG_5 | 5'-gatccggtggttccagaactaccgatcgttcagggttc-3' |
| | | YPGG_3 | 5'-ggcgaaccctgaacgatcgggtagttctggaaccaccg-3' |
| GSGSGIF*LETSLSAG | FL | FL_5 | 5'-gatccggttccggtatcttctgaaacctccctgctc-3' |
| | | FL_3 | 5'-ggccgacagggaggttccaggaagataccggaaccg-3' |
| GSGGSIF*LETSLSAG | FLG | FLG_5 | 5'-gatccggtggttccggtatcttctgaaacctccctgctc-3' |
| | | FLG_3 | 5'-ggccgacagggaggttccaggaagataccggaaccaccg-3' |
| GSGIF*LETSGIF*LET | FL2-C15 | FL2C15_5 | 5'-gatccggtatcttctgaaacctccggtatcttctgaaacc-3' |
| | | FL2C15_3 | 5'-ggttccaggaagataccgaggttccaggaagataccggatc-3' |
| GSGIF*LETSGIF*LETG | FL2-C16 | FL2C16_5 | 5'-gatccggtatcttctgaaacctccggtatcttctgaaaccgg-3' |
| | | FL2C16_3 | 5'-accggttccaggaagataccgaggttccaggaagataccggatc-3' |

^a Les mutacions puntals introduïdes es detallen a la utilització dels oligos i es remarquen en negreta a la seqüència de l'oligo corresponent.

^b Les dianes de restricció introduïdes es detallen al nom de l'oligo i es remarquen subratllades a la seqüència.

^c La seqüència diana de la proteasa HIV-1 PR es troba subratllada, on l'asterisc * indica el punt concret de tall. En negreta es ressalten els residus de glicina utilitzats com a espaiadors per tal d'elongar les seqüències *linker*.

A) Producció i purificació dels zimògens d'ONC, ONC i ONCQ1S.

Els zimògens d'ONC, la proteïna salvatge ONC i el mutant ONCQ1S, van ser produïts i purificats segons el protocol descrit prèviament per a l'ONC salvatge [104], incorporant algunes modificacions. S'obtingué en tots els casos un rendiment de 30-40 mg per litre de cultiu.

Breument, es transformaren cèl·lules BL21(DE3) [368] amb el vector d'expressió corresponent i s'incubaren en medi LB (*lysogeny broth*) suplementat amb 100 µg/ml ampil·lina, fins a obtenir una DO_{550} de 1.5-2.0. L'expressió heteròloga de la proteïna s'induí amb IPTG a 1 mM. Després de 3-4 hores, les cèl·lules del cultiu es recolliren per centrifugació a 7500xg durant 7 min, i es resuspengueren en el tampó 50 mM Tris-acetat, pH 8, 10 mM àcid etilendiaminatetraacètic (EDTA) (15 ml per litre de cultiu). Es lisà el cultiu mitjançant French-Press a 1100 psi, i es recolliren els cossos d'inclusió per centrifugació a 12000xg durant 45 min a 4 °C. Els pellets es van resuspendre en 5 ml per litre de cultiu del *tampó de solubilització* 6 M clorur de guanidini (Gdn-HCl), 2 mM EDTA, 100 mM Tris-acetat, pH 8.5. Les mostres es reduïren afegint glutatió reduït (GSH^{red}) a una concentració final de 0.1 M, ajustant el pH a 8.5 amb Tris sòlid i incubant a temperatura ambient durant 2 hores en una atmosfera de nitrogen, per tal de reduir i solubilitzar la proteïna. Posteriorment s'eliminà el material insoluble per centrifugació a 12000xg durant 30 min a 4 °C, i les proteïnes reduïdes i solubilitzades es diluïren gota a gota (unes 100 vegades), fins a una concentració final de 50-100 µg/ml, en *Solució de Replegament* 0.5 M L-arginina, 1 mM glutatió oxidat ($GSSG^{ox}$), 2 mM EDTA, 100 mM Tris-acetat, pH 8.5 (1 L per litre de cultiu). Es deixaren les proteïnes incubant a 4 °C mínim unes 48 hores. Per tal d'aturar la reoxidació, el pH es va ajustar a 5.0 amb àcid acètic. Les mostres replegades es van concentrar per ultrafiltració tangencial utilitzant un cartutx Prep/scale TFF (Millipore, Bedford, EUA). Una vegada les proteïnes es trobaven correctament replegades i concentrades, es dialitzaren contra el tampó 50 mM Tris-acetat, pH 8.0, a 4 °C. Finalment, després de descartar el material insoluble per centrifugació a 12000xg durant 30 min a 4 °C, eren cromatografiades a través d'una columna Mono-STMHR 5/5 FPLC (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) amb el mateix tampó i eluïdes a través d'un gradient lineal de 0-150 mM NaCl en 15 min, eluint aproximadament a 80 mM NaCl. Les fraccions que contenien les proteïnes d'interès van ser dialitzades enfront aigua mil·liQ, liofilitzades i emmagatzemades a -20 °C.

L'ONC salvatge va ser, a més, i de forma posterior a la concentració, dialitzada enfront la *solució d'activació* 200 mM fosfat potàssic dibàsic (K_2HPO_4), pH 7.2, 10 mM EDTA, durant 72 hores a temperatura ambient, per tal de permetre la ciclació de la glutamina N-terminal a àcid piroglutàmic [386], canvi imprescindible per a l'activitat i citotoxicitat de l'enzim [93, 96, 102, 113]. Com en el cas anterior, el material precipitat insoluble s'eliminà per centrifugació, i les mostres correctament replegades foren cromatografiades, eluint a través d'un gradient lineal de 0-150 mM NaCl en 30 min en solució d'activació.

Producció del zimogen ONCFLG marcat amb $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ o ^{15}N . Pel treball de resolució estructural per ressonància magnètica nuclear (NMR), va caldre obtenir el zimogen ONCFLG marcat amb els isòtops $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ o solament amb ^{15}N . En la producció d'aquest zimogen marcat es va seguir el procediment descrit en el punt previ, substituint el medi de creixement habitual per medi mínim M9 (Cambridge Isotope Labs) suplementat amb $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 1 g/l com a única font de nitrogen (en el cas de marcatges amb ^{15}N), o suplementat amb $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 1 g/l i $^{13}\text{C}_6$ -glucosa com a única font de nitrogen i carboni, respectivament (en el cas de marcatges amb ^{13}C i ^{15}N).

B) Producció i purificació dels zimògens d'HP-RNasa HGNs i PM5.

La producció dels zimògens HGNs i de la variant parental PM5 es va dur a terme seguint el protocol descrit prèviament per a l'HP-RNasa [173, 215]. S'obtingué en tots els casos un rendiment aproximat de 10-15 mg per litre de cultiu.

En termes generals, el protocol optimitzat de purificació de l'HP-RNasa i els zimògens corresponents és similar a l'utilitzat pels zimògens i variants d'ONC, amb algunes modificacions (Figura 22). Així doncs, la transformació amb el vector d'expressió es dugué a terme en cèl·lules Rosetta2TM(DE3), i s'incubaren fins a obtenir una DO_{550} de 1. El procés de resuspensió i reducció dels cossos d'inclusió, i replegament i reoxidació de la proteïna recombinant es duia a terme de forma similar al protocol anterior. Finalment, la cromatografia per HPLC es va realitzar amb tampó Acetat sòdic 50 mM, pH 5.0, en un gradient lineal de 0-1 M NaCl en 30 min, eluint aproximadament a 670 mM NaCl.

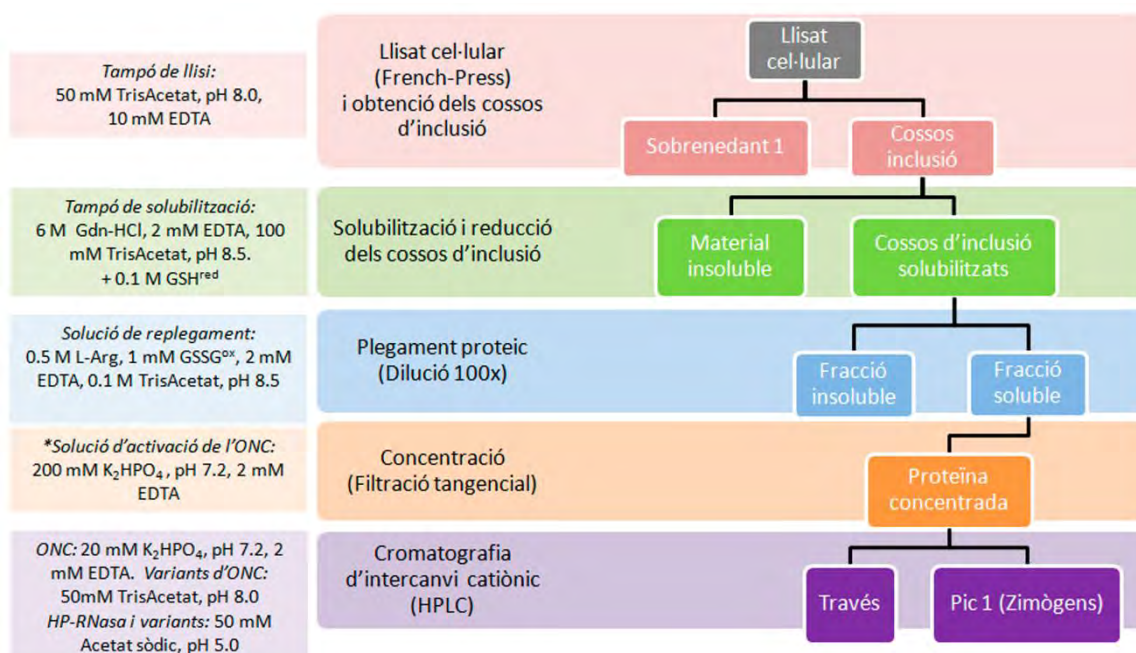


Figura 22. Esquema global del procés de purificació dels zimògens d'ONC i HP-RNasa.

Es parteix del llísat cel·lular del cultiu transformant.* L'activació només es realitzà en el cas de l'ONC, per ciclar la glutamina N-terminal a àcid piroglutàmic, després de la concentració mitjançant la filtració tangencial.

4.3.2.4. Caracterització dels zimògens d'RNasa activables per la proteasa HIV-1 PR

Activació in vitro dels zimògens amb la proteasa SK#1.

L'activació dels diferents zimògens es va assajar barrejant-los amb diferents equivalents molars de proteasa SK#1 (des de 5:1 fins a 100:1 zimogen:proteasa), en *Tampó d'Activació* 100 mM acetat sòdic/àcid acètic, pH 4.7, 300 mM NaCl i 4 mM EDTA. S'incubà la barreja a 37 °C i s'agafaren mostres a diferents temps, aturant l'activació barrejant-la amb el tampó de càrrega de SDS-PAGE (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 100 mM β -mercaptoetanol, 0.2% SDS, 10% glicerol i 0.75 mM Blau de bromofenol) i congelant-les a -20°C fins a analitzar les mostres per electroforesi. Els zimògens d'ONC i d'HP-RNasa presenten una massa molecular aproximada de 13 kDa i 15 kDa, respectivament. Una vegada són activats per part de la proteasa, es fragmenten en dos pèptids d'uns 9 i 4 kDa (ONC) i d'uns 11 i 4 kDa (HP-RNasa), units per ponts disulfur. Duent a terme l'SDS-PAGE en presència de β -mercaptoetanol, els dos pèptids s'han d'observar com a bandes separades, la qual cosa indica que l'activació dels zimògens s'ha dut a terme. Es quantificà la progressió de l'activació al llarg del temps i per a cada un dels zimògens mitjançant densitometria de les bandes obtingudes, utilitzant el quimioluminòmetre Imaging System FluorChem[®] SP (Alpha Innotech, San Leandro, CA, EUA).

Les activacions necessàries per a la caracterització d'aspectes estructurals i funcionals dels zimògens i de les RNases processades que es descriuran a les següents seccions, es van realitzar a una relació zimogen:proteasa de 50:1, i incubant la solució resultant a 37 °C i *overnight* en el cas dels zimògens ONCYP, ONCYPG1, ONCYPG2, ONCYPGG, i HGNYP, HGNFL, HGNFL2, o 5h en el cas de ONCFL i ONCFLG i HGNFL-R31ER91D, considerant-se com les condicions més oportunes en cada cas. Les activacions pels estudis de citotoxicitat dels zimògens, es realitzaren en tampó PBS per evitar l'elevada acidesa del *Tampó d'Activació*, que podria emascarar la citotoxicitat real dels zimògens.

Determinació de l'estabilitat conformacional dels zimògens.

L'estabilitat conformacional d'una proteïna pot determinar-se per diverses tècniques, de les quals en aquest estudi s'ha utilitzat la calorimetria diferencial d'escombrat (DSC), i tècniques d'espectrometria. La DSC permet mesurar el canvi en els nivells energètics d'una mostra a mesura que la seva temperatura augmenta o disminueix, de manera que es poden determinar els paràmetres termodinàmics de les transicions induïdes per temperatura, com és el cas dels processos de desplegament proteic. En la desnaturalització proteica s'estableix un equilibri entre les formes plegada i desplegada. El fet que una proteïna es trobi en estat plegat o desplegat en unes condicions determinades depèn de les contribucions dels components entàlpics i entròpics del sistema ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). El desplegament proteic es produeix quan $T\Delta S$ augmenta suficientment (per exemple, per absorció de calor) com per superar les

interaccions estabilitzadores tals com ponts d'hidrogen i interaccions hidrofòbiques o electrostàtiques. Els experiments de DSC permeten el càlcul dels paràmetres termodinàmics que caracteritzen les biomolècules: ΔH_{cal} (entalpia de desnaturalització), T_m (temperatura mitjana de fusió), ΔC_p (variació de la capacitat calorífica), ΔG (energia lliure de Gibbs) i ΔS (entropia). El valor de T_m és la temperatura on el 50% de les molècules de la proteïna es troben desplegades en equilibri, i és un valor relacionat amb l'estabilitat de la proteïna. Per a les proteïnes ONC, ONCQ1S, ONCFL i ONCFLG, el valor de T_m es va determinar per DSC a la Plataforma de Polimorfisme i Calorimetria dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona, mitjançant un equip VP-DSC de MicroCal (Northampton, MA, EUA). Per les mesures, es van dissoldre les proteïnes en el tampó 0.1 M d'àcid 2-[N-morfolin]etansulfònic-NaOH (MES-NaOH), pH 6.0, a concentracions de 0.15-0.18 mM (determinades per Bradford [370]). La temperatura s'incrementà de 30 a 110 °C, amb una velocitat d'escanejat de 1 °C min⁻¹. La T_m correspon aproximadament al pic de la corba de transició observada als experiments de DSC.

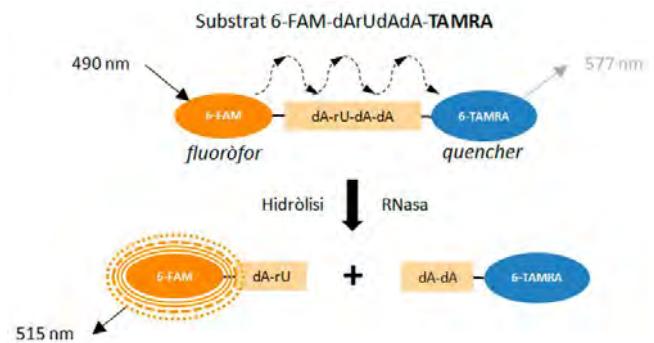
En el cas dels zimògens de PM5, es va seguir el desplegament induït per temperatura mitjançant espectrofotometria UV. Els canvis en l'entorn dels residus aromàtics durant aquest procés de desplegament poden ser monitoritzats mitjançant mesures d'absorbància, permetent la determinació de la T_m . Les corbes de desnaturalització s'ajusten a un model termodinàmic de dos estats, combinat amb funcions lineals ajustades pels estats plegat i desplegat. Quan aquest procés és reversible, l'ajust al model termodinàmic en dos estats permet el càlcul dels paràmetres termodinàmics [387-389]. L'estudi es realitzà a pH 5.0 (50 mM NaAc) i, en el cas del zimogen HGNFL-R31ER91D també a pH 7.55 (50 mM HEPES), tant pel zimogen intacte com per la RNasa activa. Les proteïnes es van dissoldre a una concentració de 0.5 mg/ml en un tampó amb la sal corresponent. La longitud d'ona de seguiment es va seleccionar a partir de l'anàlisi dels espectres d'absorció de les variants *HGNs* a temperatures extremes (12 °C i 60 °C). Es va escollir la longitud d'ona on s'apreciava millor la diferència entre els dos espectres, essent aquesta 278 nm. Mitjançant un espectrofotòmetre Lambda Bio20 (Perkin-Elmer, EUA) equipat amb cel·la termostatitzada, es seguí el desplegament de les proteïnes per mesures d'absorbància, sotmetent-les a un augment gradual de temperatura a intervals de 2 °C, deixant temperar 5 minuts cada vegada, des de 10 °C fins a 60 °C. Una vegada assolida la temperatura màxima, estabilitzada sense mostrar grans variacions d'absorbància, es retornà a l'estat inicial per tal de comprovar la reversibilitat del procés, baixant la temperatura a intervals de 5 °C i deixant temperar durant 10 minuts cada vegada. Les dades s'ajustaren a la corba corresponent a un model termodinàmic en dos estats i es calculà el valor mig de desnaturalització (T_m) tal i com es descriu a la bibliografia [388]. Els resultats es representen com la mitjana \pm error estàndard (SE) de tres determinacions independents.

Estudi de l'activitat ribonucleolítica dels zimògens.

L'activitat ribonucleolítica de les proteïnes estudiades en aquest treball es va mesurar amb el substrat fluorogènic 6-FAM-dArUdAdA-6-TAMRA [390, 391] (Novagen, Madison, WI, EUA), utilitzant un espectrofluorímetre Lambda LS50 (Perkin-Elmer, Waltham, MA, EUA), equipat amb un cel·la termostatitzada. Aquest mètode es basa en la Transferència d'Energia de Fluorescència per Resonància (FRET). El substrat consta d'un tetranucleòtid diana, un fluoròfor (6-carboxifluoresceïna, 6-FAM) i un *quencher* (6-carboxitetrametilrodamina, 6-TAMRA). Al substrat intacte, l'emissió de fluorescència del fluoròfor és apantallada per l'efecte del *quencher*, situat molt proper físicament (es dona una mínima emissió a 577 nm). El tall d'aquest substrat catalitzat per una ribonucleasa es produeix en un únic punt del tetranucleòtid diana, a 3' del ribonucleòtid rU. El trencament resulta en un increment de 200 vegades de la intensitat de fluorescència (excitació a 490 nm, emissió a 515 nm) (Figura 23).

Figura 23. Esquema del funcionament del substrat fluorogènic 6-FAM-dArUdAdA-6-TAMRA.

El substrat emet fluorescència a 515 nm després d'un procés de trencament del tetranucleòtid diana (requadre taronja) per part d'una RNasa, en un únic punt, al costat 3' del ribonucleòtid rU. En taronja, el fluoròfor 6-FAM ($\lambda_{exc/emiss} = 490/515$ nm). En blau, el *quencher* 6-TAMRA.



S'estudià l'activitat enzimàtica abans i després de l'activació de cada un dels zimògens. Els assajos es van fer a 25 °C en 1.5 ml de *Tampó TAMRA* 0.1 M d'àcid 2-[N-morfoline]ethanesulfonic-NaOH (MES-NaOH), pH 6.0, 0.1 M NaCl, amb 50 nM del substrat 6-FAM-dArUdAdA-6-TAMRA i la concentració emprada per a cada proteïna. Les concentracions d'assaig van ser de 15 µM pel cas de l'ONC salvatge i 50 µM pels zimògens d'ONC i ONCQ1S. Per les variants i zimògens d'HP-RNasa, s'utilitzaren les concentracions d'assaig de 0.2 nM per PM5 i de 800, 80 i 8 nM per als zimògens HGNYP, HGNFL i HGNFL-R31ER91D, i HGNFL2, respectivament. Els resultats per a un experiment són la mitjana de quatre determinacions, i els experiments es van fer per triplicat. Ajustant les dades a l'Equació 6 s'obtingueren els valors de k_{cat}/K_M . Els resultats obtinguts s'expressen com a valor mitjà ± desviació estàndard (SD).

Equació 6. Càlcul de k_{cat}/K_M .

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \left(\frac{\Delta F / \Delta t}{F_{m\grave{a}x} - F_0} \right) \times \frac{1}{[E]}$$

On $\Delta F / \Delta t$ representa la velocitat inicial de reacció (el pendent de la recta *Fluorescència* = $a \cdot \text{temps} + b$), F_0 és la fluorescència detectada abans d'afegir la ribonucleasa, $F_{m\grave{a}x}$ és la fluorescència detectada després del trencament complet del substrat, duent-se a terme la digestió mitjançant l'addició en excés de RNasa A, i $[E]$ és la concentració de la ribonucleasa assajada [390, 391].

Internalització dels zimògens en cèl·lules en cultiu.

Per tal de comprovar la internalització dels zimògens d'ONC en cèl·lules *Jurkat*, a partir de pONCFLG i mitjançant mutació dirigida per oligonucleòtid emprant *QuikChangeTM*, es construí el mutant ONCFLG-S120C (Ser72Cys, en la numeració original d'ONC), amb una cisteïna en posició C-terminal i realitzant la producció i purificació del nou zimogen tal com es descriu als apartats *Construcció de les variants i zimògens d'ONC*. i *Producció i purificació dels zimògens d'ONC, ONC i ONCQ15*. S'utilitzà la cisteïna de nova incorporació per a conjuguar-hi el fluoròfor verd *Alexa Fluor[®] 488 C5 maleimide* (Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) seguint el protocol que indica el fabricant.

Breument, es va incubar 100 µM ONCFLG-S120C en tampó PBS amb un excés de DTT a una relació molar de 1:10, durant 1 h en atmosfera de N₂. S'eliminà l'excés de DTT mitjançant una gel-filtració en una columna PD10. S'afegí a la solució de la proteïna un excés 10 vegades major del fluoròfor, de forma immediata. La reacció es deixà incubant durant tota la nit en cambra fosca a 4 °C i s'aturà afegint 1 mM de glutatió reduït. Posteriorment, es realitzà una nova gel-filtració a través d'una columna PD10 per tal d'eliminar l'excés de fluoròfor i de glutatió reduït, s'esterilitzà per filtració i es guardà a -20 °C. La reacció de maleïmida sobre el residu de cisteïna genera un enllaç tioèter que es manté estable en cèl·lules animals.

La internalització de ONCFLG-S120C s'estudià en cèl·lules de la línia *Jurkat*. La línia cel·lular de limfòcits-T humans *Jurkat* s'obtingué d'Eucellbank (Universitat de Barcelona, Barcelona). De forma rutinària, es mantenen fent-les créixer a 37 °C en una atmosfera humida amb 5% CO₂, en medi RPMI GlutaMAX[™]-I (Gibco, Alemanya) suplementat amb 10% sèrum fetal boví (FBS) i 1% (50 U/ml) penicil·lina i estreptomina. Les cèl·lules es mantenen lliures de *Mycoplasma* i es propaguen seguint els protocols estàndards (Veure apartat 4.2.2. *CULTIU DE CÈL·LULES EUCARIOTES* de Metodologia).

El dia anterior a la incubació amb la proteïna, es sembraren cèl·lules *Jurkat* a una densitat de 6000 cèl·lules per pou, en plaques de 6 o 24 pous pretractats amb poli-lisina, per tal d'obtenir aproximadament un 75% de confluència el dia següent. Les cèl·lules es van incubar a diferents temps amb el zimogen marcat amb el fluoròfor a una concentració de 2 µM. Finalment, es realitzà una tinció dels nuclis i les membranes cel·lulars amb els reactius *Hoescht 33342* (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) i *Dil*, respectivament, durant 10 min i posteriorment es rentaren les cèl·lules 3 vegades amb PBS per eliminar l'excés de reactius. Es van captar les imatges d'internalització amb un microscopi confocal d'escanejat làser Leica TCS SP2 AOBS, equipat amb un objectiu d'oli HCX PL APO 63x1.4, al Servei de Microscòpia de la Universitat Autònoma de Barcelona. Les imatges es van adquirir com a imatges de 512 x 512 píxels, i en seccions de 3 x 3 de l'arxiu original reduïdes al 50%, i totes preses el mateix dia utilitzant la mateixa intensitat de làser.

Capacitat dels zimògens d'evadir l'inhibidor de ribonucleases (RI).

Per analitzar el nivell d'interacció de les variants d'RNasa amb l'hRI, es va emprar una variant d'un mètode [392] que es basa en la visualització de la degradació del substrat 16S- i 23S-rRNA d'*E. coli* per acció de les RNases en absència o presència d'hRI, en un gel d'agarosa a l'1.2% (w/v). En aquelles mostres on s'observa degradació del substrat, l'enzim no ha perdut la seva activitat RNasa, i per tant no ha estat inhibit per l'hRI [203].

Per a cada proteïna d'interès, i estudiant tant el zimogen com la forma activada per la proteasa SK#1, es realitzà la reacció en presència i en absència d'hRI, preparant una solució amb 0 o 40 U d'RI (Promega, Madison, EUA) (on una unitat és la quantitat necessària per inhibir l'activitat de 5 ng de RNasa A en un 50%) en *tampó RIB* (20 mM àcid 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetsulfònic (HEPES), 125 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7.0). La quantitat de proteïna emprada en cada reacció va ser de 15 ng per l'ONC salvatge i per les variants i zimògens d'HP-RNasa i de 150 ng pels zimògens d'ONC (degut a la seva menor activitat), en un volum final de 20 µl. Després de temperar la mostra durant 10 min a 25 °C per donar temps a formar el complex RNasa-hRI, s'afegiren 4 µg de substrat 16S-/23S- rRNA (Roche, EUA) a cada tub. Com a control d'integritat del substrat s'utilitzà una mostra en la qual només s'afegí el 16S-/23S- rRNA, sense inhibidor ni RNasa. Com a controls negatiu i positiu s'utilitzaren les proteïnes PE5, variant d'HP-RNasa que és inhibida *in vitro* per l'RI, i ONC, que escapa a RI. Les reaccions de degradació del substrat per part de les RNases s'incubaren durant 10 min a 37 °C en el cas de l'ONC salvatge i els zimògens i variants d'HP-RNasa, o bé durant 4.5 h a 37 °C pels zimògens d'ONC. S'aturaren les reaccions amb 3 µl de *tampó Stop* (40% (w/v) sacarosa, 0.25% (w/v) blau de bromofenol, 0.2% (v/v) dietilpirocarbonat). La degradació del substrat es determinà aplicant les mescleres de reacció a un gel d'agarosa a l'1.2% (w/v), realitzant una tinció amb bromur d'etidi i visualitzant el gel en un transil·luminador de llum UV.

Citotoxicitat dels zimògens en cèl·lules en cultiu.

Amb activació dels zimògens in vitro. És essencial que un bon zimogen no resulti tòxic per les cèl·lules en la seva forma inactiva i, en canvi, ens interessa que la seva forma activa (RNasa) provoqui la mort cel·lular. Així doncs, es va analitzar l'efecte de diferents concentracions de zimògens, no activats i activats *in vitro*, en cèl·lules en cultiu [92].

La citotoxicitat dels zimògens d'ONC i d'HP-RNasa, abans i després de l'activació, comparada amb la de les respectives proteïnes salvatges, es va assajar en la línia cel·lular *Jurkat*, de limfòcits-T, sembrada en plaques de 96 pous a la densitat apropiada (6000 cèl·lules/pou), i crescuda en medi RPMI GlutaMAX™-I suplementat amb un 10% de sèrum boví fetal (FBS) i 1% penicil·lina/estreptomicina. L'activació dels zimògens emprant la proteasa SK#1 per als experiments de citotoxicitat es realitzava amb PBS per evitar l'elevada acidesa del *tampó d'activació*, i se'n comprovava l'eficiència per SDS-PAGE. Després de 24 h de la sembra, les

cèl·lules es van tractar amb diferents concentracions de les proteïnes en 100 µl afegits, des de 0.001 a 10 µM en el cas de l'ONC salvatge i des de 0.1 a 30 µM tant pels zimògens i variants d'ONC com pels d'HP-RNasa. En la caracterització dels zimògens no processats, s'afegia la part proporcional de *tampó d'elució* de la proteasa utilitzada pels activats, per evitar un fals positiu en l'anàlisi de les RNases activades, degut a l'acidesa i l'elevat contingut en glicerol de la solució. Finalment, en els controls s'afegia solament 100 µl de medi de cultiu. Després de 3 dies incubant a 37 °C en una atmosfera al 5% CO₂, la citotoxicitat de les proteïnes es mesurava mitjançant l'assaig quantitatiu i colorimètric utilitzant *Celltiter 96[®] Aqueous* (Promega, Madison, WI, EUA). Aquest assaig es basa en la reducció de l'MTT (bromur de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli, de coloració groga) a *formazan* (de coloració violeta). El compost reduït forma uns cristalls impermeables a les membranes cel·lulars de les cèl·lules viables que proporciona el valor d'absorbància relatiu a la taxa de proliferació cel·lular. Aquesta reducció la realitzen deshidrogenases de la cadena respiratòria del mitocondri presents en les cèl·lules metabòlicament actives.

L'assaig es dugué a terme tal i com indica la casa comercial. Breument, s'afegia MTT als pous de les plaques de les cèl·lules en cultiu tractades fins a una concentració final de 0.5 mg/ml. S'incubava 2.5 hores a 37 °C en una atmosfera al 5% CO₂ i, posteriorment, dissolent els cristalls de formazan amb 100 µl per pouet de dimetilsulfòxid (DMSO), es llegia l'absorbància a 570 nm utilitzant el lector de plaques Synergy 4 (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VE, EUA). La citotoxicitat s'expressa en valors de IC₅₀, que correspon a la concentració de l'enzim assajat necessari per a inhibir la proliferació cel·lular en un 50%, calculat a partir de la interpolació lineal en les corbes. Els resultats per a cada experiment són la mitjana de tres determinacions independents, i els experiments es van fer per triplicat.

Amb activació dels zimògens in vivo: Assajos en cèl·lules transfectades. S'analitzà l'efecte de dues de les variants de zimògens d'ONC activables per la proteasa del HIV-1 en cèl·lules en cultiu infectades, treballant en el Laboratori de Retrovirologia de la Fundació irsiCaixa, a l'Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona), amb el Dr. Miguel Ángel Martínez de la Sierra.

Es realitzaren assajos de citotoxicitat dels zimògens d'ONC (ONCYPG1 i ONCFLG) en la línia cel·lular HEK293T (cèl·lules embrionàries de ronyó), amb o sense transfecció amb el vector pNL4.3ΔEnvGFP [393]. Aquest vector conté els gens del Virus de la Immunodeficiència Humana de tipus 1 (HIV-1), junt amb el gen de la Proteïna Fluorescent Verda (GFP) localitzat enmig del gen *env*. Així, s'impedeix la traducció completa del gen que codifica per les proteïnes de l'envolta, aconseguint evitar la formació de nous virions degut a la deficiència de proteïnes de l'envolta i, conseqüentment, la lisi i mort cel·lular pel cicle viral que emmascararia els resultats de la toxicitat deguda als zimògens. El fet de presentar la GFP que s'expressa junt amb la poliproteïna del virus, permet tenir un control de l'eficiència de transfecció mitjançant fluorimetria i normalitzar finalment els resultats segons aquesta eficiència.

Així doncs, el primer dia es sembraren plaques de 96 pous amb cèl·lules HEK293T, a una concentració de 50000 cèl·lules/pou, amb un volum final de cada pou de 100 µl de medi DMEM, 10% FBS. Es deixaren incubar els cultius durant 24 h a 37 °C en una atmosfera al 5% CO₂, aconseguint una confluència d'aproximadament el 90%. El segon dia es realitzà el procés de transfecció amb el vector pNL4.3ΔEnvGFP. Per a dur a terme la transfecció, s'afegiren a cada pou 50 µl de medi *Opti-MEM®I Reduced Serum Medium* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA; que s'utilitza només per al moment de la transfecció), els quals contenien 320 ng del vector de DNA *pNL4.3DeltaEnvGFP* i 1 µl de *Lipofectamine™2000* (Invitrogen Life Sciences, Carlsbad, CA, EUA). S'incubaren les plaques durant 4.5 hores a l'incubador i posteriorment s'eliminà el medi de transfecció *Opti-MEM* i es rentaren les plaques amb PBS. S'afegí medi fresc DMEM + 10% FBS (sense antibiòtics) i es deixà a l'incubador fins l'endemà. Durant el tercer dia es realitzà el tractament de les cèl·lules amb els zimògens a assajar. S'incubaren les cèl·lules amb les concentracions de proteïna des de 0.001 a 10 µM en el cas de l'ONC i des de 0.1 a 30 µM pels dos zimògens ONCPG1 i ONCFLG. En aquests experiments es realitzaren tres tipus de control: els controls de transfecció 1) sense afegir res (ni vector de DNA, ni lipofectamina, ni tractament amb l'enzim), 2) *Mock Transfected* (en el que s'afegia solament la lipofectamina, sense el plasmidi ni el tractament amb els enzims) i 3) *Plasmid Only* (en el que es realitzava la transfecció amb el vector+lipofectamina però no es sotmetien les cèl·lules al tractament proteic). De la mateixa manera que en l'apartat anterior, després de 3 dies incubant a 37 °C en una atmosfera al 5% CO₂, la citotoxicitat de les proteïnes es mesurà mitjançant l'assaig quantitatiu colorimètric de reducció de l'MTT a *formazan*, afegint MTT a una concentració final de 5 mg/ml a cada pou i incubant posteriorment 2.5 h. Posteriorment es prosseguí a la lectura de plaques a 570 nm, prèviament havent dissolt els cristalls de formazan amb 100 µl de DMSO per pou. Per a un sol experiment es feren duplicats, realitzant 2 experiments independents.

Estudis estructurals del zimogen ONCFLG per Ressonància Magnètica Nuclear (NMR).

Per tal d'estudiar l'estructura tridimensional dels zimògens mitjançant Ressonància Magnètica Nuclear (NMR), va ser necessària l'obtenció del zimogen ONCFLG marcat amb ¹⁵N i ¹³C, i solament amb ¹⁵N. Aquesta variant es va escollir perquè era la que s'activava més eficientment amb la proteasa SK#1. La producció i purificació del zimogen ONCFLG, marcat o doblement marcat, es va realitzar a partir de cèl·lules d'*E. coli* BL21(DE3) tal i com s'especifica a l'apartat de *Producció i purificació dels zimògens d'Onconasa®*. Els experiments de NMR es van realitzar en col·laboració amb la Professora Marta Bruix, el Dr. Douglas Laurents i la Sra. Soraya Serrano, del Departament d'Espectroscopia i Estructura Molecular de l'Institut de Química-Física 'Rocasolano' del CSIC de Madrid. Tots els espectres de NMR es van realitzar en un espectròmetre Bruker AV 800 MHz equipat amb una criosonda, processat utilitzant Topspin (Bruker Biospin, Karlsruhe, Alemanya) i analitzat amb SPARKY [394].

Breument, les mostres pels experiments de NMR contenien 50 μM DSS (2,2-dimetil-2-silapentan-5-sulfonat), 3 mM NaN_3 , 100 mM KCl, 1 mM HAC, 1 mM K_2HPO_4 , i 2.8 mM zimogen ONCFLG marcat, preparat en 0.5 ml $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (10/1), a pH 5.2 i 35 $^\circ\text{C}$. Les assignacions de l'esquelet peptídic es van obtenir a partir de l'anàlisi dels espectres tridimensionals heteronuclears HNCA, HN(CO)CA, CBCANH, CBCA(CO)NH, HN(CA)CO. Les assignacions de les cadenes laterals es van obtenir mitjançant l'anàlisi d'espectres HC(C)H-TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) i (H)CCH-TOCSY. Les assignacions dels protons dels anells dels residus aromàtics (H δ i H ϵ), es van realitzar a partir de la correlació amb els C β mitjançant experiments 2D ^1H NOESY i ^1H - ^{13}C HSQC.

L'estructura tridimensional en solució de ONCFLG es determinà a través d'experiments NOE (*Nuclear Overhauser Enhancement*). Les assignacions NOE es van obtenir a partir de l'anàlisi d'espectres bidimensionals ^1H - ^1H NOESY (*NOE Spectroscopy*), i de tridimensionals ^{15}N -NOESY-HSQC (*NOESY-Heteronuclear Single Quantum Coherence*) per a la visualització dels nitrògens amida de l'esquelet de la cadena polipeptídica i de les cadenes laterals d'arginines, asparagines, glutamines i triptòfans, i ^{13}C -NOESY-HSQC per a la visualització dels carbonis alifàtics i aromàtics. La dinàmica a nivell de residu de l'esquelet peptídic va ser determinada mitjançant experiments internuclears ^1H - ^{15}N NOE amb una demora de 5.0 s.

Càlculs d'estructura. Els càlculs de l'estructura es van dur a terme amb CYANA [395] utilitzant l'assignació automàtica de NOEs combinada amb la comprovació manual de totes les assignacions. Les limitacions existents als angles diedres de l'esquelet principal es determinaren a partir dels valors de desplaçament químic utilitzant TALOS+ [396]. Es van generar 100 conformacions, que es van fer quadrar amb les dades experimentals emprant un protocol estàndard automatitzat CYANA. Les 20 conformacions amb els valors finals menors de la funció CYANA es van seleccionar i es van sotmetre a 2000 passos de minimització d'energia amb AMBER9 [397]. La qualitat de l'estructura final va ser comprovada amb PROCHECK-NMR [398] i les coordenades obtingudes es van dipositar a la base de dades PDB (Protein Data Bank) amb el codi d'accés 2LT5.

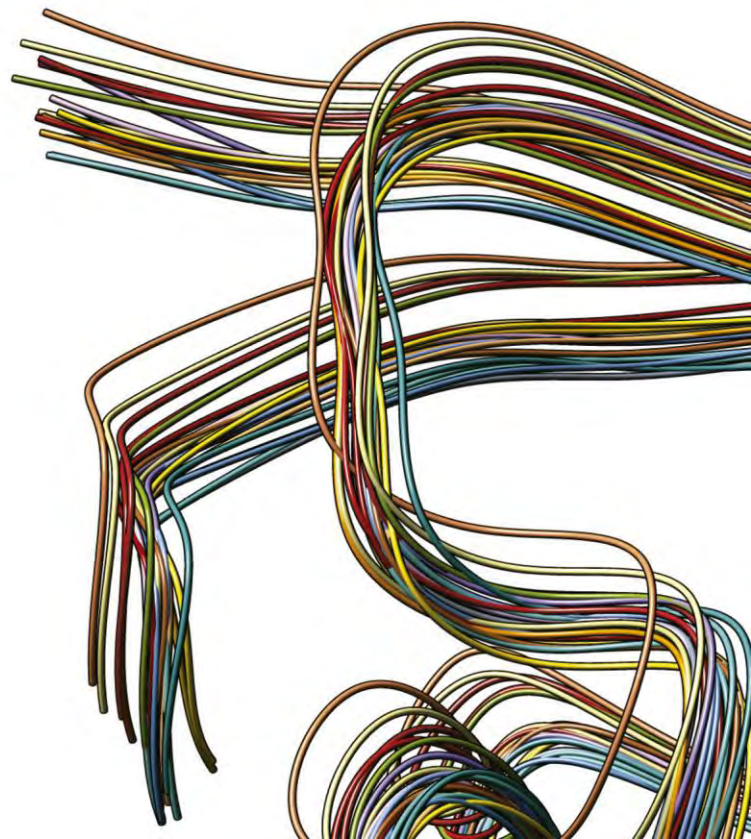
Dinàmica del zimogen i estabilitat conformacional. Es realitzà un seguiment de l'estabilitat conformacional a nivell de residu, mitjançant l'intercanvi de protó-deuteri. L'intercanvi dels protons dels grups amida amb deuterons del dissolvent va ser iniciat dissolent les dues formes d'ONCFLG marcat amb ^{15}N en un solvent deuterat (KH_2PO_4 100 mM) i es va realitzar a 30 $^\circ\text{C}$ ajustant el pH a 6.0 per la forma intacta del zimogen i a 5.2 per la forma processada. La taxa d'intercanvi d'hidrogen es va determinar a partir d'una sèrie d'espectres consecutius HSQC, després d'un lapse de temps mort inicial d'uns 30 min. La taxa d'intercanvi intrínseca per les proteïnes totalment desnaturalitzades es va determinar utilitzant els paràmetres descrits a la bibliografia [399], corregits pel pH i la temperatura corresponents. Així es calculà els factors de protecció, la relació existent entre la taxa d'intercanvi intrínseca i l'observada per cada residu.

L'estabilitat conformacional ΔG_{HX} de cada grup amida es va calcular a partir del factor de protecció tal i com es descriu a [400].

Estudis d'unió a un anàleg de substrat. Es mesclà d[UGGUGGUGG], abreujat com d[UGG]₃ (Thermo-Fischer Scientific, Ulm, Alemanya) amb el zimogen¹⁵N-ONCFLG, a unes concentracions de 0.63 i 0.32 mM, respectivament. Es van testar diversos valors de pH: 5.19, 6.35, 7.25 i 8.97. Es van registrar espectres 1D ¹H, 2D ¹H-¹⁵N HSQC, 2D ¹H TOCSY i NOESY, i espectres 3D ¹H-¹⁵N HSQC-TOCSY i HSQC-NOESY.

Model estructural de la forma processada del zimogen ONCFLG. Es comprovà electroforèticament que la forma marcada amb ¹⁵N era digerida correctament amb la proteasa SK#1. Posteriorment, es realitzaren espectres 2D de la forma activada d'ONCFLG i es compararen amb els de la forma intacta. Els espectres no presentaven variacions importants en la posició dels senyals, fet que indica que els canvis produïts per la ruptura de l'enllaç peptídic entre Phe40 i Leu41 del *linker*, dut a terme per part de la proteasa HIV-1 PR, són locals i no afecten al plegament global de la proteïna. D'acord amb aquesta evidència, el modelat del zimogen ONCFLG activat es va calcular amb el programa CYANA 2.1 [395]. Es van utilitzar la llista completa de distàncies i restriccions angulars pels residus 1-32 i 49-120 obtinguts pel zimogen no activat, i es van descartar les limitacions intra- i inter-residuals corresponents als segments no estructurats Gly33-Phe40 i Leu41-Gly48. Es generà un conjunt de 100 conformacions, minimitzant-ne també l'energia amb el mateix programa. Finalment, es seleccionaren manualment les 20 estructures que representaven millor tot l'espai conformacional cobert per aquests segments no estructurats i lliures.

