

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CC. BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**CONTRIBUCIÓN DE LOS TRIPTÓFANOS A LA
ESTRUCTURA Y FUNCIONALIDAD DE LA
RIBOTOXINA α -SARCINA**

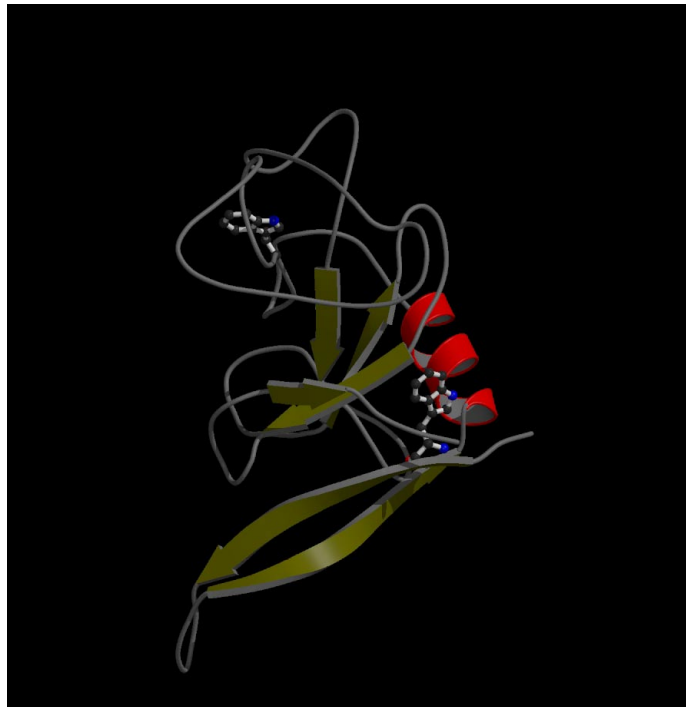
**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR M^a del Carmen de Antonio Pérez**

Bajo la dirección de los Doctores:
Álvaro Martínez del Pozo
José Miguel Mancheño Gómez

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-1676-8

CONTRIBUCIÓN DE LOS TRIPTÓFANOS
A LA ESTRUCTURA Y FUNCIONALIDAD
DE LA RIBOTOXINA α -SARCINA



Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular I
Universidad Complutense de Madrid

**CONTRIBUCIÓN DE LOS TRIPTÓFANOS A LA ESTRUCTURA
Y FUNCIONALIDAD DE LA RIBOTOXINA α -SARCINA**

TESIS DOCTORAL

María del Carmen de Antonio Pérez

Madrid, 2002

*Contribución de los Triptófanos a la estructura
y funcionalidad de la ribotoxina α -sarcina*

Memoria presentada por la Lda. María del Carmen de Antonio Pérez para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Complutense de Madrid.

Junio, 2002

El trabajo presentado en esta Memoria ha sido realizado en el Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad Complutense, con la dirección de los Doctores Alvaro Martínez del Pozo y Jose Miguel Mancheño Gómez. La financiación ha sido proporcionada por el Ministerio de Educación y Ciencia con una beca adscrita al Programa de Formación de Personal Investigador.

*A mis Abuelos,
Bienvenido y Sinforosa
Carmen y Manuel*

ÍNDICE

ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN

- 1.1. Las ribonucleasas microbianas extracelulares y las ribotoxinas
- 1.2. Posible función biológica de las ribotoxinas
- 1.3. Inhibición de la biosíntesis de proteínas
- 1.4. Mecanismo catalítico de la α -sarcina
- 1.5. Estructura tridimensional de la α -sarcina
- 1.6. Interacción con membranas
- 1.7. Citotoxicidad de la α -sarcina
- 1.8. Inmunotoxinas: bactericidas y anticancerígenos

OBJETIVO

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. CEPAS BACTERIANAS

- 2.1.1. Aislamiento y producción de plásmidos
- 2.1.2. Mutagénesis dirigida por oligonucleótido
- 2.1.3. Producción de proteínas recombinantes

2.2. MEDIOS DE CULTIVO

- 2.2.1. Medios para *A. giganteus*
- 2.2.1. Medios para *E.coli*

2.3. VECTORES

- 2.3.1. Vector para mutagénesis
- 2.3.2. Vectores para producción y expresión

2.4. OLIGONUCLEOTIDOS

- 2.4.1. Oligonucleótidos comerciales para secuenciación**
- 2.4.2. Oligonucleótidos mutagénicos**

2.5. TAMPONES Y DISOLUCIONES DE USO HABITUAL

2.6. TÉCNICAS MANIPULACIÓN DE DNA

- 2.6.1. Purificación de plásmidos a partir de células de *E.coli*.**
- 2.6.2. Purificación de DNA de hebra simple (ssDNA)**
- 2.6.3. Mutagénesis dirigida con DNA plasmídico enriquecido en uridina**
- 2.6.4. Secuenciación automática del DNA**
- 2.6.5. Reacciones enzimáticas sobre el DNA**
- 2.6.6. Fosforilación de oligonucleótidos mutagénicos**
- 2.6.7. Electroforesis en geles de agarosa**
- 2.6.8. Purificación del DNA a partir de geles de agarosa**
- 2.6.9. Purificación del DNA a partir de geles de poliacrilamida al 4% (p/v)**

2.7. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN BACTERIANA

- 2.7.1. Preparación de células competentes**
- 2.7.2. Transformación de células de *E.coli***
- 2.7.3. Selección de colonias según el tamaño del plásmido**

2.8. TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN

- 2.8.1. Aislamiento de α -sarcina fúngica**

- 2.8.2. Purificación de formas recombinantes de α -sarcina y mutante**
- 2.8.1. Reducción y Carboxiamidometilación de α -sarcina**
- 2.8.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS**
- 2.8.5. Electrotransferencia e inmunodetección**
- 2.8.6. Análisis de aminoácidos**

2.9. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

- 2.9.1. Espectros de absorción en la región ultravioleta**
- 2.9.2. Espectros de dicroísmo circular**
- 2.9.3. Espectros de fluorescencia**
- 2.9.4. Desnaturalización térmica de proteínas**
- 2.9.5. Resonancia Magnética Nuclear de protones**

2.10. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

- 2.10.1. Sobre ribosomas**
- 2.10.2. Sobre poli(A) (zimograma)**

2.11. INTERACCIÓN CON VESÍCULAS LIPÍDICAS

- 2.11.1. Formación de vesículas de fosfolípidos**
- 2.11.2. Ensayos de unión proteína-vesícula**
- 2.11.3. Valoración de fósforo**
- 2.11.4. Ensayos de agregación a vesículas**
- 2.11.5. Ensayos de mezcla de lípidos**
- 2.11.6. Medidas de polarización de fluorescencia**
- 2.11.7. Ensayos de Transferencia de Energía entre Triptófano y Antraceno**

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL

3.1.1 Aislamiento y purificación

3.1.2. Caracterización enzimática

3.2. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y ESPECTROSCÓPICA

3.2.1. Espectros de Absorción ultravioleta

3.2.2. Espectros de dicroísmo circular

3.2.3. RMN de protones

3.2.4. Desnaturalización térmica

3.2.5. Emisión de fluorescencia

3.3. CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN CON MEMBRANAS

3.3.1. Unión a vesículas de DMPG

3.3.2. Agregación de vesículas

3.3.3. Mezcla de lípidos y comportamiento termotrópico

3.3.4. Emisión de fluorescencia de proteínas en presencia de vesículas de DMPG

3.3.5. Apagamiento de la fluorescencia de triptófano por antraceno

4. CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

ANT	Antraceno
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CD	Dicroísmo Circular
DCS	Calorimetría Diferencial de Barrido
DMPG	Dimiristoilfosfatidilglicerol
DMPS	Dimiristoilfosfatidilserina
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DPX	Bromuro de N,N-p-xililen-bis piridinio
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FTIR	Infrarojo por transformada de Fourier
NBD-PE	N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il) dimiristoilfosfatidiletanolamina
PAGE-SDS	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
PS	Fosfatidilserina
%RET	Porcentaje de Transferencia de Energía de Resonancia
Rh-PE	N-(7-lisaminarodaminaBsulfonyl)diacilfosfatidiletanolamina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SDS	Dodecilsulfato Sódico
UV-VIS	Ultravioleta-Visible
αS-RC	α -sarcina reducida y carboxiamidometilada
ΔCp	Incremento de capacidad calorífica
ΔG	Incremento de energía libre
ΔH	Incremento de entalpía

INTRODUCCIÓN

Una de las características fundamentales de la vida, necesaria para la preservación de las distintas especies, proviene de la capacidad adquirida para la adaptación. Entre estos métodos y estrategias se incluye el desarrollo de sustancias, inocuas para el organismo que las produce, pero que resultan mortales para la especie competidora. Con el desarrollo de la medicina y la bioquímica se ha conseguido aprovechar algunas de estas capacidades para obtener beneficios contra enfermedades que, a su vez, surgen como producto de la propia evolución. Una de las más temidas en nuestros días (comienzos del siglo XXI) es el cáncer y fue precisamente en un proceso de búsqueda de agentes antitumorales donde se descubrió la proteína objeto de esta Memoria: la α -sarcina (Olson y Goerner, 1965; Olson y col., 1965). Su nombre apela a las propiedades antisarcoma (demostradas ante el carcinoma 755 y sarcoma 180). Proviene de un hongo, *Aspergillus giganteus* (en concreto, de la cepa MDH 18894), y es la representante de toda una familia de ribonucleasas microbianas citotóxicas, secretadas por una gran variedad de hongos y englobadas bajo el nombre de ribotoxinas (Lin y col., 1995; Wirth y col., 1997; Martínez-Ruiz y col., 1999 a y b).

Se trata de una proteína de 150 aminoácidos que por sus características estructura-función ha sido clasificada dentro de las Proteínas Inactivantes de Ribosoma (RIP del inglés *Ribosome-Inactivating Proteins*) de tipo I. Estas toxinas se componen de una única cadena polipeptídica y ejercen su acción sobre dicho complejo supramolecular. Las RIP constituyen un amplio grupo de proteínas producidas por plantas y hongos, cuya característica común consiste en la capacidad para anular la biosíntesis de proteínas de las células mediante la mencionada inactivación del ribosoma (Stirpe y col, 1992). En todos los casos esta acción catalítica tiene lugar sobre la misma localización: una región de la subunidad mayor del RNA ribosómico cuya secuencia se encuentra extraordinariamente conservada a lo largo de la evolución (Endo y Wool, 1982; Chan y col., 1983; Endo y col., 1983; Wool, 1984). Las RIP se dividen, esencialmente, en dos grupos: tipo I y tipo II (Tabla I). Las segundas suelen ser glicosidasas y están formadas por dos cadenas polipeptídicas. Una de ellas es la que lleva a cabo la función catalítica, en tanto que la otra permite su internamiento en la célula diana, mediante la interacción con receptores específicos de membrana. Suelen provenir de plantas y la más conocida de todas ellas es la ricina. El otro grupo, las de tipo I, es aquél al que pertenece la α -sarcina y todas las ribotoxinas. Aunque la mayoría de las RIP de tipo I también son glicosidasas (Tabla I), las ribotoxinas presentan actividad ribonucleolítica. Todas están formadas por una única cadena polipeptídica y, hasta la fecha, no se han detectado receptores de membrana capaces de interactuar con ellas. Por ello, parece que esta única cadena es responsable tanto de la actividad catalítica como de su capacidad para reconocer específicamente las células sobre las que ejercen su acción citotóxica. En el caso de la α -sarcina, su

capacidad para atravesar bicapas lipídicas se encuentra suficientemente caracterizada (Gasset y *col.*, 1989, 1990, 1991a, 1991b, 1994, 1995a, 1995b; Mancheño y *col.*, 1994a, 1994b, 1995a, 1995b, 1998a, 1998b; Oñaderra y *col.*, 1993, 1998), si bien, en el momento en el que se empezaron los experimentos que se describen en esta Memoria, no se conocían cuales eran los elementos estructurales responsables de esa capacidad.

Por último, no se debe olvidar cómo tanto secuencial como estructuralmente también existe una gran similitud entre las ribotoxinas y otras ribonucleasas microbianas extracelulares, que no son citotóxicas (Martínez del Pozo y *col.*, 1988; Martínez-Ruiz y *col.*, 1999b; Pérez-Cañadillas y *col.*, 2000; Yang y Moffat, 1996). De la comparación de dichas secuencias y estructuras se pueden extraer conclusiones acerca de cuales son las zonas de la α -sarcina que deben tener mayor importancia a la hora de reconocer una membrana lipídica y establecer una interacción desestabilizante con ella.

Todos estos aspectos son los que se desarrollan en los siguientes apartados que constituyen esta Introducción haciendo especial hincapié en aquellos que son más relevantes para la discusión de los Resultados presentados. Sin embargo, no se debe olvidar que la α -sarcina, y el resto de las ribotoxinas, son productos naturales y, por tanto, deben ser sintetizados con el fin de que cumplan alguna función biológica. Esta función es, de hecho, todavía desconocida pero, parece interesante empezar esta Memoria planteando, precisamente, este interrogante y, discutiendo las distintas hipótesis existentes.

Toxina	Organismo productor	Referencia	Propiedades	Actividad enzimática
TIPO I: Formadas por una única cadena polipeptídica				
Amarantina	<i>Amaranthus viridis</i>	Kwon y col., 1997	30 kDa	N-glicosidasa
Betavulgina	<i>Beta vulgaris vulgaris</i>	Hornung y col., 1996	30 kDa	N-glicosidasa
Briodinas 1, 2	<i>Bryonia dioica</i>	Gawlak y col., 1997	28 kDa	N-glicosidasas
Canforina	<i>Cinnamomum camphora</i>	Li y col., 1997		N-glicosidasa
Diantina	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Legname y col., 1991	30, 32 kDa	N-glicosidasas
Ebulitinas	<i>Sambucus ebulus</i>	De Benito y col., 1995	32 kDa, 29 kDa	N-glicosidasas
Gelonina	<i>Gelunium multiflorum</i>	Endo y col., 1988	31 kDa; glicoprot.	N-glicosidasa
Gipsofilina	<i>Gypsophila elegans</i>	Yoshinari y col., 1997	28 kDa	N-glicosidasa
JIP60	<i>Hordeum vulgare</i>	Chaudhry y col., 1994	60 kDa	N-glicosidasa
Kiriwiinas	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	Wang y col., 1986	28.8 kDa, glicoprot.	Glicosidasas
Momorcharinas?	<i>Momordica charantia</i>	Ng y col., 1994 Wang y Ng, 1998	glicoproteínas	N-glicosidasas
Momordina	<i>Momordica charantia</i>	Endo y col., 1988	28.7 kDa; glicoprot.	N-glicosidasa
PAP	<i>Phytolacca americana</i>	Myers y col., 1991	29 kDa.	N-glicosidasa
PD-S2	<i>Phytolacca dioica</i>	Del Vecchio y col., 1997; Di Maro y col., 1999	29.6 kDa; glicoprot.	N-glicosidasa
Pepocina	<i>Cucurbita pepo</i>	Yoshinari y col., 1996	26 kDa	N-glicosidasa
Proteína antiviral mirabilis (MAP)	<i>Mirabilis jalapa</i>	Habuka y col., 1989	27.8 kDa	N-glicosidasa
Saporina	<i>Saponaria officinalis</i>	Endo y col., 1988	30 kDa	N-glicosidasa
Sechiumina	<i>Sechium edule</i>	Wu y col., 1998	27 kDa	N-glicosidasa
Tricoanguina	<i>Trichocanthes arguina</i>	Chow y col., 1999	35 kDa; glicoprot.	N-glicosidasa
Tricomaglina	<i>Trichosanthes lepiniate</i>	Chen y col., 1999	24.7 kDa	N-glicosidasa
Tricosantina	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	Maraganore y col., 1987	27 kDa	N-glicosidasa

