

ANÀLISI DE LA SELECTIVITAT PER A CÈL·LULES TUMORALS DE RIBONUCLEASES CITOTÒXIQUES I DESENVOLUPAMENT D'EINES PER AUGMENTAR AQUESTA SELECTIVITAT

Glòria García Galindo

Per citar o enllaçar aquest document:

Para citar o enlazar este documento:

Use this url to cite or link to this publication:

<http://hdl.handle.net/10803/394027>

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 TDX (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.



Tesi doctoral

**Anàlisi de la selectivitat per a cèl·lules tumorals de
ribonucleases citotòxiques i desenvolupament
d'eines per augmentar aquesta selectivitat**

Glòria García Galindo

2016



Tesi doctoral

**Anàlisi de la selectivitat per a cèl·lules tumorals de
ribonucleases citotòxiques i desenvolupament
d'eines per augmentar aquesta selectivitat**

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

Glòria García Galindo

2016

Programa de Doctorat en Biologia Molecular, Biomedicina i Salut

Vistiplau
El director de Tesi

Vistiplau
La directora de Tesi

Dr. Antoni Benito Mundet
Professor Titular
de Bioquímica i Biologia Molecular

Dra. Maria Vilanova Brugués
Catedràtica
de Bioquímica i Biologia Molecular

Aquesta Tesi ha estat realitzada amb el suport del Ministerio de Educación (beca AP2010-4965), del Ministerio de Ciencia e Innovación (projecte BFU2009-06935/BMC), de la Universitat de Girona (ajut SING12/04) i del Ministerio de Economía y Competitividad (projecte BIO2013-43517-R).

Wissenschaft kann die letzten Rätsel der Natur nicht lösen. Sie kann es deswegen nicht, weil wir selbst ein Teil der Natur und damit auch ein Teil des Rätsels sind, das wir lösen wollen.

Max Planck

Als meus pares

A la meva germana

A la Pascària, la Soumya i en Nemésio

AGRAÏMENTS

Quan vaig acabar la carrera, al juny de 2010, no veia el moment de posar-me a començar la tesi doctoral amb una il·lusió enorme. Aleshores se'm feia molt llunyà el moment d'escriure la tesi: primer havia de fer el màster, després demanar una beca predoctoral, obtenir-la... Quedaven moltíssims anys per endavant plens d'experiències al laboratori, nervis, riures, plors... Alts i baixos que no hauria pogut superar sense el recolzament de moltes persones i ara que s'acosta el final del camí crec que és el moment de donar-los un reconeixement especial.

Primer de tot, voldria agrair a la Maria, a en Toni i a en Marc haver-me acceptat per fer no només la tesi en el vostre grup, sinó també el treball final de màster i el treball de la beca de col·laboració. Fa molt de temps des que vam començar tot això, i per aquest motiu us vull donar les gràcies per l'enorme confiança que heu dipositat en mi al llarg de tots aquests anys. Voldria fer una menció especial a en Toni, per rebre'm al teu despatx en qualsevol moment i d'imprevist, sempre disposat a escoltar els meus problemes, i que no han sigut pas pocs.

Moltíssimes gràcies també a tots els integrants de BQ107, els que ja hi eren abans i els que han anat passant després. Gràcies a en Pere, la Jess, en Roger Vilà, la Mariona, l'Anna i en David Soler, per transmetre'm en algun moment o altre el vostre saber, per tenir uns minuts per a mi i ajudar-me en els entrebancs del dia a dia al laboratori o donar-me ànims quan les coses no sortien com jo volia. Abans de continuar, però, vull fer un petit incís per agrair a la Jess haver-me ajudat tant i tant amb el tema dels cultius cel·lulars, per ser el meu recolzament en moments de desesperació i per ajudar-me a interpretar els resultats i a decidir el següent pas: gràcies per ser-hi sempre que t'he necessitat. Com no, moltes gràcies també a la Vero i a en Santi, pràcticament vam iniciar plegats aquest viatge i m'enduc de vosaltres molt bons records inesborrables. I gràcies també pels bons moments que hem passat plegats fora del laboratori: berenars, sopars, excursions, barbacoes, viatges, dies de platja, banys a les gorgues de ca les Planes... moments que recordaré per sempre més. Gràcies també a en Diego, en Joan, en Txús, la Lorena, la Cristina Ruiz, la Sònia Feu, la Rosa, en David Roura, la Natàlia, la Míriam, en Juanjo, la Nerea i la Rebeca; estudiants de TFG i TFM que en algun moment hem compartit vivències al laboratori, i que se m'han fet més grates al vostre costat. Per descomptat, vull donar-li les gràcies a l'Imma, la nostra tècnica, per preparar-nos els reactius i encarregar-nos les comandes amb tanta dedicació.

Moltes gràcies també a les veïnes de BQ105, que sempre han estat disposades a donar un cop de mà. Tampoc m'oblido dels becaris de la resta del departament de Biologia: els sopars, les excursions i sobretot els moments d'anar a dinar, moments plegats d'anècdotes molt divertides. Gràcies.

Fóra de l'ambient del laboratori també hi ha hagut gent amb qui he compartit moltes hores d'esbarjo i de riures i que han aconseguit que m'evadís de les preocupacions inevitables de la recerca. Als meus companys d'alemany, sobretot a la Gemma Roselló i a la Sandra Izquierdo, i a les meves dues professores, Anna Rodríguez i Mercè Ribera: Ich möchte mich bei euch darüber bedanken, nicht nur mit euch Deutsch zu lernen, sondern auch eure geschätzte Gesellschaft, unsere lustigen Abendessen, die Ausflüge nach Deutschland und besonders die lachenden Momenten beim Unterricht. Vielen Dank. També voldria agrair a la professora Mar Antón, del departament de català del Servei de Llengües Modernes de la UdG, no només per tot el que he après durant el curs de C2, sinó també per resoldre tots els meus dubtes amb tanta diligència sempre que ho he necessitat.

Finalment, el meu agraïment més especial als meus pares i a la meva germana, ja que tot aquest camí no l'hagués pogut fer sense el recolzament, la comprensió i l'amor incondicional que m'han brindat sempre. Us estimo. Aquesta tesi la dedico també a algú molt especial per a mi que durant gairebé tota la meva vida ha estat sempre fidelment al meu costat, que formava part de la meva família, però que durant la redacció d'aquesta tesi se n'ha anat per sempre més. No oblidaré mai tots aquests anys que hem passat juntes, a les dures i a les madures. Encara que no et pugui veure, allà on vagi, sé que ets al meu costat.

ÍNDEX GENERAL

Índex general	I
Índex de figures	V
Índex de taules	VII
Llista d'abreviatures	IX
Publicacions derivades	XII
Resum	XIII
Resumen	XV
Summary	XVII
1. INTRODUCCIÓ	I
1.1. Les ribonucleases com a agents antitumorals	4
<i>1.1.1. Ribonucleases antitumorals naturals</i>	<i>5</i>
1.1.1.1. BS-RNasa	5
1.1.1.2. Onconasa	5
1.1.1.3. Amfinases	8
1.1.1.4. Lectines jSBL i cSBL	8
1.2. Estratègies per aconseguir ribonucleases no naturals citotòxiques	8
1.2.1. PE5	10
1.2.2. NSLPE5 i PE10	13
1.3. Apoptina	14
1.3.1. Estructura primària	14
1.3.2. Mecanisme d'inducció de l'apoptosi	15
1.3.3. Estratègies per millorar l'eficiència d'internalització de l'apoptina en cèl·lules tumorals	16
2. OBJECTIUS	19
3. MATERIALS I MÈTODES	23
3.1. Material biològic	25
3.1.1. Soques bacterianes	25
3.1.1.1. <i>Escherichia coli</i> DH5 α	25
3.1.1.2. <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	25
3.1.1.3. <i>Escherichia coli</i> Rosetta™ 2(DE3)	25

3.1.2.	Vectors	26
3.1.2.1.	pONC	26
3.1.2.2.	pM5	26
3.1.2.3.	pE5	26
3.1.2.4.	pNLSPE5	26
3.1.2.5.	pE10	27
3.1.2.6.	pET-28ApopΔProΔLeu	27
3.1.3.	Línies cel·lulars eucariotes i condicions de cultiu	27
3.2.	Mètodes microbiològics	28
3.2.1.	Medis de cultiu	28
3.2.2.	Antibiòtics	29
3.2.3.	Cultius líquids de soques bacterianes	30
3.2.4.	Manteniment de les soques	30
3.3.	Cultiu de cèl·lules eucariotes	31
3.3.1.	Medis i condicions de cultiu	31
3.3.2.	Expansió de línies cel·lulars de creixement adherent	31
3.3.3.	Congelació i descongelació de les línies cel·lulars	32
3.3.4.	Recompte del nombre de cèl·lules	33
3.4.	Tècniques de DNA recombinant	33
3.4.1.	Obtenció de DNA plasmídic (Miniprep)	33
3.4.2.	Electroforesi de DNA en gel d'agarosa	34
3.4.3.	Purificació de fragments de DNA a partir de gels d'agarosa (GeneClean)	34
3.4.4.	Estimació espectrofotomètrica de la concentració de DNA	35
3.4.5.	Utilització d'enzims que modifiquen el DNA	35
3.4.5.1.	Tractament amb enzims de restricció	35
3.4.5.2.	Defosforilació del DNA a l'extrem 5'	36
3.4.5.3.	Reacció de lligament amb la DNA lligasa de T4	36
3.4.6.	Mutagènesi dirigida per oligonucleòtid mitjançant el mètode de QuikChange™	36
3.4.7.	Disseny de seqüències dsDNA per introduir seqüències específiques a les RNases	38
3.4.8.	Obtenció de cèl·lules competents d' <i>E. coli</i>	39
3.4.9.	Transformació de cèl·lules competents d' <i>E. coli</i>	39
3.4.10.	Seqüenciació de DNA	40
3.5.	Mètodes d'expressió i purificació de proteïnes recombinants	42

3.5.1.	<i>Expressió heteròloga d'RNases</i>	42
3.5.2.	<i>Purificació d'RNases recombinants</i>	43
3.5.2.1.	Procediment de purificació de variants de l'HP-RNasa	43
3.5.2.2.	Purificació de l'onconasa	45
3.5.2.3.	Purificació d'H ₆ -PE10_ApopΔProΔLeu	45
3.6.	Anàlisi i caracterització proteica	47
3.6.1.	<i>Determinació de la massa molecular</i>	47
3.6.2.	<i>Determinació de la quantitat de proteïna</i>	47
3.6.2.1.	Mètode espectrofotomètric	47
3.6.2.2.	Mètode de Bradford	48
3.6.3.	<i>Electroforesi discontinua en gel de poliacrilamida</i>	48
3.6.4.	<i>Anàlisi de la interacció entre RNases i l'inhibidor</i>	50
3.6.5.	<i>Anàlisi de l'activitat citotòxica sobre línies cel·lulars eucariotes</i>	51
3.6.5.1.	Assaig de proliferació cel·lular	51
3.6.5.2.	Anàlisi dels efectes citotòxics i citostàtics	52
3.6.5.3.	Anàlisi del cicle cel·lular	52
3.6.5.4.	Assaig de l'activació de les procaspases	53
3.6.5.5.	Anàlisi de l'expressió proteica per Western Blot	54
3.6.5.6.	Separació de les fraccions nuclear i citoplasmàtica de cèl·lules tractades amb ND-RNases	56
4.	RESULTATS I DISCUSSIÓ	59
4.1.	Anàlisi de la selectivitat de PE5 i NLSPE5 per a cèl·lules tumorals	61
4.1.1.	<i>Assaigs de citotoxicitat</i>	61
4.1.2.	<i>Estudi de l'efecte de les ND-RNases sobre la proliferació i la viabilitat cel·lular</i>	62
4.1.3.	<i>Anàlisi de l'efecte de PE5 i NLSPE5 sobre la distribució de fases del cicle cel·lular</i>	64
4.1.4.	<i>Caracterització de l'apoptosi induïda per PE5 i NLSPE5</i>	67
4.1.5.	<i>La selectivitat de les ND-RNases està condicionada per la sobreexpressió de p27^{KIP1} i/o p21^{WAF1/CIP1}</i>	70
4.2.	Fusió d'ND-RNases citotòxiques a determinants de l'apoptina	73
4.2.1.	<i>Estratègies per conferir selectivitat a l'HP-RNasa mitjançant l'addició d'un NES i regulable per fosforilació</i>	73

4.2.1.1.	Descripció dels NES i Psite	73
4.2.1.2.	Obtenció de les variants NES_PE5 i NES_Psite_PE5	74
4.2.1.3.	Producció i caracterització de les variants NES_Psite_PE5	77
4.2.1.4.	Estratègia d'obtenció de les variants PE10_NES_Psite	82
4.2.1.5.	Producció i caracterització de PE10_NES_Psite	85
4.2.1.6.	Avaluació de l'índex de selectivitat	89
4.2.2.	<i>Estratègia per conferir selectivitat a l'HP-RNasa mitjançant la seva fusió a l'apoptina</i>	91
4.2.2.1.	Construcció de la variant H ₆ -PE10_ApopΔProΔLeu	91
4.2.2.2.	Producció i purificació d'H ₆ -PE10_ApopΔProΔLeu	92
4.2.2.3.	Anàlisi de la capacitat d'H ₆ -PE10_ApopΔProΔLeu d'evadir l'RI	94
4.2.2.4.	Citotoxicitat d'H ₆ -PE10_ApopΔProΔLeu per a cèl·lules tumorals i no tumorals	94
5.	DISCUSSIÓ GENERAL	97
6.	CONCLUSIONS	107
7.	BIBLIOGRAFIA	111

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1.1. Estructura del complex RI-RNasa A	9
Figura 1.2. Representació esquemàtica de la posició dels residus que formen l'NLS de PE5	10
Figura 1.3. La citotoxicitat de les ND-RNases és el resultat de la competència entre l'RI i l' α -importina per unir-se a les ND-RNases	11
Figura 1.4. Estructura primària de l'apoptina	15
Figura 4.1. Efectes sobre la proliferació i la viabilitat de la línia cel·lular CCD-18Co causats pel tractament amb PE5 i NLSPE5	63
Figura 4.2. Efectes de PE5 i NLSPE5 sobre la distribució de fases del cicle cel·lular de la línia CCD-18Co després de 72 h de tractament	64
Figura 4.3. Expressió a la fracció cel·lular total de la ciclina D ₁ , la ciclina E, p27 ^{KIP1} i p21 ^{WAF1/CIP1} en cèl·lules CCD-18Co tractades amb 21 μ M de PE5 o 5,5 μ M d'NLSPE5	65
Figura 4.4. Variació del nivell d'expressió citoplasmàtica de la ciclina D ₁ , p27 ^{KIP1} i p21 ^{WAF1/CIP1} en cèl·lules CCD-18Co tractades amb 21 μ M de PE5 o 5,5 μ M d'NLSPE5	67
Figura 4.5. Activació de les procaspases 3, 8 i 9 en cèl·lules CCD-18Co tractades amb PE5 o NLSPE5	68
Figura 4.6. Variació del nivell d'expressió de Bax, Bcl-2, XIAP, JNK i p-JNK en cèl·lules CCD-18Co tractades amb 21 μ M de PE5 o amb 5,5 μ M d'NLSPE5	69
Figura 4.7. Efectes antiapoptòtics de p27 ^{KIP1}	71
Figura 4.8. Interaccions de p21 ^{WAF1/CIP1} en el citoplasma i paper en la inhibició de l'apoptosi	72
Figura 4.9. Representació esquemàtica de les variants de NES_Psite_PE5 construïdes en aquest treball	74
Figura 4.10. Esquema del procés de construcció dels mutants pNES_PE5 i pNES_Psite_PE5	76
Figura 4.11. Anàlisi de la interacció de l'RI amb les diferents variants NES_Psite_PE5	79
Figura 4.12. Anàlisi de la interacció de l'RI amb les diferents variants NES_PE5	81
Figura 4.13. Representació esquemàtica de les variants PE10_NES_Psite construïdes en aquest treball	83
Figura 4.14. Esquema del procés de construcció dels mutants pPE10_NES_Psite	84

Figura 4.15. Anàlisi de la interacció de l'RI amb les diferents variants PE10_NES_Psite	88
Figura 4.16. Esquema del procés de construcció de la variant pH ₆ -PE10_ApopΔProΔLeu	92
Figura 4.17. Anàlisi electroforètic del procés de purificació d'H ₆ -PE10_ApopΔProΔLeu	93
Figura 4.18. Purificació per gel-filtració d'H ₆ -PE10_ApopΔProΔLeu	93
Figura 4.19. Inhibició de l'activitat ribonucleolítica d'H ₆ -PE10_ApopΔProΔLeu per efecte de l'RI	94

ÍNDIX DE TAULES

Taula 3.1. Característiques generals de les línies cel·lulars que apareixen en aquest treball	28
Taula 3.2. Programa d'anellament per hibridar les cadenes codificants i no codificants	38
Taula 3.3. Coeficients d'extinció molar (280 nm) pel càlcul de concentració de les proteïnes d'aquest treball	47
Taula 4.1. Valors d'IC ₅₀ (µM) de l'onconasa, PE5 i NLSPE5 per a les línies cel·lulars indicades	61
Taula 4.2. Descripció de les diferents seqüències NES i Psite utilitzades	73
Taula 4.3. Seqüència dels oligonucleòtids dissenyats i seqüències aminoacídiques codificades corresponents a les seqüències NES i Psite utilitzades per crear les noves variants de l'HP-RNasa	75
Taula 4.4. Oligonucleòtids utilitzats en les reaccions de QuikChange™ per obtenir pNES_PE5	77
Taula 4.5. Rendiments de purificació obtinguts per a cada una de les variants de NES_Psite_PE5 i relació de pesos moleculars teòrics i observats per MALDI-TOF	78
Taula 4.6. Valors d'IC ₅₀ (µM) de PE5 i les seves variants de NES_Psite_PE5 obtinguts sobre la línia tumoral NCI-H460, i sobre les línies no tumorals HaCaT, CCD-18Co i HEK-293	78
Taula 4.7. Rendiments de purificació obtinguts per a cada una de les Variants de NES_PE5 i relació de pesos moleculars teòrics i observats per MALDI-TOF	80
Taula 4.8. Valors d'IC ₅₀ (µM) de PE5 i les seves variants de NES_PE5 obtinguts sobre la línia tumoral NCI-H460	81
Taula 4.9. Oligonucleòtids utilitzats en les reaccions de QuikChange™ per obtenir pE10_NES_Psite	85
Taula 4.10. Rendiments de purificació obtinguts per a cada una de les variants de PE10_NES_Psite i relació de pesos moleculars teòrics i observats per MALDI-TOF	86
Taula 4.11. Valors d'IC ₅₀ (µM) de PE10 i les seves variants de PE10_NES_Psite obtinguts sobre la línia tumoral NCI-H460 i sobre la línia no tumoral CCD-18Co	86
Taula 4.12. Valors d'IC ₂₅ (µM) de PE10 i les seves variants de	

PE10_NES_Psite obtinguts sobre la línia no tumoral CCD-18Co	87
Taula 4.13. Índex de selectivitat de l'onconasa, PE5 i de les variants NES_Psite_PE5	89
Taula 4.14. Valors d'IC ₅₀ (µM) de PE5 i PE10 per a les línies cel·lulars tumorals indicades	90
Taula 4.15. Valors d'IC ₅₀ (µM) de PE10, H ₆ -ApopΔProΔLeu i H ₆ -PE10_ApopΔProΔLeu per a la línia cel·lular tumoral NCI-H460 i la no tumoral CCD-18Co	95

LLISTA D'ABREVIATURES

ABC	transportadors ATP-binding cassette
Abs	absorbància
AP-1	proteïna activadora 1
ASK1/MEKK5	apoptosis signal-regulating quinase 1/mitogen-activated protein kinase kinase 5
Bax	bcl-2 associated x protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 protein
BS-RNasa	ribonucleasa de semen de bou
CAV	virus de l'anèmia del pollastre
CDK	quinases dependents de ciclins
CDK2	quinasa dependent de ciclina 2
cDNA	DNA complementari
CKI	inhibidor de quinasa dependent de ciclina
CMV	citomegalovirus
CRM1	exportina 1
cSBL	lectina de <i>Rana catesbeiana</i>
C-terminal	carboxi terminal
Da, kDa	dalton, quilodalton
ddNTP	dideoxiribonucleòtid-5'trifosfat
DMEM	medi Eagle modificat per Dulbecco
DMSO	dimetil sulfòxid
dNTP	desoxiribonucleòtid-5'trifosfat
dsDNA	DNA de doble cadena
EDTA	àcid etilendiaminatetraacètic
FBS	sèrum fetal boví
Gnd-HCl	clorur de guanidini
GSH	glutatió reduït
GSSG	glutatió oxidat
HPLC	cromatografia líquida d'alta resolució
HP-RNasa	ribonucleasa pancreàtica humana
hTR	telomerasa RNA humana
IC₅₀	concentració de proteïna que provoca una reducció del 50% de la proliferació cel·lular
IDP	proteïna intrínsecament desestructurada

IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosid
JNK	quinases c-jun N-terminal
jSBL	lectina de <i>Rana japonica</i>
LB	medi Luria-Bertani
LRS	seqüència rica en leucines
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
MAPKKK	MAP quinasa quinasa quinasa
MDR	multirresistència a fàrmacs antitumorals
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
Mw	pes molecular
ND-RNasa	ribonucleasa dirigida a nucli
NES	senyal d'export nuclear
Ni-NTA	níquel-àcid nitriltriàcètic
NLS	senyal de localització nuclear
N-terminal	amino terminal
O/N	overnight
p/v	relació pes/volum
p21^{WAF1/CIP1}	inhibidor IA de quinases dependents de ciclines
p27^{KIP1}	inhibidor IB de quinases dependents de ciclines
p53	proteïna supressora de tumors
PAGE	electroforesi en gel de poliacrilamida
PBS	tampó fosfat salí
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
P-gp	P-glicoproteïna
PI	iodur de propidi
PKB/Akt	proteïna quinasa B
PKCβ	proteïna quinasa C β
Psite	lloc de fosforilació
RI	inhibidor de ribonucleases
RNasa A	ribonucleasa de pàncrees boví
RNasa	ribonucleasa
ROS	espècies reactives de l'oxigen
RPMI	medi Roswell Park Memorial Institute
SAPK	proteïnes quinases activades per estrès
SARS	síndrome respiratòria severa aguda

SDS	dodecil sulfat de sodi
TAE	tampó Tris-Acetata EDTA
TB	medi Terrific-Broth
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
T_m	temperatura de fusió
Tris	Tris-hidroximetil-aminometà
UV	ultraviolat
v/v	relació volum/volum
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
ε	coeficient d'extinció molar
λ	longitud d'ona

PUBLICACIONS DERIVADES

G. García-Galindo, J. Castro, A. Vert, M. Ribó, M. Vilanova i A. Benito. *Analysis of selective cytotoxicity for tumor cells of nuclear-directed human ribonuclease variants*. Dins: E. Pinart, editora. I Jornada del programa de doctorat en Biologia Molecular, Biomedicina i salut. Abstract Book. Girona. Universitat de Girona; 2016. p. 19-20. ISBN: 978 84 8458 463 6

RESUM

El grup de recerca d'Enginyeria de Proteïnes ha desenvolupat diferents variants citotòxiques de la ribonucleasa pancreàtica humana dirigides a nucli (ND-RNases) amb l'objectiu d'aconseguir fàrmacs antitumorals no genotòxics que puguin ésser utilitzats ja sigui sols o com a complement dels fàrmacs antitumorals actuals. Aquestes ND-RNases contenen una o més senyals de localització nuclear (NLS) que les dirigeixen cap a aquest compartiment cel·lular, on no existeixen mecanismes per inhibir l'activitat ribonucleolítica. Entre les ND-RNases que presenten major citotoxicitat destaquen PE5 i NLSPE5, les quals són citotòxiques per a un ampli ventall de línies cel·lulars tumorals.

En el present treball s'ha estudiat la selectivitat de PE5 i NLSPE5 per a cèl·lules tumorals. Amb aquest propòsit, s'ha determinat la citotoxicitat d'ambdues ND-RNases en quatre línies cel·lulars no tumorals (HaCaT, CCD-18Co, HEK-293 i IBR.3.G) i se l'ha comparada amb la citotoxicitat que presenten en cèl·lules tumorals. A més, s'ha estudiat el mecanisme molecular promogut per ambdues ND-RNases, utilitzant com a model la línia cel·lular CCD-18Co. S'ha investigat l'efecte sobre la distribució del cicle cel·lular i sobre els mecanismes de mort cel·lular, mesurant l'activació de caspases i l'expressió de diferents proteïnes involucrades en l'apoptosi i el cicle cel·lular. Els resultats obtinguts indiquen que ambdues ND-RNases són citotòxiques per a cèl·lules no tumorals només a elevades concentracions. Així mateix, la citotoxicitat no genera canvis en la distribució de les fases del cicle cel·lular, en contraposició amb el que ocorre en cèl·lules tumorals. La mort cel·lular es produeix mitjançant l'apoptosi a través de l'activació de las procaspases 3, 8 i 9. El patró d'expressió de proteïnes involucrades en l'apoptosi i el cicle cel·lular difereix de l'induït en cèl·lules tumorals, on destaca l'augment de p27^{KIP1}, i en menor grau de p21^{WAF1/CIP1}. El canvi en el nivell d'expressió d'aquestes dues proteïnes permet explicar perquè les cèl·lules tumorals són més sensibles a l'acció d'aquestes ND-RNases.

Per altra banda, s'han dissenyat diferents estratègies per millorar la selectivitat de les ND-RNases que han consistit en fusionar-les amb diferents tipus de senyals d'exportació nuclear (NES) regulables per fosforilació, introduïdes a l'extrem N- o C-terminal de les ND-RNases. En cèl·lules tumorals, les quals sobreexpressen aquelles quinases que poden fosforilar una Thr adjacent al NES, les RNases haurien de quedar retinudes a nucli, mentre que en cèl·lules no tumorals haurien de ser redirigides al citoplasma. Aquesta estratègia també s'ha dut a terme fusionant una ND-RNasa amb una variant de l'apoptina, (H₆-ApopΔProΔLeu). L'apoptina és una proteïna viral que presenta selectivitat per a cèl·lules tumorals en part

gràcies a la seva retenció al nucli també per un mecanisme de fosforilació. Del conjunt de construccions, cap va presentar una selectivitat selectivament superior respecte a les proteïnes parentals, probablement a causa del fet que les seqüències dels NES no eren funcionals en l'entorn proteic.

RESUMEN

El grupo de investigación de Ingeniería de Proteínas ha desarrollado diferentes variantes citotóxicas de la ribonucleasa pancreática humana dirigidas a núcleo (ND-RNasas) con el objetivo de conseguir fármacos antitumorales no genotóxicos que puedan ser utilizados ya sea solos o como complementos de los fármacos antitumorales actuales. Estas ND-RNasas contienen una o más señales de localización nuclear (NLS) que las dirigen a este compartimiento celular, donde no existen mecanismos para inhibir su actividad ribonucleolítica. Entre las ND-RNasas que presentan mayor citotoxicidad destacan PE5 y NLSPE5, las cuales son citotóxicas para un amplio panel de líneas celulares tumorales.

En el presente trabajo se ha estudiado la selectividad de PE5 y NLSPE5 para células tumorales. Con este propósito se ha determinado la citotoxicidad de ambas ND-RNasas en cuatro líneas celulares no tumorales (HaCaT, CCD-18Co, HEK-293 y IBR.3.G) y se ha comparado con la citotoxicidad que presentan en células tumorales. Asimismo, se ha estudiado el mecanismo molecular promovido por ambas ND-RNasas, sobre todo utilizando como modelo la línea celular CCD-18Co. Se ha investigado su efecto sobre la distribución del ciclo celular y sobre los mecanismos de muerte celular, midiendo la activación de caspasas y la expresión de diferentes proteínas involucradas en la apoptosis y el ciclo celular. Los resultados obtenidos indican que ambas ND-RNasas son citotóxicas para células no tumorales sólo a altas concentraciones. Además, su citotoxicidad no genera cambios en la distribución de las fases del ciclo celular, en contraposición con lo que ocurre en células tumorales. La muerte celular se produce mediante apoptosis a través de la activación de las procaspasas 3, 8 y 9. El patrón de expresión de proteínas involucradas en la apoptosis y el ciclo celular difiere del inducido en las células tumorales, donde destaca el aumento de p27^{KIP1}, y en menor grado de p21^{WAF1/CIP1}. El cambio en el nivel de expresión de estas dos proteínas permite explicar porque las células tumorales son más sensibles a la acción de estas ND-RNasas.

Por otra parte, se han diseñado diferentes estrategias para mejorar la selectividad de las ND-RNasas que han consistido en fusionarlas con diferentes tipos de señales de exportación nuclear (NES) regulables por fosforilación, introducidas en el extremo N- o C-terminal de las ND-RNasas. En células tumorales, las cuales sobreexpresan aquellas quinasas que pueden fosforilar una Thr adyacente al NES, las ND-RNasas deberían quedar retenidas en el núcleo, mientras que en células tumorales deberían de ser redirigidas al citoplasma. Esta estrategia también se ha llevado a cabo fusionando una ND-RNasa con una variante de la apoptina, (H₆-ApopΔProΔLeu). La apoptina es una proteína viral que presenta selectividad para células

tumorales en parte debida a su retención en el núcleo también por un mecanismo de fosforilación. Del conjunto de construcciones ninguna presentó una selectividad significativamente superior respecto a las proteínas parentales probablemente debido a que las secuencias de los NES no eran funcionales en el entorno proteico.

SUMMARY

The Protein Engineering research group has previously developed nuclear-directed human pancreatic ribonuclease variants (ND-RNases) in order to obtain non-genotoxic antitumoral drugs that can be used either alone or as complements of present antitumoral drugs. These ND-RNases possess one or more nuclear localization signals (NLS) that direct them to the cell nucleus, where does not exist any mechanisms to inhibit their activity. PE5 and NLSPE5 are the ND-RNases that exhibit higher cytotoxicity over a panel of tumor cell lines.

In this work, we have studied the selectivity of PE5 and NLSPE5 for tumor cells. We have determined the cytotoxicity of both ND-RNases on four non-tumor cell lines (HaCaT, CCD-18Co, HEK-293 and IBR.3.G) and we have compared it with that obtained for treated tumor cell lines. Moreover, we have studied the molecular mechanisms triggered by both ND-RNases in the CCD-18Co cell line. We have measured their effects on the cell cycle distribution and on the cell-death mechanisms, i.e. the activation of caspases and the expression of several apoptosis- and cell cycle-related proteins. The results show that both RNases are cytotoxic for non-tumor cells only at high concentrations. In addition, cytotoxicity does not change the cell cycle phase distribution in contrast to what is observed for treated tumor cells. Cell death is produced through apoptosis by activation of procaspases-3, -8 and -9. The expression pattern of cell-cycle and apoptosis related proteins differ from that induced in tumor cells. In non-tumor cells stands out an increase on p27^{KIP1} expression level, and to a lesser degree an increase of p21^{WAF1/CIP1}, as responsible for the selectivity of the ND-RNases.

On the other hand, we have designed different strategies in order to improve the selectivity of these ND-RNases, which have consisted in fusing them to different nuclear export signals (NES) that are controlled by phosphorylation introduced at N- or C-terminus of the ND-RNases. Thus, ND-RNases stay in the nucleus in tumor cells that overexpress those kinases that can phosphorylate a Thr residue adjacent to the NES, while they are redirected to the cytoplasm in non-tumor cells. This strategy has been also achieved fusing a ND-RNase with an apoptin variant, (H₆-ApopΔProΔLeu). Apoptin is a viral protein with antitumor activity selective for tumor cells. This selectivity is partially due to its nuclear retention promoted by a residue phosphorylation that invalidates a nuclear export sequence. Any of the constructs presented selectivity for cancer cells higher than the parental enzymes possibly because the NES was not functional in the environment of the proteins.

I. INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

El càncer és un procés caracteritzat per un creixement cel·lular descontrolat, independent dels teixits del seu voltant i dels factors que controlen la proliferació cel·lular presentant capacitat d'enlair i disseminar-se per qualsevol teixit o òrgan, en un mecanisme anomenat metàstasi. Té el seu origen en una sola cèl·lula i la transformació d'una cèl·lula no tumoral a tumoral és un procés multifàsic que requereix que tinguin lloc una sèrie d'alteracions, que són el resultat de la interacció de factors genètics, físics, químics i biològics.

El càncer és una de les principals causes de mort a tot el món. Per aquest motiu, combatre el càncer és un dels grans reptes de la medicina moderna. La principal línia d'actuació contra el càncer és la cirurgia, en aquells casos que és possible, complementada amb la quimioteràpia. Molts agents quimioterapèutics utilitzats per combatre el càncer són agents que tenen com a diana el DNA, ja que les cèl·lules tumorals, en comparació amb les cèl·lules no tumorals, són més propenses a acumular danys en el DNA a causa de la seva major taxa de replicació i dels déficits tant en els punts de control del cicle cel·lular com de la maquinària de reparació del DNA. No obstant això, molts dels agents quimioterapèutics que s'estan utilitzant estan limitats per un escàs índex terapèutic, toxicitats significatives o per l'adquisició de resistències. Així mateix, després de 10-15 anys d'un tractament quimioterapèutic poden aparèixer càncers secundaris que no tenen cap relació amb el càncer primari, la qual cosa és conseqüència de la genotoxicitat dels agents antitumorals emprats.

És per aquest motiu que hi ha un gran interès en desenvolupar fàrmacs més selectius que no danyin el DNA. Durant les dues últimes dècades, el tractament del càncer ha evolucionat des d'agents citotòxics no específics fins a la terapèutica basada en mecanismes més selectius que no afecten el DNA. Algunes alternatives són la utilització d'anticossos lligats a entitats tumoricides com radionúclids o toxines, els quals s'uneixen selectivament a antígens associats a tumors presents a la superfície cel·lular [1]. No obstant això, el principal problema d'aquestes construccions és l'elevada toxicitat d'aquestes toxines així com la immunogenicitat que provoquen per ser proteïnes foranies [2].

Una alternativa com a substituïts de la quimioteràpia clàssica és la utilització de molècules que interfereixin en la funció de l'RNA, com és el cas de les ribonucleases (RNases). La interferència en el metabolisme de l'RNA permet interrompre el flux d'informació entre el genoma i les proteïnes, sense que es provoquin danys permanents en el DNA.

1.1. Les ribonucleases com a agents antitumorals

Les RNases constitueixen un grup d'enzims extremadament heterogeni, tant pel que fa a l'estructura com per la funció biològica que realitzen. Catalitzen el trencament d'enllaços fosfodièster en l'RNA, i es troben presents en tots els éssers vius. Les funcions de les RNases no només es limiten a la degradació de l'RNA, sinó que algunes d'elles presenten altres funcions biològiques especials, com ara la maduració cel·lular, la mort cel·lular, la defensa contra infeccions parasitàries o microbianes, l'angiogènesi o la resposta immunològica contra virus [3].

D'entre aquestes propietats especials, en destaca sobretot l'activitat citotòxica selectiva per a cèl·lules tumorals que presenten alguns membres de la superfamília de les RNases pancreàtiques. Els membres d'aquesta família no tenen especificitat per a la seqüència d'RNA a degradar, però sí que mostren preferència pels nucleòtids de pirimidina en la posició 3' en relació a l'enllaç fosfodièster que s'ha de trencar [4].

La base molecular del mecanisme de citotoxicitat de les RNases no es coneix del tot. Perquè una RNasa esdevingui citotòxica s'han de donar una sèrie de requisits. Primer, l'RNasa ha de ser estable a temperatura fisiològica [5]. En segon lloc, ha d'interaccionar amb la membrana cel·lular, ser endocitada i al llarg d'aquesta via ser translocada al citosol, abans que arribi a lisosomes per evitar la seva degradació. La translocació a citoplasma es pot afavorir conjugant la proteïna amb lligands com la transferrina, factors de creixement que tinguin receptors a membrana o anticossos contra proteïnes de membrana [6]. En tercer lloc, ha de ser activa i capaç de degradar l'RNA cel·lular en el citoplasma. Per això, l'RNasa ha d'evitar la inhibició per part de l'inhibidor d'RNases (RI) [5]. L'RI es troba present en el citosol de totes les cèl·lules de mamífers i actua protegint la cèl·lula de potencials entrades d'RNases extracel·lulars al citosol [7]. L'RI s'uneix estequiòmicament a diferents membres de la família de les RNases pancreàtiques, amb una relació estequiòmica d'1:1, inhibint-ne l'activitat. La inhibició es produeix perquè alguns dels residus de l'RNasa que són importants pel reconeixement de l'RI també estan involucrats en l'activitat catalítica de l'enzim [8]. Així doncs, la potència d'una RNasa com a agent citotòxic dependrà de la capacitat per superar cadascuna d'aquestes etapes mantenint la seva activitat i estabilitat [9, 10].

1.1.1. Ribonucleases antitumorals naturals

D'entre els membres de la superfamília de les RNases pancreàtiques amb activitat antitumoral, en destaquen sobretot la ribonucleasa de semen de bou (BS-RNasa), l'onconasa, les amfinases de *Rana pipiens* i les lectines de *Rana japonica* i de *Rana catesbeiana* (jSBL i cSBL).

1.1.1.1. BS-RNasa

La BS-RNasa és una proteïna homodimèrica que presenta activitat antitumoral, aspermatogènica i immunosupressiva [11-17]. Les dues subunitats estan unides mitjançant dos enllaços disulfur entre la Cys31 d'una subunitat amb la Cys32 de l'altra subunitat i per enllaços no covalents. Existeixen dues formes quaternàries diferents que coexisteixen, anomenades MxM i M=M [18]. En la forma MxM, es produeix un intercanvi dels dominis N-terminals d'una subunitat cap a l'altra, mentre que en la forma M=M cada subunitat conserva els seus propis dominis N-terminals (revisat a [19]).

S'ha demostrat que les propietats antitumorals de la BS-RNasa depenen de la seva dimerització [20], ja que aquesta conformació evita la seva unió a l'RI per impediment estèric [21], i així pot conservar l'activitat ribonucleolítica. El mecanisme de citotoxicitat per a cèl·lules tumorals no es coneix del tot. Tot i això, s'ha descrit que la BS-RNasa entraria a la cèl·lula per endocitosi i progressaria a través de la xarxa del trans Golgi on, en algun moment, es translocaria al citosol [22]. Una vegada al citosol, la BS-RNasa degradaria l'rRNA, inhibint la síntesi proteica i, per tant, induiria la mort cel·lular. En contraposició, sembla que en cèl·lules no tumorals aquest procés es veuria bloquejat en algun punt de la ruta intracel·lular prevenint la seva arribada al citosol [23]. Un fet interessant és que s'ha localitzat BS-RNasa en el nuclèol de les cèl·lules tumorals SVT2 i HT29 però no en cèl·lules no tumorals 3T3 [23, 24], fet que ha portat a plantejar la hipòtesi que la BS-RNasa té efectes proapoptòtics perquè indueix la degradació de la subunitat RNA de la telomerasa humana hTR [24].

1.1.1.2. Onconasa

L'onconasa, també anomenada ranpirnasa (nom comercial) o P30 (nom inicial), és una RNasa d'amfibi que es troba present tant en embrions primerencs com en oòcits no fecundats de la granota lleopard *Rana pipiens* [3, 25-31] la qual presenta activitat antitumoral *in vivo* [32], a més d'activitat aspermatogènica, embriotòxica i immunosupressora [33]. Es tracta d'una proteïna formada per una sola cadena polipeptídica [34] que pertany a la superfamília de les

INTRODUCCIÓ

RNases pancreàtiques, de les quals l'RNasa A n'és el paradigma [35]. Una característica important és la seva extraordinària estabilitat conformacional, deguda a la seva estructura altament compacta i a la presència de quatre ponts disulfur intracatenaris, la qual és crítica per a la seva activitat citotòxica [34, 36].

L'onconasa, atès que presentava una potent activitat antitumoral d'ampli espectre contra càncers tals com el de cèrvix, de mama, còlon, pancreàtic, d'ovari i de pròstata, va ser considerada inicialment com una bona candidata per esdevenir un fàrmac antitumoral. De fet, es tracta de la primera RNasa en entrar a assajos clínics. Va superar amb èxit la fase I, on es va determinar la dosi òptima tolerada per tractar tumors sòlids [37]. Posteriorment en la fase II, es va assajar en pacients amb càncer de pulmó de cèl·lules petites [38], càncer de cèl·lules renals [39], càncer de mama [40] i mesotelioma maligne [41]. El fet que l'onconasa provoqués una disminució de la progressió del mesotelioma maligne va justificar els estudis posteriors en fase III per a aquesta classe de tumor. En la part inicial d'aquesta fase, el tractament amb l'onconasa s'associava a una supervivència superior en comparació amb el tractament amb doxorubicina [42, 43]. Tot i ser poc immunogènica en humans [44], l'onconasa va presentar una elevada toxicitat renal a elevades concentracions, encara que reversible en discontinuar el tractament [45], fet que podria estar relacionat amb la seva elevada estabilitat que la protegiria de la proteòlisi [34]. Malgrat que els resultats obtinguts eren prometedors i la proteïna ja estava en la fase confirmatòria IIIb, Alfacell Corporation (avui Tamir Biotechnology, www.tamirbio.com) va interrompre els assajos en considerar la Food and Drug Administration (FDA) que l'onconasa no millorava la supervivència global dels pacients tractats de manera rellevant [46]. No obstant això, l'onconasa manté l'estatus de fàrmac orfe pel tractament del mesotelioma maligne no operable [43, 47]. Actualment s'està assajant l'onconasa en altres tipus de càncer, com per exemple en el tractament conjunt amb la gemcitabina de l'adenocarcinoma pancreàtic humà [48]. Per altra banda, l'onconasa combinada amb pemetrexed i carboplatí es troba en fase II d'assajos clínics per al tractament del càncer de pulmó de cèl·lules petites. També està sent testada en assajos preclínic contra virus patogènics com el virus del dengue, el virus de la febre groga, el coronavirus SARS, el citomegalovirus (CMV) i el virus del papil·loma humà [49].