5. RESULTATS



5. RESULTATS

5.1. OBTENCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE LA PROTEASA SK#1

La proteasa que es va seleccionar com a eina activadora dels zimògens de ribonucleases va ser la proteasa del virus de la immunodeficiència humana de tipus 1 (HIV-1 PR). Es va dissenyar un protocol de purificació d'aquest enzim, aconseguint la seva obtenció a un elevat nivell de puresa i homogeneïtat i un cop obtingut, es va caracteritzar la seva eficiència catalítica juntament amb la proteasa comercialment disponible *recHIV1-PR* (Bachem, Suïssa), les quals van resultar ser cinèticament comparables.

5.1.1. Producció i purificació de la proteasa recombinant SK#1

Per poder aïllar la proteasa en la seva forma pura es va desenvolupar un protocol d'expressió heteròloga i la corresponent estratègia de purificació tenint en compte diversos aspectes gràcies als quals el procés d'obtenció resultà exitós. Per una banda, s'ha emprat una estructura gènica expressant l'enzim en forma de precursor per tal de solucionar la problemàtica de l'autodegradació de la proteasa en el procés de producció heteròloga. S'ha realitzat a través de l'expressió conjunta del gen de la proteasa amb l'extensió N-terminal de 8 residus aminoacídics (*Figura 16*). Aquest propèptid dificulta la formació del dímer i la seva autoproteòlisi, obtenint finalment proteasa madura, de forma activa [286, 401-403]. Alguns autors alternativament han produït proteases amb mutacions en els llocs específics de tall o en residus pròxims [377]. Per altra banda, gràcies a la utilització de la soca *Rosetta*TM2(DE3) com a hoste d'expressió es pogueren minimitzar les diferències en la freqüència d'ús de codons entre el HIV (virus eucariota) i les cèl·lules procariotes, obtenint així un bon rendiment. Es considerà oportuna la utilització d'aquesta soca per la millora de l'expressió, degut a l'elevat percentatge (20%) d'aquesta tipologia de codons en el gen de la proteasa (*Taula 10*). Finalment, pel procés de purificació alguns grups han obtingut la proteasa de forma soluble i activa [404] o, alternativament, a partir d'un únic polipèptid amb dos còpies del monòmer amb una seqüència espaiadora intermitja, formant un homodímer connectat [405, 406]. Malgrat tot, es considerà com a millor opció partir de la proteasa agregada en cossos d'inclusió [366, 367, 373], seguit de passos de solubilització i renaturalització, i s'ha considerat una opció adequada per la obtenció de l'enzim en aquest estudi (*Figura 17*).

Taula 10. Freqüències i percentatge de codons de baixa utilització en procariotes del gen de la proteasa HIV-1 PR.

| Codons d'ús poc freqüent en procariotes | AGA | ATA | CTA | CCC | GGA | AGG | CGG | Total |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------|
| Aminoàcid | Arg | Ile | Leu | Pro | Gly | Arg | Arg | |
| Freqüència (núm. codons totals = 107) | 3 | 7 | 2 | 1 | 8 | 0 | 0 | 21 |
| Percentatge que representa | 2.8 | 6.5 | 1.9 | 0.9 | 7.5 | 0 | 0 | 19.6 % |

Finalment, s'obtingué proteasa madura, pura i homogènia a un elevat rendiment de 20 mg per litre de cultiu, comparable a altres treballs [377]. La proteasa és una proteïna amb una baixa estabilitat [273] i altament sensible a la liofilització, per la qual cosa s'emmagatzemà directament en solució en el tampó emprat a la cromatografia per HPLC. S'obtingué a una concentració de 0.2112 mg/ml o 19.60 µM, la qual és lleugerament superior a la de la proteasa comercial (0.157 mg/ml o 14.63 µM). Mitjançant espectrometria de masses MALDI-TOF es confirmà l'obtenció de proteasa madura i homogènia, a la qual els vuit residus aminoacídics addicionals de l'N-terminal havien estat eliminats correctament per autoprocessament, com es pot comprovar comparant la massa molecular obtinguda amb les masses moleculars teòriques de la proteasa SK#1 i del precursor amb els 8 residus N-terminals intactes (*Taula 11*).

Taula 11. Massa molecular teòrica i obtinguda per la proteasa SK#1 de l'estudi.

| Proteïna | Mm teòrica (Da) ^a | Mm observada (Da) ^b |
|--|------------------------------|--------------------------------|
| Proteasa SK#1 | 10792.79 | 10793.27 |
| Precursor HIV-1 PR (+8 aa N-terminal) | 11677.0 | - |

Analitzant el procés de purificació de la proteasa mitjançant SDS-PAGE (*Figura 25*), s'observà que l'etapa de diàlisi, malgrat portar associada una pèrdua substancial de la proteasa a la fracció insoluble (com s'aprecia als carrils A7 i B5), constituïa també una etapa de purificació significativa (al carril A6 la proteasa es troba pràcticament pura). Al cromatograma de la cromatografia de bescanvi catiònic en Mono-STM (*Figura 24*) s'observà l'aparició de dos màxims d'absorbància principals, a 170 mM i a 250 mM de NaCl, respectivament. L'anàlisi electroforètic amb electrotransferència tipus western i revelat amb l'anticòs IgG1 anti-HIV1-PR de ratolí (*Figura 25B*), permeté afirmar que efectivament es tractava de proteasa del HIV-1. Analitzant el contingut dels pics per MALDI-TOF trobàrem una proteïna majoritària d'uns 7 kDa heterogènia al pic 1, tractant-se segurament de productes d'autoprocessament de la proteasa, i fou al pic 2 on localitzàrem la proteasa SK#1 madura i amb el prosegment N-terminal escindit.

Figura 24. Cromatograma de l'elució de la proteasa SK#1 a la cromatografia d'intercanvi catiònic per HPLC.

En blau, absorbència registrada a 280 nm (eix esquerre). En verd, gradient de NaCl utilitzat per a l'elució de la proteïna (eix dret). Pic 1: màxim de 320 mUA a 170 mM de NaCl. Pic 2: màxim de 318 mUA a 250 mM de NaCl.

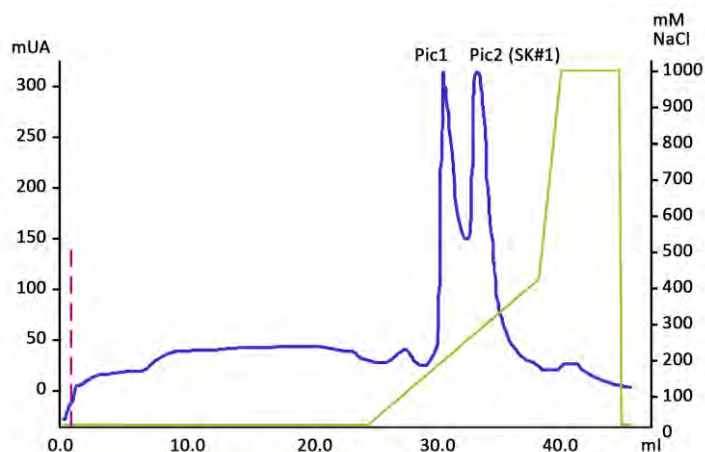
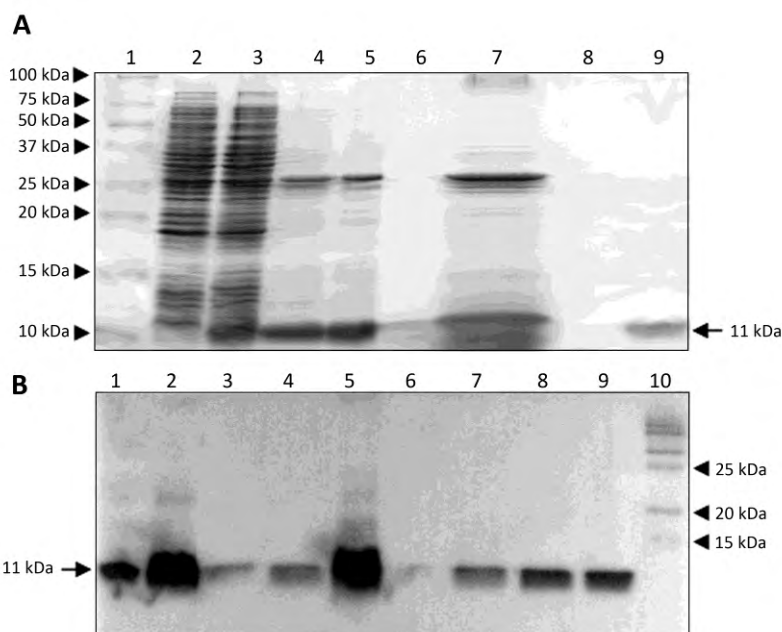


Figura 25. Anàlisi electroforètic del procés de purificació de SK#1.

En SDS-PAGE 15% en condicions reductores. **A)** Tinció amb Coomassie-blue. **1.** Marcadors de massa molecular. **2.** -IPTG t=0h. **3.** +IPTG t=4h. **4 i 5.** Través DEAE. **6.** Fracció soluble diàlisi. **7.** Fracció insoluble diàlisi. **8.** Pic 1 HPLC. **9.** Pic 2 HPLC. **B)** Western-blot. Detecció de la HIV-1 PR amb l'anticòs primari de ratolí *IgG1-anti-HIV1-PR*, dilució 1:20000 i anticòs secundari de cabra *IgG-anti-ratolí*, dilució 1:50000. **1.** +IPTG t=4h. **2.** Cossos inclús solubilitzats. **3.** Través DEAE. **4.** Fracció soluble diàlisi. **5.** Fracció insoluble diàlisi. **6.** Través HPLC. **7.** Pic 1 HPLC. **8.** Pic 2 HPLC. **9.** Proteasa *rechIV-1* PR comercial. **10.** Marcadors de massa molecular.



5.1.2. L'activitat de la proteasa pròpia SK#1 és comparable a la comercial *rechIV-1*.

Una vegada obtinguda la proteasa SK#1, es caracteritzà cinèticament mitjançant anàlisi per transferència d'energia de fluorescència per ressonància (FRET), utilitzant el substrat DABCYL- γ -Abu-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-Gln-EDANS, i es comparà amb la proteasa comercial *rechIV-1* PR. La seqüència utilitzada al pèptid substrat és la mateixa que la seqüència de reconeixement i digestió natural de la proteasa MA/CA. S'observà i es corregí l'efecte d'apantallament intern *IFE*. A la *Figura 26* es pot observar la representació gràfica dels factors de correcció de l'*IFE* (A) i l'efecte d'aplicar la correcció esmentada sobre els valors de velocitat (B). Finalment, a la *Figura 27* s'observa l'ajust de les dades obtingudes per ambdues proteases utilitzant l'equació de Michaelis-Menten (A) i la seva posterior linealització per Lineweaver-

Burk (B). Els paràmetres cinètics obtinguts es detallen a la *Taula 12*. L'eficiència catalítica de la proteasa produïda representa un 90.4% respecte l'eficiència de l'enzim comercial. En conseqüència, podem considerar que són comparables en quant a l'activitat.

Els valors d'aquests paràmetres, al treball de Matayoshi i col·laboradors [379], són de $V_{max} = 0.164 \pm 7.0 \times 10^{-3} \mu\text{M min}^{-1}$, $K_M = 103 \pm 8 \mu\text{M}$ i k_{cat}/K_M és de $2.85 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$, presentant la nostra proteasa i la comercial unes 6 vegades més d'eficiència catalítica. La k_{cat}/K_M de l'estudi descrit per Szeltner i Pólgar [273] és de $17.4 \pm 1.2 \mu\text{M min}^{-1}$, comparable a les que s'han obtingut en el present treball, tant per la SK#1 com per la *rechIV-1 PR* comercial.

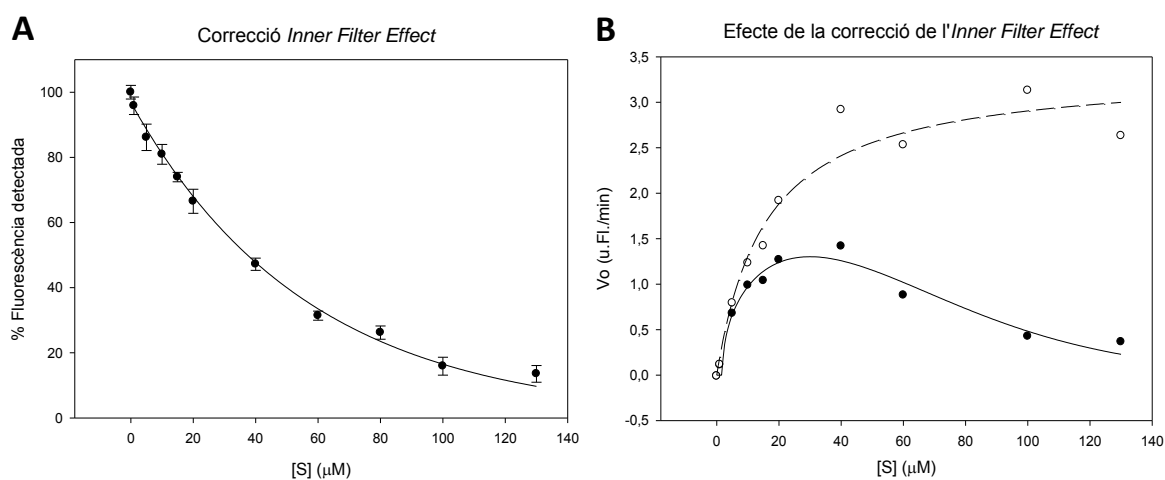


Figura 26. Representació gràfica de l'efecte IFE en la detecció de fluorescència i la seva correcció.

A) Representació dels factors de correcció de l'IFE, fluorescència relativa detectada en les diferents concentracions de substrat assajades en els experiments de caracterització de les proteases SK#1 i *rechIV-1 PR*. **B)** Representació de l'efecte de corregir l'IFE a les concentracions de substrat assajades. Punts negres: V_o sense corregir (u.FI./min). Punts blancs: V_o corregida (u.FI./min).

Taula 12. Paràmetres cinètics de la proteasa SK#1 pròpia comparada amb la comercial *rechIV1-PR*.

| Proteasa | V_{max} ($\mu\text{M min}^{-1}$) ^a | K_M (μM) ^a | k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$) | Eficiència catalítica relativa (%) |
|-------------------|---|--------------------------------------|--|------------------------------------|
| SK#1 | 0.174 ± 0.003 | 14.04 ± 0.800 | 17.10 ± 0.98 | 90.4 |
| <i>rechIV-1PR</i> | 0.150 ± 0.010 | 10.94 ± 1.020 | 18.91 ± 1.23 | 100 |

^a Els valors de V_{max} i K_M per cada proteasa foren determinats realitzant l'assaig de caracterització cinètica, amb el substrat DABCYL- γ -Abu-Ser-Gln-Asn-Tyr-Pro-Ile-Val-Gln-EDANS (Bachem, Suïssa), en 0.1 M acetat sòdic, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% DMSO, 1 mg/ml BSA, pH 4.7, en un volum final de 120 μl , incubant a 30 °C de temperatura. Les concentracions del substrat es determinaren entre 0 i 130 μM , i la concentració de la proteasa, a 1.45 μM . La proteasa comercial *rechIV1-PR* era de Bachem (Suïssa).

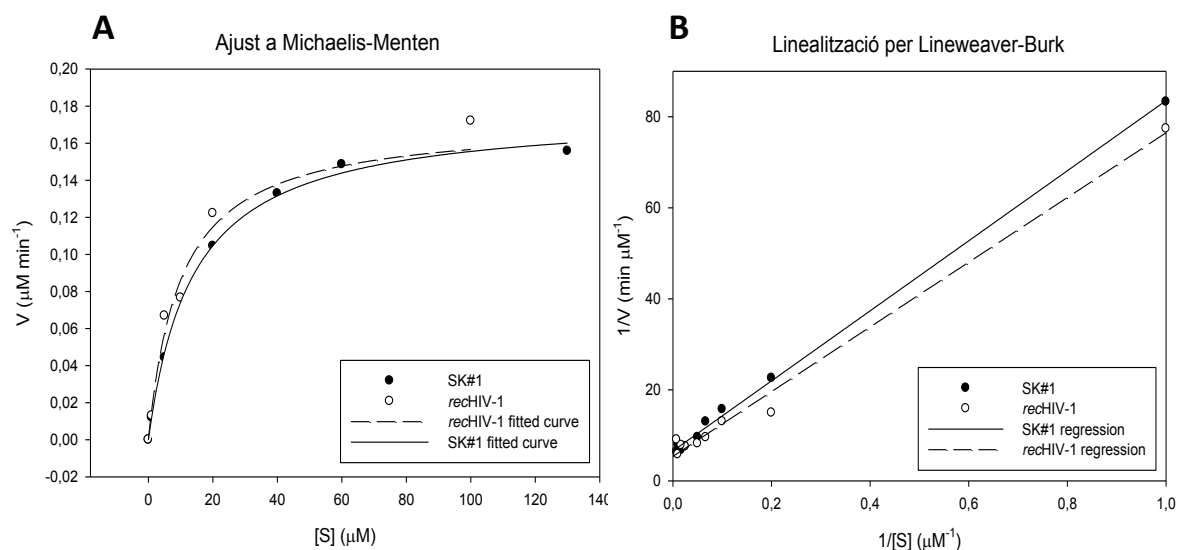


Figura 27. Comparativa de la caracterització cinètica de les proteases SK#1 i rechIV-1 PR.

L'assaig de caracterització cinètica es realitzà en les condicions detallades al peu de la *Taula 12*. **A)** Ajust de les dades corregides a l'equació de Michaelis-Menten. **B)** Ajust de les dades corregides a la linealització de Lineweaver-Burk o dobles recíprocs.

5.2. PRODUCCIÓ I CARACTERITZACIÓ DELS ZIMÒGENS BASATS EN ONC

5.2.1. Disseny, producció i activació del zimogen ONCYP

Seguint el mateix procediment que Raines i col·laboradors [360], es dissenyaren zimògens basats en ONC que fossin enzimàticament actius només quan es dona l'acció hidrolítica específica de la proteasa del virus de la SIDA. Per a la obtenció dels zimògens, s'uniren els extrems N- i C- terminals originals de la proteïna nativa amb una seqüència aminoacídica que contenia una diana per la proteasa HIV-1 PR. D'aquesta manera, l'enzim no seria capaç de ser catalític mentre el *linker* es troba intacte. Es creen nous N- i C- terminals mitjançant permutació circular. S'escollí l'ONC perquè és una proteïna que ha estat molt estudiada, i que presenta un elevat grau de citotoxicitat. A més, és altament estable, i internalitza eficientment a les cèl·lules. Aquestes qualitats la fan una proteïna interessant per a la construcció de zimògens. En el moment de dissenyar els zimògens d'ONC, es van tenir en compte tres característiques que poden influir a l'activitat, a l'estabilitat general i a la citotoxicitat de l'enzim.

En primer lloc, reflexionarem que en afegir la seqüència *linker* als zimògens s'aconseguiria, a la vegada, fer que el zimogen perdés activitat (bloqueig del centre actiu) i que s'activés per la HIV1-PR (seqüència específica). Però en el cas de les variants d'ONC, i d'acord amb l'estratègia de disseny, la seqüència que connecta els extrems amino i carboxil nadius impedia que es pogués dur a terme la ciclació espontània del residu de glutamina N-terminal (Gln1) de l'ONC

que genera un piroglutàmic (Pyr1), essencial per l'activitat ribonucleasa d'aquest enzim [93, 96]. Per aquest motiu, es va reemplaçar el residu Gln1 per un residu de serina (Ser1). Està descrit que aquesta substitució a l'N-terminal de l'ONC era la que conservava la major eficiència catalítica i major citotoxicitat d'entre les opcions que van ser estudiades [95, 96, 106], postulant que el grup hidroxil d'un residu de Ser o Tyr podia assumir el rol de l'oxigen del carbonil del Pyr1 original, permetent igualment la formació d'una xarxa de ponts d'hidrogen a l'N-terminal [112].

En segon lloc, l'ONC presenta un enllaç disulfur C87/C104, que lliga el carboxil terminal Cys104 a una cadena- β central (*Figura 5A*), segrestant-lo allunyat de l'N-terminal [93]. L'anàlisi de l'estructura cristal·logràfica de l'ONC (1ONC, [93]) revela que la distància entre els residus terminals amino i carboxil és 18.18 Å, que podria ser abastat per tan sols 5 residus (suposant una periodicitat de l'esquelet polipeptídic de 3.8 Å) en una conformació totalment desplegada. Els estudis de modelatge, però, suggeriren que era necessari un *linker* amb una seqüència mínima de 14 aminoàcids o més per tal de connectar els extrems amino i carboxil nadius i codificar per la seqüència diana de la proteasa HIV-1 PR sense pertorbar l'estructura global, evitant alhora la unió del substrat.

Els nous residus N- i C- terminals seleccionats Arg73/Ser72 es van escollir basant-nos en l'accessibilitat al solvent que presenten aquests residus al *loop* β 4- β 5 de l'ONC, zona que es situa a la perifèria i la qual s'havia demostrat prèviament que era capaç d'acomodar una substitució Ser72Cys, utilitzada en el marcatge fluorescent de l'ONC per a seguir la seva internalització cel·lular [142]. A més, aquestes posicions són les homòlogues a les que van permetre l'obtenció del zimogen més efectiu de la RNasa A a l'estudi de Plainkum i col·laboradors [360]. Aquests residus són llunyans del centre actiu i no presenten cap rol en la catàlisi ribonucleolítica [47, 64]. Cal afegir també que a alguns homòlegs de l'ONC aquest *loop* és més llarg, com a la Proteïna Catiónica d'Eosinòfil (ECP) [407]. Aquest fet, junt amb la observació d'elevada flexibilitat a aquest *loop*, fa pensar que aquesta zona és altament tolerant a les modificacions. En contrast, dos dels altres *loops* exposats al solvent, que connecten les dues últimes cadenes- β o la segona i tercera a l'ONC salvatge, sovint contenen residus de prolina en *cis* a proteïnes homòlogues com la RNasa A i són molt menys tolerants a mutacions. Finalment, gràcies als ponts disulfur 19-68 i 30-75 de l'ONC, els nous extrems N- i C- terminals no nadius dels zimògens segueixen quedant ancorats al cos de la proteïna malgrat l'eliminació de l'enllaç peptídic entre els residus 72 i 73. A la *Figura 28B* es mostra el modelatge estructural preliminar d'un dels zimògens d'ONC (ONCFLG), remarcant els extrems N- i C- terminals de nova creació (Arg73/Ser72) i amb un *linker* de 16 residus formant una hèlix- α i unint els terminals nadius, comparat amb l'estructura de l'ONC salvatge (*A*), i la seva seqüència aminoacídica (*C*).

Considerant tots els motius esmentats, es va construir el plasmidi pONCYP, que dirigia la producció de l'ONC permutada, ONCYP, afegint una metionina extra precedint l'Arg73 de l'N-terminal del zimogen i amb el residu Ser72 com a nou carboxil terminal (en la numeració del zimogen seria la Ser118). Al zimogen ONCYP, els extrems nadius Cys104 i Ser1 estan connectats per la seqüència aminoacídica C₁₀₄GSGSQNY*PIVQSAGS₁, de 14 residus, que vam anomenar de tipologia YP (*Taula 8*). Aquesta seqüència conté la diana natural MA/CA de la poliproteïna Pr55Gag específica (*Taula 3*) de la proteasa HIV-1 PR (subratllada en la seqüència), la qual és tallada a l'enllaç peptídic Tyr*Pro [270, 383, 384]. En aquest cas, i segons la classificació de substrats de les aspartil-proteases descrita prèviament [282, 283], es tracta d'un substrat de tipus 1, amb un aminoàcid aromàtic en posició P1 i un residu de Pro a P1'. Molts estudis cinètics de caracterització d'aquesta proteasa s'han centrat en aquesta seqüència diana, que també és la mateixa que trobem a l'octapèptid del substrat DABCYL-EDANS utilitzat en l'assaig de caracterització cinètica de la proteasa SK#1 d'aquest treball (*Taula 12*). Els residus que flanquegen la seqüència de reconeixement de la proteasa es van seleccionar pel fet de presentar cadenes laterals flexibles petites o polars (glicina, alanina o serina), aconseguint així la longitud necessària per unir els extrems de la proteïna permutada alhora que es proporcionava flexibilitat i solubilitat a aquesta.

Després d'expressar el zimogen ONCYP en *E. coli* BL21(DE3) en forma de cossos d'inclusió, se'l sotmeté a un procés de replegament oxidatiu *in vitro* i es va purificar obtenint un elevat rendiment, de més de 25 mg/L de cultiu. La puresa i homogeneïtat de la mostra es va confirmar per SDS-PAGE i es comprovà la massa molecular per espectrometria de masses MALDI-TOF (*Taula 13*).

Un zimogen de ribonucleasa ha de ser activat eficientment per la proteasa activadora. Es va assajar l'activació *in vitro* del zimogen ONCYP amb la proteasa SK#1 de producció pròpia utilitzant diferents relacions molars zimogen:proteasa i agafant mostres al llarg del temps després de l'addició de la proteasa. En l'anàlisi per SDS-PAGE en condicions reductores, l'aparició de dos fragments resultants del processament, de 9 i 4 kDa, permeté fer un seguiment de l'activació. Incubant el zimogen ONCYP sense la proteasa *overnight* a 37 °C no s'observà hidròlisi espontània, així com tampoc en resultà de la incubació conjunta de la proteasa HIV-1 PR amb la proteïna salvatge ONC (dades no mostrades). Com es pot observar a la *Figura 29*, l'activació del zimogen ONCYP però, deixava de progressar després d'unes 4 hores des de l'addició de la proteasa. Fins i tot utilitzant una relació molar de 1:5 ZIM:PR i incubacions més llargues (fins a 30 hores) no resultà en una major activació, aconseguint tan sols un 10% de la forma activada. Es va hipotetitzar que aquest connector, malgrat satisfer els requeriments estèrics com es pot deduir de l'elevat rendiment de proteïna correctament plegada obtingut en la purificació, impedia d'alguna forma l'accessibilitat de la proteasa.

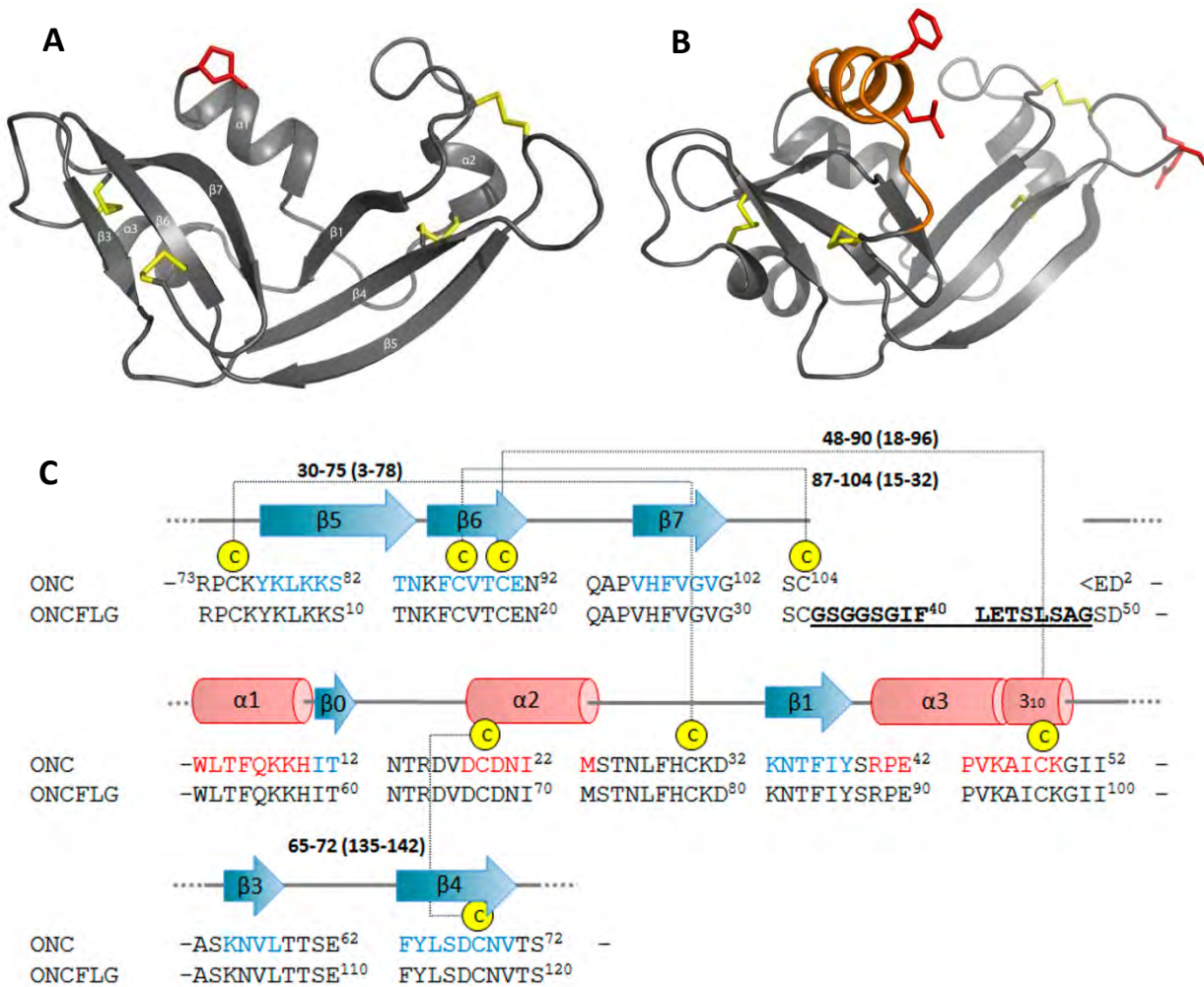


Figura 28. Comparativa estructural dels zimògens d'ONC amb l'ONC salvatge.

A) Estructura tridimensional d'ONC (1ONC) [93]. Es mostra el residu Pyr1 en barres roges. **B)** Modelat estructural de la variant ONCFLG, generat utilitzant el servidor de modelatge per homologia SWISS-MODEL i minimitzant l'energia amb la implementació GROMOS 96 de Swiss-Pdb Viewer [385]. Els terminals amino i carboxil no nadius (Arg73/Ser72), creats per permutació circular, i els residus que constitueixen l'enllaç a processar (Phe40-Leu41) es representen amb barres roges. El segment d'unió dels N- i C- terminals originals es mostra en taronja. Ambdues figures s'han generat mitjançant PyMOL (<http://pymol.sourceforge.net/>). **C)** Alineament de les seqüències aminoacídiques de l'ONC salvatge i el zimogen ONCFLG, mostrant esquemàticament l'estructura secundària de l'ONC. Es mostra la seqüència en els mateixos colors dels elements d'estructura secundària, en blau pels fulls- β i en vermell per les hèlixs- α . Els residus que componen el connector FLG, unint la Ser49 i Cys32 (Glu1 i Cys104 en l'ONC), es ressalten en negra i subratllats.

5.2.2. Optimització de l'eficiència d'activació. Disseny, producció i activació de noves variants de zimògens d'ONC: -YPs i -FLs

Amb l'objectiu d'aconseguir un zimogen que fos activat de manera més eficient per la proteasa, es van dissenyar nous *linkers* basant-nos en dos principis: i) augmentar la flexibilitat i la longitud del connector per tal d'afavorir l'accessibilitat de la proteasa, i ii) augmentar l'afinitat de la proteasa pel *linker*, utilitzant una seqüència de reconeixement diferent.

Per aconseguir l'objectiu a través de l'elongació de la seqüència, es va afegir un residu addicional de Gly a un dels dos costats del lloc de tall de la seqüència YP (zimògens ONCYPG1 i ONCYPG2, amb seqüències connectores de 15 residus) o a tots dos (zimogen ONCYPGG, amb *linker* de 16 residus) (*Taula 8*). Per tal d'encarar el segon punt, es va utilitzar una altra tipologia de seqüència, GSGIF*LETSL, que vam anomenar FL. El reconeixement de les seqüències per part de l'aspartil-proteasa HIV-1 PR és divers i l'especificitat en la digestió és controlada per interaccions complexes entre com a mínim sis aminoàcids al voltant del lloc de tall. Al treball de Beck i col·laboradors [280], es va observar que la seqüència Ac-GSGIF*LETSL-NH₂ era processada 60 vegades més eficientment que la YP, i essent la més eficient de tota una llibreria de pèptids de fags, escanejada per seleccionar nous substrats per la proteasa HIV-1 PR. Aquesta seqüència es basa en substrats de tipus 2 de les aspartil-proteases, pel fet de presentar dos residus hidrofòbics a les posicions P1 i P1'. Com que amb el connector de 14 residus provat inicialment s'havia obtingut una activació pobra, els zimògens ONCFL i ONCFLG es van dissenyar amb una longitud de 15 i 16 residus de *linker*, respectivament. A la *Taula 8*, es pot observar que ONCFLG conté una Gly addicional al costat amino de l'enllaç peptídic que serà hidrolitzat.

De forma similar a l'obtingut inicialment pel zimogen ONCYP, els nous zimògens d'ONC es produïren amb un rendiment final d'uns 30-40 mg/L de cultiu en funció de la variant. L'anàlisi per espectrometria de masses MALDI-TOF dels zimògens purificats confirmà la massa molecular de cada zimogen (*Taula 13*).

S'assajà l'eficiència de tall d'aquests nous zimògens d'ONC per la proteasa SK#1 i, com es mostra a la *Figura 29*, després de 30 hores d'incubació a una relació ZIM:PR de 5:1, l'activació dels zimògens ONCYPG1, ONCYPG2 i ONCYPGG va resultar ser de 38%, 32% i 43%, respectivament. Així doncs, l'elongació de la seqüència resultava en un increment de la reacció de catàlisi per part de la proteasa de 3-4 vegades en relació al zimogen original ONCYP. A diferència d'aquesta primera tipologia de seqüència, els zimògens tipus FL (ONCFL i ONCFLG) eren totalment processats a temps curts d'incubació i utilitzant una relació molar ZIM:PR de solament 100:1. Aquests resultats indiquen que els *linkers* basats en la seqüència aminoacídica nova GSGIF*LETSL són digerits de forma molt més eficient per part de la proteasa que els basats en la seqüència SQNY*PIVQ. Atesos els resultats, per a les activacions posteriors dels zimògens, necessàries en la caracterització de zimògens i RNases escindides, es considerarà oportuna la relació molar zimogen:proteasa de 50:1 i incubant la solució tota la nit a 37 °C en la majoria de casos, exceptuant els zimògens ONCFL, que es deixaren solament durant 5 hores.

Taula 13. Llistat de les masses moleculars teòriques i obtingudes per les variants i zimògens d'ONC.

| Proteïna | Mm teòrica (Da) ^a | Mm observada (Da) ^b |
|----------------|------------------------------|--------------------------------|
| ONC | 11819.84 | 11818 |
| ONCQ1S | 11803.78 | 11804 |
| ONCYP | 13273.20 | 13274 |
| ONCYPG1 | 13330.26 | 13330 |
| ONCYPG2 | 13330.26 | 13330 |
| ONCYPGG | 13387.31 | 13389 |
| ONCFL | 13291.26 | 13295 |
| ONCFLG | 13348.31 | 13349 |
| ONCFLG-Cys | 13364.37 | 13363 |
| ONCFL2-C15 | 13487.52 | 13487 |
| ONCFL2-C15 Act | 12757.60 | 12754 |
| ONCFL2-C16 | 13537.50 | 13540 |
| ONCFL2-C16 Act | 12814.70 | 12815 |

^a Les masses moleculars teòriques van ser calculades utilitzant l'aplicació 'Compute pI/Mw' del portal bioinformàtic ExPASy http://web.expasy.org/compute_pi/ (Swiss Institute of Bioinformatics).

^b Les masses moleculars observades es confirmaren per espectrometria de masses MALDI-TOF, amb un equip Ultraflex-TOF Bruker Daltonics, dels Serveis Tècnics de Recerca del Parc Científic i Tecnològic, Universitat de Girona.

5.2.3. Eficiència catalítica de les formes intacta i processada dels zimògens ONCFLs.

Un zimogen de RNasa ideal, ha de presentar baixa activitat ribonucleolítica abans de l'activació i recuperar una eficiència catalítica propera a la forma salvatge després de la incubació amb la proteasa activadora. Així, una vegada aconseguida l'activació eficient dels zimògens, s'avaluà la capacitat catalítica dels zimògens ONCFL i ONCFLG, per ser els únics que presentaven una activació completa (no fou el cas de la tipologia YP, els quals presentaren una mescla de les formes precursora i madura). La capacitat catalítica de la prorigonucleasa i de la forma activa dels zimògens es caracteritzà emprant el substrat fluorogènic 6-FAM-dArUdAdA-6-TAMRA [390, 391].

Com es mostra a la *Taula 14*, l'eficiència catalítica (k_{cat}/K_M) basal dels zimògens precursors fou molt baixa. Observant més detalladament els resultats obtinguts, els zimògens no activats (NA) ONCFL i ONCFLG presentaren tan sols un 5 i un 13% d'activitat relativa respecte l'ONC. Per la seva banda, els resultats per l'ONC eren coherents amb els descrits anteriorment [40, 68] i la variant ONCQ1S conservà un terç de l'activitat respecte a l'ONC salvatge (*Figura 30*), d'acord també amb el descrit a la bibliografia [106].

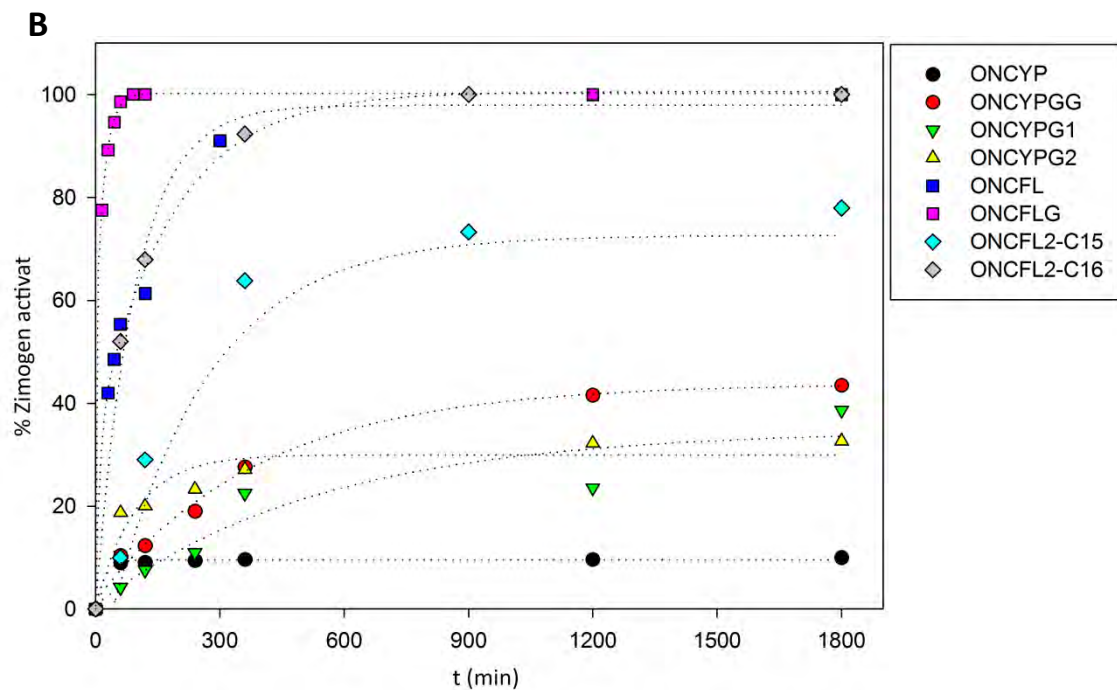
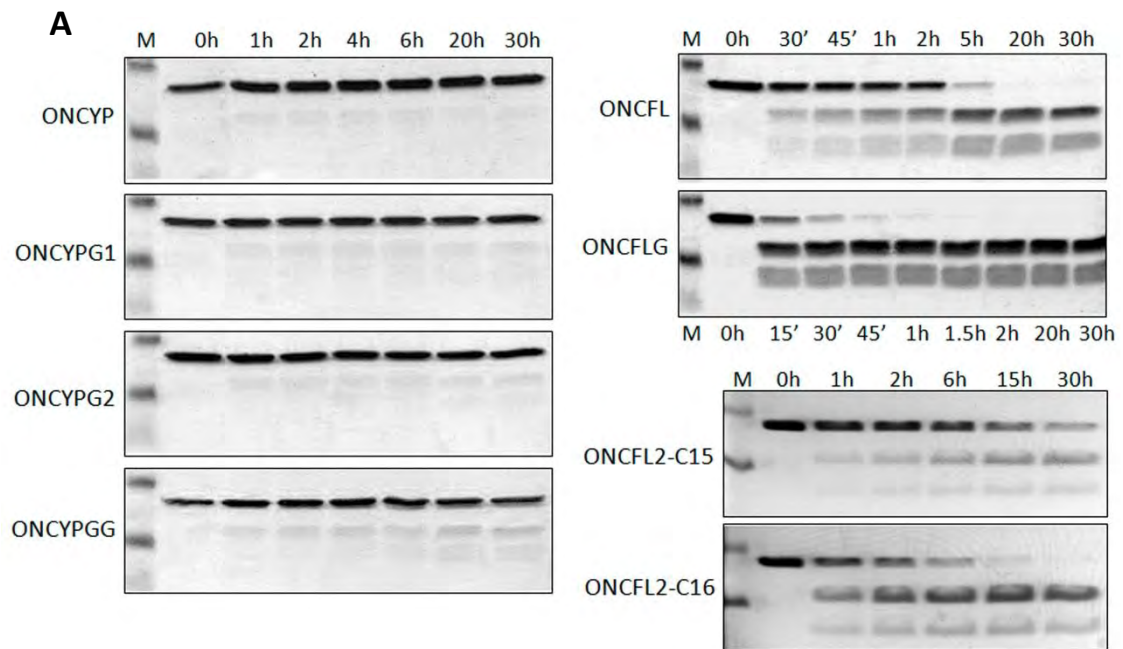


Figura 29. Eficiència de tall dels zimògens d'ONC amb la proteasa SK#1 al llarg del temps.