α -sarcina	<i>A. giganteus</i>	Olson y col., 1965	17 kDa	Ribonucleasa
A spFI	<i>A. fumigatus</i>	Arruda y col., 1990	17 kDa	Ribonucleasa
Clavina	<i>A. clavatus</i>	Parente y col., 1996	17 kDa	Ribonucleasa
c-sarcina	<i>A. clavatus</i>	Huang y col., 1997	17 kDa	Ribonucleasa
Gigantina	<i>A. giganteus</i>	Salvarelli y col., 1994	17 kDa	Ribonucleasa
Mitogilina	<i>A. restrictus</i>	Roga y col., 1971	17 kDa	Ribonucleasa
Restrictocina	<i>A. restrictus</i> , <i>A. fumigatus</i>	Goldin y col., 1966 Moser y col., 1992	17 kDa	Ribonucleasa
Hirsutelina A	<i>Hirsutiella thompsonii</i>	Liu y col., 1986	14.7 kDa	Ribonucleasa
Lufina-S	<i>Luffa cylindrica</i>	Gao y col., 1994	10 kDa	¿Fosfodiesterasa?
TIPO II: Formadas por dos cadenas polipeptídicas				
Abrina	<i>Abrus precatorius</i>	Olson y Pihl, 1981 y 1982	65 kDa; glicoprot., R	N-glicosidasa
Ricina	<i>Ricinus communis</i>	Endo y Tsurugi, 1988	62 kDa; glicoprot., R	N-glicosidasa
Modicina	<i>Adenia digitata</i>	Olson y Pihl, 1981, 1982	63 kDa; glicoprot., R	N-glicosidasa
Texina de Shiga	<i>Shigella dysenteriae</i>	O'Brien y Holmes, 1987	58-70 kDa; AB ₅ -AB ₃	N-glicosidasa
Ebulinas 1; r1 y r2; f	<i>Sambucus ebulus</i>	Girbés y col., 1993; De Benito y col., 1995	56 kDa; polimérica (f) glicoprot.	N-glicosidasas
Nigrina b	<i>Sambucus nigra</i>	Girbés y col., 1993	58 kDa; glicoprot.	N-glicosidasa
Nigrina básica b	<i>Sambucus nigra</i>	De Benito y col., 1997 y 1998	64 kDa	N-glicosidasa
Sieboldina b	<i>Sambucus sieboldiana</i>	Rojo y col., 1997	60 kDa; glicoprot, R	N-glicosidasa
Cinamomina	<i>Cinnamomum camphora</i>	Li y col., 1997	Glicoprot	N-glicosidasa
Porrectina	<i>Cinnamomum porrectum</i>	Li y col., 1996	64 kDa, glicoprot.	N-glicosidasa
Lectina I del muérdago	<i>Viscum album</i>	Eschenburg y col., 1998	63 kDa, glicoprot.	N-glicosidasa

Tabla 1 Proteínas Inactivantes del Ribosoma (RIP) mejor caracterizadas, organismo del que se han aislado (referencia al año en que fueron descubiertas), y propiedades significativas de estructura y función, sobre el RNA, de cada una de ellas. (R=Receptor)

1.1. Las ribonucleasas microbianas extracelulares y las ribotoxinas

Toda una gran variedad de microorganismos producen y secretan ribonucleasas al medio extracelular (Hill y col., 1983; Yoshida, 2001). Estas proteínas han sido ampliamente estudiadas y forman una familia de proteínas homólogas (Tablall). La ribonucleasa T1, producida por el hongo *Aspergillus orizae*, es la mejor estudiada; hasta un punto tal que hoy constituye uno de los modelos proteicos más estudiados. La RNasa T1 es una proteína ácida de 104 aminoácidos (Takahashi, 1985), cuya estructura tridimensional se conoce con detalle desde hace mucho tiempo (Pace y col., 1991) (figura 1). Se puede hablar, por tanto, de la gran familia de las RNasas de tipo T1, dentro de la cual existen, a su vez, distintas subfamilias. La primera sería aquella que engloba a las RNasas producidas por organismos procariotas, de los géneros *Bacillus* y *Streptomyces* (Tablall). La proteína más característica de este grupo es la Barnasa o ribonucleasa Ba, producida por la cepa H de *Bacillus amyloliquefaciens* (Hartley, 1997). Se han detectado otras ribonucleasas muy parecidas, con más de un 85% de identidad de secuencia, en distintas cepas de *Bacillus* (Tablall). Las producidas por *Streptomyces* constituyen otro grupo que presenta sólo alrededor de un 20-25% de identidad con la barnasa, pero que mantienen el mismo motivo de plegamiento y actividad. (Herbert y col., 1998; Pace y col., 1998)

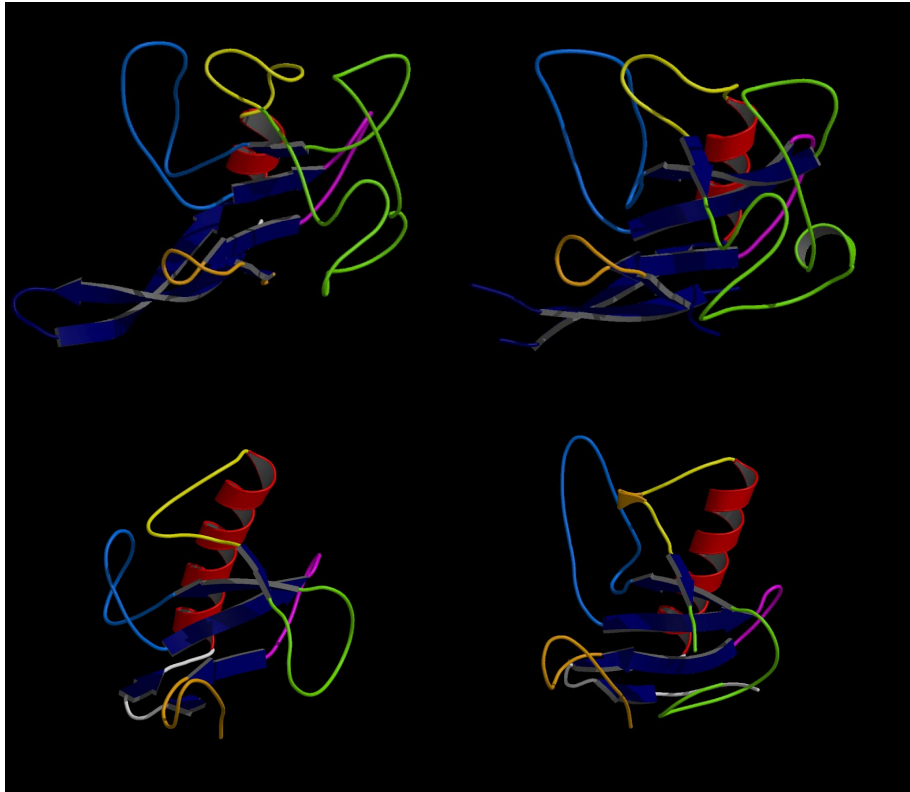


Figura 1 Comparación de estructuras de (izq. a der. y de arriba a abajo) la α -sarcosina y restrictocina y las ribonucleasas T1 y U2. Figuras generadas en MOLSCRIPT (Kraulis, 1991)

El segundo gran grupo de ribonucleasas microbianas extracelulares es el de las producidas por microorganismos eucariotas; en concreto, por distintos hongos filamentosos (Tabla II). Entre ellos hay algún basidiomiceto, como *Ustilago sphaerogena*, que produce las RNAsas U1 y U2, o *Pleurotus ostreatus*, que sintetiza la RNasa Po1. Todos los demás son Ascomicetos, como el propio *Aspergillus orizae*, productor de la RNasa T1.

Hasta hoy día (año 2002) no se han publicado resultados que apunten hacia el carácter tóxico de estas ribonucleasas. Sin embargo, existe un grupo más, producidas también por hongos, que poseen propiedades citotóxicas y que son precisamente las ribotoxinas. (Tabla I y fig. 2I). Como se ha mencionado, la α -sarcina fue la primera ribotoxina descubierta (Olson y Goerner, 1965; Olson y col., 1965). Seguidamente, a partir de distintas cepas de *A. restrictus*, se aislaron otras dos ribotoxinas, la restrictocina y la mitogilina (Olson y Goerner, 1966). Ya en los años ochenta se secuenciaron estas tres proteínas (Sacco y col., 1983; López-Otín y col., 1984; Fernández-Luna y col., 1985) tras haberse establecido previamente su extraordinaria homología a partir de la comparación de parte de sus secuencias (Rodríguez y col., 1982) y de sus características químicas y espectroscópicas (Gavilanes y col., 1983). Más tarde, en 1990, se clonó y secuenció el gen de un alérgeno de *A. fumigatus*, AspFI, que resultó ser prácticamente idéntico a mitogilina y restrictocina (Arruda y col., 1990). A partir de entonces se caracterizaron muchos otros genes (Wirth y col., 1997, Martínez-Ruiz y col., 1999 a y b), llegándose a la conclusión de que las ribotoxinas constituyen un grupo de proteínas ampliamente extendido dentro de los hongos filamentosos.

RNasa	Organismo	Referencia secuencia (n° acceso)	Especi- ficidad	n° aa	puentes disulfuro
Bacillus					
Binasa (Bi)	<i>Bacillus intermedius</i>	P00649	G	113	0
Bp	<i>Bacillus pumilus</i>	P48068	G	109	0
Bco	<i>Bacillus coagulans</i>	P37203	G	109	0
Barnasa (Ba)	<i>Bacillus amyloquefaciens</i>	P00648	G	123	0
Bci	<i>Bacillus circulans</i>	P35078	G	110	0
Streptomicetos					
Sa	<i>Streptomyces aureofaciens BM-K</i>	P05798	G	96	1
Sa3	<i>Streptomyces aureofaciens CCM3239</i>	P30289	G	98	1
Sa2	<i>Streptomyces aureofaciens R8/26</i>	Q53752	G	96	1
St	<i>Streptomyces erythraeus</i>	P00650	G	101	1
Hongos Ascomicetos					
Pch1	<i>Penicillium chrysogenum</i>	P09647	G	102	2
Pb1	<i>Penicillium brevicompactum</i>	P07446	G	102	2
Ms	<i>Aspergillus saitoi</i>	P00653	G	105	2
C2	<i>Aspergillus clavatus</i>	P00652	G	104	2
Ap1	<i>Aspergillus palidus</i>	226367	G	104	2
T1	<i>Aspergillus oryzae</i>	P00651	G	104	2
N1	<i>Neurospora crassa</i>	P09646	G	104	2
F1	<i>Fusarium moniliforme</i>	P10282	G	106	2
FI1	<i>Fusarium lateritium</i>	P16411	G	105	2
FI2	<i>Fusarium lateritium</i>	P16412	G	105	2
Th1	<i>Trichoderma harzianum</i>	P26875	G	106	2
Hongos Basidiomicetos					
U1	<i>Ustilago sphaerogena</i>	P07736	G	105	2
Po1	<i>Pleurotus ostreatus</i>	AAB32829.1	G	101	3
U2	<i>Ustilago sphaerogena</i>	P00654	G, A	114	3

Tabla II RNasas microbianas extracelulares (no se incluye a las ribotoxinas). de secuencia conocida perteneciente a la familia de T1, (la referencia corresponde a las bases de datos SwissProt, PIR o EMBL), con algunas de sus características.

"n° aa": longitud de la secuencia en número de aminoácidos.

1.2. Posible función biológica de las ribotoxinas

Los hongos superiores se clasifican en dos grupos principales: Ascomicetos y Basidiomicetos. Se caracterizan por poseer un micelio tabicado y esporas asexuales exógenas. La familia que engloba al género *Aspergillus* está formada por hongos filamentosos que pertenecen al grupo de los Ascomicetos. Concretamente en *A. giganteus* aún no ha sido observada su fase sexual, por lo que de momento está catalogado como un Ascomiceto Imperfecto. El micelio surge de la germinación y posterior crecimiento de una célula reproductora o espora. Después de la germinación la espora emite un largo filamento, llamado hifa, que se ramifica repetidamente. Un sistema ramificado de hifas constituye el micelio, y a medida que éste se extiende, el contenido citoplasmático puede desaparecer en las regiones centrales más viejas. Teniendo en cuenta que un hongo es incapaz de trasladarse, el hecho de que se extienda sobre un sustrato es el resultado de este movimiento interno del citoplasma hacia los extremos de las hifas (Wessels 1999; Stanier 1988; Steinberg 2000). Esto no está considerado como capacidad de movimiento mecánico ya que el citoplasma se encuentra encerrado dentro de su pared.

Cuando las esporas se encuentran en condiciones favorables de humedad, temperatura y sustrato, se forma el cigoto. En los Ascomicetos el cigoto se desarrolla dentro de una estructura en forma de saco (denominada asca). Allí, el núcleo, sufre una meiosis, con frecuencia seguida de una o más divisiones mitóticas. En torno a cada núcleo y cada citoplasma circundante se forma una pared, originando cuatro, ocho o más ascosporas dentro del asca. Una vez maduras las ascosporas, el asca se rompe liberando las esporas contenidas.

El momento en que comienza la producción de α -sarcina, (al igual que ocurre con su homóloga en *A. restrictus*, la restrictocina), parece coincidir con aquél en el que los núcleos empiezan a diferenciarse, llegando a la máxima concentración en la fase temprana de formación de la espora, cuando en torno a cada citoplasma comienza a formarse la pared. A partir de ahí, decrece la producción de la toxina (Brandhorst y Kenealy, 1992), siendo prácticamente nula al finalizar la maduración de la espora. Esto ha permitido sugerir que este tipo de toxinas juegan un papel de protección en la etapa más delicada (la conidiación) ya que la formación de esporas supone el éxito reproductivo para la futura expansión y propagación, con el consiguiente mantenimiento de la especie a lo largo del proceso evolutivo. En esta etapa, clave para el hongo, éste puede ser objeto del ataque de insectos (Brandhorst y col., 1996 y 2001) o pequeños mamíferos que utilizan las esporas como parte de su dieta. Con la producción de α -sarcina las esporas tienen, en ese momento crítico, un sistema de protección frente al depredador. Mientras, la espora puede comenzar a germinar en su interior. En este sentido, el insecto actuaría además, como un vector de la diseminación de esporas. El hecho de que no sea necesaria la producción de toxina, cuando ya ha madurado, sugiere que una vez formada la espora el riesgo ha sido superado, pues ya las condiciones le son favorables. Recordemos que las esporas son estructuras resistentes que pueden soportar situaciones desfavorables hasta que se den las condiciones necesarias para crecer.