Existeix una controvèrsia sobre com entra l'onconasa dins la cèl·lula. Mentre que uns estudis afirmen l'existència de receptors d'alta i baixa afinitat de l'onconasa a la superfície cel·lular [50, 51], altres estudis contradiuen la seva existència [52]. S'ha suggerit que l'onconasa, gràcies a la seva naturalesa catiònica, s'uneix a la superfície cel·lular mitjançant interaccions electrostàtiques [53, 54]. Després d'unir-se a la membrana, l'onconasa és

INTRODUCCIÓ

internalitzada per endocitosi. Una vegada translocada al citosol [50], degrada l'RNA cel·lular, ja que evadeix completament l'acció de l'RI [7, 55]. De fet, la constant de dissociació del complex format per l'onconasa i l'RI és aproximadament 10^7 vegades més gran que la del complex format entre l'RI i l'RNasa A [56]. A més, l'onconasa evadeix completament l'acció de l'RI *in vivo*, ja que s'ha vist que ni incrementant [7] ni silenciant [57] els nivells d'RI s'afecta la seva citotoxicitat. Un cop ha internalitzat dins la cèl·lula, s'ha descrit que l'onconasa degrada preferentment els tRNAs, deixant pràcticament intactes tant l'rRNA com l'mRNA [58], la qual cosa inhibeix la síntesi proteica i provoca la mort cel·lular per apoptosi [59, 60]. No obstant això, cada vegada hi ha més evidències que la degradació dels tRNAs i la inhibició de la síntesi proteica no són les úniques causes d'inducció de l'apoptosi [60-62]. Estudis recents han demostrat que l'onconasa regula l'expressió de miRNA en línies cel·lulars tumorals de mesotelioma pleural maligne (H2959, H2373 i H2591) i conclouen que l'onconasa controlaria la proliferació cel·lular, la invasió, la migració i l'apoptosi a través de la modulació dels miRNA [63] o dels seus precursors [64].

Els efectes de l'onconasa difereixen en funció del tipus cel·lular. En cèl·lules HeLa, l'onconasa induïx l'activació de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK) seguida de l'activació de la caspasa 9, la qual activa les caspases executores 3 i 7. En aquesta línia no intervé la caspasa 8 [65]. En canvi, no hi ha diferències d'expressió de JNK en la línia cel·lular NCI/ADR-RES [66]. La diferència podria raure en el fet que la funció de JNK depèn de l'estat de p53 (revisat a [67]), ja que s'ha vist que JNK té un efecte antiapoptòtic en cèl·lules que són p53- (com és el cas de les cèl·lules NCI/ADR-RES [68]), mentre que la funció de JNK és proapoptòtica en cèl·lules p53+ (com és el cas de la línia HeLa [69]). Altres estudis indiquen que en la línia cel·lular de leucèmia HL-60 es produeix l'activació de proteases de serina juntament amb aquestes caspases [70], però en línies cel·lulars de neuroblastoma provoca l'apoptosi independentment de l'activació de les caspases, en un procés similar a l'autofàgia [71]. A més, l'activació de l'apoptosi per l'onconasa és independent de p53 [60], fet que suposa un avantatge a l'hora de tractar cèl·lules tumorals p53 deficientes respecte a molts fàrmacs genotòxics.

També en funció del tipus cel·lular, l'efecte que exerceix l'onconasa sobre el cicle cel·lular és diferent. En diferents tipus cel·lulars l'onconasa atura la proliferació cel·lular a la fase G_0/G_1 del cicle cel·lular [32, 62, 72], però hi ha excepcions. En cèl·lules NIH/3T3 l'atura a la fase G_2/M del cicle [73], mentre que no altera la proporció de cèl·lules a les diferents fases del cicle cel·lular en cèl·lules Jurkat [74] ni en cèl·lules NCI/ADR-RES [66].

INTRODUCCIÓ

Tot i que l'onconasa és selectiva per a cèl·lules tumorals, el mecanisme que expliqui aquest fet es desconeix. S'ha apuntat que les cèl·lules tumorals presenten més càrregues negatives sobre la superfície cel·lular que les cèl·lules no tumorals [75, 76] i que, per tant, la interacció que facilitaria la posterior inducció de l'apoptosi es donaria gràcies a l'atracció entre càrregues negatives (membrana cel·lular) i càrregues positives (onconasa).

1.1.1.3. Amfinases

Després del descobriment de l'onconasa, es va purificar una altra RNasa citotòxica d'oòcits de *Rana pipiens* anomenada amfinasa [77], de la qual se n'han identificat 4 variants. Es tracta d'una RNasa homòloga de la família de les RNases pancreàtiques, és més bàsica que l'onconasa i és la de major pes molecular d'entre totes les RNases de granota. Tot i que l'amfinasa té menys activitat catalítica que l'onconasa, ambdues RNases presenten una citotoxicitat similar [78]. S'ha demostrat que presenta activitat citotòxica i citostàtica per a diferents línies cel·lulars tumorals [77, 78] aturant el cicle cel·lular en la fase G₁ [78].

1.1.1.4. Lectines jSBL i cSBL

A part de l'onconasa i les amfinases, s'han purificat altres RNases d'origen amfibi amb activitat antitumoral, les quals es van obtenir a partir d'oòcits de *Rana japonica* (jSBL) i *Rana catesbeiana* (cSBL). Presenten activitat lectina i s'uneixen a cèl·lules que contenen àcid siàlic a la membrana cel·lular [79, 80]. Ambdues RNases presenten les mateixes peculiaritats estructurals que l'onconasa, incloent la distribució dels quatre ponts disulfur, elevada estabilitat i la presència del residu de piroglutàmic a l'extrem N-terminal. Aquestes dues proteïnes exerceixen la seva activitat citotòxica a través de l'aglutinació de les cèl·lules tumorals en lloc de degradar l'RNA [81].

1.2. Estratègies per aconseguir ribonucleases no naturals citotòxiques

Molts estudis que s'han realitzat amb la finalitat d'utilitzar les RNases com a agents terapèutics s'han centrat en aconseguir el seu alliberament al citosol, compartiment cel·lular que, com ja s'ha dit anteriorment, conté l'RI que és capaç d'unir-se a alguns tipus d'RNases i inhibir la seva activitat. Les RNases pancreàtiques de mamífer són menys immunogèniques i

INTRODUCCIÓ

tenen més activitat ribonucleolítica [82], així com menys toxicitat renal [83] que l'onconasa. L'inconvenient que presenten és que estan fortament inhibides per l'RI (Figura 1.1) i per aquest motiu no són citotòxiques [55].

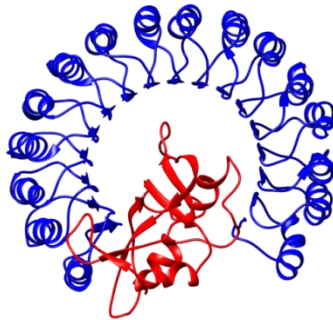


Figura 1.1. Estructura del complex RI-RNasa A. L'inhibidor d'RNases (RI) es mostra en blau i l'RNasa A en vermell (codi pdb 1DFJ [84]). Imatge obtinguda amb el programa Chimera [85].

Per solucionar aquest problema s'han buscat diferents alternatives no excloents basades en l'enginyeria de proteïnes que permetessin a les RNases de mamífer evadir l'acció de l'RI, les quals es detallen a continuació:

1. *Disminució de l'afinitat per l'RI:* les RNases que mostren poca afinitat per l'RI gairebé no es veuen inhibides, essent l'onconasa un exemple paradigmàtic, tal i com s'ha esmentat a l'apartat 1.1.1.2. Per aquest motiu, s'han descrit variants de l'RNasa A i l'RNasa pancreàtica humana (HP-RNasa) que han estat obtingudes per mutagènesi dirigida amb l'objectiu d'impedir la unió a l'RI. Per una banda, s'han canviat els residus que són importants per a aquesta unió per aconseguir impediments estèrics i/o repulsions electrostàtiques [83, 86]. Per altra banda s'ha provocat la dimerització de la proteïna [87-89]. En aquestes variants, la disminució de la constant de dissociació del complex RNasa-RI incrementa la seva activitat citotòxica [90].
2. *Saturació de l'RI:* la concentració d'RI al citosol es troba entre el 0,01-0,1 % de la proteïna total [91]. Si arriba prou quantitat d'RNasa al citosol, les molècules d'RI lliures poden arribar a exhaurir-se, permetent que aquelles noves molècules d'RNasa que arribin al citosol puguin degradar sense impediments l'RNA cel·lular. L'activitat citotòxica d'algunes variants d'RNases, les quals estan unides químicament o genèticament a un lligand associat a tumor i que *in vitro* es veuen inhibides per l'RI, podria explicar-se per aquest mecanisme.

INTRODUCCIÓ

3. *Unió a altres molècules que eviten la captura per l'RI*: el citoplasma és un ambient altament concentrat, per tant, la interacció que es dona *in vitro* no s'ha de produir necessàriament *in vivo*. En tot cas, si les RNases s'uneixen a altres molècules, aquest fet els pot permetre modular la seva unió amb l'RI. Un exemple d'aquesta estratègia és la de dirigir aquestes RNases cap a nucli, compartiment lliure d'RI, en dotar-les d'un senyal de localització nuclear (NLS), establint-se una competència entre les importines i l'RI per unir l'RNasa. Aquests tipus d'RNases, denominades ND-RNases (acrònim de *nuclear directed RNases*), es descriuen a continuació.

1.2.1. PE5

PE5 és una variant de l'HP-RNasa que presenta cinc substitucions a l'extrem N-terminal respecte a l'HP-RNasa (Arg4Ala, Lys6Ala, Gln9Glu, Asp16Gly i Ser17Asn) [92] i incorpora a més dues altres mutacions: Gly89Arg i Ser90Arg [10]. Aquests darrers canvis generen en la seva seqüència tres regions bàsiques, formades per la Lys1 i els clústers d'arginines 31-33 i 89-91, les quals doten a PE5 d'un NLS conformacional bipartit no convencional (Figura 1.2) [93].

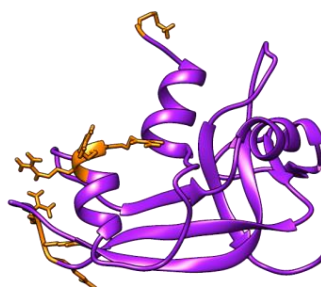


Figura 1.2. Representació esquemàtica de la posició dels residus que formen l'NLS de PE5. Es remarquen en taronja els residus que formen part de l'NLS conformacional bipartit. Imatge obtinguda amb el programa Chimera [85].

Tot i que aquests residus estan repartits per tota la seqüència i es troben separats per més de 90 residus, conformacionalment es troben molt propers en l'espai i la seva disposició topològica recorda a la d'un NLS bipartit. Aquest NLS permet a PE5 unir-se a l' α -importina [93], la qual el dirigeix cap a nucli, i en concret al nuclèol, mitjançant un transport actiu dependent de Ran i GTP [94]. S'ha demostrat que degrada preferentment l'RNA nuclear, deixant l'RNA citoplasmàtic intacte [95] i que la presència d'aquest NLS resulta cabdal tant per al seu transport a nucli [93] com per a la seva activitat citotòxica [95]. Tot i ser una RNasa molt sensible a la inhibició per l'RI, té activitat citotòxica [94] ja que la regió de reconeixement de l' α -importina se solapa amb la regió de reconeixement de l'RI. D'aquesta manera, es

INTRODUCCIÓ

produeix un equilibri entre la forma lliure de PE5 i la forma unida a l'RI o a l' α -importina, establint-se una competència. Com que PE5 escapa molt poc de l'inhibidor [94], hi haurà una quantitat petita de PE5 lliure al citosol, que serà captada per l' α -importina. El segrest en el nucli d'aquesta forma lliure per part de la importina desplaçaria l'equilibri PE5-RI del citosol cap a la forma lliure, permetent de manera progressiva la seva importació a nucli (revisat a [96]) (Figura I.3).

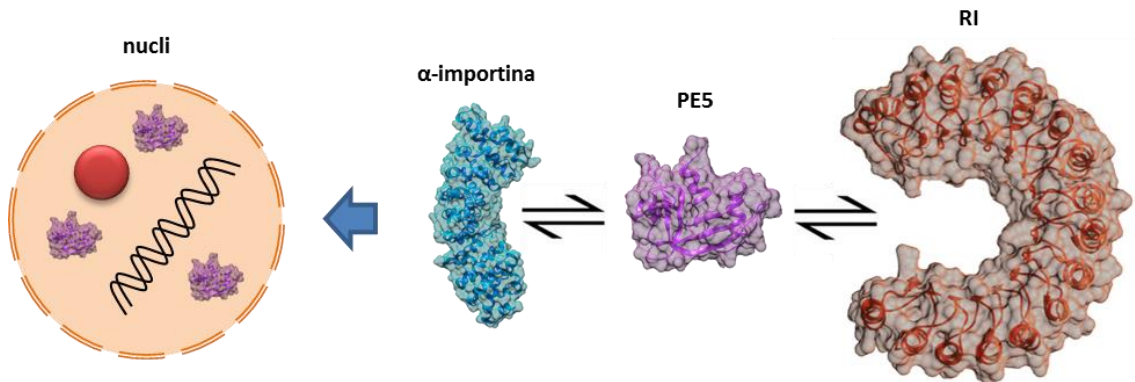


Figura I.3. La citotoxicitat de les ND-RNases és el resultat de la competència entre l'RI i l' α -importina per unir-se a les ND-RNases. Una vegada al citosol, les ND-RNases poden unir-se a l' α -importina o a l'RI. L'afinitat de les RNases per a ambdues proteïnes determinarà amb quina s'unirà principalment. No obstant això, les molècules d'ND-RNases capturades per l' α -importina seran alliberades al nucli i, per tant, al citosol es produeix un desplaçament de l'equilibri que afavoreix la dissociació del complex PE5-RI. Així doncs, les ND-RNases seran transportades progressivament cap al nucli on podran degradar l'RNA nuclear. L'inhibidor d'RNases (RI) es mostra de color taronja (codi pdb IDFJ [84]), PE5 de color lila i l' α -importina de color blau (codi pdb IEE5 [97]). Les diferents estructures s'han obtingut amb el programa Chimera [85].

In vitro PE5 té una citotoxicitat 5-15 vegades menor a la de l'onconasa per a cèl·lules tumorals [66, 94] i en canvi, la seva citotoxicitat sobre cèl·lules no tumorals de fibroblasts, NI, és 20 vegades inferior a la de l'onconasa. Aquests resultats semblen indicar que l'especificitat de PE5 per a les cèl·lules tumorals podria ser com a mínim igual a la de l'onconasa [66]. A diferència de l'onconasa, PE5 té un efecte majoritàriament citotòxic per a cèl·lules tumorals, encara que a baixes concentracions també presenta un mínim efecte citostàtic [66].

S'ha estudiat com PE5 indueix la mort de cèl·lules tumorals NCI/ADR-RES. Aquestes cèl·lules tractades amb PE5 presenten els signes clàssics de mort cel·lular per apoptosi: desestabilització de la membrana cel·lular, formació de cossos apoptòtics, condensació de la cromatina, fragmentació nuclear, translocació de la fosfatidilserina i activació de les caspases 3, 8 i 9 [66]. L'apoptosi induïda per PE5 en aquesta línia cel·lular és independent de Bcl-2 i de Bax [66]. A més, PE5 també indueix apoptosi a través de la sobreexpressió p21^{WAF/CIP1} i la subfosforilació de la forma p46 de JNK [66]. En aquest cas, p21^{WAF/CIP1} actua com un inhibidor

INTRODUCCIÓ

no enzimàtic de les proteïnes quinases activades per estrès (SAPKs)/JNKs [98]. S'ha vist que en funció de l'estat de p53 [67] JNK pot promoure la supervivència cel·lular, ja que intervé en la proliferació, transformació cel·lular i progressió tumoral o bé pot estar involucrada en l'apoptosi. Així doncs, en cèl·lules tumorals NCI/ADR-RES PE5 actua a través de p21^{WAF1/CIP1}, inhibint JNK i activant l'apoptosi [66].

La progressió del cicle cel·lular es veu aturada durant l'apoptosi induïda per PE5 [66]. En NCI/ADR-RES, PE5 promou l'acumulació de cèl·lules en les fases del cicle cel·lular S i G₂/M, efecte que ve acompanyat d'una disminució del nombre de cèl·lules en la fase G₀/G₁ [66]. Per tant, o bé PE5 atura el cicle en les fases S i G₂/M, o bé mata preferentment les cèl·lules que es troben en la fase G₀/G₁. Aquests canvis en el cicle cel·lular vénen lligats a la sobreexpressió de la ciclina E i de p21^{WAF1/CIP1} [66]. Per una banda, la ciclina E és pròpia de la fase G₁ i promou l'entrada a la fase S a través de la unió a CDK2. En estudis previs d'altres grups s'ha vist un increment dels nivells de ciclina E després d'una aturada del cicle en fase S o G₂/M [99, 100]. Per altra banda, p21^{WAF1/CIP1} també actua d'inhibidor dual de quinases dependents de ciclines (CDKs) [101] i de l'antigen nuclear de proliferació cel·lular [102]. Relacionat amb això, altres estudis han demostrat que una sobreexpressió de p21^{WAF1/CIP1} genera una aturada del cicle cel·lular en fase G₁, G₂ [103] o S [104]. Per tant, l'augment de l'expressió de la ciclina E i p21^{WAF1/CIP1} en cèl·lules NCI/ADR-RES tractades amb PE5 explicaria perquè hi ha una major acumulació d'aquestes cèl·lules en les fases S i G₂/M.

Així mateix, s'ha observat que en cèl·lules multiresistents a fàrmacs antitumorals (cèl·lules MDR), com ara les línies NCI/ADR-RES i NCI-H460/R, PE5 és citotòxica, i a més, és capaç de reduir la quantitat de P-glicoproteïna (P-gp) acumulada [105]. També s'ha demostrat que PE5 és sinèrgica amb la doxorubicina en cèl·lules NCI/ADR-RES [105]. La P-gp és una glicoproteïna situada a la membrana cel·lular que pertany a la família dels transportadors ABC (*ATP binding cassette transporters*) i pot expulsar de l'interior cel·lular un ampli espectre de fàrmacs antitumorals donant lloc a l'aparició del fenotip MDR. S'ha postulat que la reducció de P-gp induïda per PE5 podria estar relacionada amb la disminució observada de la fosforilació de JNK [66], que al seu torn podria disminuir l'expressió del gen de la P-gp (*mdr1*). La relació entre JNK i P-gp es troba en el fet que JNK fosforila i activa c-Jun, que juntament amb c-Fos, formen el factor de transcripció AP-1, el qual pot unir-se al promotor de *mdr1* [106].

Un dels avantatges que presenten les RNases és que els seus efectes són pleiotròpics, això vol dir que poden interferir en múltiples vies i processos biològics. Precisament a causa d'aquests efectes tan diversos és difícil establir un mecanisme de citotoxicitat per a les RNases

INTRODUCCIÓ

antitumorals. Tot i això, estudis realitzats mitjançant microarrays de cDNA humà per determinar el patró d'expressió gènica de cèl·lules NCI/ADR-RES tractades amb PE5 han mostrat que s'indueix l'expressió diferencial de 647 gens, els quals s'agrupen en diferents categories en fer una anàlisi d'ontologia gènica [107, 108]. D'aquestes categories, les més importants per explicar el mecanisme de citotoxicitat exercit per PE5 són metabolisme de lípids i carbohidrats, resposta a l'estrès i adhesió i migració cel·lular. PE5 disminueix especialment l'expressió de gens que formen part de rutes metabòliques que es troben desregulades en les cèl·lules tumorals (glucòlisi, síntesi i degradació de lípids i vies de síntesi d'aminoàcids). Aquesta disminució ve ajudada per la subexpressió d'oncogens i sobreexpressió de gens supressors de tumors que actuen sobre l'expressió dels gens que codifiquen pels enzims de les rutes metabòliques de les biomolècules esmentades [107, 108]. Així mateix, PE5 incrementa l'expressió de gens involucrats en l'eliminació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i disminueix l'expressió de gens associats a l'adquisició de resistència a múltiples fàrmacs (MDR) [107, 108]. Aquests resultats concorden amb les dades obtingudes a partir de l'estudi d'expressió dels miRNAs en cèl·lules tractades amb PE5 on s'ha vist que aquest potencial fàrmac provoca la disminució de l'expressió de miRNAs relacionats amb el desenvolupament i progressió del tumor, amb la quimioresistència i amb el descontrol del metabolisme. Aquests canvis en els miRNAs, juntament amb els canvis d'expressió dels mRNAs, explicarien el mecanisme de citotoxicitat de PE5 [107].

1.2.2. NLSPE5 i PE10

A partir de PE5 s'han construït noves ND-RNases per millorar-ne les propietats. Per aconseguir que un fàrmac antitumoral pugui ser utilitzat amb finalitats terapèutiques, és desitjable que a banda de ser selectiu per a les cèl·lules tumorals generi la mínima resposta immunològica.

Per disminuir la immunogenicitat de PE5 es va construir PE10, una variant en la qual es van revertir tres canvis introduïts a l'extrem N-terminal de l'HP-RNasa (posicions 9, 16 i 17), els quals no participen en la formació de l'NLS [109]. Aquesta nova variant té la mateixa citotoxicitat, estabilitat tèrmica, eficiència catalítica i habilitat per evadir l'RI que PE5 [109]. PE10 presenta una seqüència molt més propera a l'HP-RNasa conservant les mateixes propietats que PE5.

Per augmentar la citotoxicitat de PE5, es va decidir incrementar la seva eficiència d'entrada a nucli a través de la inserció d'una nova seqüència NLS a l'extrem N-terminal [109].

INTRODUCCIÓ

La seqüència NLS escollida va ser la de l'antigen T gran del virus SV40, la qual se sabia que s'unia de manera eficient a l' α -importina [110]. La nova variant, anomenada NLSPE5, és deu vegades més citotòxica que PE5 [109]. Tot i que *in vitro* escapa lleugerament de l'RI, *in vivo*, molt probablement, queda inhibida ja que és incapaç de degradar l'RNA citosòlic [109], fet que també demostra que la seva citotoxicitat depèn de la capacitat de degradar l'RNA nuclear [109]. S'ha pogut comprovar que els efectes d'NLSPE5 sobre les cèl·lules tumorals són anàlegs als de PE5 en la línia cel·lular NCI/ADR-RES. En aquesta línia, NLSPE5 indueix un increment de dues vegades els nivells de p21^{WAF1/CIP1} i ciclina E, deixant la ciclina D₁ inalterada [109]. Així mateix, la proporció de cèl·lules apoptòtiques primerenques i tardanes a diferents temps d'incubació és del mateix ordre que PE5 [109]. Finalment, NLSPE5 activa les procaspases 3, 8 i 9, seguint el mateix patró que PE5 [109].

1.3. Apoptina

L'apoptina és una proteïna petita codificada en el genoma del virus de l'anèmia del pollastre (CAV, sigles en anglès de *chicken anemia virus*), el qual pertany a la família *Circoviridae* del gènere *Gyrovirus*.

El genoma de CAV conté tres marcs de lectura solapats que donen lloc a un RNA policistrònic que codifica per a tres proteïnes diferents [111-114], les quals s'expressen en cèl·lules infectades pel CAV [113, 114]. VP1 correspon la proteïna de 51 kDa que constitueix la càpsida viral [115]. VP2 és una fosfatasa de 24 kDa, la qual es creu que intervé en el procés de replicació viral [116] i en l'assemblatge de la càpsida viral [117]. VP3 o apoptina és una proteïna de 14 kDa i que no té una funció clara. S'ha vist que l'apoptina indueix la mort cel·lular en diversos tumors humans [118, 119]. Aquesta citotoxicitat és selectiva per a cèl·lules tumorals [120], ja que l'apoptina provoca la mort cel·lular en més de 70 línies cel·lulars tumorals, d'entre les quals es troben línies de tumors humans com per exemple el melanoma, hepatoma, limfoma, etc., mentre que les cèl·lules no tumorals, tals com les endotelials, hepatòcits o cèl·lules mare hematopoètiques, sembla que no es veuen afectades [118, 119].

1.3.1. Estructura primària

L'apoptina està formada per 121 aminoàcids i no presenta homologia de seqüència amb cap altra proteïna coneguda [112]. L'extrem C-terminal conté un NLS bipartit: l'NLS1 comprèn

INTRODUCCIÓ

els residus 82-88 i l'NLS2 els residus 111-121 [121, 122]. A més, presenta un senyal d'exportació nuclear (NES) reconegut per l'exportina 1 (CRM1) [123, 124] format pels residus 97-105 (Figura 1.4). L'apoptina presenta un lloc de fosforilació (Thr108) adjacent al NES el qual regula la seva funcionalitat. L'extrem N-terminal presenta una seqüència rica en leucines (LRS) que abasta els residus 33-46, la qual està involucrada en l'acumulació nuclear [123] i en la multimerització de l'apoptina, així com en la interacció amb altres proteïnes [118, 125]. És interessant destacar que l'apoptina pot formar multímers globulars compostos per 30-40 monòmers units per enllaços no covalents a través del domini de multimerització present en l'extrem N-terminal [126, 127] (Figura 1.4).

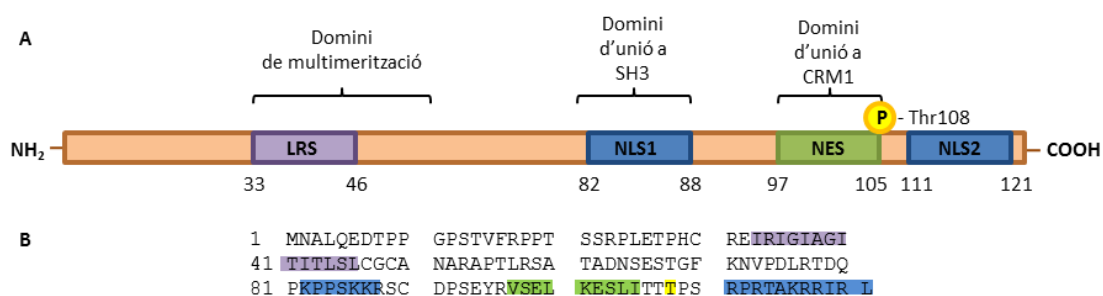


Figura 1.4. Estructura primària de l'apoptina. **A.** Es veuen representats els dominis clau de l'apoptina: LRS (seqüència rica en leucines), NLS1 i NLS2 (senyal de localització nuclear bipartit), NES (senyal d'exportació nuclear), lloc de fosforilació Thr108, així com un domini d'unió a SH3. **B.** Seqüència de l'apoptina amb indicació dels residus que formen els dominis esmentats abans.

1.3.2. Mecanisme d'inducció de l'apoptosi

La selectivitat per a cèl·lules tumorals de l'apoptina és depenent de la seva localització subcel·lular. L'apoptina en cèl·lules tumorals es troba al nucli, mentre que en cèl·lules no tumorals es troba majoritàriament en el citosol [121]. Diferents dades experimentals indiquen que aquesta localització depèn de l'NLS bipartit i del NES que es pot inactivar per la fosforilació de la Thr108. Aquesta fosforilació sembla impedir el reconeixement del NES per part de CRM1 [121-123]. El NES és inactiu només en cèl·lules tumorals, ja que la fosforilació de la Thr108 depèn de la presència de determinades quinases que es troben sobreexpressades només en cèl·lules tumorals [121, 122]. Atès que en cèl·lules no tumorals el NES és actiu, tot i l'entrada d'apoptina al nucli, aquesta és enviada de nou al citoplasma [123] on és degradada pel proteasoma [123, 125, 128]. S'han descrit dues quinases implicades en aquest procés, CDK2 [124] i PKC β [129], que fosforilen específicament la posició 108 adjacent al NES.

INTRODUCCIÓ

Alguns estudis han mostrat que la substitució de la Thr108 per altres residus no afecta en gran mesura la localització de la proteïna al nucli en cèl·lules tumorals [130]. Tot i això, s'ha descrit que la funció de la Thr108 pot ser assumida per alguna de les treonines en les posicions 106 i 107 [131]. Per altra banda, s'ha demostrat que aquesta proteïna presenta dos dominis inductors de l'apoptosi, on el domini N-terminal (residus 1-69) és independent de la fosforilació per generar apoptosi [121]. Així doncs, la fosforilació de la Thr108 seria necessària només per a la inducció d'apoptosi per part del domini C-terminal (residus 70-121) [121, 122, 130]. Tanmateix, l'apoptosi exercida per cada domini per separat és menys potent que la de l'apoptina sencera [121].

1.3.3. Estratègies per millorar l'eficiència d'internalització de l'apoptina en cèl·lules tumorals

Gràcies a la capacitat de matar selectivament les cèl·lules tumorals, s'han realitzat múltiples estudis per tal d'usar l'apoptina com a fàrmac antitumoral (revisat a [131, 132]). Tanmateix, la seva entrada eficient en cèl·lules tumorals segueix sent un repte, sobretot per la seva tendència a formar agregats.

Actualment, la utilització de vectors virals és el mètode més utilitzat per introduir l'apoptina a l'interior cel·lular. Per exemple, la transfecció del gen de l'apoptina mitjançant vectors adenovirals inhibeix la progressió del tumor en models murins [133]. De totes maneres, l'elevada resposta immunològica enfront dels adenovirus [134, 135] fa que aquesta estratègia no sigui la més indicada per ser aplicada en clínica. També s'han desenvolupat mètodes no virals, a través de la utilització de soques bacterianes [136, 137], o bé per injecció intratumoral [138] o per electroporació [139]. Malgrat tot, una expressió temporal com a conseqüència d'aquests mètodes disminueix la seva eficiència. A més, aquest tipus d'estratègia implica la mutagènesi per inserció en les cèl·lules transfectades.

Per últim, s'ha plantejat que una manera alternativa per tal que l'apoptina pugui entrar dins les cèl·lules sigui en la forma proteica, fusionant-la a una proteïna que li permeti travessar la membrana cel·lular. Un exemple és la fusió del domini 4 de la proteïna de transducció (PTD4) a l'apoptina, la qual *in vivo* inhibeix la progressió de diferents tipus de tumors xenoinplantats sense afectar cèl·lules no tumorals malgrat que també s'hi localitza la proteïna [140]. A més, PTD4-apoptina és sinèrgica amb altres agents quimioterapèutics com la dacarbacina [141]. Tot i això, com ja s'ha dit anteriorment, l'apoptina salvatge té una enorme capacitat de formar agregats, fet que dificulta no només la seva internalització, sinó també la

INTRODUCCIÓ

purificació. Per aquest motiu, Ruiz-Martínez i col·laboradors del nostre grup de recerca han dissenyat una variant soluble de l'apoptina, anomenada H₆-ApopΔProΔLeu, a la qual se li han eliminat els residus 1-43 creant d'aquesta manera una variant de l'apoptina que manté pràcticament les mateixes propietats citotòxiques que l'apoptina salvatge, tant si és administrada a través d'un sistema de transfecció o exògenament (Ruiz-Martínez et al. enviat a publicació). A més, s'ha demostrat que H₆-ApopΔProΔLeu és una proteïna IDP (*intrinsically disordered protein*) i, per tant, es tracta d'una proteïna desestructurada (Ruiz-Martínez et al. enviat a publicació).

2. OBJECTIUS

OBJECTIUS

En el camp de la biomedicina i dins del desenvolupament d'agents antitumorals, és important obtenir fàrmacs citotòxics que siguin selectius per a cèl·lules tumorals, però és tant o més important conèixer els mecanismes responsables d'aquest fet. En base a aquest coneixement, es poden establir els fonaments que serviran, en un futur, per obrir noves vies al desenvolupament de fàrmacs més selectius i que generin menys resistències. Les RNases són potencialment citotòxiques per la capacitat de degradar l'RNA amb el consegüent silenciament de l'expressió gènica i, per tant, de la inducció de la mort cel·lular. Tanmateix, moltes de les RNases pancreàtiques naturals no manifesten activitat citotòxica de manera natural. L'HP-RNasa ha sigut proposada com a candidata a ser modificada per esdevenir fàrmac antitumoral a causa: i) del seu origen humà, que permet pensar en una baixa immunogenicitat, ii) de presentar *in vivo* una retenció renal menor i tenir mil vegades més activitat ribonucleolítica que altres RNases citotòxiques com l'onconasa. Una de les estratègies de modificació utilitzades per dotar de citotoxicitat l'HP-RNasa ha estat la introducció en la seva seqüència d'un senyal de localització nuclear (NLS) aconseguint les anomenades RNases dirigides a nucli (ND-RNases). Les més estudiades han sigut PE5 i NLSPE5.

Els dos objectius principals d'aquest treball han sigut:

1. Analitzar la selectivitat de PE5 i NLSPE5 per a línies cel·lulars tumorals.
2. Incrementar aquesta selectivitat fusionant a RNases citotòxiques (PE5 i PE10) determinants que permetin retenir-les al nucli de les cèl·lules tumorals i alliberar-les al citosol en les no tumorals on haurien de ser inhibides.

Per aconseguir aquests objectius s'han proposat els següents subobjectius:

1. Determinar quins mecanismes moleculars són responsables de la inducció de mort cel·lular en línies cel·lulars no tumorals tractades amb PE5 o NLSPE5 i comparar-los amb els que es donen en les línies tumorals tractades amb les mateixes proteïnes.
2. Construir un conjunt de variants de PE5 i PE10 que cadascuna d'elles incorpori, a l'extrem N- o C-terminal, una combinació entre un senyal d'exportació nuclear i una diana de fosforilació reconeguda per quinases sobreexpressades en cèl·lules tumorals. La finalitat serà identificar parelles NES/diana que facin que el NES sigui regulable per fosforilació. Aquests NES seran actius en cèl·lules no

OBJECTIUS

tumorals desplaçant l'ND-RNasa fora del nucli i inactius en cèl·lules tumorals permetent la seva acumulació al nucli.

3. Construir una proteïna de fusió entre PE10 i una variant soluble de l'apoptina, amb la finalitat de situar la seva seqüència NES juntament amb el lloc de fosforilació en el context proteic en què es troben dins la proteïna sencera tal i com es dona de manera natural, per tal de dotar la nova ND-RNasa de la selectivitat de l'apoptina.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. Material biològic

3.1.1. Soques bacterianes

3.1.1.1. *Escherichia coli* DH5 α

Aquesta soca ha sigut utilitzada en tots els processos de clonatge ja que presenta una elevada taxa de transformabilitat, a més del genotip *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, atès que ha d'estar metilat a la seqüència reconeguda per l'enzim de restricció *DpnI* [142].

Genotip: *F-, ϕ 80 Δ lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-, mk+), phoA, supE44, λ -, thi-1, gyrA96, relA1*

3.1.1.2. *Escherichia coli* BL21(DE3)

S'ha usat aquesta soca per a l'expressió de les diferents proteïnes recombinants que s'expressen sota el control del promotor de l'RNA polimerasa de T7. La soca 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, i per tant, el profag DE3 no es pot escindir del genoma ni tornar-se a integrar, de manera que roman com a lisogen estable. El profag DE3 conté el promotor *lacUV5*, un fragment inicial del gen *lacZ* i el gen que codifica per l'RNA polimerasa de T7. En aquestes condicions, l'únic promotor capaç d'induir la transcripció de l'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 l'RNA polimerasa de T7, la qual transcriu el gen que ha estat clonat darrera del promotor reconegut per aquesta polimerasa [143].

Genotip: *F-, ompT-, hsdS(rB- mB-), dcm+, gal, λ (DE3), lon-*

3.1.1.3. *Escherichia coli* Rosetta™ 2(DE3)

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 a set tRNAs que reconeixen set codons de baixa freqüència d'ús a *E. coli* (AGA, AGG, AUA,

CUA, GGA, CCC i CGG), però comuns en cèl·lules eucariotes. Aquesta soca permet augmentar els nivells d'expressió de proteïnes, el gen de les quals presenta aquests codons [144]. El vector pRARE incorpora un gen de resistència a cloramfenicol com a marcador de selecció. Aquesta soca va ser utilitzada per millorar l'expressió del mutant PE10_HIV_CDK2.

Genotip: F-, *ompT*, *hsdSB*(rB- mB-), *dcm*, *gal*, λ (DE3), pRARE (CamR)

3.1.2. Vectors

3.1.2.1. pONC

pONC és un vector derivat del plasmidi pET22b(+) que porta clonat el gen de l'onconasa fusionada a la seqüència senyal pelB d'exportació periplasmàtica [86].

3.1.2.2. pM5

Aquest plasmidi porta clonat un gen el qual és un híbrid format a partir dels gens de la BS-RNasa (residus 1 a 20) i l'HP-RNasa (residus 21 a 128) [92]. Com a resultat, el gen de la variant, anomenada PM5, de l'HP-RNasa presenta cinc mutacions: Arg4Ala, Lys6Ala, Gln9Glu, Asp16Gly and Ser17Asn. El gen de PM5 es troba flanquejat a l'extrem 5' per un fragment del plasmidi pET17 i per un fragment del plasmidi pET22 a l'extrem 3'.

3.1.2.3. pE5

pE5 és un vector derivat de pET17b que conté una variant de PM5 a la qual se li han introduït les mutacions Gly89Arg i Ser90Arg per mutagènesi dirigida [94].

3.1.2.4. pNLSPE5

pNLSPE5 és un vector derivat de pET17b que conté el gen de PE5 fusionat a un NLS de l'antigen T gran del virus SV40 a l'extrem 5' [109].

3.1.2.5. pE10

Es tracta d'un vector derivat de pE5 que conté una variant del gen de PE5 en el qual tres residus de l'extrem N-terminal s'han revertit als de l'HP-RNasa salvatge (Gln9Glu, Asp16Gly i Ser17Asn) [109].

3.1.2.6. pET-28ApopΔProΔLeu

Aquest vector derivat de pET28a conté el gen truncat de l'apoptina, al qual se li ha escindit la seqüència que codifica per als residus 1-43 de l'apoptina salvatge, eliminant d'aquesta manera la regió de multimerització (Ruiz-Martínez et al. enviat a publicació). A més, a l'extrem 5' del gen truncat de l'apoptina hi ha una regió que codifica per a sis histidines, la qual s'utilitza per a la seva purificació per cromatografia d'afinitat (IMAC). Per a la construcció de pET-28ApopΔProΔLeu es va utilitzar el gen de l'apoptina salvatge [145] que estava inserit en un vector anomenat pCMV-Apoptin, amablement cedit per la professora Malvash Tavassoli (King's College, UK).

3.1.3. Línies cel·lulars eucariotes i condicions de cultiu

En aquest treball s'han emprat les línies cel·lulars que es detallen a la Taula 3.1. La línia de càncer de pulmó humà NCI-H460 i la línia cel·lular de càncer d'ovari humà OVCAR-8 es van obtenir del dipòsit de línies cel·lulars tumorals del National Cancer Institute-Frederick (tumor repository-USA). La línia cel·lular de càncer de pulmó humà fenotip MDR, NCI-H460/R, va ser cedida amablement pel Dr. Sabera Ruzdijic de l'*Institute for Biological Research* (Belgrad, Sèrbia). La línia cel·lular de càncer d'ovari humà fenotip MDR, NCI/ADR-RES (abans anomenada MCF-7/Adr) [146], va ser cedida amablement pel Dr. Ramon Colomer de l'*Institut Català d'Oncologia de Girona, Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta* (Girona, Espanya). La línia cel·lular limfoblàstica de limfòcits T humans, Jurkat, la línia cel·lular de càncer de cèrvix humà, HeLa, les línies cel·lulars de càncer de mama MCF-7 [147], SK-BR-3 [148] i MDA-MB-231 [149], la línia cel·lular de queratinòcits humans, HaCaT, i la línia cel·lular humana de fibroblasts de còlon normals, CCD-18Co, es van obtenir d'*Eucellbank*, (*Universitat de Barcelona*, Barcelona, Espanya). La línia cel·lular humana embrionària de ronyó HEK-293 i la línia cel·lular humana de fibroblasts de teixit epitelial, IBR.3.G, es van obtenir de l'*European Collection of Cell Cultures* (ECACC, Porton, UK).

Taula 3.1. Característiques generals de les línies cel·lulars que apareixen en aquest treball.