A) Anàlisi de l'activació dels zimògens d'ONC a 37°C i a diferents temps després de l'addició de la proteasa SK#1 a una relació molar de 5:1 (zimogen:proteasa) pels de tipologia YP i de 100:1 pels de tipologia FL, mitjançant SDS-PAGE 20% en condicions reductores (β -mercaptoetanol) amb tinció per Blau de Coomassie. Per tots els gels, el carril M correspon als marcadors de massa molecular: 15, 10 i 4 kDa. **B)** Representació gràfica del processament dels diferents zimògens al llarg del temps. Quantificació de l'activació per densitometria, a partir dels gels SDS-PAGE anteriors, utilitzant el quimioluminòmetre Imaging System FluorChem® SP (Alpha Innotech, San Leandro, CA, EUA).

Taula 14. Anàlisi de l'estabilitat i funcionalitat dels zimògens d'ONC.

| ZIM | T _m (°C) NA ^a | IC ₅₀ (µM) NA ^b | IC ₅₀ (µM) Act ^b | (k _{cat} /K _M) NA (10 ² M ⁻¹ s ⁻¹) ^c | (k _{cat} /K _M) Act (10 ² M ⁻¹ s ⁻¹) ^c | (k _{cat} /K _M) Act / (k _{cat} /K _M) NA |
|------------|--|--|--|---|--|---|
| ONC | 87.53 ± 0.32 | - | 0.46 ± 0.03 | - | 7.31 ± 0.11 | - |
| ONCQ1S | 84.74 ± 0.45 | - | 4.04 ± 0.78 | - | 2.60 ± 0.08 | - |
| ONCFL | 80.87 ± 0.09 | 28.23 ± 0.94 | 28.19 ± 0.78 | 0.37 ± 0.04 | 0.47 ± 0.06 | 1.27 ± 0.34 |
| ONCFLG | 80.51 ± 0.14 | 7.98 ± 1.91 | 11.77 ± 3.40 | 0.95 ± 0.16 | 1.10 ± 0.04 | 1.16 ± 0.25 |
| ONCFL2-C15 | ND | 15.60 ± 1.41 | 12.23 ± 1.51 | 0.56 ± 0.11 | 0.80 ± 0.47 | 1.43 ± 1.14 |
| ONCFL2-C16 | ND | 14.60 ± 1.30 | 12.97 ± 1.50 | 3.03 ± 0.41 | 2.38 ± 0.36 | 0.79 ± 0.22 |

^a La T_m (±SE) es va estudiar en 0.1 M MES-NaOH, pH 6.0 per DSC, a concentracions de 0.15-0.18 mM, tal i com es descriu a l'apartat de *Determinació de l'estabilitat conformacional dels zimògens*. (Metodologia).

^b La IC₅₀ (±SD) es va determinar en cèl·lules *Jurkat* en cultiu estudiant la viabilitat cel·lular per reducció de l'MTT utilitzant *CellTiter96*[®], com es descriu a l'apartat de *Citotoxicitat dels zimògens en cèl·lules en cultiu*. (Metodologia).

^c Els valors de k_{cat}/K_M (±SD) es determinaren per catalisi del substrat 6-FAM-dArUdAdA-6-TAMRA a 50 nM en tampó 0.1 M MES-NaOH, 0.1 M NaCl, pH 6.0, a 25 °C [390, 391].

NA. Forma no activada. Act. Forma activada. ND. No Determinat. -. No aplicable.

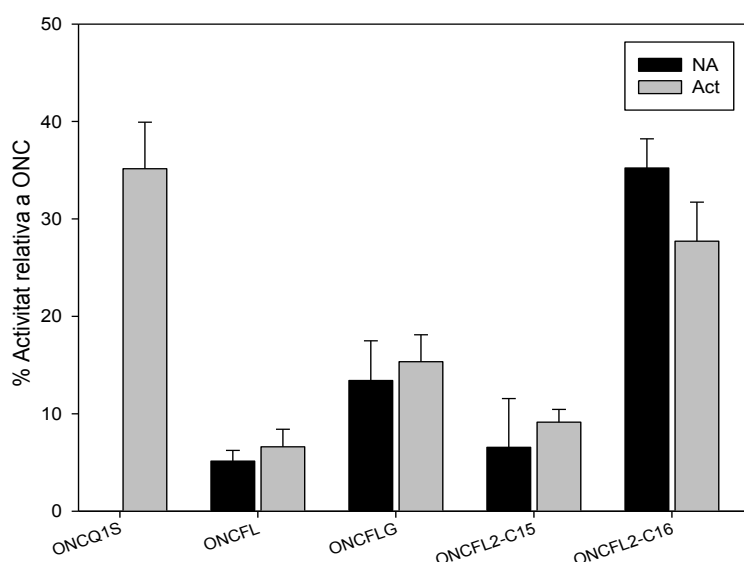


Figura 30. Activitat ribonucleolítica relativa dels zimògens d'ONC respecte ONC salvatge, abans i després del tractament amb la proteasa SK#1.

L'estudi es realitzà a 25 °C en 0.1 M MES-NaOH a pH 6.0, 0.1 M NaCl, amb 50 nM del substrat 6-FAM-dArUdAdA-6-TAMRA, i a una concentració de proteïna de 15 µM per l'ONC salvatge i 50 µM pels zimògens d'ONC i ONCQ1S. La forma precursora s'indica com a NA i la processada, com a Act.

En el cas dels zimògens ONCFL i ONCFLG, el tractament amb la proteasa SK#1 incrementà la seva eficiència catalítica tan sols en 1.27 i 1.16 vegades, respectivament. Es pot pensar que la disminució d'activitat observada entre els zimògens intactes i activats en relació a la variant ONCQ1S no és el resultat de la presència del *linker* intacte, sinó dels aminoàcids addicionals en els terminals natiu, amb independència de si estan o no connectats. Possiblement doncs, malgrat el tall de l'enllaç peptídic de la seqüència de bloqueig del centre actiu, els extrems peptídics creats podrien establir certes interaccions amb residus propers del cos de la proteïna, bloquejant igualment l'accés del substrat al centre actiu i impeding la seva degradació.

5.2.4. Disseny i anàlisi de l'activació i l'activitat de nous zimògens ONCFL2s

Havent obtingut els resultats anteriors, de recuperació d'una eficiència catalítica poc significativa en les onconases permutades ONCFL i ONCFLG, respecte els zimògens inactius, es decidí dissenyar i produir noves variants de zimògens, els FL2, a partir d'una variació de les seqüències FL amb dos punts de tall, IF*LETSGIF*LET (*Taula 8*), i estudiant dues longituds de *linker*, de 15 i 16 aminoàcids, creant els zimògens ONCFL2-C15 i ONCFL2-C16, respectivament. Amb aquestes variants s'esperava que amb el trencament de dos enllaços peptídics del *linker*, es provoqués el despreniment d'un fragment peptídic, evitant així el potencial bloqueig del centre actiu pels extrems peptídics un cop activats els zimògens amb la proteasa.

Incubant aquests dos nous zimògens amb la proteasa SK#1, s'observà (*Figura 29*) que requerien temps més llargs d'incubació respecte la diana FL simple, degut a una menor accessibilitat de la proteasa al punt de tall per estar aquest situat més als extrems del linker. En el cas de ONCFL2-C16, l'activació fou completa després d'incubar overnight amb la proteasa i, en canvi, per ONCFL2-C15 s'aconseguí arribar aproximadament al 70% d'activació utilitzant les mateixes condicions. Els zimògens ONCFL2-C15 i ONCFL2-C16 precursors presentaren una massa molecular de 13487.3 Da i 13539.9 Da, respectivament, mentre que una vegada activats la massa molecular es reduïa a 12754.1 Da i 12815.4 Da (*Taula 13*), concloent que efectivament es duia a terme l'escissió en els dos punts de la seqüència per part de la proteasa i es desprenia el fragment peptídic de 766 Da situat entremig. En aquest cas, esperàvem que els nous extrems formats en l'activació no fossin prou llargs per a ocloure el centre actiu en cas d'interaccions amb residus propers, de manera que sí que s'observés un increment d'activitat de la forma activa respecte a la no processada.

En analitzar la capacitat catalítica dels nous zimògens ONCFL2 (*Taula 14* i *Figura 30*), s'observà que la relació entre la k_{cat}/K_M de la RNasa respecte el zimogen seguia essent de poc més de 1, i fins i tot, pel zimogen ONCFL2-C16, amb una activitat basal comparable a la variant ONCQ1S, no es va observar un increment d'activitat.

Ens plantejarem la idoneïtat del substrat emprat. En el TAMRA que conté el tetranucleòtid – dArUdAdA- només trobem una sola diana, òptima per a la RNasa A i l'HP-RNasa, però no per ONC, per la preferència d'uracil al subseti B1 i guanina a B2 [70]. Es feren proves amb tRNAs de llevat com a substrat, però tampoc s'observaren diferències entre ambdues formes dels zimògens assajats (dades no mostrades).

Vistos els resultats obtinguts, a més de prosseguir amb la caracterització dels zimògens d'ONC, en relació a la seva capacitat d'internalització i d'evasió de l'RI, la citotoxicitat en cèl·lules en cultiu abans i després de l'activació, i la seva estabilitat conformacional, es decidí també estudiar l'estructura tridimensional del zimogen més atractiu per la major eficiència

d'activació, ONCFLG, amb la intenció d'aprofundir en el coneixement del procés de catàlisi per part de l'ONC i els respectius zimògens i poder explicar el baix increment d'activitat ribonucleolítica aconseguit després de l'acció de la proteasa SK#1. Per altra banda, es contemplà la possibilitat que la recuperació d'activitat fos més elevada amb la creació de zimògens a partir d'HP-RNasa, que presenta entre 3 i 5 ordres més d'activitat que l'ONC.

5.2.5. Els zimògens d'ONC internalitzen eficientment i evadeixen l'RI *in vitro*

Internalització del zimogen ONCFLG-S120C.

La internalització d'ONC en cèl·lules eritroleucèmiques K562 té lloc ràpidament i s'assoleix un marcatge cel·lular màxim al cap de 45 minuts, englobada en endosomes [203]. Per avaluar la capacitat d'internalització dels zimògens d'ONC, es construí la variant ONCFLG-S120C amb la Ser C-terminal substituïda per Cys (Ser72Cys en la numeració d'ONC), i es va marcar fluorescentment conjugant la nova cisteïna amb *Alexa Fluor® 488 C5 maleimide*. El zimogen ONCFLG-S120C marcat amb *Alexa* s'incubà amb cèl·lules *Jurkat* i es va monitoritzar per microscòpia confocal la seva internalització a diferents temps en cèl·lules amb les membranes i els nuclis tenyits, com es detalla a l'apartat Internalització dels zimògens en cèl·lules en cultiu., del punt 4.3.2.4. de Metodologia. Aquest estudi va permetre demostrar, com s'observa a la *Figura 31*, que el zimogen marcat internalitza ràpidament i eficient, detectant-se a l'interior de les cèl·lules 3 h després d'afegir-lo al cultiu, a una concentració de tan sols 2 µM del zimogen marcat. La internalització incrementa fins a 12 h després de la incubació. A les imatges, s'observa la coincidència entre els punts d'acumulació de proteïna i les zones corresponents a la membrana plasmàtica, entrant englobat segurament en vesícules. Aquests resultats podrien relacionar-se amb el procés d'internalització per endocitosi a través d'endosomes descrit per a l'ONC [203].

Capacitat dels zimògens d'evadir l'inhibidor de ribonucleases (RI).

L'habilitat d'una ribonucleasa d'evadir la unió amb l'inhibidor de ribonucleases és d'elevada importància per a la seva activitat citotòxica. Així, el fet que l'ONC salvatge escapi a l'RI és un dels motius de la seva gran citotoxicitat [82, 113]. S'analitzà la capacitat d'evasió a l'RI per part dels zimògens mitjançant la visualització de la degradació del substrat 16S-/23S- rRNA d'*E. coli* en absència o presència d'hRI. Tal i com era d'esperar pels zimògens d'ONC i per la seva proteïna parental, s'observà degradació del substrat d'RNA tant en presència com en absència d'inhibidor, com es mostra a la *Figura 32*, indicant que no hi havia inhibició significativa en la majoria de casos.

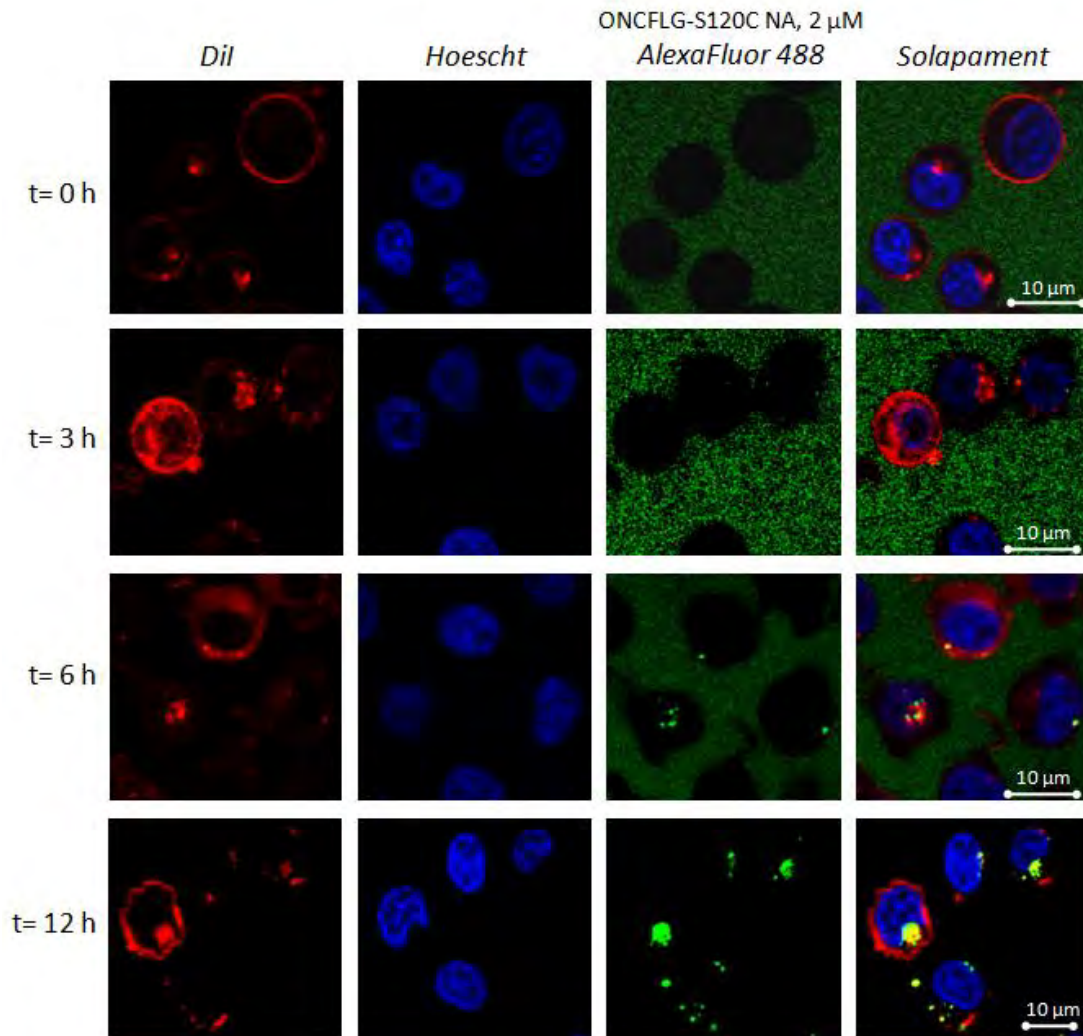


Figura 31. Internalització del zimogen ONCFLG-S120C conjugat amb el fluoròfor Alexa Fluor® 488 C5 maleimide (Molecular Probes, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) en cèl·lules *Jurkat* en cultiu. Es mostra la imatge captada per microscòpia confocal a diferents temps, incubant les cèl·lules amb 2 μ M de zimogen marcat amb el fluoròfor (en verd). La membrana cel·lular i els nuclis es troben tenyits amb *Dil* (vermell) i *Hoescht* (blau), respectivament. S'indica amb una barra la longitud corresponent a 10 μ m, en la columna de solapament de les imatges.

En els zimògens ONCFL2 s'observà certa inhibició per l'RI, especialment en la forma no activada. És difícil pensar que partint d'ONC, que no és sensible a l'RI, i afegint la seqüència *linker*, la proteïna pugui unir-se a inhibidor. Tot i que la seqüència *linker* podria ocasionar una alteració de càrregues exposades de la proteïna que afavorís les interaccions electrostàtiques i la unió amb l'RI, cal considerar que la seqüència FL2 presenta un residu àcid (E) de més respecte FL i 2 més respecte YP, contribuint més aviat a la repulsió entre zimogen i RI, predominantment de càrrega negativa. Així, resulta difícil explicar la inhibició d'aquestes variants. Malgrat tot, és la inhibició de la RNasa processada la que ens afectaria a la seva funcionalitat *in vivo*.

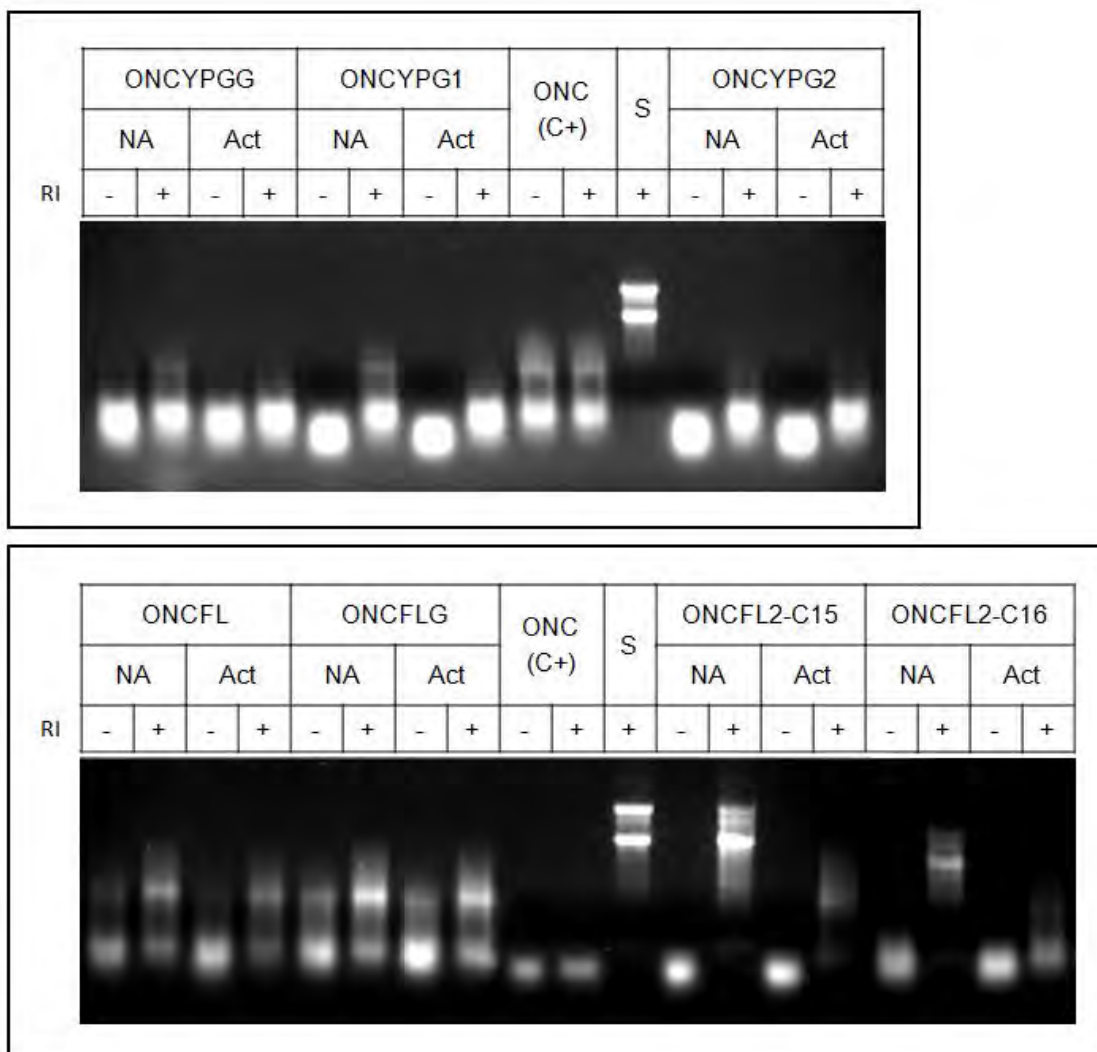


Figura 32. Inhibició de l'activitat ribonucleolítica dels zimògens d'ONC de l'estudi per part de l'hRI.

Visualització de la degradació de 4 µg de substrat 16S- i 23S- rRNA d'*E. coli*, amb 0 o 40 U d'hRI (indicat com a - o +), en 20 µl de 20 mM HEPES, 125 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7.0 a 37 °C, amb una quantitat de ribonucleases de 15 ng per l'ONC salvatge i de 150 ng pels zimògens d'ONC. El control d'integritat del substrat s'indica com a "S". A cada zimogen s'indica la forma intacta (NA) i processada (Act). Les variants de zimògens assajats es detallen a la *Taula 8*. Per a les ribonucleases sensibles a l'RI s'observa el substrat intacte en presència d'RI (+). Per a les variants resistents, s'observa la banda de substrat degradada (més inferior en el gel) tant en absència com en presència d'RI.

5.2.6. Els zimògens d'ONC presenten baixa citotoxicitat en cèl·lules en cultiu

Citotoxicitat amb activació in vitro.

Un agent terapèutic no ha de presentar toxicitat per les cèl·lules sanes, i per tant els zimògens de ribonucleases precursors haurien de ser, de forma ideal, innocus per les cèl·lules no infectades pel HIV. És necessari, per tant, comprovar que la citotoxicitat dels zimògens no activats sigui baixa. Per altra banda, perquè puguin presentar una citotoxicitat selectiva, cal

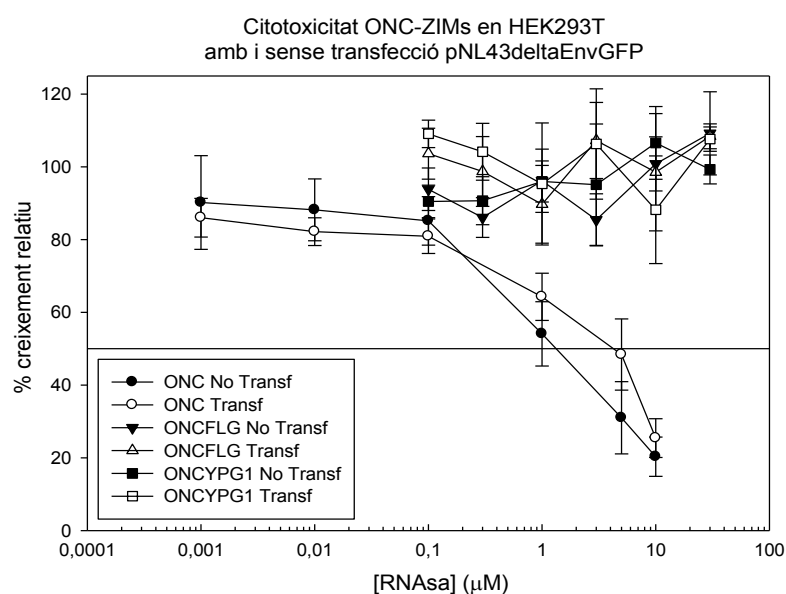
que s'observi un augment significatiu de citotoxicitat entre la forma activada i el precursor. La citotoxicitat d'ONCFL i ONCFLG de les formes precursora (NA) i processada (Act) es va comparar amb l'ONC salvatge i ONCQ1S com a controls, mesurant els valors respectius d'IC₅₀ en cèl·lules *Jurkat*. Com s'observa a la *Taula 14*, tots els zimògens precursors assajats presentaren una citotoxicitat menor als enzims parentals, amb uns valors de IC₅₀ entre 2 i 7, o 17 i 61 vegades més grans en comparació als valors de ONCQ1S i ONC, respectivament. Així, les prorigonucleases han perdut citotoxicitat respecte l'ONC salvatge. En el cas de les formes madures, seria desitjable un augment significatiu de toxicitat, el qual no s'observà en cap dels zimògens estudiats.

Citotoxicitat amb activació in vivo, en cèl·lules transfectades.

L'eficiència d'internalització dels zimògens activats podria ser diferent de la dels precursors. Per tal de demostrar realment si els zimògens eren funcionals o no, es realitzà un estudi de citotoxicitat dels zimògens d'ONC amb activació *in vivo*. Aquest experiment es realitzà en cèl·lules en cultiu simulant una infecció: transfectant-les amb un vector que expressés proteïnes del HIV. Així, utilitzant els zimògens ONCYPG1 i ONCFLG com a model, s'avaluà la seva capacitat citotòxica en la línia HEK293T, amb o sense transfecció amb el vector pNL4.3ΔEnvGFP [393], com es detalla a l'apartat *Citotoxicitat dels zimògens en cèl·lules en cultiu., amb activació in vivo*. Idealment, en aquest estudi seria d'esperar que sense transfecció el zimogen no s'activaria i no presentaria citotoxicitat mentre que a les cèl·lules transfectades, en haver-hi presència de la proteasa del HIV-1, es podria dur a terme el processament específic de la seqüència que bloqueja el centre actiu dels zimògens, recuperant així la seva activitat RNasa i la seva toxicitat. Analitzant el zimogen activat (amb transfecció) respecte el no activat (sense transfecció) no s'observà cap increment de citotoxicitat (*Figura 33*).

Figura 33. Corbes de citotoxicitat d'ONCFLG i ONCYPG1 amb activació in vivo.

Citotoxicitat dels zimògens ONCYPG1 i ONCFLG en cèl·lules HEK293T, per les formes intactes, sense transfecció (No Transf), i activades *in vivo* (Transf, amb transfecció amb el vector pNL4.3ΔEnvGFP [393]), en comparació amb l'ONC.



5.2.7. Estudi estructural i dinàmica del zimogen ONCFLG per NMR

Resolució de l'estructura tridimensional del zimogen ONCFLG i canvis observats.

Per tal de comprendre millor i poder explicar la poca activitat dels zimògens, s'estudià l'estructura tridimensional de la variant ONCFLG. S'escollí aquest zimogen com a model dels zimògens d'ONC per ser el que presentava millor activació amb la proteasa. Les coordenades estructurals es dipositaren a la base de dades *Protein Data Bank* (PDB) amb el codi d'accés 2LT5 (<http://www.rcsb.org>), i els desplaçaments químics del zimogen es recolliren a *Biological Magnetic Resonance Bank* (BMRB), amb el codi d'accés 17973 (<http://www.bmrwisc.edu>). Les estructures, obtingudes utilitzant el protocol de càlcul descrit a la secció d'*Estudis estructurals del zimogen ONCFLG per Ressonància Magnètica Nuclear (NMR)*, de *Metodologia*, satisfieren els requisits estructurals i presentaren potencials d'energia baixos (*Taula 15*).

Taula 15. Estadística estructural de les 20 millors estructures NMR del zimogen ONCFLG.

| NOE Distance and Dihedral Constraints | | |
|---|-----------|------------------|
| Nº short-range distances ($ i-j \leq 1$) | | 1059 |
| Nº medium-range distances ($1 < i-j < 5$) | | 288 |
| Nº long-range distance ($ i-j \geq 5$) | | 678 |
| Nº restraints from S-S bonds | | 24 |
| Nº angular restraints (ϕ, ψ) | | 149 |
| Nº total restraints | | 2198 |
| Nº restrictions/residue | | 18.3 |
| Structure Calculation | | |
| CYANA target function value (min, mean, max) | | 1.54, 1.69, 1.96 |
| Maximum distance violation (Å) (min, mean, max) | | 0.12, 0.20, 0.47 |
| Maximum dihedral angle violation (°) (min, mean, max) | | 2.32, 3.58, 9.51 |
| Average AMBER energy (kcal/mol) | | -3926 |
| Average AMBER Electrostatic energy (kcal/mol) | | -7769 |
| RMSD bond lengths from ideal geometry (Å) | | 0.01 ± 0.001 |
| RMSD angles from ideal geometry (°) | | 2.171 ± 0.01 |
| Averaged pairwise RMSD (Å) (backbone, heavy atoms) | | |
| Global (1-120) | 0.84±0.31 | 1.31±0.26 |
| Structured region (1-32, 49-120) | 0.32±0.07 | 0.96±0.07 |
| Unstructured linker (33-48) | 1.47±0.61 | 2.13±0.75 |
| Secondary structure (helices and sheets) | 0.25±0.06 | 0.84±0.08 |
| α-helices (51-58, 70-72, 90-94) | 0.21±0.06 | 0.95±0.16 |
| β-sheets (5-12, 14-18, 23-29, 59-60, 81-86, 103-107, 111-118) | 0.23±0.05 | 0.75±0.09 |
| Ramachandran Plot Analysis (%) | | |
| Most favored regions | | 74.9 |
| Additional allowed regions | | 24.7 |
| Generously allowed regions | | 0.0 |
| Disallowed regions | | 0.0 |

A la *Figura 34*, es pot apreciar l'estructura global ben definida obtinguda pel zimogen ONCFLG, mantenint la mateixa estructura terciària d'altres membres de la superfamília de la RNasa A, i particularment similar a l'ONC salvatge [93, 100], a altres variants amb mutacions puntuals [70, 103] i també a les ribonucleases citotòxiques de la granota toro *Rana catesbeiana* [408, 409]. El segment connector Gly33-Gly48 de 16 residus (en taronja), s'estén per sobre el nucli de la proteïna ocupant la zona còncava de l'estructura en forma de ronyó comuna de les ribonucleases homòlogues a l'RNasa A. D'aquesta manera, aquest connector flexible pot obstaculitzar l'accés al centre actiu, que conté la tríada catalítica: His25, His58 i Lys79, característica de la superfamília de la RNasa A, junt amb la Ser49 i Lys57, exclusiva de les ribonucleases de granota (a l'ONC salvatge: His97, His10 i Lys31; Pyr1 i Lys9) [93]. És interessant remarcar que el valor RMSD (*Root Mean Square Deviation*) del *linker* indica que aquest no adopta estructura secundària regular. Aquest valor, que permet quantificar el grau de plegament/desplegament de l'esquelet polipeptídic, és de 1.47 Å pel segment connector, força més gran que el de 0.32 Å que s'obté per la resta de la proteïna (*Taula 15*). És remarcable la diferència amb la previsió estructural en hèlix- α del modelat fet durant la fase de disseny dels zimògens (*Figura 28B*).

A nivell general, comparant l'estructura del zimogen ONCFLG amb la d'ONC (*Figura 35*), podem observar una lleugera obertura de la molècula entre els lòbuls V1 i V2, fent que l'esclatxa central sigui més gran. A nivell d'elements d'estructura secundària, les tres α -hèlix Leu52-His58, Ile70-Ser72 i Pro89-Ala94 amb numeració del zimogen, concorden molt bé amb les hèlixs presents a l'ONC salvatge (Trp3-His10, Cys19-Ile22 i Pro41-Lys49; veure equivalències a la *Figura 28C*). Cal comentar que la segona hèlix d'ONCFLG presenta una estructura d'hèlix- 3_{10} , causant una reestructuració del *loop* que connecta aquesta hèlix amb la primera cadena- β i en canvi, l'hèlix- 3_{10} contigua a l'hèlix- α 3 típica de la proteïna salvatge, és absent. Les cadenes β 5 (Tyr5-Asn12), β 6 (Phe14-Cys18), β 7 (Pro23-Val29), β 0 (Ile59-Thr60), β 1 (Lys81-Tyr86) i β 4 (Phe111-Val118), són també equivalents a les de l'ONC nativa, exceptuant la zona homòloga a β 3 (residus Lys103-Thr107 del zimogen) que no presenta estructuració. La variació en la disposició del *loop* β 4- β 5 en relació a l'ONC es pot explicar per l'absència de l'enllaç peptídic entre els residus 72-73, punt on es situen els extrems de nova creació.

Una inspecció detallada de l'estructura d'ONCFLG ens permet observar diferències més localitzades i en l'orientació d'alguns residus concrets. Es poden constatar canvis notables comparant la disposició dels residus responsables de la catàlisi d'ONCFLG respecte els residus equivalents en l'estructura cristal·logràfica determinada per raigs X de l'ONC (1ONC) [93] o del complex ONC-d(AUGA) (2I5S) [70] (*Figura 36A*). Les variacions són més evidents pels residus del centre actiu o subseti P1, tant per la tríada catalítica His58, Lys79 i His25, com pels altres residus característics de les ribonucleases d'amfibi Ser49 i Lys57 (mostrats en vermell). En canvi, els aminoàcids que conformen els subsetis B1 i B2 (en taronja fosc i clar, respectivament) manifesten diferències menors.

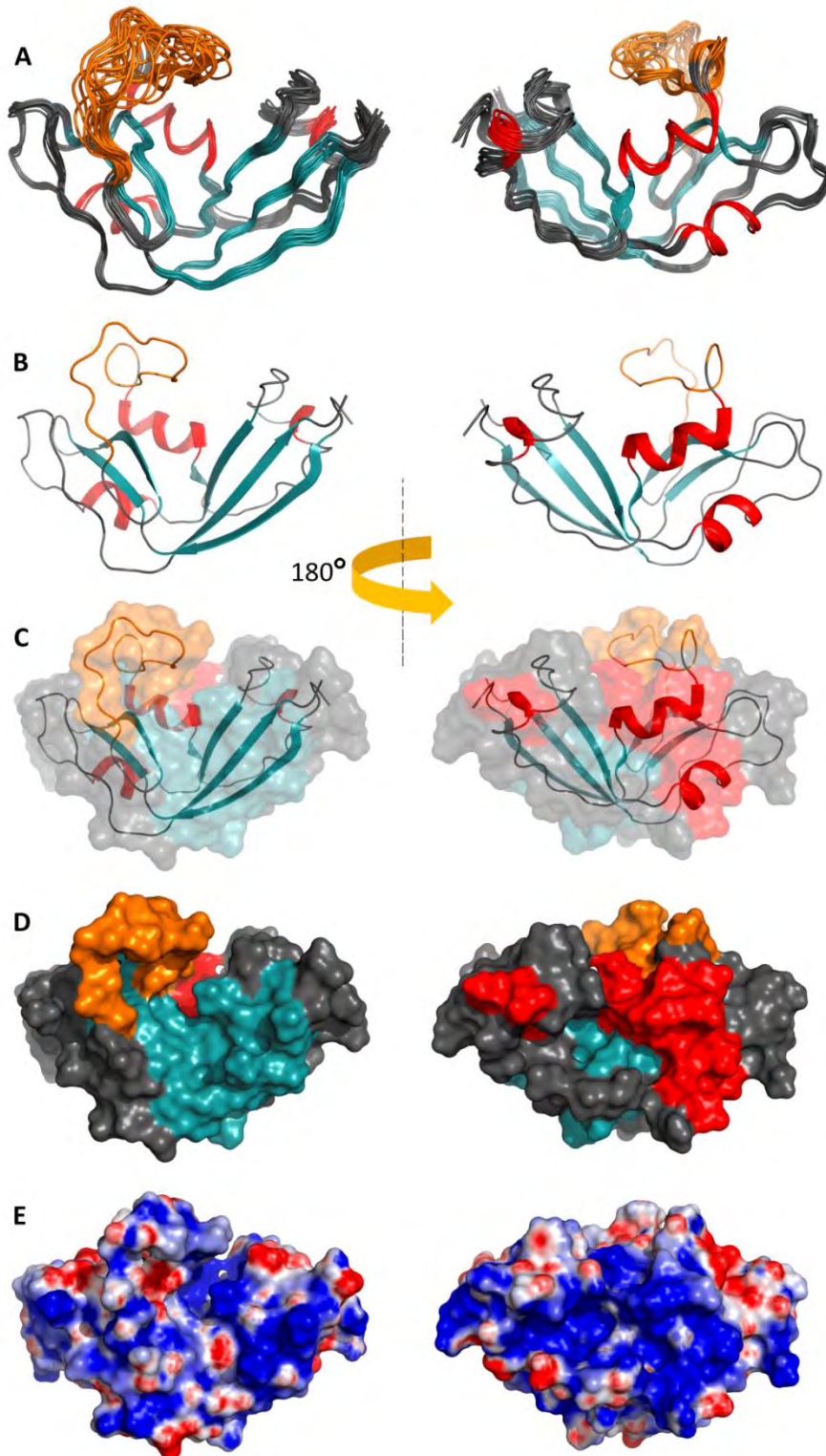


Figura 34. Estructura tridimensional del zimogen ONCFLG resolta per Ressonància Magnètica Nuclear (2LT5).

A) Superposició de les 20 conformacions d'ONCFLG amb el mínim d'energia. **B)** Representació en *cartoons* d'una conformació representativa de la família d'estructures amb l'energia minimitzada. **C)** Estructura anterior sobreposada a una representació de la superfície de la proteïna. **D)** Superfície del zimogen ONCFLG. A **B)**, **C)** i **D)** el *linker* no estructurat (Gly33-Gly48) es mostra en taronja i la resta de l'esquelet proteic està acolorit en funció de l'estructura secundària, les zones en hèlix- α en vermell i els fulls- β , en blau turquesa. **E)** Potencial electrostàtic del zimogen ONCFLG. S'ha calculat amb el [servidor web APBS](http://www.expasy.org/), combinat amb [PROPKA](http://www.csbio.com/) [189], a partir del fitxer pdb del zimogen, a pH 7.0. Les zones amb càrrega neutra es mostren en blanc, mentre que les de càrrega negativa en vermell, i les de càrrega positiva, en blau. Les vistes es troben rotades 180° l'esquerra respecte la dreta. Les imatges s'han creat amb el programa PyMol (<http://pymol.sourceforge.net/>).

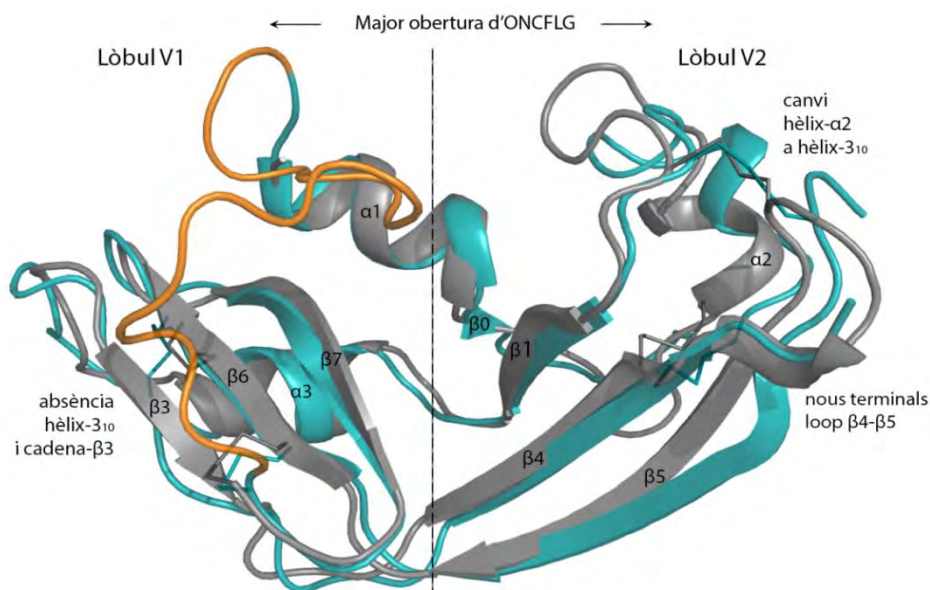


Figura 35. Canvis estructurals globals observats al zimogen ONCFLG en comparació amb l'ONC.

Es representa l'estructura de les proteïnes en *cartoons*, en gris per a ONC (1ONC [93]) i en blau turquesa per a ONCFLG, i es remarca el connector de bloqueig del centre actiu del zimogen en taronja. Els ponts disulfur s'observen del mateix color que cada proteïna, en barres. S'anoten les diferències més remarcables. La figura s'ha generat amb PyMol (<http://pymol.sourceforge.net/>).

Canvis observats al subseti catalític P1.

I) La pèrdua d'un pont d'hidrogen entre Ser49 i Lys57 (Pyr1 i Lys9 a l'ONC) ocasiona una elevada mobilitat de Lys57:

L'Oγ de la Ser49, que ha de substituir el Oε de Pyr1 de l'N-terminal natiu, a diferència de l'ONC salvatge no està unit per pont d'hidrogen amb el Nξ del residu Lys57 (Lys9 a l'ONC) i conseqüentment, la cadena lateral de la Lys57 presenta una elevada mobilitat, allunyant-se del centre actiu (Figura 36A).

II) La cadena lateral de Lys79 (Lys31 a l'ONC) rota lluny del centre actiu d'ONCFLG:

S'ha proposat que la Lys79 treballa conjuntament amb la Lys57 per establir l'acumulació de càrrega negativa a un oxigen d'un grup fosforil durant la catàlisi [70, 93, 96]. No obstant, la Lys79 sobresurt de l'estructura d'ONCFLG, en lloc d'apuntar cap a l'interior del centre actiu com fa la seva equivalent Lys31 a l'ONC (Figura 36A). Segurament succeeix a causa de la major mobilitat de la Lys57, comentada anteriorment.