La universalidad de la actividad catalítica de la α -sarcina sobre el rRNA del propio hongo plantea la cuestión de cómo se protege éste

(Miller y Bodley, 1988). Inicialmente se pensó en la existencia de un inhibidor constitutivo de la especie o en la posibilidad de que se sintetizase como una forma inmadura, ribonucleolíticamente inactiva. La inexistencia de un sistema de producción recombinante de α -sarcina, o de restrictocina, en sistemas heterólogos eucariotas no permitía discriminar una u otra opción. Los intentos frustrados de producción en *S. cerevisiae* (Yang and Kenealy, 1992a) parecían apoyar la segunda hipótesis. Sin embargo, mucho más recientemente, se consiguió clonar y producir α -sarcina en la levadura *P. pastoris*, y además se aisló una forma pro-, demostrándose que era enzimáticamente activa (Martínez-Ruiz y col., 1998). Por tanto, la única posibilidad razonable sería entonces que a lo largo de su procesamiento las diferentes formas de α -sarcina se encontrasen englobadas en el interior de estructuras vacuolares, y no libres en el citoplasma del hongo. Por ello, la protección del propio hongo frente a la toxina debe ser reflejo de la acción de un sistema secretor fielmente dirigido, basado en un proceso de compartimentación vacuolar, que comience en la traducción y se extienda hasta las últimas etapas del procesamiento. Antes de ser completada su síntesis, la pre-pro- α -sarcina sería confinada al retículo endoplasmático. De allí pasaría al Golgi, en vacuolas, donde se convertiría en pro- α -sarcina. En esta forma sería secuestrada en largas vacuolas y distribuida cerca de la pared celular donde, probablemente, se completará su procesamiento en contacto ya con la membrana citoplasmática. Datos incompletos que apoyan esta secuencia de acontecimientos fueron publicados tras el estudio histológico del *Aspergillus giganteus* productor de la α -sarcina (Endo y col., 1993 a y b).

```

          *           20           *           40           *
Sarcin : ---AVTWI*CLNDQKNPKTKYETKRLLYNQNK*ESNSHHAPLSDCKTGSSYPHWF : 52
Gigant : ---AVTWI*CLNEQKNIKTKYETKRLLYNQDK*ESNSHHAPLSDCKTGSSYPHWF : 52
Clavin : ---AATWICMNEQKNPKTKYENKRLLYNQNN*ESNAHHAPLSDCKTGSSYPHWF : 52
Restri : ---A-TW*ICINQQLNPKTKWEDKRLLYSQAK*ESNSHHAPLSDCKTGSSYPHWF : 51
HtA    : ---APIV*ICR-----P-KLDGREKPFKVDVATAQAQARKAGLTT*EKSGD--PHRY : 44
U2     : CDIPQSTNCG-----G*NVYSNDDINTAIQGA-----LDDVANCDRPNY*PHQY : 43
T1     : ---ACDY*ICG-----S*ICYSSSDVSTAQAAG-YQLHEDGETVCSN--SY*PHKY : 42

          60           *           80           *           100           *
Sarcin : TNGYDGDGKLPKGRTPIKFGKSDCDRPPKHSKDGNGKTDHYLLEFP*TFFPDGH--D : 105
Gigant : TNGYDGEKILKGRTPIKFGKSDCDRPPKHSKDGNGKNDHYLLEFP*TFFPDGH--D : 105
Clavin : TNGYDGDGKILKGRTPIKWGNSDCDRPPKHSKNGDGKNDHYLLEFP*TFFPDGH--Q : 105
Restri : TNGYDGNGLIKGRTPIKFGKADCDRPPKHSQNGMGKDDHYLLEFP*TFFPDGH--D : 104
HtA    : FAGDH-----IRWGVN*NCDKA-----D-----AILWEYPIYVW*GKNAE : 77
U2     : YD-EASED-----ITLCCGS--GP-----WSEFPLVYNGP--Y : 71
T1     : NN-YEG-----FDFS*VVS--SP-----YYEWEILSSGD--V : 67

          120           *           140           *           160
Sarcin : YKFDSKK--PKENPGPARVLYTY--PNKVF*CGIIAHTKE---NQCE--LKLCSH : 150
Gigant : YKFDSKK--PKEDPGPARVLYTY--PNKVF*CGIIAHTRE---NQCE--LKLCSH : 150
Clavin : YNFDSKK--PKEDPGPARVLYTY--PNKVF*CGIVAHTRE---NQCD--LKLCSH : 150
Restri : YKFDSKK--PKENPGPARVLYTY--PNKVF*CGIVAHQ*RG---NQCD--LRLCSH : 149
HtA    : WAKDVKTSQQKGGPTPIRVYVANSRGAVQYCCVMTHSKVDKNNQ*KEFFEKCD- : 130
U2     : YSSRDN----YVSPGPD*RVLYQT--NTGEFCATVTH*TGAASY-DC---FTQCS- : 114
T1     : YSGGS-----PCADR*VVFN---ENNQLACVITH*TGASGN-----FVECT- : 104

```

Figura 2 Comparación de secuencias entre ribonucleasas. Se destacan en magenta los residuos de triptófano de las proteínas de carácter tóxico (ribotoxinas).

1.3. Inhibición de la biosíntesis de proteínas

El mecanismo molecular de acción de las ribotoxinas no se conocía cuando se evaluaron clínicamente como agentes antitumorales. Fue durante la década de los setenta cuando Julian Davies, entonces en la Universidad de Wisconsin en Madison (EE.UU.), junto con Daniel Schindler, descubrieron que la α -sarcina inhibía la biosíntesis de proteínas al probar su efecto sobre extractos de germen

de trigo, que usaban para evaluar la acción de diversos antibióticos (Schindler y Davies, 1977). La inhibición de esta biosíntesis se debe a la escisión de un único enlace en el del rRNA, de mayor coeficiente de sedimentación, de la subunidad grande de los ribosomas (Schindler y Davies, 1977; Brigotti y *col.*, 1989; Furutani y *col.*, 1992). De este modo se producen dos fragmentos, el más pequeño de los cuales se encuentra en el extremo 3' del rRNA y se denomina fragmento- α . Su longitud varía según el organismo, encontrándose en torno a los 350-400 nucleótidos. Los grupos de David Vázquez y Eric Cundliffe, que trabajaban también en la caracterización de sustancias inhibitoras de la biosíntesis de proteínas, y colaboraban con Julian Davies, estudiaron más en profundidad la acción sobre el ribosoma de la α -sarcina y otras ribotoxinas, (Fernández-Puentes y Vázquez, 1977; Conde y *col.*, 1978; Hobden y Cundliffe, 1978), confirmándose que su mecanismo de acción era el mismo (Conde y *col.*, 1978; Fando y *col.*, 1985).

El siguiente paso en el esclarecimiento del modo de acción de las ribotoxinas sobre el ribosoma fueron los estudios del grupo de Ira Wool en la Universidad de Chicago, cuando, en una serie notable de trabajos (Endo y Wool., 1982; Chan y *col.*, 1983; Endo y *col.*, 1983; revisado en Wool, 1984), establecieron en buena medida los detalles de la actividad ribonucleolítica específica de la α -sarcina, localizando el lugar exacto de corte en el ribosoma y analizaron también las actividades no específicas de esta proteína, concretamente su capacidad para hidrolizar enlaces fosfodiéster de RNA situados en la posición 3' de purinas. Por otro lado, se observó que puede producir escisiones sobre el DNA, pero de forma poco eficiente. Estos estudios iniciales se han ido completando (Endo y *col.*, 1990; Gluck y Wool 1996;

Wool 1997; Yang y *col.* 2001), por lo que hoy se conoce con bastante más detalle, las zonas de reconocimiento y corte de las ribotoxinas en el ribosoma.

En definitiva, la α -sarcina es una ribonucleasa muy específica que produce la hidrólisis de un único enlace fosfodiéster, entre las bases G4325 y A4326 del rRNA (según la numeración de la molécula aislada de rata) de la subunidad mayo del ribosoma, localizado en la única región conservada evolutivamente del dominio VI del rRNA 28S (fig. 3) (Endo y Wool, 1982; Chan y *col.*, 1983; Endo y *col.*, 1983; Wool, 1984;). La inactivación del ribosoma bloquea la síntesis de proteínas provocando la muerte de la célula. Esta acción es tan específica y eficiente que la entrada de una única molécula por célula desencadena la acción letal observada (Olsnes y Pihl, 1982).

El modo en que α -sarcina inhibe la síntesis de proteínas en la célula se encuentra directamente relacionado, por un lado, con el sitio de reconocimiento del ribosoma y, por otro, con el lugar donde ejerce su acción catalítica, 6 nucleótidos hacia adelante de aquél, (a unos 11 Å de distancia) en la secuencia de la subunidad mayor del ribosoma. Ambos sitios quedan englobados en una región de 12 nucleótidos altamente conservada en todas las especies (fig. 3), que constituye la secuencia más larga del RNA ribosómico donde se han conservado sin interrupción todas las bases, en todos los organismos estudiados (Gutell y Fox, 1988), incluyendo los del propio *A. giganteus* (Hobden y Cundiffe, 1978; Miller y Bodley, 1988).

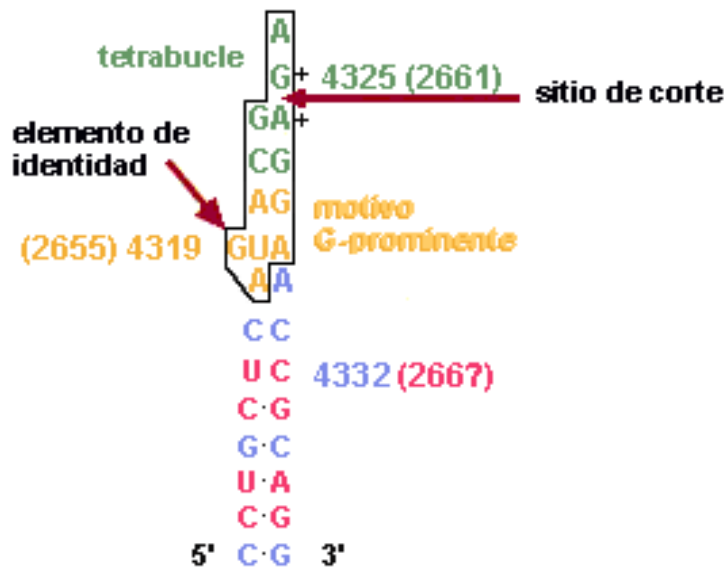


Figura 3 Representación esquemática del bucle Sarcina/Ricina, única secuencia conservada del dominio VI del rRNA mayor de la subunidad grande del ribosoma. Se han delimitado los 12 nucleótidos que componen la estructura de la horquilla y que se mantiene en todos los organismos vivos. Se compone de un tetrabucle GAGA (en verde) y el motivo de la G-prominente (en amarillo). El lazo queda unido por contactos Watson-Crick (representados por un punto), que forman la hélice 95 en el rRNA 23S. Bases pertenecientes al rRNA de rata, y comparación con la secuencia en *E.coli* (números entre paréntesis). Las bases coloreadas en rosa son comunes a ambos organismos.

En una base adyacente, la A4324 (del rRNA 28S de rata), es también donde se produce la acción catalítica de las RIP de plantas (Tabla II), cuya actividad es N-glicosidasa, en lugar de ribonucleolítica (Endo y *col.*, 1987, 1988 y 1991; Endo y Tsurugi, 1988; Gluck y *col.* 1992; Stirpe y *col.*, 1992). Por ello, esta región se ha denominado Lazo Sarcina/Ricina (siglas en inglés SRL). Eso no significa que no sea el

lugar de reconocimiento de otras proteínas inactivantes del ribosoma, así como de algunas de las propias proteínas ribosomales (Stelzl y *col.*, 2000; Uchiumi y *col.*, 1999; Hinck y *col.*, 1997; Mueller y *col.*, 2000; Ban y *col.* 2000) cuya principal misión consiste en el mantenimiento de la estructura terciaria del rRNA. Dichas proteínas ribosomales, por otra parte, no parecen ser necesarias para que la α -sarcina reconozca el SRL (Miller y Bodley, 1988; Glück y Wool, 1996). La universalidad de esta región se supone deriva del hecho de ser el lugar de interacción con factores implicados en la síntesis proteica (Moazed y *col.* 1988, Brigotti y *col.*, 1989). En concreto, los factores de elongación EF-1 y EF-2 de eucariotas (Correl y *col.*, 1998; Munishkin y Wool 1997), EF-Tu y EF-G de procariotas (Ban y *col.*, 2000; Porse y Garret, 1999; Tapio e Isakson 1991).

La localización del SRL en la subunidad mayor del ribosoma se halla, asimismo, estratégicamente situada debido a encontrarse expuesta (Ban y *col.* 1999 y 2000) y, en el límite de la superficie de unión a la subunidad menor del ribosoma (fig. 4). A su vez, muy cerca, se encuentra el túnel donde se establecen las uniones codón-anticodón entre el mRNA y el tRNA (Chan y *col.*, 2000; Mueller y *col.*, 2000; Stelzl y *col.*, 2000; Ban y *col.*, 2000). Todo esto, convierte al SRL en un centro neurálgico esencial para la correcta función del ribosoma.

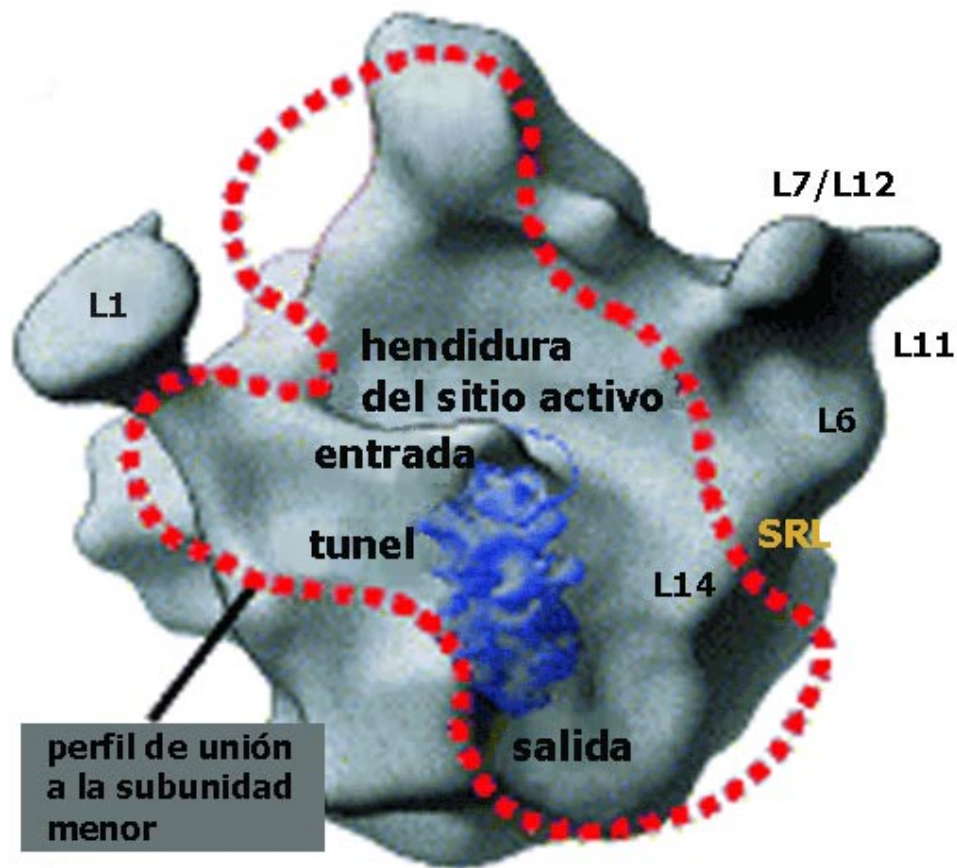


Figura 4 Subunidad 50S del ribosoma vista desde la superficie de unión a la subunidad menor. Se destaca donde queda situado el motivo de unión a Sarcina/Ricina (SRL) en ocre, así como las zonas donde se unen algunas de las proteínas ribosomales. El tunel peptídico, lugar donde se están transfiriendo los aminoácidos, se muestra a una resolución de 5Å, con su punto de entrada del mRNA y el lugar de salida de la cadena peptídica que se está sintetizando. Figura original extraída de Ban 1999 y tratada posteriormente con el programa Adobe Photoshop.