Nom	Organisme	Tipus cel·lular	Òrgan	Morfologia	Creixement	Tumoral
SK-BR-3	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma	Glàndula mamària	Epitelial	Adherent	Sí
MDA-MB-231	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma	Glàndula mamària	Epitelial	Adherent	Sí
MCF-7	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma	Glàndula mamària	Epitelial	Adherent	Sí
OVCAR-8	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma	Ovari	Epitelial	Adherent	Sí
NCI/ADR-RES	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma	Ovari	Epitelial	Adherent	Sí
NCI-H460	<i>Homo sapiens</i>	Carcinoma de cèl·lules grans	Pulmó	Epitelial	Adherent	Sí
NCI-H460/R	<i>Homo sapiens</i>	Carcinoma de cèl·lules grans	Pulmó	Epitelial	Adherent	Sí
HeLa	<i>Homo sapiens</i>	Adenocarcinoma	Cèrvix uterí	Epitelial	Adherent	Sí
Jurkat	<i>Homo sapiens</i>	Limfòcit T	Sang perifèrica	Limfoblast	Suspensió	Sí
HaCaT	<i>Homo sapiens</i>	Queratinòcits immortalitzats	Pell	Poligonal	Adherent	No
HEK-293	<i>Homo sapiens</i>	Cèl·lules embrionàries	Ronyó	Epitelial	Adherent	No
IBR.3.G.	<i>Homo sapiens</i>	Fibroblasts transformats	Pell	Fibroblast	Adherent	No
CCD-18Co	<i>Homo sapiens</i>	Miofibroblasts	Còlon	Fibroblast	Adherent	No

3.2. Mètodes microbiològics

3.2.1. Medis de cultiu

Pel creixement i propagació de les diferents soques bacterianes s'han utilitzat els medis de cultiu LB (Luria-Bertani) i TB (Terrific Broth). El medi LB s'ha utilitzat de manera general en el creixement de les soques, mentre que el medi TB, molt més ric i que permet un creixement cel·lular molt elevat, s'ha utilitzat per a l'expressió de l'onconasa. La composició per un litre de cada un d'ells és la següent:

MATERIALS I MÈTODES

Medi LB

Triptona	10 g
Extracte de llevat	5 g
NaCl	10 g

S'enrasa a un volum final de 1 litre amb aigua destil·lada. Seguidament s'ajusta el pH a 7,2 amb NaOH i després s'esterilitza a l'autoclau durant 20 min a 121 °C. Per a l'obtenció de medi sòlid per plaques de cultiu s'afegeix 15 g d'agar per litre de medi (1,5% final).

Medi TB

Triptona	12 g
Extracte de llevat	24 g
Glicerol (80%)	4 ml
Fosfat potàssic monobàsic	2,30 g
Fosfat potàssic dibàsic	12,50 g

La triptona, l'extracte de llevat i el glicerol es dissolen en 900 ml d'aigua destil·lada, mentre que les sals es dissolen en 100 ml. Les dues solucions s'esterilitzen per separat a l'autoclau durant 20 min a 121 °C. Una vegada estèrils, les diferents solucions es reuneixen, mantenint les condicions d'esterilitat necessàries.

3.2.2. Antibiótics

A continuació es detallen com s'han preparat els estocs d'antibiòtics per suplementar els medis de cultiu.

Ampicil·lina. Antibiótic de selecció de les cèl·lules que contenen plasmidis derivats de pET17b i pET22b(+). Es prepara en una solució estoc 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 aliquidada a -20 °C. Per al seu ús, la solució mare s'addiciona al medi en condicions estèrils a una concentració de treball de 100 µg/ml.

Kanamicina. Utilitzat per seleccionar cèl·lules que contenen vectors derivats de pET28. Es prepara en una solució estoc de 50 mg/ml en aigua destil·lada, s'esterilitza per filtració i es guarda aliquidada a -20 °C. La seva concentració de treball és de 50 µg/ml.

Cloramfenicol. En transformar la soca *Rosetta*TM 2(DE3) amb el vector corresponent, a part del marcador de selecció del plasmidi, s'ha d'afegir cloramfenicol com a antibiòtic de selecció específic del vector pRARE. El cloramfenicol es prepara com a una solució estoc de 35 mg/ml en etanol. Una vegada preparada la solució es guarda aliquidada a -20 °C. La concentració de treball és de 35 µg/ml.

3.2.3. Cultius líquids de soques bacterianes

El volum del medi de cultiu ha de ser 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 preinòcul 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.

3.2.4. Manteniment de les soques

Per al manteniment a curt termini (dues setmanes aproximadament) de les soques d'*E. coli*, es cultiven en plaques de Petri amb medi LB. 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 segellades amb parafilm, també en posició invertida.

Per a la conservació a llarg termini s'inocula una colònia de la soca desitjada en 10 ml de medi LB i s'incuba a 37 °C en agitació (250 rpm) O/N, es barregen en un tub Eppendorf estèril 800 µl del cultiu saturat i 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.

3.3. Cultiu de cèl·lules eucariotes

3.3.1. Medis i condicions de cultiu

Les cèl·lules NCI-H460 es cultiven rutinàriament a 37 °C en una atmosfera humidificada amb un 5% de CO₂ en medi RPMI (Gibco, Alemanya) suplementat amb un 10% d'FBS (Gibco, Alemanya), 50 U/ml de penicil·lina i 50 U/ml d'estreptomicina (Gibco, Alemanya). La resta de línies cel·lulars emprades en aquest treball es cultiven rutinàriament a 37 °C en una atmosfera humidificada amb un 5% de CO₂ en medi DMEM (Gibco, Alemanya) suplementat amb un 10% d'FBS (Gibco, Alemanya), 50 U/ml de penicil·lina i 50 U/ml d'estreptomicina (Gibco, Alemanya). Periòdicament s'han realitzat controls per comprovar l'absència de contaminació per *Mycoplasma*.

Per tal de preparar els medis suplementats amb FBS i els antibiòtics es descongela el sèrum boví fetal prèviament inactivat i dispensat en vials de 50 ml i es tempera el medi DMEM o RPMI (500 ml). S'hi addicionen 50 ml de sèrum boví fetal inactivat i 5 ml de solució estoc de penicil·lina-estreptomicina.

3.3.2. Expansió de línies cel·lulars de creixement adherent

Quan les cèl·lules arriben a condicions de confluència es procedeix a subcultivar per a assegurar-ne el seu creixement exponencial.

Per a les línies de creixement adherent, els cultius s'han subcultivat 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, s'obté una fase de latència més llarga de la normal, alentint-se l'establiment del cultiu. Les característiques de creixement varien per a cada línia cel·lular.

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

Inicialment s'elimina el medi vell amb una pipeta estèril, es renta la monocapa de cèl·lules adherides al flascó amb 10 ml de PBS (Gibco, Alemanya) estèril per tal d'eliminar les

restes de FBS del medi, les quals actuarien inhibint l'acció de la tripsina, i s'afegeix la solució de tripsina-EDTA 1x (Gibco, Alemanya) a 37 °C fins que cobreixi la monocapa de cèl·lules adherida a la superfície del flascó (~3 ml per a flascons de cultiu de 75 ml). S'incuba 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, s'afegeix 9 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. En aquest punt es pot realitzar la dilució que correspongui en nous flascons i s'incuba en un incubador saturat de vapor d'aigua a 37 °C i 5% CO₂. Per a la simple propagació del cultiu cal subcultivar cada vegada que les cèl·lules assoleixin la preconfluència, que sol ser cada 3-4 dies.

3.3.3. Congelació i descongelació de les línies cel·lulars

Per a la congelació de les línies cel·lulars primerament s'aspira el medi del flascó amb cèl·lules crescudes fins a un 80% de confluència, i si són cèl·lules adherents, es desadhereixen mitjançant un tractament amb tripsina. Després, se centrifuguen 5 min a 405 xg i s'elimina el sobrenedant. A continuació, es resuspèn el sediment amb el volum necessari de medi fred per tal de tenir 2-4 x10⁶ cèl·lules/ml. En un criotub es posen 900 µl de medi amb cèl·lules i s'hi afegeix tot seguit 100 µl de DMSO (Sigma, EUA). Cal tenir en compte que els agents crioprotectors, malgrat ser imprescindibles en el procés de congelació, són altament tòxics per a 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. S'homogeneïtza i es congela en un dipòsit de congelació gradual d'isopropanol a -80 °C durant 24 h. Es transfereixen els vials a un tanc de nitrogen líquid per a una conservació a llarg termini.

Per tal de recuperar les cèl·lules congelades i minimitzar l'efecte de la mort cel·lular és imprescindible fer una sembra a una alta densitat. S'agafa el vial del recipient de nitrogen líquid, i es col·loca en un bany d'aigua prèviament temperat a 37 °C. Quan les cèl·lules s'acaben de descongelar, a fi de minimitzar el contacte amb el DMSO, es transfereix ràpidament el contingut del vial a un tub de centrifuga estèril que conté 10 ml de medi fresc. Se sembren les cèl·lules en un flascó T75 i s'incuba a 37 °C en una atmosfera del 5% CO₂ durant 24 h. Passat aquest temps, es controlen els cultius 24 h per tal d'assegurar que les cèl·lules s'han adherit a la superfície del flascó i que evolucionen correctament. Es canvia el medi per tal d'eliminar el DMSO.

3.3.4. 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) en cambra de Neubauer. Les cèl·lules vives apareixen refringents i clares, mentre que les mortes s'observen tenyides de blau. Això es deu a que el colorant no pot penetrar a les cèl·lules vives, mentre que sí que ho pot fer a les mortes.

Es tripsinitzen les cèl·lules i s'afegeix la suspensió cel·lular a un tub estèril de centrífuga, se centrifuga 10 min a 405 xg i es resuspenen les cèl·lules amb 5 ml de medi de cultiu. Es prepara 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. Es prepara l'hemocitòmetre (Cambra de Neubauer) amb la col·locació d'un cobreobjectes i s'aplica la mostra sota el cobreobjectes per capil·laritat. Finalment, es disposa l'hemocitòmetre al microscopi invertit i es recompten les 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 la fórmula següent:

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

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

3.4. Tècniques de DNA recombinant

3.4.1. Obtenció de DNA plasmídic (Miniprep)

En aquest treball s'ha utilitzat el kit comercial QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) seguint el protocol que descriu 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, se centrifuga a 20.500 xg durant 30 s i s'elimina el sobrenedant per aspiració. Es repeteix el procés tres vegades i es resuspèn el sediment amb 250 µl de solució de resuspensió. En aquest pas es produeix el trencament de les cèl·lules i l'eliminació del RNA. S'afegeixen 250 µl de solució de lisi cel·lular. La solució esdevé viscosa i lleugerament clara a causa de la desnaturalització del

DNA. A continuació s'afegeix 350 µl de solució neutralitzadora. En aquest punt la solució es torna tèrbola i blanquinosa a causa de la precipitació del DNA genòmic. Se centrifuga 10 min a 20.500 xg. S'aplica el sobrenedant a una cromatografia d'adsorció de matriu de sílica i se centrifuga durant 60 s a 20.500 xg. La sílica de les columnes reté el DNA. Després es renta el DNA amb 750 µl de solució de rentat que conté etanol. Es fan dos centrifugacions de 60 s per eliminar les restes d'etanol. S'asseca durant 15 min a 37 °C per acabar d'eliminar l'etanol, el qual podria interferir en les reaccions enzimàtiques posteriors i finalment s'elueix el DNA amb 50 µl de solució d'elució centrifugant 1 min a 20.500 xg. El DNA purificat es pot emmagatzemar a -20 °C.

3.4.2. Electroforesi de DNA en gel d'agarosa

Es barreja en 50 ml de tampó TAE (Tris-Acetats 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0) la quantitat d'agarosa necessària per aconseguir el percentatge adequat. S'escalfa la barreja en un matràs Erlenmeyer fins a fondre l'agarosa en pols, i després d'uns 5-10 min temperant, s'hi afegeix 5 µl de bromur d'etidi 5 mg/ml (Sigma, EUA; 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 permet la visualització dels fragments. S'aboca la barreja en el motlle del gel i es deixa solidificar. 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, a les quals s'hi ha afegit tampó de càrrega. El DNA, de càrrega negativa, anirà migrant cap al pol positiu. Es poden veure els fragments de DNA transil·luminant el gel amb llum UV, gràcies al bromur d'etidi intercalat que emet fluorescència.

3.4.3. 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. Es talla la banda de DNA minimitzant al màxim la mida del fragment escindit, es posa a un tub Eppendorf i es pesa. Se solubilitza el fragment amb 300 µl de tampó de solubilització per cada 100 mg de gel. A continuació s'incuba 20 min a 50-60 °C o fins que el fragment de gel estigui totalment dissolt, i es carrega la solució a la columna d'adsorció de sílica. Tot seguit se centrifuga 60 s a 12.000 xg, s'elimina el sobrenedant i s'addicionen 750 µl de tampó de rentat (conté etanol). Se centrifuga dues vegades 60 s a

12.000 xg i s'evaporen les restes d'etanol mantenint 15 min a 37 °C. Finalment, s'elueix el DNA amb 35-50 µl de tampó d'elució.

3.4.4. Estimació espectrofotomètrica de la concentració de DNA

Per fer una estimació de la quantitat de DNA present a una dissolució, s'ha mesurat l'absorbància a 260 nm. S'accepta de forma general que una unitat d'absorbància (Abs) a 260 nm equival a una concentració de 50 µg/ml de DNA de doble cadena. En el cas dels oligonucleòtids comercials, adquirits a Roche Diagnostics SL (Roche Molecular Biochemicals, Alemanya), s'han emprat les equivalències de dades d'Abs₂₆₀ i concentració subministrades per la casa comercial.

3.4.5. Utilització d'enzims que modifiquen el DNA

3.4.5.1. 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. A continuació es detallen les condicions generals que s'han emprat.

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 al fet 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 a la de DNA és massa elevada (> 25 U/µg de DNA). Les barreges de restricció s'han incubat a 37 °C entre 1 i 3 h. En el cas de reaccions amb dos enzims de restricció diferents, l'addició dels enzims era simultània quan tots dos presentaven activitat òptima a les mateixes condicions, és a dir, en el mateix amortidor.

3.4.5.2. Defosforilació del DNA a l'extrem 5'

Quan s'utilitzen enzims de restricció és possible que es formin extrems cohesius complementaris que podrien recircularitzar, com és el cas de fer servir un únic enzim de restricció. Per evitar-ho, s'ha fet servir el kit comercial *Thermo Scientific FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase*® (Thermo Fisher Scientific, EUA), el qual es basa en un enzim anomenat fosfatasa alcalina que elimina el grup fosfat dels extrems 5' i 3' del DNA, RNA, nucleòtids i també elimina grups fosfat de proteïnes. En aquest treball s'ha fet servir aquesta fosfatasa alcalina per eliminar els grups fosfat de l'extrem 5' del DNA. El protocol utilitzat es detalla a continuació:

1. Es prepara la barreja:

Plasmidi tallat	17 µl
Reaction Buffer (10x)	2 µl
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	1 µl
2. Es barreja bé i s'incuba durant 10 min a 37 °C.
3. S'atura la reacció escalfant la mostra durant 5 min a 75 °C.
4. El producte resultant es pot utilitzar directament en la reacció de lligament.

3.4.5.3. 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 Diagnostics SL, Alemanya). 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 la reacció de lligament s'utilitza una relació entre vector i insert de 1:4. A continuació s'afegeix 1 unitat de DNA lligasa de T4 i s'incuba la reacció de lligament a 18°C durant 15-20 h. Alternativament es poden fer incubacions de 2-4 h a temperatura ambient. La mescla obtinguda s'utilitza per transformar cèl·lules competents.

3.4.6. Mutagènesi dirigida per oligonucleòtid mitjançant el mètode QuikChange™

El mètode *QuikChange*™, desenvolupat per Stratagene (EUA), permet introduir una mutació específica en una seqüència de DNA coneguda, utilitzant DNA de doble cadena com a

MATERIALS I MÈTODES

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 metilat portador del gen a modificar, dos encebadors sintètics que han de ser complementaris entre ells i que continguin en la seva seqüència la mutació desitjada i una DNA polimerasa molt processiva que permeti amplificar tot el vector, de manera que al posar la mescla de reacció al termociclador es generen plasmidis portadors dels gens amb la mutació desitjada. El producte és tractat amb l'enzim de restricció *DpnI*. *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'. La funció del *DpnI* és digerir el DNA que contingui una cadena parental (reconeix DNA metilat o hemimetilat) i així seleccionar el DNA sintetitzat que conté la mutació a les dues cadenes (DNA no metilat). La reacció de digestió es realitza 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 la fórmula següent:

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

On %GC és el percentatge de bases de G i C de l'oligonucleòtid, N és el nombre de nucleòtids de l'oligonucleòtid i %desaparellament és el percentatge de nucleòtids que no hibriden amb la seqüència patró. El protocol de *QuikChange*[™] recomana que els oligonucleòtids tinguin una T_m per sobre de 70 °C, per tal de poder ajustar la temperatura d'hibridació de la PCR.

Els oligonucleòtids van ser subministrats, de manera liofilitzada, per Roche Diagnostics S.L. (Roche Molecular Biochemicals, Alemanya). Aquests liofilitzats es van resuspendre amb 200 µl d'aigua milliQ, es va determinar la seva concentració espectrofotomètricament, i es van preparar alíquotes de cada oligonucleòtid a la concentració de treball per a cada metodologia.

MATERIALS I MÈTODES

Reacció d'amplificació:

Pfu Buffer (x10)	5 µl
dNTP mix	1 µl
dsDNA motlle (~50 ng)	2 µl
Oligonucleòtid 3' (25 ng/µl)	5 µl
Oligonucleòtid 5' (25 ng/µl)	5 µl
Aigua milliQ estèril	32 µl
Pfu Turbo® DNA Polimerasa (1 U)	1 µl

Programa (Termociclador):

Desnaturalització inicial	3 min a 95 °C	} x 20 cicles
Desnaturalització	1 min a 95 °C	
Hibridació	1 min a 55 °C	
Extensió	12 min a 68 °C	
	Indefinidament a 4 °C	

3.4.7. Disseny de seqüències dsDNA per introduir seqüències específiques a les RNases

Una alternativa a la digestió amb enzims de restricció i posterior purificació de fragments dsDNA és la del disseny d'una seqüència específica a partir de dos oligonucleòtids que, en aparellar-se, formen un segment dsDNA i que posteriorment pot ser introduït en un vector. En el disseny d'aquests oligonucleòtids s'ha de tenir en compte l'aparellament de bases i que els extrems cohesius mantinguin la pauta de lectura adequada.

Taula 3.2. Programa d'anellament per hibridar les cadenes codificants i no codificants.

Temperatura	Temps	Temperatura	Temps	Temperatura	Temps
92 °C	5 min	71 °C	3 min	49 °C	2 min
89 °C	3 min	69 °C	2 min	45 °C	1 min
86 °C	2 min	67 °C	2 min	41 °C	1 min
84 °C	1 min	65 °C	2 min	37 °C	1 min
81 °C	2 min	63 °C	2 min	33 °C	1 min
79 °C	3 min	61 °C	2 min	29 °C	1 min
76 °C	3 min	57 °C	2 min	4 °C	Indefinidament
73 °C	2 min	54 °C	2 min		

Per a l'anellament o hibridació cada parella d'oligonucleòtids ha d'estar a una concentració equimolar. Seguidament s'executa el següent programa al termociclador (Taula 3.2).

3.4.8. Obtenció de cèl·lules competents d'*E. coli*

Es posen 10 ml de medi LB a una ampolla de 75 ml i s'hi inocula la soca desitjada d'*E. coli* procedent del socari, partint del glicerinat. S'incuba durant tota la nit a 37 °C i 180 rpm. L'endemà, es reinocula a una dilució 1/100 a partir del cultiu de nit (100 µl de cultiu de nit en 10 ml de medi) i s'incuba a 37 °C i 180 rpm fins a assolir una Abs₅₅₀ de 0,6-0,7 (aproximadament 2 h). S'aliquota en tubs Eppendorf o es transfereix a un tub Falcon de manera estèril. A continuació se centrifuga a 4.000 xg a 4 °C durant 10 min i es descarta el sobrenedant de manera estèril. Tot seguit es resuspèn el sediment amb el mateix volum de CaCl₂ 100 mM fred i estèril. S'incuba en gel durant un mínim de 30 min. Se centrifuga novament a 4.000 xg a 4 °C durant 10 min i es descarta el sobrenedant de manera estèril. Seguidament es resuspèn el sediment amb 1/10 del volum de CaCl₂ 100 mM fred i estèril. 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 15%.

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

Primerament s'afegeix 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). A continuació s'agita suaument, colpejant amb un dit, per tal d'homogeneïtzar la solució. S'incuba en gel durant 1-2 h (mínim 20 min) i s'efectua un xoc tèrmic posant els tubs Eppendorf al bany a 42 °C durant 1,5 min. S'incuben els tubs en gel durant 10 min, s'afegeixen 300 µl (transformants de minipreps) o 600 µl (transformants de *QuikChange*TM i lligaments) de medi LB líquid a cada tub Eppendorf i s'incuba a 37 °C en agitació suau durant 1 h per tal de realitzar la recuperació fenotípica. Després se centrifuga durant 5 min a 800 xg, s'elimina el volum de medi necessari fins un volum final de 120 µl i se sembra en plaques d'agar LB suplementades amb l'antibiòtic pel qual el vector proporcioni resistència (marcador de selecció). Finalment s'incuben les plaques en una estufa a 37 °C O/N, fins que s'observin les colònies transformants (12-15 h).

3.4.10. Seqüenciació de DNA

La seqüenciació del DNA de les construccions realitzades en aquest treball ha estat el mètode que ha permès validar els diferents clons obtinguts. S'ha seguit l'anomenat mètode del dideoxiribonucleòtid [150, 151], emprant el kit comercial *ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing 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 dideoxiribonucleòtid 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 dideoxiribonucleòtids (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 la sèrie pET, els primers universals T7term i T7prom són compatibles, ja que 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 polymerase*. Existeix la possibilitat de 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:

Aigua milliQ estèril	35,5 µl
DeepVent Buffer (x10)	5 µl
Oligonucleòtid T7Prom (5 pmol/µl)	2,5 µl
Oligonucleòtid T7Term (5 pmol/µl)	2,5 µl
dsDNA motlle (~50 ng)	2,5 µl
dNTPs 10 mM (0,4 mM final)	2,5 µl
DeepVent DNA Polimerasa (1 U)	0,5 µl

MATERIALS I MÈTODES

Programa (Termociclador)

Desnaturalització inicial	3 min a 95 °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	
	Indefinidament a 4 °C	

Precipitació del producte de PCR: Es recupera el producte de PCR i s'hi afegeixen 0,1 volums d'acetat sòdic 3 M pH 5,5 i 3 volums d'etanol absolut refredat a -20 °C. Tot seguit s'agita en un vòrtex i es guarda a -80 °C durant 1 h o bé a -20 °C O/N. Passat aquest temps, se centrifuga durant 25 min a 20.500 xg i s'elimina el sobrenedant. A continuació s'hi afegeixen 500 µl d'etanol 70% fred (-20 °C) i se centrifuga durant 5 min a 20.500 xg, s'aspira el sobrenedant i es deixa assecar el sediments a 37 °C durant 10-15 min. Després es resuspèn el sediments amb 20 µl d'aigua milliQ estèril. Finalment, es purifica el DNA amplificat mitjançant un gel d'agarosa 1% i un posterior GeneClean de la banda retallada, per tal d'eliminar la resta d'oligonucleòtids.

Reacció de seqüenciació (PCR asimètrica o segona PCR)

Utilitzant el kit comercial ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, EUA), com a motlle el dsDNA obtingut en la primera PCR i com a encebador T7Prom o T7Term per separat permet seqüenciar el gen des dels seus dos extrems. Les condicions d'aquesta segona reacció són:

Barreja de reacció:

dsDNA motlle	6 µl
Sequencing Buffer (x5)	2 µl
Encebador (T7Term / T7Prom, 5 pmol/µl)	0,5 µl
Ready mix	1,5 µl

La Ready Mix és subministrada per la casa comercial i conté ddNTPs, dNTPs, Tris-HCl (pH 9,0), MgCl₂ i la polimerasa AmpliTaq® DNA polimerase i pirofosfatasa alcalina.

MATERIALS I MÈTODES

Programa (Termociclador)

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

Precipitació de la reacció de seqüenciació: Els diferents fragments amplificats es precipiten afegint al producte de la reacció 1 µl d'EDTA 125 mM; 1 µl d'acetat sòdic 3 M pH 5,2 i 25 µl d'etanol absolut refredat a -20 °C. Es vorteja suaument i es deixa 15 min a temperatura ambient. Es centrifuga 15 min a 20.500 xg, s'aspira el sobrenedant, s'hi afegeix 35 µl d'etanol 70% fred i es vorteja suaument. A continuació se centrifuga 10 min a 20.500 xg, s'aspira el sobrenedant i s'asseca 15 min a l'estufa a 37 °C. Finalment es resuspèn amb 10 µl de formamida, es vorteja suaument i es deixa 10 min a temperatura ambient, fent un pols de centrifuga posterior per recollir tot el volum. En aquest treball l'anàlisi de la reacció de seqüenciació es va dur a terme mitjançant el seqüenciador del Laboratori d'Ictiologia Genètica de la Universitat de Girona.

3.5. Mètodes d'expressió i purificació de proteïnes recombinants

3.5.1. Expressió heteròloga d'RNases

Les diferents variants de l'HP-RNasa recombinant han sigut produïdes a partir de cèl·lules d'*Escherichia coli* (BL21 (DE3)) transformades amb el vector corresponent tal i com s'ha publicat en treballs anteriors [152, 153].

A partir d'un glicerinat o d'una colònia aïllada d'una sembra en placa d'*E. coli* BL21 (DE3) transformat amb el vector corresponent es realitza un inòcul en 10 ml de medi LB suplementat amb ampicil·lina 100 µg/ml. S'incuba durant 30 min i es reinocula a una dilució 1/100 sobre 50 ml de medi LB suplementat amb ampicil·lina 100 µg/ml. D'aquesta manera s'assegura que la fase estacionària no és massa llarga i que la quantitat de cèl·lules viables és suficientment gran. S'incuba durant 10-12 h a 37 °C i sota agitació constant a 180 rpm. A partir del cultiu de nit s'inoculen amb una dilució 1/100 5 flascons Erlenmeyer amb 400 ml de medi líquid LB

suplementat amb ampicil·lina 100 µg/ml. Es deixa créixer el cultiu a 37 °C sota agitació constant de 250 rpm durant 3 h, fins que s'assoleix una Abs₅₅₀ de 2-2,5. En aquest moment s'afegeix al cultiu IPTG (Fisher, EUA) a una concentració final de 1 mM, partint d'una solució mare de 200 mM en aigua milliQ preparada just abans d'induir. Es deixa créixer el cultiu induït durant 3-4 h, en les mateixes condicions i, tot seguit, se centrifuga a 7.500 xg durant 7 min per tal de recollir les cèl·lules. Aquestes es guarden a -20 °C fins el moment de començar el procés de purificació. 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 12.000 xg durant 1 min, s'elimina el sobrenedant per aspiració i es resuspèn el sediment cel·lular amb 200 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 per visualitzar proteïnes.

En aquelles construccions en què l'expressió s'ha dut a terme a partir de la soca d'*E. coli* Rosetta™2 (DE3) el medi LB ha d'estar suplementat amb ampicil·lina 100 µg/ml i cloramfenicol 35 µg/ml. Per a la producció de la variant H₆-PE10_ApopΔProΔLeu el medi LB ha d'estar suplementat amb kanamicina 50 µg/ml.

Per a l'expressió de l'onconasa s'utilitza el mateix protocol que per a les variants de l'HP-RNasa, excepte que el cultiu es fa en medi Terrific Broth suplementat amb 100 µg/ml d'ampicil·lina fins que s'assoleix una Abs₆₀₀ de 2 aproximadament.

3.5.2. Purificació d'RNases recombinants

3.5.2.1. Procediment de purificació de variants de l'HP-RNasa

El protocol utilitzat [92, 152] parteix del sediment del cultiu induït. Aquest és lisat mitjançant la premsa de French i s'aïllen els cossos d'inclusió, que és on es troba la major part de la proteïna recombinant produïda. El procés continua amb la desnaturalització d'aquests agregats amb clorur de guanidini (Gnd-HCl) i amb la seva reducció amb glutatió reduït (GSH). La mostra, desnaturalitzada i reduïda, es dilueix lentament gota en gota en un tampó de replegament. A través de la dilució, tant el Gnd-HCl com el GSH passen a estar a una concentració molt baixa, de manera que s'inicia el replegament i, gràcies a la presència de glutatió oxidat (GSSG), es produeix la reoxidació de les cisteïnes de l'HP-RNasa. La mostra s'incuba en aquestes condicions a 4 °C durant 24-48 h i es procedeix a la seva concentració

MATERIALS I MÈTODES

per mitjà d'un sistema d'ultrafiltració tangencial. La mostra ja concentrada es dialitza contra l'amortidor d'equilibrat d'una columna de bescanvi catiònic Mono-S d'HPLC, de la qual s'elueix mitjançant un gradient de clorur de sodi. Es recull el pic principal del cromatograma, que correspon a la proteïna pura i homogènia.

De manera detallada, el protocol adaptat per a la purificació a partir de dos litres de cultiu induït és el següent:

1. Les cèl·lules, provinents de la centrifugació de 2 l de cultiu, es resuspenen en 30 ml de Tris-HCl, 50 mM EDTA 10 mM (pH 8,0).
2. Les cèl·lules se sotmeten tres vegades a la premsa de French a 1.100 psi.
3. Se centrifuga el lisat a 12.000 xg durant 45 min a 4 °C per tal de sedimentar els cossos d'inclusió.
4. Es descarta el sobrenedant i se solubilitza el sediment en 10 ml de Tris-Acetata 100 mM, Gdn-HCl 6 M, EDTA 2 mM (pH 8,5). S'afegeix GSH (Sigma, EUA) en pols fins a una concentració final de 0,1 M. S'ajusta el pH a 8,5 amb Tris sòlid i tot seguit es bombolleja amb N₂ per tal de desplaçar l'O₂ present. Es deixa la solució tancada sota agitació suau 2 h.
5. Se centrifuguen les mostres a 12.000 xg durant 30 min a 4 °C, amb la finalitat d'eliminar el material insoluble.
6. Es dilueix el sobrenedant, abocant-lo gota a gota, en 2 l de Tris-Acetata 100 mM, L-Arg 0,5 M, GSSG (Sigma, EUA) 1 mM, EDTA 2 mM (pH 8,5).
7. S'incuba la mostra a 4 °C sense agitació, durant un mínim de 24 h.
8. S'ajusta pH de la mostra a 5,0 amb àcid acètic glacial per tal d'aturar la reoxidació.
9. En aquest punt la major part de la proteïna s'ha d'haver replegat, però és possible que apareguin precipitats de molècules mal plegades, que poden ser eliminats per centrifugació de la mostra a 15.000 xg durant 30 min a 4 °C.
10. Es concentra la mostra per ultrafiltració tangencial fins a uns 150 ml utilitzant el Pellicon 2 Cassette (Millipore, EUA).
11. Es dialitza la mostra contra 5 l d'acetat sòdic 50 mM (pH 5,0) a 10 °C, fent un canvi de diàlisi usant sacs de diàlisi *Spectra/Por*[®] MWCO: 3.500.
12. Se centrifuga a 15.000 xg durant 30 min, es reserva el sobrenedant i es filtra amb un filtre de 0,22 µm.
13. S'aplica la mostra a una columna Mono-S HR 5/5 FPLC (Amersham Biosciences, EUA) d'intercanvi catiònic. El tampó d'equilibrat és acetat de sodi 50 mM (pH 5,0), i la proteïna s'elueix amb un gradient lineal de 0 a 1 M de NaCl, el qual ha de ser

MATERIALS I MÈTODES

optimitzat per cada una de les variants, ja que les diferències en la seqüència aminoacídica que determinen diferències en càrrega neta de la proteïna, comporten diferències en l'afinitat per la columna. L'elució de la proteïna se segueix amb una mesura contínua d'absorbància a 280 nm i es recull el volum corresponent al pic principal del cromatograma.

14. Es dialitza la mostra enfront d'aigua milliQ per tal d'eliminar les sals de la mostra.
15. Es congelen les mostres a -80 °C i es liofilitzen.
16. La mostra liofilitzada s'emmagatzema a -20 °C en un recipient tancat.

En la purificació d'NLSPE5, per a la resuspensió i tractament amb la premsa de French es va utilitzar acetat sòdic 50 mM, EDTA 10 mM (pH 5,0), per tal de mantenir la proteïna en la forma insoluble [154].

3.5.2.2. Purificació de l'onconasa

En el cas de l'onconasa, la purificació és anàloga a la de les ND-RNases però cal afegir un pas addicional en el procés de purificació per tal de permetre la ciclació del residu Gln N-terminal a àcid pirolutàmic. Aquest residu és essencial per a l'activitat catalítica i les seves propietats citotòxiques [29, 56, 155]. La ciclació es realitza en un pas extra de diàlisi després de la concentració de la mostra per filtració tangencial. Així doncs, es dialitza la mostra contra 5 l de fosfat potàssic dibàsic 200 mM, EDTA 2 mM (pH 7,2) a temperatura ambient per un període de 72 h, incloent un canvi de diàlisi amb 3 l del mateix tampó [153]. La mostra activada és llavors dialitzada contra 5 l de fosfat potàssic dibàsic 20 mM, EDTA 2 mM (pH 7,2) durant 24 h, centrifugada a 15.000 xg durant 30 min a 4 °C per descartar el material insoluble i carregada en una columna FPLC Mono-S HR 5/5 (Amersham Biosciences, EUA) equilibrada amb fosfat potàssic 20 mM, EDTA 2 mM (pH 7,2), i eluïda amb un gradient lineal de 0 a 1 M de NaCl.

3.5.2.3. Purificació d'H₆-PEI0_ApopΔProΔLeu

El protocol de purificació d'H₆-PEI0_ApopΔProΔLeu canvia respecte a la resta de variants purificades pel fet d'incorporar un segment de sis histidines a l'extrem N-terminal que permet la seva purificació a través d'una cromatografia d'afinitat (IMAC). El protocol és el que es detalla a continuació:

MATERIALS I MÈTODES

1. Els sediments cel·lulars obtinguts a partir del cultiu induït es resuspenen amb 15 ml de solució S₁ (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, PMSF 1 mM (pH 7,4)).
2. Les cèl·lules es lisen utilitzant la Premsa de French i s'aïllen els cossos d'inclusió per centrifugació a 12.000 xg durant 45 min a 4 °C.
3. El sediment es resuspen amb 5 ml de solució I₁ (Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, Urea 7 M, Imidazol 5 mM (pH 7,4)). S'afegeix GSH a una concentració final de 0,1 M, s'ajusta el pH a 7,4 amb Tris sòlid, i la mostra s'incuba a temperatura ambient durant 2 h sota una atmosfera de nitrogen per permetre la solubilització proteica.
4. La fracció insoluble es descarta per centrifugació a 12.000 xg durant 30 min a 4 °C i posteriorment la proteïna solubilitzada es barreja amb 5 ml de reïna Ni-NTA equilibrada prèviament amb solució I₁ i es deixa en incubació O/N a temperatura ambient. A l'endemà es realitza el cromatografia d'afinitat (IMAC).
5. S'empaqueta la reïna a les columnes i s'elueix el través.
6. Un cop eluït el través es fa un primer pas de rentat passant 5 volums de columna de la solució I₁.
7. Es fa un segon pas de rentat passant per les columnes 5 volums de Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, Urea 7 M, Imidazol 20 mM (pH 7,4).
8. Per eluir la proteïna es fan passar per les columnes 7,5 volums de Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, Urea 7 M, Imidazol 500 mM (pH 7,4), recollint la fracció E. Aquesta fracció és on s'elueix la totalitat d'H₆-PE10_ApopΔProΔLeu.
9. Es dilueix la fracció E gota a gota en 500 ml Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, L-Arg 100 mM, àcid L-Glutàmic 100 mM, EDTA 1 mM, GSH 1 mM, GSSG 1 mM (pH 8,1) per permetre el replegament de la proteïna i s'incuba durant 48 h a 4 °C.
10. Per aturar la reacció d'oxidació, es fa baixar el pH a 5 amb HCl i les proteïnes es concentren per ultrafiltració tangencial utilitzant el Pellicon 2 Cassette (Millipore, EUA) fins a 150 ml.
11. La mostra concentrada es dialitza en aigua milliQ i es liofilitza.
12. Un cop liofilitzada, es carrega la totalitat de la mostra en una columna de gel-filtració Sephadex G75 HR 10/30 (Pharmacia) equilibrada amb Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM pH 7,4; amb l'objectiu de recollir la fracció monomèrica de la proteïna.
13. Finalment, la fracció monomèrica es torna a dialitzar en aigua milliQ, es liofilitza i s'emmagatzema a -20 °C.

3.6. Anàlisi i caracterització proteica

3.6.1. Determinació de la massa molecular

La massa molecular de les proteïnes recombinants estudiades en aquest treball s'ha comprovat per espectrometria de masses MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*) en un Ultraflex-TOF de Bruker Daltonics, dels Serveis Tècnics de Recerca del Parc Científic i Tecnològic de la Universitat de Girona.

3.6.2. Determinació de la quantitat de proteïna

3.6.2.1. Mètode espectrofotomètric

A partir de l'absorbància a 280 nm, es va calcular la concentració de les diferents proteïnes segons la llei de Lambert-Beer:

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

On Abs_{280} és l'absorbància a 280 nm, $[\text{proteïna}]$ és la concentració de la proteïna a la mostra (M), ϵ_{280} és el coeficient d'extinció molar a 280 nm ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) i l és la longitud de pas de la cubeta utilitzada (cm).

Taula 3.3. Coeficients d'extinció molar (280 nm) pel càlcul de concentració de les proteïnes d'aquest treball.

Proteïna	ϵ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	Proteïna	ϵ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
NES(Apop)_PE5	7950	PE10_Apop_MCM2	7950
NES(Tlarge)_PE5	9440	PE10_Tlarge_Apop	9440
NES(ISGF)_PE5	9440	PE10_Tlarge_MCM2	9440
NES(HIV)_PE5	7950	PE10_ISGF_Apop	9440
Apop_Apop_PE5	7950	PE10_HIV_Apop	7950
Apop_MCM2_PE5	7950	PE10_HIV_MCM2	7950
Tlarge_Apop_PE5	9440	H ₆ -PE10_Apop Δ Pro Δ Leu	9565
Tlarge_MCM2_PE5	9440	Onconasa	10470
ISGF_Apop_PE5	9440	PE5	7950
ISGF_MCM2_PE5	9440	NLSPE5	7950
HIV_MCM2_PE5	7950	PE10	7950

Els coeficients d'extinció molar ϵ_{280} es van obtenir de la predicció feta per l'aplicació ProtParam del portal ExPASy, que són calculats segons el mètode de Pace [156]. A la Taula 3.3 es mostren els ϵ_{280} utilitzats per a cada proteïna.

3.6.2.2. Mètode de Bradford

La determinació de la quantitat de proteïna total també s'ha dut a terme utilitzant el mètode de Bradford [157]. 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 una solució mare de BSA (Bio-Rad, EUA) a una concentració de 100 $\mu\text{g/ml}$ en aigua milliQ, a partir de la qual poder construir una recta patró (0 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$, 35 $\mu\text{g/ml}$ i 40 $\mu\text{g/ml}$) amb la qual determinar la concentració de la mostra problema. A més, cal preparar una dilució de la mostra problema amb la finalitat de poder interpolar el seu valor d'absorbància a 595 nm amb la seva concentració. Es dilueix 1:5 el reactiu de Bradford amb aigua milliQ. Es barregen 40 μl de cada una de les dilucions i de la mostra problema amb 40 μl de reactiu de Bradford diluït. S'incuben totes les reaccions a temperatura ambient durant 5 min i es fa una lectura de l'absorbància a 595 nm.

3.6.3. Electroforesi discontinua en gel de poliàcrilamida

L'electroforesi discontinua en gel de poliàcrilamida en presència de dodecilsulfat sòdic (SDS-PAGE) s'ha utilitzat de manera rutinària per a la determinació del contingut proteic de cadascuna de les fraccions cel·lulars, i el seguiment dels processos de purificació, així com per a la determinació del grau de puresa de les mostres obtingudes al final del procés.

En aquest treball s'ha utilitzat el mètode d'electroforesi discontinua descrit per Lane & Harlow [158]. 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.

En aquest treball s'han emprat gels separadors de dos percentatges diferents d'acrilamida, segons la mida de les proteïnes a analitzar. Així, s'han utilitzat gels separadors al

MATERIALS I MÈTODES

15% d'acrilamida (i gel apilador al 5% d'acrilamida) i 0,75 mm de gruix per al seguiment de la purificació de les diferents RNases i per a la determinació del grau de puresa de les mostres obtingudes al final del procés; mentre que per a l'anàlisi de diferents proteïnes implicades en el cicle cel·lular per western blot s'han emprat gels separadors al 12,5% d'acrilamida (i gel apilador al 3% d'acrilamida) i 1,5 mm de gruix. Es detalla el protocol de confecció dels gels, apilador i separador.