III) Augmenta la mobilitat de les histidines catalítiques His58 i His25 (His10 i His97 a l'ONC):

Com a conseqüència dels moviments de la Lys57 a l'estructura d'ONCFLG, l'anell d'imidazol del residu catalític His58 sembla oscil·lar verticalment entre dues conformacions que difereixen en aproximadament 90°, no observat per a l'ONC, disposant-se majoritàriament en una

localització perpendicular respecte His10 de l'ONC. Finalment, l'altra histidina catalítica, la His25, presenta el seu anell imidazol ocupant un conjunt de conformacions a mig camí entre les dues conformacions del seu residu homòleg, la His97A, activa, observada en el complex ONC-d(AUGA) (2I5S [70]) i la His97B, inactiva i ocupant la cavitat del centre actiu, en l'estructura de l'ONC lliure (1ONC [93]) (*Figura 36B i C*).

Canvis observats als subconjunts de fixació del substrat B1 i B2.

Si ens fixem en els residus del subconjunt B1 (*Figura 36A*, acolorits en taronja fosc), podem veure que els residus Asp115 i Thr83 (Asp67 i Thr35), implicats en el reconeixement específic d'Uracil [106], no presenten diferències significatives respecte l'ONC lliure (en negre). La Phe26 presenta una disposició similar que la Phe98, però amb un lleuger gir de la cadena lateral. Aquest residu estableix ponts d'hidrogen amb el substrat a través de la seva cadena principal. Per altra banda, la Lys81 presenta una elevada mobilitat, també detectada al seu residu equivalent Lys33 de l'ONC, però disposada molt més acostada al centre de B1. A la cavitat B2 (residus mostrats en taronja clar a la *Figura 36A*), no s'observen diferències significatives entre els residus Thr17 i Glu19 respecte els seus homòlegs Thr89 i Glu91.

Variacions als residus del cluster hidrofòbic.

Comparant els residus situats al cluster hidrofòbic del lòbul V2 del zimogen amb l'ONC (*Figura 37*), es poden observar canvis d'orientació i localització d'alguns d'ells, degut a la presència del connector i a la reestructuració de la zona pel canvi de la segona hèlix, d'hèlix- α a hèlix-3₁₀, i per l'emplaçament dels nous terminals al *loop* β 4- β 5. Mentre que Phe84 i Val65 manifesten poca variació respecte als residus Phe36 i Val17 de la proteïna salvatge, els residus Ile70 i Leu75 d'ONCFLG disposen la cadena lateral perpendicularment als equivalents Ile22 i Leu27 de l'ONC. Finalment, la diferència més remarcable es troba en Met71 i Phe76 (Met23 i Phe28 a l'ONC), allunyant-se del nucli hidrofòbic, i presentant el primer una elevada llibertat conformacional.

Increment d'1 Å a la distància C α -C α entre les Cys18-Cys96 respecte a l'ONC.

Es pot observar un rearranjament local subtil prop de les Cys18-Cys96 respecte als residus homòlegs 90-48 de l'ONC (*Figura 38*). Al zimogen ONCFLG s'observa un increment d'aproximadament 1 Å de longitud a la distància C α -C α d'aquestes cisteïnes, probablement relacionat amb l'absència de l'hèlix-3₁₀ que segueix l'hèlix- α 3 que sí que es troba a l'ONC [93] (*Figura 28C*).

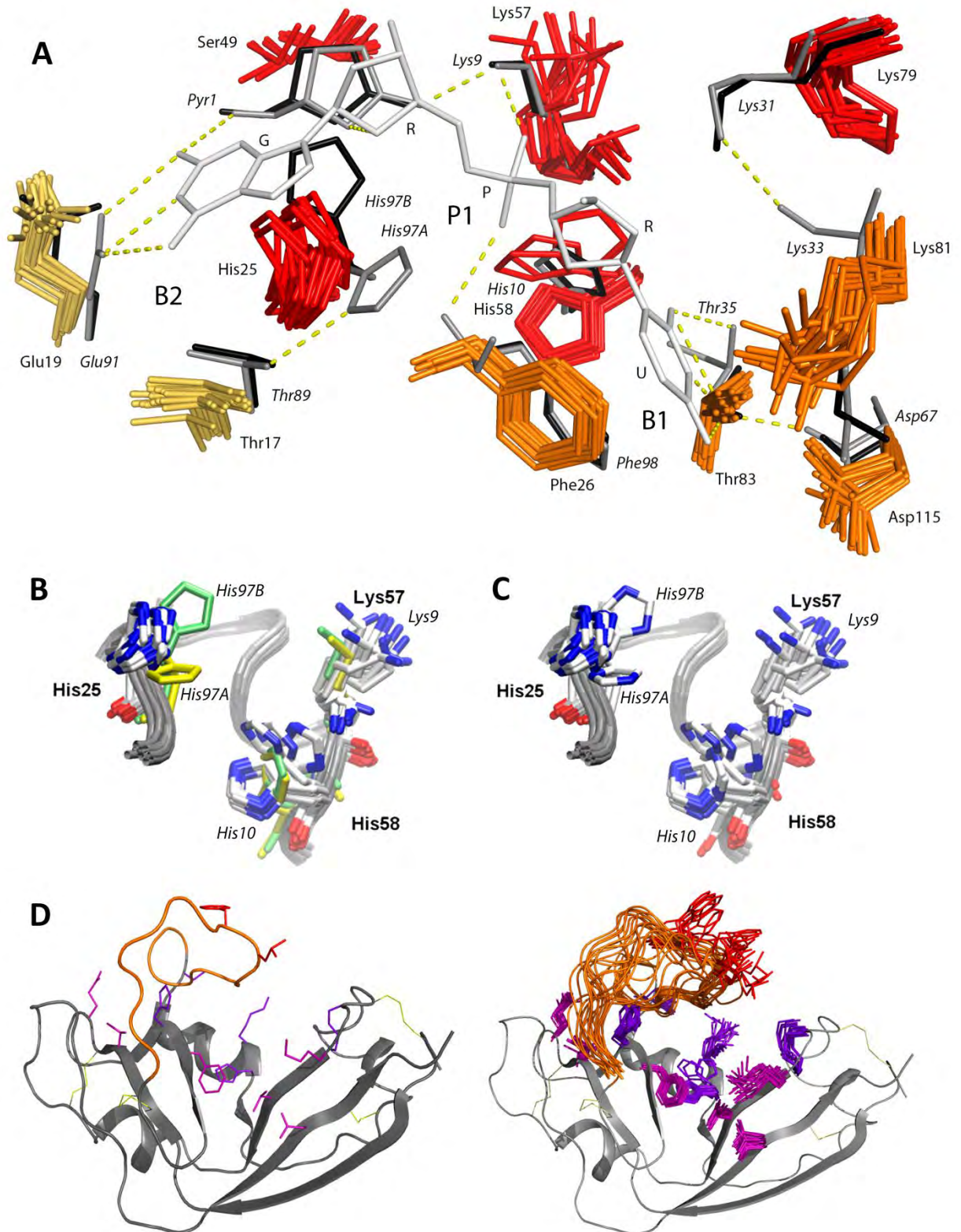


Figura 36. Comparació dels residus catalítics del zimogen ONCFLG i de l'ONC lliure i acomplexada a un substrat.

A) Detall de les diferents conformacions dels subetis P1 (en vermell), B1 (en taronja fosc) i B2 (en taronja clar) d'ONCFLG (2LT5) respecte els residus homòlegs d'ONC (1ONC [93] en negre, i ONC-d(AUGA) 2I5S [70], en gris). El substrat ribonucleotídic es mostra en blanc. G (guanina), R (ribosa), P (fosfat), U (uracil). S'indica els residus corresponents al zimogen ONCFLG, i en cursiva els equivalents en la numeració d'ONC. **B)** Superposició de les diferents conformacions estructurals de la tríada catalítica His58, His25 i Lys57 d'ONCFLG (en colors CPK) i els equivalents His10, His97 i Lys9 d'ONC (en verd llima) i del complex ONC-d(AUGA) (en groc). **C)** Igual que B, excepte

que tots els residus es mostren en colors CPK per visualitzar com els N δ 1 i N ϵ 2 de la His25 intercanvien la seva posició mitjançant rotació entorn l'angle dièdric χ_2 , entre les conformacions de la His97A observada al complex ONC-d(AUGA) i la His97B observada a l'ONC. **D)** Situació dels residus de P1, B1 i B2 dins l'estructura general del zimogen ONCFLG. A l'esquerra, una de les conformacions obtingudes per NMR. A la dreta, es mostra una conformació en la globalitat de la proteïna, però totes les 20 conformacions obtingudes tant pel segment connector Gly33-Gly48 (en taronja), junt amb els residus Phe40-Leu41 corresponents al punt de tall (en barres roges), com pels residus catalítics de P1 His58, Lys79, His25, Ser49 i Lys57 (en lila), i els residus de B1 i B2 Lys81, Thr83, Asp115, Phe26, Thr17 i Glu19 (en morat). Les figures A i D s'han realitzat amb PyMol (<http://pymol.sourceforge.net/>), mentre que les B i C, s'han generat utilitzant VMD [410].

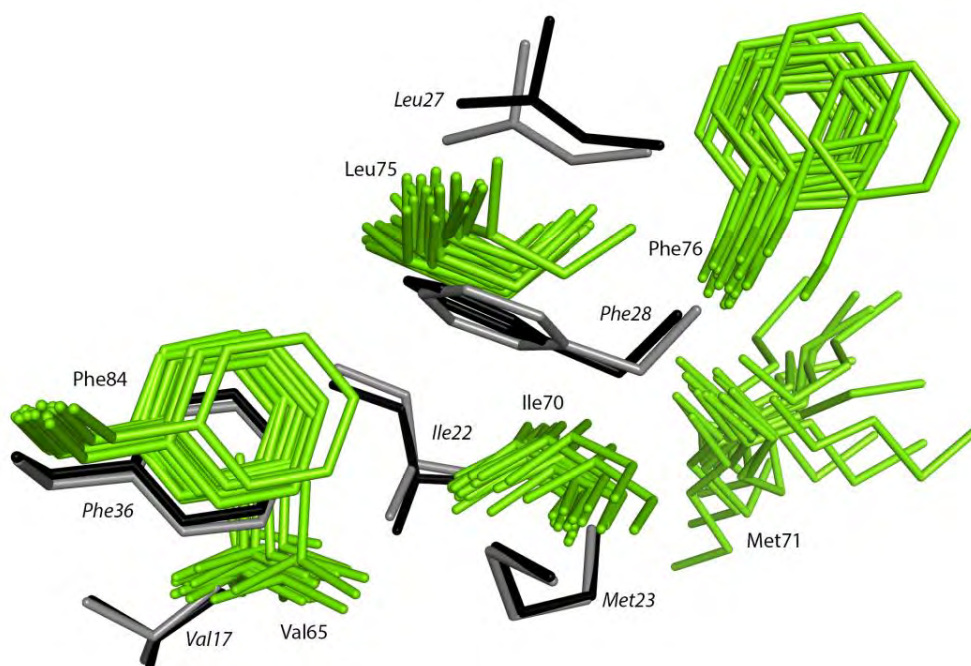
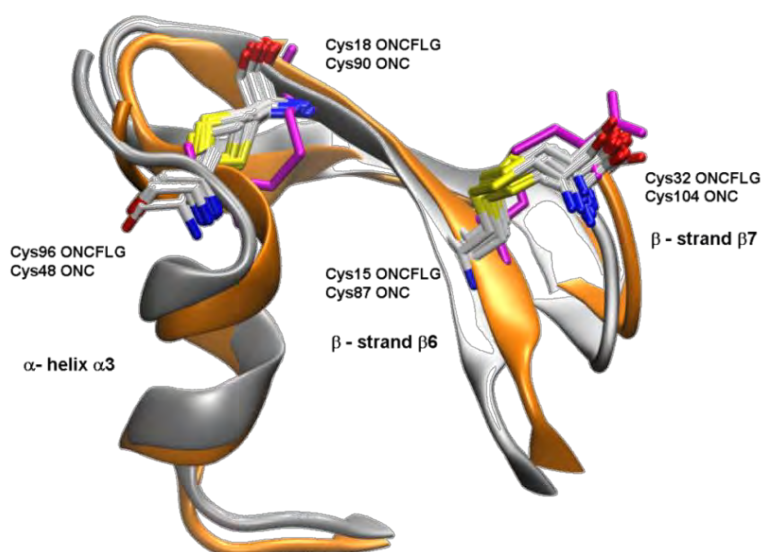


Figura 37. Sobreposició de les conformacions dels residus del cluster hidrofòbic del zimogen ONCFLG amb l'ONC. Es mostren les diferents conformacions del zimogen ONCFLG (2LT5) en verd, solapades sobre l'estructura de l'ONC (1ONC [93]) i l'enzim acomplexat a un substrat ONC-d(AUGA) (2I5S [70]), en negre i gris, respectivament. S'indica els residus corresponents a ONCFLG i, en cursiva, els equivalents en la numeració d'ONC. La imatge s'ha creat amb el programa PyMol (<http://pymol.sourceforge.net/>).

Figura 38. Comparació dels ponts disulfur Cys18-Cys96 i Cys15-Cys32 del zimogen ONCFLG amb l'ONC.

El zimogen ONCFLG (2LT5) es mostra en blanc, i les diferents conformacions de les Cys18-Cys96 (que connecta el full- β 6 i l'hèlix- α 3) i Cys15-Cys32 (que connecta el full- β 6 i el full- β 7) d'ONCFLG es mostren en colors CPK. L'ONC (1ONC [93]) es mostra en taronja i les cisteïnes homòlogues a les anteriors, Cys90-Cys48 i Cys87-Cys104, respectivament, es mostren en magenta. Aquesta figura s'ha generat amb VMD [410].



Unió d'un anàleg de substrat al zimogen ONCFLG.

Per avaluar experimentalment si el connector de bloqueig del centre actiu realitzava la seva funció afectant la interacció amb el substrat, es va decidir provar la capacitat d'unió a ONCFLG de l'anàleg de substrat no hidrolitzable d[UGG]₃. Es va observar la formació d'un precipitat blanc immediatament després de barrejar d[UGG]₃ amb ¹⁵N-ONCFLG. Després de la centrifugació del tub de NMR, es va registrar un espectre HSQC els pics del qual tenien en essència els mateixos desplaçaments químics que ¹⁵N-ONCFLG en absència de d[UGG]₃. Això suggerí que d[UGG]₃ i ¹⁵N-ONCFLG es combinen per formar un complex insoluble, però que l'excés de ¹⁵N-ONCFLG roman en solució. ONCFLG està carregat positivament a pH 5.19, però s'espera que presenti càrrega negativa per sobre de pH 8, així, es raonà que incrementant el pH es podria debilitar les interaccions electrostàtiques suposadament inespecífiques entre d[UGG]₃ i ¹⁵N-ONCFLG i es permetria el reconeixement i unió de l'oligo al centre actiu. El precipitat persistí elevant el pH a 6.35, però es dissolgué a un pH de 7.25, donant una solució transparent.

Aprofitant la informació continguda als espectres 3D ¹H-¹⁵N HSQC-TOCSY i HSQC-NOESY registrats a pH 7.25, i les assignacions anteriors obtingudes a pH 5.2 [411], va ser possible assignar fàcilment els espectres 2D ¹H-¹⁵N HSQC i la majoria dels pics presents als 2D ¹H NOESY. Els desplaçaments químics observats als espectres 2D ¹H-¹⁵N HSQC de la cadena principal de ¹⁵N-ONCFLG, a un pH de 7.25-7.28 amb presència o absència de d[UGG]₃ resultaren ser essencialment els mateixos, indicant que no hi havia canvis conformationals entre les dues estructures. A més, basant-se en els resultats de l'experiment ¹H-¹⁵N HSQC dissenyat per revelar senyals creuades entre els àtoms Nδ₁, Hε₁, Nε₂ i Hδ₂ dels anells imidazol de les histidines, s'observà que la His77 (que es troba exposada al solvent) es trobava majoritàriament en l'estat carregat, mentre que la His58 era principalment neutra en el tautòmer H-Nδ₁. Els resultats per la His25 foren menys conclouents, però suggeriren que en les condicions assajades el seu anell d'imidazol és principalment neutre i adopta una barreja d'estats tautomèrics. Pel mateix experiment realitzat amb ¹⁵N-ONCFLG en presència de d[UGG]₃, els resultats foren similars.

Només s'observà un efecte substancial als nuclis ¹Hα dels residus Phe54 i Gln55 propers al centre actiu. Aquests resultats contrasten amb la forta pertorbació dels desplaçaments químics dels nuclis del centre actiu de la RNasa A, incloent la His catalítica, després de la unió amb un anàleg de substrat [412]. Finalment, no es van poder assignar NOEs intermoleculares entre d[UGG]₃ i ¹⁵N-ONCFLG de forma no ambigua, mentre que se n'han detectat més de vint entre la RNasa A i els seus anàlegs de substrat. S'ha descrit que la K_M dels substrats d'RNA que s'uneixen a ONC i la K_D dels anàlegs de substrat són relativament elevades (del rang de 0.1 mM), la qual cosa pot explicar la baixa activitat ribonucleolítica de l'ONC en comparació amb la RNasa A [96]. Segons aquests autors, la unió del substrat amb l'ONC és afeblida en presència de sal. D'acord amb aquestes dades, es van repetir els experiments de NMR a pH 7.90 i 8.97

disminuint la força iònica. Tampoc es van poder identificar NOEs intermoleculars no ambigus i es van obtenir poques diferències significatives en el desplaçament químic. En aquestes condicions, la His58 es trobava encara principalment en el tautòmer H-N δ_1 , i tant la His25 com la His77 semblen presentar majoritàriament càrrega neutra i equilibrar-se entre els tautòmers H-N δ_1 i H-N ϵ_2 .

La forma processada d'ONCFLG podria estar bloquejant l'accés del substrat al centre actiu.

Per determinar els canvis estructurals al zimogen ONCFLG provocats pel processament de l'enllaç peptídic F*L per part de la proteasa HIV-1 PR, es van obtenir les assignacions per ressonància del zimogen activat per la proteasa, seguint la metodologia utilitzada per la proteïna no hidrolitzada [411]. Es comprovà electroforèticament que la forma marcada amb ^{15}N era activada correctament per al proteasa SK#1. La *Figura 39A* mostra una comparativa dels espectres bidimensionals ^1H - ^{15}N HSQC entre les formes activada (en vermell) i no activada (en gris) d'ONCFLG. Com s'esperava, el senyal HN corresponent a la Leu41 no s'observa en la forma activada, ja que la hidròlisi per part de la proteasa de l'enllaç peptídic entre Phe40-Leu41 converteix l'enllaç peptídic -CO-HN- en els grups -COO $^-$.. H $_3$ N $^+$ -. La majoria dels senyals HN conserven el desplaçament químic després de l'escissió. Els més afectats pertanyen als residus Phe40 i Glu42, que flanquegen el lloc de tall per la proteasa HIV-1 PR, seguits per residus situats en el segment connector (Ser44, Leu45, Ser46) o just al costat d'aquest (Ser49, Asp50, Trp51, Thr53). Les diferències dels desplaçaments químics ($\Delta\delta$) dels carbonis $^{13}\text{C}\alpha$ i $^{13}\text{C}\beta$ entre el zimogen ONCFLG processat i el seu precursor es recopilen a la *Figura 39B*. La majoria de valors $\Delta\delta$ són petits (<0.1 ppm), excepte per al segment Phe40-Asp50 situat prop de l'enllaç peptídic tallat. Aquestes dades apunten clarament a la conservació del plegament global de la proteïna, acompanyat per diferències estructurals al *linker* després de l'activació. D'altra banda, l'anàlisi dels espectres NOESY va permetre identificar un conjunt similar de valors NOE de curt i llarg abast a les regions estructurades del zimogen activat i no activat, corroborant que les seves estructures 3D són molt similars. Basant-nos en aquestes dades, es construí un model estructural per al zimogen ONCFLG digerit (*Figura 39C*). El canvi més notable és l'augment del nombre de conformacions possibles per als segments que voregen el lloc d'escissió (ressaltats en taronja).

El segment connector és la zona més dinàmica i flexible del zimogen ONCFLG.

Per estudiar la flexibilitat local de la cadena principal del zimogen ONCFLG en l'escala de temps de ns-ps, es van mesurar els espectres NOE heteronuclears (*Figura 40A*). Un valor baix de la ràtio de NOEs a una zona de la proteïna és indicador de més mobilitat, com a girs i *loops*. La majoria dels residus presenten valors NOE propers al valor més alt teòric esperat per zones rígides i estructurades (0.85), concordant amb els resultats d'elevada rigidesa prèviament demostrats per a l'ONC i les seves variants [112, 408]. Els extrems N- i C-terminals són més flexibles, amb ràtios de NOE d'aproximadament 0.5-0.6.

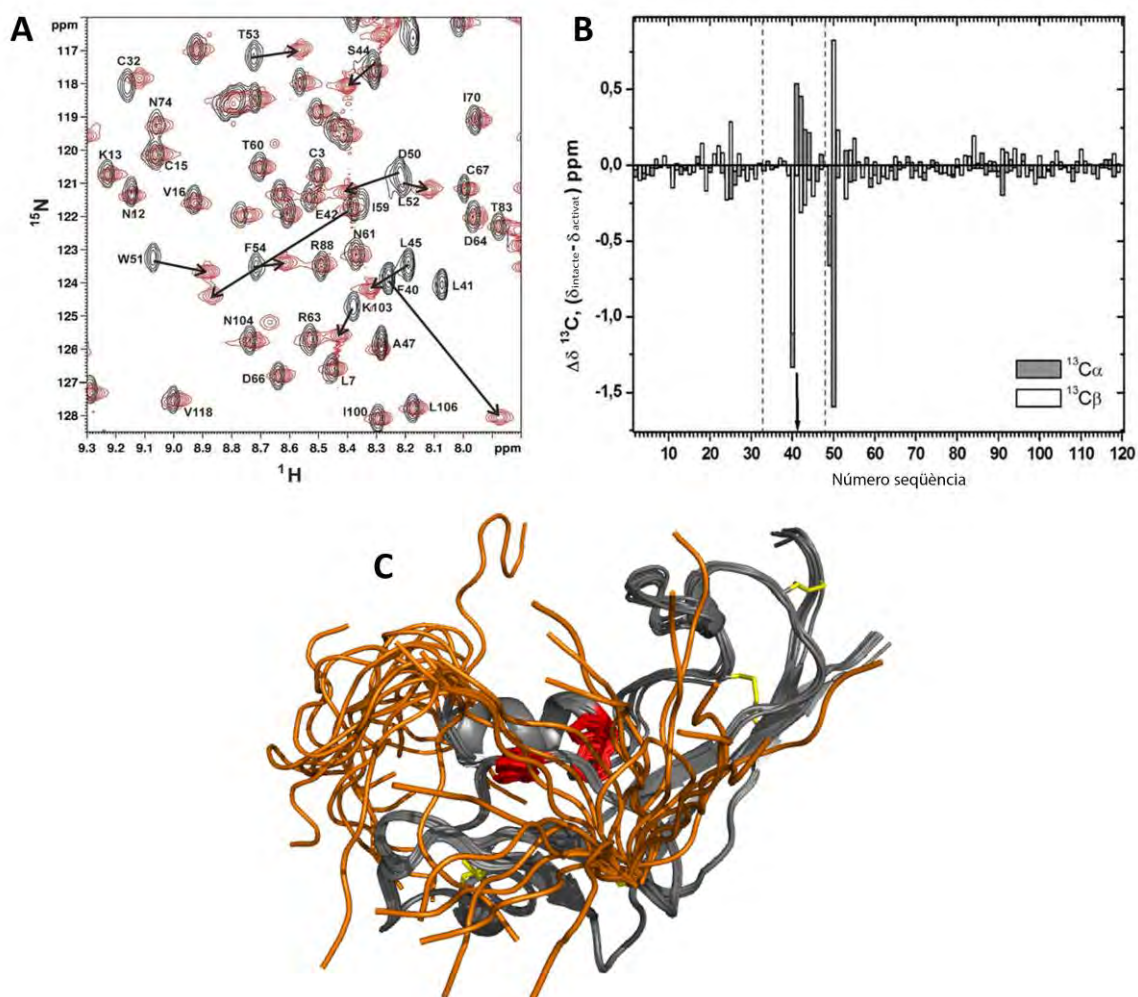


Figura 39. Dades de NMR i model estructural del zimogen ONCFLG escindit per la proteasa.

A) Espectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC del zimogen ^{15}N -ONCFLG intacte (en gris) superimposat sobre els del zimogen digerit amb la proteasa (en vermell). Els espectres es van registrar a 800 MHz, 35 °C i pH 5.2. Les correlacions ^1H - ^{15}N representatives del zimogen intacte es troben etiquetades, i es relacionen amb els senyals dels desplaçaments químics de la forma processada amb fletxes negres. **B)** Comparació dels valors dels desplaçaments químics dels carbonis $^{13}\text{C}\alpha$ i $^{13}\text{C}\beta$ entre el zimogen precursor ONCFLG i la corresponent forma activada. Els valors $\Delta\delta$ es van obtenir a partir de la diferència entre els valors δ del zimogen ONCFLG intacte (BMRB núm. 17973) i de l'escindit ($\Delta\delta = \delta_{\text{intacte}} - \delta_{\text{activat}}$). La fletxa remarca la posició de l'enllaç peptídic hidrolitzat, i els extrems del segment connector, Gly33-Gly48, s'assenyalen mitjançant línies discontinües. **C)** Model estructural del zimogen activat. El *linker* (Gly33-Gly48) està representat en taronja i la resta de l'esquelet proteic en gris. Les histidines del centre actiu estan ressaltades en vermell. La figura s'ha generat amb PyMol (<http://pymol.sourceforge.net/>).

A la forma no digerida, els valors dels NOE heteronuclears mostren que el segment de 16 residus inserit per connectar els terminals originals (des de la Ser34 fins a la Gly48) és la part més flexible de la molècula, presentant un valor mitjà de NOE de 0.38. Aquest fet indica que aquesta regió es comporta com un *loop* flexible amb moviments ràpids en l'escala de temps de ns-ps, característics d'una regió no estructurada. És important remarcar que aquesta flexibilitat incrementa substancialment als extrems de nova creació de la forma activada, amb valors NOE negatius al segment Ile39-Ser44, la qual cosa és indicativa d'una llibertat conformacional comparable a la dels pèptids no estructurats curts.

5.2.8. L'estabilitat conformacional dels zimògens d'ONC és comparable a ONC

Una elevada estabilitat conformacional representa un avantatge per a les proteïnes d'ús terapèutic, ja que com més estable sigui una proteïna, menor és la seva susceptibilitat a la degradació proteolítica no específica [157]. Mitjançant desnaturalització induïda per temperatura seguida per DSC, es determinà la temperatura mitja de desnaturalització T_m a pH 6.0 dels zimògens ONCFL i ONCFLG i de les proteïnes control ONC i ONCQ1S, essent respectivament 81, 80, 87 i 85 °C, tal i com es detalla a la *Taula 14* i es representa a la *Figura 41*. Podem observar totes les variants d'ONC han resultat ser altament estables, presentant uns punts mitjos de desplegament tèrmic dels zimògens molt per sobre de la temperatura fisiològica (37 °C) i essent comparables a la proteïna salvatge, ONC [91]. Així, aquests zimògens són prou estables per ser utilitzats *in vitro* i *in vivo* en condicions fisiològiques.

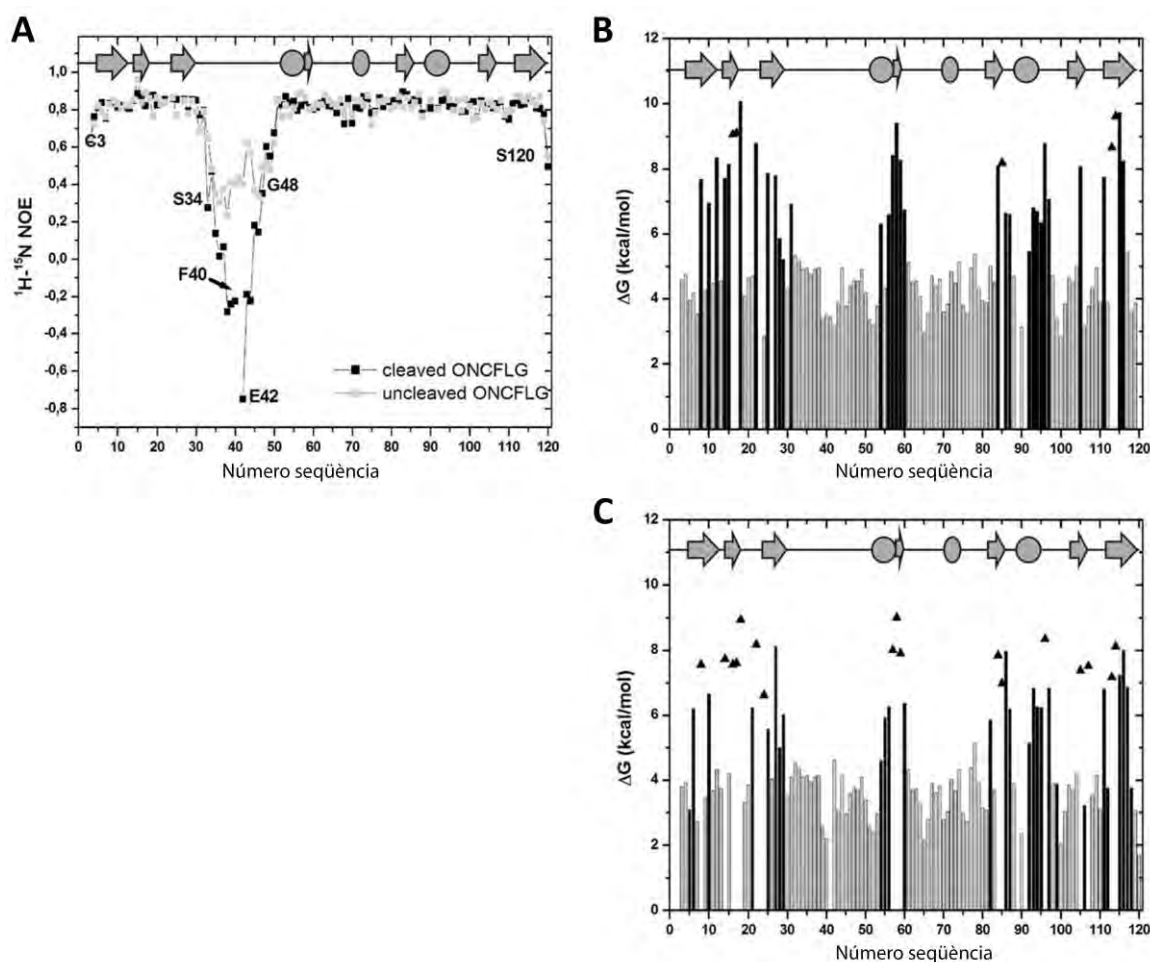


Figura 40. Dinàmica i estabilitat conformacional de les formes del zimogen ONCFLG.

A) Representació de la ràtio $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ -NOE pel zimogen (en gris) i la forma activada (en negre) en funció del número de residu a la seqüència. Les línies que connecten els requadres grisos o negres serveixen com a referència visual. **B)** i **C)** Valors ΔG_{HX} obtinguts per intercanvi protó-deuteri seguit per NMR de les formes intacta (**B**) i digerida (**C**) del zimogen ONCFLG en funció del número de residu a la seqüència. Les barres grises representen el límit superior pels grups d'intercanvi ràpid, les barres negres mostren els valors mesurats experimentalment i els triangles indiquen el límit inferior estimat pels grups d'intercanvi lent. Es representa l'estructura secundària a la part superior de cada gràfic, mitjançant fletxes grises pels fulls- β i ovals per a les hèlixs- α .

D'altra banda, l'estabilitat conformacional a nivell de residu del zimogen ONCFLG, ΔG_{HX} , es va mesurar per intercanvi de protó-deuteri (^1H - ^2H) seguit per NMR. Els grups amida més protegits i estables (Figura 40B) es troben a les regions amb estructura secundària, sobretot al full- β 1 i la primera i tercera α -hèlixs. En relació a la majoria de les proteïnes, incloent l'RNasa A [413], la mitjana de ΔG_{HX} d'aquests elements d'estructura secundària és alta, la qual cosa reflecteix l'extraordinària estabilitat conformacional d'ONCFLG. És remarcable que el *linker* presenta una protecció no mesurable en aquestes condicions, confirmant la seva baixa estructuració. Els protons HN de la segona hèlix estan igualment desprotegits, fet que també es descrigué per l'ONC salvatge i variants [112]. S'ha vist que la mateixa hèlix presenta una baixa estabilitat tant a l'RNasa A com a la RNasa humana 3 (ECP) [407]. Després de la digestió amb la proteasa (Figura 40C), els valors de ΔG_{HX} indiquen una lleugera relaxació estructural, disminuint en mitjana aproximadament 1.7 kcal/mol. Assumint que la dependència de l'energia lliure d'estabilitat, a la T_m observada per l'ONC [203], es manté en el zimogen ONCFLG, es calculà que la digestió d'ONCFLG amb la proteasa disminuiria uns 6.6 °C la seva T_m , essent de 73.9 °C. Aquest valor és encara molt llunyà dels 37 °C, mantenint-se ONCFLG establement plegat en condicions fisiològiques.

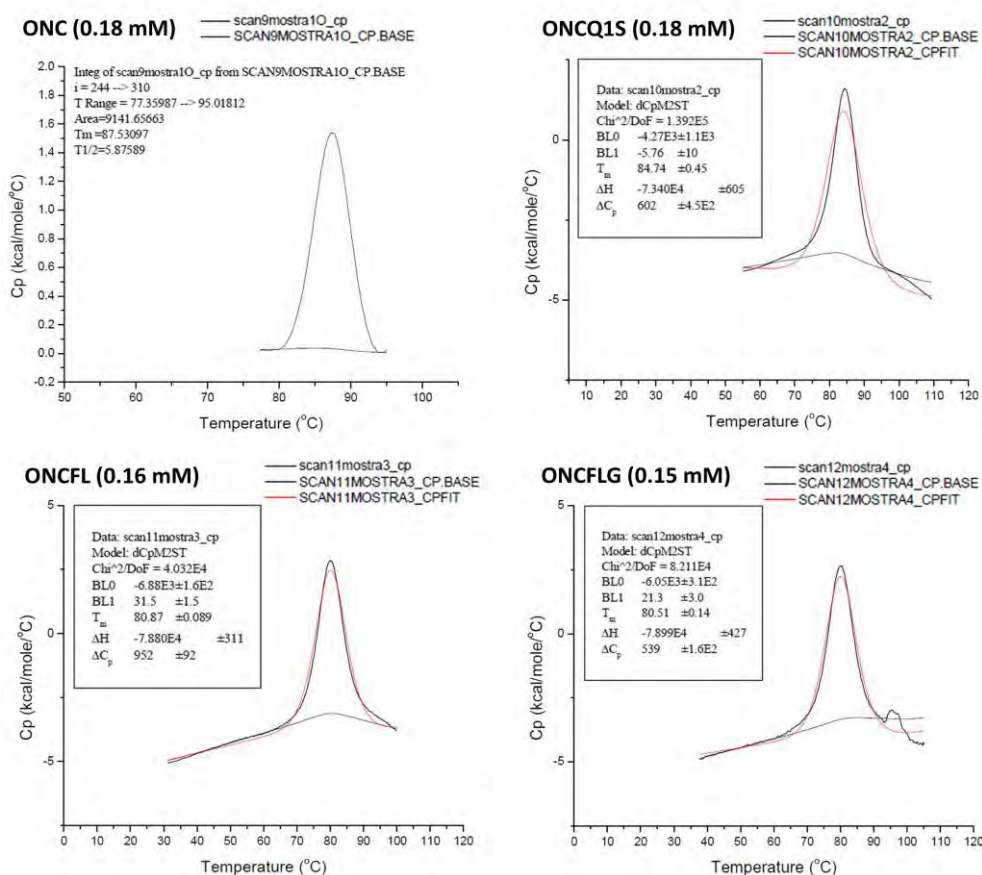


Figura 41. Espectres DSC dels zimògens d'ONC.

L'anàlisi de l'estabilitat conformacional dels zimògens d'ONC es realitzà a 0.15-0.18 mM en tampó 0.1 M MES-NaOH a pH 6.0, incrementant la temperatura de 30 a 110 °C a una velocitat d'escanejat d'1 °C min⁻¹. S'efectuà a la Plataforma de Polimorfisme i Calorimetria dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

5.3. PRODUCCIÓ I CARACTERITZACIÓ DE ZIMÒGENS BASATS EN LA RIBONUCLEASA PANCREÀTICA HUMANA

5.3.1. Disseny, producció i activació de zimògens *HGNs* basats en PM5

Les formes precursors dels zimògens d'ONC estudiats anteriorment presentaren una baixa activitat basal i no s'observà citotoxicitat, indicant ser innocus per a cèl·lules no infectades per HIV-1. Una vegada s'analitzà les formes processades, però, s'observà que l'increment desitjat d'activitat catalítica de la forma activa respecte al zimogen era molt baix i, a més a més, no mostraven activitat citotòxica. És sabut que l'ONC, malgrat ser altament citotòxica, presenta una activitat catalítica molt menor que les seves homòlogues de la família de les ribonucleases pancreàtiques [69, 70, 94], entre elles l'HP-RNasa. Així, es cregué oportú desenvolupar zimògens basats en l'HP-RNasa per la seva major activitat. A més, cal considerar la menor immunogenicitat esperada pel fet de ser una proteïna d'origen humà.

Així doncs, es dissenyaren nous zimògens basats en l'HP-RNasa, els quals s'anomenaren *HGNs*. Es consideraren les característiques que havien permès l'obtenció dels zimògens d'ONC, com la posició dels nous extrems N- i C- terminals i les seqüències *linker* a assajar. A l'hora d'escollir la proteïna base, també es tingué en compte la dificultat observada en l'expressió heteròloga de l'HP-RNasa i la seva elevada afinitat per l'hRI, característica majorment responsable de la seva manca de citotoxicitat.

Primerament, la proteïna escollida com a base per a la creació dels zimògens va ser PM5, una variant d'HP-RNasa que presenta 5 modificacions N-terminals respecte a l'HP-RNasa salvatge (Arg4Ala, Lys6Ala, Gln9Glu, Asp16Gly i Ser17Asn) [173] (*Figura 9*). Està descrit que aquesta variant presenta una estabilitat conformacional major que l'enzim salvatge i permet una millor producció heteròloga, essent comparable a l'HP-RNasa en quant a característiques cinètiques [173, 215]. Amb un mutant molt similar, PM7, que presenta les substitucions anteriors a més de Pro50Ser [172], fou possible l'obtenció de l'estructura cristal·logràfica, la qual cosa permeté un disseny acurat dels zimògens.

Els nous extrems N- i C- terminals seleccionats per la construcció dels zimògens *HGNs*, van ser Gly89/Asn88, coincidint amb les posicions homòlogues dels extrems de nova creació Arg73/Ser72 dels zimògens d'ONC. Per tal de mantenir una estructura similar al primer zimogen de RNasa A descrit per Raines i col·laboradors [360], es prosseguí a eliminar els 4 residus C-terminals -EDST, característics de l'HP-RNasa, els quals no es troben a la seva homòloga bovina, de 124 aminoàcids. A més, però, el zimogen de RNasa A de Raines i col·laboradors presentava una seqüència *linker* de reconeixement per la plasmepsina II de 14 residus, longitud que en el nostre cas resultà insuficient per a la correcta accessibilitat de la proteasa HIV-1 PR als zimògens d'ONC. L'HP-RNasa és en conjunt més gran i menys compacta

que l'ONC. Així, es considerà millor el disseny de zimògens *HGNs* amb un *linker* de mínim 15 aminoàcids, trobant oportú d'eliminar també el residu Val124 de la proteïna. D'aquesta manera s'obtingué una construcció de longitud equivalent al zimogen de ribonucleasa de l'equip de Raines, de 138 residus, resultat dels 123 aminoàcids de la proteïna junt amb els 15 residus del connector. Propers als extrems de nova creació, trobem els ponts disulfur 27-110 i 96-154 (95-40 i 26-84, respectivament, a PM5) que esperàvem que mantinguessin els terminals no nadius dels zimògens ancorats al cos de la proteïna malgrat la supressió de l'enllaç peptídic entre els residus 88 i 89.

Amb la intenció de fer una primera anàlisi d'una bateria de zimògens d'HP-RNasa i estudiar la flexibilitat, accessibilitat i solubilitat de les seqüències i, en definitiva, l'eficiència, es seleccionà una seqüència connectora de cada tipologia i longitud estudiades anteriorment amb els zimògens d'ONC. Així doncs, com es detalla a la *Taula 8*, els zimògens basats en la variant PM5 contenen: I) la primera de les seqüències testades en els zimògens d'ONC, YP de 14 residus, malgrat haver observat que presentava un reconeixement baix per part de la proteasa en el cas dels zimògens d'ONC; II) la seqüència FL de 15 residus, reconeguda eficientment per la proteasa fins i tot sense l'elongació mitjançant la Gly; i III) la seqüència FL2-C16, per presentar una major activació que C15 degut a una millor accessibilitat al punt de tall, assajant així les tres diferents longituds testades anteriorment pels zimògens d'ONC. Els zimògens basats en PM5 resultants, amb la deleció dels residus 124-128, els nous terminals en posició 88/89 i les seqüències connectores escollides, s'anomenaren HGNYP, HGNFL i HGNFL2. A la *Figura 42B* es mostra el modelat estructural d'HGNFL, remarcant els nous terminals Asn88/Gly89 i amb el *linker* de 15 residus unint els terminals nadius, comparat amb l'estructura de PM5 (A), i la seva seqüència aminoacídica amb la numeració de la variant d'HP-RNasa i del zimogen (C).

Per acabar, en relació a la capacitat d'evasió de l'RI, s'hipotetitzà que la seqüència de bloqueig del centre actiu de la ribonucleasa suposaria una modificació prou important com per impedir la unió amb l'RI, que implica residus del centre actiu, tant en la forma intacta com una vegada processada. Però malgrat que inicialment no es considerà necessària la confecció de variants de zimògens amb mutacions puntuals per escapar de l'hRI, finalment es construí un nou mutant que escapés a RI, HGNFL-R31ER91D, com s'explica més endavant.