1.4. Mecanismo catalítico de la α -sarcina

El SRL no es simplemente un lazo de 17 residuos, como se habría supuesto en un principio, sino una horquilla compacta en cuyo extremo se encuentra un pequeño bucle, formado únicamente por dos nucleótidos (fig. 5). Su estructura tridimensional, que ha sido determinada mediante RMN (Szewczak y *col.*, 1993; Szewczak y Moore, 1995) y cristalografía (Correl y *col.*, 1998 y 1999) se puede descomponer en tres pequeños motivos (fig. 3): un tetralazo GAGA, una G prominente y una corta hélice de tipo A. Los extremos se entrelazan mediante uniones tipo Watson-Crick formando la hélice 95 del rRNA 23S (Mueller y *col.*, 2000; Stelzl y *col.*, 2000; Ban 1999 y 2000). Esta hélice forma parte del dominio VI (que comprende 161 nucleótidos) de la subunidad mayor del ribosoma (fig. 6).

Antes de conocerse la estructura tridimensional de este dominio, el grupo de Wool ya había empezado a estudiar los elementos estructurales mínimos que serían necesarios para que la ricina y la α -sarcina ejercieran su acción. Para ello, sintetizó un fragmento de 27 nucleótidos, de secuencia idéntica a la de dicho lazo, y que es susceptible de ser hidrolizado por ambos tipos de toxinas. El primer resultado sorprendente fue que ambas proteínas actúan de diferente modo, en cuanto a su reconocimiento del sustrato. Así, mientras que la ricina es capaz de depurar cualquier tetralazo GAGA que esté cerrado por una corta hélice del tipo de Watson y Crick (Endo y *col.*, 1991; Glück y *col.*, 1992), la α -sarcina ataca a un residuo adyacente, en el SRL, pero reconoce elementos estructurales muy distintos, aunque

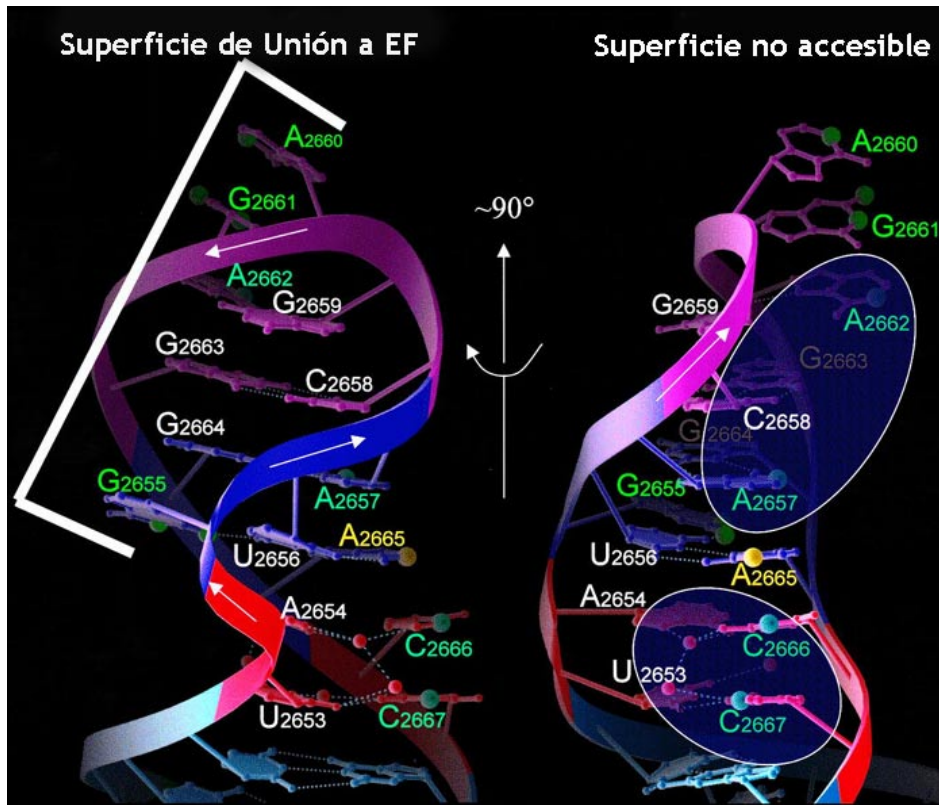


Fig 5 Estructura tridimensional del Dominio Sarcina/Ricina (SRD). A la izquierda se puede ver el área expuesta donde contactan los factores de elongación (EF del inglés Elongation Factors) y hacia donde queda situada la G prominente (G₂₆₅₅) con la que parece interaccionar la α -sarcina. Un giro de 90°, de esta imagen, permite mostrar también la superficie no accesible (la porción mínima de ésta queda englobada en las elipses). La α -sarcina corta entre G₂₆₆₁ y A₂₆₆₂ enlace orientado hacia la superficie no accesible. Imagen extraída de Correll 1999.

en los primeros experimentos no se lograron identificar (Endo y *col.*, 1990; revisado en Wool y *col.*, 1992; Wool, 1996 y 1997). Sólo después de resolverse la estructura tridimensional del sustrato se dirigió la atención hacia la "G prominente" (G10 en la estructura deducida por RMN; G15 en el oligo considerado por el grupo de Wool; G4319 en el rRNA de rata; G2655 en el rRNA de *E.coli*; figuras 5 y 6), que ha

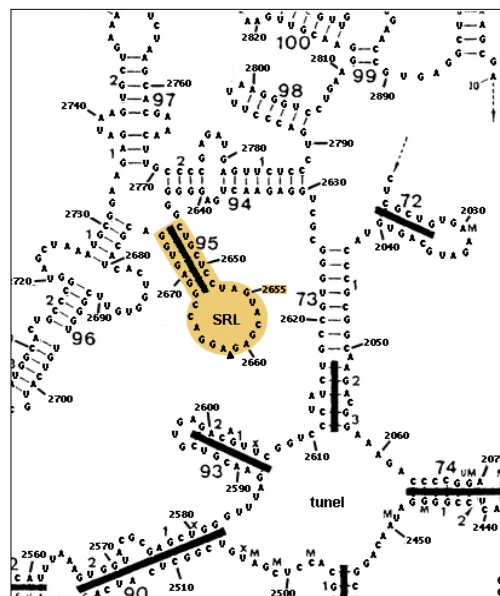
resultado ser el elemento fundamental de reconocimiento. La delección de esta guanina en el oligonucleotido, o su intercambio por otra base, elimina la capacidad de reconocimiento por parte de la α -sarcina, a pesar de estar situada a 6 nucleótidos hacia el extremo 5' del enlace que es hidrolizado (Glück y Wool, 1996). De aquí se deriva otra conclusión importante del trabajo, obtenida mediante la inserción sucesiva de bases entre la guanina, que representa este elemento de reconocimiento, y el enlace que es hidrolizado: Parece ser que α -sarcina emplea como punto de referencia la G prominente para orientarse adecuadamente y escindir el enlace que se encuentra a una cierta distancia (11.3 Å hacia el extremo 3' del rRNA), no reconociendo, estrictamente hablando, una secuencia concreta a hidrolizar (Glück y Wool, 1996).

La acción catalítica específica ocurre en una región esencial para el correcto funcionamiento del rRNA, por lo que no resulta extraño que esta única escisión produzca una parada en la maquinaria de biosíntesis de proteínas en la célula, que se observa tras 18 horas de incubación, debido a que desorganiza una estructura de reconocimiento que no tiene sustitución en el ribosoma. Esto ha quedado corroborado con el diseño de numerosas mutaciones en el rRNA a nivel del SRL (Endo y *col.*, 1990 y 1991; Taprich y Dahlberg, 1990; Wool y *col.*, 1992; Wool, 1996; O'Connor y Dahlberg, 1996; Chan y *col.*, 2000;).

Aunque la α -sarcina presenta una elevada especificidad de sustrato, ésta es dependiente de la concentración de la enzima (Wool, 1984 y 1997). La estricta especificidad de la α -sarcina sobre la subunidad mayor del ribosoma se establece siempre y cuando la

concentración de toxina sea inferior a 30nM. Si ésta es superior a dicho valor, la α -sarcina comienza a producir cortes inespecíficos en el extremo 3' de guaninas (Endo y col., 1983; Wool, 1984; Endo y col., 1988). Por ello, se ha propuesto la existencia de dos zonas de reconocimiento con distinta afinidad: la G prominente correspondería a una elevada afinidad por parte de la proteína, y la hidrólisis inespecífica sugiere la existencia de otras zonas de menor afinidad.

Figura 6 Detalle del dominio VI del rRNA 23S que refleja la situación del SRL (al final de la hélice 95), mostrando su proximidad al tunnel, o anillo de la peptidil transferasa, donde se lleva a cabo el proceso de traducción. Se han destacado, en color, la posición de la G prominente donde α -sarcina parece unirse y, con una flecha (\blacktriangle), el enlace sobre el que ejerce su acción, entre G₂₆₆₁ y A₂₆₆₂. Detalle reconstruido en Adobe Photoshop 6.0 del mapa original de Mueller 2000.



En este mismo sentido se ha descrito cómo la α -sarcina puede degradar homopolinucleótidos, si se añade a una concentración suficientemente alta (1-20 μ M) (Endo y col., 1983), manifestando preferencia por aquellos compuestos por purinas. Incluso se ha descrito

su capacidad para degradar DNA de doble cadena, en presencia de Mg^{2+} , si bien este resultado no está suficientemente contrastado. De hecho, la actividad ribonucleolítica de la α -sarcina se inhibe por la presencia de concentraciones milimolares de Mg^{2+} y Mn^{2+} (Endo y *col.*, 1983; Martínez del Pozo y *col.*, 1989) y molares de cationes monovalentes como Na^+ , K^+ o NH_4^+ (Endo y *col.*, 1983).

Por último, también se ha demostrado que la α -sarcina es capaz de hidrolizar dinucleótidos, como ApA ó GpA, aunque con una muy baja eficacia (Lacadena y *col.*, 1998). Dichos estudios permitieron demostrar que la α -sarcina es una ribonucleasa ciclante con un pH óptimo ácido (Pérez-Cañadillas y *col.*, 1998; Lacadena y *col.*, 1999). Es decir, que se comportaría en términos generales de acuerdo con el mecanismo descrito por Takahasi (1970) para la RNasa T1. Si bien el comportamiento enzimático de la RNasaT1 es sensiblemente diferente frente al ApA (Osterman y Walz, 1978), ambas enzimas comparten un mecanismo muy similar. En él, dos residuos de la proteína participarían directamente en la hidrólisis ácido-base del enlace fosfodiéster, según se muestra en la figura 7. En el caso de la α -sarcina, la His-137 es el residuo que participa como ácido en la primera etapa, mientras que es el Glu-96 el que actúa como base (Pérez-Cañadillas y *col.*, 1998; Lacadena y *col.*, 1999). El resultado es la formación de un fosfodiéster cíclico, unido por 2' y 3' a la ribosa. En la segunda etapa el papel de los residuos mencionados se invierte con la consiguiente hidrólisis del intermedio cíclico (fig. 7).

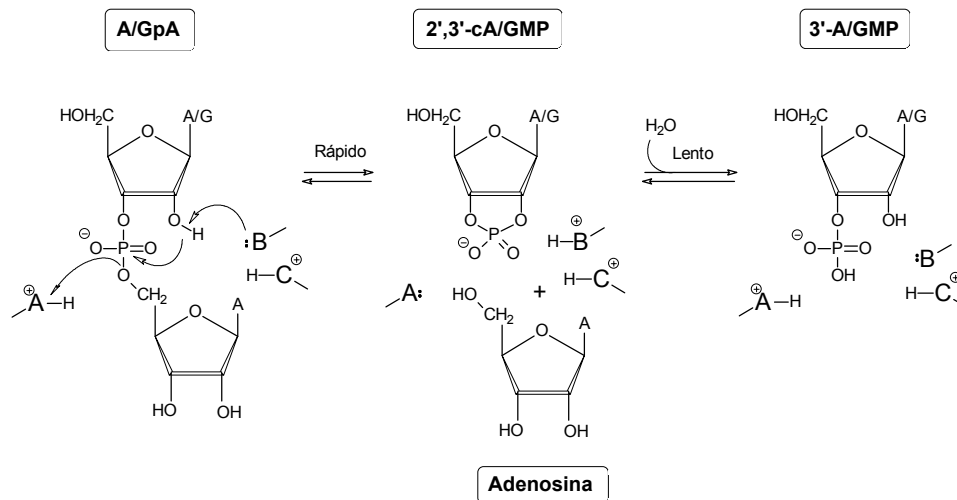


Figura 7 Secuencia de reacciones del mecanismo de transfosforilación de ribonucleasas ciclantes. El modo de acción se ha simplificado para un dinucleótido, siendo **A** el residuo que actúa como ácido, **B** la base y **C** es la histidina que no participa directamente.

1.5. Estructura tridimensional de la α -sarcina

Quando se determinó la estructura primaria de la α -sarcina se observó la gran similitud de secuencia que presentaba con otras RNAsas microbianas como la T1 o la U2 (Sacco y *col.*, 1983), lo que hacía pensar que podían presentar un plegamiento similar. En este sentido, se conoce la estructura tridimensional de la RNasaT1 (Pace y *col.*, 1991), así como numerosas características catalíticas y de plegamiento (Campbell y Ts'o, 1971; Heineman y *col.*, 1980; Heinemann y Saenger, 1982; Ding y *col.*, 1991; Grunert y *col.*, 1991; Grauzin y *col.*, 1992). También se han resuelto las estructuras tridimensionales de otras dos proteínas de la misma familia, las RNAsas

Ms (Nonaka y *col.*, 1993) y F1 (Vassilyev y *col.*, 1993) apareciendo posteriormente la de la RNasa U2 (Noguchi y *col.*, 1995).

La similitud de secuencia se concentraban en algunas zonas que correspondían a los residuos del centro catalítico y las hebras β de la lámina principal de las RNasas de la familia de la T1. Se comprueba asimismo que las ribotoxinas presentaban bucles entre las hebras β notablemente más largos y ricos en residuos básicos que las ribonucleasas (Martínez del Pozo y *col.*, 1988; Lamy y *col.*, 1992; Mancheño y *col.*, 1995 a). Ha sido propuesto que las ribotoxinas presentarían un mismo patrón de plegamiento en torno a una lámina β central bastante hidrofóbica en la que se situarían los residuos catalíticos. Los residuos extra con respecto a las RNasas no tóxicas serían lazos en los que abundarían giros β o estructuras no ordenadas, y en los cuales se encuentran la mayoría de los residuos básicos de la proteína, y serían los responsables del componente electrostático de la interacción con vesículas lipídicas (Mancheño y *col.*, 1995a). Al mismo tiempo, Kao y Davies (1995) postularon una estructura similar para la restrictocina, basándose en un alineamiento parecido, aunque centrando su explicación en la especificidad de la actividad ribonucleolítica de las ribotoxinas, de la que también responsabilizaban a los lazos extra (Kao y Davies, 1995; Campos-Olivas y *col.* 1996; Chin y *col.*, 1999; Pérez-Cañadillas y Varani 2001).

La colaboración de nuestro grupo con el de Espectroscopía de RMN del Instituto de Química-Física Rocasolano (CSIC, Madrid) permitió determinar, la estructura tridimensional de la α -sarcina, mejorando sucesivamente la resolución y refinando la estructura hasta resolver incluso las zonas más desordenadas (Campos-Olivas y *col.*,

1996a y b; Pérez-Cañadillas y *col.*, 1998 y 2000). Durante este tiempo, se publicó, asimismo, la estructura de la restrictocina, resuelta mediante difracción de rayos X (Yang y Moffat, 1996). Su plegamiento, al menos en lo que se refiere a los elementos de estructura secundaria ordenada, coincide con lo que se había predicho (fig. 8).