Gel separador al 15% d'acrilamida (4 ml; 0,75 mm gruix):

Acrilamida:Bisacrilamida (37,5:1) al 40%	1,5 ml
Tampó del gel separador (x4) (Tris-HCl 1,5 M; SDS 0,4% (pH 8,8))	1 ml
Aigua milliQ	1,5 ml
Persulfat amònic 10% (p/v)	30 µl
TEMED	3 µl

Gel apilador al 5% d'acrilamida (2 ml; 0,75 mm gruix):

Acrilamida:Bisacrilamida (37,5:1) al 40%	0,25 ml
Tampó del gel separador (x4) (Tris-HCl 0,5 M; SDS 0,4% (pH 6,8))	0,5 ml
Aigua milliQ	1,25 ml
Persulfat amònic 10% (p/v)	30 µl
TEMED	3 µl

Gel separador al 12,5% d'acrilamida (8 ml; 1,5 mm gruix):

Acrilamida:Bisacrilamida (37,5:1) al 40%	2,5 ml
Tampó del gel separador (x4) (Tris-HCl 1,5 M; SDS 0,4% (pH 8,8))	2 ml
Aigua milliQ	3,5 ml
Persulfat amònic 10% (p/v)	60 µl
TEMED	6 µl

Gel apilador al 3% d'acrilamida (4 ml; 1,5 mm gruix):

Acrilamida:Bisacrilamida (37,5:1) al 40%	0,3 ml
Tampó del gel separador (x4) (Tris-HCl 0,5 M; SDS 0,4% (pH 6,8))	1 ml
Aigua milliQ	2,7 ml
Persulfat amònic 10% (p/v)	30 µl
TEMED	3 µl

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 milliQ per evitar malformacions del front. Una vegada el gel separador hagi polimeritzat, es pot retirar la capa d'aigua. Llavors es passa a la preparació del gel apilador 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 (Tris-HCl 25 mM; SDS 0,1%; glicina 192 mM; (pH 8,5)). Posteriorment, es posa els vidres amb el gel polimeritzat a la zona d'encaix dels accessoris del kit.

Preparació de les mostres:

Les mostres es preparen aplicant amortidor d'aplicació de mostres x4 (Tris-HCl 50 mM, SDS 8%, glicerol 20% i 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. Es bullen les mostres 5 min a 90 °C. Es carreguen les mostres al gel i es connecta la font d'alimentació a un voltatge inicialment baix, i un cop el colorant arriba al gel separador es pot pujar fins a uns 150-200 V. Quan el colorant del tampó d'aplicació assoleix l'extrem inferior del gel es pot 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 blot.

Tinció del gel de poliacrilamida amb blau de Coomassie

Per a la tinció del gel de poliacrilamida amb blau de Coomassie, se submergeix el gel, preferiblement en agitació, en solució Coomassie (Coomassie Blue 0,1% (p/v), metanol 45% (v/v), àcid acètic 10% (v/v)). Posteriorment s'elimina l'excés de colorant amb diversos rentats amb àcid acètic al 7% fins que les bandes proteiques es vegin ben contrastades.

3.6.4. Anàlisi de la interacció entre RNases i l'inhibidor

Amb l'objectiu d'analitzar el nivell d'interacció entre les variants de l'HP-RNasa i l'RI, s'ha emprat una variant d'un mètode basat en la visualització de la degradació del substrat 16S- i 23S-rRNA d'*Escherichia coli* per les RNases en presència o absència de 40 unitats d'RI (on una unitat és la quantitat necessària per inhibir l'activitat de 5 ng d'RNasa A en un 50%), en un gel d'agarosa [159, 160]. 15 ng de cada RNasa es dissolen en 20 μ l de tampó RIB (HEPES 20 mM, NaCl 125 mM, DTT 10 mM, EDTA 1 mM (pH 7,0)) i s'incuben durant 10 min a 25 °C amb 0 o 40 unitats de RI (Promega, EUA). Després s'afegeixen a les mostres 4 μ g de 16S- i 23S-rRNA (Roche, Suïssa) s'incuben durant 10-30 min més a 25 °C. Les reaccions s'aturen per l'adició de 3 μ l de tampó STOP (sacarosa 40%, blau de bromofenol 0,25%, dietilpirocarbonat 0,2%) i es carreguen en un gel d'agarosa a l'1,2%. En aquelles mostres on s'observa degradació del

substrat en presència d'RI, l'enzim no ha perdut la seva activitat RNasa, i per tant, no ha estat inhibit per l'RI.

3.6.5. Anàlisi de l'activitat citotòxica sobre línies cel·lulars eucariotes

3.6.5.1. Assaig de proliferació cel·lular

L'assaig de proliferació es basa en la utilització una sal de tetrazolium (MTT; Sigma, EUA) que en cèl·lules viables és reduïda a un producte derivat del formazan, el qual absorbeix a 570 nm. Aquesta reducció la realitzen deshidrogenases mitocondrials de la cadena respiratòria mitocondrial presents en les cèl·lules metabòlicament actives.

El protocol és el següent:

1. Se sembren les cèl·lules en plaques de 96 pous a la densitat apropiada: 1.900 cèl·lules/pou per NCI-H460, 3.500 cèl·lules/pou per HaCaT, 2.000 cèl·lules/pou per CCD-18Co, 2.500 cèl·lules/pou per HEK-293 i 3.000 cèl·lules/pou per IBR.3.G.
2. S'incuben les plaques durant 24 h a 37 °C i 5% CO₂.
3. Es tracten les cèl·lules amb diferents concentracions de RNasa (0,001-10 µM per a l'onconasa i NLSPE5 o 0,1-30 µM per a la resta de RNases) prèviament filtrades en un volum final de 200 µl per pou. S'hi afegeix un control de viabilitat utilitzant només medi sense RNasa.
4. S'incuben les plaques durant 72 h a 37 °C i 5% CO₂.
5. S'aspira el medi i afegir 100 µl de medi fresc a cada pou. Seguidament, s'hi afegeix 10 µl d'MTT (Sigma, EUA) (0,5 g d'MTT dissolts en 100 ml de PBS).
6. S'incuben les plaques a 37 °C i 5% CO₂ 1-4 h.
7. Es mesuren l'absorbància a 570 nm amb el lector de plaques multipou Synergy 4 (Biotek Instruments, EUA).

El valor d'IC₅₀ representa la concentració d'RNasa necessària per inhibir la proliferació cel·lular un 50%, i en cada cas aquest valor es calcula per interpolació lineal a partir de les corbes de creixement obtingudes. Totes les dades estan expressades com la mitjana ± la desviació estàndard d'almenys tres experiments independents amb tres rèpliques cadascun.

3.6.5.2. Anàlisi dels efectes citotòxics i citostàtics

Per poder analitzar aquests efectes, es realitza un recompte simple de les cèl·lules tractades vives i mortes utilitzant un hemocitòmetre combinat amb l'assaig d'exclusió del blau tripà basat en l'absència de tinció en cèl·lules viables.

1. Se sembren en plaques de cultiu cel·lular de 6 cm de diàmetre 143.000 cèl·lules CCD-18Co en 3,5 ml de medi.
2. S'incuben les plaques a 37 °C en una atmosfera al 5% CO₂ durant 24 h.
3. Es tracten les cèl·lules amb PE5 (0 µM; 5,5 µM; 15 µM; 21 µM i 42 µM) i NLSPE5 (0 µM; 0,7 µM; 3 µM; 5,5 µM i 11 µM) en medi DMEM 10% FBS.
4. S'incuben les plaques a 37 °C en una atmosfera al 5% CO₂ durant 24, 48 o 72 h.
5. Es recullen el sobrenedant i les cèl·lules adherides i se centrifuga a 870 xg durant 10 min. A continuació s'elimina el sobrenedant amb cura de no perdre cèl·lules.
6. Es resuspèn el sediment amb 30 µl de PBS fred.
7. Es prepara en un tub Eppendorf 10 µl de suspensió cel·lular i 40 µl de blau tripà a l'1% (dilució 1:5).
8. Es disposa l'hemocitòmetre en el microscopi de contrast de fases invertit i es realitza el recompte de les cèl·lules observades als quadrants. Les cèl·lules vives s'observen refringents mentre que les mortes queden tenyides de color blau. Les dades es representen com el percentatge de cèl·lules totals de cada tractament respecte al total de les cèl·lules control (proliferació cel·lular) o com el percentatge de cèl·lules viables respecte al total de cada tractament (viabilitat cel·lular).

3.6.5.3. Anàlisi del cicle cel·lular

L'anàlisi del cicle cel·lular es duu a terme mitjançant la tinció amb iodur de propidi (PI). El protocol adaptat al cultiu de la línia cel·lular CCD-18Co es detalla a continuació:

1. Se sembren les cèl·lules CCD-18Co (360.000 cèl·lules/placa de 100 mm) en 8 ml de medi.
2. S'incuben les plaques a 37 °C en una atmosfera al 5% CO₂ durant 24 h.
3. Es tracten les cèl·lules amb PE5 o NLSPE5 en medi DMEM 10% FBS.
4. S'incuben les plaques a 37 °C en una atmosfera al 5% CO₂ durant 72 h.

MATERIALS I MÈTODES

5. Es recullen el sobrenedant i les cèl·lules adherides i es renten amb 5 ml de PBS fred, i després se centrifuga tot a 460 xg durant 10 min a 4 °C. Es resuspenen bé amb 500 µl de PBS fred.
6. Es fixa amb etanol al 70% fred diluït en PBS: s'hi afegeixen 4,5 ml d'etanol gota a gota a la suspensió cel·lular mentre aquesta es vorteja suaument.
7. S'incuba durant un mínim de 60 min en gel. En aquest punt es poden emmagatzemar les cèl·lules a -20 °C durant diverses setmanes.
8. Es prepara RNasa A 1 mg/ml en acetat sòdic 0,01 M pH 5,2; s'escalfa a 100 °C durant 15 min, es deixa refredar lentament a temperatura ambient i s'ajusta el pH afegint 0,1 volums (20 µl) de Tris-HCl 1M pH 7,4. Aquest tractament elimina les possibles DNases.
9. Se centrifuguen les mostres a 1.000 xg durant 5 min a 4 °C i es descarta l'etanol per decantació.
10. Es renta el pellet amb 5 ml PBS 1% BSA fred i se centrifuguen les mostres a 500 xg durant 10 min a 4 °C.
11. Es resuspenen les cèl·lules amb PBS (580.000-650.000 cèl·lules/ml) i a continuació es tracten amb RNasa A (100 µg/ml) i PI (40 µg/ml) (Molecular Probes, EUA) a 37 °C durant 30 min previ a l'anàlisi per citometria de flux. S'analitzen un mínim de 10.000 cèl·lules de la població seleccionada amb el citòmetre de flux FACSCalibur (BD Biosciències, EUA). La distribució del cicle cel·lular s'analitza utilitzant el programa FlowJo (Freestar, EUA).

3.6.5.4. Assaig de l'activació de les procaspases

L'activitat catalítica de les caspases 3, 8 i 9 ha sigut mesurada en aquest treball mitjançant el kit d'assaig colorimètric APOPCYTO (MBL, Japó) seguint les instruccions del fabricant. L'assaig es basa en el trencament de substrats cromogènics, DEVD-pNA, IETD-pNA i LEHD-pNA per les caspases 3, 8 i 9, respectivament.

El protocol es presenta adaptat per a cèl·lules CCD-18Co tractades amb PE5 i NLSPE5:

1. Se sembren les cèl·lules (600.000 cèl·lules/placa 100 mm) en 8 ml de medi DMEM 10% FBS i s'incuben durant 24 h a 37 °C i 5% CO₂.
2. Es tracten les cèl·lules amb PE5 o NLSPE5 durant 48 i 72 h a 37 °C i 5% CO₂ en medi privat de sèrum (0,5% FBS).
3. Es recullen les cèl·lules adherents i flotants i se centrifuguen a 460 xg durant 10 min a 4 °C.

MATERIALS I MÈTODES

4. Es fan dos rentats amb PBS fred i se centrifuga a 21.500 xg durant 10 min a 4 °C, es descarta el sobrenedant i en aquest punt es poden emmagatzemar els pellets a -20 °C.
5. Es resuspenen les cèl·lules amb tampó de lisi fred i s'incuben en gel durant 10 min.
6. Se centrifuguen els lisats a 10.000 xg durant 5 min a 4 °C per precipitar les restes cel·lulars i es recull el sobrenedant.
7. Es determina la concentració total de proteïna dels extractes cel·lulars pel mètode de Bradford i s'ajusta la concentració de proteïna a 20 µg/10 µl en tampó de lisi.
8. S'afegeix DTT al 2x Reaction Buffer del kit comercial de manera que la concentració final sigui de DTT 10 mM.
9. Es barreja per a cada tub Eppendorf: 10 µl de 2x Reaction Buffer DTT 10 mM, 10 µl de lisat (20 µg de proteïna total) i 1 µl del substrat de la caspasa corresponent (DEVD-pNA, IETD-pNA o LEHD-pNA 10 mM) a cada tub.
10. S'incuben les mostres a 37 °C durant 4 h. La reacció es mesura pels canvis en l'absorbància a 405 nm. Totes les dades estan expressades com la mitjana ± la desviació estàndard d'almenys tres experiments independents amb tres rèpliques cadascun.

3.6.5.5. Anàlisi de l'expressió proteica per Western blot

El procés per a la realització d'un Western blot a partir de lisats (fracció cel·lular total) de la línia CCD-18Co és el següent:

1. Se sembren les cèl·lules (360.000 cèl·lules/placa 100 mm) i al cap de 24 h se les tracta amb PE5 o amb NLSPE5 durant 72 h (els tractaments han de provocar en tots els casos una disminució del 50% en la proliferació cel·lular (IC₅₀)).
2. Es recullen les cèl·lules i se centrifuguen a 400 xg durant 5 min a 4 °C.
3. Es fan dos rentats amb PBS fred, se centrifuguen a 18.000 xg 10 min a 4 °C i es descarta el sobrenedant. En aquest punt es poden congelar els sediments a -80 °C.
4. Es resuspèn el sediment amb 200-250 µl de tampó de lisi 1x vortejant fins que estigui totalment resuspès. El tampó de lisi comercial es troba concentrat 10x (Cell Signaling Technology, EUA), de manera que per cada 100 µl de tampó 10x, cal afegir-hi 890 µl d'aigua milliQ i 10 µl de PMSF.
5. Es mantenen en gel durant 30 min i es vortegen cada 4-5 min.
6. Se centrifuguen les mostres a 18.000 xg 10 min a 4 °C.

MATERIALS I MÈTODES

7. Es descarta el sediment i es determina la concentració total de proteïna mitjançant el mètode de Bradford.
8. Es preparen les mostres en funció de la quantitat de proteïna que es vulgui carregar en un gel SDS-PAGE. En aquest treball, s'han carregat 25 µg per a la quantificació de la β-actina, p-JNK i Bax, 40 µg per a la quantificació de Bcl-2 o 50 µg per a la quantificació de la ciclina D₁, ciclina E, p21, JNK i XIAP.
9. Es preparen els gels SDS-PAGE al 12,5 % d'acrilamida, es carreguen les mostres i es fan córrer les electroforesis tal i com s'explica a l'apartat 3.6.3.
10. S'activa la membrana de PVDF (Millipore, EUA) submergint-la en metanol 100% durant 15 s i després rentant-la amb aigua milliQ durant 2 min.
11. Se submergeix la membrana activada i les esponges en tampó d'electrotransferència (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, metanol 20% v/v, pH 8,3) durant almenys 5 min. Es submergeixen també els papers Whatman almenys 30 s.
12. Es munta el sistema d'electrotransferència segons l'ordre següent a partir del càtode o pol negatiu (eliminant les possibles bombolles): esponja, paper Whatman, gel de poliacrilamida, membrana activada, paper Whatman i esponja.
13. Es col·loca el sistema dins la cubeta d'electrotransferència, s'hi posa també una unitat refrigerant i una barra magnètica, i s'omple la cubeta amb tampó d'electrotransferència.
14. Es connecta la font d'alimentació i es deixa l'electrotransferència 2 h a 100 V a 4 °C.
15. Finalitzada la transferència, cal comprovar que els marcadors s'han transferit bé.
16. Se submergeix la membrana de PVDF en tampó TBST (Tris-HCl 10 mM; NaCl 100 mM; Tween-20 0,1%; pH 7,5) durant 5 min a temperatura ambient.
17. S'elimina el tampó de rentat, s'hi afegeix 10 ml de tampó de bloqueig o BLOTTO (tampó TBST 3% llet en pols) i s'incuba durant 1 hora a temperatura ambient i amb agitació.
18. S'elimina el tampó de bloqueig i es renta una mica la membrana amb TBST per eliminar l'excés de llet.
19. S'incuba la membrana a 4 °C O/N amb l'anticòs primari diluït en 6 ml de BLOTTO. Els anticossos primaris contra Bcl-2 (# sc-7382; dilució 1:500), Bax (# sc-7480; dilució 1:1.000), ciclina D₁ (# sc-20044; dilució 1:500), ciclina E (# sc-247; dilució 1:500), p21^{WAF1/CIP1} (# sc-6246; dilució 1:100), p27^{KIP1} (# sc-1641; dilució 1:200), JNK (# sc-7345; dilució 1:100), p-JNK (# sc-6254; dilució 1:1.000) i β-actina (# sc-8432; dilució 1:400) s'han obtingut de Santa Cruz Biotechnology

MATERIALS I MÈTODES

(Santa Cruz, EUA). L'anticòs primari contra XIAP (# 610716; dilució 1:4.000) s'ha obtingut de BD Transduction Laboratories, EUA.

20. Es descarta la solució d'anticòs primari i es fan tres rentats de 5 min cadascun amb TBST a temperatura ambient i amb agitació.
21. Es preparen 30 ml d'una dilució 1:30.000 de l'anticòs secundari *Goat Anti-Mouse IgG Peroxidase Conjugate* (Calbiochem, Alemanya) en tampó de bloqueig, s'hi afegeix a la membrana i s'incuba durant 1 h a temperatura ambient i amb agitació.
22. S'elimina l'anticòs secundari i es renta la membrana tres vegades durant 5 min amb TBST a temperatura ambient i amb agitació.
23. Es barregen 2 ml de la dissolució A (substrat de la peroxidasa, conté luminol) amb 2 ml de la dissolució B (conté peròxid d'hidrogen) del kit quimioluminiscent Immobilon™ Western (Millipore, EUA).
24. S'aboca la dissolució de detecció sobre la membrana i s'incuba durant 5 min a temperatura ambient i sense agitació.
25. S'asseca la membrana amb paper de filtre i se la col·loca entre dos plàstics transparents.
26. Es revela amb una càmera CCD. Les imatges s'han capturat amb el sistema FluorChem SP (Alpha Innotech, EUA).

L'anàlisi quantitatiu es basa en la intensitat de banda fent servir el programa Quantity One (Bio-Rad Laboratories, EUA). La linealitat de l'assaig ha sigut comprovada prèviament per cada anticòs monoclonal assajant diferents quantitats d'extractes cel·lulars sense tractar per Western blot. Totes les dades estan expressades com la mitjana \pm la desviació estàndard d'almenys tres experiments independents amb tres rèpliques cadascun.

3.6.5.6. Separació de les fraccions nuclear i citoplasmàtica de cèl·lules tractades amb ND-RNases

El procés per analitzar l'expressió proteica diferencial del nucli i del citoplasma cel·lulars de la línia cel·lular CCD-18Co, utilitzant el kit PARIS (Life Technologies, EUA) va ser el següent:

1. Se sembren les cèl·lules (370.000 cèl·lules/placa 100 mm) i al cap de 24 h se les tracta amb una concentració equivalent a l'IC₅₀ de PE5 o NLSPE5 durant 72 h.
2. Es recullen les cèl·lules i se centrifuguen a 400 xg durant 5 min a 4 °C.

MATERIALS I MÈTODES

3. Es renten amb PBS fred, se centrifuguen a 400 xg 5 min a 4 °C i es descarta el sobrenedant. Es resuspenen suaument les cèl·lules amb 100-150 µl de *Cell Fractionation Buffer*, en funció de la concentració proteica del lisat desitjada.
4. S'incuba en gel durant 10 min.
5. Se centrifuguen les mostres a 500 xg durant 5 min a 4 °C.
6. Se separa amb cura la fracció citoplasmàtica (sobrenedant) de la fracció nuclear (sediment).
7. Es renta el sediment nuclear amb el mateix volum de *Cell Fractionation Buffer* utilitzat en el punt 4 per evitar la contaminació de la fracció nuclear amb components de la fracció citoplasmàtica.
8. S'afegeix entre 37-75 µl de *Cell Disruption Buffer* al sediment nuclear, en aquest cas interessa concentrar el lisat nuclear el màxim possible perquè la relació nucli:citoplasma es troba entre 1:2 i 1:4. Es pipeteja vigorosament per lisar els nuclis.
9. S'incuba la fracció nuclear en gel durant 10 min.
10. Se centrifuguen les mostres a 20.500 xg durant 2 min a 4 °C. Les fraccions es van emmagatzemar a -20 °C durant una setmana o bé a -80 °C durant dues setmanes.
11. Es determina la concentració proteica pel mètode del Bradford i realitzar el Western blot tal i com es descriu a l'apartat 3.6.5.5.

Per a la determinació de l'expressió proteica del citoplasma s'han utilitzat les mateixes dilucions d'anticossos primaris i secundari descrites a l'apartat anterior. En el cas de la fracció nuclear, s'ha utilitzat una dilució el doble de concentrada que l'establerta a l'apartat anterior.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Anàlisi de la selectivitat de PE5 i NLSPE5 per a cèl·lules tumorals

En treballs anteriors del grup de recerca es van construir dues variants de l'HP-RNasa dirigides a nucli que eren citotòxiques per a un ventall molt ample de línies cel·lulars tumorals. Així mateix es va observar que presentaven citotoxicitat selectiva, però el nombre de línies cel·lulars no tumorals assajat fins a la realització de la present Tesi era limitat [66]. Per aquest motiu, un dels objectius ha estat determinar el mecanisme molecular de la citotoxicitat de les ND-RNases sobre cèl·lules no tumorals i comparar-lo amb el de cèl·lules tumorals.

4.1.1. Assaigs de citotoxicitat

En aquest treball s'ha mesurat la citotoxicitat de les ND-RNases (PE5 i NLSPE5), utilitzant l'assaig d'MTT, sobre les línies cel·lulars no tumorals indicades a la Taula 4.1, ampliant l'estudi inicial realitzat sobre cèl·lules no tumorals de fibroblast NI [66]. En aquest estudi es va incloure l'onconasa per poder comparar els resultats atès que està descrit que *in vitro* presenta una bona selectivitat [7], i es va treballar amb línies cel·lulars tumorals a efectes de comparació [109]. A la taula 4.1 es presenten els valors d'IC₅₀ obtinguts per a un panell de quatre línies cel·lulars tumorals i quatre línies cel·lulars no tumorals.

Taula 4.1. Valors d'IC₅₀ (µM) de l'onconasa, PE5 i NLSPE5 per a les línies cel·lulars indicades. Els resultats es mostren com la mitjana ± desviació estàndard d'almenys tres experiments independents amb tres rèpliques cadascun. Les línies cel·lulars NCI-H460, OVCAR-8, NCI/ADR-RES i HeLa són línies tumorals. Les línies cel·lulars HaCaT, CCD-18Co, HEK-293 i IBR.3.G són línies no tumorals.

Línia cel·lular	Onconasa (µM)	PE5 (µM)	NLSPE5 (µM)
NCI-H460	0,40 ± 0,06 ^a	0,57 ± 0,16	0,15 ± 0,05
OVCAR-8	0,54 ± 0,08 ^a	3,32 ± 0,59 ^a	0,24 ± 0,04 ^a
NCI/ADR-RES	1,18 ± 0,17 ^a	8,91 ± 1,31 ^a	0,96 ± 0,05 ^a
HeLa	0,15 ± 0,02 ^a	1,74 ± 0,27 ^a	0,26 ± 0,04 ^a
HaCaT	0,70 ± 0,09	11,39 ± 0,33	0,92 ± 0,14
CCD-18Co	0,56 ± 0,10	21,00 ± 1,78	5,42 ± 2,99
HEK-293	0,28 ± 0,05	6,78 ± 0,50	0,74 ± 0,18
IBR.3.G	0,50 ± 0,13	6,29 ± 3,07	0,75 ± 0,10

^a Valors extrets de Vert i col·laboradors [109].

Com es pot observar, l'onconasa presenta valors d'IC₅₀ per a línies cel·lulars tumorals i no tumorals que no difereixen significativament. En canvi, tant per PE5 com per NLSPE5, depenent de la línia no tumoral i tumoral comparades, la relació de valors d'IC₅₀ no tumoral/tumoral arriba a ser d'unes 36-37 vegades. Aquest fet suggereix que les ND-RNases poden presentar una selectivitat per a cèl·lules tumorals superior a la de l'onconasa.

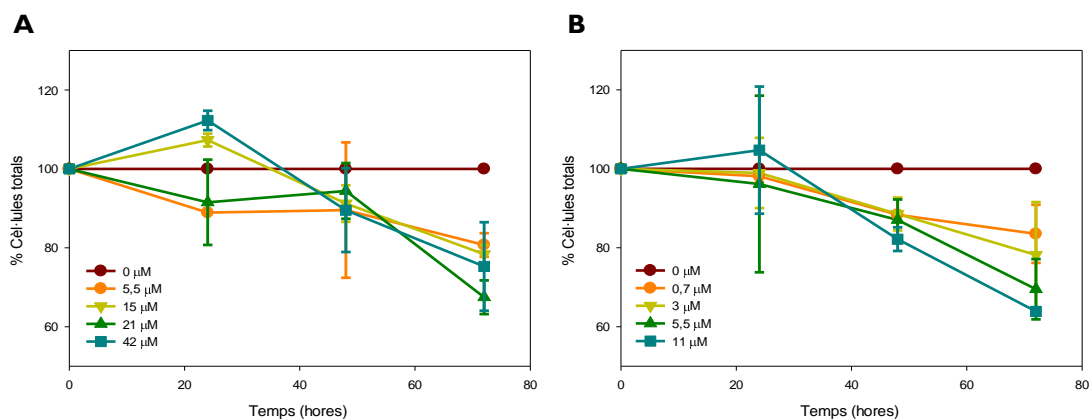
Una vegada ampliat l'estudi de la citotoxicitat de PE5 i NLSPE5 amb més línies cel·lulars no tumorals i havent corroborat la seva citotoxicitat selectiva, a continuació es va investigar com aquestes RNases afectaven les cèl·lules no tumorals i es va comparar amb el que es coneixia sobre les cèl·lules tumorals, amb la finalitat de determinar el seu mecanisme de selectivitat. Aquest estudi es va realitzar sobre la línia cel·lular CCD-18Co, ja que era la menys sensible a les ND-RNases i, a la vegada, era la línia que presentava el temps de duplicació més gran, cosa que indicava que tenia el comportament més allunyat de les cèl·lules tumorals.

4.1.2. Estudi de l'efecte de les ND-RNases sobre la proliferació i la viabilitat cel·lular

L'assaig d'MTT no permet diferenciar si l'efecte d'aquestes RNases sobre cèl·lules és a causa d'un efecte citotòxic o citostàtic, per tant, es va investigar el seu efecte sobre la proliferació i la viabilitat cel·lular. Estudis previs havien demostrat que PE5 presentava un efecte majoritàriament citotòxic en la línia cel·lular tumoral NCI/ADR-RES [66], tot i que a concentracions baixes també s'observava un efecte citostàtic. NLSPE5 va presentar un comportament similar sobre la línia cel·lular NCI-H460/R [154]. La Figura 4.1 mostra l'efecte de quatre concentracions diferents de PE5 i NLSPE5 sobre la proliferació i la viabilitat de les cèl·lules CCD-18Co al llarg de 72 h d'incubació.

Tal i com es pot veure a la Figura 4.1, a les 24 h de tractament no hi ha un efecte clar respecte a les cèl·lules no tractades. L'efecte d'ambdues ND-RNases sobre la proliferació i la viabilitat de les cèl·lules CCD-18Co es pot observar clarament a partir de les 48 h de tractament i augmenta a les 72 h. En general, tant en el tractament amb PE5 com amb NLSPE5 es produeix una disminució de les cèl·lules totals en el cultiu que és paral·lel al de cèl·lules viables a diferents temps d'incubació, sigui quina sigui la concentració d'RNasa que es faci servir. Això indica que ambdues RNases tenen principalment un efecte citotòxic sobre les cèl·lules no tumorals. Tot i això, PE5 presenta una lleugera capacitat d'aturar la proliferació cel·lular a baixes concentracions.

Proliferació



Viabilitat

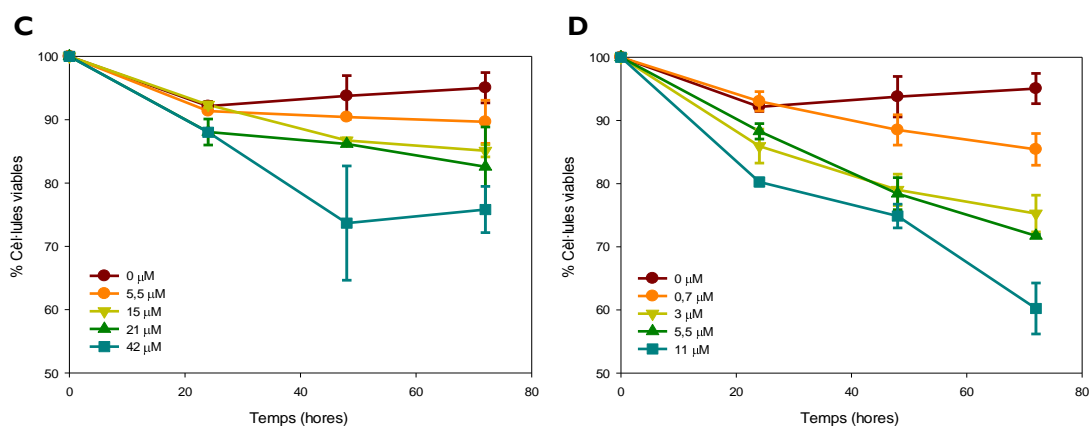


Figura 4.1. Efectes sobre la proliferació i la viabilitat de la línia cel·lular CCD-18Co causats pel tractament amb PE5 i NLSPE5. Les cèl·lules van ser tractades amb diferents concentracions de PE5 (A i C) o de NLSPE5 (B i D) i es van estimar els efectes a les 0, 24, 48 i 72 h després d'iniciar el tractament. La proliferació i la viabilitat cel·lular es van determinar mitjançant el comptatge de cèl·lules tal i com s'ha descrit a l'apartat 3.6.5.2. Els punts representen les mitjanes \pm desviació estàndard d'almenys 3 experiments independents.

Si es comparen els efectes descrits de PE5 i NLSPE5 sobre les línies cel·lulars tumorals (PE5 sobre la línia NCI/ADR-RES [66] i NLSPE5 sobre la línia NCI-H460/R [154]) i sobre la no tumoral CCD-18Co, s'observa que aquestes dues ND-RNases tenen un comportament similar independentment de la línia cel·lular. Un fet interessant és que en cèl·lules no tumorals els efectes es comencen a detectar més tard que en cèl·lules tumorals. En cèl·lules tumorals els efectes de les ND-RNases a la concentració més elevada ja es detecten al cap de 24 h de tractament [66, 154], mentre que en cèl·lules CCD-18Co els efectes són patents al cap de 48 h.

Per altra banda, és interessant destacar que en tractar aquestes cèl·lules durant 72 h amb concentracions d'ND-RNases equivalents a la seva IC_{50} , ni la proliferació ni la viabilitat

reflectides al gràfic arriben al 50%. Tot i això, si es multipliquen els valors del percentatge de cèl·lules totals que queden pel percentatge de cèl·lules viables a concentracions equivalents a l'IC₅₀, el resultat obtingut es troba al voltant d'un 50%, tant per PE5 com per NLSPE5. Aquest resultat és lògic ja que el valor d'IC₅₀ obtingut de les corbes de citotoxicitat mesura l'activitat metabòlica de cèl·lules que poden estar afectades per l'ND-RNasa sense que estiguin mortes. El valor d'IC₅₀ no és un reflex de la quantitat de cèl·lules presents a l'assaig de viabilitat ni tampoc al de proliferació atès que en el primer es mesuren les cèl·lules viues exclusivament mentre que en el de proliferació es mesura el nombre total de cèl·lules, tant viues com mortes. Per tant, es mesuren conceptes diferents.

4.1.3. Anàlisi de l'efecte de PE5 i NLSPE5 sobre la distribució de fases del cicle cel·lular

S'ha descrit que en cèl·lules tumorals la mort cel·lular induïda per les ND-RNases va acompanyada d'una acumulació de cèl·lules en les fases del cicle cel·lular S i G₂/M que pot interpretar-se de dues maneres. Les ND-RNases aturen el cicle cel·lular de les cèl·lules tumorals a les fases S i G₂/M o bé provoquen mort cel·lular a la fase G₁ del cicle cel·lular, la qual cosa porta a un increment de les cèl·lules a les fases S i G₂/M [66, 154]. Atès que els resultats presentats a la Figura 4.1 ens indiquen que les ND-RNases no aturen la proliferació cel·lular sinó que tenen efectes citotòxics, seria d'esperar un comportament similar per part de les cèl·lules no tumorals estudiades tractades amb PE5 i NLSPE5.

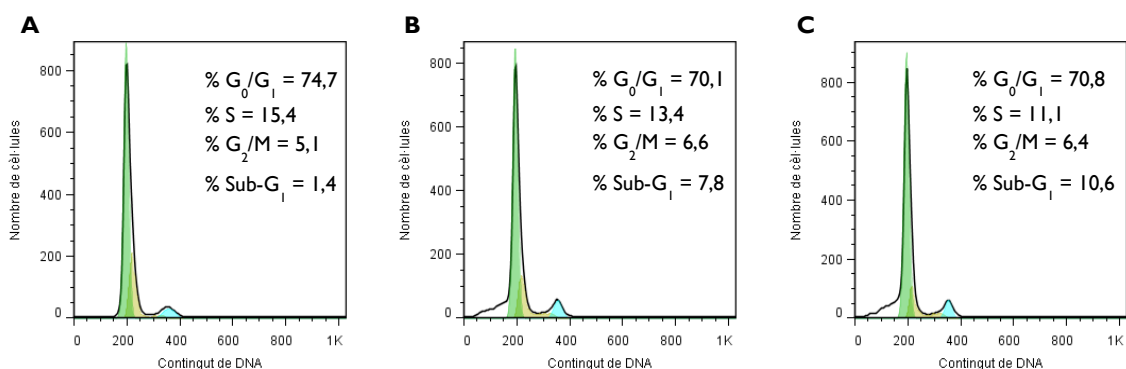


Figura 4.2. Efectes de PE5 i NLSPE5 sobre la distribució de fases del cicle cel·lular de la línia CCD-18Co després de 72 h de tractament. Distribució del contingut de DNA de **A)** cèl·lules sense tractar, **B)** de cèl·lules tractades amb 42 μM de PE5 i **C)** de cèl·lules tractades amb 11 μM de NLSPE5. Les cèl·lules van ser permeabilitzades, tenyides amb PI i el contingut de DNA cel·lular va ser analitzat per citometria de flux tal i com s'ha descrit a l'apartat 3.6.5.3. Els resultats són representatius de tres assaigs independents. Es van analitzar valors obtinguts a partir de com a mínim 10.000 cèl·lules de la població seleccionada.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Així doncs, es va investigar l'efecte que produïa sobre la progressió del cicle cel·lular de la línia CCD-18Co una concentració de PE5 o NLSPE5 equivalent a dues vegades la seva IC_{50} . La distribució de fases obtinguda en cada cas es troba representada a la Figura 4.2. Els resultats ens indiquen que la mort cel·lular es dona en totes les fases del cicle cel·lular ja que no s'aprecia cap canvi de distribució respecte a les cèl·lules control (Figura 4.2). Per tant, els efectes de les ND-RNases sobre les cèl·lules no tumorals són independents de la fase del cicle cel·lular en què es trobin a diferència del que passa amb les cèl·lules tumorals [66, 154].

Paral·lelament a aquesta anàlisi, es va dur a terme un estudi per Western blot de com el tractament amb les dues ND-RNases afectava l'expressió de diferents proteïnes relacionades amb el cicle cel·lular. En concret, es van seleccionar les ciclines D_1 i E i els inhibidors de ciclines $p21^{WAF1/CIP1}$ i $p27^{KIP1}$. En cèl·lules tumorals, PE5 i NLSPE5 indueixen un increment de l'expressió de la ciclina E i de $p21^{WAF1/CIP1}$ [66, 109]. Com es pot veure a la Figura 4.3, en la línia CCD-18Co PE5 incrementa lleugerament l'expressió de $p27^{KIP1}$ (en un $132\% \pm 27$) respecte al control, mentre que els nivells de les ciclines D_1 i E i $p21^{WAF1/CIP1}$ romanen inalterats. NLSPE5 incrementa l'expressió de la ciclina D_1 en un $141\% \pm 14$, el de la ciclina E en un $208\% \pm 34$, el de $p27^{KIP1}$ en un $190\% \pm 52$ i el de $p21^{WAF1/CIP1}$ en un $151\% \pm 5$, respecte a les cèl·lules sense tractar. Així doncs, els resultats ens indiquen que els efectes de les dues ND-RNases sobre l'acumulació de diferents proteïnes relacionades amb la gestió del cicle cel·lular en la línia no tumoral són diferents (Figura 4.3).

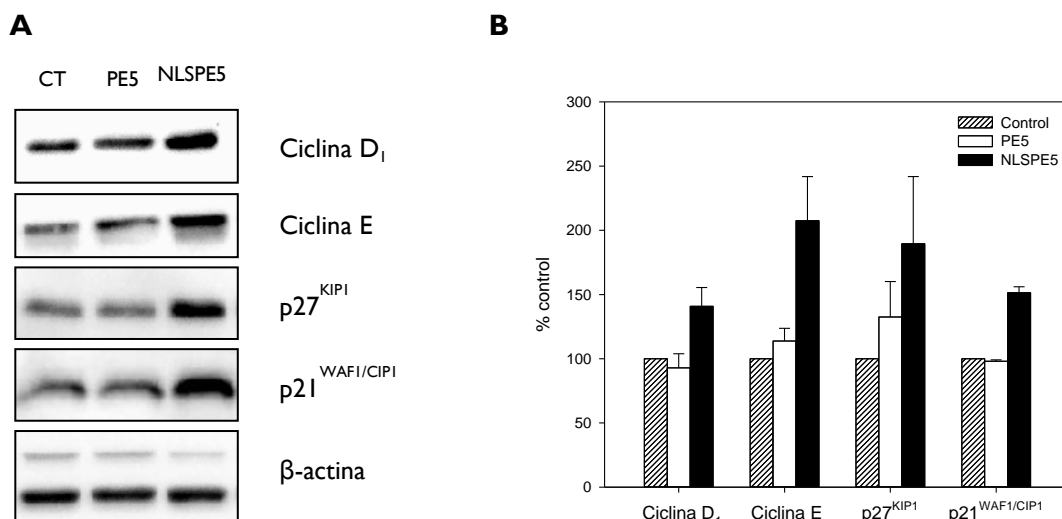


Figura 4.3. Expressió a la fracció cel·lular total de la ciclina D_1 , la ciclina E, $p27^{KIP1}$ i $p21^{WAF1/CIP1}$ en cèl·lules CCD-18Co tractades amb $21 \mu M$ de PE5 o $5,5 \mu M$ d'NLSPE5. Després de 72 h de tractament, les cèl·lules es van recollir i analitzar per Western blot utilitzant els anticossos monoclonals descrits a l'apartat 3.6.5.5. **A)** Western blot d'un experiment representatiu. **B)** Anàlisi densitomètrica normalitzada respecte a l'expressió de la β -actina per a cada tractament. Els valors representen les mitjanes d'almenys tres experiments independents.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

La progressió del cicle cel·lular depèn de l'activació dels complexos ciclina-quinasa dependent de ciclina (CDK), els quals actuen conjuntament a la fase G_1 i G_2 per activar la S i la mitosi, respectivament. Un dels mecanismes de regulació d'aquest procés és a través de la inhibició dels complexos per part dels inhibidors de CDK (CKI). Els CKIs de la família Cip/Kip s'uneixen tant a les ciclines com a les CDK i poden modular l'activitat de les ciclines D, E, A i B unides a les respectives CDKs [161].

Malgrat que els resultats del Western blot indiquen que hi ha canvis en l'expressió d'algunes proteïnes implicades en la gestió del cicle cel·lular, les ND-RNases no modifiquen la distribució de fases d'aquest cicle en la línia CCD-18Co. Aquests resultats es poden explicar de la següent manera. Per PE5, el fet que cap de les dues ciclines incrementi la seva expressió i el lleuger increment de l'expressió de l'inhibidor dels complexos CDK-ciclina, $p27^{KIP1}$, pot explicar que la distribució de cèl·lules a les diferents fases del cicle cel·lular no hagi variat. Així mateix, per NLSPE5, l'increment de $p21^{WAF1/CIP1}$ i $p27^{KIP1}$, ambdós inhibidors dels complexos CDK-ciclina E o D_1 , els quals són els responsables principals de la transició de G_1 a S [162, 163], podria explicar que el patró de fases del cicle cel·lular fos igual al control no tractat. És a dir, en aquest segon cas, l'increment de ciclines es podria veure contrarestat per l'increment dels inhibidors dels complexos CDK-ciclina.