Per a la producció de les variants *HGNs*, inicialment s'utilitzaren els plasmidis pHGNYP, pHGNFL i pHGNFL2, seguint el protocol de purificació descrit prèviament per l'HP-RNasa [173, 215], i similar a l'emprat pels zimògens d'ONC. Veient que els rendiments eren menors, es decidí clonar els zimògens al vector pET28 per tal d'obtenir les construccions p6His-HGNYP, p6His-HGNFL i p6His-HGNFL2, amb una cua d'histidines a l'N-terminal, i poder-les purificar mitjançant cromatografia IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*) amb níquel. En aquest cas, però, malgrat obtenir més quantitat de mostra, ens trobàrem amb dificultats per a obtenir les proteïnes amb el nivell de puresa desitjat.

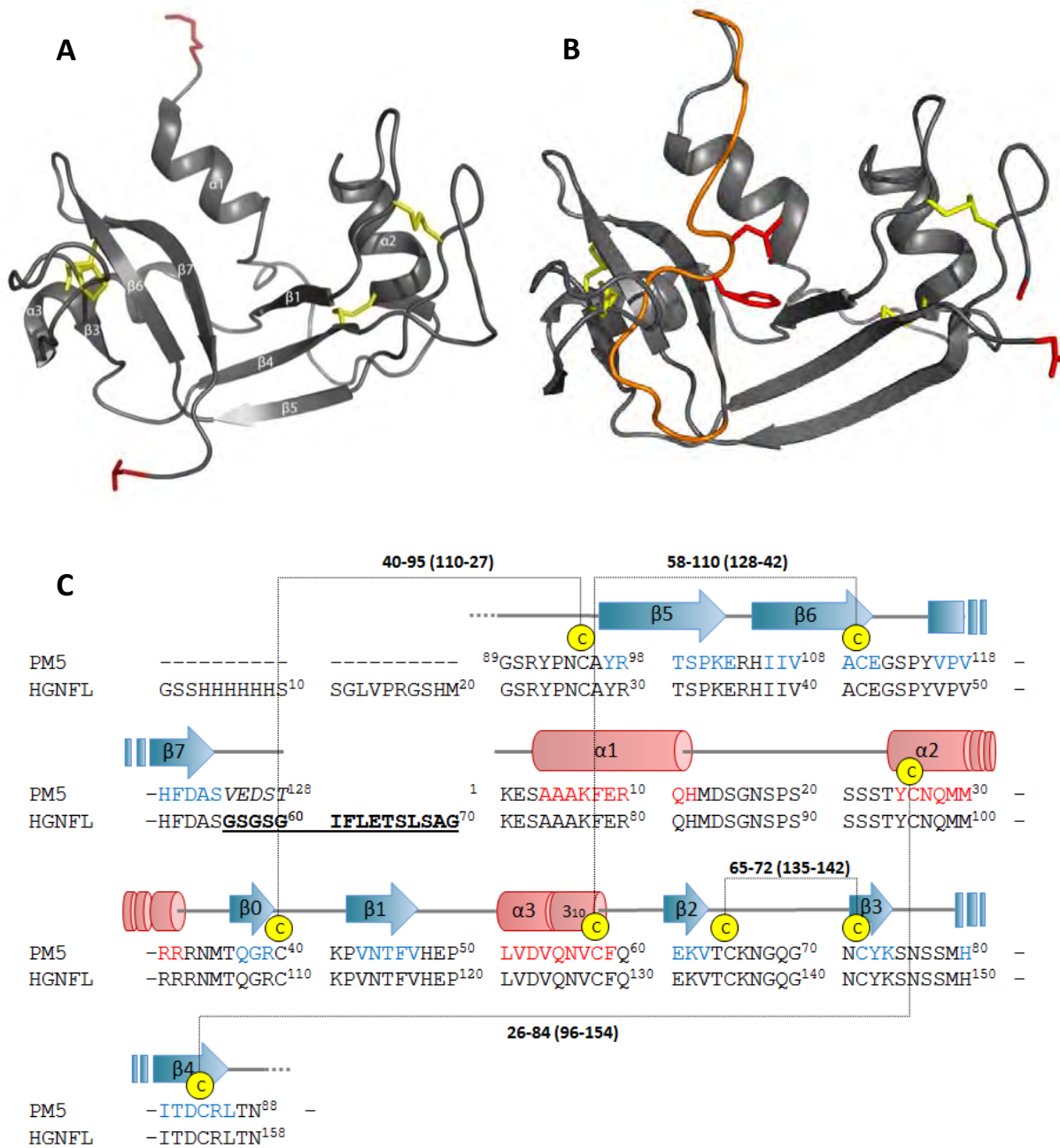


Figura 42. Comparativa estructural dels zimògens HGNs amb la variant d'HP-RNasa PM5.

A) Estructura tridimensional de PM5 (codi pdb 1DZA de PM7, variant d'HP-RNasa més similar a PM5, amb solament la modificació P50S extra). Els N- i C- terminals (Lys1 i Thr128) es remarquen en barres roges. **B)** Modelat estructural de la variant HGNFL, generat utilitzant el servidor de modelatge per homologia SWISS-MODEL i minimitzant l'energia amb la implementació GROMOS 96 de Swiss-Pdb Viewer [385]. Els terminals amino i carboxil no nadius (Gly89/Asn88 a PM5, Gly21/Asn158 al zimogen), creats per permutació circular, i els residus que constitueixen l'enllaç d'escissió (Phe62/Leu63) es representen en barres roges. El segment d'unió dels N- i C- terminals originals es mostra en taronja. Ambdues figures s'han generat mitjançant PyMOL (<http://pymol.sourceforge.net/>). **C)** Alineament de les seqüències aminoacídiques de PM5 i el zimogen HGNFL, mostrant esquemàticament l'estructura secundària de PM5. Es remarca en color els elements d'estructura secundària en la seqüència, en vermell per a les hèlixs- α i en blau per als fulls- β . Els residus que componen el connector FL, unint la Ser55 i Lys71 (Ser123 i Lys1 a PM5), es remarquen en negreta i subratllats, i els residus 124-128 de PM5, eliminats en el procés de construcció dels zimògens, es senyalen en cursiva.

Finalment, s'expressaren les proteïnes heteròlogues resultants d'aquests últims vectors en la soca *Rosetta2TM*(DE3) i mitjançant el protocol inicial. S'observà que la cua d'histidines aportava solubilitat i estabilitat als zimògens, de manera que incrementaren significativament els seus rendiments, fins a uns 10-15 mg/L de cultiu. Tot i ser menor que pels zimògens d'ONC, el rendiment superà l'obtingut anteriorment per PM5, de 5 mg/L de cultiu [173]. La puresa i homogeneïtat de la mostra es va confirmar per SDS-PAGE i es comprovà la massa molecular per espectrometria de masses MALDI-TOF (*Taula 16*).

Taula 16. Llistat de les masses moleculars teòriques i obtingudes per les variants d'HP-RNasa.

| Proteïna | Mm teòrica (Da) ^a | Mm observada (Da) ^b |
|----------------|------------------------------|--------------------------------|
| PM5 | 14394.10 | 14395.30 |
| HGNYP | 17471.34 | 17472.21 |
| HGNFL | 17390.24 | 17393.35 |
| HGNFL2 | 17534.44 | 17536.53 |
| HGNFL-R31ER91D | 17322.20 | 17317.30 |

^a Les masses moleculars teòriques van ser calculades utilitzant l'aplicació 'Compute pI/Mw' del portal bioinformàtic ExpASy http://web.expasy.org/compute_pi/ (Swiss Institute of Bioinformatics).

^b Les masses moleculars observades es confirmaren per espectrometria de masses MALDI-TOF, amb un equip Ultraflex-TOF Bruker Daltonics, dels Serveis Tècnics de Recerca del Parc Científic i Tecnològic, Universitat de Girona.

S'estudià l'activació dels zimògens de ribonucleasa pancreàtica humana incubats a 37 °C amb la proteasa SK#1, utilitzant la relació zimogen:proteasa de 50:1 i un temps d'incubació *overnight* (unes 15 h), condicions emprades anteriorment per a la caracterització dels diferents zimògens d'ONC. Com es mostra a la *Figura 43*, de forma posterior a l'activació s'aprecien dues bandes resultants del processament específic dels zimògens, d'11 i 4 kDa. En relació a l'eficiència d'activació de les tipologies de les seqüències *linker*, es mantingué l'activació més eficient i completa pel zimogen HGNFL, seguida per HGNFL2 (a la figura s'insinua una banda amb restes de la proteïna intacta a uns 15 kDa) i finalment YP, el qual resultava en aproximadament un 68% de forma activada. Aquest percentatge fou determinat per densitometria, tal i com es detalla a l'apartat *Activació in vitro dels zimògens amb la proteasa SK#1*, de *Metodologia*. No s'observà activació dels zimògens sense l'addició de proteasa, ni tampoc en resultà de la incubació conjunta de la proteasa amb la proteïna salvatge PM5 (dades no mostrades). Per les activacions necessàries en la caracterització dels zimògens processats s'utilitzaren aquestes mateixes condicions.

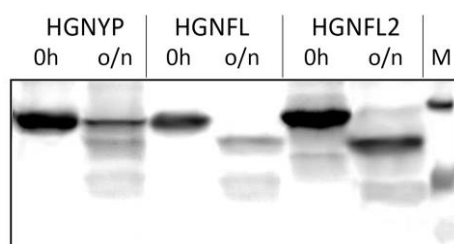


Figura 43. Activació dels zimògens HGNs amb la proteasa SK#1.

Digestió efectuada a 37 °C a una relació molar de 50:1 zimogen:proteasa, i analitzada mitjançant SDS-PAGE 20% en condicions reductores (amb β-mercaptoetanol) amb tinció per Blau de Coomassie. El carril M correspon als marcadors de massa molecular: 15, 6 i 3 kDa. A cada zimogen s'observa la mostra corresponent a t= 0h i després de la incubació *overnight*.

5.3.2. Les formes activades dels zimògens *HGNs* són inhibides per l'RI

L'HP-RNasa no presenta citotoxicitat de forma natural ja que és inhibida fortament per l'inhibidor de ribonucleases [174]. Malgrat això, inicialment s'hipotetitzà, com s'ha comentat anteriorment, que tant la forma intacta com digerida dels zimògens *HGNs* presentarien una menor afinitat que l'HP-RNasa per l'RI, degut a impediments estèrics causats per la seqüència peptídica de bloqueig del centre actiu. S'analitzà, doncs, la capacitat de degradar el substrat 16S- i 23S- rRNA d'*E. coli* per part dels diferents zimògens *HGNs* basats en PM5, abans i després del processament, en presència o absència d'inhibidor. Com s'observa a la *Figura 44*, solament els zimògens precursors (NA, no activats) d'HGNYP, HGNFL i HGNFL2 escaparen de l'hRI, però no fou així per les formes enzimàtiques madures (Act, activats), a les quals la presència de l'hRI es traduí en una impossibilitat de degradar el substrat d'RNA.

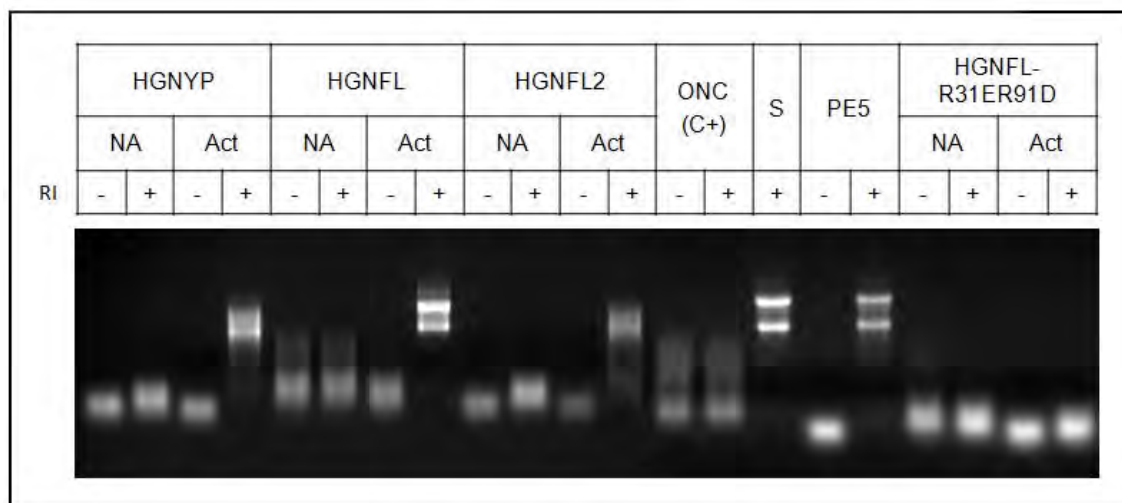


Figura 44. Inhibició de l'activitat ribonucleolítica dels zimògens d'HP-RNasa de l'estudi per part de l'hRI.

Visualització de la degradació de 4 µg de substrat 16S- i 23S- rRNA d'*E. coli*, amb 0 o 40 U d'hRI (indicat com a - o +), en 20 µl de 20 mM HEPES, 125 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7.0 a 37 °C, amb una quantitat de ribonucleases de 15 ng per a totes les variants i zimògens d'HP-RNasa. El control d'integritat del substrat s'indica com a "S". A cada zimogen s'indica la forma intacta (NA) i processada (Act). Per a les ribonucleases sensibles a l'RI s'observa el substrat intacte en presència d'RI (+). Per a les variants resistents, s'observa la banda de substrat degradada (més inferior en el gel) tant en absència com en presència d'RI.

5.3.3. Creació del nou zimogen HGNFL-R31ER91D i anàlisi de la capacitat d'evasió de l'RI

Havent constatat la inhibició dels zimògens *HGNs* per l'RI, es considerà oportuna la creació d'un últim zimogen que pogués escapar-se de la unió amb l'inhibidor. L'equip de Raines [174] descrigué que els residus de l'HP-RNasa que formen ponts d'hidrogen amb l'hRI són R4, Q11, R31, R32, R39, K41, N67, N71, N88, G89, R91, E111, essent K41 també un residu catalític, junt amb H12 i H119. Així, és als loops $\alpha 2\beta 1$ i $\beta 4\beta 5$ on es concentren la major quantitat de ponts d'hidrogen responsables de la interacció HP-RNasa – hRI, essent els residus 91 i 39 els més importants. En la construcció d'aquest últim zimogen, HGNFL-R31ER91D, s'escolliren les

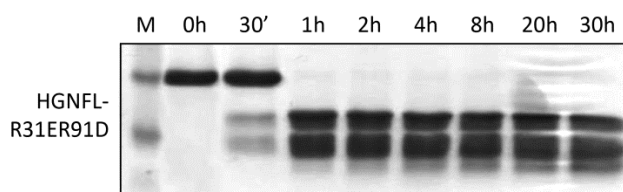
posicions 91 i 31 per a la realització de mutacions puntuals, alterant dos residus bàsics i substituint-los per dos d'àcids. Es seleccionaren aquestes substitucions atès que el nostre grup de recerca havia documentat prèviament la capacitat d'evasió de l'RI del mutant d'HP-RNasa anomenat PE3 (R31ER91A), dotant-lo d'una citotoxicitat moderada en cèl·lules K562 [203]. Com s'observà en calcular el potencial electrostàtic del nou zimogen i comparar-lo amb el zimogen HGNFL parental i amb l'HP-RNasa salvatge, s'incrementava la càrrega nativa de la zona mutada de V2 (*Figura 46*). Amb aquests canvis s'esperava, per una banda, promoure la repulsió electrostàtica amb l'RI, i per l'altra, eliminar la possibilitat de creació dels ponts d'hidrogen que estableixen els residus originals i que estableixen el complex HP-RNasa-hRI (*Figura 8*).

La construcció d'aquest mutant es dugué a terme sobre el zimogen HGNFL, per considerar com a adequada la seqüència FL, de 15 residus de longitud, la qual permetria un plegament correcte i una accessibilitat adequada per part de la proteasa. Amb aquestes condicions s'esperava aconseguir un increment de l'eficiència catalítica a la RNasa madura respecte al precursor, mantenint una baixa activitat basal. La producció d'aquest enzim es dugué a terme seguint el mateix protocol que pels primers zimògens *HGNs*. S'assolí un rendiment lleugerament superior, de 15 mg/L de cultiu, confirmant la puresa i homogeneïtat de la mostra per SDS-PAGE i la massa molecular per MALDI-TOF (*Taula 16*).

Estudiant la cinètica d'activació al llarg del temps del zimogen HGNFL-R31ER91D amb la proteasa HIV-1 PR, a una relació zimogen:proteasa de 50:1 i a 37 °C (*Figura 45*), s'observà una activació remarcablement ràpida, arribant a la seva totalitat en un temps inferior a 1h d'incubació.

Figura 45. Activació del zimogen HGNFL-R31ER91D amb la proteasa SK#1, al llarg del temps.

Activació mesurada a diferents temps després de l'addició de la proteasa, a 37 °C i a una relació molar de 50:1 zimogen:proteasa, analitzada mitjançant SDS-PAGE 20% en condicions reductores amb tinció per Blau de Coomassie. El carril M correspon als marcadors de massa molecular: 15, 6 i 3 kDa.



Posteriorment, s'analitzà la capacitat d'evasió de l'RI del zimogen HGNFL-R31ER91D, característica per la qual s'havia creat expressament aquest mutant. A la *Figura 44*, s'observa l'escapament a l'inhibidor aconseguït, tant per la prorigonucleasa (NA) com per la forma processada (Act) del zimogen HGNFL-R31ER91D.

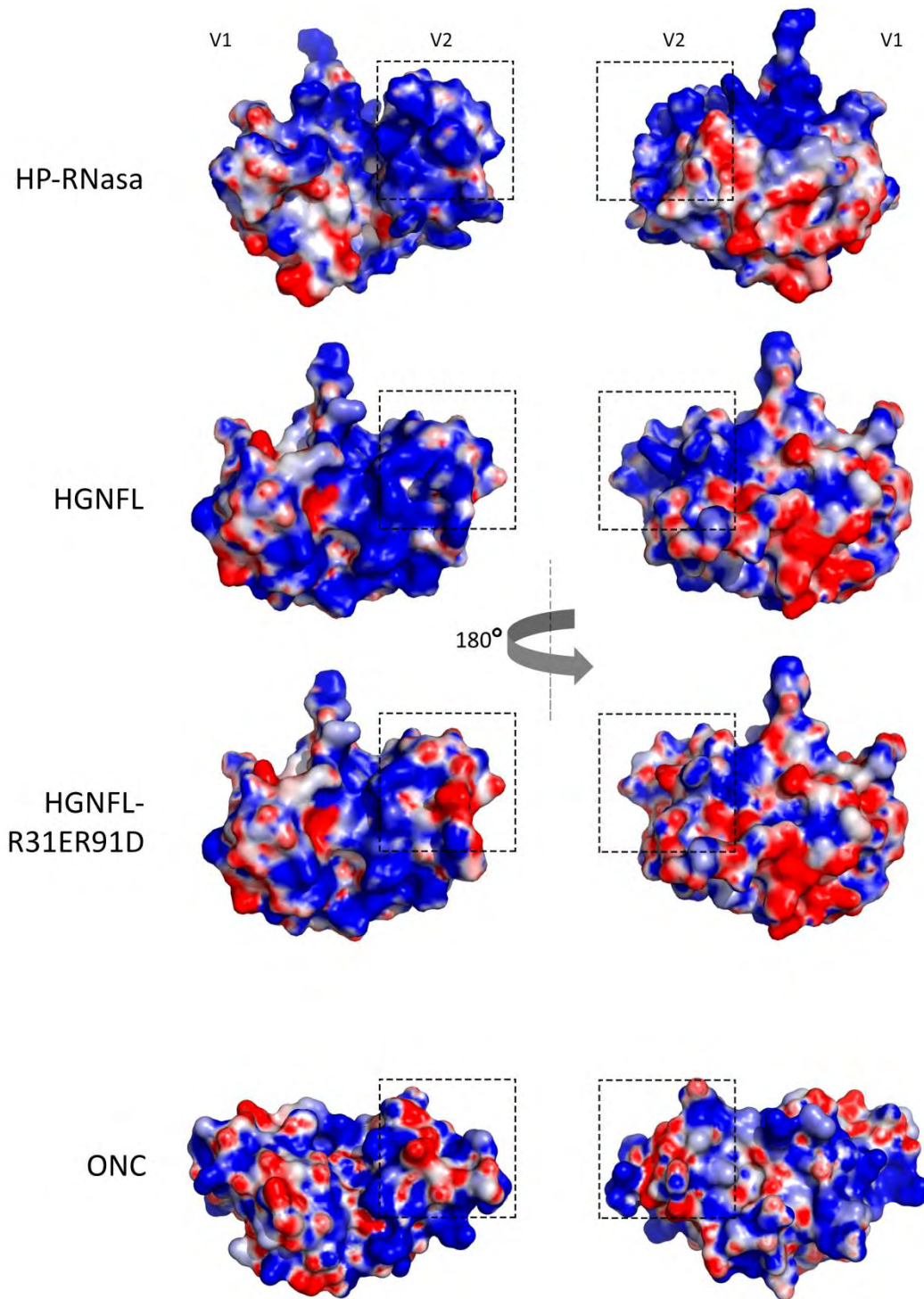


Figura 46. Comparativa del potencial electrostàtic del modelat del zimogen HGNFL-R31ER91D respecte la seva variant parental HGNFL, la proteïna salvatge HP-RNasa i l'ONC.

Les proteïnes es mostren en la mateixa orientació, per davant i darrere, amb un gir de 180°. Les superfícies de càrrega positiva a pH 7.0 es mostren en blau, les de càrrega negativa, en vermell i les càrrega neutra, en blanc. Es pot observar la diferència de potencial a la regió del lòbul V2, essent altament positiu per l'HP-RNasa i HGNFL i presentant més càrrega negativa al zimogen HGNFL-R31ER91D, de forma similar a l'ONC. Els potencials electrostàtics s'han calculat amb el [servidor web APBS](#) [189], combinat amb [PROPKA](#) [414], a partir del fitxer pdb creat en el modelatge dels zimògens, del pdb 2K11 corresponent a l'HP-RNasa salvatge [98] o 1ONC per a ONC [93]. Les figures s'han generat amb el programa PyMol (<http://pymol.sourceforge.net/>).

5.3.4. Anàlisi de la funcionalitat dels zimògens *HGNs*

Per a finalitzar la caracterització de la funcionalitat dels zimògens HGNYP, HGNFL, HGNFL2 i HGNFL-R31ER91D, s'estudià la capacitat catalítica i citotoxicitat tant dels zimògens com de les formes madures, junt amb la seva estabilitat conformacional.

Estudi de l'eficiència catalítica dels zimògens HGNs.

La capacitat catalítica dels zimògens *HGNs* s'estudià mesurant l'activitat ribonucleolítica abans i després del processament per part de la proteasa SK#1 mitjançant el substrat fluorogènic 6-FAM-dArUdAdA-6-TAMRA [390, 391].

El valor de k_{cat}/K_M de PM5 va resultar ser d'una magnitud de 5 ordres superior a l'eficiència catalítica de l'ONC, la qual cosa era esperable atès que PM5 presenta una activitat comparable a l'HP-RNasa salvatge [146, 174], però més de 30 vegades superior als valors obtinguts per les variants d'HP-RNasa construïdes per Raines i col·laboradors [40]. A diferència dels zimògens d'ONC, als d'HP-RNasa sí que s'observa, en tots els casos, l'augment desitjat d'activitat enzimàtica de la RNasa madura respecte al zimogen, essent per a HGNYP, HGNFL, HGNFL2, i HGNFL-R31ER91D, de 9, 42, 156 i 13 vegades, com es detalla a la *Figura 47* i a la *Taula 17*.

Les formes precursors presenten una activitat basal baixa. Es pot apreciar que aquesta augmenta com més llarga és la seqüència connectora, podent-se relacionar amb una major accessibilitat del substrat d'RNA al centre actiu prèviament a l'activació. Aquesta activitat basal podria resultar crítica en la citotoxicitat de les formes precursors (que a més, escapen a l'inhibidor), sobretot en el cas de la variant amb el *linker* amb més longitud, HGNFL2, tot i que aquesta tan sols és un 0.015% de l'activitat de l'enzim parental PM5, però d'un ordre de magnitud superior a l'activitat de l'ONC (*Taula 14*). Així, considerarem encertada la construcció d'HGNFL-R31ER91D a partir d'HGNFL i no d'HGNFL2.

Després de l'activació, les RNases aconseguixen recuperar una activitat relativa a la proteïna salvatge (PM5) d'entre el 0,001% i el 2,4%. Aquesta baixa activitat absoluta perd rellevància en el context intracel·lular, on serà més important la diferència relativa entre les formes activada i precursora. Comparativament amb l'ONC, l'activitat absoluta aconseguida pels *HGNs* és 4 ordres superior.

Taula 17. Anàlisi de l'estabilitat i funcionalitat dels zimògens d'HP-RNasa.

| ZIM | T _m (°C) NA ^a | IC ₅₀ (μM) NA ^b | IC ₅₀ (μM) Act ^b | (k _{cat} /K _M) NA (10 ² M ⁻¹ s ⁻¹) ^c | (k _{cat} /K _M) Act (10 ² M ⁻¹ s ⁻¹) ^c | (k _{cat} /K _M) Act / (k _{cat} /K _M) NA |
|--------------------|--|--|--|---|--|---|
| PM5 | 58.3 ^d | - | > 30 | - | 468700 ± 18420 | - |
| PE5 | 45.7 ^d | - | 13.12 ± 1.23 ^e | - | ND | - |
| HGNYP | ND | 20.4 ± 1.2 | 21.95 ± 1.40 | 0.61 ± 0.12 | 5.70 ± 0.29 | 9.34 ± 2.27 |
| HGNFL | 44.1 ± 2.0 | > 30 | > 30 | 15.85 ± 1.61 | 665.16 ± 62.51 | 41.97 ± 8.21 |
| HGNFL2 | 30.7 ± 1.6 | > 30 | > 30 | 72.07 ± 9.38 | 11241 ± 908 | 155.97 ± 28.74 |
| HGNFL- R31ER91D | 29.3 ± 1.5 | > 30 | > 30 | 20.26 ± 2.56 | 263.70 ± 62.78 | 13.02 ± 4.74 |

^a El valor de T_m (±SE) es va estudiar a una concentració de 0.5 mg/ml en 50 mM NaAc a pH 5.0 per espectrofotometria, tal i com es descriu a l'apartat de *Determinació de l'estabilitat conformacional dels zimògens*.

^b La IC₅₀ (±SD) es va determinar en cèl·lules *Jurkat* en cultiu utilitzant l'assaig de detecció de viabilitat cel·lular per reducció de l'MTT *CellTiter96*[®], com es descriu a *Citotoxicitat dels zimògens en cèl·lules en cultiu*. de *Metodologia*.

^c Els valors de k_{cat}/K_M (±SD) es determinaren per catàlisi del substrat 6-FAM-dArUdAdA-6-TAMRA a 50 nM en tampó 0.1 M MES-NaOH, 0.1 M NaCl, pH 6.0, a 25 °C [390, 391].

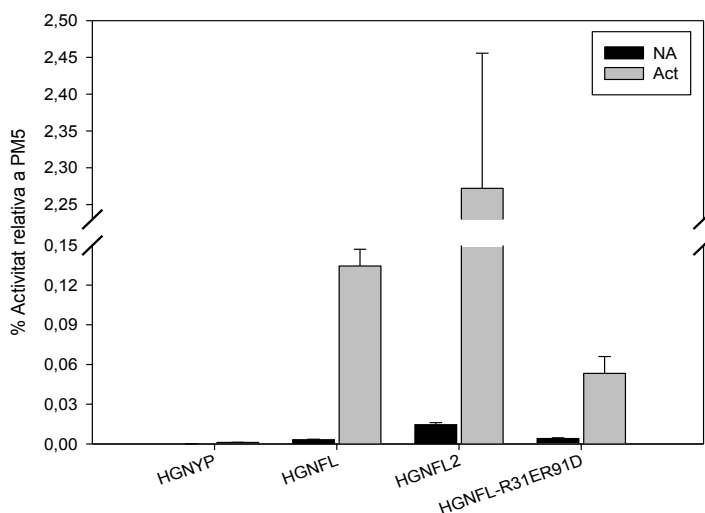
^d Valor extret de Bosch i col·laboradors [203].

^e Comunicació personal d'A.Vert.

NA. Forma no activada. Act. Forma activada. ND. No Determinat. -. No aplicable.

Figura 47. Activitat ribonucleolítica relativa a PM5 dels zimògens d'HP-RNasa abans i després del tractament amb la proteasa SK#1.

L'estudi es realitzà a 25 °C en 0.1 M MES-NaOH a pH 6.0, 0.1 M NaCl, amb 50 nM del substrat 6-FAM-dArUdAdA-6-TAMRA, i a una concentració de proteïna de 0.2 nM per PM5 i de 800, 80, i 8 nM per als zimògens HGNYP, HGNFL i HGNFL-R31ER91D, i HGNFL2, respectivament. La forma precursora s'indica com a NA i la processada, com a Act.



A la variant HGNYP, l'augment modest d'activitat segurament es pot relacionar amb una subestimació de la seva capacitat catalítica una vegada activat, ja que es comptava amb una mixtura de formes activada i precursora a causa d'una activació parcial del 68%, tal com s'ha esmentat anteriorment. Així, calculant el valor de k_{cat}/K_M esperat si l'activació fos total, estimem que l'augment d'activitat de la RNasa respecte al precursor seria d'unes 14 vegades. Pels zimògens HGNFL i HGNFL2 observem un gran increment d'activitat RNasa un cop activats, essent màxima en l'última variant. Aquest fet es pot relacionar amb la supressió del fragment peptídic entre les dues dianes per la proteasa, aconseguint després de la doble digestió uns extrems peptídics més curts, i evitant així possibles impediments estèrics en l'acostament del substrat al centre actiu. Finalment, en el cas del zimogen HGNFL-R31ER91D, malgrat que l'activitat basal és comparable a la de la variant HGNFL, d'on prové, podem observar que la

recuperació d'activitat en la forma madura és molt menor, segurament degut a canvis estructurals i una menor estabilitat a conseqüència de les mutacions puntuals introduïdes. Així doncs, tots els zimògens basats en l'HP-RNasa PM5 presenten un augment significatiu de l'activitat catalítica una vegada processats, representant una fita important en aquest treball.

Citotoxicitat dels zimògens HGNs, amb activació in vitro.

La capacitat citotòxica dels zimògens HGNYP, HGNFL, HGNFL2 i HGNFL-R31ER91D s'analitzà, de forma comparada amb PM5, que no presenta citotoxicitat, i amb ONC que sí és citotòxica. Finalment, s'afegí també la proteïna PE5 com a control positiu, molt similar a PM5 en estructura i activitat, però amb un senyal de localització nuclear bipartit que la dirigeix a nucli, compartiment on pot evadir l'inhibidor de ribonucleases degradant l'RNA nuclear i activar l'apoptosi cel·lular, essent així citotòxica [203, 212, 213].

Com es mostra a la *Taula 17*, els zimògens assajats no presentaren citotoxicitat, amb uns valors d'IC₅₀ per a cèl·lules *Jurkat* majors al límit detectat per l'assaig (IC₅₀ >30 µM), exceptuant el zimogen HGNYP (IC₅₀ = 20.4 ± 1.2 µM), el qual presenta una citotoxicitat lleu. Malgrat tot, les ribonucleases processades tampoc presentaren un valor de IC₅₀ que es pogués considerar citotòxic. Aquest fet era previsible per a les variants HGNYP, HGNFL i HGNFL2, perquè s'havia observat inhibició per part de l'RI en les formes escindides, però no per a HGNFL-R31ER91D, variant que no fou sensible a l'RI i que presentava una recuperació d'eficiència catalítica significativa un cop activat.

5.3.5. Estabilitat conformacional dels zimògens HGNs

El valor de T_m de la variant PM5 és de 58.3 °C, essent 4.5 °C més termoestable que l'HP-RNasa salvatge, amb una T_m d'uns 53.7 °C a pH 5.0 [203] o de 56 °C a pH fisiològic [40, 146, 174]. Els zimògens HGNFL, HGNFL2 i HGNFL-R31ER91D, però, presentaren valors de temperatura de desnaturalització propers o inferiors a la temperatura fisiològica, amb unes T_m de 44.1, 30.7 i 29.3 °C, respectivament (*Taula 17*). Només la variant HGNFL presentà una estabilitat superior als 37 °C, amb la qual cosa accentua la idoneïtat de construir l'últim dels zimògens sobre aquesta variant.

En el cas del zimogen HGNFL-R31ER91D, s'estudià el procés de desnaturalització a dos pHs diferents, abans i després del tractament amb la proteasa HIV-1 PR. S'observà un lleuger increment d'estabilitat d'uns 2-4 °C en augmentar el pH fins a condicions fisiològiques, així com després de l'activació amb la proteasa ($T_{m_{NA,pH5.0}} = 29.30 \pm 1.56$, $T_{m_{NA,pH7.55}} = 33.07 \pm 1.50$; i una vegada activat, $T_{m_{Act,pH5.0}} = 32.76 \pm 0.55$ i $T_{m_{Act,pH7.55}} = 34.20 \pm 0.62$). Malgrat aquesta millora de l'estabilitat no s'aconseguí un zimogen basat en PM5 que a temperatura fisiològica sigui prou estable. Així, la baixa estabilitat dels zimògens d'HP-RNasa resultà un punt crític en la seva funcionalitat, essent extremadament acusat sobretot pel zimogen HGNFL-R31ER91D.



6. DISCUSSIÓ



6. DISCUSSIÓ

La creació de zimògens proporciona una opció versàtil per al control de l'activitat enzimàtica, permetent desenvolupar noves aplicacions d'enzims en biotecnologia i biomedicina. Tenint en compte les funcions especials que presenten algunes RNases, en concret la seva citotoxicitat, la creació d'un "Cavall de Troia" basat en un zimogen de ribonucleasa podria tenir una clara aplicació farmacològica, estenent la seva utilitat terapèutica. En aquest treball s'escolliren l'ONC i l'HP-RNasa per a la creació de zimògens a partir de la seva permutació circular. En el cas de l'ONC es pretengué treure partit de la seva elevada estabilitat i citotoxicitat natural. L'interès en l'obtenció de zimògens d'HP-RNasa recaigué en el fet que presenta 1000 vegades més d'activitat ribonucleolítica que l'ONC i en què, pel seu origen humà, seria d'esperar una menor resposta immunològica en cas de poder ser utilitzada en clínica humana. Més de trenta anys després de la notificació de la primera prova clínica de la SIDA, la pandèmia encara representa un gran repte per a la salut pública. La proteasa del HIV, clau en el cicle viral, és un dels enzims al qual es dirigeixen alguns dels antiretrovirals actuals que s'apliquen en la teràpia HAART. La funció imprescindible de la HIV-1 PR en el cicle viral fa que aquest enzim pugui ser una bona eina activadora dels zimògens.

Un zimogen de ribonucleasa ideal, per complir les seves funcions de citotoxicitat dirigida, a part de presentar una afinitat suficient per la proteasa que faci possible un bon grau d'activació *in vitro* i *in vivo*, ha d'internalitzar de forma eficient a les cèl·lules i mantenir la seva estabilitat conformacional. Així mateix, els zimògens intactes han de presentar una baixa activitat ribonucleolítica, ser innocus per les cèl·lules i patir un increment substancial de l'eficiència catalítica i activitat citotòxica un cop activats per la proteasa. Per tal que compleixin l'últim requisit, cal afegir una última característica: l'evasió de l'inhibidor citosòlic de ribonucleases, que els permeti desenvolupar la seva funció ribonucleolítica dins les cèl·lules i culminar el procés citotòxic.

Per la creació d'un zimogen de ribonucleasa és necessari que la seqüència que connecta els N- i C- terminals de l'enzim natiu s'estengui i bloquegi l'accés al centre actiu [360]. Al grup de ribonucleases pancreàtiques, els extrems N- i C- terminals estan disposats de tal manera, a banda i banda del centre actiu, que un pèptid que els connecti pot també bloquejar el subseti catalític. El zimogen és activat quan una proteasa específica, en aquest cas la HIV-1 PR, reconeix i trenca una diana concreta del *linker*. Així, aquest connector ha de ser suficientment llarg per unir els dos extrems N- i C- terminals sense induir tensió a l'estructura i per a codificar el motiu de reconeixement de la proteasa, però suficientment curt com per a bloquejar el centre actiu, impeding la unió del zimogen intacte amb el substrat. A aquest treball s'han creat 12 variants de ribonucleases permutades (8 d'ONC i 4 d'HP-RNasa) activables específicament per la proteasa HIV-1 PR.

Els zimògens d'ONC es crearen amb els extrems N- i C- terminals no nadius en posició Ser72/Arg73, i se'n feren tres tipologies (*Taula 8*): YP amb la diana natural de la proteasa HIV-1 PR MA/CA (SQNY*PIVQ) de diferent longitud (14, 15 i 16 residus, essent ONCYP, ONCYPG1 i ONCYPG2, i ONCYPGG, respectivament); FL amb la seqüència de reconeixement alternativa GSGIF*LETSL (ONCFL i ONCFLG); i FL2 introduint dos punts de tall (ONCFL2-C15 i ONCFL2-C16). Als zimògens d'HP-RNasa, basats en la variant PM5 [173, 215], els extrems N- i C- terminals es situaren a Gly89/Asn88. En aquest cas, s'estudiaren les seqüències *linker* YP, FL i FL2-C16 de 14, 15 i 16 residus (*Taula 8*), obtenint les proteïnes HGNYP, HGNFL i HGNFL2, respectivament. A més, a partir de HGNFL es creà el zimogen HGNFL-R31ER91D amb 2 mutacions a residus que intervenen en la unió amb l'RI (a $\alpha 2$ i al loop $\beta 4\beta 5$), per afavorir l'escapament a l'RI d'aquesta RNasa.

Comparant l'activació de les diverses variants en funció de la longitud del seu *linker*, s'observà que com més llarga era la seqüència connectora, més eficientment era digerida per la proteasa (*Figura 29B* i *Figura 43*). Aquest resultat es pot explicar per una major accessibilitat a l'enllaç peptídic per part de la proteasa degut als residus addicionals de Glicina. Segons la tipologia de connector, s'ha pogut concloure que els zimògens YP arriben a un punt de no-progressió de l'activació resultant en una barreja de formes precursora i activada, mentre que els de tipologia FL són exitosament i totalment digerits per la proteasa HIV-1 PR tant als zimògens d'ONC com d'HP-RNasa. Per tant, les diferències en els rendiments d'activació entre les variants YP i FL dels zimògens d'ONC i HP-RNasa es poden relacionar a les obtingudes pels diferents substrats de la proteasa HIV-1 PR de l'estudi de Beck i col·laboradors [280]. La flexibilitat conformacional observada per NMR en l'estructura del *linker*, junt amb l'accessibilitat dels residus Phe40-Leu41 que contenen l'enllaç que és hidrolitzat, explica la ràpida activació de la variant ONCFLG per part de la proteasa HIV-1 PR. En el cas dels FL2, en trobar-se les dues dianes per la proteasa més properes als extrems de la seqüència connectora, la proteasa té menys accessibilitat al punt de tall, presentant una eficiència d'activació elevada, però intermitja a les dues construccions anteriors (*Figura 29*). El percentatge d'activació dels zimògens amb seqüència YP és molt diferent segons si es tracta de variants d'ONC o d'HP-RNasa (del 10% o del 68% amb activació o/n, respectivament) (*Figura 29* i *Figura 43*). Aquest fet segurament és degut a una major accessibilitat per part de la proteasa, atribuïble a la menor rigidesa de l'HP-RNasa en comparació amb l'ONC i, per altra banda, al fet que la major flexibilitat de l'hèlix- $\alpha 1$ de l'HP-RNasa podria estar incrementant la mobilitat del connector.

La causa de les variacions en l'eficiència de les seqüències aminoacídiques sembla ser la diferent afinitat de la proteasa HIV-1 PR. La proteasa i els zimògens d'ONC o d'HP-RNasa són proteïnes amb molta càrrega positiva. L'atracció o repulsió entre la seqüència connectora emprada i la proteasa podria afectar a l'afinitat, veient-se afavorida amb la seqüència que conté la diana FL, que presenta un residu àcid més que la seqüència que conté la diana YP. A

més de l'afinitat entre el connector i la proteasa, altres factors relacionats amb el context estructural, com l'accessibilitat de la proteasa al punt de tall, la rigidesa i compactació de l'enzim, la interacció del connector amb la resta de la proteïna, la conformació del *linker* i l'orientació dels residus que voregen l'enllaç peptídic a digerir, poden també afectar a l'eficiència final de catàlisi de les diferents variants.

En l'estudi de l'activitat ribonucleolítica, les formes precursoras dels zimògens ONCFL, ONCFLG, ONCFL2-C15 i ONCFL2-C16 mostraren una baixa activitat catalítica (amb valors de $k_{cat}/K_M < 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Taula 14) i una molt baixa citotoxicitat per a cèl·lules *Jurkat* en cultiu, característiques que els feien zimògens atractius. A més, a aquest treball s'ha demostrat per microscòpia confocal que el zimogen ONCFLG marcat amb *AlexaFluor 488* penetra eficientment i ràpidament a les cèl·lules *Jurkat* (Figura 31), i que la majoria de les variants estudiades escapen a l'acció de l'RI (Figura 32). Malgrat aquests bons resultats, i com es mostra a la Taula 14, s'observà una relació entre la k_{cat}/K_M de la RNasa respecte el zimogen de poc més de 1. Així mateix tampoc es va observar cap increment de citotoxicitat entre les dues formes precursora i activada. En cap dels treballs de zimògens d'RNasa A de Raines i col·laboradors [360-362] no es van aportar dades sobre la citotoxicitat dels zimògens una vegada processats.