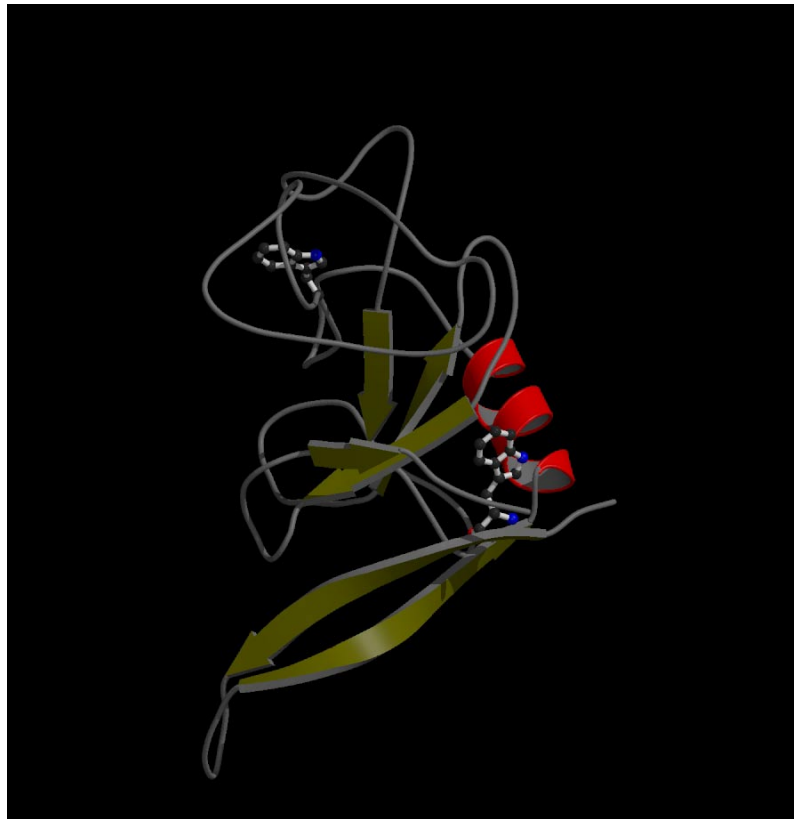


Figura 8 Estructura tridimensional de α -sarcina resuelta por RMN. Se resaltan en color las áreas de estructura secundaria ordenada (α -hélice en rojo y láminas β en ocre), asimismo se destacan las cadenas laterales de los dos residuos de triptófanos que contiene la proteína: posiciones 4 (lámina β N-terminal) y 51 (arriba, lámina β -principal). Figura realizada en MOLSCRIPT (Kraulis, 1991).

La estructura de la α -sarcina (Tabla III) en disolución, está representada en el Banco de Datos de Proteínas (Protein Data Bank; código de acceso 1DE3) por un conjunto de 20 confórmeros (Campos-Olivas y col. 1996 b; Pérez Cañadillas y col., 1999, 2000). Su plegamiento global corresponde a una estructura de tipo α/β formada por una lámina antiparalela de 5 hebras (β_3 a β_7), conectadas con topología -1, -1, -1, -1. Empaquetada con la lámina se encuentra una α -hélice de aproximadamente tres giros (α_1). El extremo amino de 26 residuos forma una larga horquilla β en la que las dos hebras se pueden considerar partidas por una «bisagra» que separaría dos pequeñas láminas. El resto de los residuos formarían cinco largos bucles, que son los que conectan los elementos de estructura secundaria regular. De ellos, al menos el bucle 2 puede considerarse separado en dos partes, 2_A y 2_B , separadas por un giro de hélice, α_2 (Pérez-Cañadillas y col., 2000).

El plegamiento de la α -sarcina es muy similar al de la restrictocina (fig. 1), con los elementos de estructura secundaria regular prácticamente idénticos. Sólo se aprecian orientaciones ligeramente diferentes en las regiones correspondientes a la secuencia Ser 83--Asp 91 de la α -sarcina y el bucle 5. En cuanto al centro activo de ambas proteínas también es muy similar, y sólo se diferencian en la orientación de la cadena lateral de la arginina (121 en la α -sarcina y 120 en la restrictocina), probablemente debido a la presencia de un ión fosfato en la estructura cristalográfica (Pérez-Cañadillas y col., 1999). Se ha demostrado que precisamente este residuo de Arg es clave para el mantenimiento de la capacidad citotóxica de la α -sarcina (Masip y col., 2001). Hay que destacar que una parte de la horquilla β del

residuos		ELEMENTO		Secuencia		residuos		ELEMENTO		Secuencia	
2 — 6	β 1A	VTWTC		73 — 78	α 2	KSDCCR					
9 — 12	β 1B	DQKN		79 --- 93	bucle 2B	PPKHSKDGNGKTDY					
13 --16	giro β 1	PKTN		94 — 97	β 4	LLEF					
17 — 20	β 2B	KYET		98 ----119	bucle 3	PTFPDGHDIYKFDSSK PKENPPGP					
23 — 26	β 2A	LLYN		120 — 124	β 5	ARVIY					
27 — 36	α 1	QNKAESNSHH		125 --132	bucle 4	TYPNKVFC					
37 ----49	bucle 1	APLSDGKTGSSYP		133 — 137	β 6	GIIAH					
50 — 52	β 3	HWF		139 --143	bucle 5	KENQG					
53 --- 72	bucle 2A	TNGYDGDGKLPKGR TPIKFG		144 — 146	β 7	ELK					

Tabla III Elementos de estructura secundaria de α -sarcina ordenados desde el extremo amino al carboxilo, destacando la secuencia que comprenden.

extremo amino no ha podido ser resuelta en el cristal de la restrictocina, por lo que no se tiene información sobre esta zona, que en los confómeros de la α -sarcina presenta una gran flexibilidad (Pérez Cañadillas, 1999). El papel clave de esta región sobre la capacidad de las ribotoxinas para interactuar con membranas y para reconocer específicamente el rRNA de los ribosomas ha sido demostrado recientemente (García-Ortega y *col.*, 2001 y 2002).

En cuanto a la comparación con las estructuras de las RNAsas T1 y U2, las ribotoxinas muestran un alto grado de similitud en las regiones de estructura secundaria regular (aunque la hélice α_1 de las ribotoxinas es menor), centrándose las principales diferencias en la menor longitud de los bucles de conexión y de la horquilla β , que presenta una sublámina adicional (fig. 1). Los residuos catalíticos de las tres enzimas se encuentran en posiciones equivalentes, con una ligera diferencia en cuanto a la cadena lateral de la arginina (residuo 121 en α -sarcina). La diferente actividad ribonucleolítica se puede explicar por la distinta orientación del bucle 5 y de los cambios en el sitio de reconocimiento de la base, y por la menor accesibilidad de la histidina catalítica de las ribotoxinas, que justifica su menor eficacia catalítica frente a nucleótidos (Pérez Cañadillas, 1999; Pérez Cañadillas y *col.*, 1998 y 2000; Lacadena y *col.*, 1999).

Desde el punto de vista del trabajo presentado en esta Memoria, es muy importante destacar el hecho de que la mayoría de las ribotoxinas contienen tres triptófanos, manteniéndose conservados en todas ellas los correspondientes al Trp 4 y al Trp 51 de la α -sarcina (fig.

2). Por otra parte, las otras RNAsas microbianas como, por ejemplo, T1 y U2, sólo poseen uno (Trp 98 en T1, y Trp 95 en U2).

Se debe, asimismo hacer mención de la localización de estos dos Trp de la α -sarcina, pues su sustitución por Phe constituye la base del trabajo presentado en esta Memoria. El Trp-4 se encuentra en la primera hebra (β 1A, residuos 2-6) que constituye la horquilla β -amino-terminal y muy próximo a la Cys-6, que a su vez forma un puente disulfuro con la Cys-148, manteniendo muy próximos los dos extremos de la cadena polipeptídica (fig. 9). El Trp-51 forma parte de la hebra β -3 (residuos 50-52), que constituye uno de los elementos de la lámina β -central (fig. 9), y es contiguo a la His-50, que forma parte del centro activo y participa en la reacción ribonucleolítica estabilizando el estado de transición (Lacadena y *col.*, 1999).

Los dos residuos de triptófano (Killian y von Heijne 2000, Kuznetsova y Turoverov, 1998; Yau y *col.*, 1998, Schiffer y *col.*, 1992, Chen y Barkeley, 1998) presentan valores bajos de accesibilidad al disolvente (entre el 5 y el 15%) (Pérez-Cañadillas, 1999) y sus cadenas laterales están bien definidas en la estructura obtenida por RMN (Pérez-Cañadillas y *col.*, 2000).

En cuanto a su disposición espacial, el Trp 4 parece participar en la formación de un pequeño núcleo hidrofóbico, junto con la Phe 131 y la Ile 134, mientras que el Trp 51 establece interacciones directas con la His 82 (bucle2B) y el Asp 41 (bucle1) (fig. 9). Esta interacción se traduce en un valor alterado del pKa intrínseco de la mencionada His 82 (Pérez-Cañadillas y *col.*, 1999; Pérez-Cañadillas y *col.*, 1998 y 2000).

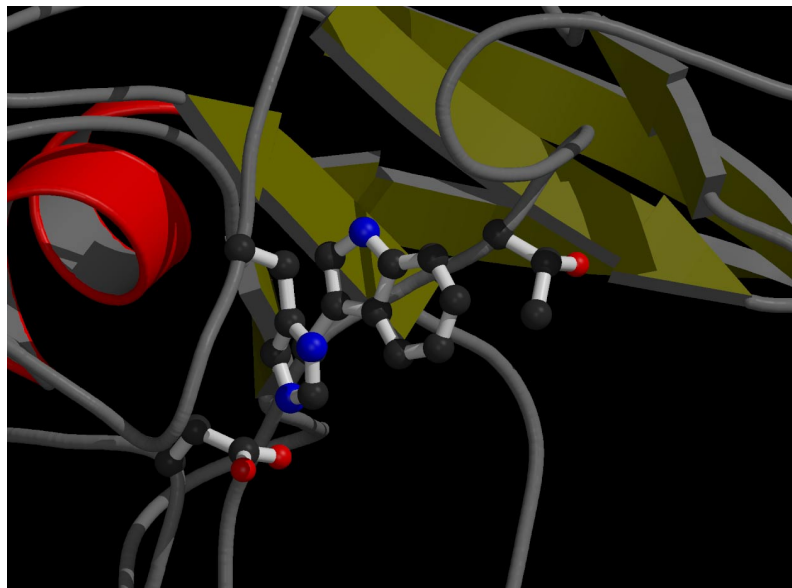
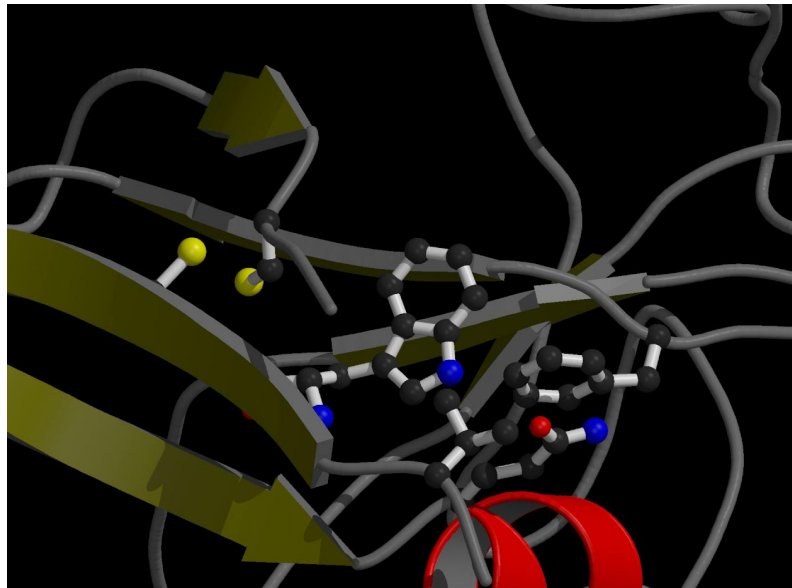


Figura 9 Entorno de los residuos de triptófano en la estructura tridimensional de la α -sarcosina. Arriba extremo N-terminal (Val-2) y núcleo hidrofóbico que forma el Trp-4 con Ile 134 y Phe 131, también se destacan las cisteínas que establecen el puente disulfuro 6-148. Abajo puede observarse como quedan enfrentados los anillos imidazol de la His-82 e indol del Trp-51, se incluyen también las cadenas laterales de Asp-41 y Thr-53.

Finalmente, en el modelo de interacción propuesto (fig. 10) para explicar el reconocimiento del SRL por parte de la α -sarcina (Pérez-Cañadillas y *col.*, 2000), las bases adyacentes al sitio de corte quedarían cercanas al segmento Trp 51-Gly 55 y también al bucle 5 (fig. 10). La secuencia que se extiende entre la Phe 52 y el Asp 57 formaría parte del sitio de reconocimiento del sustrato y de hecho, los aminoácidos homólogos de Asn54 en RNasaT1 (Asn44) y restrictocina (Asn53) parecen determinantes en la estabilización del sitio de reconocimiento de Guanina (la base específica del punto de corte de RNasaT1), al hallarse formando enlaces de hidrógeno con moléculas de agua cuando no existe ligando (Loris y *col.*, 1999).