A causa de la capacitat de $p21^{WAF1/CIP1}$ i $p27^{KIP1}$ d'aturar la progressió del cicle cel·lular, se'ls sol considerar com a supressors de tumors. No obstant això, en els últims anys s'ha fet evident que aquesta família de CKIs presenten altres funcions més enllà de la regulació del cicle cel·lular, incloent efectes en la transcripció, l'apoptosi i la migració cel·lular, algunes de les quals s'exerceixen en el citosol (revisat a [164]). Per aquest motiu es va decidir estudiar l'expressió de ciclina D_1 , $p27^{KIP1}$ i $p21^{WAF1/CIP1}$ a nucli i a citoplasma (Figura 4.4) amb la finalitat de veure si aquest increment d'expressió es donava preferentment en un dels dos compartiments de la cèl·lula. Es van separar les dues fraccions i es va dur a terme una anàlisi de l'expressió de les proteïnes esmentades a la fracció nuclear i a la citoplasmàtica. Els primers experiments, emprant les mateixes quantitats de proteïna aplicada a l'electroforesi i dilució d'anticòs van permetre observar la variació de l'expressió en el citoplasma però en la fracció nuclear no es detectaven les diferents proteïnes. Pel que fa a la fracció nuclear es van assajar múltiples condicions, però no va ser possible obtenir uns resultats en què el senyal fos suficientment intens sobre el soroll de fons per poder determinar uns valors de variació d'expressió fiables. Per això, només es mostren els resultats obtinguts a partir de la fracció citoplasmàtica, els quals s'han determinat seguint les mateixes condicions emprades per assajar la fracció total. Tal i com es pot observar a la Figura 4.4, en el citoplasma de cèl·lules tractades

RESULTATS I DISCUSSIÓ

amb PE5 es veu un increment de p27^{KIP1} en un 285% ± 50 mentre que les expressions de la ciclina D₁ i de p21^{WAF1/CIP1} no canvien. En el cas d'NLSPE5, s'observa un increment en el citoplasma de la ciclina D₁ d'un 198% ± 20; de p27^{KIP1} d'un 320% ± 97 i de p21^{WAF1/CIP1} d'un 215% ± 21.

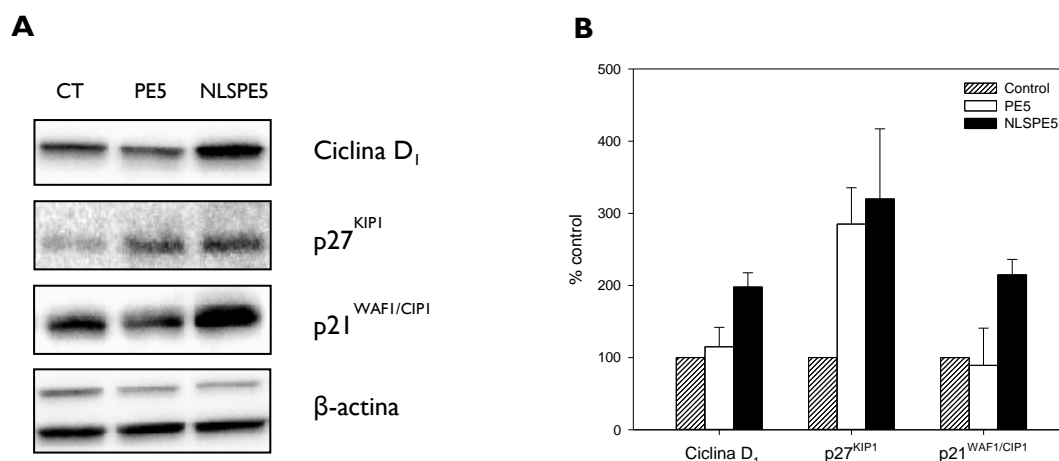


Figura 4.4. Variació del nivell d'expressió citoplasmàtica de la ciclina D₁, p27^{KIP1} i p21^{WAF1/CIP1} en cèl·lules CCD-18Co tractades amb 21 µM de PE5 o 5,5 µM d'NLSPE5. Després de 72 h de tractament, les cèl·lules es van recollir, es va separar la fracció citoplasmàtica i es va analitzar per Western blot el grau d'expressió de les proteïnes indicades utilitzant els anticossos monoclonals, tal i com s'ha descrit a l'apartat 3.6.5.6. **A)** Western blot d'un experiment representatiu. **B)** Anàlisi densitomètrica normalitzada respecte a l'expressió de la β-actina per a cada tractament. Els valors representen les mitjanes d'almenys tres experiments independents.

Com es pot veure, els efectes de les dues ND-RNases sobre l'acumulació en el citoplasma de diferents proteïnes relacionades amb la gestió del cycle cel·lular a la línia no tumoral són paral·lels als que es produeixen en la fracció cel·lular total (Figura 4.3). PE5 augmenta lleugerament l'expressió de p27^{KIP1}, mentre que NLSPE5 provoca l'augment de la ciclina D₁, p21^{WAF1/CIP1} i p27^{KIP1} (Figura 4.4). Per tant, aquests resultats suggereixen que els efectes d'aquestes proteïnes podrien no estar relacionats amb la gestió del cycle cel·lular, fet que també podria explicar que la distribució de cèl·lules a cada fase del cycle cel·lular no hagi canviat amb el tractament.

4.1.4. Caracterització de l'apoptosi induïda per PE5 i NLSPE5

Es va estudiar si la citotoxicitat induïda per les ND-RNases es produïa per un mecanisme d'apoptosi. Per aquest motiu es va investigar el nivell d'activació de diferents procaspases i el canvi d'expressió de diferents proteïnes implicades en l'apoptosi. Primerament, es va analitzar el nivell d'activació de les procaspases 3, 8 i 9 en la línia cel·lular no tumoral

RESULTATS I DISCUSSIÓ

CCD-18Co després del tractament amb 42 μM de PE5 o 11 μM d'NLSPE5 (Figura 4.5). Com es pot observar, PE5 i NLSPE5 indueixen l'activació de les procaspases iniciadores 8 i 9 i la procaspasa executora 3, tal i com s'ha descrit prèviament en cèl·lules tumorals [66, 109]. Tant PE5 com NLSPE5 promouen l'activació de les tres procaspases a les 48 h de tractament essent el nivell d'activació lleugerament superior en el cas d'NLSPE5. No obstant això, el perfil d'activació és lleugerament diferent. En el cas de PE5 el nivell d'activació augmenta fins almenys les 72 h, mentre que en el cas d'NLSPE5 es produeix la màxima activació a les 48 h. Aquests resultats semblen indicar que el tipus de procaspases activades i la seva seqüència d'activació induïts per ambdues RNases són els mateixos, tot i que els temps d'activació poden variar lleugerament.

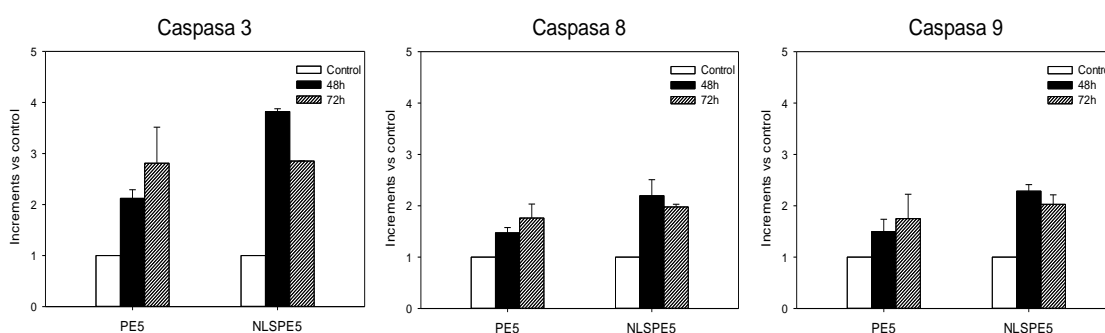


Figura 4.5. Activació de les procaspases 3, 8 i 9 en cèl·lules CCD-18Co tractades amb PE5 o NLSPE5. Les cèl·lules van ser incubades amb 42 μM de PE5 i 11 μM d'NLSPE5 durant 48 h (barres negres) o 72 h (barres ratllades). L'activitat catalítica d'aquestes caspases va ser mesurada en lisats de cèl·lules senceres utilitzant un assaig de detecció colorimètric quantitatiu, tal i com s'ha descrit a l'apartat 3.6.5.4. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm desviació estàndard de tres experiments independents.

Aquest resultat és molt interessant, perquè en el desenvolupament d'un fàrmac antitumoral és important que la mort cel·lular induïda per aquest sigui a través d'apoptosi, ja que si fos a través de necrosi podria provocar inflamació o complicacions immunitàries als pacients, fet que dificultaria la seva aplicabilitat en clínica. És interessant destacar que el grau d'activació de les diferents procaspases respecte a les cèl·lules control (Figura 4.5) és dos o tres vegades inferior al que s'observa en les cèl·lules tumorals NCI/ADR-RES tractades amb concentracions similars de les RNases [66, 109]. Per altra banda, el màxim d'activació s'observa entre les 48 i 72 hores per NLSPE5 i probablement per PE5 tal i com s'havia descrit anteriorment en cèl·lules tumorals [66, 109]. L'elevat temps requerit per assolir la màxima activació és un reflex que aquestes ND-RNases exerceixen la seva acció a través de canvis en l'expressió gènica [66, 105, 108] més que no pas a través de canvis en la senyalització cel·lular que tindrien efectes més immediats.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

També es va caracteritzar per Western blot l'efecte produït en tractar cèl·lules CCD-18Co amb 21 μM de PE5 o 5,5 μM d'NLSPE5, durant 72 h, sobre el nivell d'expressió de Bcl-2, Bax, XIAP, JNK i la forma fosforilada de p46 JNK (Figura 4.6). És de destacar que les dues RNases promouen un patró d'expressió diferent d'algunes proteïnes relacionades amb l'apoptosi en aquesta línia cel·lular no tumoral. Els nivells de XIAP, JNK i p-JNK romanen inalterats quan es tracten les cèl·lules amb qualsevol de les dues ND-RNases. En canvi, el tractament amb PE5 provoca una disminució de Bcl-2 ($63\% \pm 14$) acompanyada d'un increment de Bax ($127\% \pm 28$) que no s'observa en el cas del tractament amb NLSPE5.

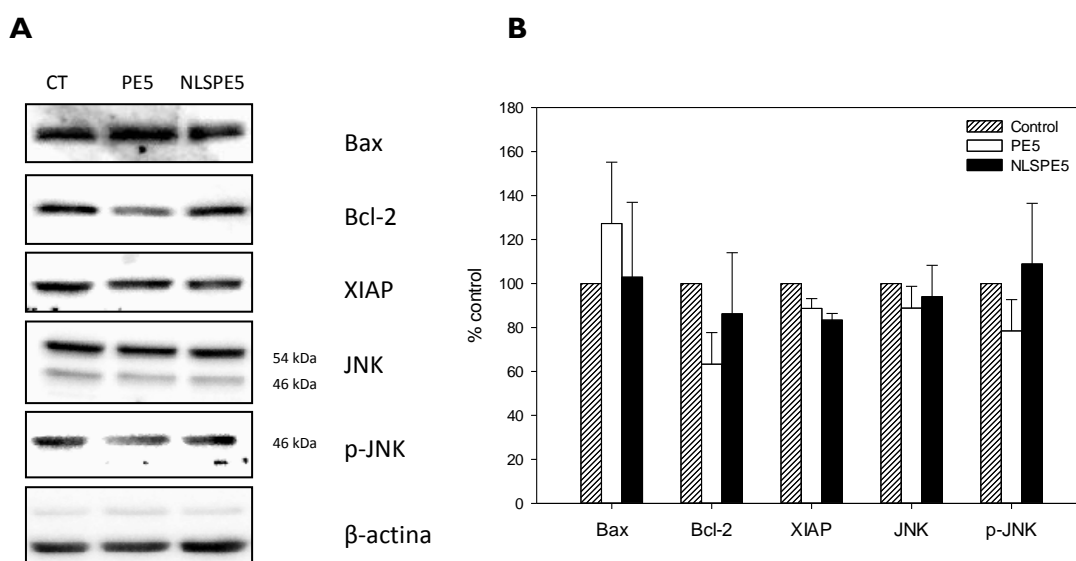


Figura 4.6. Variació del nivell d'expressió de Bax, Bcl-2, XIAP, JNK i p-JNK en cèl·lules CCD-18Co tractades amb 21 μM de PE5 o amb 5,5 μM d'NLSPE5. Després de 72 h de tractament, les cèl·lules es van recollir i analitzar per Western blot utilitzant els anticossos monoclonals descrits a l'apartat 3.6.5.5. **A)** Western blot d'un experiment representatiu. En el cas de JNK s'indiquen les dues isoformes de 46 i 54 kDa respectivament. **B)** Anàlisi densitomètrica normalitzada respecte a l'expressió de la β -actina per a cada tractament. Els valors representen les mitjanes d'almenys tres experiments independents.

Se sap que Bcl-2 bloqueja l'apoptosi sense afectar la proliferació cel·lular i la seva expressió en diversos tumors malignes s'ha associat a un resultat clínic més favorable [165]. En canvi, des que es va descobrir que Bax, una altra proteïna membre de la família Bcl-2, promou l'apoptosi, es va proposar el quocient Bax/Bcl-2 per calcular el grau de susceptibilitat de les cèl·lules a l'apoptosi [166, 167]. En el cas de cèl·lules no tumorals tractades amb PE5, el valor d'aquest quocient és de $2 \pm 1,04$. Per tant, tal i com s'ha descrit en altres treballs [168, 169], un valor >1 és indicatiu que les cèl·lules han entrat en apoptosi. Tot i que és difícil d'explicar, aquest resultat podria suggerir que els mecanismes d'activació de l'apoptosi per part de les dues ND-RNases són diferents quan es tracten cèl·lules no tumorals, en contraposició amb el

que s'havia observat anteriorment en tractar cèl·lules tumorals [66, 109]. Aquesta diferència també es fa palesa en analitzar els efectes de les dues ND-RNases sobre diferents proteïnes relacionades amb la gestió del cicle cel·lular (Figura 4.3).

4.1.5. La selectivitat de les ND-RNases està condicionada per la sobreexpressió de p27^{KIP1} i/o p21^{WAF1/CIP1}

Tal i com s'ha descrit, les proteïnes p21^{WAF1/CIP1} i p27^{KIP1}, components de la família d'inhibidors Cip/Kip, van ser inicialment identificades com a inhibidors del cicle cel·lular. No obstant, actualment se sap que també estan implicades en altres processos [170]. La regulació de les Cip/Kip es produeix a través d'una intricada i complexa xarxa de fosforilacions que altera la seva localització subcel·lular, les interaccions amb altres proteïnes i també la seva estabilitat (revisat a [171, 172]), fet que explica que les seves funcions puguin ser diverses i en alguns casos oposades. A més, poden variar depenent del tipus cel·lular i de l'estat de transformació de les cèl·lules. Així, s'ha observat que en cèl·lules tumorals la inducció de p27^{KIP1} i/o de p21^{WAF1/CIP1} pot tant afavorir com promoure la resistència a l'apoptosi [173-176].

PE5 i NLSPE5 produeixen un augment de l'expressió de p27^{KIP1} en les cèl·lules no tumorals CCD-18Co, i aquest augment es localitza majoritàriament al citoplasma, tal i com s'observa a la Figura 4.4. Els canvis induïts en p27^{KIP1} són remarcables ja que d'acord amb estudis previs del grup no tenen lloc en cèl·lules tumorals [66, 109]. L'acumulació de p27^{KIP1} al citoplasma explicaria perquè les cèl·lules CCD-18Co tractades amb les ND-RNases són més resistents a l'apoptosi i, per tant, permetria entendre la selectivitat per a cèl·lules tumorals. S'ha descrit que al citoplasma p27^{KIP1} té l'habilitat d'evitar l'activació de les procaspases 2L i 3 i l'alliberament de citocrom c al citosol [177], generant resistència a l'apoptosi (Figura 4.7). Per aquesta raó, s'ha suggerit que la localització citoplasmàtica de p27^{KIP1} podria estar relacionada amb la resistència a l'apoptosi d'alguns tipus de tumors i aquest fet seria independent de la interacció amb les ciclines i les CDK (revisat a [164]). Està descrit que el moviment de p27^{KIP1} cap al citoplasma no es dona per mutacions del gen sinó per una fosforilació anòmala de la proteïna per part de quinases sobreexpressades en cèl·lules tumorals, tals com PKB/Akt i SRC [178]. Malgrat que la major part dels estudis sobre la funcionalitat de p27^{KIP1} s'han dut a terme en cèl·lules tumorals, la funció antiapoptòtica no està restringida a aquest tipus de cèl·lules, sinó que també s'ha descrit per a cèl·lules no tumorals. Concretament, s'ha descrit que p27^{KIP1} juga un paper protector d'una apoptosi excessiva durant un dany inflamatori en teixits no tumorals [179].

RESULTATS I DISCUSSIÓ

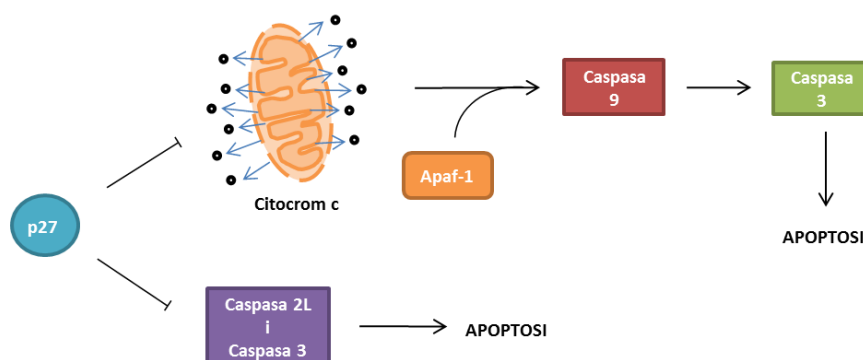


Figura 4.7. Efectes antiapoptòtics de p27^{KIP1}. En el citoplasma p27^{KIP1} evita l'activació de l'apoptosi a través de la inhibició de l'alliberament de citocrom c i impedit l'activació de les caspases 2L i 3.

La major sensibilitat de les cèl·lules tumorals a l'acció de les ND-RNases també es pot explicar en part per l'acció de p21^{WAF1/CIP1}, particularment en el cas d'NLSPE5. El tractament de les cèl·lules no tumorals CCD-18Co amb NLSPE5 promou un increment d'expressió de p21^{WAF1/CIP1} que s'acumula sobretot al citoplasma (Figures 4.3 i 4.4). Aquest augment, juntament amb la no variació dels nivells de JNK i p-JNK en aquestes cèl·lules, podria explicar perquè les cèl·lules no tumorals CCD-18Co tractades amb NLSPE5 presenten una major resistència a l'apoptosi. Com ja s'ha comentat anteriorment, la localització de p21^{WAF1/CIP1} determina quin tipus de funció realitza en la cèl·lula. S'ha descrit que quan p21^{WAF1/CIP1} presenta una localització citoplasmàtica es pot unir a diferents proteïnes implicades en l'apoptosi, com per exemple la procaspasa 3, caspasa 8, caspasa 10, les proteïnes quinases activades per estrès (SAPK/JNK) i la quinasa reguladora de senyal apoptòtica 1 (ASK1/MEKK5), inhibint la seva activitat i inactivant l'apoptosi (Figura 4.8) [180, 181].

p21^{WAF1/CIP1} pot bloquejar l'apoptosi unint-se a l'extrem N-terminal de la procaspasa 3, evitant la seva activació i, per tant, inhibint l'apoptosi [182]. S'ha descrit que la caspasa 3 activada trenca l'NLS de p21^{WAF1/CIP1}, que queda retingut al citoplasma i a més no pot interaccionar el complex ciclina-CDK2; tot plegat afavoreix el conjunt d'interaccions inhibidores de l'apoptosi esmentades més amunt, dibuixant un mecanisme coordinat (Figura 4.8) [183]. En aquest treball no s'ha detectat cap trencament de p21^{WAF1/CIP1}, ja que no s'ha observat cap variació de pes molecular entre les bandes corresponents a lisats de cèl·lules sense tractar i les bandes corresponents a les cèl·lules tractades (Figures 4.3 i 4.4). Aquest fet seria explicable perquè en el moment d'analitzar l'expressió de p21^{WAF1/CIP1} per Western blot es van seleccionar les cèl·lules vives i no pas les mortes. S'ha descrit que l'efecte de la caspasa 3 sobre p21^{WAF1/CIP1} no és observable en lisats provinents de cèl·lules vives [183].

RESULTATS I DISCUSSIÓ

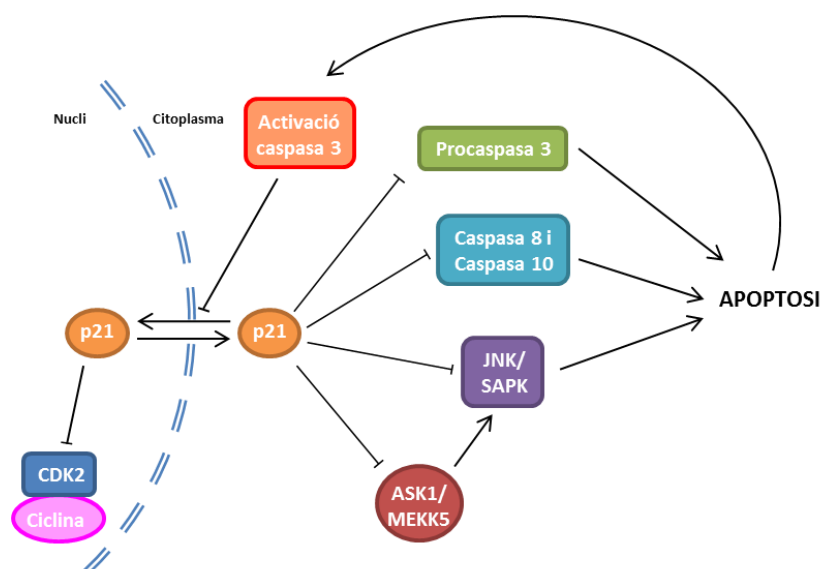


Figura 4.8. Interaccions de p21^{WAF1/CIPI} en el citoplasma i paper en la inhibició de l'apoptosi. p21^{WAF1/CIPI} citoplasmàtica exerceix la seva funció antiapoptòtica pel fet que és capaç d'inhibir diverses proteïnes relacionades amb l'apoptosi. p21^{WAF1/CIPI} s'uneix i inhibeix l'activitat de ASK1/MEKK5 i aquesta no pot activar JNK/SAPK. A més p21^{WAF1/CIPI} pot interferir en l'activació de les procaspasa 3 i de les caspases 8 i 10. Si finalment s'activa l'apoptosi, les caspases activades inhibeixen el transport de p21^{WAF1/CIPI} cap al nucli.

En certs tipus cel·lulars p21^{WAF1/CIPI} podria contribuir a disminuir la sensibilitat de les cèl·lules no tumorals al tractament amb NLSPE5 en inhibir l'apoptosi per estrès promoguda per JNK actuant a dos nivells, ja sigui unint-s'hi directament inactivant-la o inhibint la MAP quinasa ASK1/MEKK5 [184], la qual al seu torn activa JNK [98] (Figura 4.8). De manera general, es considera que JNK té un paper promotor de l'apoptosi però en certs tipus de tumors JNK pot tenir una funció antiapoptòtica. El paper antiapoptòtic de JNK estaria relacionat amb l'estatus de p53 a la cèl·lula. S'ha descrit que la via de JNK inhibeix l'aturada del cicle cel·lular i l'apoptosi promoguda per p53 i que JNK només pot promoure els efectes antiapoptòtics en cèl·lules deficientes en p53 (revisat a [67]). Així, en cèl·lules tumorals les ND-RNases indueixen l'acumulació de p21^{WAF1/CIPI} [66, 109] fent disminuir els nivells de JNK activat i aquest efecte, en tractar-se de cèl·lules deficientes en p53, promou l'apoptosi [66]. Contràriament, en cèl·lules CCD-18Co tractades amb NLSPE5, que són p53+, els nivells d'activació de JNK es mantenen invariables (Figura 4.6). Això pot indicar que la resistència a l'apoptosi induïda per les ND-RNases en aquestes cèl·lules no depèn de JNK.

4.2. Fusió d'ND-RNases citotòxiques a determinants de l'apoptina

En aquesta Tesi, un dels objectius ha estat aconseguir variants de PE5 o PE10 més selectives sobre cèl·lules tumorals mitjançant un sistema d'interruptor molecular, combinant diferents seqüències NES i dianes de fosforilació per quinases sobreexpressades en cèl·lules tumorals (Psite) que pugui emascarar el primer, la combinació dels quals sigui capaç de dirigir les RNases a nucli en cèl·lules tumorals (afavorint la citotoxicitat) i al citoplasma en el cas de les cèl·lules no tumorals (afavorint la interacció amb l'RI).

4.2.1. Estratègies per conferir selectivitat a l'HP-RNasa mitjançant l'addició d'un NES regulable per fosforilació

4.2.1.1. Descripció dels NES i Psite

Per a la construcció dels vectors que incorporaven un NES i un lloc de fosforilació fusionat al gen codificant les RNases respectives, es van utilitzar els vectors pE5 i pE10 els quals han estat descrits anteriorment (veure apartat 3.1.2) [94, 109]. Les variants construïdes, que incorporen aquests determinants moleculars a l'extrem N-terminal de l'ND-RNasa, es van anomenar de manera general NES_Psite_PE5 i aquelles que els incorporen a l'extrem C-terminal es van anomenar PE10_NES_Psite, ja que derivaven de PE5 i PE10, respectivament.

Taula 4.2. Descripció de les diferents seqüències NES i Psite utilitzades.

Nom de la seqüència	Seqüència aminoacídica ^a	Origen	Referències
NES(Apop)	VSKLKESLI	Apoptina	[122, 123]
NES(Tlarge)	LYPELRRILTI	Antigen T gran de l'adenovirus 5	[185]
NES(ISGF)	LLLKKMYLM	Components p84/p91 del factor de transcripció ISGF-3	[186-188]
NES(HIV)	LPPLERLTL	Transactivador tipus Rev del virus HIV-1	[189]
Psite(Apop)	TTT*PSRPRTA	Apoptina	[124, 128]
Psite(MCM2)	LTSS*PGRSSR	Component 2 del complex de manteniment del minicromosoma (MCM2)	[190, 191]

^a L'asterisc (*) a la dreta d'un determinat residu indica que és susceptible de ser fosforilat per la CDK2.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Per a les construccions es van seleccionar diferents NES que prèviament havien estat descrits com a funcionals quan s'inserien en una proteïna recombinant (Taula 4.2). De manera general, els diferents NES i Psite presentaven similitud de seqüència amb el NES de l'apoptina. A més, es van seleccionar dos Psite reconeguts per la quinasa CDK2, la qual està sobreexpressada en diversos tipus de cèl·lules tumorals (revisat a [192]). Les diferents combinacions de NES i llocs de fosforilació introduïdes tant als extrems N- com C-terminal de les ND-RNases s'indiquen a les Figures 4.9 i 4.13.

4.2.1.2. Obtenció de les variants NES_PE5 i NES_Psite_PE5

Les construccions que incorporaven el NES i la diana de fosforilació a l'extrem N-terminal de l'ND-RNasa es van realitzar sobre PE5 utilitzant estratègies de mutagènesi dirigida i mutagènesi en casset (Figura 4.9).

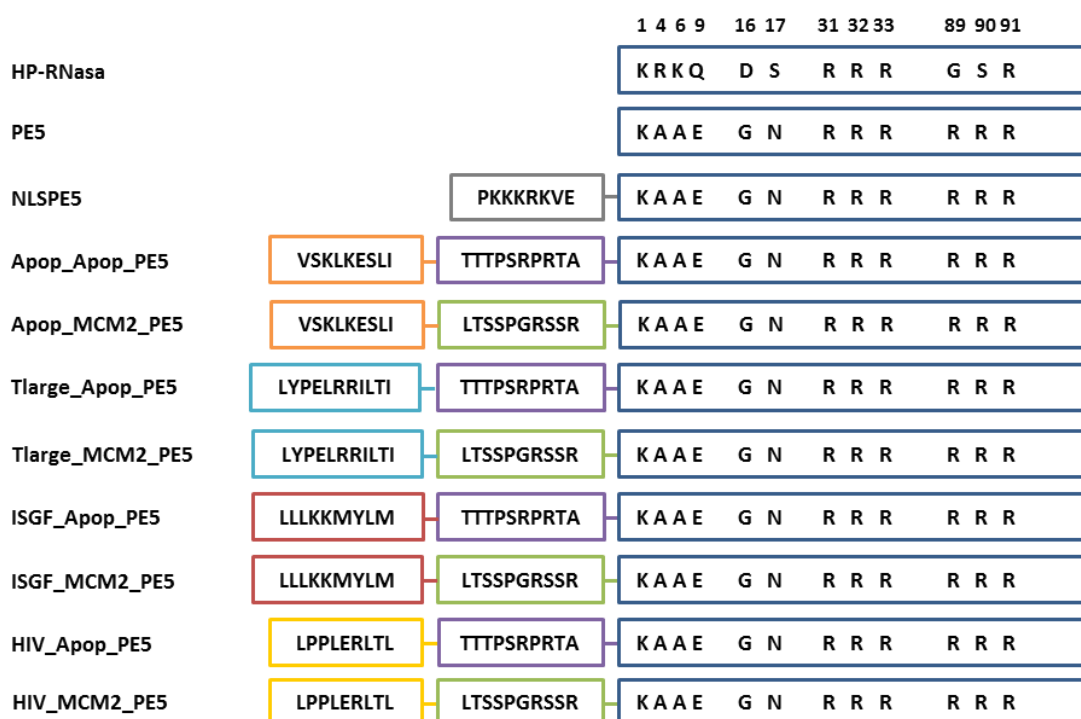


Figura 4.9. Representació esquemàtica de les variants de NES_Psite_PE5 construïdes en aquest treball. S'indiquen també a l'esquema les ND-RNases PE5 i NLSPE5. A la caixa de l'ND-RNasa s'indiquen aquells residus que han canviat en la construcció de PE5 respecte a l'HP-RNasa i els residus que conformen l'NLS conformacional bipartit. Cada color correspon a una seqüència diferent de NES o Psite. A l'esquerra s'especifica el nom de cadascuna de les variants NES_Psite_PE5 construïdes, on primer es detalla quin tipus de NES porta incorporat (Apop, Tlarge, ISGF o HIV), seguit del lloc de fosforilació o Psite (Apop o MCM2) i per últim el tipus d'RNasa.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Per realitzar les construccions es va procedir a obtenir, en primer lloc, un segment de dsDNA que codifiqués per als diferents NES a introduir. Per a cada tipus de seqüència NES, es van dissenyar 2 oligonucleòtids complementaris, excepte en els extrems 5', (Taula 4.3). D'aquesta manera, en hibridar-se formaven un fragment de dsDNA excepte en els dos extrems on es reproduïen les seqüències de les dianes ja tallades dels enzims de restricció *NdeI* i *BamHI*. Per al disseny de les seqüències dels oligonucleòtids es va tenir en compte que el segment inserit mantingués la pauta de lectura de l'RNasa i l'ús de codó d'*E. coli*. A la Taula 4.3 es detalla la seqüència dels diferents oligonucleòtids utilitzats.

Taula 4.3. Seqüència dels oligonucleòtids dissenyats i seqüències aminoacídiques codificades corresponents a les seqüències NES i Psite utilitzades per crear les noves variants de l'HP-RNasa. A i B corresponen a les cadenes complementàries de cada NES i Psite.

Nom	Seqüència oligonucleotídica	Seqüència aminoacídica
NESApop A	5' TATggTgAgCAAActgAAAgAAAgCCTgATTg 3'	VSKLKESLI
NESApop B	5' gATCCAATCAggCTTTCTTTCAgTTTgCTCACCA 3'	
NEStlarge A	5' TATgCTgTATCCggAACTgCgCCgCATTCTgACCATTg 3'	LYPELRRILTI
NEStlarge B	5' gATCCAATggTCAGaATgCggCgCAgTTCCggATACA gCA 3'	
NESISGF A	5' TAtgCTgCTgCTgAAAAAATgTATCTgATgg 3'	LLLKKMYLM
NESISGF B	5' gATCCCATCAgATACATTTTTTTTCAGCAgCAgCA 3'	
NESHIV A	5' TATgCTgCCgCCgCTggAACgCCTgACCCTgg 3'	LPPLERLTL
NESHIV B	5' gATCCCAgggTCAGgCgTTCCA gCggCggCAgCA 3'	
PsiteApop A	5' gATCCACCACCACCCgAgCCgTCCgCgTACCgCgAgCCA 3'	TTTPSRPRTA
PsiteApop B	5' AgCTTggCTCgCggTACgCggACggCTCggggTggTggTg 3'	
PsiteMCM2 A	5' gATCCCTgACCAgCAgCCCgggCCgTA gCAgCCgTA gCCA 3'	LTSSPGRSSR
PsiteMCM2 B	5' AgCTTggCTACggCTgCTACggCCCgggCTgCTggTCAgg 3'	

En segon lloc, per tal de fusionar PE5 amb el segment de dsDNA hibridat va ser necessari introduir a l'extrem 5' del gen codificant per PE5 les dianes de restricció *NdeI* i *BamHI*, procés que es detalla a la Figura 4.10. Es va aprofitar que es disposava del plasmidi pLINKM5 utilitzat en la construcció d'NLSPE5 [109] (Figura 4.10-A) el qual conté entre el codó AUG i la seqüència del gen de PM5 una seqüència espaiadora que ja contenia la diana *NdeI*. Sobre aquest plasmidi es va realitzar una primera reacció de mutagènesi dirigida per oligonucleòtid per convertir el gen de PM5 en el de PE5. Per això es van utilitzar els oligonucleòtids PE5A i PE5B (Taula 4.4), que permetien substituir els residus Gly89 i Ser90 per Arg. El vector resultant es va anomenar pLINKE5 (Figura 4.10-B). Seguidament es va realitzar una segona reacció de mutagènesi amb els oligonucleòtids IkbamM5_1 i IkbamM5_2 (Taula 4.4) per tal d'introduir la diana de l'enzim de restricció *BamHI* dins de l'espaiador a l'extrem 5'

RESULTATS I DISCUSSIÓ

del gen codificant per PE5, obtenint-se el vector pLINK(Bam)E5 (Figura 4.10-C). Posteriorment, es va digerir el vector pLINK(Bam)E5 amb *NdeI* i *BamHI*, es va purificar el plasmidi que havia perdut un fragment de 20 pb i es va lligar amb els segments de dsDNA corresponents als diferents NES (Figura 4.10-D), obtenint d'aquesta manera el conjunt de mutants pNES_PE5 (pApop_PE5, pTlarge_PE5, pISGF_PE5 i pHIV_PE5).

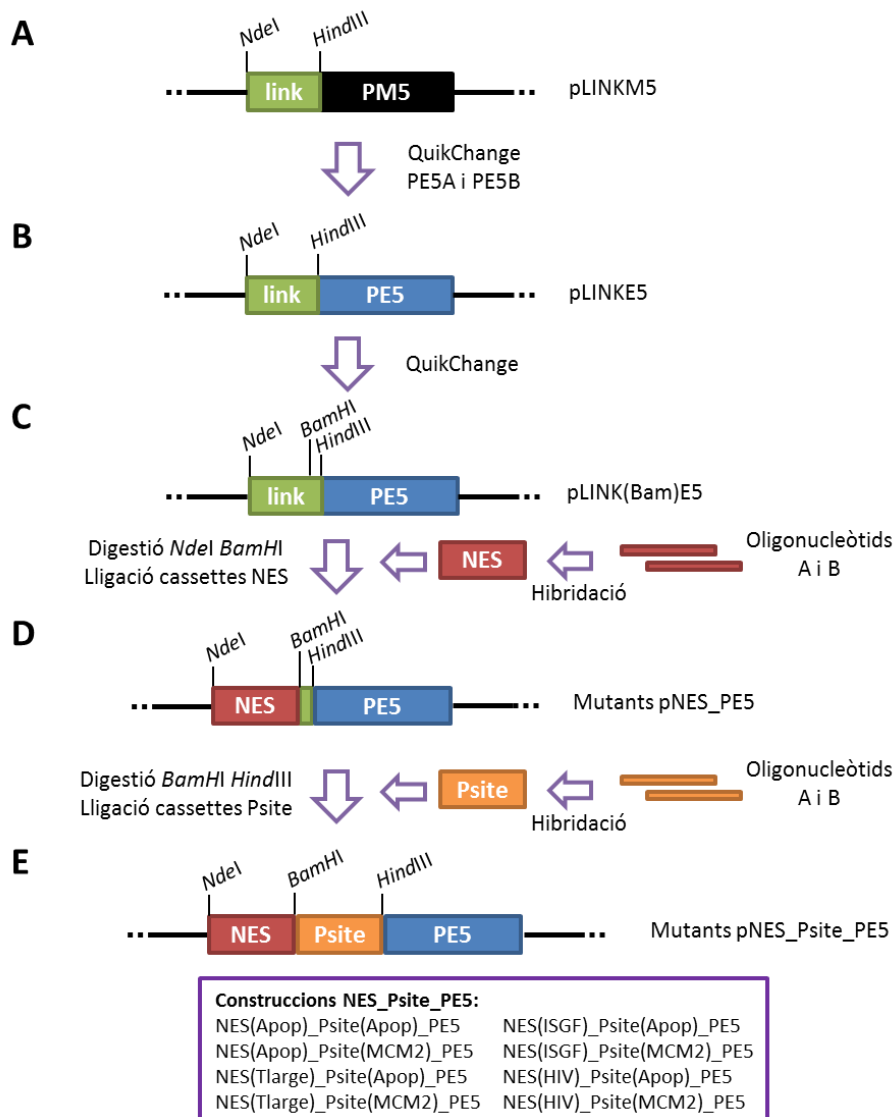


Figura 4.10. Esquema del procés de construcció dels mutants pNES_PE5 i pNES_Psite_PE5.

Per últim, per introduir en pNES_PE5 els llocs de fosforilació es va procedir de la mateixa manera. Per a cada Psite, es van sintetitzar dos oligonucleòtids que un cop hibridats codificaven pels respectius Psite (Taula 4.3). A l'igual que pels NES, les dues cadenes complementàries deixaven a l'extrem 5' cadenes senzilles que reproduïen les seqüències de les dianes de restricció ja tallades, en aquest cas, pels enzims de restricció *BamHI* i *HindIII* a 5' i 3',

RESULTATS I DISCUSSIÓ

respectivament. Cada vector que contenia el NES a 5' es va digerir amb els enzims de restricció *Bam*HI i *Hind*III (Figura 4.10-D) i es va lligar amb els segments dsDNA codificants per les diferents seqüències Psite, obtenint-se els mutants NES_Psite_PE5 (Apop_Apop_PE5, Apop_MCM2_PE5, Tlarge_Apop_PE5, Tlarge_MCM2_PE5, ISGF_Apop_PE5, ISGF_MCM2_PE5, HIV_Apop_PE5 i HIV_MCM2_PE5) (Figura 4.10-E). Totes les construccions es van comprovar per seqüenciació de DNA.

Taula 4.4. Oligonucleòtids utilitzats en les reaccions de QuikChange™ per obtenir pNES_PE5.

Nom	Utilització	Seqüència
PE5A	Substitució G89R i S90R en pLINKM5 per obtenir pLINKE5	5' gATTgTAgACTgACTAATCgTCgTAgATACCCTAATTgTgC 3'
PE5B		5' gCACAATTAgggTATCTACgACgATTAgTCAgTCTACAATC 3'
IkBamM5_1	Introducció diana de restricció <i>Bam</i> HI en pLINKE5 per obtenir pLINK(Bam)E5	5' AgCATgACTggtggATCCCAAATgggTCgggAT 3'
IkBamM5_2		5' ATCCCgACCCATTTgggATCCACCAgTCATgCT 3'

4.2.1.3. Producció i caracterització de les variants NES_Psite_PE5

Abans d'iniciar el procés de producció i purificació de cadascuna de les variants construïdes, es va determinar el grau d'expressió de diferents colònies per tal de seleccionar aquella que garantís el màxim nivell d'expressió. Per això es va analitzar electroforèticament l'extracte cru de cultius induïts provinents de diferents colònies, per tal de seleccionar aquella que presentés la millor expressió. De les colònies seleccionades es va procedir a expressar i purificar cada una de les variants d'acord amb el protocol descrit als apartats de Materials i Mètodes 3.5.1.1 i 3.5.2.1.

Del conjunt de variants construïdes se'n van poder produir i purificar només les indicades a la Taula 4.5, ja que no es va poder obtenir un nivell destacable d'expressió d'HIV_Apop_PE5 i ISGF_MCM2_PE5, tot i haver provat la seva expressió en diferents soques d'*E. coli* i condicions d'inducció. Els rendiments van ser molt variables, oscil·lant entre els 4 mg per litre de cultiu induït de Tlarge_MCM2_PE5 i els més de 30 mg per litre de cultiu de Tlarge_Apop_PE5. Un cop obtingudes les proteïnes purificades i abans de començar la seva caracterització, es va comprovar la seva massa molecular per MALDI-TOF i, tal i com es pot veure a la Taula 4.5, els pesos moleculars teòrics no diferien dels obtinguts.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Taula 4.5. Rendiments de purificació obtinguts per a cada una de les variants de NES_Psite_PE5 i relació de pesos moleculars teòrics i observats per MALDI-TOF.

Proteïna	Rendiment (mg/l de cultiu)	Mw teòric (Da)	Mw observat (Da)
Tlarge_Apop_PE5	32,0	17649	17650
Tlarge_MCM2_PE5	4,0	17609	17613
Apop_Apop_PE5	10,6	17147	17147
Apop_MCM2_PE5	12,7	17106	17106
HIV_MCM2_PE5	4,1	17273	17284
ISGF_Apop_PE5	7,5	17415	17414

A continuació, es va caracteritzar la citotoxicitat de les diferents construccions per a les línies cel·lulars no tumorals HaCaT, CCD-18Co i HEK-293 i com a control es va utilitzar la línia tumoral NCI-H460, emprant l'assaig de viabilitat cel·lular descrit a l'apartat 3.6.5.1 de Materials i Mètodes. A partir de les corbes de citotoxicitat obtingudes es van calcular els valors d'IC₅₀ que es detallen a la Taula 4.6.