Per tal de comprendre millor el procés de catàlisi i explicar la baixa eficiència catalítica observada en els zimògens d'ONC, es resolgué per NMR l'estructura tridimensional del zimogen ONCFLG, com a model. L'estructura tridimensional que s'obtingué (codi pdb: 2LT5; codi BMRB: 17973) (Figura 34) és molt similar a la d'ONC, exceptuant el segment connector Gly33-Gly48. Aquesta regió, que bloqueja l'accés al centre actiu, no adopta cap estructura secundària, presentant una gran diversitat conformacional i mostrant un grau de protecció molt baix (tant pel *linker* intacte com pel digerit) (Figura 40B i C). Alhora, és la zona més dinàmica de la proteïna, indicat tant pels desplaçaments químics (Figura 39A) com pels valors RMSD (Taula 15) i les mesures dels NOEs heteronuclears (Figura 40) de l'estudi per NMR. Remarcablement, al modelat fet en la fase de disseny dels zimògens, el segment connector adoptava una estructura en hèlix- α . Les prediccions estructurals es realitzaren amb l'extensió Gromos96, implementada en qualsevol de les versions de DeepView. En els modelats, es tingué en compte que l'energia global del sistema resultés negativa, per tant, es considerà que la minimització d'energia en 3000 passos era suficient. Un modelat, però, no és res més que una predicció, amb la qual cosa sempre hi ha un contingut d'incertesa.

Comparant l'estructura d'ONCFLG amb la d'ONC (1ONC) [93], es detectaren variacions en l'orientació de residus del nucli hidrofòbic de V2 (Figura 37) i a l'extrem N-terminal, elements importants per a l'estabilitat conformacional de la proteïna [91, 96, 102, 106]. Aquests canvis, però, no semblen afectar massa a l'elevada estabilitat d'ONCFLG, determinada per DSC (Taula 14) i corroborada pels resultats de l'intercanvi protó-deuteri a nivell de residu (Figura 40).

Aquesta elevada estabilitat de les variants de zimògens d'ONC és sorprenent considerant que els extrems N- i C- terminals es troben permutats.

S'han pogut determinar diversos factors que aconseguen bloquejar l'activitat dels zimògens d'ONC. A nivell global, la seqüència connectora del zimogen ONCFLG es situa sobre la cavitat central i s'ha confirmat la seva capacitat per impedir el correcte posicionament i unió del substrat d[UGG]₃ al centre actiu, tal com es pot deduir per l'absència de NOEs intermoleculares entre l'oligonucleòtid i ONCFLG. A més, el fet que les histidines catalítiques His25 i His58 es trobin majoritàriament amb càrrega neutra (a diferència de la His77, exposada), junt amb les dades d'intercanvi protó-deuteri que reflexen un baix intercanvi de protons amb el solvent, sembla corroborar el bloqueig del subseti P1 aconseguit pel *linker*, que impossibilita l'intercanvi de protons d'aquests residus amb el solvent. L'ONC presenta una major obertura del centre actiu que les seves homòlogues pancreàtiques més actives [113], que junt amb l'elevada rigidesa de l'enzim, determinen una baixa afinitat pels àcids nucleics de cadena senzilla [96]. Recentment s'ha observat que quan l'ONC s'acomplexa amb un substrat s'observa un ínfim tancament entre els lòbuls V1 i V2 [100]. El fet que el zimogen ONCFLG presenti una estructura encara més oberta que l'ONC (*Figura 35*) podria determinar una disminució més acusada de l'afinitat pel substrat.

Comparant el zimogen amb l'ONC (1ONC [93]) i del complex ONC-d(AUGA) (2I5S [70]), s'han observat també canvis en l'orientació dels residus responsables de la catàlisi (*Figura 36*), principalment al subseti catalític P1. L'estructura del zimogen ONCFLG revela que la pèrdua del pont d'hidrogen entre Ser49 i Lys57 (Pyr1 i Lys9 a l'ONC salvatge) és la responsable de l'elevat grau de llibertat conformacional observat per la cadena lateral de Lys57 i corrobora que la funció de Pyr1 a l'ONC, proposada per Raines i col·laboradors [96], és la de posicionar el residu Lys9 de forma apropiada per a la catàlisi. S'ha proposat que la Lys79 treballa conjuntament amb la Lys57 per estabilitzar l'acumulació de càrrega negativa a un oxigen d'un grup fosforil durant la catàlisi [70, 93, 96]. No obstant, la cadena lateral de Lys79 (Lys31 a l'ONC) es disposa allunyant-se del cos central d'ONCFLG (*Figura 36A*) en lloc d'apuntar cap a l'interior del centre actiu com fa la seva equivalent Lys31 a l'ONC. Segurament succeeix a causa de la major mobilitat de la Lys57, comentada anteriorment. Ja amb l'ONC, la major distància d'aquest residu al centre actiu sembla causar una menor activitat respecte a la RNasa A [96, 112]. Així, la posició allunyada de Lys79, podria contribuir també a la disminució d'activitat d'ONCFLG respecte a l'enzim salvatge. Finalment, les histidines catalítiques His58 i His25 presenten una elevada mobilitat i l'anell imidazòlic de la His25 oscil·la verticalment sense adoptar cap de les dues conformacions A (activa) o B (inactiva) observades pel complex ONC-d(AUGA) o per l'ONC salvatge, respectivament (*Figura 36A i B*). A l'ONC també es dona una major oscil·lació de la His97 respecte a les seves homòlogues que sembla afectar a l'activitat [96, 102]. Aquests canvis observats al zimogen semblen ser conseqüència dels moviments de la Lys57 i de la presència del connector peptídic entre els N- i C- terminals nadius. Cal comentar que les

estructures que s'han comparat s'han obtingut amb tècniques diferents: el zimogen ONCFLG mitjançant NMR i, en canvi, 1ONC i ONC-d(AUGA) a través de cristal·lografia i raigs X. Aquestes tècniques presenten limitacions diferents. Així, l'augment de flexibilitat aparent observat en certes zones del zimogen podria ser degut a que, en el cas de cristal·lografia i raigs X, algunes estructures es poden observar més fixes degut a contactes entre molècules del cristall.

L'eficiència catalítica de la variant ONCQ1S, a la qual probablement també li manca el pont d'hidrogen esmentat anteriorment, entre Ser1 i Lys9, és solament tres vegades menor que en l'ONC, mentre que els valors de k_{cat}/K_M de les formes precursors d'ONCFL i d'ONCFLG són de 20 i 8 vegades menors, respectivament (*Taula 14*). Per tant, el *linker* intacte contribueix directament a disminuir l'eficiència catalítica d'ONCFL en aproximadament una setena part i la d'ONCFLG en una tercera part. En conjunt, totes aquestes característiques estructurals comentades permeten explicar la baixa activitat ribonucleolítica aconseguida pel zimogen ONCFLG.

A la forma ONCFLG processada, els valors ΔG_{HX} de la proteïna esdevenen lleugerament més baixos en mitjana (*Figura 40C*), la qual cosa suggereix que les interaccions entre la seqüència connectora i el cos de la proteïna participen en l'estabilitat d'aquesta última. El model estructural i els resultats dels estudis per NMR per aquesta forma (*Figura 39*), indiquen que el segment connector pot adoptar un elevat nombre de conformacions després de la digestió per part de la proteasa HIV-1 PR, presentant uns valors NOE característics dels pèptids no estructurats (*Figura 40A*). El moviment d'aquests segments peptídics podria seguir obstructint estèricament l'aproximació del substrat al centre actiu, incrementant el valor de K_M , i empitjorant la ja baixa afinitat de l'ONC pels substrats ribonucleotídics [70, 96], afectant en gran mesura la seva eficiència catalítica. D'altra banda, en la reacció catalítica àcid-base en dues fases de la RNasa A es requereix que les histidines es trobin carregades [47]. Observant els resultats d'intercanvi protó-deuteri per les histidines catalítiques His25 i His58, sembla que a la forma escindida aquests residus segueixen presentant un baix intercanvi de protons amb el solvent, no recuperant els valors de l'ONC salvatge com seria desitjable. Possiblement l'intercanvi es veu impedit pels extrems peptídics llargs contigus al punt d'activació. Aquest baix intercanvi de protons podria afectar també a la seva càrrega, mantenint-se neutra i, per tant, a la capacitat catalítica de la forma activada del zimogen. Així doncs, la poca accessibilitat al centre actiu i a les histidines catalítiques, junt amb les alteracions dels residus catalítics abans descrites pel zimogen, la majoria de les quals es mantenen en la forma escindida, poden ser la base de la baixa activitat catalítica dels zimògens d'ONC activats, explicant perquè la seva eficiència catalítica no arriba a igualar la del mutant ONCQ1S. Cal comentar que en el cas dels zimògens FL2, en els que suposadament no hi ha la presència dels llargs terminals peptídics, tampoc s'observa una recuperació de l'activitat, fent pensar que la major responsabilitat de la baixa activitat podria ser els canvis que s'observen a nivell dels residus catalítics.

Als zimògens naturals, la proteòlisi específica d'un enllaç peptídic duu a la seva activació, permetent la unió amb el substrat [415], bé sigui reorganitzant la conformació dels residus del centre actiu [33], bé desbloquejant-ne l'accés, o reconstituïnt l'escletxa d'unió al substrat [33, 37]. Els zimògens d'ONC estudiats veuen atenuada la seva activitat per aquests tres factors: tant per l'oclusió del centre actiu efectuada pel *linker* com per l'eixamplament de la cavitat, i finalment també per les alteracions als residus catalítics esmentades. Així doncs, s'han pogut mimetitzar als nostres zimògens creats artificialment les estratègies utilitzades per zimògens naturals. El que no s'ha aconseguit però, ha estat la recuperació de la posició òptima dels residus del centre actiu, ja que la mancança del pont d'hidrogen entre Ser49 i Lys57 es manté en els zimògens d'ONC activats. Tampoc s'ha aconseguit l'accessibilitat del substrat una vegada efectuada l'activació degut a la presència dels llargs fragments peptídics romanents.

Pels zimògens basats en l'HP-RNasa PM5, anomenats *HGNs*, abans de l'activació s'observà una baixa eficiència catalítica igual que pel cas dels zimògens d'ONC. Però a diferència d'aquests, els *HGNs* presentaren un increment significatiu d'activitat ribonucleolítica una vegada activats, d'entre 9 i 156 vegades (*Taula 17*). Aquest increment d'activitat és comparable als zimògens optimitzats d'RNasa A descrits per Raines i el seu equip, de 1000 vegades pel zimogen activable per la plasmepsina II, el primer dels zimògens creats [360], però de 105 per l'activable per la proteasa NS3 del virus causant de l'hepatitis C [361] i tan sols de 50 vegades pel zimogen activable també per la proteasa HIV-1 PR [362]. Així doncs, l'augment significatiu d'activitat catalítica aconseguit a les formes processades dels *HGNs* representa una fita important d'aquest treball.

A les formes precursors de les variants *HGNs* estudiades, s'han observat diferències en l'activitat ribonucleolítica basal, que es poden relacionar clarament amb la longitud del *linker* emprat, que impedeix en diferent grau la possibilitat d'unió del substrat al centre actiu prèviament a l'activació. Així, s'ha considerat adequada la longitud de 15 residus en el connector, ja que amb 16 ja s'observà una activitat basal més elevada. És interessant ressaltar que pels zimògens d'ONC, més petita i compacta que l'HP-RNasa, es considerà adequada la longitud del connector de 16 residus. Aparentment, la major flexibilitat de la proteïna humana es relaciona amb una millor accessibilitat al punt de tall per part de la proteasa i al centre actiu per part del substrat, fent que es requereixi una longitud menor del connector. De forma interessant, quan es compara l'eficiència catalítica de les RNases madures HGNFL i HGNFL2, la presència de 2 dianes amb la conseqüent eliminació d'un fragment del connector FL2 sembla afavorir l'acostament i unió del substrat, evitant gràcies als dos punts de tall els possibles impediments estèrics causats pels llargs extrems peptídics de nova creació que afectarien a FL (com s'ha observat als estudis estructurals d'ONCFLG).

La cua d'histidines present en els zimògens *HGNs* no s'eliminà de forma posterior a la purificació. Evidentment podria afectar a les qualitats dels zimògens, però tot i no utilitzar

finalment una cromatografia d'afinitat (Ni-NTA) durant el procés de purificació d'aquestes variants, la cua d'histidines sembla ser necessària en el procés d'expressió i purificació ja que millorà substancialment el rendiment obtingut. L'acumulació de càrregues positives que representa podria afavorir la internalització. S'ha descrit que la cationització de RNasa A, l'HP-RNasa [143, 144, 207] i de cSBL [416] o de la RNasa Sa [417], augmenta la seva eficiència d'internalització incrementant la citotoxicitat de l'enzim. A més, la cua d'histidines podria alterar de dues maneres l'activitat catalítica. Si entenem que incrementa les càrregues positives de la proteïna de forma global, podria ocasionar un major acostament del substrat ribonucleic, carregat negativament, afavorint així la seva interacció. Però alternativament, també es podria suggerir que l'acumulació de càrrega positiva a un punt concret de la molècula, allunyat del centre actiu, podria segrestar el substrat i impedir la unió d'aquest al centre actiu, disminuint així el potencial catalític de la proteïna. Analitzant l'activitat dels zimògens sense la cua d'histidina es podria valorar l'efecte que aquesta produeix.

L'hRI s'uneix a l'HP-RNasa salvatge fortament, implicant residus del seu centre actiu i fet que aquesta no presenti citotoxicitat en cèl·lules humanes. La cua d'histidines també podria alterar de dues maneres la interacció dels zimògens amb l'RI. La càrrega positiva global més elevada podria atraure més a l'RI ocasionant una major afinitat d'aquest per la RNasa o bé, en desplaçar l'atracció de càrregues al nou N-terminal dels zimògens, potser el centre actiu es mantindria lliure, perdent l'RI la funció inhibidora o part d'aquesta. Malgrat que inicialment era d'esperar que el *linker* impedís la unió amb l'RI en les formes intacta i processada, s'ha observat que el connector intacte efectivament impedeix la unió de la forma precursora al seu inhibidor, però una vegada es duu a terme l'escissió de l'enllaç P1-P1', els extrems peptídics resultants del processament deixarien el centre actiu de l'enzim prou disponible i accessible a l'RI com perquè sigui capaç d'inhibir la seva activitat ribonucleolítica (*Figura 44*). Així doncs, tot i el gran increment d'activitat catalítica observat per les RNases madures, tant les formes precursoras com les processades presenten una citotoxicitat nul·la, demostrant que aquests zimògens resulten ser innocus per a cèl·lules no infectades pel virus HIV-1 (*Taula 17*). El fet de presentar el centre actiu accessible al substrat també sembla implicar que aquestes proteïnes puguin interaccionar amb l'inhibidor. Comparativament, a molts zimògens naturals els ocorre un fet similar, unint-se fortament al seu inhibidor dins les cèl·lules una vegada processats [6]. En el cas del zimogen de RNasa A activable per la mateixa proteasa HIV-1 PR, de Raines i col·laboradors [362], s'observà també que la forma precursora era innòcua per a cèl·lules no infectades i que presentava la capacitat d'evadir RI, com s'ha vist pels zimògens HGNs. Malgrat tot, no es detallà la capacitat d'evasió de l'RI ni la citotoxicitat per la forma processada.

La variant HGNFL-R31ER91D, inspirada en PE3 [203] (proteïna que confirmà treballs previs que demostraven que l'evasió de l'RI pot convertir una ribonucleasa innòcua en una molècula tòxica [40, 418]), aconseguí satisfer el motiu de la seva creació, essent capaç d'evadir l'hRI tant en la forma inactiva com una vegada processada (*Figura 44*). És remarcable també el fet que, a

més de les mutacions R31E i R91D, partint de PM5 ja s'havia alterat també un altre dels residus formadors de ponts d'hidrogen amb l'RI, R4A. Malgrat que aquesta capacitat d'evasió faria esperar que el zimogen HGNFL-R31ER91D activat, un cop dins les cèl·lules pogués dur a terme la seva activitat catalítica i iniciés el procés citotòxic, no s'observà cap efecte en les cèl·lules *Jurkat* en cultiu assajades (Taula 17).

L'absència de citotoxicitat mostrada pel zimogen HGNFL-R31ER91D es pot explicar per la baixa estabilitat conformacional, amb una T_m de 29 °C a pH 5.0 o de 33 °C a pH 7.0, resultant ser la més crítica de tots els zimògens *HGNs* (Taula 17). La desnaturalització parcial d'aquesta última variant permetria explicar algunes de les característiques observades, com la rapidíssima activació amb un temps d'incubació amb la proteasa inferior a 1 h (Figura 45), l'absència de citotoxicitat en cèl·lules en cultiu, ambdós experiments realitzats a 37 °C, i la baixa recuperació d'activitat observada per aquest enzim en relació a la seva variant parental HGNFL, en l'assaig TAMRA efectuat a 25 °C a pH 6.0 (Taula 17 i Figura 47). Estudiant l'estabilitat conformacional de la proteïna HGNFL-R31ER91D una vegada processada, es revelà un lleu increment de 3 °C en el valor de T_m , essent desitjable, ja que les proteïnes menys estables són més susceptibles a la degradació proteolítica no específica [102, 157]. Així, agafant aquesta variant com a exemple, els zimògens de ribonucleases serien degradats més ràpidament en absència que en presència de la proteasa HIV-1 PR, com es descrigué anteriorment [360]. Tot i així, l'estabilitat conformacional aconseguida seguí essent molt baixa.

La proteïna parental PM5, presenta una estabilitat substancialment més elevada, de 58 °C [173]. La variant PE3 ja presentà una disminució en l'estabilitat conformacional, amb una T_m de 53.1 °C, a causa de les mutacions introduïdes a les posicions 31 i 91 [203]. Així, no és d'estranyar la baixa estabilitat estructural dels zimògens pels grans canvis que suposa l'addició de la seqüència connectora i la creació de nous extrems, sobretot a la variant HGNFL-R31ER91D que com PE3, disminueix la seva termoestabilitat respecte el zimogen parental a causa de les mutacions puntuals extra que presenta, veient-se doblement afectada. Comparativament, la permutació circular de l'HP-RNasa fa disminuir la T_m uns 14 °C, el doble de la disminució d'estabilitat causada en els zimògens d'ONC, proteïna molt més termoestable (T_m de 87 °C). S'ha descrit que la capacitat catalítica d'un enzim rígid com és l'ONC és molt sensible a canvis subtils en les distàncies entre els grups funcionals crítics i en la seva disposició [99, 419]. Així, per a poder explicar les diferències d'estabilitat de l'ONC i els seus zimògens respecte a l'HP-RNasa i els seus zimògens, es pot especular que la major rigidesa i estabilitat de l'ONC fa que suporti millor els canvis globals sense afectar de manera dràstica la seva estabilitat, però també pot dificultar la reorientació i el posicionament correcte dels residus catalítics, com hem pogut observar pel zimogen ONCFLG. A l'HP-RNasa podria succeir tot el contrari, deduïble per la baixa estabilitat però la gran recuperació d'activitat aconseguida de forma posterior a l'activació.

L'estabilitat conformacional de l'HP-RNasa també és menor que la descrita per a la RNasa A ($T_m = 64$ °C [82]). Per tant, si observem les variants de zimògens de RNasa A de Raines i el seu equip, seria comprensible que presentessin una estabilitat superior que la dels *HGNs* estudiats. Tot i així, la variant HGNFL, amb una T_m de 44 °C, és comparable als zimògens de RNasa A activables per HIV-1 PR [362], amb unes T_m entorn els 45 °C, uns 20 °C per sota la seva proteïna parental. Per tant, malgrat que la baixa estabilitat conformacional observada pels zimògens d'HP-RNasa representa un punt crític en la seva funcionalitat i aplicació biomèdica, és comparable a la d'altres zimògens de RNases descrits.

Per resumir, considerant aquest treball en conjunt, s'han acomplert els objectius. Tanmateix, les característiques desitjables per a les construccions dels zimògens no han pogut ser assolides en la seva totalitat en cap de les variants de ribonucleasa estudiades. S'han dissenyat, caracteritzat i optimitzat 8 variants de zimògens d'ONC i 4 d'HP-RNasa, innocus per a cèl·lules no infectades per HIV-1, i que són hidrolitzats eficientment per la proteasa HIV-1 PR. No obstant, malgrat la seva elevada estabilitat i capacitat d'evasió de l'RI, les variants d'ONCFLs i ONCFL2s escindides correctament mostraren activitat i citotoxicitat marginal degut a les modificacions que implicava la permutació circular. S'ha resolt l'estructura tridimensional d'ONCFLG, la qual cosa permet explicar l'absència de recuperació d'activitat per les variants basades en ONC. Les dades estructurals aportades estableixen les bases per a la optimització futura dels zimògens d'ONC. Per altra banda, en canvi, s'ha aconseguit obtenir una recuperació d'activitat ribonucleolítica considerable en el cas de les HP-RNases permutades, i per la variant HGNFL-R31ER91D, també la capacitat d'evadir l'inhibidor de ribonucleases citosòlic. Malgrat tot, no s'ha observat tampoc citotoxicitat en la forma processada segurament degut a la baixa estabilitat d'aquest últim zimogen. Resoldre els aspectes que són crítics en cada tipologia de zimogen de RNasa és una fita que val la pena assolir. En un futur, podria ser interessant la creació de noves variants de zimògens tenint en compte aquestes consideracions, que combinin tots els avantatges en una sola molècula. Per tal d'assolir-ho es podria desenvolupar diferents estratègies que es comenten a continuació.

A) OPTIMITZACIÓ DELS ZIMÒGENS D'ONC

A.1) Redisseny de la longitud i seqüència del connector.

En el cas de l'ONC, es podria redissenyar la longitud i la seqüència del connector per tal de posicionar millor el grup acceptor del pont d'hidrogen i fixar el N ξ de la Lys57, ja en la forma inactiva. En cas d'estudiar noves seqüències es podria assajar, per començar, la seqüència utilitzada per l'equip de Raines en el zimogen de RNasa A activable per HIV-1 PR, GSTATIM*MQRGNAG, corresponent a la seqüència natural d'hidròlisi de p2/NC (Δ p2-fast). Aquesta diana és la primera en ser digerida durant el processament seqüencial de la

poliproteïna Gag, i presenta una elevada eficiència d'activació *in vitro* i *in vivo* per part de la proteasa [226, 285]. Cal recordar, però, que és la diana natural de la HIV-1 PR que presenta més variabilitat de totes [288] (revisat a [289]), i que, per tant, el zimogen podria ser més susceptible a l'aparició de resistències per part del virus HIV-1.

A.II) Inserció de mutacions que incrementin l'eficiència catalítica.

A l'ONC, mitjançant la mutació Met23Leu [91, 99] s'afavoreix la mobilitat del loop 24-31 [99]. Aquest fet sembla facilitar l'apropament de Lys31 al centre actiu [112] i podria fixar la seva cadena lateral [100]. En conseqüència, la capacitat catalítica del mutant es veu augmentada, malgrat que és en detriment de la seva estabilitat conformacional, fent que sigui més sensible a la proteòlisi en el punt Phe28-His29, que es troba més exposat que a l'ONC salvatge [91]. En l'aplicació en clínica humana de l'ONC podria ser interessant la creació de mutants menys estables per tal de disminuir la seva vida mitjana en l'organisme minimitzant la toxicitat renal que causa [99, 166, 202]. A més, veient l'elevada estabilitat dels zimògens, s'esperaria que la disminució d'estabilitat no suposés un problema.

Tanmateix, observant la disposició del residu equivalent a Met23 al zimogen ONCFLG (Met71) (*Figura 37*) es pot apreciar que és un dels residus del cluster hidrofòbic que més desplaçat es troba. De fet, tota la regió s'estructura diferent, com s'ha comentat anteriorment, per l'hèlix- 3_{10} que presenta el zimogen enlloc de l'hèlix- $\alpha 2$ habitual a ONC. A la *Figura 48* es compara el residu 23 de l'ONC per estudiar com varia la seva disposició segons si es tracta d'una Met (en gris, 1ONC [93]) o d'una Leu (en blau més fosc, 1YV6 de Merlino et al. [99]; i blau clar, 1PU3 de Gorbatyuk et al. [112]). Es pot apreciar que manté una orientació similar. En canvi al zimogen ONCFLG (2LT5, en taronja) la Met71 s'aprecia clarament allunyada. Observant més detingudament el residu Lys31 (*Figura 48C i D*), veiem que mentre al mutant de Merlino aquest residu es disposa amb l'extrem de la cadena lateral més encarat al centre actiu que l'ONC, afavorint la catàlisi, pel mutant de Gorbatyuk no s'aprecia aquesta millora, adoptant una posició diferent, de forma similar a la Lys79 del zimogen. Segurament, la distància i disposició d'aquesta Lys a la variant de Gorbatyuk són degudes a l'absència de la xarxa de ponts d'hidrogen N-terminal, ja que aquesta variant no presenta el residu Pyr1 (manté la Met-1 que impossibilita a la Gln1 de ciclar-se). Així, es pot observar que sense aquesta estabilització, la Lys9 es troba més allunyada (*Figura 48D*) i al seu torn, no pot estabilitzar tan correctament la Lys31. Per tant, sumant el fet que sense la formació dels ponts d'hidrogen N-terminal la millora ja no és tan substancial, i que ONCFLG presenta la Met71 tan desplaçada, malgrat que es podria provar la mutació esmentada, fa dubtar que l'efecte fos l'esperat.

A.III) Estudi de dianes addicionals a la seqüència connectora.

Si s'aconseguís solucionar l'orientació dels residus catalítics, es podria aprofundir en l'estudi de dianes addicionals per part de la proteasa dins el connector, com el cas dels zimògens FL2, disminuint els impediments estèrics causats pels extrems peptídics de nova creació.

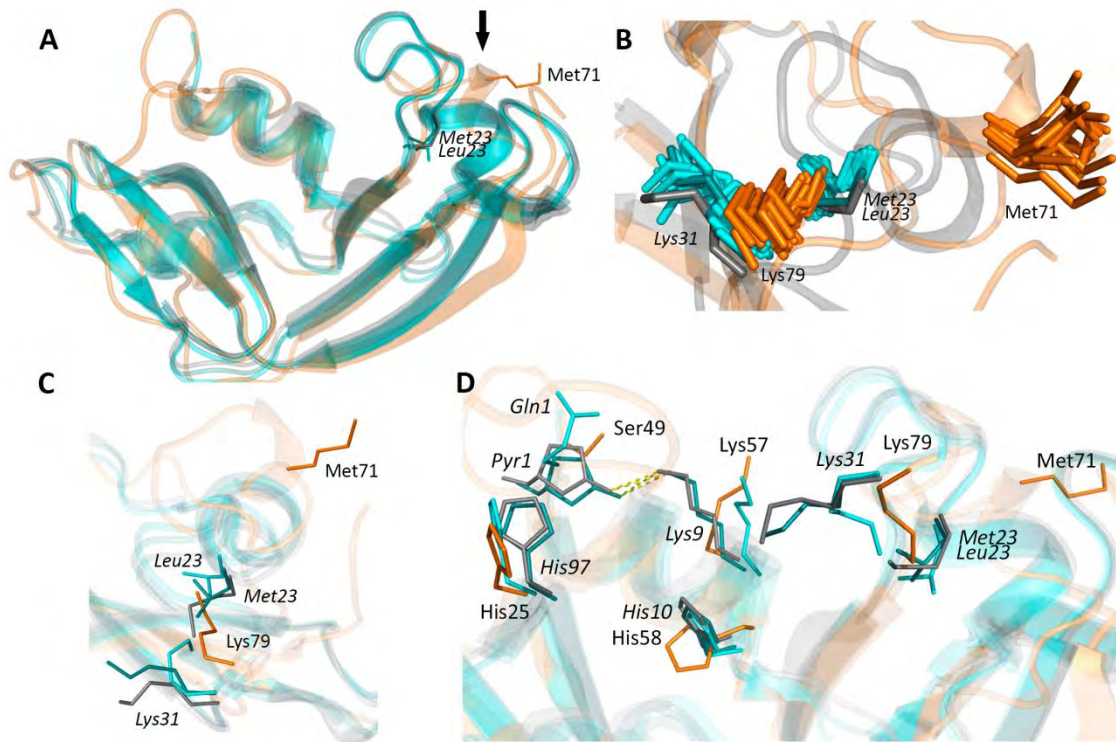


Figura 48. Comparativa de la disposició del residu 23 entre ONC, ONC-M23L i ONCFLG.

A) Estructura general solapada de l'ONC salvatge (1ONC [93]) amb el residu salvatge Met23 ressaltat en barres, de la variant ONC-M23L de Merlino i col·laboradors (1YV6 [99]) i ONC-M23L de Gorbatyuk i col·laboradors (1PU3 [112]) amb el residu mutat Leu23; i el zimogen ONCFLG (2LT5) amb el residu equivalent Met71. **B)** Visualització del residu 23 junt amb la Lys31 (residus Met71 i Lys39 al zimogen ONCFLG). Es poden observar les diferents conformacions que poden adoptar els residus del zimogen 2LT5, i de 1PU3. **C)** Visió superior (des d'on s'indica amb la fletxa negra a A) dels residus 23 i 31 (ONC i ONC-M23L), i els equivalents del zimogen 71 i 79. Es pot apreciar l'allunyament de la Met71 d'ONCFLG respecte a la Met23 d'ONC i Leu23 de les dues ONC-M23L en relació al residu Lys31 (Lys79 al zimogen). **D)** Solapament dels residus del centre actiu de les proteïnes. S'observa els ponts d'hidrogen formats entre Pyr1 i Lys9 tant per 1ONC com per 1YV6. La variant 1PU3 manté la Met-1 i el zimogen presenta la Ser49 (N-terminal original) unida al C-terminal original mitjançant el *linker*. En tots els casos, l'ONC salvatge (1ONC) es troba acolorida en gris, les variants mutades ONC-M23L es mostren en blau per la variant 1YV6 i en blau clar per 1PU3. El zimogen ONCFLG es mostra en taronja. S'indiquen els residus corresponents al zimogen amb tipografia normal, i els corresponents a ONC i ONC-M23L, en cursiva.

B) OPTIMITZACIÓ DELS ZIMÒGENS D'HP-RNAsa HGNs

B.1) Estudi de dianes addicionals a la seqüència connectora de 15 residus.

Per a les variants d'HP-RNasa es podrien crear zimògens que presentin una seqüència connectora de 15 residus aminoacídics de longitud, evitant l'elevada activitat basal observada per la variant HGNFL2 de 16 residus i descartant possible citotoxicitat en la forma intacta, però amb dos punts de digestió, ja que semblen afavorir la recuperació d'activitat permetent una major accessibilitat del substrat. Es podria utilitzar la seqüència connectora FL2-C15, assajada solament en les variants d'ONC permutada.

B.II) Estudi de les mutacions R39ER91D per escapar a RI.

És necessari que els zimògens escapin a l'acció de l'inhibidor per ser efectius, per tant seria interessant potser testar les substitucions R39E i R91D, ja que les estudiades en aquest treball R31ER91D duen a una gran pèrdua d'estabilitat. Al treball de Johnson i col·laboradors [174], s'observà que els residus més importants en la unió amb l'hRI eren els residus 91 i 39, que no solament intervenen en la formació del complex per atracció de càrregues sinó que també l'estabilitzen mitjançant ponts d'hidrogen tot permetent la formació d'altres contactes. El residu Arg91, situat al llaç $\beta 4\beta 5$, estableix interaccions amb la superfície aniònica còncava de l'hRI, formant dos ponts d'hidrogen amb Glu287. El residu 39 forma un pont d'hidrogen doble amb la cadena lateral de Glu401 de l'hRI i un pont d'hidrogen entre cadenes principals amb el residu Tyr434. A més, el residu 39 es troba localitzat fora de l'hèlix- $\alpha 2$, a diferència del residu 31 modificat en aquest treball, i podria afectar en menor grau l'estructura d'aquesta regió i, en conseqüència, l'estabilitat de la proteïna.

B.III) Millora de l'estabilitat global de les HP-RNases permutades.

Per una banda, es podria eliminar la cua d'histidines dels zimògens, de forma posterior a la seva purificació mitjançant proteòlisi (emprant d'entrada la diana per trombina que hi ha a pET28 o afegint una diana per alguna altra proteasa), per tal d'estudiar com afecta aquesta a les característiques dels zimògens, i en concret veure si permet millorar-ne l'estabilitat.

Per altra banda, el punt on es localitzen els extrems no nadius d'un zimogen de ribonucleasa pot afectar tant en el plegament proteic com en la seva estabilitat, així com la recuperació d'activitat de la RNasa per efectes sobre l'estructura i posició dels residus catalítics i del centre actiu [360]. Així, en estudis futurs es podria assajar noves posicions diferents pels extrems no nadius en els zimògens d'HP-RNasa, amb la finalitat de millorar el plegament i estabilitat conformacional.

També, es podria generar una nova bateria de zimògens d'HP-RNasa introduint enllaços que puguin estabilitzar l'estructura, com ponts disulfur [420], ponts d'hidrogen o interaccions electrostàtiques [421]. Mentre que l'eliminació de ponts disulfur naturals sol resultar en una disminució de l'estabilitat proteica [422, 423], la creació de nous enllaços disulfur és context-depenent, augmentant l'estabilitat en alguns casos [424-426] però creant tensions a la proteïna [424, 427] o alterant el procés de plegament/desplegament [428, 429] en altres casos. L'èxit de les manipulacions depèn de les propietats individuals i topologia de la proteïna [426]. S'han descrit incomptables modificacions puntuals a la RNasa A per tal d'incrementar la seva estabilitat, però només algunes han resultat exitoses (revisat a [430]). En són destacables A4C/V11C ($\Delta T_m = +5^\circ\text{C}$), D53A ($\Delta T_m = +5^\circ\text{C}$ [55]) i la introducció d'un pont S-S a A4C/V118C ($\Delta T_m = +4^\circ\text{C}$) [157, 426]. Aquest últim pont disulfur també demostrà incrementar l'estabilitat ($\Delta T_m = +5^\circ\text{C}$ [40] o $\Delta C_{1/2} = 0.64 \text{ M}$ en desnaturalització amb clorur de guanidini [431]) i la citotoxicitat ($\Delta IC_{50} = -4 \mu\text{M}$ [40]) d'una variant d'HP-RNasa. En proteïnes termòfiles, a més de

presentar habitualment més ponts disulfur, també el número d'aminoàcids carregats incrementa, a expenses dels no carregats polars, afavorint la formació de ponts salins. Encara que un pont salí aporta menys guany d'estabilitat que un pont disulfur, causa menys tensió conformacional, essent considerablement important, particularment si aquest pont salí forma part d'una xarxa [430, 432, 433]. A la RNasa A, l'Asp83 (situat al punt oposat del pont d'hidrogen natural A4-V118), sembla no ser crucial per l'estabilitat. S'ha vist però, que la substitució de Asp83Glu promou una estabilització de la RNasa A per la creació d'un pont salí entre Asp83Glu i Lys104 (a la zona C-terminal), i que la Ser 123 intervé en la formació d'una xarxa electrostàtica, incrementant finalment l'estabilitat en +6 °C [434]. Així, en el triple mutant A4C/D83E/V118C, l'efecte va ser additiu aconseguint la RNasa A més estable ($T_m = 76$ °C). Malgrat tot, degut a la implicació d'Asp83 en la unió amb el substrat [47, 157] i a la variació observada a la cadena lateral de la His119 catalítica (al costat de la posició mutada 118), s'observà una lleu disminució de l'activitat catalítica. En els zimògens descrits per l'equip de Raines [360-362], es parteix d'una RNasa A amb 2 ponts disulfur no-natius introduïts, en posicions 4/118 i 88/89. Aquest segon pont disofre uneix els nous terminals generats en la permutació circular, incrementant globalment en 8-10 °C el valor de la T_m respecte la RNasa permutada amb solament els 4 ponts disulfur natius. En el nostre cas, es podrien reproduir en noves HP-RNases permutades aquests canvis per tal de millorar l'estabilitat.

C) ALTRES PUNTS D'ESTUDI

Si s'aconseguís millorar les característiques dels zimògens, posteriorment seria interessant estudiar alguns punts.

C.1) El HIV afecta a les propietats de la membrana plasmàtica, i podria afectar la capacitat d'internalització dels zimògens en cèl·lules infectades.

Al moment de la infecció, l'entrada viral pot ocasionar una major internalització com s'ha observat en algunes RNases, tal i com s'explica a l'apartat introductor 2.3.4. *RNases en la teràpia contra el HIV*. Podria ser degut a la proteïna gp41, que sembla ser un formador de porus [435]. Aquest fet resultaria positiu pels zimògens, podent afavorir també la seva internalització a les cèl·lules. D'altra banda, una vegada el virus ha infectat la cèl·lula, mentre efectua el cicle viral expressa proteïnes de l'envolta pels nous virions, que s'ancoraran a la membrana [436]. També, durant el cicle viral del HIV-1, algunes proteïnes virals transmembrana ocasionen una permeabilització de la membrana plasmàtica de la cèl·lula hoste i de compartiments cel·lulars gràcies a la formació de canals que dissiparan el potencial transmembrana (revisat a [232]). Finalment, tot i que està en estadis inicials d'estudi, sembla que les cèl·lules-T CD4⁺ que presenten infecció per HIV en estat latent sobreexpressen la proteïna de membrana CD2 [341]. Tots aquests canvis de membrana de les cèl·lules infectades podrien afectar a la internalització dels zimògens. D'una banda, el canvi de potencial de membrana podria dificultar la interacció dels zimògens

(catiònics) amb la membrana, de potencial habitualment negatiu. Però contràriament, la internalització es podria veure afavorida per l'aprimament o la formació de canals transmembrana. Per tal de determinar la capacitat d'internalització dels zimògens en cèl·lules infectades respecte les sanes, s'hauria d'estudiar en detall.

C.II) Els zimògens no haurien de ser activats per cap de les proteases humanes de l'interior de les cèl·lules sanes.

A l'interior de les cèl·lules es troben presents múltiples proteases, algunes d'elles similars a la del HIV-1. Per tal d'estudiar si els zimògens podrien ser activats per proteases humanes, es podria posar en contacte els zimògens amb sèrum i analitzar el temps de vida mitja d'aquests. Prèviament, es pot fer una previsió *in silico*. Existeixen bases de dades de peptidases (com MEROPS), i eines per fer un mapa de digestió d'una seqüència peptídica per part de proteases (com els serveis web ClipServe, SitePrediction, CleavPredict, PROSPER, o PeptideCutter d'ExPASy). Però cal comentar que malgrat que són previstos múltiples punts de tall a la seqüència connectora dels zimògens, és molt diferent les dianes que pot presentar la seqüència desplegada que no *in vivo*, respecte a una regió amb possible estructura i amb zones de la proteïna plegada properes, presentant un accés de les proteases molt més difícil als punts de tall previstos i, segurament, una digestió significativament diferent.

C.III) Estudi de la capacitat dels zimògens d'eliminació de reservoris virals.

El desenvolupament de drogues que matin les cèl·lules infectades pel HIV-1 és altament atractiu, ja que podria eradicar completament els reservoris virals en pacients, un repte encara pendent en la teràpia HAART [437]. En el cas de les RNases, que també presenten la limitació de no actuar contra el provirus latent, es podrien combinar amb activadors de la transcripció viral, tal i com s'està estudiant actualment per altres antiretrovirals. Tot i que existeixen tractaments de 'xoc i mort' més efectius, les citocines s'empraren com a activadors de les cèl·lules-T [314-317]. Així, l'HP-RNasa, que potencia la producció de citocines en cèl·lules dendrítiques [194], modificada convenientment com a zimogen, podria representar un agent antiviral interessant com a anti-HIV. Per l'eliminació del reservori viral de més difícil accés, el CNS, s'hauria d'aconseguir traspasar la barrera hematoencefàlica, i combinar-ho també amb un activador de la transcripció viral que comparteixi la mateixa capacitat (com l'HDACi vorinostat). S'ha observat que alguns patògens alteren la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica. El HIV incrementa el diàmetre dels vasos corticals, aprima la làmina basal, causa la pèrdua d'algunes glicoproteïnes, i promou l'apoptosi de les cèl·lules endotelials i la disrupció de les unions estretes de la barrera hematoencefàlica [438]. D'aquesta forma, sembla que es facilita la seva entrada al cervell establint el reservori. Aquesta permeabilització de membrana es pot relacionar amb neuropatologies associades (HAND) degut a la permissió d'entrada de toxines al CNS [439]. Així, sembla que la infecció per HIV potencialment podria incrementar el transport de drogues (i per tant, dels zimògens) cap al cervell. Per tal de permeabilitzar la BBB existeixen diferents estratègies com augmentar la lipofilitat de la

droga, alterar la permeabilitat de la barrera (ultrasons, camps magnètics, gels disruptors), internalitzar via nanopartícules o liposomes, utilització de cèl·lules mediadores, ... (revisat a [440]). Existeix un exemple de RNasa A amb acilacions que podia superar la barrera hematoencefàlica *in vitro* [441]. El mecanisme més factible de transport selectiu de molècules grans cap al CNS és la transcitosi mediada per receptor. Hi ha múltiples receptors presents a la membrana de les cèl·lules endotelials de la barrera hematoencefàlica, el més estudiat dels quals és el receptor de la transferrina. Per aconseguir dirigir els zimògens al CNS, es podria fusionar el zimogen més òptim amb el pèptid H-THRPPMWSPVWP-NH₂ de l'estudi recent de Teixidó i col·laboradors, un pèptid rentro-enantiòmer resistent a proteases i que s'unia al receptor de transferrina a un lloc diferent de la transferrina, permetent el transport de càrregues de mida variable cap al CNS [442].

L'estratègia quimioterapèutica emprada en els zimògens de RNases, basada en l'activació d'un enzim citotòxic per part d'un enzim viral, en comptes de la seva inhibició directa, podria permetre evadir mecanismes ja descrits de resistència microbiana o viral. És raonable anticipar que la resistència a una droga/substrat que requereixi l'activitat catalítica de la proteasa HIV-1 PR serà significativament més difícil de desenvolupar per part d'un virus que no pas quan se'l tracta amb drogues inhibidores. A més, l'aparició d'una resistència a causa d'una variant de proteasa que alteri l'especificitat de substrat, a part de poder afectar el processament de les poliproteïnes del virus, podria ser contrarestada reemplaçant el connector de bloqueig del centre actiu de la ribonucleasa per un de nou que sigui reconegut [362].