1.6. Interacción con membranas

Puede parecer obvio que, dado que las ribotoxinas son toxinas extracelulares que ejercen su actividad citotóxica en el citosol de determinadas células diana, esta acción requiere varias etapas. Concretamente, previa a la acción catalítica sobre el ribosoma ha de producirse la entrada de la toxina al interior celular (Parker y Pattus, 1993; Lacy y Stevens, 1998; Ladokhin y White 1999; Epanand y Vogel 1999; Falpnes y Sandvig 2000). Dado que la actividad inactivante del ribosoma se dirige hacia una estructura evolutivamente conservada, ésta podría tener lugar, en principio, en todo tipo de células. Por tanto, y ya que las ribotoxinas son tóxicas sólo para determinados tipos celulares y organismos, es lógico pensar que la selectividad de la acción citotóxica podría residir precisamente en la distinta capacidad para entrar en las células diana (Ladokhin y Holloway 1995; Park y *col.*, 1998; Malenbaum y *col.* 1998; Ladokhin 1999; La Rocca y *col.* 1999;

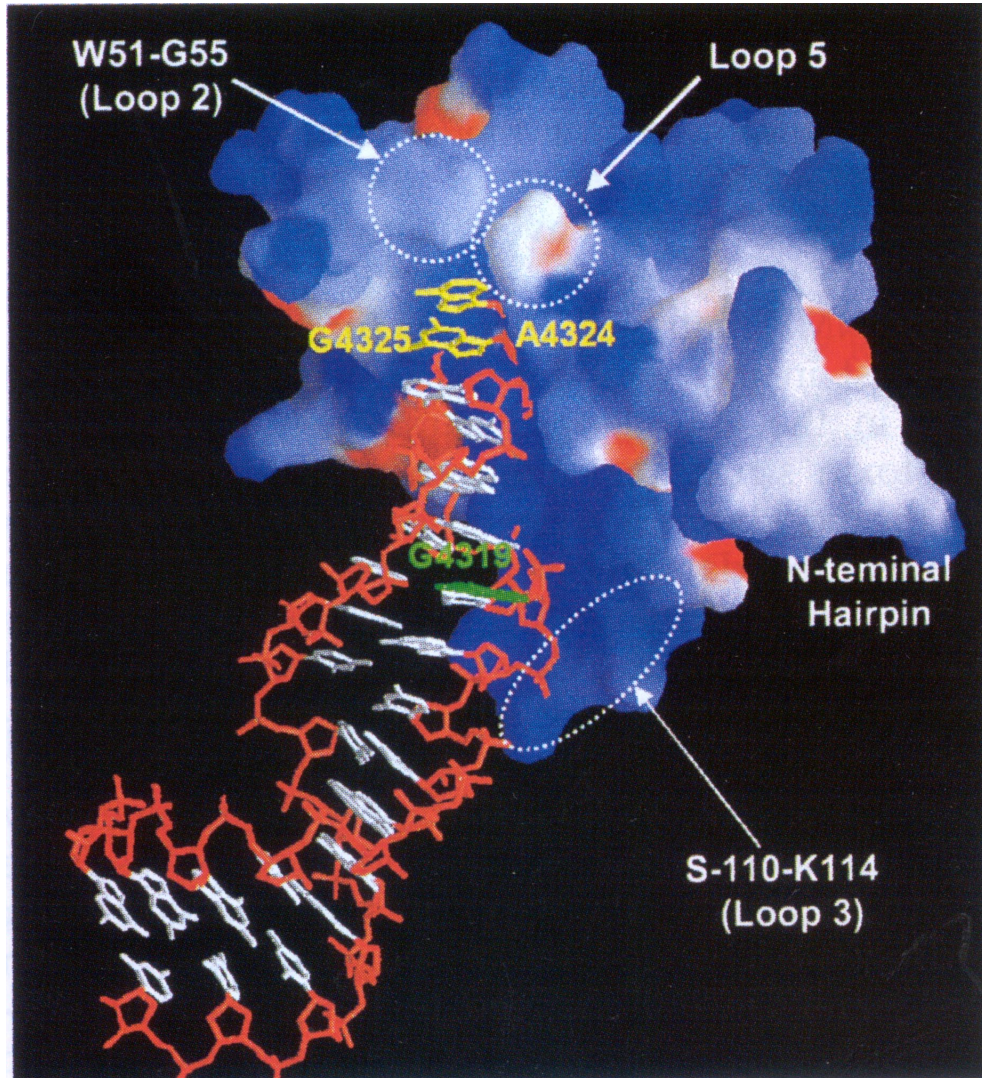


Figura 10 Modelo de interacción del Dominio Sarcina/Ricina del RNA 28S (representado por varillas, esqueleto fosfodiéster coloreado en rojo) con la α -sarcina (representada por superficie electrostática, el azul simboliza densidad de carga positiva y el rojo negativa). La base de reconocimiento (G4319) se muestra en verde y, los dos nucleótidos que forman el bucle del dominio S/R en amarillo. En la proteína se ha destacado la posición central del bucle 3 (que contiene las lisinas 111, 113 y 114), que contactaría con la G prominente, así como dos áreas: la comprendida entre el Trp-51 y Gly-55, y la del bucle 5, ambas se situarían próximas al sitio de corte (G4325-A4326) en la interacción. También se ha señalado el lugar que ocupará la lámina N-terminal en dicho modelo. La figura ha sido extraída de Pérez-Cañadillas 2000.

Sharpe y London 1999; Ren y *col.*, 1999; Kuprakar y *col.*, 1999; Xia y Sui, 2000). Esta “actividad” de entrada en las células también las diferencia del resto de ribonucleasas microbianas extracelulares, que no presentan carácter tóxico. En esta etapa de la entrada en células es donde se ha centrado tradicionalmente el estudio de las bases moleculares de la citotoxicidad de la α -sarcina por parte de nuestro grupo de investigación.

No se ha encontrado ningún receptor para las ribotoxinas, que ayude a su entrada en las células, a pesar de numerosos intentos de búsqueda (Lin, A. y Wool, I.G., resultados sin publicar, citado en Wool, 1997). De hecho, las conclusiones que se han obtenido en nuestro laboratorio sugieren que la α -sarcina presenta en su propia estructura la capacidad para interactuar con la membrana celular y translocarse al citosol. Como ya se ha dicho, esto es una diferencia clara con las RIP de plantas de tipo II, como la ricina, que sí utilizan elementos de las células como receptores (Stirpe y *col.*, 1992; Lord y *col.*, 1994); incluso parece que utilizan la maquinaria de translocación de proteínas defectuosas en el retículo endoplásmico, para conseguir que la cadena catalítica entre al interior celular (Wesche y *col.*, 1999; Argent y *col.*, 2000).

La aproximación que ha permitido estudiar la capacidad de la α -sarcina para atravesar membranas ha sido tanto la de emplear sistemas modelos de membrana (Hope y *col.*, 1995), formados por vesículas lipídicas (revisado en Gasset y *col.*, 1994; Mancheño y *col.*, 1994 a), como la de utilizar cultivos de células tumorales (Olmo y *col.*, 1993, 2001; Turnay y *col.*, 1993).

En primer lugar, la α -sarcina muestra una elevada afinidad por fosfolípidos ácidos, habiéndose descrito su capacidad para interactuar con vesículas modelo compuestas por ellos (Gasset y *col.*, 1989; Oñaderra y *col.*, 1989; Mancheño y *col.*, 1998 b). Como consecuencia de la interacción, la α -sarcina produce la agregación de vesículas (Gasset y *col.*, 1990). Esta agregación es dependiente de la relación molar proteína:lípido, alcanzándose la saturación cuando ésta es de 1:50. Los fosfolípidos ácidos son imprescindibles, detectándose interacción tanto cuando se utilizan vesículas de fosfatidilglicerol (PG; Gasset y *col.*, 1990) como de fosfatidilserina (PS; Mancheño y *col.*, 1994 b y 1998 b), pero no de fosfatidilcolina (PC; Gasset y *col.*, 1990), un fosfolípido zwitteriónico. De esta forma, se detecta la existencia de un componente electrostático en la interacción. De hecho, variaciones en la fuerza iónica del medio suponen modificaciones en la extensión de la agregación, pero no revierten la interacción una vez establecida, demostrando que también existe un componente hidrofóbico importante. Este resultado está también de acuerdo con lo observado al estudiar la influencia de la α -sarcina sobre el comportamiento termotrópico de las vesículas (Gasset y *col.*, 1989, 1990, 1991a y b, 1995 a y b).

Se ha descrito también la capacidad de la α -sarcina para producir fusión de vesículas lipídicas (Gasset y *col.*, 1990). Para ello, se midió la mezcla de lípidos entre diferentes vesículas, en un ensayo clásico de transferencia de energía por resonancia (Gasset y *col.*, 1990; Mancheño y *col.*, 1994 b). Este proceso implica la agregación de vesículas, mediada por interacciones entre moléculas de proteína tal y

como se ha determinado por estudios de cinética rápida mediante técnicas de flujo detenido (Mancheño y *col.*, 1994b). La capacidad fusogénica de la α -sarcina también se ha detectado por estudios de microscopía electrónica por criofractura, observándose grandes estructuras multilamelares cuya existencia corroboraría los estudios espectroscópicos (Gasset y *col.*, 1990 y 1991b).

La interacción de la α -sarcina con vesículas lipídicas supone también una protección de la proteína frente a hidrólisis triptica, a pesar de su alto contenido en residuos de lisina y arginina (Gasset y *col.*, 1989; Oñaderra y *col.*, 1989). Además, se ha descrito su capacidad para translocarse al interior de estos sistemas modelo (Oñaderra y *col.*, 1993). Esto se demostró mediante dos tipos de ensayos: degradación de tRNA encapsulado en vesículas de asolectina, tras incubación con α -sarcina; y degradación de la α -sarcina por incubación con vesículas conteniendo tripsina en el medio intravesicular. En ambos casos se utilizaron controles para descartar la liberación espontánea de las moléculas encapsuladas, y por tanto una degradación extravesicular. De esta forma, se demostró que la α -sarcina es capaz de translocarse al interior de las vesículas en un estado enzimáticamente activo. Estos ensayos no permiten determinar si la proteína α -sarcina penetra totalmente al interior vesicular, o si permanece unida en la cara interna de la membrana pero con su centro activo accesible al interior de las vesículas. También se pudo determinar mediante este tipo de ensayos la presencia de formas oligoméricas de la α -sarcina asociadas a la interacción con las vesículas lipídicas y a su translocación a través de la bicapa (Oñaderra y *col.*, 1998).

Esta translocación de la α -sarcina, junto con el resto de los resultados comentados, se explica suponiendo que la existencia del componente electrostático en la interacción permite su unión a membranas lipídicas, mientras que el componente de naturaleza hidrofóbica desestabiliza las bicapas, posibilitando su paso al interior de las vesículas. Este esquema general de interacción se ha propuesto en otros sistemas (Honig y Nicholls, 1995; Epand y *col.*, 1995; Dathe y *col.*, 1996; Ben-Tal y *col.* 1997; Dathe y *col.*, 1997; Wieprecht y *col.*, 1997a; Ren y *col.*, 1997; Murray y *col.*, 1999; Sitaram y Nagarag, 1999; Dathe y Wieprecht, 1999; Ren y *col.*, 1999; Magnet-Dana, 1999). El componente electrostático de la interacción sería atribuido al gran número de residuos básicos que tiene esta proteína y que permitiría la interacción con las cabezas polares de los fosfolípidos ácidos, mientras que el componente hidrofóbico requeriría la existencia de zonas hidrofóbicas en la proteína que afectasen a la zona de las cadenas de acilo de la bicapa. Esta zona hidrofóbica, que no era evidente al observar la secuencia primaria de la α -sarcina (Sacco y *col.*, 1983; Martínez del Pozo y *col.*, 1988), se predijo que podía ser una lámina β central que sería equivalente a la lámina β central de las RNAsas T1 y U2 (Mancheño y *col.*, 1995a), cuya existencia se confirmó después al resolver la estructura tridimensional de la proteína (Campos-Olivas y *col.*, 1996 a y b; Pérez-Cañadillas y *col.*, 2000). Así, para comprobar el papel de la lámina β en dicha interacción con las bicapas lipídicas, se sintetizó un péptido, α S (116-139), que correspondería a dos de las hebras de la lámina β . Este péptido origina efectos similares a los producidos por la proteína completa en su interacción con vesículas, adoptando una conformación β tras la interacción, lo cual es consistente con la hipótesis planteada acerca del papel de la mencionada lámina β (Mancheño y *col.*, 1995 b). Asimismo, se han sintetizado péptidos de

menor tamaño correspondientes a la misma zona de la estructura de la α -sarcina, estableciendo que un péptido de nueve aminoácidos, correspondiente a los residuos 131-139 de la α -sarcina es suficiente para producir dichos efectos (Mancheño y *col.*, 1998a). Se debe resaltar, por su relevancia respecto a los resultados presentados en esta Memoria que el Trp-51 forma parte de esta lámina β , como ya se ha comentado (fig. 8).

Por otro lado, la interacción de la α -sarcina con vesículas se traduce en una disminución en la estabilidad de la proteína (Gasset y *col.*, 1995 b). Se han realizado también ensayos de interacción utilizando α -sarcina reducida y carboxiamidometilada (Gasset y *col.*, 1995 a), de manera que, aunque ésta sólo contendría parte de su estructura β y giros β como ordenaciones periódicas, y aunque se encuentra mayoritariamente desestructurada, como sugiere su espectro de dicroísmo circular, sigue produciendo sobre las vesículas efectos similares a los obtenidos con la proteína nativa. Por tanto, la estructura nativa de la α -sarcina no es imprescindible para el establecimiento de su interacción con vesículas. Este resultado estaría también de acuerdo con la existencia de la lámina β hidrofóbica como soporte del componente hidrofóbico de la interacción, puesto que el porcentaje de este tipo de ordenación periódica es elevado en el complejo proteína-lípido que se forma, como se ha comprobado por espectroscopía de infrarrojo (Gasset y *col.*, 1995 a y b).

En definitiva, todos estos estudios de interacción de la α -sarcina con vesículas modelo, ponen de manifiesto la capacidad intrínseca de la proteína para interaccionar con membranas. Hay que recordar que la

α -sarcina presenta capacidad citotóxica frente a numerosas líneas celulares de tumores humanos, sin que medie ningún tipo de permeabilización anterior de la membrana (Olson y *col.*, 1965; Olmo y *col.*, 1993 a y 2001; Turnay y *col.*, 1993). Por tanto, parece que la α -sarcina se transloca al interior celular a través de su interacción con los fosfolípidos de las membranas. En este sentido, los diferentes fosfolípidos actuarían como una nueva familia de receptores (Leenhouts y *col.*, 1995; van Voorst y de Kuijff, 2000; Epanand, 1998; Lee, 2000).

1.7. Citotoxicidad de la α -sarcina

Si bien las ribotoxinas fueron descubiertas y estudiadas gracias a sus propiedades antitumorales (Olson y *col.*, 1965; Goldin y *col.*, 1966), los primeros estudios que se hicieron a nivel molecular acerca de su efecto sobre sistemas celulares parecieron revelar que la proteína sólo mostraba su carácter citotóxico frente a células previamente permeabilizadas por la infección viral (Fernández-Puentes y Carrasco, 1980; Carrasco y Esteban, 1982; Muñoz y *col.*, 1985; Otero y Carrasco, 1987; Liprandi y *col.*, 1997;) o por algún otro agente (Otero y Carrasco, 1986, 1987 y 1988).

Sin embargo, más recientemente se ha demostrado cómo también la α -sarcina presenta actividad citotóxica frente a líneas celulares de tumores humanos (Turnay y *col.*, 1993; Olmo y *col.*, 1993 y 2001), corroborando así la caracterización inicial que condujo a su descubrimiento (Olson y *col.*, 1965). De hecho, la proteína modifica el patrón de proliferación de las células, produciendo la inhibición de su crecimiento y, finalmente, la muerte celular. Todos estos efectos son,

probablemente, consecuencia de la inhibición de la síntesis de proteínas, que se observa tras 18 horas de incubación, recordando que basta una única molécula por célula para causar un efecto letal (Olsnes y Pihl, 1982).

Teniendo en cuenta el análisis cinético de esta inhibición, se pueden observar dos fases; una estacionaria respecto a la concentración de α -sarcina, seguida de otra fase que conlleva una disminución de la síntesis de proteínas de primer orden respecto a la concentración de la ribotoxina. Esto indicaría la existencia de un componente cinético saturable, previo a la inactivación de los ribosomas, que correspondería con el paso de la proteína a través de la membrana celular (Turnay y *col.*, 1993). Ya fue observado en su día (Olmo, 1993) que, α -sarcina no producía una alteración significativa de la membrana, ya que no existía liberación de lactato deshidrogenasa (marcador citosólico). Mucho más recientemente, se ha observado que el proceso de transporte de α -sarcina en el citosol no aparece asociado a vesículas cubiertas de clatrina, y es dependiente de ATP lo que indica que alcanza el citosol a través de un mecanismo de endocitosis en el que se hallan implicados endosomas ácidos (Olmo y *col.*, 2001). En este mismo trabajo se muestra que la distorsión provocada por 2 ionóforos (monesina y nigericina) sobre el aparato de Golgi produce una disminución acusada en su IC_{50} , sugiriendo que también se halla implicado dicho orgánulo en su camino para alcanzar el citosol.

Respecto a los efectos que causa su acción sobre células, se ha descubierto recientemente, que la incubación de las células con α -sarcina a una concentración inferior a su IC_{50} induce fragmentación

internucleosomal del DNA, la reversión de la asimetría de la membrana (apareciendo una mayor cantidad de PS en el lado externo), la activación de la cascada caspasa-3 y la rotura de la poli (ADP-ribosa) polimerasa, demostrando que su actividad catalítica provoca apoptosis, de la que son reflejo dichos efectos (Olmo y *col.*, 2000). Estudios con inhibidores de caspasas sugieren que, sin embargo, este mecanismo es tal que la α -sarcina sería capaz de inducir la muerte celular a través de una forma de apoptosis independiente de caspasas o por mecanismos no apoptóticos pero, eso sí, siempre como consecuencia de su actividad catalítica sobre el ribosoma y la consecuente inhibición de la biosíntesis de proteínas.