Taula 4.6. Valors d'IC₅₀ (µM) de PE5 i les seves variants de NES_Psite_PE5 obtinguts sobre la línia tumoral NCI-H460 i sobre les línies no tumorals HaCaT, CCD-18Co i HEK-293. Els valors s'expressen com la mitjana ± desviació estàndard d'almenys tres experiments independents cadascun amb tres rèpliques independents.

Proteïna	NCI-H460	HaCaT	CCD-18Co	HEK-293
Onconasa	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,3 ± 0,1
PE5	0,6 ± 0,2	11,4 ± 0,3	21,0 ± 1,8	6,8 ± 0,5
Tlarge_Apop_PE5	0,9 ± 0,1	8,4 ± 0,9	12,3 ± 3,7	6,9 ± 1,5
Tlarge_MCM2_PE5	0,5 ± 0,1	4,8 ± 0,2	5,4 ± 1,2	3,6 ± 0,3
Apop_Apop_PE5	0,4 ± 0,2	7,2 ± 0,7	24,8 ± 4,2	4,2 ± 0,7
Apop_MCM2_PE5	0,4 ± 0,1	4,9 ± 1,2	17,1 ± 5,1	4,3 ± 0,6
HIV_MCM2_PE5	0,5 ± 0,1	6,7 ± 0,3	22,0 ± 3,6	5,5 ± 3,3
ISGF_Apop_PE5	0,7 ± 0,2	7,7 ± 0,7	9,7 ± 3,8	5,4 ± 1,1

Si es comparen els valors d'IC₅₀ obtinguts per les diferents variants de NES_Psite_PE5 amb el valor obtingut en tractar les mateixes cèl·lules amb PE5, s'observa que en la línia tumoral NCI-H460 no hi ha un increment de la citotoxicitat. En canvi, en les línies cel·lulars no tumorals la tendència és que la citotoxicitat sigui del mateix ordre o lleugerament més elevada

RESULTATS I DISCUSSIÓ

que l'obtinguda en tractar aquestes línies amb PE5. Aquests resultats indiquen que cap de les construccions NES_Psite_PE5 millora la selectivitat respecte a PE5. S'ha de destacar en canvi, que tant PE5 com les variants construïdes presenten *in vitro* una selectivitat molt superior a la de l'onconasa.

Com s'ha esmentat anteriorment, la capacitat d'una RNasa d'evadir l'acció de l'RI influeix en la seva activitat citotòxica. Per això, un dels motius que podria explicar perquè les variants construïdes no augmentaven la seva selectivitat podria ser que l'RI tingués menys capacitat d'inhibir-les en comparació amb PE5. En aquest cas, la introducció d'un NES no suposaria un augment de la selectivitat ja que al citosol l'RNasa també podria exercir la seva citotoxicitat. Per aquest motiu es va analitzar la interacció amb l'RI de cada una de les variants NES_Psite_PE5. Per a aquests experiments es va utilitzar PE5 com a control positiu d'inhibició per l'RI (Figura 4.11).

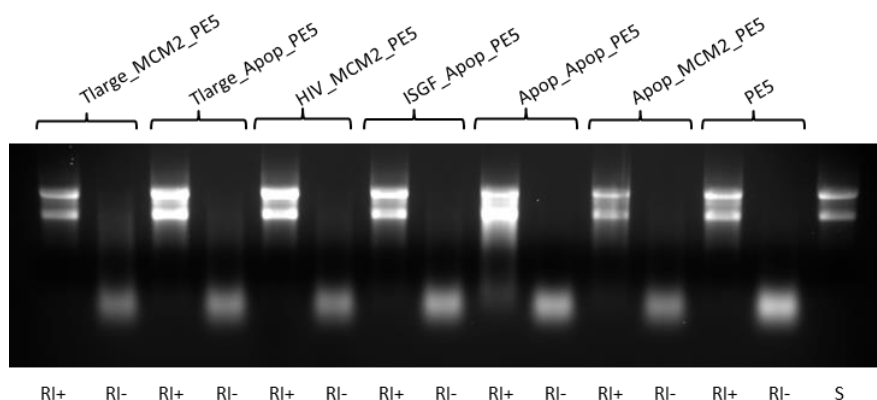


Figura 4.11. Anàlisi de la interacció de l'RI amb les diferents variants NES_Psite_PE5. Es visualitza la degradació del substrat 16S- i 23S-rRNA en presència (RI+) o absència (RI-) d'RI. El control de la integritat del substrat s'indica com a "S". El gel es va dur a terme en les condicions descrites a l'apartat 3.6.4.

Com es pot veure a la Figura 4.11, en presència d'RI cap de les variants no pot degradar el substrat, indicant que totes són inhibides. Per tant, una major capacitat d'evasió de l'RI no podia ser la causa de la manca d'augment de selectivitat d'aquestes variants. Així mateix, una altra possible explicació per a la qual les construccions no presentaven una major selectivitat podia ser pel fet que les seqüències NES no eren funcionals en aquestes construccions. Per poder comprovar aquest raonament es va assajar la citotoxicitat de variants de PE5 que portessin unit només el NES (variants NES_PE5 generades durant el procés de clonatge). Si la citotoxicitat disminuïa respecte a PE5 indicaria que el NES havia permès l'exportació de la variant, la qual hauria sigut inhibida per l'RI i que, per tant, no podria degradar tant RNA nuclear.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Com en el cas de NES_Psite_PE5, per a cada una de les variants NES_PE5 es va testar el grau d'expressió de diferents colònies transformades amb el corresponent plasmidi a partir de l'anàlisi per SDS-PAGE de l'extracte cru dels respectius cultius, i es van seleccionar aquelles que van presentar la millor expressió. Tot seguit es van produir i purificar cadascuna de les variants NES_PE5 d'acord amb el protocol descrit als apartats 3.5.1.1 i 3.5.2.1. A la Taula 4.7 es mostren els rendiments obtinguts al final de cada procés de purificació, així com els valors de massa molecular observats i esperats per a cada variant. En general, es van obtenir aproximadament 8,5-10 mg de proteïna per litre de cultiu, amb excepció de NES(HIV)_PE5. La massa molecular observada de cada construcció per MALDI-TOF no va diferir de l'esperada.

Taula 4.7. Rendiments de purificació obtinguts per a cada una de les variants de NES_PE5 i relació de pesos moleculars teòrics i observats per MALDI-TOF.

Proteïna	Rendiment (mg/l de cultiu)	Mw teòric (Da)	Mw observat (Da)
NES(Tlarge)_PE5	8,5	17078	17080
NES(Apop)_PE5	8,8	16570	16573
NES(HIV)_PE5	1,5	16743	16745
NES(ISGF)_PE5	9,8	16844	16842

A continuació, es va determinar el grau d'escapament a l'RI (Figura 4.12) incloent l'onconasa com a control positiu i PE5 com a control negatiu d'escapament a l'RI. Com es pot observar al gel A de la Figura 4.12, NES(HIV)_PE5 no és capaç de degradar el substrat en presència de l'inhibidor indicant que no escapa a l'RI, mentre que la variant NES(Apop)_PE5 evadeix completament l'acció de l'inhibidor. Aquest resultat no era esperable ja que no s'han modificat els residus d'interacció amb l'RI [193, 194]. Per contra, les variants NES(Tlarge)_PE5 i NES(ISGF)_PE5 presentaven molt poca activitat en les condicions assajades tant en presència com en absència d'RI (resultats no mostrats). Per tal de potenciar la visualització de la degradació del substrat, a fi i efecte de confirmar que es tractava de variants inhibides per l'RI, es va repetir l'experiment triplicant la quantitat d'RNasa a l'assaig així com la d'RI mantenint la mateixa quantitat de substrat. Els resultats es presenten a la Figura 4.12-B. Es pot observar que tant NES(Tlarge)_PE5 com NES(ISGF)_PE5 només degraden el substrat en absència de l'RI. El fet d'haver hagut d'incrementar la concentració de RNasa per analitzar l'escapament de l'RI suggereix que aquestes dues variants presenten una activitat catalítica menor a la de PE5.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

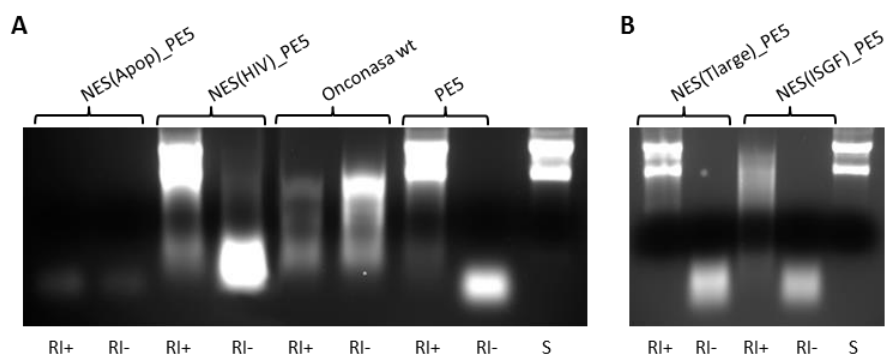


Figura 4.12. Anàlisi de la interacció de l'RI amb les diferents variants NES_PE5. Es visualitza la degradació del substrat 16S- i 23S-rRNA en presència (RI+) o absència (RI-) d'RI. El control de la integritat del substrat s'indica com a "S". El gel A es va dur a terme en les condicions descrites que a l'apartat 3.6.4, en canvi, en el gel B es va triplicar la quantitat d'RNasa i RI mantenint la mateixa quantitat de substrat.

Un cop analitzat l'escapament de les variants NES_PE5 de l'RI, es va analitzar la funcionalitat dels diferents NES dins del context de NES_PE5 mesurant la citotoxicitat de cada variant en la línia tumoral NCI-H460 (Taula 4.8). Per aquest assaig, no era important que la línia cel·lular utilitzada fos tumoral o no tumoral, perquè la funcionalitat del NES no estava condicionada a una fosforilació per part de les quinases. Per tant, els efectes haurien de ser vàlids en els dos tipus de línia cel·lular.

Taula 4.8. Valors d'IC₅₀ (μM) de PE5 i les seves variants de NES_PE5 obtinguts sobre la línia tumoral NCI-H460. Els valors s'expressen com la mitjana ± desviació estàndard d'almenys tres experiments independents fets en triplicats.

Proteïna	NCI-H460
PE5	0,8 ± 0,2
NES(TIarge)_PE5	0,7 ± 0,2
NES(ISGF)_PE5	0,6 ± 0,1
NES(Apop)_PE5	0,6 ± 0,1
NES(HIV)_PE5	0,8 ± 0,2

A priori s'esperava que la presència del NES disminuís l'efecte citotòxic de PE5 ja que el NES, en cas de ser funcional, hauria d'exportar PE5 al citoplasma on seria inhibit per l'RI. Tanmateix, si el NES no era funcional, els valors d'IC₅₀ haurien de ser similars als de la proteïna parental PE5. Els valors de la Taula 4.8 mostren que no hi ha diferències entre PE5 i les noves variants NES_PE5 en la línia tumoral NCI-H460. No obstant això, per la variant NES(Apop)_PE5, la qual s'escapa de l'RI, no es pot concloure que el NES no sigui funcional

atès que un cop al citosol podria exercir la seva activitat ribonucleolítica, la qual cosa explicaria que els valors d'IC₅₀ per la línia tumoral fossin del mateix ordre que els obtinguts per PE5.

Per la resta de variants es podria concloure *a priori* que els diferents NES no són funcionals quan es localitzen a l'extrem N-terminal de PE5. De totes maneres, aquesta conclusió s'ha de considerar amb reserves ja que, com s'ha comentat anteriorment, la citotoxicitat de les RNases depèn de molts factors (veure apartat 1.1) i per tant, aquest manteniment de la citotoxicitat pot deure's a altres factors. Pel que fa a NES(TLarge_PE5) i NES(ISGF)_PE5, per exemple, malgrat que aquestes variants presenten una activitat ribonucleolítica molt inferior a la proteïna parental, segueixen mantenint uns valors de citotoxicitat del mateix ordre. No hi ha una explicació clara per a aquest resultat però es pot especular que la introducció del NES en aquestes dues variants milloraria algun dels aspectes que fan que una RNasa sigui citotòxica. Es podria pensar que ajuden a l'entrada de les proteïnes a la cèl·lula, compensant la baixa activitat ribonucleolítica. Si aquest efecte fos prou gran, fins i tot amb un NES no funcional, la sortida al citosol permetria que hi hagués prou quantitat d'RNasa per saturar l'RI i, malgrat la baixa activitat catalítica, es produís una degradació de l'RNA citosòlic. Per tant, per aquestes dues variants, tampoc es podria concloure de forma contundent que el NES no sigui funcional. Per la variant NES(HIV)_PE5 podem afirmar amb tota seguretat que el NES no és funcional atès que la citotoxicitat és del mateix ordre que la presentada per PE5, la proteïna és inhibida per l'RI i l'activitat no sembla diferir de la parental.

En qualsevol cas, la introducció d'un NES a l'extrem N-terminal de PE5 no semblava ser la millor construcció per dotar una ND-RNasa de major selectivitat.

4.2.1.4. Estratègia d'obtenció de les variants PE10_NES_Psite

Arran dels resultats anteriors, es va plantejar la hipòtesi que tant les seqüències NES com els llocs de fosforilació situats a l'extrem N-terminal podrien no estar totalment accessibles a la maquinària cel·lular encarregada de l'exportació nuclear o que podrien afectar significativament l'activitat catalítica de les variants construïdes. Un fet similar ha estat descrit pel que fa a la funcionalitat de la posició d'un NLS en funció de l'extrem on s'insereix la seqüència en una ND-RNasa, la qual és funcional a l'extrem N-terminal però no pas a l'extrem C-terminal [95]. Per aquest motiu es va decidir construir noves variants en què se situarien les diferents combinacions de NES i Psite a l'extrem C-terminal. En aquest cas, les construccions es van realitzar sobre la variant PE10, ja que presentava la mateixa citotoxicitat que PE5 [109] i

RESULTATS I DISCUSSIÓ

era més similar a l'HP-RNasa salvatge pel que fa a la seqüència aminoacídica. De manera general, les noves variants van ser anomenades PE10_NES_Psite (Figura 4.13).

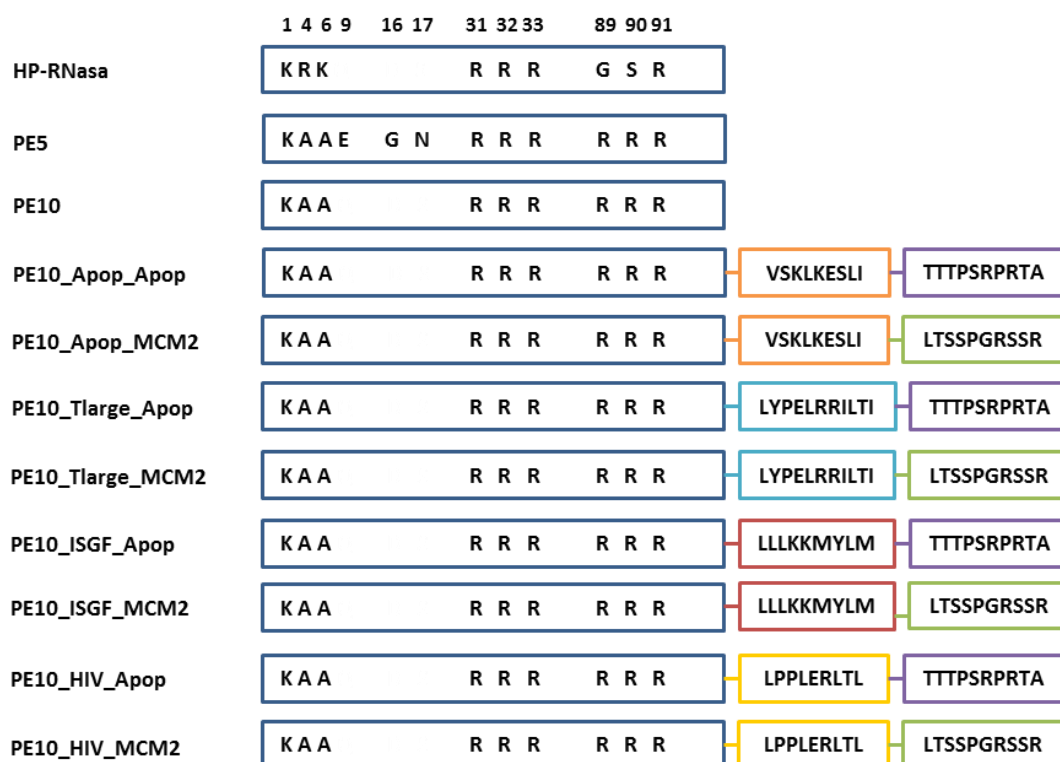


Figura 4.13. Representació esquemàtica de les variants PE10_NES_Psite construïdes en aquest treball. S'indiquen també a l'esquema les ND-RNases PE5 i PE10. A la caixa de l'ND-RNasa s'indica la seqüència d'aquells residus que han canviat en la construcció de PE10 respecte a l'HP-RNasa i els residus que conformen l'NLS conformacional bipartit. Cada color correspon a una seqüència diferent de NES o Psite. A l'esquerra s'especifica el nom de cadascuna de les variants PE10_NES_Psite construïdes, on primer es detalla el tipus d'RNasa, seguit de la seqüència NES que incorpora (Apop, Tlarge, ISGF o HIV) i per últim el lloc de fosforilació o Psite (Apop o MCM2).

Per obtenir els diferents mutants de PE10_NES_Psite es va seguir l'estratègia següent. Aprofitant que es disposava del vector pE10 [109] (Figura 4.14-A), es van realitzar dos reaccions de mutagènesi dirigida per oligonucleòtid consecutives. Amb la primera d'elles, utilitzant la parella d'oligonucleòtids PE10NdeCtA i PE10NdeCtB (Taula 4.9), se substituïa el codó STOP i la diana de restricció *HindIII* a l'extrem 3' del gen per una diana de restricció *NdeI*. La segona reacció reintroduïa més enllà la diana *HindIII* i el codó STOP mantenint la pauta de lectura, gràcies a la utilització dels oligonucleòtids PE10HindCA i PE10HindCB (Taula 4.9). El plasmidi resultant contenia el gen de PE10 entre dues dianes de *NdeI* i tenia a l'extrem 3' una seqüència addicional amb un codó STOP final flanquejada per les dianes dels enzims de restricció *NdeI* i *HindIII*. Aquest nou vector es va anomenar pE10(3NdeHind) (Figura 4.14-B). Paral·lelament, a partir dels vectors que codificaven pels mutants NES_Psite_PE5 (Figura 4.14-

RESULTATS I DISCUSSIÓ

C), es va digerir cada combinació de NES i Psite amb els enzims de restricció *NdeI* i *HindIII* i es va purificar cada fragment d'uns 70 pb (Figura 4.14-D). Seguidament, es va digerir el plasmidi pE10(3NdeHind) amb *NdeI* i *HindIII*, de manera que el resultat de la digestió va ser l'escissió del gen de PE10 entre les dues dianes de *NdeI* per una banda, i el vector obert entre les dianes *NdeI* i *HindIII* per una altra, els quals van ser purificats. El vector digerit es va lligar amb els fragments que codificaven per les diferents combinacions de NES_Psite (Figura 4.14-E). Els vectors resultants es van digerir de nou amb *NdeI* per tal de reinserir el gen de PE10, prèviament obtingut, a l'extrem 5' de les combinacions NES_Psite (Figura 4.14-F). D'aquesta manera es van obtenir les diferents variants de PE10_NES_Psite: PE10_Apop_Apop, PE10_Apop_MCM2, PE10_Tlarge_Apop, PE10_Tlarge_MCM2, PE10_ISGF_Apop, PE10_ISGF_MCM2, PE10_HIV_Apop i PE10_HIV_MCM2. Totes les construccions es van comprovar per seqüenciació de DNA.

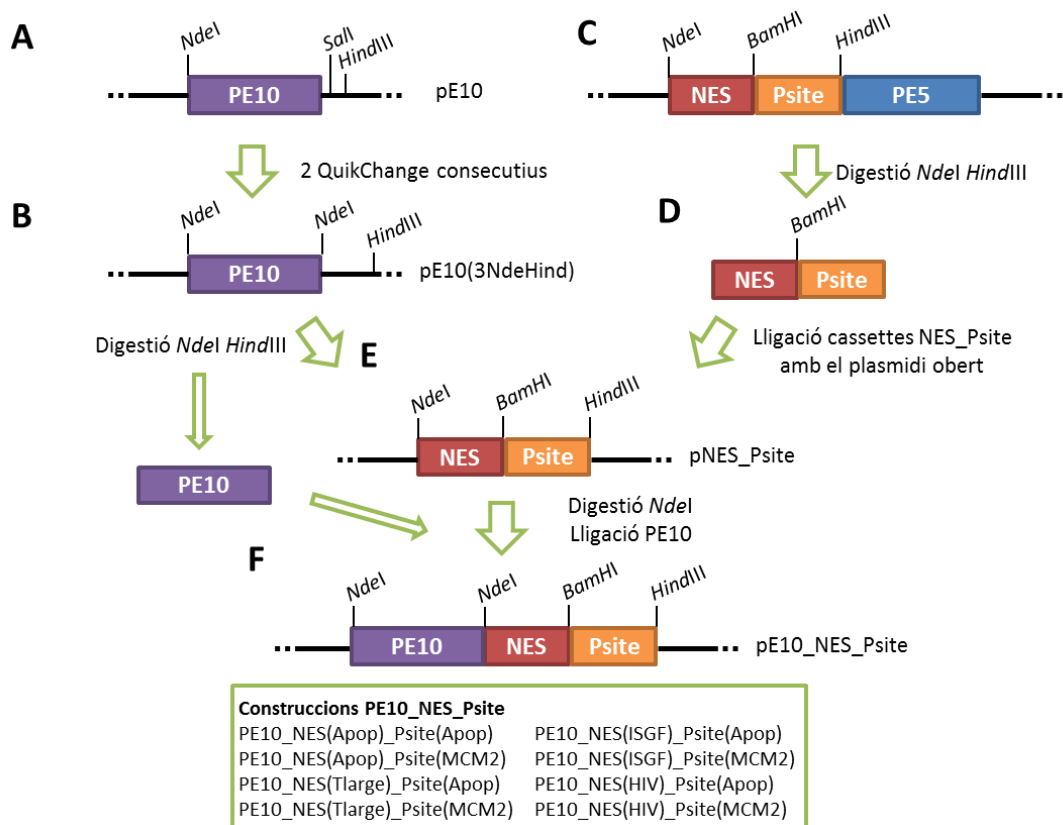


Figura 4.14. Esquema del procés de construcció dels mutants pPE10_NES_Psite.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Taula 4.9. Oligonucleòtids utilitzats en les reaccions de QuikChange™ per obtenir pE10_NES_Psite.

Nom	Utilització	Seqüència
PE10NdeCtA	Substitució de la diana <i>HindIII</i> i el codó STOP de l'extrem 3' de pE10 per <i>NdeI</i>	5' gAAgATTCTACTCATATggACCAgCTTgCggCC 3'
PE10NdeCtB		5' ggCCgCAAgCTggTCCATATgAgTAGAATCTTC 3'
PE10HindCA	Reintroducció de la diana <i>HindIII</i> i el codó STOP en l'extrem 3' de pE10 per obtenir pE10(3NdeHind)	5' CgAgCAgATCCgAAgCTTAACAAAgCCCg 3'
PE10HindCB		5' CgggCTTTgTTAAgCTTCggATCTgCTCg 3'

4.2.1.5. Producció i caracterització de PE10_NES_Psite

Un cop obtinguts tots els plasmidis que presentaven les seqüències NES i els corresponents llocs de fosforilació a l'extrem C-terminal, es van fer proves d'inducció per seleccionar aquelles colònies amb la millor expressió, a fi d'obtenir el major rendiment al final del procés de purificació. Es van poder seleccionar colònies que presentaven una molt bona expressió, a excepció de les construccions PE10_HIV_MCM2 i PE10_Apop_Apop. En el cas de PE10_HIV_MCM2 va ser necessari canviar de soca (*E. coli* Rosseta 2(DE3)) per aconseguir nivells d'expressió suficients. En canvi, no va ser possible expressar pE10_Apop_Apop a un nivell suficient emprant diferents soques disponibles. La resta de variants PE10_NES_Psite es van produir i purificar d'acord amb els protocols descrits als apartats 3.5.1.1 i 3.5.2.1. A la Taula 4.10 s'indiquen els rendiments obtinguts de cada producció els quals van ser variables, oscil·lant entre 3,6 i 11,25 mg de proteïna per litre de cultiu. La massa molecular de cada construcció es va comprovar per MALDI-TOF, amb uns valors observats iguals als esperats (Taula 4.10).

A continuació es va analitzar l'activitat citotòxica de cadascuna de les construccions en la línia tumoral NCI-H460 i en la línia no tumoral CCD-18Co per comprovar si amb la reubicació de les combinacions NES_Psite s'aconseguia que els NES es comportessin tal com era d'esperar. Els valors d'IC₅₀ obtinguts es detallen a la Taula 4.11. Igual que pel conjunt de variants NES_Psite_PE5, per a les PE10_NES_Psite també s'esperava un increment de citotoxicitat en cèl·lules tumorals mentre que en cèl·lules no tumorals la citotoxicitat hauria

RESULTATS I DISCUSSIÓ

de disminuir per efecte de la relocalització de les RNases al citosol i la seva posterior inhibició per l'RI.

Taula 4.10. Rendiments de purificació obtinguts per a cada una de les variants de PE10_NES_Psite i relació de pesos moleculars teòrics i observats per MALDI-TOF.

Proteïna	Rendiment (mg/l de cultiu)	Mw teòric (Da)	Mw observat (Da)
PE10_Tlarge_Apop	5,75	17866	17863
PE10_Tlarge_MCM2	8	17826	17817
PE10_Apop_MCM2	4,95	17456	17447
PE10_HIV_Apop	3,6	17531	17521
PE10_HIV_MCM2	5,35	17491	17492
PE10_ISGF_Apop	11,25	17632	17629
PE10_ISGF_MCM2	8,3	17592	17589

Taula 4.11. Valors d'IC₅₀ (µM) de PE10 i les seves variants de PE10_NES_Psite obtinguts sobre la línia tumoral NCI-H460 i sobre la línia no tumoral CCD-18Co. Els valors s'expressen com la mitjana ± desviació estàndard d'almenys tres experiments independents cadascun fet amb tres rèpliques.

Proteïna	NCI-H460	CCD-18Co
PE10	1,8 ± 0,2	≥ 30
PE10_Tlarge_Apop	1,3 ± 0,5	19,9 ± 4,6
PE10_Tlarge_MCM2	1,5 ± 0,4	21,8 ± 6,2
PE10_ISGF_Apop	1,1 ± 0,1	15,6 ± 2,1
PE10_ISGF_MCM2	0,8 ± 0,2	11,3 ± 2,5
PE10_Apop_MCM2	1,9 ± 0,2	≥ 30
PE10_HIV_Apop	1,7 ± 0,1	≥ 30
PE10_HIV_MCM2	2,4 ± 0,1	≥ 30

Abans de valorar els resultats obtinguts per les construccions PE10_NES_Psite, és important esmentar que, en determinades rèpliques dels tractaments de la línia CCD-18Co amb algunes de les variants PE10_NES_Psite, els valors de citotoxicitat mesurats van ser variables. No es va poder determinar un valor d'IC₅₀ atès que en algunes de les corbes de supervivència, a la concentració màxima testada, no s'arribava a una inhibició del 50% de la proliferació cel·lular. Per tant, no es va poder calcular una mitjana global fiable. Per aquest

RESULTATS I DISCUSSIÓ

motiu, els valors d'IC₅₀ de la Taula 4.11 indicats amb el símbol “ ≥ 30 ” no impliquen una disminució clara de la citotoxicitat.

A trets generals, els resultats obtinguts amb les construccions PE10_NES_Psite van ser similars als de NES_Psite_PE5. Sobre la línia tumoral NCI-H460, la majoria de construccions tenien una IC₅₀ similar a la de PE10, mentre que sobre la línia no tumoral CCD-18Co, per les circumstàncies explicades anteriorment, no es va poder determinar el valor d'IC₅₀ fins i tot per a la variant parental PE10. Aquest fet dificultava poder comparar citotoxicitats i, per això, es van calcular també els valors d'IC₂₅ només per a la línia CCD-18Co (Taula 4.12). És important recalcar, però, que la robustesa del valor d'IC₂₅ no és la mateixa que la de l'IC₅₀, perquè presenta una major variabilitat i, per tant, més error.

Taula 4.12. Valors d'IC₂₅ (μ M) de PE10 i les seves variants de PE10_NES_Psite obtinguts sobre la línia no tumoral CCD-18Co. Els valors s'expressen com la mitjana \pm desviació estàndard d'almenys tres experiments independents fets en triplicats.

Proteïna	CCD-18Co
PE10	14,9 \pm 4,5
PE10_Tlarge_Apop	10,8 \pm 3,1
PE10_Tlarge_MCM2	12,8 \pm 2,6
PE10_ISGF_Apop	6,5 \pm 1,1
PE10_ISGF_MCM2	4,7 \pm 0,9
PE10_Apop_MCM2	16,6 \pm 7,4
PE10_HIV_Apop	17,3 \pm 8,6
PE10_HIV_MCM2	20,8 \pm 1,1

Si es comparen les IC₂₅ de les diferents variants de PE10_NES_Psite amb la variant parental PE10 es pot observar que totes les variants presenten una citotoxicitat del mateix ordre que l'obtinguda per PE10. Per tant, la introducció d'una seqüència NES_Psite a l'extrem C-terminal tampoc va permetre aconseguir millorar la selectivitat de les ND-RNases.

Atesos els resultats, es va plantejar si la manca d'augment de selectivitat era deguda a una major evasió de l'RI, com inicialment es va plantejar en el cas de les variants NES_Psite_PE5. Per aquest motiu es va analitzar el grau d'escapament de les variants PE10_NES_Psite de l'inhibidor. Tal i com es pot observar a la Figura 4.15, algunes de les variants PE10_NES_Psite no presentaven activitat catalítica per degradar l'rRNA en aquelles condicions. En base a aquests resultats, no es pot saber si aquestes variants es troben inhibides

RESULTATS I DISCUSSIÓ

per l'RI, atès que la manca d'activitat pot emascarar la inhibició. Les variants analitzades que, en aquestes condicions, presentaven activitat no escapaven de l'RI, si bé algunes d'elles presentaven menys activitat catalítica que PE10. És interessant remarcar que l'activitat sembla dependre del NES introduït. Tant el NES de l'antigen T gran com el d'HIV són els que tenen un efecte més marcat en la disminució de l'activitat mentre que els d'ISGF i de l'apoptina no semblen afectar-la significativament. Atesos els resultats, no es pot explicar en base a una inhibició per l'RI que aquestes variants no hagin incrementat la selectivitat de les ND-RNases. Tal com ja s'ha descrit anteriorment cal considerar que hi ha molts factors que poden afectar la citotoxicitat d'una RNasa i el fet que malgrat disminuir l'activitat presentin citotoxicitat es podria explicar tal com s'ha fet per les variants NES_PE5 (apartat 4.2.1.3).

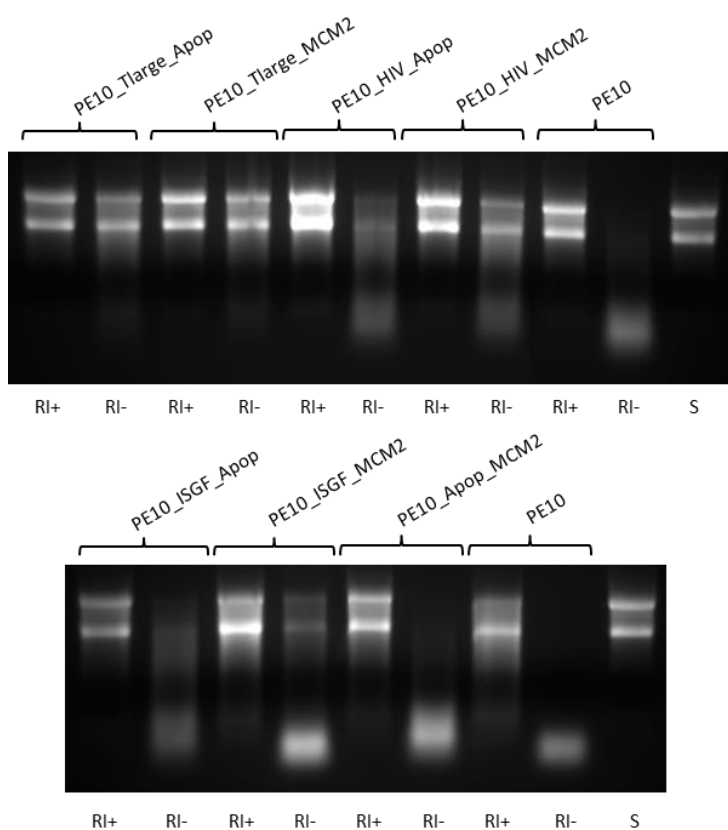


Figura 4.15. Anàlisi de la interacció de l'RI amb les diferents variants PE10_NES_Psite. Es visualitza la degradació del substrat 16S- i 23S-rRNA en presència (RI+) o absència (RI-) d'RI. El control de la integritat del substrat s'indica com a "S". Els gels es van dur a terme segons les condicions descrites a l'apartat 3.6.4.

4.2.1.6. Avaluació de l'índex de selectivitat

Per tenir una visió global dels resultats obtinguts, en el cas de les variants NES_Psite_PE5 s'ha fet una estimació de la selectivitat de cada variant expressada com el quocient entre el valor d'IC₅₀ obtingut en tractar cada línia no tumoral amb la variant corresponent respecte al valor d'IC₅₀ de la línia tumoral NCI-H460 tractada amb la mateixa variant. Els valors es presenten a la Taula 4.13. Com més elevat és aquest valor, major selectivitat té la proteïna. En línies generals, i prenent els resultats sobre totes les línies estudiades, es pot afirmar que amb aquesta estratègia no s'ha aconseguit una selectivitat significativa en cap dels mutants construïts. Les variants mantenen en menor o major grau la citotoxicitat de la variant parental PE5 sobre la línia cel·lular tumoral NCI-H460. En canvi, en cèl·lules no tumorals no s'ha aconseguit que les variants fossin significativament menys citotòxiques que PE5. Tot i això, com es pot observar a la Taula 4.13, hi ha dues variants NES_Psite_PE5 que presenten un índex de selectivitat igual o una mica superior al de PE5 depenent de la línia no tumoral considerada, són Apop_Apop_PE5 i HIV_MCM2_PE5. Ambdues proteïnes presenten valors d'índex de selectivitat similars als de PE5 si pel càlcul s'usen els valors d'IC₅₀ d'HaCaT i HEK-293, però els valors són superiors si es prenen els valors d'IC₅₀ de CCD-18Co. Les cèl·lules de la línia CCD-18Co són les que es poden considerar més similars a una cèl·lula normal, per tant, tot i que els resultats no són tan bons com fóra d'esperar, es pot dir que hi ha dues variants del grup NES_Psite_PE5 que presenten una selectivitat incrementada respecte a la proteïna parental.

Taula 4.13. Índex de selectivitat de l'onconasa, PE5 i de les variants NES_Psite_PE5. L'índex de selectivitat ha sigut calculat a partir del quocient entre els valors d'IC₅₀ de les cèl·lules no tumorals respecte als valors d'IC₅₀ de les cèl·lules NCI-H460 per cada una de les variants estudiades.

Proteïna	HaCaT / H460	CCD-18Co / H460	HEK-293 / H460
Onconasa	1,7	1,4	0,7
PE5	20	37	12
Tlarge_Apop_PE5	10	14	8
Tlarge_MCM2_PE5	10	11	7
Apop_Apop_PE5	17	58	10
Apop_MCM2_PE5	11	38	10
HIV_MCM2_PE5	13	43	11
ISGF_Apop_PE5	12	15	8

RESULTATS I DISCUSSIÓ

S'ha de ressenyar que la citotoxicitat de PE5 i PE10 també depèn en part de la línia cel·lular utilitzada (Taula 4.14). Per tant, no es pot descartar que la selectivitat obtinguda per a cada variant hauria canviat si s'hagués utilitzat com a referència una altra línia tumoral.

Taula 4.14. Valors d'IC₅₀ de PE5 i PE10 per a les línies cel·lulars tumorals indicades. Els resultats es mostren com la mitjana ± desviació estàndard d'almenys tres experiments independents.

Línia cel·lular	PE5 (µM)	PE10 (µM)
SK-BR-3	33,1 ± 3,7 ^a	ND ^c
MCF-7	20,0 ± 1,5 ^a	ND
MDA-MB-231	12,7 ± 2,0 ^a	ND
NCI/ADR-RES	8,9 ± 1,3 ^b	8,9 ± 1,6 ^b
NCI-H460/R	2,3 ± 0,4 ^b	3,3 ± 0,5 ^b
HeLa	1,7 ± 0,3 ^b	1,9 ± 0,4 ^b
OVCAR-8	3,3 ± 0,6 ^b	3,6 ± 0,8 ^b
Jurkat	13,1 ± 1,2 ^b	13,2 ± 0,8 ^b

^a Valors extrets de Castro i col·laboradors [105]

^b Valors extrets de Vert i col·laboradors [109]

^c ND. No determinat.

Pel que fa a les variants PE10_NES_Psite, per les raons que s'han explicat a l'apartat 4.2.1.5., no s'ha pogut calcular l'índex de selectivitat de les variants ni tampoc el de la proteïna parental, PE10. A més, tot i que es van comparar els assajos a tres nivells (IC₅₀ per a la línia NCI-H460, IC₂₅ per a CCD-18Co i cada corba de supervivència per separat), els resultats no permeten considerar que cap construcció millori clarament la citotoxicitat de PE10. Per tant, s'ha conclòs que situar la combinació NES_Psite a l'extrem C-terminal, tal com s'ha dissenyat en aquest treball, no permet incrementar la selectivitat de les ND-RNases. Tot i això, per PE10_HIV_MCM2 s'aprecia un lleuger increment d'aquesta selectivitat.

Finalment, és interessant destacar que totes les variants construïdes són molt més selectives que l'onconasa, l'única RNasa que ha arribat a fase II/III d'assaigs clínics com a fàrmac antitumoral [42].

Els resultats obtinguts per les variants tant de PE5 com de PE10 que són lleugerament positius conviden a continuar buscant noves combinacions o construccions que puguin assolir l'objectiu de millorar la selectivitat de les ND-RNases. Del conjunt de resultats obtinguts, les

variants Apop_Apop_PE5, HIV_MCM2_PE5 i PE10_HIV_MCM2 són les més susceptibles de ser millorades en un futur per tal de guanyar més selectivitat.

4.2.2. Estratègia per conferir selectivitat a l'HP-RNasa mitjançant la seva fusió a l'apoptina

4.2.2.1. Construcció de la variant H₆-PE10_ApopΔProΔLeu

Per tal d'aconseguir dotar de major selectivitat les ND-RNases es va proposar construir una proteïna de fusió entre variants de l'HP-RNasa i l'apoptina. L'apoptina presenta un mecanisme de citotoxicitat, en part, lligat a una seqüència NES regulable per fosforilació [121-123]. La quimera construïda permetria assajar una construcció NES_Psite en un entorn que, en principi, seria similar al que es dona en l'apoptina, presentant més possibilitats de mantenir la funcionalitat.

Per a la creació de la proteïna de fusió entre l'apoptina i una ND-RNasa es va seleccionar PE10 i un mutant de l'apoptina al qual se li havia eliminat el domini de multimerització però que conservava la seva activitat citotòxica selectiva per a cèl·lules tumorals (Ruiz-Martínez et al. enviat a publicació). Aquesta variant facilitava poder obtenir la proteïna recombinant de manera soluble ja que en no tenir el domini de multimerització s'evitava la formació d'agregats que podien fer precipitar la proteïna durant el procés de purificació. La construcció resultant es va anomenar H₆-PE10_ApopΔProΔLeu. Va ser construïda a partir del vector que contenia el gen H₆-ApopΔProΔLeu juntament amb una seqüència His-Tag a l'extrem N-terminal. Aquest gen és una variant de l'apoptina a la qual se li ha escindit els residus 1-43, eliminant d'aquesta manera les regions riques en prolines i en leucines (Ruiz-Martínez et al. enviat a publicació).

Per a la construcció d'H₆-PE10_ApopΔProΔLeu es va escindir el gen de pE10 del vector pE10(3NdeHind) (Figura 4.16-A) digerint amb l'enzim NdeI (Figura 4.16-B). A continuació es va digerir el vector pET-28ApopΔProΔLeu (Ruiz-Martínez et al. enviat a publicació) (Figura 4.16-C) amb NdeI (Figura 4.16-D) i es van lligar els dos segments per donar lloc a la construcció pH₆-PE10_ApopΔProΔLeu (Figura 4.16-E).