L'ONC és citotòxica de forma natural, i va assolir la fase IIIb pel tractament del mesotelioma maligne. Per l'HP-RNasa és d'esperar una menor resposta immunològica en ser aplicada en clínica humana. Concloent, la creació de zimògens exitosos basats en ONC o en HP-RNasa pot representar una opció nova i versàtil per a controlar l'activitat catalítica d'aquests enzims i dirigir la seva citotoxicitat a cèl·lules infectades concretes. Aquests zimògens, activats per proteases microbianes o virals, podrien estendre la utilitat terapèutica de les ribonucleases citotòxiques a malalties diferents del càncer i representen una estratègia per evitar mecanismes coneguts de resistència a drogues per part d'alguns patògens.



7. CONCLUSIONS



7. CONCLUSIONS

1. S'ha optimitzat l'expressió recombinant i s'ha desenvolupat un protocol de purificació per la proteasa HIV-1, denominada SK#1, aconseguint un rendiment de producció de 20 mg/ml de cultiu. L'eficiència catalítica de la proteasa SK#1 ($k_{cat}/K_M=17.10 \pm 0.98 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$) és equiparable a la de l'enzim comercial *recHIV-1PR*.

2. S'han dissenyat, construït i purificat 8 zimògens basats en l'ONC i 4 en l'HP-RNasa, denominats ONCYP, ONCYPG1, ONCYPG2, ONCYPGG, ONCFL, ONCFLG, ONCFL2-C15 i ONCFL2-C16; i HGNYP, HGNFL, HGNFL2 i HGNFL-R31ER91D.

3. L'activació *in vitro* dels zimògens utilitzant la proteasa SK#1 és variable entre un 10-100% en funció de la seqüència aminoacídica i la longitud del connector del zimogen. Així, la seqüència de tipologia FL (GSGIF*LETSL) és processada més eficientment i ràpida que la de tipus YP (SQNY*PIVQ). D'altra banda, una major longitud del connector o la duplicació de la diana també afavoreix la digestió per part de la proteasa.

4. Els zimògens ONCFL i ONCFLG, en experiments de DSC, presenten una elevada estabilitat conformacional. Els valors de T_m al voltant dels 80 °C són comparables als de l'ONC i la variant ONCQ1S, i molt superiors a la temperatura fisiològica, propietat essencial per a la seva utilització *in vitro* i *in vivo*. L'estabilitat d'ONCFLG es va confirmar també en els experiments d'intercanvi ^1H - ^2D mitjançant NMR. Els zimògens basats en HP-RNasa presenten una estabilitat a la temperatura molt menor (T_m entre 29 i 44 °C). La variant més estable, HGNFL, presenta un valor de T_m comparable a la dels zimògens basats en la RNasa A.

5. S'ha comprovat que el zimogen ONCFLG (S120C-conjugat amb *Alexa Fluor*[®] 488 C5 *maleimide*) internalitza eficientment i ràpida en cèl·lules *Jurkat* en cultiu, detectant-se a l'interior de les cèl·lules 3 hores després d'afegir-lo, i incrementant la seva internalització fins a les 12 hores.

6. Els zimògens d'ONC escapen a l'inhibidor de ribonucleases de la mateixa manera que ho fa l'ONC. Per la seva part, els zimògens d'HP-RNasa només eviten la unió a l'inhibidor quan el connector està intacte. La variant HGNFL-R31ER91D dissenyada amb aquesta finalitat, ha permès l'obtenció d'un zimogen de l'HP-RNasa que escapa de l'inhibidor tant en la seva forma precursora com processada.

7. Mentre que pels zimògens basats en l'ONC s'observa un increment de k_{cat}/K_M , després de l'activació amb la proteasa SK#1, d'entre 0,79 i 1,43 cops, pels zimògens d'HP-RNasa, en canvi, es detecta un increment d'activitat catalítica d'entre 9 i 156 vegades un cop són activats per la proteasa. Aquests increments són comparables als descrits per zimògens d'RNasa A.

8. Les formes precursors de tots els zimògens estudiats presenten una citotoxicitat molt reduïda abans de l'activació amb la proteasa SK#1 i són, per tant, innòcues per les cèl·lules no infectades pel HIV-1. Les formes activades no presenten una citotoxicitat significativa, la qual

cosa podria ser deguda a la baixa activitat ribonucleolítica en el cas dels zimògens d'ONC i a l'efecte de l'inhibidor o a la baixa estabilitat conformacional en el cas dels d'HP-RNasa.

9. El zimogen ONCFLG presenta una estructura terciària global i una disposició dels elements d'estructura secundària molt similar a l'ONC salvatge, conservant l'elevada rigidesa i compactació (RMSD = 0.2 Å). Les diferències més remarcables són la reorganització de part de l'hèlix- α 2 en hèlix-3₁₀, i la pèrdua de l'hèlix-3₁₀ al final de l'hèlix- α 3. El connector FL (GSGIF*LETSL) no presenta estructura secundària definida i és la part més dinàmica i flexible de la molècula (RMSD = 1.5 Å), mostrant una gran diversitat conformacional. Aquesta regió s'estén per sobre la cavitat central desenvolupant la funció d'obstaculitzar l'accés del substrat al centre actiu. Aquest resultat estaria en consonància amb la no detecció de NOEs intermoleculares en els experiments d'unió d'ONCFLG a l'anàleg de substrat no hidrolitzable per ribonucleases d[UGG]₃.

10. El model estructural de la forma digerida del zimogen ONCFLG permet proposar que després de l'acció de la proteasa, els segments del connector resultants presentarien un número molt elevat de conformacions. La mobilitat d'aquests segments podria seguir obstruint espacialment l'accessibilitat del substrat al centre actiu la qual cosa podria explicar, parcialment, la baixa recuperació d'activitat després de la digestió.

11. Els canvis d'orientació de les cadenes laterals de determinats residus del zimogen ONCFLG corroboren la importància del pont d'hidrogen Pyr1 O ϵ – Lys9 N ξ per posicionar la Lys9 de manera escaient per a la catàlisi en l'ONC. La pèrdua d'aquesta interacció entre els residus equivalents, Ser49 i Lys57, al zimogen, proporcionarien una major llibertat conformacional als residus Lys79, His58 i His25 que constitueixen la triada catalítica. Aquests reajustaments permeten explicar aproximadament, una tercera part de la pèrdua d'activitat dels zimògens mentre que la resta seria deguda a la mobilitat dels segments després de la digestió del connector per la proteasa.

12. Els estudis realitzats amb els zimògens d'ONC i HP-RNasa i la resolució de l'estructura del zimogen ONCFLG permeten entendre millor les bases moleculars del funcionament dels zimògens artificials de ribonucleases i estableixen els fonaments per a la creació de zimògens exitosos en un futur. Això suposa una opció versàtil per manipular l'activitat enzimàtica d'aquests enzims i dirigir la seva toxicitat a un determinat estat d'una malaltia. Els zimògens basats en ribonucleases activats per proteases microbianes o virals podrien fer extensiu el potencial terapèutic d'aquests enzims a altres malalties a part del càncer i representen una estratègia per esquivar mecanismes coneguts de resistència dels patògens.



8. BIBLIOGRAFIA



8. BIBLIOGRAFIA

1. Uversky, V.N., *Functional roles of transiently and intrinsically disordered regions within proteins*. FEBS J, 2015.
2. Uversky, V.N. and A.K. Dunker, *Understanding protein non-folding*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(6): p. 1231-64.
3. Jeffery, C.J., *An introduction to protein moonlighting*. Biochem Soc Trans, 2014. **42**(6): p. 1679-83.
4. Jeffery, C.J., *Moonlighting proteins--an update*. Mol Biosyst, 2009. **5**(4): p. 345-50.
5. Neurath, H., *Evolution of proteolytic enzymes*. Science, 1984. **224**(4647): p. 350-7.
6. Salvesen, G.S. and J.M. Abrams, *Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2774-84.
7. Petsko, G.R., D., *Control of protein function, in Protein Structure and Function, in Protein Structure and Function. Primers in Biology*. 2008, Primers in Biology. p. 85-127.
8. Wyrick, J.J. and R.A. Young, *Deciphering gene expression regulatory networks*. Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(2): p. 130-6.
9. Agami, R., *RNAi and related mechanisms and their potential use for therapy*. Curr Opin Chem Biol, 2002. **6**(6): p. 829-34.
10. Kapp, L.D. and J.R. Lorsch, *The molecular mechanics of eukaryotic translation*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 657-704.
11. Dorn, G.W., 2nd and D. Mochly-Rosen, *Intracellular transport mechanisms of signal transducers*. Annu Rev Physiol, 2002. **64**: p. 407-29.
12. Brown, K., et al., *Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1485-8.
13. Warepm, M., et al., *Structural characteristic of the initial unfolded state on refolding determines catalytic efficiency of the folded protein in presence of osmolytes*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e109408.
14. Khan, S.H., et al., *Naturally occurring organic osmolytes: from cell physiology to disease prevention*. IUBMB Life, 2010. **62**(12): p. 891-5.
15. Koshland, D.E., Jr. and K. Hamadani, *Proteomics and models for enzyme cooperativity*. J Biol Chem, 2002. **277**(49): p. 46841-4.
16. Monod, J., J.P. Changeux, and F. Jacob, *Allosteric proteins and cellular control systems*. J Mol Biol, 1963. **6**: p. 306-29.
17. Zolnierowicz, S. and M. Bollen, *Protein phosphorylation and protein phosphatases. De Panne, Belgium, September 19-24, 1999*. EMBO J, 2000. **19**(4): p. 483-8.
18. Zhong, H., et al., *The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the I kappa B-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism*. Cell, 1997. **89**(3): p. 413-24.
19. Shahbazian, M.D. and M. Grunstein, *Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 75-100.
20. Luzio, J.P., P.R. Pryor, and N.A. Bright, *Lysosomes: fusion and function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(8): p. 622-32.
21. Demartino, G.N. and T.G. Gillette, *Proteasomes: machines for all reasons*. Cell, 2007. **129**(4): p. 659-62.
22. Kornitzer, D. and A. Ciechanover, *Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation*. J Cell Physiol, 2000. **182**(1): p. 1-11.
23. Perler, F.B., *Protein splicing mechanisms and applications*. IUBMB Life, 2005. **57**(7): p. 469-76.
24. Paulus, H., *Protein splicing and related forms of protein autoprocessing*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 447-96.
25. Anraku, Y., R. Mizutani, and Y. Satow, *Protein splicing: its discovery and structural insight into novel chemical mechanisms*. IUBMB Life, 2005. **57**(8): p. 563-74.
26. Perler, F.B., *InBase: the Intein Database*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(1): p. 383-4.
27. Choi, J.J., et al., *Protein trans-splicing and characterization of a split family B-type DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeal parasite Nanoarchaeum equitans*. J Mol Biol, 2006. **356**(5): p. 1093-106.
28. Saleh, L. and F.B. Perler, *Protein splicing in cis and in trans*. Chem Rec, 2006. **6**(4): p. 183-93.

29. Hirata, R., et al., *Molecular structure of a gene, VMA1, encoding the catalytic subunit of H(+)-translocating adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1990. **265**(12): p. 6726-33.
30. Kane, P.M., et al., *Protein splicing converts the yeast TFP1 gene product to the 69-kD subunit of the vacuolar H(+)-adenosine triphosphatase*. Science, 1990. **250**(4981): p. 651-7.
31. Von Der Helm, K., Korant, B.D. & Cheronis, J.C., *Proteases as Targets for Therapy.*, ed. Springer-Verlag. 2000, Heidelberg.
32. Smith, J.S., C., *Proteinase and Peptidase Inhibition: Recent Potential Targets for Drug Development*, ed. T. Francis. 2002, London.
33. Khan, A.R. and M.N. James, *Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes*. Protein Sci, 1998. **7**(4): p. 815-36.
34. Laskowski, M.J., Quasim, M.A. & Lu, S.M., *Interaction of standard mechanism, canonical protein inhibitors with serine proteases.*, in *Protein-Protein Recognition*, C. Kleantous, Editor. 2000, Oxford University Press: Oxford. p. 228-279.
35. Lazure, C., *The peptidase zymogen proregions: nature's way of preventing undesired activation and proteolysis*. Curr Pharm Des, 2002. **8**(7): p. 511-31.
36. Borgono, C.A. and E.P. Diamandis, *The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(11): p. 876-90.
37. Freer, S.T., et al., *Chymotrypsinogen: 2.5-angstrom crystal structure, comparison with alpha-chymotrypsin, and implications for zymogen activation*. Biochemistry, 1970. **9**(9): p. 1997-2009.
38. Kossiakoff, A.A., et al., *Structure of bovine trypsinogen at 1.9 Å resolution*. Biochemistry, 1977. **16**(4): p. 654-64.
39. Ehrmann, M. and T. Clausen, *Proteolysis as a regulatory mechanism*. Annu Rev Genet, 2004. **38**: p. 709-24.
40. Leland, P.A., et al., *Endowing human pancreatic ribonuclease with toxicity for cancer cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(46): p. 43095-102.
41. Haigis, M.C., E.L. Kurten, and R.T. Raines, *Ribonuclease inhibitor as an intracellular sentry*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(3): p. 1024-32.
42. Dickson, K.A., M.C. Haigis, and R.T. Raines, *Ribonuclease inhibitor: structure and function*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2005. **80**: p. 349-74.
43. Eckstein, F., et al., *Stereochemistry of the transesterification step of ribonuclease T1*. Biochemistry, 1972. **11**(19): p. 3507-12.
44. Gohda, K., et al., *Crystal structure of RNase T1 complexed with the product nucleotide 3'-GMP. Structural evidence for direct interaction of histidine 40 and glutamic acid 58 with the 2'-hydroxyl group of the ribose*. J Biol Chem, 1994. **269**(26): p. 17531-6.
45. Sorrentino, S. and M. Libonati, *Structure-function relationships in human ribonucleases: main distinctive features of the major RNase types*. FEBS Lett, 1997. **404**(1): p. 1-5.
46. Beintema, J.J., et al., *Molecular evolution of the ribonuclease superfamily*. Prog Biophys Mol Biol, 1988. **51**(3): p. 165-92.
47. Raines, R.T., *Ribonuclease A*. Chem Rev, 1998. **98**(3): p. 1045-1066.
48. Deutscher, M.P., *The metabolic role of RNases*. Trends Biochem Sci, 1988. **13**(4): p. 136-9.
49. D'Alessio, G., et al., *Seminal RNase: a unique member of the ribonuclease superfamily*. Trends Biochem Sci, 1991. **16**(3): p. 104-6.
50. Anfinsen, C.B., et al., *The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1961. **47**: p. 1309-14.
51. Scheraga, H.A. and J.A. Rupley, *Structure and function of ribonuclease*. Adv Enzymol Relat Subj Biochem, 1962. **24**: p. 161-261.
52. Blackburn, P. and J.G. Gavilanes, *Identification of lysine residues in the binding domain of ribonuclease A for the RNase inhibitor from human placenta*. J Biol Chem, 1982. **257**(1): p. 316-21.
53. Nogues, M.V., M. Vilanova, and C.M. Cuchillo, *Bovine pancreatic ribonuclease A as a model of an enzyme with multiple substrate binding sites*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1253**(1): p. 16-24.
54. Ribo, M., et al., *Pressure as a tool to study protein-unfolding/refolding processes: the case of ribonuclease A*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1764**(3): p. 461-9.
55. Vila, R., et al., *Mapping the stability clusters in bovine pancreatic ribonuclease A*. Biopolymers, 2009. **91**(12): p. 1038-47.
56. Cuchillo, C.M., M.V. Nogues, and R.T. Raines, *Bovine pancreatic ribonuclease: fifty years of the first enzymatic reaction*

- mechanism*. *Biochemistry*, 2011. **50**(37): p. 7835-41.
57. Matousek, J., *Ribonucleases and their antitumor activity*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2001. **129**(3): p. 175-91.
58. Benito, A., M. Ribo, and M. Vilanova, *On the track of antitumour ribonucleases*. *Mol Biosyst*, 2005. **1**(4): p. 294-302.
59. Benito, A., et al., *The structural determinants that lead to the formation of particular oligomeric structures in the pancreatic-type ribonuclease family*. *Curr Protein Pept Sci*, 2008. **9**(4): p. 370-93.
60. Arnold, U. and R. Ulbrich-Hofmann, *Natural and engineered ribonucleases as potential cancer therapeutics*. *Biotechnol Lett*, 2006. **28**(20): p. 1615-22.
61. Benner, S.A. and R.K. Allemann, *The return of pancreatic ribonucleases*. *Trends Biochem Sci*, 1989. **14**(10): p. 396-7.
62. Youle, R.J., et al., *Cytotoxic ribonucleases and chimeras in cancer therapy*. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1993. **10**(1): p. 1-28.
63. Fett, J.W., et al., *Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells*. *Biochemistry*, 1985. **24**(20): p. 5480-6.
64. D'Alessio, G., Riordan, JF., *Ribonucleases: Structures and Functions*, in Academic Press. 1997: New York.
65. Gupta, S.K., et al., *The mammalian secreted RNases: mechanisms of action in host defence*. *Innate Immun*, 2013. **19**(1): p. 86-97.
66. Schein, C.H., *From housekeeper to microsurgeon: the diagnostic and therapeutic potential of ribonucleases*. *Nat Biotechnol*, 1997. **15**(6): p. 529-36.
67. Beintema, J.J. and R.G. Kleineidam, *The ribonuclease A superfamily: general discussion*. *Cell Mol Life Sci*, 1998. **54**(8): p. 825-32.
68. Bretscher, L.E., R.L. Abel, and R.T. Raines, *A ribonuclease A variant with low catalytic activity but high cytotoxicity*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(14): p. 9893-6.
69. Wu, Y., et al., *A cytotoxic ribonuclease. Study of the mechanism of onconase cytotoxicity*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(14): p. 10686-93.
70. Lee, J.E., et al., *Structural basis for catalysis by onconase*. *J Mol Biol*, 2008. **375**(1): p. 165-77.
71. Garcia-Mayoral, M.F., et al., *NMR structural determinants of eosinophil cationic protein binding to membrane and heparin mimetics*. *Biophys J*, 2010. **98**(11): p. 2702-11.
72. Navarro, S., et al., *The cytotoxicity of eosinophil cationic protein/ribonuclease 3 on eukaryotic cell lines takes place through its aggregation on the cell membrane*. *Cell Mol Life Sci*, 2008. **65**(2): p. 324-37.
73. Torrent, M., et al., *Bactericidal and membrane disruption activities of the eosinophil cationic protein are largely retained in an N-terminal fragment*. *Biochem J*, 2009. **421**(3): p. 425-34.
74. Vescia, S., et al., *In vitro studies on selective inhibition of tumor cell growth by seminal ribonuclease*. *Cancer Res*, 1980. **40**(10): p. 3740-4.
75. Mastronicola, M.R., R. Piccoli, and G. D'Alessio, *Key extracellular and intracellular steps in the antitumor action of seminal ribonuclease*. *Eur J Biochem*, 1995. **230**(1): p. 242-9.
76. Bracale, A., et al., *Essential stations in the intracellular pathway of cytotoxic bovine seminal ribonuclease*. *Biochem J*, 2002. **362**(Pt 3): p. 553-60.
77. Haigis, M.C. and R.T. Raines, *Secretory ribonucleases are internalized by a dynamin-independent endocytic pathway*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 2): p. 313-24.
78. Gruenberg, J. and F.R. Maxfield, *Membrane transport in the endocytic pathway*. *Curr Opin Cell Biol*, 1995. **7**(4): p. 552-63.
79. Lee, F.S. and B.L. Vallee, *Structure and action of mammalian ribonuclease (angiogenin) inhibitor*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1993. **44**: p. 1-30.
80. Papageorgiou, A.C., R. Shapiro, and K.R. Acharya, *Molecular recognition of human angiogenin by placental ribonuclease inhibitor--an X-ray crystallographic study at 2.0 Å resolution*. *EMBO J*, 1997. **16**(17): p. 5162-77.
81. Lee, F.S., R. Shapiro, and B.L. Vallee, *Tight-binding inhibition of angiogenin and ribonuclease A by placental ribonuclease inhibitor*. *Biochemistry*, 1989. **28**(1): p. 225-30.
82. Rutkoski, T.J. and R.T. Raines, *Evasion of ribonuclease inhibitor as a determinant of ribonuclease cytotoxicity*. *Curr Pharm Biotechnol*, 2008. **9**(3): p. 185-9.

83. Roth, J.S. and H. Juster, *On the absence of ribonuclease inhibitor in rat liver nuclei*. *Biochim Biophys Acta*, 1972. **287**(3): p. 474-6.
84. Furia, A., et al., *The ribonuclease/angiogenin inhibitor is also present in mitochondria and nuclei*. *FEBS Lett*, 2011. **585**(4): p. 613-7.
85. Viola, M., et al., *Bovine seminal ribonuclease is cytotoxic for both malignant and normal telomerase-positive cells*. *Int J Oncol*, 2005. **27**(4): p. 1071-7.
86. Tsuji, T., et al., *Angiogenin is translocated to the nucleus of HeLa cells and is involved in ribosomal RNA transcription and cell proliferation*. *Cancer Res*, 2005. **65**(4): p. 1352-60.
87. Tubert, P., *Tesi Doctoral. Caracterització de Determinants Estructurals de Propietats Especials de la Ribonucleasa Pancreàtica Humana*, in *Laboratori d'Enginyeria de Proteïnes*. 2012, Universitat de Girona: Girona.
88. Makarov, A.A. and O.N. Iliinskaya, *Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets*. *FEBS Lett*, 2003. **540**(1-3): p. 15-20.
89. Matousek, J., et al., *Antitumor activity and other biological actions of oligomers of ribonuclease A*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(26): p. 23817-22.
90. Darzynkiewicz, Z., et al., *Cytostatic and cytotoxic effects of Pannon (P-30 Protein), a novel anticancer agent*. *Cell Tissue Kinet*, 1988. **21**(3): p. 169-82.
91. Notomista, E., et al., *Onconase: an unusually stable protein*. *Biochemistry*, 2000. **39**(30): p. 8711-8.
92. Leland, P.A., et al., *Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(18): p. 10407-12.
93. Mosimann, S.C., W. Ardel, and M.N. James, *Refined 1.7 Å X-ray crystallographic structure of P-30 protein, an amphibian ribonuclease with anti-tumor activity*. *J Mol Biol*, 1994. **236**(4): p. 1141-53.
94. Ardel, W., S.M. Mikulski, and K. Shogen, *Amino acid sequence of an anti-tumor protein from *Rana pipiens* oocytes and early embryos. Homology to pancreatic ribonucleases*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(1): p. 245-51.
95. Newton, D.L., et al., *Single amino acid substitutions at the N-terminus of a recombinant cytotoxic ribonuclease markedly influence biochemical and biological properties*. *Biochemistry*, 1998. **37**(15): p. 5173-83.
96. Lee, J.E. and R.T. Raines, *Contribution of active-site residues to the function of onconase, a ribonuclease with antitumoral activity*. *Biochemistry*, 2003. **42**(39): p. 11443-50.
97. Wlodawer, A., et al., *Structure of phosphate-free ribonuclease A refined at 1.26 Å*. *Biochemistry*, 1988. **27**(8): p. 2705-17.
98. Kover, K.E., et al., *The solution structure and dynamics of human pancreatic ribonuclease determined by NMR spectroscopy provide insight into its remarkable biological activities and inhibition*. *J Mol Biol*, 2008. **379**(5): p. 953-65.
99. Merlino, A., et al., *The importance of dynamic effects on the enzyme activity: X-ray structure and molecular dynamics of onconase mutants*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(18): p. 17953-60.
100. Holloway, D.E., et al., *Crystal structure of Onconase at 1.1 Å resolution--insights into substrate binding and collective motion*. *FEBS J*, 2011. **278**(21): p. 4136-49.
101. Arnold, U., et al., *Contribution of structural peculiarities of onconase to its high stability and folding kinetics*. *Biochemistry*, 2006. **45**(11): p. 3580-7.
102. Notomista, E., et al., *Contribution of chain termini to the conformational stability and biological activity of onconase*. *Biochemistry*, 2001. **40**(31): p. 9097-103.
103. Schulenburg, C., et al., *Impact of the C-terminal disulfide bond on the folding and stability of onconase*. *Chembiochem*, 2010. **11**(7): p. 978-86.
104. Torrent, G., et al., *Contribution of the C30/C75 disulfide bond to the biological properties of onconase*. *Biol Chem*, 2008. **389**(8): p. 1127-36.
105. Xu, G., et al., *Characterization of the fast-forming intermediate, des [30-75], in the reductive unfolding of onconase*. *Biochemistry*, 2004. **43**(11): p. 3246-54.
106. Liao, Y.D., et al., *The structural integrity exerted by N-terminal pyroglutamate is crucial for the cytotoxicity of frog ribonuclease from *Rana pipiens**. *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(18): p. 5247-55.
107. Leland, P.A., et al., *A synapomorphic disulfide bond is critical for the conformational stability and cytotoxicity*

- of an amphibian ribonuclease. FEBS Lett, 2000. **477**(3): p. 203-7.
108. Cummins, P.M. and B. O'Connor, *Pyroglutamyl peptidase: an overview of the three known enzymatic forms*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1429**(1): p. 1-17.
109. Kadonosono, T., et al., *Minimization of cavity size ensures protein stability and folding: structures of Phe46-replaced bovine pancreatic RNase A*. Biochemistry, 2003. **42**(36): p. 10651-8.
110. Beintema, J.J., Breukelman, H. J., Carsana, A., and Furia, A., *Evolution of vertebrate ribonucleases: ribonuclease A superfamily*, in *Ribonucleases: Structures and Functions*, G. D'Alessio, & Riordan, J. F., Editor. 1997, Academic Press: New York. p. 245-269.
111. Koditz, J., R. Ulbrich-Hofmann, and U. Arnold, *Probing the unfolding region of ribonuclease A by site-directed mutagenesis*. Eur J Biochem, 2004. **271**(20): p. 4147-56.
112. Gorbatyuk, V.Y., et al., *Effect of N-terminal and Met23 mutations on the structure and dynamics of onconase*. J Biol Chem, 2004. **279**(7): p. 5772-80.
113. Boix, E., et al., *Role of the N terminus in RNase A homologues: differences in catalytic activity, ribonuclease inhibitor interaction and cytotoxicity*. J Mol Biol, 1996. **257**(5): p. 992-1007.
114. Findlay, D., et al., *The active site and mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease*. Nature, 1961. **190**: p. 781-84.
115. Thompson, J.E. and R.T. Raines, *Value of general Acid-base catalysis to ribonuclease a*. J Am Chem Soc, 1994. **116**(12): p. 5467-8.
116. Park, C., L.W. Schultz, and R.T. Raines, *Contribution of the active site histidine residues of ribonuclease A to nucleic acid binding*. Biochemistry, 2001. **40**(16): p. 4949-56.
117. de Mel, V.S., et al., *The occupancy of two distinct conformations by active-site histidine-119 in crystals of ribonuclease is modulated by pH*. FEBS Lett, 1994. **349**(1): p. 155-60.
118. Zegers, I., et al., *The structures of RNase A complexed with 3'-CMP and d(CpA): active site conformation and conserved water molecules*. Protein Sci, 1994. **3**(12): p. 2322-39.
119. Berisio, R., et al., *Protein titration in the crystal state*. J Mol Biol, 1999. **292**(4): p. 845-54.
120. Messmore, J.M., D.N. Fuchs, and R.T. Raines, *Ribonuclease a: revealing structure-function relationships with semisynthesis*. J Am Chem Soc, 1995. **117**(31): p. 8057-60.
121. Bateman, R.C., Jr., *A spectrophotometric assay for glutaminy-peptide cyclizing enzymes*. J Neurosci Methods, 1989. **30**(1): p. 23-8.
122. Witzel, H. and E.A. Barnard, *Mechanism and binding sites in the ribonuclease reaction. II. Kinetic studies on the first step of the reaction*. Biochem Biophys Res Commun, 1962. **7**: p. 295-9.
123. Iordanov, M.S., et al., *Molecular determinants of apoptosis induced by the cytotoxic ribonuclease onconase: evidence for cytotoxic mechanisms different from inhibition of protein synthesis*. Cancer Res, 2000. **60**(7): p. 1983-94.
124. Saxena, S.K., et al., *Entry into cells and selective degradation of tRNAs by a cytotoxic member of the RNase A family*. J Biol Chem, 2002. **277**(17): p. 15142-6.
125. Suhasini, A.N. and R. Sirdeshmukh, *Transfer RNA cleavages by onconase reveal unusual cleavage sites*. J Biol Chem, 2006. **281**(18): p. 12201-9.
126. Ardelt, B., W. Ardelt, and Z. Darzynkiewicz, *Cytotoxic ribonucleases and RNA interference (RNAi)*. Cell Cycle, 2003. **2**(1): p. 22-4.
127. Mattick, J.S. and I.V. Makunin, *Non-coding RNA*. Hum Mol Genet, 2006. **15 Spec No 1**: p. R17-29.
128. Zhao, H., et al., *The cytotoxic ribonuclease onconase targets RNA interference (siRNA)*. Cell Cycle, 2008. **7**(20): p. 3258-61.
129. Volinia, S., et al., *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2257-61.
130. Tarasov, V., et al., *Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest*. Cell Cycle, 2007. **6**(13): p. 1586-93.
131. Altomare, D.A., et al., *Onconase responsive genes in human mesothelioma cells: implications for an RNA damaging therapeutic agent*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 34.

132. Suhasini, A.N. and R. Sirdeshmukh, *Onconase action on tRNA(Lys3), the primer for HIV-1 reverse transcription*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **363**(2): p. 304-9.
133. Cuchillo, C.M., et al., *The role of 2',3'-cyclic phosphodiesterases in the bovine pancreatic ribonuclease A catalysed cleavage of RNA: intermediates or products?* FEBS Lett, 1993. **333**(3): p. 207-10.
134. Matousek, J., et al., *Comprehensive comparison of the cytotoxic activities of onconase and bovine seminal ribonuclease*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2003. **136**(4): p. 343-56.
135. Mikulski, S.M., et al., *Striking increase of survival of mice bearing M109 Madison carcinoma treated with a novel protein from amphibian embryos*. J Natl Cancer Inst, 1990. **82**(2): p. 151-3.
136. Lee, I., et al., *Antitumor efficacy of the cytotoxic RNase, ranpirnase, on A549 human lung cancer xenografts of nude mice*. Anticancer Res, 2007. **27**(1A): p. 299-307.
137. Lee, J.E. and R.T. Raines, *Ribonucleases as novel chemotherapeutics : the ranpirnase example*. BioDrugs, 2008. **22**(1): p. 53-8.
138. Mikulski, S., A. Viera, and K. Shogen, *In vitro synergism between a novel amphibian oocytic ribonuclease (onconase(r)) and tamoxifen, lovastatin and Cisplatin, in human ovcar-3 ovarian carcinoma cell-line*. Int J Oncol, 1992. **1**(7): p. 779-85.
139. Deptala, A., et al., *Potentiation of tumor necrosis factor induced apoptosis by onconase*. Int J Oncol, 1998. **13**(1): p. 11-6.
140. Ardelt, W., B. Ardelt, and Z. Darzynkiewicz, *Ribonucleases as potential modalities in anticancer therapy*. Eur J Pharmacol, 2009. **625**(1-3): p. 181-9.
141. Fisher, B.M., J.H. Ha, and R.T. Raines, *Coulombic forces in protein-RNA interactions: binding and cleavage by ribonuclease A and variants at Lys7, Arg10, and Lys66*. Biochemistry, 1998. **37**(35): p. 12121-32.
142. Rodriguez, M., et al., *Intracellular pathway of Onconase that enables its delivery to the cytosol*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 8): p. 1405-11.
143. Futami, J., et al., *Preparation of potent cytotoxic ribonucleases by cationization: enhanced cellular uptake and decreased interaction with ribonuclease inhibitor by chemical modification of carboxyl groups*. Biochemistry, 2001. **40**(25): p. 7518-24.
144. Futami, J. and H. Yamada, *Design of cytotoxic ribonucleases by cationization to enhance intracellular protein delivery*. Curr Pharm Biotechnol, 2008. **9**(3): p. 180-4.
145. Nitta, K., et al., *Inhibition of cell proliferation by Rana catesbeiana and Rana japonica lectins belonging to the ribonuclease superfamily*. Cancer Res, 1994. **54**(4): p. 920-7.
146. Johnson, R.J., et al., *Cytotoxic ribonucleases: the dichotomy of Coulombic forces*. Biochemistry, 2007. **46**(36): p. 10308-16.
147. Turcotte, R.F. and R.T. Raines, *Interaction of onconase with the human ribonuclease inhibitor protein*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **377**(2): p. 512-4.
148. Sundlass, N.K., et al., *Contribution of electrostatics to the binding of pancreatic-type ribonucleases to membranes*. Biochemistry, 2013. **52**(37): p. 6304-12.
149. Abercrombie, M. and E.J. Ambrose, *The surface properties of cancer cells: a review*. Cancer Res, 1962. **22**: p. 525-48.
150. Marquez, M., et al., *Charge-dependent targeting: results in six tumor cell lines*. Anticancer Res, 2004. **24**(3a): p. 1347-51.
151. Kojima, K., *Molecular aspects of the plasma membrane in tumor cells*. Nagoya J Med Sci, 1993. **56**(1-4): p. 1-18.
152. Wu, Y., et al., *A study of the intracellular routing of cytotoxic ribonucleases*. J Biol Chem, 1995. **270**(29): p. 17476-81.
153. Saxena, S.K., et al., *Comparison of RNases and toxins upon injection into Xenopus oocytes*. J Biol Chem, 1991. **266**(31): p. 21208-14.
154. Turcotte, R.F., L.D. Lavis, and R.T. Raines, *Onconase cytotoxicity relies on the distribution of its positive charge*. FEBS J, 2009. **276**(14): p. 3846-57.
155. Rybak, S.M., et al., *Cytotoxic potential of ribonuclease and ribonuclease hybrid proteins*. J Biol Chem, 1991. **266**(31): p. 21202-7.
156. Leich, F., et al., *Endocytotic internalization as a crucial factor for the cytotoxicity of ribonucleases*. J Biol Chem, 2007. **282**(38): p. 27640-6.
157. Klink, T.A. and R.T. Raines, *Conformational stability is a determinant of ribonuclease A cytotoxicity*. J Biol Chem, 2000. **275**(23): p. 17463-7.
158. Kobe, B. and J. Deisenhofer, *Mechanism of ribonuclease inhibition by ribonuclease*

- inhibitor protein based on the crystal structure of its complex with ribonuclease A.* J Mol Biol, 1996. **264**(5): p. 1028-43.
159. Grabarek, J., et al., *Activation of caspases and serine proteases during apoptosis induced by onconase (Ranpirnase).* Exp Cell Res, 2002. **278**(1): p. 61-71.
160. Tsai, S.Y., et al., *Treatment of Jurkat acute T-lymphocytic leukemia cells by onconase (Ranpirnase) is accompanied by an altered nucleocytoplasmic distribution and reduced expression of transcription factor NF-kappaB.* Int J Oncol, 2004. **25**(6): p. 1745-52.
161. Mikulski, S., et al., *Relationship between response rate and median survival in patients with advanced nonsmall cell lung-cancer - comparison of onconase(r) with other anticancer agents.* Int J Oncol, 1995. **6**(4): p. 889-97.
162. Smolewski, P., et al., *Cytotoxic activity of the amphibian ribonucleases onconase and r-amphinase on tumor cells from B cell lymphoproliferative disorders.* Int J Oncol, 2014. **45**(1): p. 419-25.
163. Mikulski, S.M., et al., *Phase II trial of a single weekly intravenous dose of ranpirnase in patients with unresectable malignant mesothelioma.* J Clin Oncol, 2002. **20**(1): p. 274-81.
164. Costanzi, J., et al., *Ribonucleases as a novel pro-apoptotic anticancer strategy: review of the preclinical and clinical data for ranpirnase.* Cancer Invest, 2005. **23**(7): p. 643-50.
165. Dhalluin, X. and A. Scherpereel, *Chemotherapy and radiotherapy for mesothelioma.* Recent Results Cancer Res, 2011. **189**: p. 127-47.
166. Vasandani, V.M., J.A. Burris, and C. Sung, *Reversible nephrotoxicity of onconase and effect of lysine pH on renal onconase uptake.* Cancer Chemother Pharmacol, 1999. **44**(2): p. 164-9.
167. Saxena, S.K., et al., *Inhibition of HIV-1 production and selective degradation of viral RNA by an amphibian ribonuclease.* J Biol Chem, 1996. **271**(34): p. 20783-8.
168. Bedoya, V.I., et al., *Ribonucleases in HIV type 1 inhibition: effect of recombinant RNases on infection of primary T cells and immune activation-induced RNase gene and protein expression.* AIDS Res Hum Retroviruses, 2006. **22**(9): p. 897-907.
169. Youle, R.J., et al., *RNase inhibition of human immunodeficiency virus infection of H9 cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(13): p. 6012-6.
170. Rybak, S.M. and D.L. Newton, *Natural and engineered cytotoxic ribonucleases: therapeutic potential.* Exp Cell Res, 1999. **253**(2): p. 325-35.
171. Zhou, H.M. and D.J. Strydom, *The amino acid sequence of human ribonuclease 4, a highly conserved ribonuclease that cleaves specifically on the 3' side of uridine.* Eur J Biochem, 1993. **217**(1): p. 401-10.
172. Pous, J., et al., *Three-dimensional structure of a human pancreatic ribonuclease variant, a step forward in the design of cytotoxic ribonucleases.* J Mol Biol, 2000. **303**(1): p. 49-60.
173. Canals, A., et al., *Production of engineered human pancreatic ribonucleases, solving expression and purification problems, and enhancing thermostability.* Protein Expr Purif, 1999. **17**(1): p. 169-81.
174. Johnson, R.J., et al., *Inhibition of human pancreatic ribonuclease by the human ribonuclease inhibitor protein.* J Mol Biol, 2007. **368**(2): p. 434-49.
175. Gilliland, G.L., *Biological Macromolecule Crystallization Database.* Methods Enzymol, 1997. **277**: p. 546-56.
176. Santoro, J., et al., *High-resolution three-dimensional structure of ribonuclease A in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy.* J Mol Biol, 1993. **229**(3): p. 722-34.
177. el-Joubary, A., et al., *¹H and ¹⁵N sequential assignment and solution secondary structure of ¹⁵N labelled human pancreatic ribonuclease.* J Biomol NMR, 1999. **15**(3): p. 265-6.
178. Pous, J., et al., *Three-dimensional structure of human RNase 1 delta N7 at 1.9 Å resolution.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2001. **57**(Pt 4): p. 498-505.
179. Beintema, J.J., et al., *The amino acid sequence of human pancreatic ribonuclease.* Anal Biochem, 1984. **136**(1): p. 48-64.
180. Brandts, J.F., H.R. Halvorson, and M. Brennan, *Consideration of the Possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues.* Biochemistry, 1975. **14**(22): p. 4953-63.
181. Cuchillo, C.M.V., M. & Nogués, M. V., *Pancreatic ribonucleases, in Ribonucleases: Structures and Functions,* D.A.G.R. JF, Editor. 1997, Academic Press: New York, NY. p. 271-304.