Finalmente, merece la pena resaltar el hecho de que la α -sarcina reconozca fosfolípidos ácidos, especialmente PS (fosfatidilserina) y PG (fosfatidilglicerol), y no interaccione con los de naturaleza neutra, PC (fosfatidilcolina). Se ha descrito la asimetría en la distribución de los fosfolípidos en las membranas plasmáticas, predominando generalmente PS y fosfatidiletanolamina (PE) en la monocapa interna, y PC y esfingomielina (SM) en la externa (Connor y *col.*, 1989; Devaux, 1993; Zachowski, 1993; Devaux y Zachowski, 1994; Williamson y Schlegel, 1994). Esta asimetría se mantiene gracias a la acción de varias enzimas transportadoras de distintos tipos de fosfolípidos, (a las que se conoce como "flipasas") (Smit y *col.*, 1993; Tang y *col.*, 1996; van Helvoort y *col.*, 1996; Epand 1998). En las células tumorales aparece una inversión de dicha asimetría, encontrándose PS mayoritariamente en la monocapa externa (Connor y *col.*, 1989; Utsugi y *col.*, 1991; Denisov y *col.*, 1998). Se ha observado que la predominancia de PS en la cara externa es un detonante del inicio del proceso de apoptosis por macrófagos, que presentan en su

superficie receptores de fosfatidilserina y activan la endocitosis en la célula (Fadok y *col.*, 1992a y b). Siendo PS un fosfolípido ácido puede entenderse la mayor especificidad que mostrará α -sarcina para invadir líneas tumorales frente a células normales.

1.8. Inmunotoxinas: bactericidas y anticancerígenos

Las primeras pruebas clínicas de las ribotoxinas como agentes antitumorales supusieron un fracaso (Goldin y *col.*, 1966; Roga y *col.*, 1971). Aún así se ha intentado su utilización en aplicaciones clínicas, pero dirigiendo su acción de forma local y específica hacia las células que se quiere inactivar, para limitar su efecto citotóxico. Así, se han construido diversas inmunotoxinas, en las que las ribotoxinas utilizadas se unían a anticuerpos monoclonales que reconocen células tumorales (Orlandi y *col.*, 1988; Conde y *col.*, 1989; Wawrzynczak y *col.*, 1991; Better y *col.*, 1992; Rathore y Batra, 1996, 1997a y b; Rathore y *col.*, 1997; Wang y *col.*, 2000). Otro enfoque sería el de producir la ribotoxina localmente en los tumores, mediante la utilización de terapia génica, evitando, así, que se vean afectadas otras células del organismo. Esto se está intentando actualmente a través de una colaboración establecida con nuestro laboratorio.

OBJETIVO

El objetivo principal del presente trabajo se puede resumir en el estudio de la contribución de los dos residuos de triptófano, aminoácidos conservados en todas las ribonucleasas de la familia, en la estructura y función de α -sarcina. Este objetivo general se puede concretar a su vez en dos objetivos concretos:

Caracterización estructural mediante las técnicas espectroscópicas de emisión de fluorescencia, dicroísmo circular (tanto en la región del ultravioleta próximo, como en el lejano), así como por resonancia magnética nuclear, de variantes de α -sarcina con uno o ninguno de los residuos de triptófano, los cuales serán sustituidos por fenilalaninas. Este objetivo necesariamente demanda, en primer lugar, el diseño de vectores de expresión adecuados para la producción de las distintas proteínas recombinantes, así como su posterior purificación.

Caracterización funcional de las distintas variantes de α -sarcina. Este estudio se enfocará desde dos perspectivas considerando las dos actividades de esta toxina. Por un lado, se analizarán los efectos de las correspondientes mutaciones en la actividad ribonucleasa de la α -sarcina, tanto en lo referente a su actividad específica, sobre ribosomas, como a su actividad inespecífica, sobre polinucleótidos y, por otro lado, su capacidad para interactuar con bicapas lipídicas. Este último análisis es especialmente interesante en tanto que puede arrojar información relevante sobre regiones concretas de la proteína que interactúan con la bicapa.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. CEPAS BACTERIANAS

Las diferentes cepas celulares de *E.coli* empleadas se presentan agrupadas según la finalidad para la que fueron utilizadas:

2.1.1 Aislamiento y producción de plásmidos

HB101: {F⁻ *supE44 hsdS 20*(r_B⁻ m_B⁻) *recA13 ara-14 Δ(gpt-proA) 62 leuB6 lacY1Δ(mcrC-mrr) galK2 rpsL20* (Str^r) *xyl-5 mtl-1* }

Se trata de un híbrido (*E.coli* K12 x *E. coli* B) altamente transformable. Se utilizó en ocasiones simplemente porque es una cepa “estándar” de *E. coli* que no posee la RNA polimerasa del fago T7.

DH5αF': {[F'] *endA1 hsdR17* (r_K⁻ m_K⁺) *supE44 thi-1 supE44 thi-1 recA1 gyrA* (Nal^R) *relA1 Δ(lacZYA-argF) U169 deoR [Ø80 dlac Δ(lacZ) M15]}*

Se empleó para la amplificación de plásmidos, pues la mutación en el gen *endA* elimina la actividad inespecífica endonucleasa tipo1.

TG1: {F' *traD36 lacI^q Δ(lacZ) M15 proAB⁺/supE Δ(hsdM-mcrB)5* (r_K⁻ m_K⁺ *McrB⁻) thi Δ (lac-proAB)*}

Al ser restricción -, sirve como cepa soporte para el crecimiento de fagos y vectores.

Ambas cepas son F', mantienen los genes implicados en la formación del pili, siendo susceptibles a la infección por el fago f1, paso obligado en la preparación de DNA de hebra simple.

2.1.2. Mutagénesis dirigida por oligonucleótido

BW313: {*Hfr*KL16 *pol*45 [*lysA* (61-62)] *dut*1 *ung*1 *thi*1 *relA*1}

Presentan una tasa de mutación espontánea baja. Son susceptibles a la infección por fagos filamentosos pequeños. Su genotipo *ung*1 y *dut*1, resulta ideal para la selección por uridina ya que, permiten su incorporación al DNA.

2.1.3. Producción de proteínas recombinantes

RB791: {W3110 *lacI*^q L8}

Cepa *RecA*+ derivada de HB101. Gracias a *lacI*^q consiguen un aumento en los niveles del represor *lac*, permitiendo la expresión controlada de genes que se encuentran bajo el promotor *lac*. Utilizada para expresar pINPG

BL21 (DE3): {F' *ompT* [*lon*] *hsd*_B (*r*_B⁻ *m*_B⁻)}

Sirve para obtener un alto nivel de expresión de genes clonados en vectores que contienen el promotor Φ10 del bacteriófago T7, ya que lleva la secuencia codificadora de la RNA polimerasa de T7 integrada en el cromosoma. Es deficiente en las proteasas *lon* y *OmpT*.

2.2. MEDIOS DE CULTIVO

Todos los medios descritos a continuación se utilizaron tras esterilización en autoclave, durante un ciclo de 20 minutos a 120°C, excepto la glucosa que se esterilizó por filtración. Cuando fue necesario se añadió ampicilina (100 µg/ml) o/y cloramfenicol (34 µg/ml) al medio.

2.2.1. Medios para *A. giganteus*

Mantenimiento en medio sólido: Se preparó un medio que contenía agar 15 g/l NaNO₃ 2 g/l, Na₂HPO₄·12H₂O 1 g/l MgSO₄·5H₂O 0.5 g/l FeSO₄ 0.01 g/l KCl 0.5 g/l y sacarosa 20 g/l. Alternativamente, también se utilizó un medio a base de dextrosa y extracto de patata (PDB) de DIFCO, a 24 g/l, suplementando con agar a 15 g/l.

Cultivo en medio líquido: El aislamiento y purificación de la α -sarcina fúngica requiere el cultivo del hongo en un medio cuya composición es peptona al 2% (p/v), almidón de maíz 2% (p/v) NaCl 0.5% (p/v) y extracto de carne de vaca 1.5% (p/v).

2.2.1. Medios para *E.coli*

LB (Sambrook y *col.*, 1989) Como medio general para el mantenimiento de cepas y purificación de plásmidos a pequeña o gran escala. Contiene bacto triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 10 g/l. El pH se ajustó a 7.0. Para prepararlo como medio sólido se añadió agar a 15 g/l. Para la selección de transformantes de *E. coli* resistentes

a ampicilina o cloramfenicol, se añadieron dichos antibióticos a las concentraciones ya mencionadas.

YT (Sambrook y *col.*, 1989) Soporte para el crecimiento de cepas de *E. coli* destinadas a la obtención de ssDNA. Este es un medio más rico que el LB y contiene bacto triptona 16 g/l, extracto de levadura 10 g/l y NaCl 5 g/l, finalmente se suplementa con glucosa al 0.2% (p/v).

Medio mínimo (Sambrook y *col.*, 1989) se utilizó para la producción de α -sarcina recombinante y de las diferentes formas mutadas. Este medio contiene la mezcla de sales M9 1x, MgSO₄ 1mM, glucosa 0.2 (p/v) y CaCl₂ 0.01 mM. El empleo de este medio mínimo supone el crecimiento más lento de las células, favoreciendo el plegamiento de las proteínas, lo que facilita su purificación.

ΨBroth se empleó para la obtención de células competentes de *E. coli* y posterior transformación con DNA plasmídico. Contiene bacto triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), MgSO₄ 0.4% (p/v) y KCl 10 mM. El pH del medio se ajustó a 7.6 utilizando KOH.

2.3. VECTORES

2.3.1. Vector para mutagénesis

pEMBL 18 (+): (Dente y Corsese, 1987) Se empleó para la obtención del DNA de hebra simple rico en uridina (ssDNA-U), al contener un sitio de iniciación de la replicación para el fago f1 (ori F1). Permite realizar los ensayos de mutagénesis dirigida por oligonucleótido, así como detectar la mutación por secuenciación, ya que, flanqueando la zona de multiclonaje posee secuencias de hibridación con los oligonucleótidos más habituales utilizados en las reacciones de secuenciación.

2.3.2. Vectores para producción y expresión

pET11b: A partir de este vector, se construyó el sistema de expresión pET11b α S. Los genes que se clonan en los vectores pET se encuentran bajo el control del promotor del fago T7 permitiendo, así, un control específico de la expresión (Rosenberg y *col.*, 1987). En ausencia de la RNA polimerasa del fago T7 (Studier y *col.*, 1990), la transcripción y, por tanto, la expresión de los genes es prácticamente inexistente. Esta característica convierte a estos vectores en sistemas de expresión muy útiles para la producción de proteínas tóxicas, como es el caso de la α -sarcina. Consecuentemente, la manipulación del DNA durante el clonaje en este sistema, se realizó utilizando cepas de *E. coli*, como la HB101, que no contienen el gen de la RNA polimerasa del fagoT7. Cuando se requirió la expresión de los genes se emplearon cepas de *E. coli* que contienen el gen de la RNA polimerasa de dicho fago, como la BL21 (DE-3).

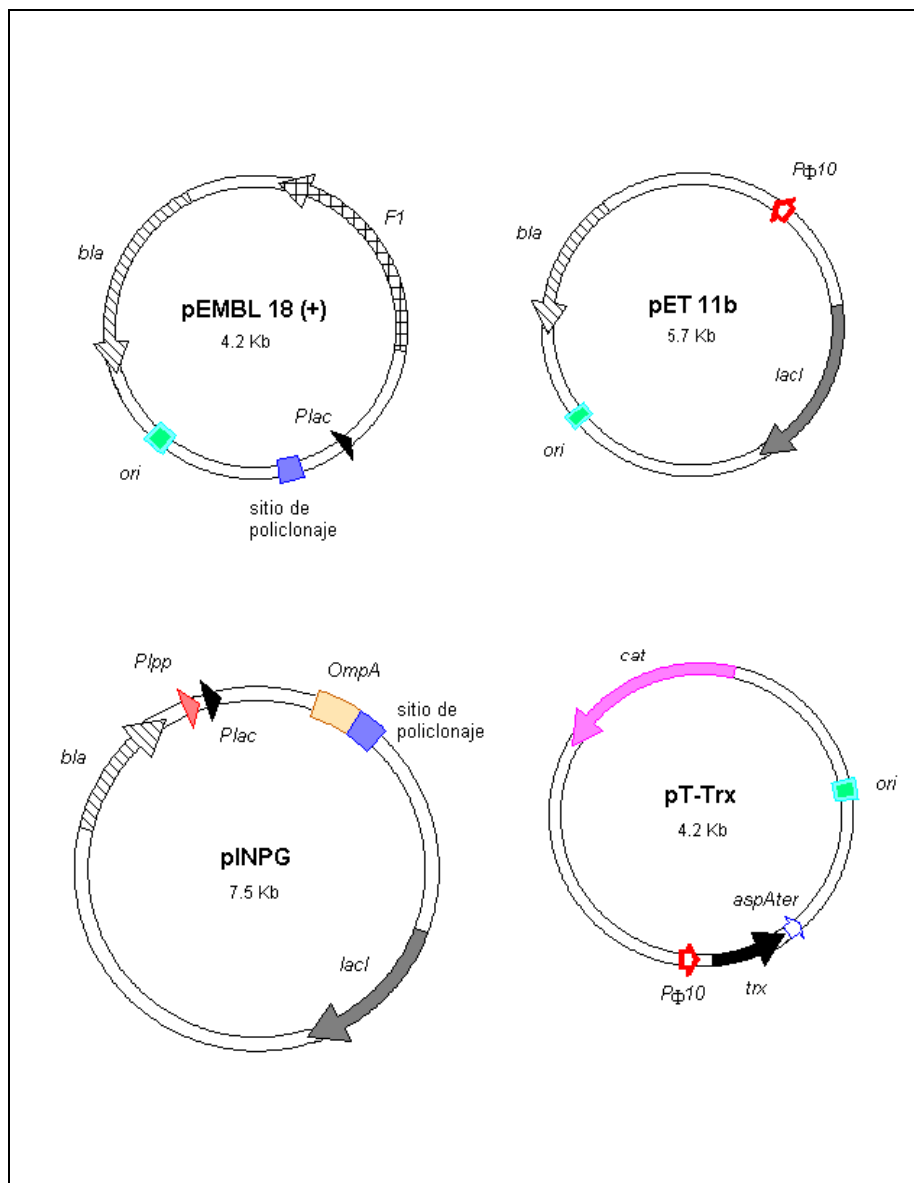


Figura 11 Representación esquemática de los diferentes plásmidos empleados durante la realización de los experimentos descritos en esta Memoria.

pINPG: Es un plásmido derivado de pINIII OmpA1 (Ghrayeb y *col.*, 1984) que se encuentra modificado en la zona codificante del péptido señal de la proteína OmpA de *E. coli*, (se sustituyó Val18 por una Ser, y Glu 20 por una Leu). De esta forma la α -sarcina se secreta al periplasma, en cultivos a gran escala, sin resultar tóxica para la célula, consiguiéndose, así, una mejora en la eficiencia del procesamiento (Lacadena y *col.*, 1994). El plásmido contiene detrás de esta región un sitio de multiclonaje, que permite la introducción del inserto. Contiene, además, el complejo *promotor/operador lac*, permitiendo la expresión de genes por inducción con IPTG. El gen marcador confiere resistencia a ampicilina.

pT-Trx: (Yasukawa y *col.*, 1995) Se trata de un pACYC (que lleva el replicón p15A, y un marcador de resistencia a cloramfenicol) modificado por la inserción de *trx* (que codifica para tioredoxina). La tioredoxina favorece un ensamblaje adecuado de los puentes disulfuro de las moléculas de la proteína, a medida que ésta se va procesando, aumentando la cantidad de proteína soluble en detrimento de los cuerpos de inclusión. Se halla bajo el control del promotor T7, por lo que es inducible con IPTG. Para ello se empleó la cepa BL21(DE-3). Células competentes que incluían pT-Trx, hicieron posible la introducción y expresión de pINPG α -S en esta cepa (García-Ortega y *col.*, 2000). De esta forma se consiguió aumentar el rendimiento de α -sarcina soluble en la fracción periplásmica.