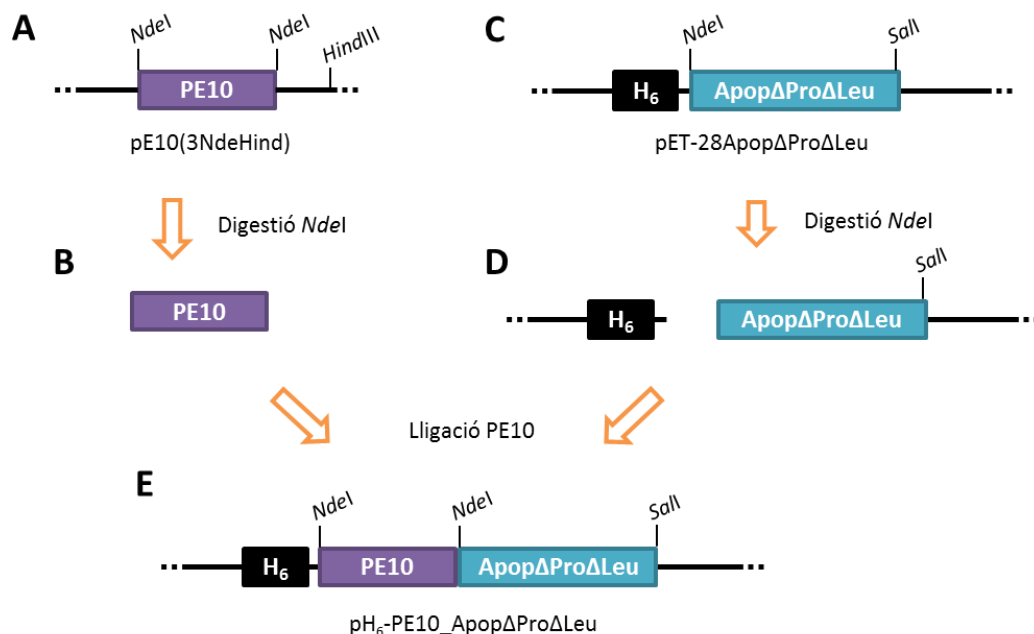


Figura 4.16. Esquema del procés de construcció de la variant pH₆-PE10_ApopΔProΔLeu.

4.2.2.2. Producció i purificació d'H₆-PE10_ApopΔProΔLeu

Després d'haver confirmat per seqüenciació de DNA que la construcció obtinguda era pH₆-PE10_ApopΔProΔLeu, es va procedir a transformar la soca d'*E. coli* BL21(DE3) amb el vector corresponent i es van dur a terme proves d'inducció per seleccionar la colònia amb millor expressió. Feta la selecció es va produir la proteïna seguint el procediment descrit a l'apartat 3.5.1.1. A la Figura 4.17 es presenta una anàlisi per SDS-PAGE del procés de producció dut a terme d'acord amb el protocol descrit a l'apartat 3.5.2.3. Com es pot observar, es va partir d'un cultiu que va presentar molt bona inducció (carrils 1 i 2, Figura 4.17). Així mateix, a la figura es pot observar el seguiment del procés de purificació per tal d'anar seleccionant a cada etapa la fracció on es trobava H₆-PE10_ApopΔProΔLeu. Tal i com es pot veure, la proteïna es trobava en els cossos d'inclusió perquè el sobrenedant no en presentava (carril 3, Figura 4.17) i, per tant, va ser necessari solubilitzar-la amb clorur de guanidini, abans de purificar-la emprant la cua d'histidines N-terminal. Durant la cromatografia d'afinitat (IMAC) es perdia certa quantitat de proteïna en el través (carril 4, Figura 4.17) i en els rentats posteriors (carrils 5 i 6, Figura 4.17), però el rendiment final d'aquesta etapa va ser elevat (carril 7, Figura 4.17).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

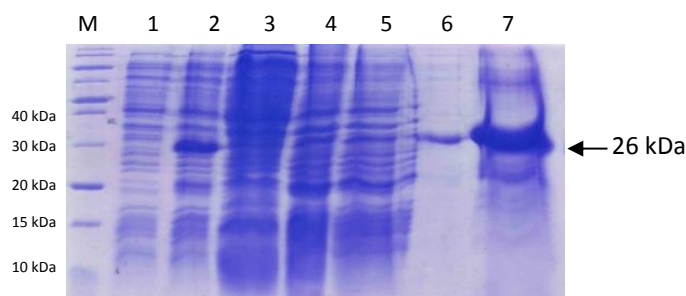


Figura 4.17. Anàlisi electroforètic del procés de producció i de purificació d'H₆-PE10_ApopΔProΔLeu. Gel d' SDS-PAGE 15% en condicions reductores. **M.** Marcadors de massa molecular. **1.** Extracte cel·lular abans d'induir amb IPTG. **2.** Extracte cel·lular després de 3 h d'inducció amb 1 mM d'IPTG. **3.** Sobrenedant del lisat cel·lular a pH 7,4. **4.** Traves cromatografia d'afinitat. **5.** Rentat 1 (5 mM d'imidazol). **6.** Rentat 2 (20 mM d'imidazol). **7.** Eluït (500 mM imidazol).

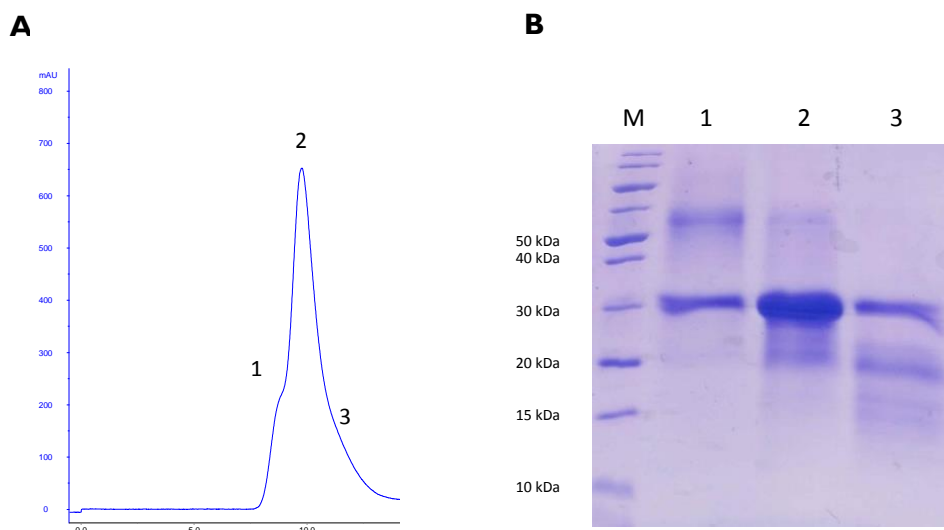


Figura 4.18. Purificació per gel-filtració d'H₆-PE10_ApopΔProΔLeu. **A)** Cromatograma de H₆-PE10_ApopΔProΔLeu. S'indiquen amb un número els tres pics solapats. **B)** Anàlisi electroforètic en gel SDS-PAGE 15% en condicions reductores del procés de purificació. **M.** Marcadors de massa molecular. **1.** Mostra corresponent al pic 1 del cromatograma. **2.** Mostra corresponent al pic 2 del cromatograma. **3.** Mostra corresponent al pic 3 del cromatograma.

Un cop es va obtenir la proteïna semipura, es va procedir al seu replegament, es va concentrar, dialitzar en aigua milliQ i liofilitzar. Finalment es va carregar a una columna de gel-filtració (Figura 4.18-A) per tal de continuar la seva purificació. S'obtingueren tres pics solapats a un volum d'elució aproximat de 10 ml, els quals es van recollir en tres fraccions i es van analitzar per SDS-PAGE (Figura 4.18-B) trobant-se H₆-PE10_ApopΔProΔLeu majoritàriament a la fracció 2 del cromatograma. La fracció de la cromatografia corresponent a la proteïna quimèrica va ser dialitzada en aigua milliQ i liofilitzada. Per últim, es va confirmar la seva massa

RESULTATS I DISCUSSIÓ

molecular per espectrometria de masses MALDI-TOF, resultant que la massa esperada va ser igual a l'observada (l'esperada era de 25.531 Da mentre que la massa observada va ser de 25.549 Da). El rendiment final del procés de purificació va ser de 9,4 mg de proteïna per litre de cultiu.

4.2.2.3. Anàlisi de la capacitat d'H₆-PE10_ApopΔProΔLeu d'evadir l'RI

Amb la finalitat de caracteritzar aquesta la nova proteïna, es va analitzar la seva capacitat d'evadir l'RI en comparació amb la proteïna parental PE10 que presenta activitat ribonucleasa (Figura 4.19). Tal i com es desprèn dels resultats obtinguts, no es pot saber si aquesta variant escapa o no de l'RI, perquè qualitativament no mostra activitat ribonucleolítica en absència d'RI.

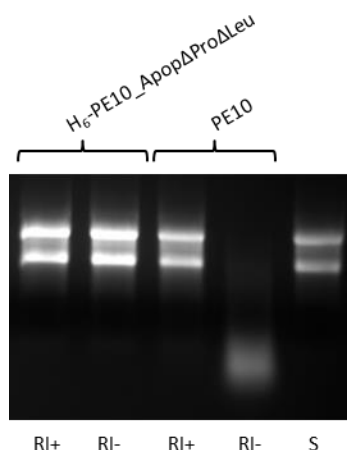


Figura 4.19. Inhibició de l'activitat ribonucleolítica d'H₆-PE10_ApopΔProΔLeu per efecte de l'RI. Es visualitza la degradació del substrat 16S- i 23S-rRNA en presència (RI+) o absència (RI-) d'RI. El control de la integritat del substrat s'indica com a "S". El gel es va dur a terme en les condicions descrites a l'apartat 3.6.4.

4.2.2.4. Citotoxicitat d'H₆-PE10_ApopΔProΔLeu per a cèl·lules tumorals i no tumorals

Per determinar si aquesta nova construcció incrementa la capacitat d'induir la mort cel·lular selectiva de cèl·lules tumorals respecte a les ND-RNases, es va estudiar la citotoxicitat sobre la línia tumoral NCI-H460 i sobre la línia no tumoral CCD-18Co, comparant-la amb la citotoxicitat presentada per les seves proteïnes parentals PE10 i H₆-ApopΔProΔLeu sobre les mateixes línies (Taula 4.15).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Taula 4.15. Valors d'IC₅₀ (µM) de PE10, H₆-ApopΔProΔLeu i H₆-PE10_ApopΔProΔLeu per a la línia cel·lular tumoral NCI-H460 i la no tumoral CCD-18Co. Els resultats es mostren com la mitjana ± desviació estàndard d'almenys tres experiments independents.

Proteïna	NCI-H460	CCD-18Co
PE10	1,8 ± 0,2	≥ 30
H₆-ApopΔProΔLeu	7,5 ± 1,3 ^a	≥ 30 ^a
H₆-PE10_ApopΔProΔLeu	4,8 ± 0,6	19,1 ± 0,01

^a Valors extrets de Ruiz-Martínez i col·laboradors (Ruiz-Martínez et al. enviat a publicació).

En el cas de les cèl·lules CCD-18Co tractades tant amb PE10 com amb H₆-ApopΔProΔLeu no va ser possible determinar un valor d'IC₅₀, ja que a la concentració màxima testada la corba de supervivència no assolía una inhibició de la proliferació del 50%. Per tant, a la Taula 4.15 s'han indicat aquests casos amb el símbol “≥ 30”.

Tal i com es pot veure a la Taula 4.15, la proteïna de fusió H₆-PE10_ApopΔProΔLeu presenta una citotoxicitat similar a la de les proteïnes parentals H₆-ApopΔProΔLeu i PE10 per a cèl·lules tumorals. En canvi, H₆-PE10_ApopΔProΔLeu és més citotòxica per a cèl·lules no tumorals que les proteïnes parentals. La citotoxicitat d'H₆-PE10_ApopΔProΔLeu podria provenir només de la meitat apoptina ja que en l'assaig d'escapament no es va detectar activitat ribonucleolítica. Per determinar que efectivament la proteïna quimèrica no era activa es va mesurar la seva activitat catalítica i es va comparar amb la de PE10, emprant com a substrat citidina 2',3' fosfat cíclic (C>p) i treballant a concentracions saturants, seguint el procediment descrit per Boix i col·laboradors [195]. Amb aquest assaig es va veure que H₆-PE10_ApopΔProΔLeu tan sols conserva un 6% de l'activitat presentada per la proteïna parental PE10.

En base als resultats obtinguts, es pot especular que l'increment de citotoxicitat de la quimera respecte a les proteïnes parentals, observat en cèl·lules no tumorals, podria ser a causa de la presència del segon NLS aportat per la meitat RNasa (pràcticament inactiva) que permetria una major permanència de la construcció al nucli, contrarestant l'efecte del NES. A més, H₆-ApopΔProΔLeu és una proteïna desestructurada (Ruiz-Martínez et al. enviat a publicació), per tant, la meitat apoptina podria afectar l'estructura de PE10.

Es pot concloure doncs que la fusió de PE10 amb H₆-PE10_ApopΔProΔLeu provoca una disminució de la selectivitat per a cèl·lules tumorals. Per tant, malgrat la localització de la seqüència NES_Psite en el context de la proteïna, no es va assolir l'efecte buscat.

5. *DISCUSSIÓ GENERAL*

DISCUSSIÓ GENERAL

El càncer, tot i ser una malaltia habitualment considerada més pròpia dels països desenvolupats, actualment és un problema global, ja que més del 60% de tots els càncers (excloent el càncer de pell no melanoma) es produeixen en països del tercer món [196]. L'any 2012 hi van haver 14,1 milions de nous casos diagnosticats i es van produir 8,2 milions de morts. A més, els estudis prediuen un increment de més de 20 milions de nous casos diagnosticats anualment a partir del 2025 [197]. Per tant, vèncer el càncer és un dels reptes pendents de la medicina actual. Quan el tumor es troba localitzat i és de mida petita, molt probablement l'extirpació a través de cirurgia juntament amb un tractament de radioteràpia assolirà bons resultats. Si es tracta de tumors no localitzats i dispersos per tot el cos, la quimioteràpia constitueix l'únic tractament. Un dels problemes de la quimioteràpia clàssica, la molècula diana de la qual és el DNA, és la baixa selectivitat, la qual cosa provoca efectes secundaris a curt, mitjà i llarg termini.

Per aquest motiu hi ha un enorme interès en el desenvolupament de fàrmacs antitumorals més selectius. Un exemple seria la utilització d'anticossos monoclonals que s'uneixen específicament a un receptor que es troba sobreexpressat en cèl·lules tumorals, com és el cas del trastuzumab. El trastuzumab (Herceptin®; Genentech, Califòrnia, EUA) és un anticòs monoclonal recombinant humanitzat que s'uneix específicament al domini extracel·lular del receptor tirosina quinasa HER2 [198], el qual es troba sobreexpressat en cèl·lules tumorals de càncer de mama metastàtic [199]. Tot i que ha millorat la taxa de supervivència de pacients amb càncer de mama HER2 positiu [200, 201], s'ha obtingut un èxit relatiu a causa de l'aparició a curt termini de resistències (revisat a [202]).

Diferents grups estan desenvolupant nous fàrmacs antitumorals basats en RNases. Atès que són enzims que afecten l'RNA no són genotòxics i, per tant, els seus efectes sobre les cèl·lules no tumorals són reversibles. A més, ja que afecten l'RNA, els efectes també són pleiotròpics. Això suposa un avantatge respecte als fàrmacs selectius que van dirigits contra una única diana ja que s'ha demostrat que, en alguns casos, no poden lluitar contra la complexitat multifactorial del càncer. Dins d'aquestes RNases, l'ús de l'HP-RNasa és interessant per diversos motius. El seu origen humà fa pensar que no presentarà problemes significatius d'immunogenicitat que podrien limitar-ne l'ús o disminuir-ne la vida mitjana *in vivo*. A més, contràriament al que ocorre amb l'onconasa, l'HP-RNasa no s'acumula als ronyons, de manera que és d'esperar que les seves variants no presentin toxicitat renal [83]. Finalment, a diferència d'altres RNases, aquest enzim té més activitat endonucleasa [203], cosa que facilita la inactivació d'un ampli espectre de molècules d'RNA amb un sol tall. Pel que fa a les RNases que són capaces de dirigir-se al nucli, estudis previs han demostrat que tant PE5 com NLSPE5

DISCUSSIÓ GENERAL

són citotòxiques per a un ampli panell de línies cel·lulars tumorals [66, 94, 109] i que indueixen la mort cel·lular per apoptosi [66, 109].

La raó per la qual les RNases maten selectivament les cèl·lules tumorals ha sigut molt discutida, i s'especula amb diverses teories (revisat a [9]). Una d'elles hipotetitzava que les RNases podrien ser selectivament reconegudes o bé internalitzades per les cèl·lules tumorals. Aquesta hipòtesi es basa en el fet que les cèl·lules canvien la composició de la membrana cel·lular substituint les molècules de fosfatidiletanolamina per fosfatidilcolina durant el procés de transformació [204]. Aquest canvi implica un increment de les càrregues negatives de la superfície cel·lular, fet que podria facilitar la interacció amb les RNases, que presenten caràcter bàsic. Una altra hipòtesi es basa en una ruta d'internalització diferencial només productiva en cèl·lules tumorals i no en cèl·lules no transformades, la qual permetria la translocació eficient al citosol de les RNases només en cèl·lules tumorals. Per exemple, s'ha comprovat la presència de la BS-RNasa a la xarxa del trans Golgi de cèl·lules tumorals, fet que no s'observa en cèl·lules no tumorals [23]. Per últim, l'especificitat podria estar relacionada amb la major sensibilitat de les cèl·lules tumorals al trencament de l'RNA. Per exemple, s'ha descrit que l'onconasa pot activar vies apoptòtiques en cèl·lules tumorals que tenen gens supressors de tumors inactivats que no són accessibles en cèl·lules no tumorals [65].

En aquest treball s'ha volgut corroborar la selectivitat de les ND-RNases per a cèl·lules tumorals ampliant l'estudi dels efectes d'aquests enzims a un nombre significatiu de línies no tumorals. Així mateix, s'han estudiat els mecanismes responsables d'aquesta selectivitat.

Es va mesurar la citotoxicitat de dues ND-RNases, PE5 i NLSPE5, sobre les línies cel·lulars no tumorals HaCaT, CCD-18Co, HEK-293 i IBR.3.G. Com a control de cèl·lules tumorals es va utilitzar la línia NCI-H460, obtenint valors d'IC₅₀ similars als descrits en estudis previs del grup [109]. Així mateix, per ampliar el ventall de línies tumorals es van incloure els valors d'IC₅₀ de les línies tumorals HeLa, OVCAR-8 i NCI/ADR-RES obtinguts en estudis anteriors [109]. Com a control positiu d'una RNasa citotòxicament selectiva per a cèl·lules tumorals es va emprar l'onconasa. Haigis i col·laboradors [7] van demostrar que l'onconasa era altament citotòxica per a totes les línies cel·lulars tumorals testades, amb valors d'IC₅₀ de l'ordre de submicromolar, mentre que en cèl·lules no tumorals l'IC₅₀ era unes 10 vegades més gran. Tanmateix, en el cas d'NLSPE5, l'IC₅₀ per a cèl·lules tumorals és, en la major part de les línies assajades, del mateix ordre o lleugerament més baixa que la de l'onconasa però l'IC₅₀ per a cèl·lules no tumorals és d'1,5 a 12 vegades més gran. En el cas de PE5, el valor d'IC₅₀ és d'1,5 a 10 vegades més gran que la de l'onconasa per a cèl·lules tumorals però de 12,5 a 37 vegades

DISCUSSIÓ GENERAL

més gran per a cèl·lules no tumorals. Per tant, aquestes dades suggereixen que la selectivitat de PE5 i NLSPE5 per a cèl·lules tumorals és superior a la de l'onconasa.

A continuació, emprant la línia no tumoral CCD-18Co, que era la línia més sensible a l'acció d'aquestes ND-RNases, es van dur a terme un seguit d'estudis a fi i efecte d'establir la base molecular del mecanisme de selectivitat de PE5 i NLSPE5. Saber com es comporten aquestes RNases i esbrinar quines molècules s'alteren de manera diferencial en cèl·lules tumorals i en no tumorals pot obrir un camí a l'hora de perfeccionar l'acció d'aquests agents terapèutics, a més de permetre el potencial descobriment de noves funcions de les molècules que queden alterades per l'acció dels agents terapèutics.

PE5 i NLSPE5 mostren un comportament similar per a cèl·lules tumorals i no tumorals pel que fa a la proliferació i viabilitat cel·lular. Ambdues ND-RNases són citotòxiques a concentracions elevades, encara que a baixes concentracions presenten un lleu efecte citostàtic. No obstant això, els seus efectes sobre la progressió del cicle cel·lular en cèl·lules no tumorals difereixen dels presentats en cèl·lules tumorals. PE5 i NLSPE5 provoquen una acumulació de les cèl·lules tumorals en les fases S i G₂/M en les línies NCI/ADR-RES [66] i NCI-H460/R [154]. Sorprenentment, PE5 i NLSPE5 no produeixen una acumulació de cèl·lules no tumorals CCD-18Co en cap fase del cicle cel·lular en concret, per tant, PE5 i NLSPE5 maten les cèl·lules tumorals independentment de la fase en què es trobin. Aquesta troballa es correlaciona amb el fet que, a l'hora d'investigar els efectes sobre determinades proteïnes relacionades amb el cicle cel·lular, com p27^{KIP1}, p21^{WAF1/CIP1} i la ciclina D₁, la seva sobreexpressió es troba localitzada al citosol.

Per altra banda, si bé tant en cèl·lules tumorals com en no tumorals les dues ND-RNases activen les procaspases 3, 8 i 9, s'han detectat diferències en la variació de l'expressió de proteïnes relacionades amb l'apoptosi en funció de l'ND-RNasa assajada. PE5 incrementa els nivells de Bax mentre que redueix els de Bcl-2. Si es calcula el quocient entre aquestes dues proteïnes, el valor que s'obté indica que les cèl·lules han entrat en apoptosi [166-169]. En canvi, aquesta diferència entre Bax i Bcl-2 no s'ha observat en cèl·lules no tumorals tractades amb NLSPE5. Una altra divergència entre cèl·lules no tumorals tractades amb PE5 o NLSPE5 es troba en l'expressió de p21^{WAF1/CIP1}. En cèl·lules tumorals NCI/ADR-RES, PE5 i NLSPE5 produeixen una sobreexpressió de p21^{WAF1/CIP1}, fet que provoca la disminució dels nivells d'activació de JNK [66, 109]. En canvi, en cèl·lules CCD-18Co, només NLSPE5 incrementa els nivells de p21^{WAF1/CIP1}, però manté estables els nivells de JNK i p-JNK. Tanmateix, tant PE5 com NLSPE5 indueixen un increment dels nivells citoplasmàtics de p27^{KIP1} en cèl·lules no tumorals,

DISCUSSIÓ GENERAL

cosa que no s'ha observat en cèl·lules tumorals tractades amb aquestes ND-RNases [66, 109]. Així doncs, aquests resultats indicarien que PE5 i NLSPE5 tenen mecanismes d'activació de l'apoptosi diferents en cèl·lules no tumorals.

La base del mecanisme de selectivitat de PE5 i NLSPE5 per a cèl·lules no tumorals rau majoritàriament en l'expressió diferencial dels inhibidors CKI, p27^{KIP1} i/o p21^{WAF1/CIP1}, al citoplasma, els quals exerceixen altres funcions més enllà de la regulació del cicle cel·lular, algunes de les quals es duen a terme en el citosol [164]. Aquest resultat és interessant, ja que la majoria d'estudis que s'han realitzat sobre les diferents funcions de p27^{KIP1} i de p21^{WAF1/CIP1} s'han dut a terme en cèl·lules tumorals. La major part dels estudis coincideixen que p27^{KIP1} citoplasmàtica té la capacitat d'inhibir o limitar els efectes de l'apoptosi, a través d'impedir l'alliberament del citocrom c al citosol [177], fet que evitaria l'activació de la procaspasa 9 [205]. Per altra banda, p21^{WAF1/CIP1} citoplasmàtica evita l'apoptosi inhibint, entre altres, la procaspasa 3 [182] i, a més, pot inhibir directament o indirectament JNK [98, 184]. Com s'ha explicat anteriorment, es postula que la funció de JNK en CCD-18Co pot ser proapoptòtica, però en el cas de cèl·lules CCD-18Co tractades amb NLSPE5 no s'ha observat una disminució de l'expressió ni de JNK ni de la seva forma activada, sinó que els nivells s'han mantingut iguals als de les cèl·lules sense tractar.

El segon objectiu d'aquest treball ha sigut el de dissenyar noves variants d'RNases dirigides a nucli que presentin una major selectivitat. Es va decidir introduir en PE5 i PE10 diferents seqüències d'exportació nuclear (NES) condicionals que fossin regulables per la fosforilació catalitzada per quinases sobreexpressades en cèl·lules tumorals, concretament per CDK2. La fosforilació d'un residu proper a un NLS o NES és un dels mecanismes més comuns a l'hora de regular el transport de proteïnes que contenen NLS i/o NES en la seva seqüència, a través de l'augment o disminució del reconeixement per part de les importines i/o exportines, respectivament (revisat a [206, 207]). Per exemple, s'ha vist que a l'antigen T gran del virus SV40 la fosforilació de la Ser111/112 que flanqueja l'NLS, per part de la caseïna quinasa 2 (CK2), incrementa el reconeixement d'aquesta seqüència per la importina $\alpha/\beta 1$ unes 100 vegades, cosa que augmenta al seu torn l'eficiència d'entrada d'aquest antigen a nucli unes 50 vegades [208, 209]. El mateix mecanisme és vàlid en el cas de l'exportació nuclear, on la fosforilació de les Ser114 i Ser128 en el factor de transcripció de llevats Pho4 incrementa substancialment el seu reconeixement per part de l'exportina 4 (Msn5) [210]. En canvi, la fosforilació de la Ser152 en Pho4, propera a un NLS, per part de la quinasa dependent de ciclina Pho80-Pho85, impedeix la unió de la importina $\beta 3$ (Pse1), evitant d'aquesta manera l'import nuclear de Pho4 [211]. De la mateixa manera, la fosforilació de la Thr174 i la Tyr176 en la

DISCUSSIÓ GENERAL

proteïna Hog1p, que pertany a la via d'alta osmolaritat per glicerol en llevats, emmascara el NES i impedeix la seva unió amb l'exportina I (Xpo1p) evitant l'exportació nuclear [212]. Un altre exemple de com la fosforilació impedeix l'exportació nuclear és l'apoptina. L'apoptina és una proteïna d'origen viral que mata específicament les cèl·lules tumorals humanes sense afectar les cèl·lules no tumorals, fet que ha desencadenat un seguit d'estudis amb la finalitat d'aprofitar aquesta característica i aplicar-la en el camp de la teràpia antitumoral.

Seguint aquest raonament, es van construir variants d'ND-RNases (PE5 i PE10) que incorporaven un NES, la qual cosa faria disminuir la citotoxicitat de la variant. Aquest NES seria regulable per fosforilació d'un residu proper reconegut per una quinasa sobreexpressada en cèl·lules tumorals. El que s'esperava era que en cèl·lules tumorals aquestes quinases sobreexpressades fosforilarien la diana i bloquejarien el NES afavorint la retenció de la proteïna a nucli, mentre que en cèl·lules no tumorals el NES seria accessible per unir-se a exportines i facilitaria el seu transport a citoplasma, on la variant seria inhibida per l'RI. Si l'estratègia funcionava, s'esperaria que en cèl·lules tumorals la citotoxicitat fos igual que la presentada per PE5 o PE10, però que en cèl·lules no tumorals la citotoxicitat hauria de ser clarament menor que la promoguda per les RNases parentals.

Inicialment es van construir les variants NES_Psite_PE5, les quals incorporaven les diferents combinacions de seqüències NES i llocs de fosforilació a l'extrem N-terminal, en aquests cas, de PE5. Un cop produïdes i purificades, es va determinar la citotoxicitat que presentaven sobre una línia tumoral, NCI-H460, i sobre 3 línies no tumorals, HaCaT, CCD-18Co i HEK-293. Aquestes variants mantenien una citotoxicitat similar a la de PE5 sobre la línia NCI-H460 mentre que per a les línies no tumorals, en general, la citotoxicitat era igual o major que PE5. Per tant, aquestes construccions no incrementaven la selectivitat, que era el propòsit desitjat, excepte en el cas d'Apop_Apop_PE5 i HIV_MCM2_PE5 on s'observava un increment de selectivitat respecte a PE5 si es comparaven els valors d'IC₅₀ de la línia NCI-H460 i CCD-18Co. Una possible explicació del perquè aquestes variants havien guanyat citotoxicitat en cèl·lules no tumorals era que evadien millor l'acció de l'RI i, per tant, quan eren redireccionades al citosol de les cèl·lules no tumorals igualment estaven capacitades per degradar altres tipus d'RNA i mataven les cèl·lules. Tanmateix, aquesta hipòtesi va ser descartada pel fet que totes les variants obtingudes escapaven de l'RI. Així doncs, l'explicació més plausible va ser que el NES situat a l'extrem N-terminal de l'ND-RNasa no era funcional. Per aquest motiu, es van purificar les variants intermèdies NES_PE5 que es van obtenir durant el procés de construcció de les variants NES_Psite_PE5. Amb les variants NES_PE5 es va comprovar el grau d'escapament a l'inhibidor i, com en el cas de NES_Psite_PE5, totes

DISCUSSIÓ GENERAL

escapaven. En canvi, en estudiar la citotoxicitat de NES_PE5 per a la línia NCI-H460, es va veure que totes tenien la mateixa IC_{50} que PE5. És possible que aquest resultat sigui degut a que el NES no sigui funcional a l'extrem N-terminal de les ND-RNases ja que en cas contrari la citotoxicitat hauria d'haver estat marcadament inferior a la de PE5. De totes maneres, la complexitat del mecanisme d'actuació de les RNases fa que sigui complex poder afirmar això amb rotunditat.

Així doncs, es van construir, produir i purificar altres variants situant les diferents combinacions de NES_Psite a l'extrem C-terminal, en aquest cas, de PE10. Totes les variants PE10_NES_Psite van ser igual de citotòxiques que la variant parental per a la línia tumoral NCI-H460. Malauradament, a l'hora de determinar la citotoxicitat per a la línia no tumoral CCD-18Co, en molts casos no va ser possible determinar un valor d' IC_{50} , de manera que es va optar per calcular el valor d' IC_{25} el qual va permetre obtenir una mitjana, tot i saber que un valor d' IC_{25} és menys fiable que un d' IC_{50} . En comparar els valors d' IC_{25} per a la línia CCD-18Co, cap variant disminuïa substancialment la citotoxicitat respecte a PE10 i d'aquesta manera cap incrementava la selectivitat significativament, excepte la variant PE10_HIV_MCM2, on es va apreciar un lleuger increment de la selectivitat. Així doncs, es va concloure que l'estratègia de situar els NES_Psite a l'extrem C-terminal tampoc permetia assolir l'objectiu buscat. Va sorprendre la manca d'increment de selectivitat, i per això també es va estudiar el grau d'escapament a l'RI per descartar un increment de citotoxicitat en cèl·lules no tumorals per aquesta raó. No obstant això, es va veure que aquesta hipòtesi quedava descartada per a PE10_ISGF_Apop, PE10_ISGF_MCM2 i PE10_Apop_MCM2, mentre que no va ser possible determinar-ho per a PE10_Tlarge_Apop, PE10_Tlarge_MCM2, PE10_HIV_Apop i PE10_HIV_MCM2. Per tant, tot i els resultats obtinguts, Apop_Apop_PE5, HIV_MCM2_PE5 i PE10_HIV_MCM2 són les variants que, tot i no incrementar significativament la selectivitat, són les candidates a ser millorades en properes construccions. Es podria plantejar allargar més les seqüències linker que separen el NES i el lloc de fosforilació de l'RNasa, a fi d'assegurar que les seqüències siguin més accessibles a la maquinària de transport cel·lular i a les quinases.

La raó per la qual l'estratègia de combinar diferents seqüències NES que fossin regulables per fosforilació no ha assolit els resultats esperats és difícil de respondre. Arribats a aquest punt és important ressaltar que quan s'introdueixen residus addicionals a la seqüència d'una RNasa per tal de modificar o potenciar la seva citotoxicitat/selectivitat, el resultat final pot no ser l'esperat a causa de diferents variables que són difícils de controlar. Les seqüències introduïdes podrien estar alterant les interaccions entre els diferents residus de la proteïna que al capdavall determinen la seva conformació nativa. També podria modificar l'accessibilitat

DISCUSSIÓ GENERAL

a determinades regions de la proteïna, com per exemple els NLS, NES i llocs de fosforilació, així com l'activitat enzimàtica i l'estabilitat.

Per últim, el tercer objectiu ha sigut fusionar PE10, una variant més humanitzada que PE5, amb l'apoptina, una proteïna amb una gran capacitat d'induir apoptosi en cèl·lules de mamífer tumorals o transformades mentre que no afecta les cèl·lules primàries o les no transformades [120]. Per tant, en aquest treball s'ha volgut aprofitar les propietats antitumorals de l'apoptina, que estan lligades a la seva localització cel·lular, per crear H₆-PE10_ApopΔProΔLeu, una proteïna quimèrica amb una ND-RNasa, amb l'objectiu que l'efecte combinat d'ambdues proteïnes sigui sinèrgic sobre les cèl·lules tumorals i sobretot per tal que s'aconsegueixi major especificitat. La variant H₆-ApopΔProΔLeu es va considerar adequada per a la fusió, per les raons que s'han comentat anteriorment a l'apartat 1.3.3. L'objectiu d'aquesta construcció, doncs, és similar a les variants NES_Psite_PE5 i PE10_NES_Psite, però en el cas de la proteïna quimèrica, el que es pretenia era que el NES regulable per fosforilació es trobés en el context proteic en què es troba en l'apoptina sencera. Malauradament, la proteïna de fusió és més citotòxica per a cèl·lules no tumorals en comparació amb les seves proteïnes parentals, de manera que la seva selectivitat per a cèl·lules tumorals s'ha reduït. La raó per la qual H₆-PE10_ApopΔProΔLeu ha disminuït l'índex de selectivitat no es pot saber. Però no es pot descartar que en fusionar les dues proteïnes s'hagin establert interaccions entre elles que hagin alterat les seves propietats biològiques. De fet, se sap que la variant H₆-ApopΔProΔLeu és una proteïna classificada com a intrínsecament desplegada (Ruiz-Martínez et al. enviat a publicació), de manera que en podria estar alterant o destorbant l'estructura de PE10. A més, una altra possible raó que explicaria l'increment de citotoxicitat podria ser pel fet que la introducció d'un segon NLS aportat per PE10 a la proteïna quimèrica podria contrarestar l'efecte del NES de l'apoptina truncada, per la qual cosa s'acumularien més molècules d'H₆-PE10_ApopΔProΔLeu al nucli.

6. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. Les ND-RNases PE5 i NLSPE5 són selectivament citotòxiques per a cèl·lules tumorals i són més selectives que l'onconasa.
2. Tant PE5 com NLSPE5 tenen efectes citotòxics sobre la línia cel·lular CCD-18Co. PE5 presenta un lleu efecte citostàtic a concentracions baixes.
3. PE5 i NLSPE5 no alteren la proporció de cèl·lules a les diferents fases del cicle cel·lular en cèl·lules no tumorals CCD-18Co, a diferència del que ocorre en cèl·lules tumorals NCI/ADR-RES i NCI-H460/R.
4. El patró d'expressió de diferents proteïnes relacionades amb el cicle cel·lular i l'apoptosi en cèl·lules no tumorals difereix del presentat per cèl·lules tumorals, després del tractament amb les ND-RNases. En cèl·lules no tumorals tractades amb PE5 es produeix una disminució de l'expressió de Bcl-2 i un lleuger increment de Bax, acompanyat d'un increment de l'expressió de p27^{KIP1}, mentre que quan són tractades amb NLSPE5 s'incrementa l'expressió de p27^{KIP1}, p21^{WAF1/CIP1} i de les ciclines D₁ i E. En canvi, en cèl·lules tumorals deficientes en p53 tractades tant amb PE5 com amb NLSPE5 es produeix un increment d'expressió de la ciclina E i de p21^{WAF1/CIP1}, acompanyat d'una disminució de p-JNK.
5. PE5 i NLSPE5 indueixen l'activació de les procaspases 3, 8 i 9 en cèl·lules no tumorals CCD-18Co, efecte que ja s'observa a les 48 h de tractament.
6. La selectivitat de les ND-RNases es pot explicar almenys en part per la sobreexpressió citoplasmàtica de p27^{KIP1} i/o p21^{WAF1/CIP1}, els quals protegeixen les cèl·lules no tumorals de l'apoptosi gràcies a la seva unió i inactivació de diferents proteïnes citoplasmàtiques involucrades en aquest procés.
7. S'han dissenyat, construït, purificat i caracteritzat diverses variants de PE5 i PE10 a les quals s'ha afegit una seqüència d'exportació nuclear (NES) regulable per fosforilació (Psite), tant a l'extrem N- com a l'extrem C-terminal, amb la finalitat d'aconseguir ND-RNases més selectives.
8. L'Rl inhibeix *in vitro* les variants NES_PE5, excepte NES(Apop)_PE5 que n'escapa completament. Les variants de NES_Psite_PE5 pateixen la mateixa inhibició que la variant parental PE5. En canvi, algunes variants del conjunt PE10_NES_Psite

CONCLUSIONS

mostren tan poca activitat en les condicions assajades, que no es pot afirmar si interaccionen amb l'RI.

9. Les diferents seqüències NES unides a una diana de fosforilació, situades tant a l'extrem N- com C-terminal, no han assolit un increment significatiu de selectivitat respecte a la proteïna parental, amb excepció de les variants Apop_Apop_PE5 i HIV_MCM2_PE5 i PE10_HIV_MCM2, les quals presenten un lleuger augment.
10. S'ha construït una proteïna de fusió entre PE10 i una variant de l'apoptina citotòxica soluble de manera que la parella NES_Psite es trobés en el seu context proteic amb la finalitat de millorar la selectivitat. No obstant això, la construcció no presenta una millora de selectivitat. Aquest fet pot ser a causa de la influència de la variant de l'apoptina sobre l'estructura de l'RNasa, atès que la primera és una proteïna caracteritzada com a intrínsecament desplegada. A més, la presència d'un segon NLS podria contrarestar l'efecte del NES, fet que permetria una major acumulació al nucli de les cèl·lules no tumorals i, per tant, una major citotoxicitat sobre aquestes cèl·lules, perdent selectivitat.

7. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Govindan SV, Goldenberg DM: **New antibody conjugates in cancer therapy.** *ScientificWorldJournal* 2010, **10**:2070-2089.
2. Kreitman RJ: **Immunotoxins in cancer therapy.** *Curr Opin Immunol* 1999, **11**(5):570-578.
3. Schein CH: **From housekeeper to microsurgeon: the diagnostic and therapeutic potential of ribonucleases.** *Nat Biotechnol* 1997, **15**(6):529-536.
4. Beintema JJ, Kleineidam RG: **The ribonuclease A superfamily: general discussion.** *Cell Mol Life Sci* 1998, **54**(8):825-832.
5. Leland PA, Raines RT: **Cancer chemotherapy--ribonucleases to the rescue.** *Chem Biol* 2001, **8**(5):405-413.
6. Rybak SM, Newton DL: **Natural and engineered cytotoxic ribonucleases: therapeutic potential.** *Exp Cell Res* 1999, **253**(2):325-335.
7. Haigis MC, Kurten EL, Raines RT: **Ribonuclease inhibitor as an intracellular sentry.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**(3):1024-1032.
8. Kobe B, Deisenhofer J: **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):1028-1043.
9. Benito A, Ribo M, Vilanova M: **On the track of antitumour ribonucleases.** *Mol Biosyst* 2005, **1**(4):294-302.
10. Benito A, Vilanova M, Ribo M: **Intracellular routing of cytotoxic pancreatic-type ribonucleases.** *Curr Pharm Biotechnol* 2008, **9**(3):169-179.
11. D'Alessio G: **New and cryptic biological messages from RNases.** *Trends Cell Biol* 1993, **3**(4):106-109.

BIBLIOGRAFIA

12. D'Alessio G, Di Donato A, Parente A, Piccoli R: **Seminal RNase: a unique member of the ribonuclease superfamily**. *Trends Biochem Sci* 1991, **16**(3):104-106.
13. Laccetti P, Portella G, Mastronicola MR, Russo A, Piccoli R, D'Alessio G, Vecchio G: **In vivo and in vitro growth-inhibitory effect of bovine seminal ribonuclease on a system of rat thyroid epithelial transformed cells and tumors**. *Cancer Res* 1992, **52**(17):4582-4586.
14. Matousek J: **The effect of bovine seminal ribonuclease (AS RNase) on cells of Crocker tumour in mice**. *Experientia* 1973, **29**(7):858-859.
15. Matousek J, Pavlok A, Dostal J, Grozdanovic J: **Some biological properties of bull seminal vesicle aspermatogenic substance and its effect on mice**. *J Reprod Fertil* 1973, **34**(1):9-22.
16. Soucek J, Chudomel V, Potmesilova I, Novak JT: **Effect of ribonucleases on cell-mediated lympholysis reaction and on GM-CFC colonies in bone marrow culture**. *Nat Immun Cell Growth Regul* 1986, **5**(5):250-258.
17. Tamburrini M, Scala G, Verde C, Ruocco MR, Parente A, Venuta S, D'Alessio G: **Immunosuppressive activity of bovine seminal RNase on T-cell proliferation**. *Eur J Biochem* 1990, **190**(1):145-148.
18. Piccoli R, Tamburrini M, Piccialli G, Di Donato A, Parente A, D'Alessio G: **The dual-mode quaternary structure of seminal RNase**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**(5):1870-1874.
19. D'Alessio G, Di Donato A, Mazzarella L, Piccoli R: **Seminal ribonuclease: the importance of diversity**. In: *Ribonucleases: structures and functions*. Edited by D'Alessio G, Riordan JF. New York: Academic Press; 1997: 383-423.
20. Cafaro V, De Lorenzo C, Piccoli R, Bracale A, Mastronicola MR, Di Donato A, D'Alessio G: **The antitumor action of seminal ribonuclease and its quaternary conformations**. *FEBS Lett* 1995, **359**(1):31-34.