182. Osvath, S. and M. Gruebele, *Proline can have opposite effects on fast and slow protein folding phases*. Biophys J, 2003. **85**(2): p. 1215-22.
183. Pradeep, L., H.C. Shin, and H.A. Scheraga, *Correlation of folding kinetics with the number and isomerization states of prolines in three homologous proteins of the RNase family*. FEBS Lett, 2006. **580**(21): p. 5029-32.
184. Mazzarella, L., et al., *Bovine seminal ribonuclease: structure at 1.9 Å resolution*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1993. **49**(Pt 4): p. 389-402.
185. Wedemeyer, W.J., E. Welker, and H.A. Scheraga, *Proline cis-trans isomerization and protein folding*. Biochemistry, 2002. **41**(50): p. 14637-44.
186. Kobe, B. and J. Deisenhofer, *Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats*. Nature, 1993. **366**(6457): p. 751-6.
187. Rutkoski, T.J., et al., *Disruption of shape-complementarity markers to create cytotoxic variants of ribonuclease A*. J Mol Biol, 2005. **354**(1): p. 41-54.
188. Gaur, D., S. Swaminathan, and J.K. Batra, *Interaction of human pancreatic ribonuclease with human ribonuclease inhibitor. Generation of inhibitor-resistant cytotoxic variants*. J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 24978-84.
189. Dolinsky, T.J., et al., *PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W665-7.
190. Kobe, B. and J. Deisenhofer, *A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands*. Nature, 1995. **374**(6518): p. 183-6.
191. Weickmann, J.L., M. Elson, and D.G. Glitz, *Purification and characterization of human pancreatic ribonuclease*. Biochemistry, 1981. **20**(5): p. 1272-8.
192. Barnard, E.A., *Biological function of pancreatic ribonuclease*. Nature, 1969. **221**(5178): p. 340-4.
193. Landre, J.B., et al., *Human endothelial cells selectively express large amounts of pancreatic-type ribonuclease (RNase 1)*. J Cell Biochem, 2002. **86**(3): p. 540-52.
194. Yang, D., et al., *Human ribonuclease A superfamily members, eosinophil-derived neurotoxin and pancreatic ribonuclease, induce dendritic cell maturation and activation*. J Immunol, 2004. **173**(10): p. 6134-42.
195. Sorrentino, S., et al., *Degradation of double-stranded RNA by human pancreatic ribonuclease: crucial role of noncatalytic basic amino acid residues*. Biochemistry, 2003. **42**(34): p. 10182-90.
196. Lee-Huang, S., et al., *Lysozyme and RNases as anti-HIV components in beta-core preparations of human chorionic gonadotropin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 2678-81.
197. Potenza, N., et al., *Hybridase activity of human ribonuclease-1 revealed by a real-time fluorometric assay*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(10): p. 2906-13.
198. Libonati, M. and S. Sorrentino, *Degradation of double-stranded RNA by mammalian pancreatic-type ribonucleases*. Methods Enzymol, 2001. **341**: p. 234-48.
199. Libonati, M. and J.J. Beintema, *Basic charges on ribonuclease molecules and activity towards double-stranded polyribonucleotides*. Biochem Soc Trans, 1977. **5**(2): p. 470-4.
200. Gaur, D., D. Seth, and J.K. Batra, *Glycine 38 is crucial for the ribonucleolytic activity of human pancreatic ribonuclease on double-stranded RNA*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **297**(2): p. 390-5.
201. Suzuki, M., et al., *Engineering receptor-mediated cytotoxicity into human ribonucleases by steric blockade of inhibitor interaction*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(3): p. 265-70.
202. Vasandani, V.M., et al., *Molecular determinants in the plasma clearance and tissue distribution of ribonucleases of the ribonuclease A superfamily*. Cancer Res, 1996. **56**(18): p. 4180-6.
203. Bosch, M., et al., *A nuclear localization sequence endows human pancreatic ribonuclease with cytotoxic activity*. Biochemistry, 2004. **43**(8): p. 2167-77.
204. Dickson, K.A., C.L. Dahlberg, and R.T. Raines, *Compensating effects on the cytotoxicity of ribonuclease A variants*. Arch Biochem Biophys, 2003. **415**(2): p. 172-7.
205. Piccoli, R., et al., *A dimeric mutant of human pancreatic ribonuclease with selective cytotoxicity toward malignant cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 7768-73.
206. Strong, L.E.K., J.A.; Pensinger, D.; Mei, B.; Shahan, M.; Raines, R.T., *Efficacy of*

- ribonuclease QBI-139 in combination with standard of care therapies.* Cancer Res., 2012. **72**(8).
207. Futami, J., et al., *Optimum modification for the highest cytotoxicity of cationized ribonuclease.* J Biochem, 2002. **132**(2): p. 223-8.
208. Tada, H., et al., *Insertional-fusion of basic fibroblast growth factor endowed ribonuclease 1 with enhanced cytotoxicity by steric blockade of inhibitor interaction.* FEBS Lett, 2004. **568**(1-3): p. 39-43.
209. Castro, J., et al., *Mini-review: nucleus-targeted ribonucleases as antitumor drugs.* Curr Med Chem, 2013. **20**(10): p. 1225-31.
210. Vert, A., et al., *Generation of new cytotoxic human ribonuclease variants directed to the nucleus.* Mol Pharm, 2012. **9**(10): p. 2894-902.
211. Rodriguez, M., et al., *A cytotoxic ribonuclease variant with a discontinuous nuclear localization signal constituted by basic residues scattered over three areas of the molecule.* J Mol Biol, 2006. **360**(3): p. 548-57.
212. Tubert, P., et al., *The nuclear transport capacity of a human-pancreatic ribonuclease variant is critical for its cytotoxicity.* Invest New Drugs, 2011. **29**(5): p. 811-7.
213. Castro, J., et al., *A human ribonuclease induces apoptosis associated with p21WAF1/CIP1 induction and JNK inactivation.* BMC Cancer, 2011. **11**: p. 9.
214. Kim, J.S. and R.T. Raines, *Bovine seminal ribonuclease produced from a synthetic gene.* J Biol Chem, 1993. **268**(23): p. 17392-6.
215. Ribo, M., et al., *Purification of engineered human pancreatic ribonuclease.* Methods Enzymol, 2001. **341**: p. 221-34.
216. Benito, A., et al., *Stabilization of human pancreatic ribonuclease through mutation at its N-terminal edge.* Protein Eng, 2002. **15**(11): p. 887-93.
217. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).* Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
218. Haynes, B.F., G. Pantaleo, and A.S. Fauci, *Toward an understanding of the correlates of protective immunity to HIV infection.* Science, 1996. **271**(5247): p. 324-8.
219. Sharp, P.M. and B.H. Hahn, *Origins of HIV and the AIDS pandemic.* Cold Spring Harb Perspect Med, 2011. **1**(1): p. a006841.
220. Hemelaar, J., et al., *Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007.* AIDS, 2011. **25**(5): p. 679-89.
221. Muesing, M.A., et al., *Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus.* Nature, 1985. **313**(6002): p. 450-8.
222. Ratner, L., et al., *Complete nucleotide sequences of functional clones of the AIDS virus.* AIDS Res Hum Retroviruses, 1987. **3**(1): p. 57-69.
223. Tomasselli, A.G. and R.L. Henrikson, *Specificity of retroviral proteases: an analysis of viral and nonviral protein substrates.* Methods Enzymol, 1994. **241**: p. 279-301.
224. Henderson, L.E., et al., *Gag proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processings, and complete amino acid sequences.* J Virol, 1992. **66**(4): p. 1856-65.
225. Muller, B., T. Patschinsky, and H.G. Krausslich, *The late-domain-containing protein p6 is the predominant phosphoprotein of human immunodeficiency virus type 1 particles.* J Virol, 2002. **76**(3): p. 1015-24.
226. Pettit, S.C., et al., *The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions.* J Virol, 1994. **68**(12): p. 8017-27.
227. Jacks, T., et al., *Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression.* Nature, 1988. **331**(6153): p. 280-3.
228. Ikuta, K., et al., *Positive and negative aspects of the human immunodeficiency virus protease: development of inhibitors versus its role in AIDS pathogenesis.* Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(4): p. 725-45.
229. Krausslich, H.G. and E. Wimmer, *Viral proteinases.* Annu Rev Biochem, 1988. **57**: p. 701-54.
230. Freed, E.O., *HIV-1 replication.* Somat Cell Mol Genet, 2001. **26**(1-6): p. 13-33.
231. Bour, S. and K. Strebel, *The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release.* Microbes Infect, 2003. **5**(11): p. 1029-39.

232. Fischer, W.B. and H.J. Hsu, *Viral channel forming proteins - modeling the target*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1808**(2): p. 561-71.
233. Li, L.H., H.J. Hsu, and W.B. Fischer, *Qualitative computational bioanalytics: assembly of viral channel-forming peptides around mono and divalent ions*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **442**(1-2): p. 85-91.
234. Cobos-Jimenez, V., et al., *Macrophages and HIV-1*. Curr Opin HIV AIDS, 2011. **6**(5): p. 385-90.
235. Teixeira, C., et al., *Viral surface glycoproteins, gp120 and gp41, as potential drug targets against HIV-1: brief overview one quarter of a century past the approval of zidovudine, the first anti-retroviral drug*. Eur J Med Chem, 2011. **46**(4): p. 979-92.
236. Tisne, C., *Structural bases of the annealing of primer tRNA(3Lys) to the HIV-1 viral RNA*. Curr HIV Res, 2005. **3**(2): p. 147-56.
237. Gallo, R.C., *HIV--the cause of AIDS: an overview on its biology, mechanisms of disease induction, and our attempts to control it*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1988. **1**(6): p. 521-35.
238. Maartens, G., C. Celum, and S.R. Lewin, *HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention*. Lancet, 2014. **384**(9939): p. 258-71.
239. Deneka, M., et al., *In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53*. J Cell Biol, 2007. **177**(2): p. 329-41.
240. Welsch, S., et al., *HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages*. PLoS Pathog, 2007. **3**(3): p. e36.
241. Walker B.D., O.B.O., *HIV cycle and drug targets*, A.E.o.a.E. Poster from the 2007 Holiday Lectures on Science, Editor. 2007.
242. Jolly, C., et al., *HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse*. J Exp Med, 2004. **199**(2): p. 283-93.
243. Groot, F., S. Welsch, and Q.J. Sattentau, *Efficient HIV-1 transmission from macrophages to T cells across transient virological synapses*. Blood, 2008. **111**(9): p. 4660-3.
244. Stacey, A.R., et al., *Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections*. J Virol, 2009. **83**(8): p. 3719-33.
245. Cohen, M.S., et al., *Acute HIV-1 Infection*. N Engl J Med, 2011. **364**(20): p. 1943-54.
246. Trautmann, L., et al., *Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction*. Nat Med, 2006. **12**(10): p. 1198-202.
247. Richman, D.D., et al., *Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 4144-9.
248. Heaton, R.K., et al., *HIV-associated neurocognitive disorders persist in the era of potent antiretroviral therapy: CHARTER Study*. Neurology, 2010. **75**(23): p. 2087-96.
249. Maldarelli, F., et al., *HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells*. Science, 2014. **345**(6193): p. 179-83.
250. Van Lint, C., S. Bouchat, and A. Marcello, *HIV-1 transcription and latency: an update*. Retrovirology, 2013. **10**: p. 67.
251. Archin, N.M., et al., *Immediate antiviral therapy appears to restrict resting CD4+ cell HIV-1 infection without accelerating the decay of latent infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(24): p. 9523-8.
252. Ananworanich, J., K. Dube, and N. Chomont, *How does the timing of antiretroviral therapy initiation in acute infection affect HIV reservoirs?* Curr Opin HIV AIDS, 2015. **10**(1): p. 18-28.
253. Anderson, J.L., et al., *Progress Towards an HIV Cure: Update from the 2014 International AIDS Society Symposium*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2015. **31**(1): p. 36-44.
254. Svicher, V., et al., *Understanding HIV compartments and reservoirs*. Curr HIV/AIDS Rep, 2014. **11**(2): p. 186-94.
255. Cieri, N., et al., *IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors*. Blood, 2013. **121**(4): p. 573-84.
256. Finzi, D., et al., *Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy*. Nat Med, 1999. **5**(5): p. 512-7.
257. Brown, D. and J.J. Mattapallil, *Gastrointestinal tract and the mucosal macrophage reservoir in HIV infection*. Clin Vaccine Immunol, 2014. **21**(11): p. 1469-73.

258. Chun, T.W., et al., *Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy*. J Infect Dis, 2008. **197**(5): p. 714-20.
259. Blackard, J.T., et al., *HIV variability in the liver and evidence of possible compartmentalization*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2011. **27**(10): p. 1117-26.
260. Costiniuk, C.T. and M.A. Jenabian, *The lungs as anatomical reservoirs of HIV infection*. Rev Med Virol, 2014. **24**(1): p. 35-54.
261. Cusini, A., et al., *Higher CNS penetration-effectiveness of long-term combination antiretroviral therapy is associated with better HIV-1 viral suppression in cerebrospinal fluid*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2013. **62**(1): p. 28-35.
262. Eisele, E. and R.F. Siliciano, *Redefining the viral reservoirs that prevent HIV-1 eradication*. Immunity, 2012. **37**(3): p. 377-88.
263. Gray, L.R., et al., *Reduced basal transcriptional activity of central nervous system-derived HIV type 1 long terminal repeats*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2013. **29**(2): p. 365-70.
264. Gonzalez-Scarano, F. and J. Martin-Garcia, *The neuropathogenesis of AIDS*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(1): p. 69-81.
265. Churchill, M.J., et al., *HIV-1 transcriptional regulation in the central nervous system and implications for HIV cure research*. J Neurovirol, 2014.
266. Letendre, S.L., et al., *Neurologic complications of HIV disease and their treatment*. Top HIV Med, 2010. **18**(2): p. 45-55.
267. Pulicherla, K.K. and M.K. Verma, *Targeting Therapeutics Across the Blood Brain Barrier (BBB), Prerequisite Towards Thrombolytic Therapy for Cerebrovascular Disorders-an Overview and Advancements*. AAPS PharmSciTech, 2015.
268. Martel, S., *Learning from our failures in blood-brain permeability: what can be done for new drug discovery?* Expert Opin Drug Discov, 2015: p. 1-5.
269. Kohl, N.E., et al., *Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(13): p. 4686-90.
270. Debouck, C., *The HIV-1 protease as a therapeutic target for AIDS*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1992. **8**(2): p. 153-64.
271. Crawford, S. and S.P. Goff, *A deletion mutation in the 5' part of the pol gene of Moloney murine leukemia virus blocks proteolytic processing of the gag and pol polyproteins*. J Virol, 1985. **53**(3): p. 899-907.
272. Pearl, L.H. and W.R. Taylor, *A structural model for the retroviral proteases*. Nature, 1987. **329**(6137): p. 351-4.
273. Szeltner, Z. and L. Polgar, *Conformational stability and catalytic activity of HIV-1 protease are both enhanced at high salt concentration*. J Biol Chem, 1996. **271**(10): p. 5458-63.
274. Wlodawer, A., et al., *Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease*. Science, 1989. **245**(4918): p. 616-21.
275. Miller, M., et al., *Structure of complex of synthetic HIV-1 protease with a substrate-based inhibitor at 2.3 Å resolution*. Science, 1989. **246**(4934): p. 1149-52.
276. Weber, I.T., et al., *Molecular modeling of the HIV-1 protease and its substrate binding site*. Science, 1989. **243**(4893): p. 928-31.
277. Moore, M.L., et al., *Peptide substrates and inhibitors of the HIV-1 protease*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **159**(2): p. 420-5.
278. Kay, J. and B.M. Dunn, *Viral proteinases: weakness in strength*. Biochim Biophys Acta, 1990. **1048**(1): p. 1-18.
279. Leis, J., et al., *Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses*. J Virol, 1988. **62**(5): p. 1808-9.
280. Beck, Z.Q., et al., *Identification of efficiently cleaved substrates for HIV-1 protease using a phage display library and use in inhibitor development*. Virology, 2000. **274**(2): p. 391-401.
281. Silva, A.M., et al., *Inhibition and catalytic mechanism of HIV-1 aspartic protease*. J Mol Biol, 1996. **255**(2): p. 321-46.
282. Pettit, S.C., et al., *Analysis of retroviral protease cleavage sites reveals two types of cleavage sites and the structural requirements of the P1 amino acid*. J Biol Chem, 1991. **266**(22): p. 14539-47.
283. Griffiths, J.T., et al., *Different requirements for productive interaction between the active site of HIV-1 proteinase and substrates containing hydrophobic*hydrophobic- or aromatic*pro- cleavage sites*. Biochemistry, 1992. **31**(22): p. 5193-200.
284. Tozser, J., et al., *Kinetic and modeling studies of S3-S3' subsites of HIV*

- proteinases. *Biochemistry*, 1992. **31**(20): p. 4793-800.
285. Pettit, S.C., et al., *Processing sites in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag-Pro-Pol precursor are cleaved by the viral protease at different rates*. *Retrovirology*, 2005. **2**: p. 66.
286. Debouck, C., et al., *Human immunodeficiency virus protease expressed in Escherichia coli exhibits autoprocessing and specific maturation of the gag precursor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(24): p. 8903-6.
287. Darke, P.L., et al., *HIV-1 protease specificity of peptide cleavage is sufficient for processing of gag and pol polyproteins*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988. **156**(1): p. 297-303.
288. de Oliveira, T., et al., *Variability at human immunodeficiency virus type 1 subtype C protease cleavage sites: an indication of viral fitness?* *J Virol*, 2003. **77**(17): p. 9422-30.
289. Fun, A., et al., *Human Immunodeficiency Virus Gag and protease: partners in resistance*. *Retrovirology*, 2012. **9**: p. 63.
290. Shehu-Xhilaga, M., et al., *Proteolytic processing of the p2/nucleocapsid cleavage site is critical for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimer maturation*. *J Virol*, 2001. **75**(19): p. 9156-64.
291. Tessmer, U. and H.G. Krausslich, *Cleavage of human immunodeficiency virus type 1 proteinase from the N-terminally adjacent p6* protein is essential for efficient Gag polyprotein processing and viral infectivity*. *J Virol*, 1998. **72**(4): p. 3459-63.
292. Pettit, S.C., et al., *The dimer interfaces of protease and extra-protease domains influence the activation of protease and the specificity of GagPol cleavage*. *J Virol*, 2003. **77**(1): p. 366-74.
293. Billich, A. and G. Winkler, *Analysis of subsite preferences of HIV-1 proteinase using MA/CA junction peptides substituted at the P3-P1' positions*. *Arch Biochem Biophys*, 1991. **290**(1): p. 186-90.
294. Tomasselli, A.G., et al., *Substrate analogue inhibition and active site titration of purified recombinant HIV-1 protease*. *Biochemistry*, 1990. **29**(1): p. 264-9.
295. Rose, J.R., R. Salto, and C.S. Craik, *Regulation of autoproteolysis of the HIV-1 and HIV-2 proteases with engineered amino acid substitutions*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(16): p. 11939-45.
296. Strickler, J.E., et al., *Characterization and autoprocessing of precursor and mature forms of human immunodeficiency virus type 1 (HIV 1) protease purified from Escherichia coli*. *Proteins*, 1989. **6**(2): p. 139-54.
297. Vocero-Akbani, A.M., et al., *Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein*. *Nat Med*, 1999. **5**(1): p. 29-33.
298. Falnes, P.O., et al., *Toxins that are activated by HIV type-1 protease through removal of a signal for degradation by the N-end-rule pathway*. *Biochem J*, 1999. **343 Pt 1**: p. 199-207.
299. Hymes, K.B., et al., *Kaposi's sarcoma in homosexual men-a report of eight cases*. *Lancet*, 1981. **2**(8247): p. 598-600.
300. Kellerman, S., et al., *Changes in HIV and AIDS in the United States: Entering the Third Decade*. *Curr Infect Dis Rep*, 2005. **7**(2): p. 138-143.
301. Fetti, J., et al., *Global Epidemiology of HIV*. *Infect Dis Clin North Am*, 2014. **28**(3): p. 323-337.
302. Carr, A., *Toxicity of antiretroviral therapy and implications for drug development*. *Nat Rev Drug Discov*, 2003. **2**(8): p. 624-34.
303. Jiang, Y., X. Liu, and E. De Clercq, *New therapeutic approaches targeted at the late stages of the HIV-1 replication cycle*. *Curr Med Chem*, 2011. **18**(1): p. 16-28.
304. Nieva, J.L., V. Madan, and L. Carrasco, *Viroporins: structure and biological functions*. *Nat Rev Microbiol*, 2012. **10**(8): p. 563-74.
305. Barbaro, G., et al., *Highly active antiretroviral therapy: current state of the art, new agents and their pharmacological interactions useful for improving therapeutic outcome*. *Curr Pharm Des*, 2005. **11**(14): p. 1805-43.
306. Gardner, E.M., et al., *Antiretroviral medication adherence and the development of class-specific antiretroviral resistance*. *AIDS*, 2009. **23**(9): p. 1035-46.
307. Agrawal, L., et al., *Anti-HIV therapy: Current and future directions*. *Curr Pharm Des*, 2006. **12**(16): p. 2031-55.
308. Hutter, G., et al., *Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(7): p. 692-8.
309. Yukl, S.A., et al., *Challenges in detecting HIV persistence during potentially curative*

- interventions: a study of the Berlin patient.* PLoS Pathog, 2013. **9**(5): p. e1003347.
310. Persaud, D., et al., *Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant.* N Engl J Med, 2013. **369**(19): p. 1828-35.
311. Henrich, T.J., et al., *Antiretroviral-free HIV-1 remission and viral rebound after allogeneic stem cell transplantation: report of 2 cases.* Ann Intern Med, 2014. **161**(5): p. 319-27.
312. Henrich, T.J., et al., *Long-term reduction in peripheral blood HIV type 1 reservoirs following reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation.* J Infect Dis, 2013. **207**(11): p. 1694-702.
313. Deeks, S.G., *HIV: Shock and kill.* Nature, 2012. **487**(7408): p. 439-40.
314. Chun, T.W., et al., *Induction of HIV-1 replication in latently infected CD4+ T cells using a combination of cytokines.* J Exp Med, 1998. **188**(1): p. 83-91.
315. Prins, J.M., et al., *Immuno-activation with anti-CD3 and recombinant human IL-2 in HIV-1-infected patients on potent antiretroviral therapy.* AIDS, 1999. **13**(17): p. 2405-10.
316. Levy, Y., et al., *Enhanced T cell recovery in HIV-1-infected adults through IL-7 treatment.* J Clin Invest, 2009. **119**(4): p. 997-1007.
317. Sereti, I., et al., *IL-7 administration drives T cell-cycle entry and expansion in HIV-1 infection.* Blood, 2009. **113**(25): p. 6304-14.
318. Wightman, F., et al., *HDAC inhibitors in HIV.* Immunol Cell Biol, 2012. **90**(1): p. 47-54.
319. Spina, C.A., et al., *An in-depth comparison of latent HIV-1 reactivation in multiple cell model systems and resting CD4+ T cells from aviremic patients.* PLoS Pathog, 2013. **9**(12): p. e1003834.
320. Mbonye, U. and J. Karn, *Transcriptional control of HIV latency: cellular signaling pathways, epigenetics, happenstance and the hope for a cure.* Virology, 2014. **454-455**: p. 328-39.
321. Rasmussen T.A., T.M., Brinkmann C.R., Olesen R., Erikstrup C., Solomon A., Winckelmann A., Palmer S., Dinarello, C. Buzon, M. Lichterfeld M., Lewin S.R., Østergaard L., Søggaard O.S., *Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, for latent-virus reactivation in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy: a phase 1/2, single group, clinical trial, in The Lancet HIV.* October 2014. p. Pages e13-e21.
322. Archin, N.M., et al., *Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy.* Nature, 2012. **487**(7408): p. 482-5.
323. Wei, D.G., et al., *Histone deacetylase inhibitor romidepsin induces HIV expression in CD4 T cells from patients on suppressive antiretroviral therapy at concentrations achieved by clinical dosing.* PLoS Pathog, 2014. **10**(4): p. e1004071.
324. Trushin, S.A., et al., *Human immunodeficiency virus reactivation by phorbol esters or T-cell receptor ligation requires both PKCalpha and PKCtheta.* J Virol, 2005. **79**(15): p. 9821-30.
325. Beans, E.J., et al., *Highly potent, synthetically accessible prostratin analogs induce latent HIV expression in vitro and ex vivo.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(29): p. 11698-703.
326. Barr, P.M., et al., *Phase II study of bryostatatin 1 and vincristine for aggressive non-Hodgkin lymphoma relapsing after an autologous stem cell transplant.* Am J Hematol, 2009. **84**(8): p. 484-7.
327. Zolla-Pazner, S., *A critical question for HIV vaccine development: which antibodies to induce?* Science, 2014. **345**(6193): p. 167-8.
328. Jardine, J., et al., *Rational HIV immunogen design to target specific germline B cell receptors.* Science, 2013. **340**(6133): p. 711-6.
329. Wu, X., et al., *Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1.* Science, 2010. **329**(5993): p. 856-61.
330. Zhou, T., et al., *Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01.* Science, 2010. **329**(5993): p. 811-7.
331. Petrovas C, F.-M.S., Pegu A, et al.: *A population of CD8 T cells is located in the germinal centers that is functionally capable of mediating bi-specific antibody mediated killing of HIV-infected T-cells.* 2014 IAS Towards an HIV cure symposium. Melbourne, Australia, 2014). *A population of CD8 T cells is located in the germinal centers that is functionally capable of mediating bi-specific antibody mediated killing of HIV-infected T-cells.* in IAS Towards an HIV cure symposium. 2014. Melbourne, Australia.

332. Li, L., et al., *Genomic editing of the HIV-1 coreceptor CCR5 in adult hematopoietic stem and progenitor cells using zinc finger nucleases*. *Mol Ther*, 2013. **21**(6): p. 1259-69.
333. Tebas, P., et al., *Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV*. *N Engl J Med*, 2014. **370**(10): p. 901-10.
334. Ott, M. *Epigenetic regulation of HIV latency*. in *IAS Towards an HIV cure symposium*. 2014. Melbourne, Australia.
335. Alchin, D.R., *HIV vaccine development: an exploratory review of the trials and tribulations*. *Immunol Res*, 2014. **60**(1): p. 35-7.
336. Casazza, J.P., et al., *Therapeutic vaccination expands and improves the function of the HIV-specific memory T-cell repertoire*. *J Infect Dis*, 2013. **207**(12): p. 1829-40.
337. Rerks-Ngarm, S., et al., *Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand*. *N Engl J Med*, 2009. **361**(23): p. 2209-20.
338. Garcia, F., et al., *A dendritic cell-based vaccine elicits T cell responses associated with control of HIV-1 replication*. *Sci Transl Med*, 2013. **5**(166): p. 166ra2.
339. Norton, T.D., et al., *Vpx-containing dendritic cell vaccine induces CTLs and reactivates latent HIV-1 in vitro*. *Gene Ther*, 2015.
340. Thornhill, J., S. Fidler, and J. Frater, *Advancing the HIV cure agenda: the next 5 years*. *Curr Opin Infect Dis*, 2015. **28**(1): p. 1-9.
341. Iglesias-Ussel, M., et al., *High levels of CD2 expression identify HIV-1 latently infected resting memory CD4+ T cells in virally suppressed subjects*. *J Virol*, 2013. **87**(16): p. 9148-58.
342. Zhou, A., B.A. Hassel, and R.H. Silverman, *Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action*. *Cell*, 1993. **72**(5): p. 753-65.
343. Fernandez-Puentes, C. and L. Carrasco, *Viral infection permeabilizes mammalian cells to protein toxins*. *Cell*, 1980. **20**(3): p. 769-75.
344. Fang, E.F. and T.B. Ng, *Ribonucleases of different origins with a wide spectrum of medicinal applications*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1815**(1): p. 65-74.
345. Zhang, R.Y., et al., *A novel ribonuclease with antiproliferative activity from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Lyophyllum shimeiji**. *Biochem Genet*, 2010. **48**(7-8): p. 658-68.
346. Wang, H.X. and T.B. Ng, *Purification of a novel ribonuclease from dried fruiting bodies of the edible wild mushroom *Thelephora ganbajun**. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **324**(2): p. 855-9.
347. Wang, H.X. and T.B. Ng, *Quinqueginsin, a novel protein with anti-human immunodeficiency virus, antifungal, ribonuclease and cell-free translation-inhibitory activities from American ginseng roots*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **269**(1): p. 203-8.
348. Ng, T.B. and H. Wang, *Panaxagin, a new protein from Chinese ginseng possesses anti-fungal, anti-viral, translation-inhibiting and ribonuclease activities*. *Life Sci*, 2001. **68**(7): p. 739-49.
349. Wang, H.X. and T.B. Ng, *A ribonuclease from Chinese ginseng (*Panax ginseng*) flowers*. *Protein Expr Purif*, 2004. **33**(2): p. 195-9.
350. Domachowske, J.B., et al., *Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNase A-family ribonuclease with direct antiviral activity*. *Nucleic Acids Res*, 1998. **26**(14): p. 3358-63.
351. Cara, A., et al., *Inhibition of HIV-1 replication by combined expression of gag dominant negative mutant and a human ribonuclease in a tightly controlled HIV-1 inducible vector*. *Gene Ther*, 1998. **5**(1): p. 65-75.
352. Durack, D.T., et al., *Purification of human eosinophil-derived neurotoxin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. **78**(8): p. 5165-9.
353. Fredens, K., R. Dahl, and P. Venge, *The Gordon phenomenon induced by the eosinophil cationic protein and eosinophil protein X*. *J Allergy Clin Immunol*, 1982. **70**(5): p. 361-6.
354. Bystrom, J., K. Amin, and D. Bishop-Bailey, *Analysing the eosinophil cationic protein--a clue to the function of the eosinophil granulocyte*. *Respir Res*, 2011. **12**: p. 10.
355. Navarro, S., et al., *Eosinophil-induced neurotoxicity: the role of eosinophil cationic protein/RNase 3*. *J Neuroimmunol*, 2010. **227**(1-2): p. 60-70.
356. Pulido, D., et al., *Towards the rational design of antimicrobial proteins: single point mutations can switch on bactericidal and agglutinating activities on the RNase A superfamily lineage*. *FEBS J*, 2013. **280**(22): p. 5841-52.

357. Heinrich, J., et al., *Oligonucleotide-mediated retroviral RNase H activation leads to reduced HIV-1 titer in patient-derived plasma*. AIDS, 2009. **23**(2): p. 213-21.
358. Youle, R.J.D.A., G., *Ribonucleases: Structures and Functions.*, G.R. D'Alessio, J.F., Editor. 1997, Academic Press: New York. p. 491-514.
359. Yu, F., et al., *Recent advances in the research of HIV-1 RNase H inhibitors*. Mini Rev Med Chem, 2008. **8**(12): p. 1243-51.
360. Plainkum, P., et al., *Creation of a zymogen*. Nat Struct Biol, 2003. **10**(2): p. 115-9.
361. Johnson, R.J., S.R. Lin, and R.T. Raines, *A ribonuclease zymogen activated by the NS3 protease of the hepatitis C virus*. FEBS J, 2006. **273**(23): p. 5457-65.
362. Turcotte, R.F. and R.T. Raines, *Design and characterization of an HIV-specific ribonuclease zymogen*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2008. **24**(11): p. 1357-63.
363. Novy, R.D., D., Yaeger, K., and Mierendorf, R., *inNovations, in Advanced products and protocols for molecular biology research*. 2001, Novagen: Madison, WI. p. 1-3.
364. Sorensen, H.P., H.U. Sperling-Petersen, and K.K. Mortensen, *Production of recombinant thermostable proteins expressed in Escherichia coli: completion of protein synthesis is the bottleneck*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003. **786**(1-2): p. 207-14.
365. Better, M., et al., *Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment*. Science, 1988. **240**(4855): p. 1041-3.
366. Cheng, Y.S., et al., *High-level synthesis of recombinant HIV-1 protease and the recovery of active enzyme from inclusion bodies*. Gene, 1990. **87**(2): p. 243-8.
367. Rangwala, S.H., et al., *High-level production of active HIV-1 protease in Escherichia coli*. Gene, 1992. **122**(2): p. 263-9.
368. Studier, F.W. and B.A. Moffatt, *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. J Mol Biol, 1986. **189**(1): p. 113-30.
369. Pace, C.N., et al., *How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein*. Protein Sci, 1995. **4**(11): p. 2411-23.
370. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
371. Lane, D. and E. Harlow, *Two different viral transforming proteins bind the same host tumour antigen*. Nature, 1982. **298**(5874): p. 517.
372. Hong, L., et al., *Crystal structure of an in vivo HIV-1 protease mutant in complex with saquinavir: insights into the mechanisms of drug resistance*. Protein Sci, 2000. **9**(10): p. 1898-904.
373. Gustafson, M.E., et al., *Large-scale production of HIV-1 protease from Escherichia coli using selective extraction and membrane fractionation*. Protein Expr Purif, 1995. **6**(4): p. 512-8.
374. Martinez, M.A., et al., *A bacteriophage lambda-based genetic screen for characterization of the activity and phenotype of the human immunodeficiency virus type 1 protease*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(5): p. 1132-9.
375. Vera, A., et al., *Engineering the E. coli beta-galactosidase for the screening of antiviral protease inhibitors*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **329**(2): p. 453-6.
376. Sambrook J., F.E.F., Maniatis T., ed. *Molecular cloning*. Harbor Laboratory Press, ed. C.S. Harbor. 1989: NY.
377. Mildner, A.M., et al., *The HIV-1 protease as enzyme and substrate: mutagenesis of autolysis sites and generation of a stable mutant with retained kinetic properties*. Biochemistry, 1994. **33**(32): p. 9405-13.
378. Stryer, L., *Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler*. Annu Rev Biochem, 1978. **47**: p. 819-46.
379. Matayoshi, E.D., et al., *Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer*. Science, 1990. **247**(4945): p. 954-8.
380. Lloyd, J.B.F., ed. *Standards in Fluorescence Spectrometry*. Chapman & Hall, ed. J.N. Miller, Ed. 1981: London.
381. Lakowicz, J.R., ed. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. ed. P. Press. 1983: New York
382. Liu, Y., et al., *Use of a fluorescence plate reader for measuring kinetic parameters with inner filter effect correction*. Anal Biochem, 1999. **267**(2): p. 331-5.
383. Darke, P.L., et al., *Human immunodeficiency virus protease. Bacterial expression and characterization*

- of the purified aspartic protease. *J Biol Chem*, 1989. **264**(4): p. 2307-12.
384. Tritch, R.J., et al., *Mutagenesis of protease cleavage sites in the human immunodeficiency virus type 1 gag polyprotein*. *J Virol*, 1991. **65**(2): p. 922-30.
385. Guex, N. and M.C. Peitsch, *SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling*. *Electrophoresis*, 1997. **18**(15): p. 2714-23.
386. Ribo, M., et al., *Quantitative analysis, using MALDI-TOF mass spectrometry, of the N-terminal hydrolysis and cyclization reactions of the activation process of onconase*. *Eur J Biochem*, 2004. **271**(6): p. 1163-71.
387. Mozhaev, V.V., et al., *High pressure effects on protein structure and function*. *Proteins*, 1996. **24**(1): p. 81-91.
388. Torrent, J., et al., *Pressure versus heat-induced unfolding of ribonuclease A: the case of hydrophobic interactions within a chain-folding initiation site*. *Biochemistry*, 1999. **38**(48): p. 15952-61.
389. Font, J., et al., *Pressure-jump-induced kinetics reveals a hydration dependent folding/unfolding mechanism of ribonuclease A*. *Biophys J*, 2006. **91**(6): p. 2264-74.
390. Kelemen, B.R. and R.T. Raines, *Extending the limits to enzymatic catalysis: diffusion of ribonuclease A in one dimension*. *Biochemistry*, 1999. **38**(17): p. 5302-7.
391. Park, C., et al., *Fast, facile, hypersensitive assays for ribonucleolytic activity*. *Methods Enzymol*, 2001. **341**: p. 81-94.
392. Blackburn, P., G. Wilson, and S. Moore, *Ribonuclease inhibitor from human placenta. Purification and properties*. *J Biol Chem*, 1977. **252**(16): p. 5904-10.
393. Shen, L., et al., *Dose-response curve slope sets class-specific limits on inhibitory potential of anti-HIV drugs*. *Nat Med*, 2008. **14**(7): p. 762-6.
394. Goddard, T.D. and D.G. Kneller, *Sparky 3*, University of California, San Francisco. 2005.
395. Güntert, P., *Automated NMR structure calculation with CYANA*. *Methods Mol Biol*, 2004. **278**: p. 353-378.
396. Shen, Y., et al., *TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts*. *J Biomol NMR*, 2009. **44**(4): p. 213-23.
397. Case, D.A., Darden, T. A., Cheatham, I., T. E., Simmerling, C. L., Wang, J., Duke, R. E., Luo, R., Merz, K. M., Pearlman, D. A., Crowley, M., Walker, R. C., Zhang, W., Wang, B., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Wong, K. F., Paesani, F., Wu, X., Brozell, S., Tsui, V., Gohlke, H., Yang, L., Tan, C., Mongan, J., Hornak, V., Cui, G., Beroza, P., Mathews, D. H., Schafmeister, C., Ross, W. S. and Kollman, P. A. , *AMBER 9*, University of California, San Francisco. . 2006
398. Laskowski, R.A., et al., *AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR*. *J Biomol NMR*, 1996. **8**(4): p. 477-86.
399. Bai, Y., et al., *Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange*. *Proteins*, 1993. **17**(1): p. 75-86.
400. Bruix, M., et al., *Destabilizing mutations alter the hydrogen exchange mechanism in ribonuclease A*. *Biophys J*, 2008. **94**(6): p. 2297-305.
401. Bu, M., S. Oroszlan, and R.B. Luftig, *Inhibition of bacterially expressed HIV protease activity determined by an in vitro cleavage assay with MuLV Pr65gag*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1989. **5**(3): p. 259-68.
402. Chiang, C.S., et al., *Development of a confirmatory enzyme-linked immunosorbent assay for HIV-1 antibodies*. *Clin Chem*, 1989. **35**(6): p. 946-52.
403. Giam, C.Z. and I. Boros, *In vivo and in vitro autoprocessing of human immunodeficiency virus protease expressed in Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(29): p. 14617-20.
404. Billich, A., F. Hammerschmid, and G. Winkler, *Purification, assay and kinetic features of HIV-1 proteinase*. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1990. **371**(3): p. 265-72.
405. Dilanni, C.L., et al., *Characterization of an active single polypeptide form of the human immunodeficiency virus type 1 protease*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(28): p. 17348-54.
406. Krausslich, H.G., *Human immunodeficiency virus proteinase dimer as component of the viral polyprotein prevents particle assembly and viral infectivity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(8): p. 3213-7.
407. Laurents, D.V., et al., *The (1)H, (13)C, (15)N resonance assignment, solution structure, and residue level stability of eosinophil cationic protein/RNase 3 determined by NMR spectroscopy*. *Biopolymers*, 2009. **91**(12): p. 1018-28.

408. Chang, C.F., et al., *The solution structure of a cytotoxic ribonuclease from the oocytes of Rana catesbeiana (bullfrog)*. J Mol Biol, 1998. **283**(1): p. 231-44.
409. Hsu, C.H., et al., *Solution structure of the cytotoxic RNase 4 from oocytes of bullfrog Rana catesbeiana*. J Mol Biol, 2003. **326**(4): p. 1189-201.
410. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten, *VMD: visual molecular dynamics*. J Mol Graph, 1996. **14**(1): p. 33-8, 27-8.
411. Serrano, S., et al., *(1)H, (13)C and (15)N resonance assignments of the Onconase FL-G zymogen*. Biomol NMR Assign, 2013. **7**(1): p. 13-5.
412. Toiron, C., et al., *Three-dimensional structure of the complexes of ribonuclease A with 2',5'-CpA and 3',5'-d(CpA) in aqueous solution, as obtained by NMR and restrained molecular dynamics*. Protein Sci, 1996. **5**(8): p. 1633-47.
413. Neira, J.L., et al., *Hydrogen exchange in ribonuclease A and ribonuclease S: evidence for residual structure in the unfolded state under native conditions*. J Mol Biol, 1999. **285**(2): p. 627-43.
414. Li, H., A.D. Robertson, and J.H. Jensen, *Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values*. Proteins, 2005. **61**(4): p. 704-21.
415. Sohl, J.L., et al., *Inhibition of alpha-lytic protease by pro region C-terminal steric occlusion of the active site*. Biochemistry, 1997. **36**(13): p. 3894-902.
416. Iwama, M., et al., *Effect of modification of the carboxyl groups of the sialic acid binding lectin from bullfrog (Rana catesbeiana) oocyte on anti-tumor activity*. Biol Pharm Bull, 2001. **24**(9): p. 978-81.
417. Ilinskaya, O.N., et al., *Changing the net charge from negative to positive makes ribonuclease Sa cytotoxic*. Protein Sci, 2002. **11**(10): p. 2522-5.
418. Gaur, D. and J.K. Batra, *Role of aspartic acid 121 in human pancreatic ribonuclease catalysis*. Mol Cell Biochem, 2005. **275**(1-2): p. 95-101.
419. Benkovic, S.J., C.A. Fierke, and A.M. Naylor, *Insights into enzyme function from studies on mutants of dihydrofolate reductase*. Science, 1988. **239**(4844): p. 1105-10.
420. Perry, L.J. and R. Wetzel, *Disulfide bond engineered into T4 lysozyme: stabilization of the protein toward thermal inactivation*. Science, 1984. **226**(4674): p. 555-7.
421. Serrano, L., et al., *The folding of an enzyme. II. Substructure of barnase and the contribution of different interactions to protein stability*. J Mol Biol, 1992. **224**(3): p. 783-804.
422. Pace, C.N., et al., *Conformational stability and activity of ribonuclease T1 with zero, one, and two intact disulfide bonds*. J Biol Chem, 1988. **263**(24): p. 11820-5.
423. Klink, T.A., et al., *Contribution of disulfide bonds to the conformational stability and catalytic activity of ribonuclease A*. Eur J Biochem, 2000. **267**(2): p. 566-72.
424. Matsumura, M., G. Signor, and B.W. Matthews, *Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds*. Nature, 1989. **342**(6247): p. 291-3.
425. Betz, S.F., *Disulfide bonds and the stability of globular proteins*. Protein Sci, 1993. **2**(10): p. 1551-8.
426. Pecher, P. and U. Arnold, *The effect of additional disulfide bonds on the stability and folding of ribonuclease A*. Biophys Chem, 2009. **141**(1): p. 21-8.
427. Hinck, A.P., D.M. Truckses, and J.L. Markley, *Engineered disulfide bonds in staphylococcal nuclease: effects on the stability and conformation of the folded protein*. Biochemistry, 1996. **35**(32): p. 10328-38.
428. Mason, J.M., et al., *The influence of intramolecular bridges on the dynamics of a protein folding reaction*. Biochemistry, 2002. **41**(40): p. 12093-9.
429. Mucke, M. and F.X. Schmid, *Intact disulfide bonds decelerate the folding of ribonuclease T1*. J Mol Biol, 1994. **239**(5): p. 713-25.
430. Arnold, U., *Stability and stabilization of proteins: the ribonuclease A example*, in *Protein Folding*, W. EC, Editor. 2011, Nova Science Publishers, Inc.: New York. p. 83-118.
431. Futami, J., et al., *Stabilization of human RNase 1 by introduction of a disulfide bond between residues 4 and 118*. J Biochem, 2000. **128**(2): p. 245-50.
432. Vieille, C. and G.J. Zeikus, *Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability*. Microbiol Mol Biol Rev, 2001. **65**(1): p. 1-43.
433. Xiao, L. and B. Honig, *Electrostatic contributions to the stability of*

- hyperthermophilic proteins*. J Mol Biol, 1999. **289**(5): p. 1435-44.
434. Arnold, U. and M. Schopf, *Significant stabilization of ribonuclease A by additive effects*. FEBS J, 2012. **279**(14): p. 2508-19.
435. Costin, J.M., et al., *Viroporin potential of the lentivirus lytic peptide (LLP) domains of the HIV-1 gp41 protein*. Virol J, 2007. **4**: p. 123.
436. Steckbeck, J.D., et al., *Detailed topology mapping reveals substantial exposure of the "cytoplasmic" C-terminal tail (CTT) sequences in HIV-1 Env proteins at the cell surface*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e65220.
437. Yang, Q.E., *Human immunodeficiency virus reservoir might be actively eradicated as residual malignant cells by cytotoxic chemotherapy*. Med Hypotheses, 2004. **62**(3): p. 358-63.
438. Toborek, M., et al., *Mechanisms of the blood-brain barrier disruption in HIV-1 infection*. Cell Mol Neurobiol, 2005. **25**(1): p. 181-99.
439. Calabria, A.R. and E.V. Shusta, *Blood-brain barrier genomics and proteomics: elucidating phenotype, identifying disease targets and enabling brain drug delivery*. Drug Discov Today, 2006. **11**(17-18): p. 792-9.
440. Chen, Y. and L. Liu, *Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier*. Adv Drug Deliv Rev, 2012. **64**(7): p. 640-65.
441. Chopineau, J., et al., *Monoacylation of ribonuclease A enables its transport across an in vitro model of the blood-brain barrier*. J Control Release, 1998. **56**(1-3): p. 231-7.
442. Prades, R., et al., *Applying the Retro-Enantio Approach to Obtain a Peptide Capable of Overcoming the Blood-Brain Barrier*. Angew Chem Int Ed Engl, 2015.