BIBLIOGRAFIA

21. Murthy BS, De Lorenzo C, Piccoli R, D'Alessio G, Sirdeshmukh R: **Effects of protein RNase inhibitor and substrate on the quaternary structures of bovine seminal RNase.** *Biochemistry* 1996, **35**(13):3880-3885.
22. Mastronicola MR, Piccoli R, D'Alessio G: **Key extracellular and intracellular steps in the antitumor action of seminal ribonuclease.** *Eur J Biochem* 1995, **230**(1):242-249.
23. Bracale A, Spalletti-Cernia D, Mastronicola M, Castaldi F, Mannucci R, Nitsch L, D'Alessio G: **Essential stations in the intracellular pathway of cytotoxic bovine seminal ribonuclease.** *Biochem J* 2002, **362**(Pt 3):553-560.
24. Viola M, Libra M, Callari D, Sinatra F, Spada D, Noto D, Emmanuele G, Romano F, Averna M, Pezzino FM et al: **Bovine seminal ribonuclease is cytotoxic for both malignant and normal telomerase-positive cells.** *Int J Oncol* 2005, **27**(4):1071-1077.
25. Ardelt W, Ardelt B, Darzynkiewicz Z: **Ribonucleases as potential modalities in anticancer therapy.** *Eur J Pharmacol* 2009, **625**(1-3):181-189.
26. Ardelt W, Shogen K, Darzynkiewicz Z: **Onconase and amphinase, the antitumor ribonucleases from *Rana pipiens* oocytes.** *Curr Pharm Biotechnol* 2008, **9**(3):215-225.
27. Lee I: **Ranpirnase (Onconase), a cytotoxic amphibian ribonuclease, manipulates tumour physiological parameters as a selective killer and a potential enhancer for chemotherapy and radiation in cancer therapy.** *Expert Opin Biol Ther* 2008, **8**(6):813-827.
28. Makarov AA, Kolchinsky A, Ilinskaya ON: **Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents.** *Bioessays* 2008, **30**(8):781-790.
29. Mosimann SC, Ardelt W, James MN: **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):1141-1153.

BIBLIOGRAFIA

30. Newton DL, Hansen HJ, Mikulski SM, Goldenberg DM, Rybak SM: **Potent and specific antitumor effects of an anti-CD22-targeted cytotoxic ribonuclease: potential for the treatment of non-Hodgkin lymphoma.** *Blood* 2001, **97**(2):528-535.
31. Newton DL, Stockwin LH, Rybak SM: **Anti-CD22 Onconase: preparation and characterization.** *Methods Mol Biol* 2009, **525**:425-443, xiv.
32. Darzynkiewicz Z, Carter SP, Mikulski SM, Ardelt WJ, Shogen K: **Cytostatic and cytotoxic effects of Pannon (P-30 Protein), a novel anticancer agent.** *Cell Tissue Kinet* 1988, **21**(3):169-182.
33. Matousek J, Soucek J, Slavik T, Tomanek M, Lee JE, Raines RT: **Comprehensive comparison of the cytotoxic activities of onconase and bovine seminal ribonuclease.** *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2003, **136**(4):343-356.
34. Notomista E, Catanzano F, Graziano G, Dal Piaz F, Barone G, D'Alessio G, Di Donato A: **Onconase: an unusually stable protein.** *Biochemistry* 2000, **39**(30):8711-8718.
35. Ardelt W, Mikulski SM, Shogen K: **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):245-251.
36. Leland PA, Staniszewski KE, Kim B, Raines RT: **A synapomorphic disulfide bond is critical for the conformational stability and cytotoxicity of an amphibian ribonuclease.** *FEBS Lett* 2000, **477**(3):203-207.
37. Mikulski S, Grossman A, Carter P, Shogen K, Costanzi J: **Phase-I human clinical-trial of onconase(r) (p-30 protein) administered intravenously on a weekly schedule in cancer-patients with solid tumors.** *Int J Oncol* 1993, **3**(1):57-64.
38. Mikulski S, Chun H, Mittelman A, Panella T, Puccio C, Shogen K, Costanzi J: **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):889-897.

BIBLIOGRAFIA

39. Vogelzang NJ, Aklilu M, Stadler WM, Dumas MC, Mikulski SM: **A phase II trial of weekly intravenous ranpirnase (Onconase), a novel ribonuclease in patients with metastatic kidney cancer.** *Invest New Drugs* 2001, **19**(3):255-260.
40. Puccio C, Mittelman A, Chun H, Costanzi J, Panella T, Coombe N, Shogen K, Mikulski S: **A new anticancer Rnase (Onconase): Clinical trial in patients (pts) with breast cancer (BC) [Abstract 242].** In: *American Society of Clinical Oncology Annual Meeting: May 1996; Philadelphia, PA.*
41. Mikulski SM, Costanzi JJ, Vogelzang NJ, McCachren S, Taub RN, Chun H, Mittelman A, Panella T, Puccio C, Fine R *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):274-281.
42. Costanzi J, Sidransky D, Navon A, Goldsweig H: **Ribonucleases as a novel pro-apoptotic anticancer strategy: review of the preclinical and clinical data for ranpirnase.** *Cancer Invest* 2005, **23**(7):643-650.
43. Pavlakis N, Vogelzang NJ: **Ranpirnase--an antitumour ribonuclease: its potential role in malignant mesothelioma.** *Expert Opin Biol Ther* 2006, **6**(4):391-399.
44. Matousek J, Gotte G, Pouckova P, Soucek J, Slavik T, Vottariello F, Libonati M: **Antitumor activity and other biological actions of oligomers of ribonuclease A.** *J Biol Chem* 2003, **278**(26):23817-23822.
45. Vasandani VM, Burris JA, Sung C: **Reversible nephrotoxicity of onconase and effect of lysine pH on renal onconase uptake.** *Cancer Chemother Pharmacol* 1999, **44**(2):164-169.
46. Dhalluin X, Scherpereel A: **Chemotherapy and radiotherapy for mesothelioma.** *Recent Results Cancer Res* 2011, **189**:127-147.
47. Lee JE, Raines RT: **Ribonucleases as novel chemotherapeutics : the ranpirnase example.** *BioDrugs* 2008, **22**(1):53-58.

BIBLIOGRAFIA

48. Fiorini C, Cordani M, Gotte G, Picone D, Donadelli M: **Onconase induces autophagy sensitizing pancreatic cancer cells to gemcitabine and activates Akt/mTOR pathway in a ROS-dependent manner.** *Biochim Biophys Acta* 2015, **1853**(3):549-560.
49. Squiquera L, Weaver R, Taxman D, Hodge T, Sulley J: **Ranpirnase as a treatment for infections by Human Papillomavirus (HPV).** In: *73rd Annual Meeting: March 2015; San Francisco.* American Academy of Dermatology 2015.
50. Rodriguez M, Torrent G, Bosch M, Rayne F, Dubremetz JF, Ribo M, Benito A, Vilanova M, Beaumelle B: **Intracellular pathway of Onconase that enables its delivery to the cytosol.** *J Cell Sci* 2007, **120**(Pt 8):1405-1411.
51. Wu Y, Mikulski SM, Ardelt W, Rybak SM, Youle RJ: **A cytotoxic ribonuclease. Study of the mechanism of onconase cytotoxicity.** *J Biol Chem* 1993, **268**(14):10686-10693.
52. Haigis MC, Raines RT: **Secretory ribonucleases are internalized by a dynamin-independent endocytic pathway.** *J Cell Sci* 2003, **116**(Pt 2):313-324.
53. Johnson RJ, Chao TY, Lavis LD, Raines RT: **Cytotoxic ribonucleases: the dichotomy of Coulombic forces.** *Biochemistry* 2007, **46**(36):10308-10316.
54. Sundlass NK, Eller CH, Cui Q, Raines RT: **Contribution of electrostatics to the binding of pancreatic-type ribonucleases to membranes.** *Biochemistry* 2013, **52**(37):6304-6312.
55. Dickson KA, Haigis MC, Raines RT: **Ribonuclease inhibitor: structure and function.** *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2005, **80**:349-374.
56. Boix E, Wu Y, Vasandani VM, Saxena SK, Ardelt W, Ladner J, Youle RJ: **Role of the N terminus in RNase A homologues: differences in catalytic activity, ribonuclease inhibitor interaction and cytotoxicity.** *J Mol Biol* 1996, **257**(5):992-1007.

BIBLIOGRAFIA

57. Monti DM, D'Alessio G: **Cytosolic RNase inhibitor only affects RNases with intrinsic cytotoxicity.** *J Biol Chem* 2004, **279**(38):39195-39198.
58. Saxena SK, Sirdeshmukh R, Ardelt W, Mikulski SM, Shogen K, Youle RJ: **Entry into cells and selective degradation of tRNAs by a cytotoxic member of the RNase A family.** *J Biol Chem* 2002, **277**(17):15142-15146.
59. Deptala A, Halicka HD, Ardelt B, Ardelt W, Mikulski SM, Shogen K, Darzynkiewicz Z: **Potentiation of tumor necrosis factor induced apoptosis by onconase.** *Int J Oncol* 1998, **13**(1):11-16.
60. Iordanov MS, Ryabinina OP, Wong J, Dinh TH, Newton DL, Rybak SM, Magun BE: **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):1983-1994.
61. Altomare DA, Rybak SM, Pei J, Maizel JV, Cheung M, Testa JR, Shogen K: **Onconase responsive genes in human mesothelioma cells: implications for an RNA damaging therapeutic agent.** *BMC Cancer* 2010, **10**:34.
62. Juan G, Ardelt B, Li X, Mikulski SM, Shogen K, Ardelt W, Mittelman A, Darzynkiewicz Z: **G1 arrest of U937 cells by onconase is associated with suppression of cyclin D3 expression, induction of p16INK4A, p21WAF1/CIP1 and p27KIP and decreased pRb phosphorylation.** *Leukemia* 1998, **12**(8):1241-1248.
63. Goparaju CM, Blasberg JD, Volinia S, Palatini J, Ivanov S, Donington JS, Croce C, Carbone M, Yang H, Pass HI: **Onconase mediated NFKbeta downregulation in malignant pleural mesothelioma.** *Oncogene* 2011, **30**(24):2767-2777.
64. Qiao M, Zu LD, He XH, Shen RL, Wang QC, Liu MF: **Onconase downregulates microRNA expression through targeting microRNA precursors.** *Cell Res* 2012, **22**(7):1199-1202.

BIBLIOGRAFIA

65. Iordanov MS, Wong J, Newton DL, Rybak SM, Bright RK, Flavell RA, Davis RJ, Magun BE: **Differential requirement for the stress-activated protein kinase/c-Jun NH(2)-terminal kinase in RNAdamage-induced apoptosis in primary and in immortalized fibroblasts.** *Mol Cell Biol Res Commun* 2000, **4**(2):122-128.
66. Castro J, Ribo M, Navarro S, Nogues MV, Vilanova M, Benito A: **A human ribonuclease induces apoptosis associated with p21WAF1/CIP1 induction and JNK inactivation.** *BMC Cancer* 2011, **11**:9.
67. Liu J, Lin A: **Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword.** *Cell Res* 2005, **15**(1):36-42.
68. Ogretmen B, Safa AR: **Expression of the mutated p53 tumor suppressor protein and its molecular and biochemical characterization in multidrug resistant MCF-7/Adr human breast cancer cells.** *Oncogene* 1997, **14**(4):499-506.
69. Rybak SM, Saxena SK, Ackerman EJ, Youle RJ: **Cytotoxic potential of ribonuclease and ribonuclease hybrid proteins.** *J Biol Chem* 1991, **266**(31):21202-21207.
70. Grabarek J, Ardelt B, Du L, Darzynkiewicz Z: **Activation of caspases and serine proteases during apoptosis induced by onconase (Ranpirnase).** *Exp Cell Res* 2002, **278**(1):61-71.
71. Michaelis M, Cinatl J, Anand P, Rothweiler F, Kotchetkov R, von Deimling A, Doerr HW, Shogen K, Cinatl J, Jr.: **Onconase induces caspase-independent cell death in chemoresistant neuroblastoma cells.** *Cancer Lett* 2007, **250**(1):107-116.
72. Halicka HD, Murakami T, Papageorgio CN, Mittelman A, Mikulski SM, Shogen K, Darzynkiewicz Z: **Induction of differentiation of leukaemic (HL-60) or prostate cancer (LNCaP, JCA-1) cells potentiates apoptosis triggered by onconase.** *Cell Prolif* 2000, **33**(6):407-417.
73. Smith MR, Newton DL, Mikulski SM, Rybak SM: **Cell cycle-related differences in susceptibility of NIH/3T3 cells to ribonucleases.** *Exp Cell Res* 1999, **247**(1):220-232.

BIBLIOGRAFIA

74. Tsai SY, Ardelt B, Hsieh TC, Darzynkiewicz Z, Shogen K, Wu JM: **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):1745-1752.
75. James AM, Ambrose EJ, Lowick JH: **Differences between the electrical charge carried by normal and homologous tumour cells.** *Nature* 1956, **177**(4508):576-577.
76. Slivinsky GG, Hymer WC, Bauer J, Morrison DR: **Cellular electrophoretic mobility data: a first approach to a database.** *Electrophoresis* 1997, **18**(7):1109-1119.
77. Singh UP, Ardelt W, Saxena SK, Holloway DE, Vidunas E, Lee HS, Saxena A, Shogen K, Acharya KR: **Enzymatic and structural characterisation of amphinase, a novel cytotoxic ribonuclease from *Rana pipiens* oocytes.** *J Mol Biol* 2007, **371**(1):93-111.
78. Ardelt B, Ardelt W, Pozarowski P, Kunicki J, Shogen K, Darzynkiewicz Z: **Cytostatic and cytotoxic properties of Amphinase: a novel cytotoxic ribonuclease from *Rana pipiens* oocytes.** *Cell Cycle* 2007, **6**(24):3097-3102.
79. Nitta K, Takayanagi G, Kawauchi H, Hakomori S: **Isolation and characterization of *Rana catesbeiana* lectin and demonstration of the lectin-binding glycoprotein of rodent and human tumor cell membranes.** *Cancer Res* 1987, **47**(18):4877-4883.
80. Sakakibara F, Kawauchi H, Takayanagi G, Ise H: **Egg lectin of *Rana japonica* and its receptor glycoprotein of Ehrlich tumor cells.** *Cancer Res* 1979, **39**(4):1347-1352.
81. Nitta K, Ozaki K, Ishikawa M, Furusawa S, Hosono M, Kawauchi H, Sasaki K, Takayanagi Y, Tsuiki S, Hakomori S: **Inhibition of cell proliferation by *Rana catesbeiana* and *Rana japonica* lectins belonging to the ribonuclease superfamily.** *Cancer Res* 1994, **54**(4):920-927.

BIBLIOGRAFIA

82. Vasandani VM, Wu YN, Mikulski SM, Youle RJ, Sung C: **Molecular determinants in the plasma clearance and tissue distribution of ribonucleases of the ribonuclease A superfamily.** *Cancer Res* 1996, **56**(18):4180-4186.
83. Leland PA, Staniszewski KE, Kim BM, Raines RT: **Endowing human pancreatic ribonuclease with toxicity for cancer cells.** *J Biol Chem* 2001, **276**(46):43095-43102.
84. Kobe B, Deisenhofer J: **A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands.** *Nature* 1995, **374**(6518):183-186.
85. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE: **UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis.** *J Comput Chem* 2004, **25**(13):1605-1612.
86. Leland PA, Schultz LW, Kim BM, Raines RT: **Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(18):10407-10412.
87. Di Donato A, Cafaro V, D'Alessio G: **Ribonuclease A can be transformed into a dimeric ribonuclease with antitumor activity.** *J Biol Chem* 1994, **269**(26):17394-17396.
88. Di Gaetano S, D'Alessio G, Piccoli R: **Second generation antitumour human RNase: significance of its structural and functional features for the mechanism of antitumour action.** *Biochem J* 2001, **358**(Pt 1):241-247.
89. Piccoli R, Di Gaetano S, De Lorenzo C, Grauso M, Monaco C, Spalletti-Cernia D, Laccetti P, Cinatl J, Matousek J, D'Alessio G: **A dimeric mutant of human pancreatic ribonuclease with selective cytotoxicity toward malignant cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(14):7768-7773.
90. Haigis MC, Kurten EL, Abel RL, Raines RT: **KFERQ sequence in ribonuclease A-mediated cytotoxicity.** *J Biol Chem* 2002, **277**(13):11576-11581.

BIBLIOGRAFIA

91. Lee FS, Vallee BL: **Structure and action of mammalian ribonuclease (angiogenin) inhibitor**. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1993, **44**:1-30.
92. Canals A, Ribo M, Benito A, Bosch M, Mombelli E, Vilanova M: **Production of engineered human pancreatic ribonucleases, solving expression and purification problems, and enhancing thermostability**. *Protein Expr Purif* 1999, **17**(1):169-181.
93. Rodriguez M, Benito A, Tubert P, Castro J, Ribo M, Beaumelle B, Vilanova M: **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):548-557.
94. Bosch M, Benito A, Ribo M, Puig T, Beaumelle B, Vilanova M: **A nuclear localization sequence endows human pancreatic ribonuclease with cytotoxic activity**. *Biochemistry* 2004, **43**(8):2167-2177.
95. Tubert P, Rodriguez M, Ribo M, Benito A, Vilanova M: **The nuclear transport capacity of a human-pancreatic ribonuclease variant is critical for its cytotoxicity**. *Invest New Drugs* 2011, **29**(5):811-817.
96. Castro J, Ribo M, Benito A, Vilanova M: **Mini-review: nucleus-targeted ribonucleases as antitumor drugs**. *Curr Med Chem* 2013, **20**(10):1225-1231.
97. Conti E, Kuriyan J: **Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha**. *Structure* 2000, **8**(3):329-338.
98. Shim J, Lee H, Park J, Kim H, Choi EJ: **A non-enzymatic p21 protein inhibitor of stress-activated protein kinases**. *Nature* 1996, **381**(6585):804-806.
99. Takezawa K, Okamoto I, Tsukioka S, Uchida J, Kuniwa M, Fukuoka M, Nakagawa K: **Identification of thymidylate synthase as a potential therapeutic target for lung cancer**. *Br J Cancer* 2010, **103**(3):354-361.

BIBLIOGRAFIA

100. Ye F, Che Y, McMillen E, Gorski J, Brodman D, Saw D, Jiang B, Zhang DY: **The effect of *Scutellaria baicalensis* on the signaling network in hepatocellular carcinoma cells.** *Nutr Cancer* 2009, **61**(4):530-537.
101. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ: **The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases.** *Cell* 1993, **75**(4):805-816.
102. Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B: **The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA.** *Nature* 1994, **369**(6481):574-578.
103. Niculescu AB, 3rd, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C, Reed SI: **Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication.** *Mol Cell Biol* 1998, **18**(1):629-643.
104. Ogryzko VV, Wong P, Howard BH: **WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases.** *Mol Cell Biol* 1997, **17**(8):4877-4882.
105. Castro J, Ribo M, Puig T, Colomer R, Vilanova M, Benito A: **A cytotoxic ribonuclease reduces the expression level of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines.** *Invest New Drugs* 2012, **30**(3):880-888.
106. Ikeguchi M, Teeter LD, Eckersberg T, Ganapathi R, Kuo MT: **Structural and functional analyses of the promoter of the murine multidrug resistance gene *mdr3/mdr1a* reveal a negative element containing the AP-1 binding site.** *DNA Cell Biol* 1991, **10**(9):639-649.
107. Vert A: **Molecular mechanism of PE5-induced cytotoxicity and generation of new cytotoxic nuclear-directed ribonuclease variants.** *PhD Thesis*. Universitat de Girona; 2014.

BIBLIOGRAFIA

108. Vert A, Castro J, Ribo M, Benito A, Vilanova M: **A nuclear-directed human pancreatic ribonuclease (PE5) targets the metabolic phenotype of cancer cells.** *Oncotarget* 2016.
109. Vert A, Castro J, Ruiz-Martinez S, Tubert P, Escribano D, Ribo M, Vilanova M, Benito A: **Generation of new cytotoxic human ribonuclease variants directed to the nucleus.** *Mol Pharm* 2012, **9**(10):2894-2902.
110. Fanara P, Hodel MR, Corbett AH, Hodel AE: **Quantitative analysis of nuclear localization signal (NLS)-importin alpha interaction through fluorescence depolarization. Evidence for auto-inhibitory regulation of NLS binding.** *J Biol Chem* 2000, **275**(28):21218-21223.
111. Miller MM, Jarosinski KW, Schat KA: **Positive and negative regulation of chicken anemia virus transcription.** *J Virol* 2005, **79**(5):2859-2868.
112. Noteborn MH, de Boer GF, van Roozelaar DJ, Karreman C, Kranenburg O, Vos JG, Jeurissen SH, Hoeben RC, Zantema A, Koch G *et al*: **Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle.** *J Virol* 1991, **65**(6):3131-3139.
113. Noteborn MH, Todd D, Verschueren CA, de Gauw HW, Curran WL, Veldkamp S, Douglas AJ, McNulty MS, van der EA, Koch G: **A single chicken anemia virus protein induces apoptosis.** *J Virol* 1994, **68**(1):346-351.
114. Phenix KV, Meehan BM, Todd D, McNulty MS: **Transcriptional analysis and genome expression of chicken anaemia virus.** *J Gen Virol* 1994, **75** (Pt 4):905-909.
115. Renshaw RW, Soine C, Weinkle T, O'Connell PH, Ohashi K, Watson S, Lucio B, Harrington S, Schat KA: **A hypervariable region in VPI of chicken infectious anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture.** *J Virol* 1996, **70**(12):8872-8878.

BIBLIOGRAFIA

116. Peters MA, Jackson DC, Crabb BS, Browning GF: **Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase.** *J Biol Chem* 2002, **277**(42):39566-39573.
117. Noteborn MH, van der Eb AJ: **Apoptin-induced apoptosis: potential for antitumor therapy.** *Drug Resist Updat* 1998, **1**(2):99-103.
118. Backendorf C, Visser AE, de Boer AG, Zimmerman R, Visser M, Voskamp P, Zhang YH, Noteborn M: **Apoptin: therapeutic potential of an early sensor of carcinogenic transformation.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008, **48**:143-169.
119. Tavassoli M, Guelen L, Luxon BA, Gaken J: **Apoptin: specific killer of tumor cells?** *Apoptosis* 2005, **10**(4):717-724.
120. Danen-Van Oorschot AA, Fischer DF, Grimbergen JM, Klein B, Zhuang S, Falkenburg JH, Backendorf C, Quax PH, Van der Eb AJ, Noteborn MH: **Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(11):5843-5847.
121. Danen-Van Oorschot AA, Zhang YH, Leliveld SR, Rohn JL, Seelen MC, Bolk MW, Van Zon A, Erkeland SJ, Abrahams JP, Mumberg D *et al*: **Importance of nuclear localization of apoptin for tumor-specific induction of apoptosis.** *J Biol Chem* 2003, **278**(30):27729-27736.
122. Kuusisto HV, Wagstaff KM, Alvisi G, Jans DA: **The C-terminus of apoptin represents a unique tumor cell-enhanced nuclear targeting module.** *Int J Cancer* 2008, **123**(12):2965-2969.
123. Poon IK, Oro C, Dias MM, Zhang J, Jans DA: **Apoptin nuclear accumulation is modulated by a CRM1-recognized nuclear export signal that is active in normal but not in tumor cells.** *Cancer Res* 2005, **65**(16):7059-7064.
124. Rohn JL, Zhang YH, Aalbers RI, Otto N, Den Hertog J, Henriquez NV, Van De Velde CJ, Kuppen PJ, Mumberg D, Donner P *et al*: **A tumor-specific kinase activity regulates the viral death protein Apoptin.** *J Biol Chem* 2002, **277**(52):50820-50827.

BIBLIOGRAFIA

125. Heilman DW, Teodoro JG, Green MR: **Apoptin nucleocytoplasmic shuttling is required for cell type-specific localization, apoptosis, and recruitment of the anaphase-promoting complex/cyclosome to PML bodies.** *J Virol* 2006, **80**(15):7535-7545.
126. Leliveld SR, Dame RT, Mommaas MA, Koerten HK, Wyman C, Danen-van Oorschot AA, Rohn JL, Noteborn MH, Abrahams JP: **Apoptin protein multimers form distinct higher-order nucleoprotein complexes with DNA.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**(16):4805-4813.
127. Leliveld SR, Zhang YH, Rohn JL, Noteborn MH, Abrahams JP: **Apoptin induces tumor-specific apoptosis as a globular multimer.** *J Biol Chem* 2003, **278**(11):9042-9051.
128. Los M, Panigrahi S, Rashedi I, Mandal S, Stetefeld J, Essmann F, Schulze-Osthoff K: **Apoptin, a tumor-selective killer.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1793**(8):1335-1342.
129. Jiang J, Cole D, Westwood N, Macpherson L, Farzaneh F, Mufti G, Tavassoli M, Gaken J: **Crucial roles for protein kinase C isoforms in tumor-specific killing by apoptin.** *Cancer Res* 2010, **70**(18):7242-7252.
130. Lee YH, Cheng CM, Chang YF, Wang TY, Yuo CY: **Apoptin T108 phosphorylation is not required for its tumor-specific nuclear localization but partially affects its apoptotic activity.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **354**(2):391-395.
131. Rollano Penaloza OM, Lewandowska M, Stetefeld J, Ossysek K, Madej M, Bereta J, Sobczak M, Shojaei S, Ghavami S, Los MJ: **Apoptins: selective anticancer agents.** *Trends Mol Med* 2014, **20**(9):519-528.
132. Maddika S, Mendoza FJ, Hauff K, Zamzow CR, Paranjothy T, Los M: **Cancer-selective therapy of the future: apoptin and its mechanism of action.** *Cancer Biol Ther* 2006, **5**(1):10-19.
133. van der Eb MM, Pietersen AM, Speetjens FM, Kuppen PJ, van de Velde CJ, Noteborn MH, Hoeben RC: **Gene therapy with apoptin induces regression of xenografted human hepatomas.** *Cancer Gene Ther* 2002, **9**(1):53-61.

BIBLIOGRAFIA

134. Chen H, Xiang ZQ, Li Y, Kurupati RK, Jia B, Bian A, Zhou DM, Hutnick N, Yuan S, Gray C *et al*: **Adenovirus-based vaccines: comparison of vectors from three species of adenoviridae.** *J Virol* 2010, **84**(20):10522-10532.
135. Harvey BG, Hackett NR, El-Sawy T, Rosengart TK, Hirschowitz EA, Lieberman MD, Lesser ML, Crystal RG: **Variability of human systemic humoral immune responses to adenovirus gene transfer vectors administered to different organs.** *J Virol* 1999, **73**(8):6729-6742.
136. Cao HD, Yang YX, Lu L, Liu SN, Wang PL, Tao XH, Wang LJ, Xiang TX: **Attenuated Salmonella typhimurium carrying TRAIL and VP3 genes inhibits the growth of gastric cancer cells in vitro and in vivo.** *Tumori* 2010, **96**(2):296-303.
137. Guan GF, Zhao M, Liu LM, Jin CS, Sun K, Zhang DJ, Yu DJ, Cao HW, Lu YQ, Wen LJ: **Salmonella typhimurium mediated delivery of Apoptin in human laryngeal cancer.** *Int J Med Sci* 2013, **10**(12):1639-1648.
138. Lian H, Jin N, Li X, Mi Z, Zhang J, Sun L, Zheng H, Li P: **Induction of an effective anti-tumor immune response and tumor regression by combined administration of IL-18 and Apoptin.** *Cancer Immunol Immunother* 2007, **56**(2):181-192.
139. Mitrus I, Missol-Kolka E, Plucienniczak A, Szala S: **Tumour therapy with genes encoding apoptin and E4orf4.** *Anticancer Res* 2005, **25**(2A):1087-1090.
140. Sun J, Yan Y, Wang XT, Liu XW, Peng DJ, Wang M, Tian J, Zong YQ, Zhang YH, Noteborn MH *et al*: **PTD4-apoptin protein therapy inhibits tumor growth in vivo.** *Int J Cancer* 2009, **124**(12):2973-2981.
141. Jin JL, Gong J, Yin TJ, Lu YJ, Xia JJ, Xie YY, Di Y, He L, Guo JL, Sun J *et al*: **PTD4-apoptin protein and dacarbazine show a synergistic antitumor effect on B16-F1 melanoma in vitro and in vivo.** *Eur J Pharmacol* 2011, **654**(1):17-25.
142. Hanahan D: **Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.** *J Mol Biol* 1983, **166**(4):557-580.

BIBLIOGRAFIA

143. Studier FW, Moffatt BA: **Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.** *J Mol Biol* 1986, **189**(1):113-130.
144. Sorensen HP, Sperling-Petersen HU, Mortensen KK: **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):207-214.
145. Guelen L, Paterson H, Gaken J, Meyers M, Farzaneh F, Tavassoli M: **TAT-apoptin is efficiently delivered and induces apoptosis in cancer cells.** *Oncogene* 2004, **23**(5):1153-1165.
146. Liscovitch M, Ravid D: **A case study in misidentification of cancer cell lines: MCF-7/AdrR cells (re-designated NCI/ADR-RES) are derived from OVCAR-8 human ovarian carcinoma cells.** *Cancer Lett* 2007, **245**(1-2):350-352.
147. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M: **A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma.** *J Natl Cancer Inst* 1973, **51**(5):1409-1416.
148. Fogh J (ed.): **Human tumor cells in vitro.** New York: Plenum Press; 1975.
149. Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ, Jr.: **Breast tumor cell lines from pleural effusions.** *J Natl Cancer Inst* 1974, **53**(3):661-674.
150. Sanger F, Coulson AR: **The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing.** *FEBS Lett* 1978, **87**(1):107-110.
151. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, **74**(12):5463-5467.
152. Ribo M, Benito A, Canals A, Nogues MV, Cuchillo CM, Vilanova M: **Purification of engineered human pancreatic ribonuclease.** *Methods Enzymol* 2001, **341**:221-234.

BIBLIOGRAFIA

153. Ribo M, Bosch M, Torrent G, Benito A, Beaumelle B, Vilanova M: **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):1163-1171.
154. Mates J: **Caracterització de les propietats citotòxiques i citostàtiques d'una variant de ribonucleasa pancreàtica humana dirigida a nucli.** *Final degree project.* Universitat de Girona; 2012.
155. Notomista E, Catanzano F, Graziano G, Di Gaetano S, Barone G, Di Donato A: **Contribution of chain termini to the conformational stability and biological activity of onconase.** *Biochemistry* 2001, **40**(31):9097-9103.
156. Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T: **How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein.** *Protein Sci* 1995, **4**(11):2411-2423.
157. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
158. Lane D, Harlow E: **Two different viral transforming proteins bind the same host tumour antigen.** *Nature* 1982, **298**(5874):517.
159. Blackburn P, Wilson G, Moore S: **Ribonuclease inhibitor from human placenta. Purification and properties.** *J Biol Chem* 1977, **252**(16):5904-5910.
160. Park C, Kelemen BR, Klink TA, Sweeney RY, Behlke MA, Eubanks SR, Raines RT: **Fast, facile, hypersensitive assays for ribonucleolytic activity.** *Methods Enzymol* 2001, **341**:81-94.
161. Sherr CJ, Roberts JM: **CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression.** *Genes Dev* 1999, **13**(12):1501-1512.
162. Giacinti C, Giordano A: **RB and cell cycle progression.** *Oncogene* 2006, **25**(38):5220-5227.

BIBLIOGRAFIA

163. Hinds PW, Mitnacht S, Dulic V, Arnold A, Reed SI, Weinberg RA: **Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins.** *Cell* 1992, **70**(6):993-1006.
164. Besson A, Dowdy SF, Roberts JM: **CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond.** *Dev Cell* 2008, **14**(2):159-169.
165. Doglioni C, Dei Tos AP, Laurino L, Chiarelli C, Barbareschi M, Viale G: **The prevalence of BCL-2 immunoreactivity in breast carcinomas and its clinicopathological correlates, with particular reference to oestrogen receptor status.** *Virchows Arch* 1994, **424**(1):47-51.
166. Korsmeyer SJ: **BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death.** *Cancer Res* 1999, **59**(7 Suppl):1693s-1700s.
167. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ: **Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death.** *Cell* 1993, **74**(4):609-619.
168. Raisova M, Hossini AM, Eberle J, Riebeling C, Wieder T, Sturm I, Daniel PT, Orfanos CE, Geilen CC: **The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis.** *J Invest Dermatol* 2001, **117**(2):333-340.
169. Salakou S, Kardamakis D, Tsamandas AC, Zolota V, Apostolakis E, Tzelepi V, Papathanasopoulos P, Bonikos DS, Papapetropoulos T, Petsas T *et al*: **Increased Bax/Bcl-2 ratio up-regulates caspase-3 and increases apoptosis in the thymus of patients with myasthenia gravis.** *In Vivo* 2007, **21**(1):123-132.
170. Lim S, Kaldis P: **Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation.** *Development* 2013, **140**(15):3079-3093.
171. Borriello A, Cucciolla V, Oliva A, Zappia V, Della Ragione F: **p27Kip1 metabolism: a fascinating labyrinth.** *Cell Cycle* 2007, **6**(9):1053-1061.

BIBLIOGRAFIA

172. Child ES, Mann DJ: **The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability.** *Cell Cycle* 2006, **5**(12):1313-1319.
173. De la Cueva E, Garcia-Cao I, Herranz M, Lopez P, Garcia-Palencia P, Flores JM, Serrano M, Fernandez-Piqueras J, Martin-Caballero J: **Tumorigenic activity of p21^{Waf1/Cip1} in thymic lymphoma.** *Oncogene* 2006, **25**(29):4128-4132.
174. Eymin B, Brambilla E: **The yin and the yang of p27^{Kip1} as a target for cancer therapy.** *Eur Respir J* 2004, **23**(5):663-664.
175. Martin-Caballero J, Flores JM, Garcia-Palencia P, Serrano M: **Tumor susceptibility of p21^(Waf1/Cip1)-deficient mice.** *Cancer Res* 2001, **61**(16):6234-6238.
176. Wang YA, Elson A, Leder P: **Loss of p21 increases sensitivity to ionizing radiation and delays the onset of lymphoma in atm-deficient mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(26):14590-14595.
177. Eymin B, Haugg M, Droin N, Sordet O, Dimanche-Boitrel MT, Solary E: **p27^{Kip1} induces drug resistance by preventing apoptosis upstream of cytochrome c release and procaspase-3 activation in leukemic cells.** *Oncogene* 1999, **18**(7):1411-1418.
178. Lee J, Kim SS: **The function of p27^{KIP1} during tumor development.** *Exp Mol Med* 2009, **41**(11):765-771.
179. Ophascharoensuk V, Fero ML, Hughes J, Roberts JM, Shankland SJ: **The cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} safeguards against inflammatory injury.** *Nat Med* 1998, **4**(5):575-580.
180. Dotto GP: **p21^(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle?** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1471**(1):M43-56.
181. Roninson IB: **Oncogenic functions of tumour suppressor p21^(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts.** *Cancer Lett* 2002, **179**(1):1-14.

BIBLIOGRAFIA

182. Suzuki A, Tsutomi Y, Akahane K, Araki T, Miura M: **Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21^{WAF1} and IAP gene family ILP.** *Oncogene* 1998, **17**(8):931-939.
183. Levkau B, Koyama H, Raines EW, Clurman BE, Herren B, Orth K, Roberts JM, Ross R: **Cleavage of p21^{Cip1/Waf1} and p27^{Kip1} mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade.** *Mol Cell* 1998, **1**(4):553-563.
184. Huang S, Shu L, Dilling MB, Easton J, Harwood FC, Ichijo H, Houghton PJ: **Sustained activation of the JNK cascade and rapamycin-induced apoptosis are suppressed by p53/p21^{Cip1}.** *Mol Cell* 2003, **11**(6):1491-1501.
185. Kratzer F, Rosorius O, Heger P, Hirschmann N, Dobner T, Hauber J, Stauber RH: **The adenovirus type 5 E1B-55K oncoprotein is a highly active shuttle protein and shuttling is independent of E4orf6, p53 and Mdm2.** *Oncogene* 2000, **19**(7):850-857.
186. Begitt A, Meyer T, van Rossum M, Vinkemeier U: **Nucleocytoplasmic translocation of Stat1 is regulated by a leucine-rich export signal in the coiled-coil domain.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(19):10418-10423.
187. McBride KM, McDonald C, Reich NC: **Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor.** *Embo J* 2000, **19**(22):6196-6206.
188. Mowen K, David M: **Regulation of STAT1 nuclear export by Jak1.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**(19):7273-7281.
189. Gorlich D, Mattaj JW: **Nucleocytoplasmic transport.** *Science* 1996, **271**(5255):1513-1518.
190. Chuang LC, Teixeira LK, Wohlschlegel JA, Henze M, Yates JR, Mendez J, Reed SI: **Phosphorylation of Mcm2 by Cdc7 promotes pre-replication complex assembly during cell-cycle re-entry.** *Mol Cell* 2009, **35**(2):206-216.

BIBLIOGRAFIA

191. Montagnoli A, Valsasina B, Brotherton D, Troiani S, Rainoldi S, Tenca P, Molinari A, Santocanale C: **Identification of Mcm2 phosphorylation sites by S-phase-regulating kinases.** *J Biol Chem* 2006, **281**(15):10281-10290.
192. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN: **The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer.** *Cell Prolif* 2003, **36**(3):131-149.
193. Johnson RJ, McCoy JG, Bingman CA, Phillips GN, Jr., Raines RT: **Inhibition of human pancreatic ribonuclease by the human ribonuclease inhibitor protein.** *J Mol Biol* 2007, **368**(2):434-449.
194. Pous J, Canals A, Terzyan SS, Guasch A, Benito A, Ribo M, Vilanova M, Coll M: **Three-dimensional structure of a human pancreatic ribonuclease variant, a step forward in the design of cytotoxic ribonucleases.** *J Mol Biol* 2000, **303**(1):49-60.
195. Boix E, Nogues MV, Schein CH, Benner SA, Cuchillo CM: **Reverse transphosphorylation by ribonuclease A needs an intact p2-binding site. Point mutations at Lys-7 and Arg-10 alter the catalytic properties of the enzyme.** *J Biol Chem* 1994, **269**(4):2529-2534.
196. Stewart B, Wild CP (eds.): **World Cancer Report 2014:** International Agency for Research on Cancer (IARC); 2016.
197. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F: **Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.** *Int J Cancer* 2015, **136**(5):E359-386.
198. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM: **Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**(10):4285-4289.
199. Browne BC, O'Brien N, Duffy MJ, Crown J, O'Donovan N: **HER-2 signaling and inhibition in breast cancer.** *Curr Cancer Drug Targets* 2009, **9**(3):419-438.

BIBLIOGRAFIA

200. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C *et al*: **Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer.** *N Engl J Med* 2005, **353**(16):1659-1672.
201. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA *et al*: **Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer.** *N Engl J Med* 2005, **353**(16):1673-1684.
202. Nahta R, Esteva FJ: **HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance.** *Breast Cancer Res* 2006, **8**(6):215.
203. Rodriguez M, Moussaoui M, Benito A, Cuchillo CM, Nogues MV, Vilanova M: **Human pancreatic ribonuclease presents higher endonucleolytic activity than ribonuclease A.** *Arch Biochem Biophys* 2008, **471**(2):191-197.
204. Kojima K: **Molecular aspects of the plasma membrane in tumor cells.** *Nagoya J Med Sci* 1993, **56**(1-4):1-18.
205. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X: **Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade.** *Cell* 1997, **91**(4):479-489.
206. Jans DA, Xiao CY, Lam MH: **Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport?** *Bioessays* 2000, **22**(6):532-544.
207. Poon IK, Jans DA: **Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation?** *Traffic* 2005, **6**(3):173-186.
208. Hubner S, Xiao CY, Jans DA: **The protein kinase CK2 site (Ser111/112) enhances recognition of the simian virus 40 large T-antigen nuclear localization sequence by importin.** *J Biol Chem* 1997, **272**(27):17191-17195.

BIBLIOGRAFIA

209. Xiao CY, Hubner S, Jans DA: **SV40 large tumor antigen nuclear import is regulated by the double-stranded DNA-dependent protein kinase site (serine 120) flanking the nuclear localization sequence.** *J Biol Chem* 1997, **272**(35):22191-22198.
210. Komeili A, O'Shea EK: **Roles of phosphorylation sites in regulating activity of the transcription factor Pho4.** *Science* 1999, **284**(5416):977-980.
211. Kaffman A, Rank NM, O'Shea EK: **Phosphorylation regulates association of the transcription factor Pho4 with its import receptor Pse1/Kap121.** *Genes Dev* 1998, **12**(17):2673-2683.
212. Ferrigno P, Posas F, Koepp D, Saito H, Silver PA: **Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1.** *Embo J* 1998, **17**(19):5606-5614.