2.4. OLIGONUCLEOTIDOS

Los oligonucleótidos empleados fueron encargados a Pharmacia a través del Servicio de Secuenciación de DNA de la Universidad Complutense de Madrid.

2.4.1. Oligonucleótidos comerciales para secuenciación

Universal Mx13 (-20): 5'- GTA AAA CGA CGG CCA GT - 3'

Reverse (-48): 5'- AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA – 3'

2.4.2. Oligonucleótidos mutagénicos

Sonda W4F: 5'- CA GCG GTG ACC TTT ACC TGC TTG - 3'

Sonda W51F: 5'- GC TAT CCT CAC TTT TTC ACC AAC – 3'

2.5. TAMPONES Y DISOLUCIONES DE USO HABITUAL

En este apartado se describe la composición de las disoluciones de uso general en el laboratorio durante la realización del trabajo presentado en esta Memoria:

Cloroformo:metanol (2:1)

Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)

Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1)

Medio mínimo: Mezcla de sales M9 (10x): Na_2HPO_4 0.21M, KH_2PO_4 0.11M, NaCl 43mM, NH_4Cl 93mM, pH 7.4

MOPS: 50mM Mops, NaCl 0.1M EDTA 1mM, pH 7.0

PBS: NaCl 0.14 M, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.5 mM, Na_2HPO_4 8.1 mM

Tampón de aplicación 1x (Electroforesis de proteínas): Tris 50 mM pH 7.6, EDTA 2 mM, SDS 1% (p/v), glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0.02% (p/v)

Tampón de aplicación 6x (Electroforesis de DNA): azul de bromofenol 0.25% (p/v), cianol de xileno 0.25% (p/v), glicerol 30% (v/v)

Tampón de desarrollo de PAGE-SDS (Tris-glicocola): Tris 0.125M, glicocola 0.1M, SDS 0.5% (p/v)

Tampón de lisis (selección de colonias): Tris-HCl 1 M pH 7.4-8.0, EDTA 0.5 M, NaOH 10 N, SDS 20% (p/v)

Tampón de transferencia: Tris 48 mM, Gly 39 mM, SDS 0.0375% (p/v), metanol 20% (v/v)

TAE 1x: Tris-Acetato 0.045 mM, EDTA 0.001 M pH 8.0

TBE 1x: Tris-Borato 0.045 mM, EDTA 0.001 M pH 8.0

TE: Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5-8.0

TfB1: RbCl_2 100mM, MnCl_2 50mM, acetato potásico 30mM, $\text{CaCl}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 10mM, glicerol 15% (v/v) pH 5.2 (se ajusta con AcH 0.2 M)

TfB2: MOPS 10mM, RbCl_2 10mM, $\text{CaCl}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 75mM, glicerol 75% (v/v) pH 7.0 (se ajusta con NaOH)

2.6. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE DNA

2.6.1. Purificación de plásmidos a partir de células de *E.coli*.

El DNA plasmídico se purificó siguiendo el método comercial de Promega "WIZARD MINIPREPS". Para ello, se creció una colonia aislada de bacterias transformadas en 5ml de medio LB durante 16 horas a 37°C. Tras centrifugar las células y resuspenderlas en Tris 50mM pH 7.5, EDTA 10mM y RNasa A 100mg/ml, se lisaron con NaOH 0.2M, SDS 1%. Posteriormente, se neutralizó el pH con acetato potásico 1.32 M, y se centrifugó para eliminar los restos celulares. El sobrenadante, conteniendo el DNA plasmídico, se puso en contacto con la resina comercial, a la que se une. Después, se procedió a lavar con NaCl 200mM, Tris-HCl 20mM pH 7.5 y EDTA 5mM diluido 1:1 en etanol 95%. Por último se eluyó el DNA con H₂O ó TE. Se analizó mediante electroforesis, valorándose si el grado de pureza era suficiente para el posterior análisis de restricción y secuenciación.

Cada vez que se preparó un nuevo plásmido, cuando éste estuvo suficientemente caracterizado, (análisis con enzimas de restricción, comportamiento en electroforesis de agarosa, secuenciación), se purificó a mayor escala, para su conservación, empleando esta vez "WIZARD MAXIPREPS" método similar al anterior pero adaptado a 500ml de cultivo inicial de bacterias.

2.6.2. Purificación de DNA de hebra simple (ssDNA)

El clonaje de un fragmento de DNA en un plásmido que contenga en su secuencia un origen de replicación de un plásmido

filamentoso, permite la obtención de ssDNA. Gracias a las células empleadas este ssDNA se obtuvo enriquecido en uridina, lo cual es necesario para ensayos posteriores de mutagénesis dirigida por oligonucleótido.

Esta técnica se realizó de acuerdo con Messing (1983) y basándose en lo descrito por Merola y *col.* (1989). Se partió de células de *E. coli*, pertenecientes a la cepa *BW313*, transformadas con el vector pEMBL18(+), que llevaba clonado el inserto adecuado en cada caso.

Esta cepa, susceptible a la infección por fagos filamentosos pequeños, presenta un genotipo *dut-* (*dut1*) y *ung-* (*ung1*), necesario para la incorporación y estabilidad de la uridina al DNA del plásmido, y una tasa de mutación espontánea baja. Tras crecer las células transformadas en placas de LB con ampicilina y uridina se inocularon 2 ml de YT con glucosa al 0.2% y Amp y uridina (1mg/ml), y se incubaron a 37°C hasta una DO_{600nm} de 0.42. En este punto de la fase exponencial de crecimiento, se añadió el fago F1 para transfectarlas (40µl de 1.5×10^{12} p/ml) y replicar, así, el vector. De esta manera las bacterias secretan la hebra no codificadora del pEMBL18(+), rica en uridina (ssDNA-U), en forma de partícula vírica. La incubación se mantuvo durante 5 horas centrifugándose finalmente a 10000xg. Al sobrenadante con los fagos y las partículas víricas, se le adicionó una cantidad de polietilglicol (PEG) y NaCl suficiente para alcanzar unas concentraciones finales de 2.5% (p/v) y 2.5M, respectivamente, manteniéndolo, al menos 2 horas a 4°C. Tras centrifugar y eliminar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 200 µl de TE conteniendo Rnasa A al 0.5% (p/v). La muestra se extrajo, entonces con 200µl más de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, lavándose

después la fase acuosa, varias veces, con éter etílico. Por último, el ssDNA-U de la fase acuosa se precipitó con 1/10(v/v) de Li Cl 4M, MgCl₂ 0.1M y 2.5 volúmenes de etanol frío, lavándose el precipitado con etanol al 70% y disolviéndose TE ó H₂O. La pureza y el rendimiento del proceso se estimaron con una electroforesis en gel de agarosa.

2.6.3. Mutagénesis dirigida con DNA plasmídico enriquecido en uridina

Para la obtención de formas mutantes de la α -sarcina, se empleó el método descrito por Kunkel y *col.* (1987), partiendo de oligonucleótidos sintéticos que hibridaban con diferentes zonas del ssDNA y en los que se habían sustituido las bases necesarias (veáse el apartado de materiales).

La reacción de mutagénesis consistió en mezclar el ssDNA-U, obtenido previamente, con el oligonucleótido mutagénico fosforilado, a una relación molar 1:10 respectivamente, y en mantenerla 2 minutos a 70°C. Tras dejarla enfriar lentamente hasta 25°C, la mezcla de reacción se puso en hielo y se añadieron los componentes para la síntesis y ligación del DNA. Esto se llevó a cabo en HEPES 200mM pH7.8, DTT 2mM y MgCl₂ 10mM, adicionando una mezcla de dNTPs 5mM, ATP 1mM, 1-3 unidades de DNA polimerasa Klenow y 2-5 unidades de la DNA ligasa del fago T4. El proceso completo necesitó una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente y 2 horas a 37°C. De esta forma se facilitaba la hibridación y posterior acción de la DNA polimerasa Klenow y de la ligasa. La reacción finalizó por adición de EDTA a una concentración final de 15mM. Después de transformar con la mezcla

mutagénica células DH5 α F' o TG1 de *E.coli*, seleccionar las que llevaban el vector con el inserto y purificar el plásmido, se determinó la existencia única de la mutación deseada, por secuenciación del DNA.

2.6.4. Secuenciación automática del DNA

Los vectores pEMBL con los insertos previamente mutados se secuenciaron haciendo uso del servicio de secuenciación de la Universidad Complutense. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos Universal M13 (-20) o (reverse primer) Reverso (-48). En el proceso se empleó el sistema ABI PRISM (Perkin Elmer) con la DNA polimerasa Ampli Taq FS. Esta enzima es una forma doble mutante de la Taq polimerasa, que carece de actividad exonucleasa 5' \rightarrow 3' y tiene una mutación en el dominio polimerasa, lo que permite una menor discriminación frente a dNTPs respecto a la enzima original. La amplificación se realiza en un termociclador de gradiente. La mezcla de reacción se preparó utilizando el protocolo comercial ABI PRISM *dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*, y está compuesta por: el DNA plasmídico (100ng/ml), oligonucleótidos (5pmol/ml), mezcla de 4 terminadores de la reacción que están marcados con 4 fluorocromos distintos, mezcla de dNTPs, Tris-HCl 80mM pH 9.0, MgCl₂ 2mM, y la enzima. Una vez realizada la amplificación a la temperatura de hibridación del oligonucleótido empleado, se precipitó el DNA con una mezcla de etanol absoluto y MgCl₂. El sedimento con el DNA se resuspendió en 4ml de formamida desionizada (5:1), azul de dextrano (50mg/ml) y EDTA 25mM pH 8.0, tras lo cual se aplicaron 1.5 (ml) de esta muestra en el gel. La electroforesis se realizó en un gel desnaturizante, compuesto por urea y acrilamida Long Ranger, de alta resolución, a 1680 V, 50 mA y 150 W

durante 8 horas. Según migran los fragmentos de DNA, pasan por un laser que excita a los fluoróforos. La emisión producida por éstos es recogida e interpretada en el aparato quedando asignados los nucleótidos que determinan la secuencia.

2.6.5. Reacciones enzimáticas sobre el DNA

Tienen como objetivo, la consecución de los fragmentos de interés así como la obtención de construcciones útiles para la clonación y expresión de los genes de α -sarcina o sus mutantes.

Las **digestiones enzimáticas** se llevaron a cabo en cada caso empleando un tampón adecuado en el cual las enzimas pudieran ejercer su acción con una eficacia del 100%, BSA (1mg/ml) y RNasa A (0.5mg/ml). Cuando eran preparativas las digestiones se dejaban toda la noche a 37°C, para asegurar que la reacción era cuantitativa. En los casos en que se utilizaba una baja cantidad de DNA (digestiones analíticas) era suficiente con una hora. Por último la enzima se inactivaba calentando a 65°C la mezcla durante 10 minutos. El rendimiento de las digestiones se determinó por electroforesis en geles de agarosa.

Las **reacciones de ligación** eran llevadas a cabo por la DNA ligasa del bacteriófago T4. La mezcla de ligación contenía, además, el tampón de ligasa y ATP 1mM para favorecer la reacción. El proceso se efectuaba dejando la mezcla a 20°C, o bien a 14°C, durante 1 hora o, toda una noche, respectivamente. Alguna vez se utilizó el sistema de Boehringer "*Rapid DNA ligation Kit*" que permite realizar la ligación en 5

minutos a temperatura ambiente, siguiendo el protocolo de dicho sistema.

2.6.6. Fosforilación de oligonucleótidos mutagénicos

Se siguió un protocolo estándar (Sambrook y col., 1989), basado en la utilización de la polinucleótido quinasa del fago T4. Para ello se incubó en un volumen total de 30µl de Tris 0.1M pH 8.0, MgCl₂ 10mM, DTT 5mM y ATP 0.1mM, 10 unidades de la enzima y el oligonucleótido a una concentración final de 25pmol/ml. La reacción tuvo lugar en un baño de agua a 37°C durante 45 minutos. Por último la enzima se inactivó calentando la mezcla a 65°C durante 10 minutos.

2.6.7. Electroforesis en geles de agarosa

Se prepararon los geles al 0.7% (p/v), de agarosa en TAE. El porcentaje de agarosa dependía del tamaño del DNA que se quería detectar o purificar. Las electroforesis se desarrollaron a 100 V y temperatura ambiente, ó a 80 V y 4°C en el caso de agarosa con bajo punto de fusión (para fragmentos pequeños de DNA, 100-800pb). Las muestras se aplicaron en tampón 6x para este fin, y el patrón de peso molecular fue el correspondiente a la digestión con *HindIII* del fago λ. Para la detección de las bandas con luz UV se utilizó bromuro de etidio, a una concentración final de 0.5 µg/ml.

2.6.8. Purificación del DNA a partir de geles de agarosa

DNA de mayor tamaño (1.5 -10 kb)

Para purificar fragmentos de un tamaño comprendido entre 1.5 y 10 kilobases se utilizó el sistema comercial GENE CLEAN Kit Bio 101 Inc. Tras electroforesis en gel al 0.7% de agarosa, se recortó el bloque que contenía el fragmento deseado, al que se añadieron 3 volúmenes de NaI 3 M. La mezcla se calentó a 55°C, se enfrió y se le añadió el volumen adecuado de “glassmilk” (5 µl por 5 µg, de DNA y 1 µl más por cada 0.5 µg de DNA adicional), resina que presenta afinidad por el DNA, incubándose la mezcla de reacción durante 15 minutos en hielo. Tras centrifugar el sedimento (DNA-glassmilk) se resuspendió y se lavó con 700 µl de su solución de lavado (“new wash”) centrifugando 30”. El lavado se repitió 2 veces. Por último, se añadió un volumen igual al de resina, de TE o de H₂O, y se calentó a 55°C durante 3 minutos, para favorecer la disociación del complejo DNA-glassmilk. Una centrifugación de 30” permite la obtención del DNA libre, que permanece en el sobrenadante purificado. La elución se repitió para aumentar el rendimiento y el grado de pureza se determinó por electroforesis en geles de agarosa.

DNA de menor tamaño (100-1500pb)

Para fragmentos de DNA comprendidos entre 100 y 1500 pb se empleó el método comercial “WIZARD PCR PREPS” partiendo de un gel de agarosa de bajo punto de fusión, al 1%. Tras fundir el bloque de agarosa durante 5 minutos a 55-65°C, se añadió la resina, contenida en este sistema, y se aplicó un protocolo esencialmente igual al descrito para la purificación de los plásmidos.

2.6.9. Purificación del DNA a partir de geles de poliacrilamida al 4% (p/v)

En algún caso se empleó este sistema para aislar fragmentos entre 200 y 10000 pb. Se llevaron a cabo a 100V en geles de acrilamida al 0.4% en TBE. El proceso a seguir, tras la electroforesis, consiste detectar la banda de DNA, tiñendo con azul de metileno al 0.01% (p/v) y recortar la banda de interés. El correspondiente fragmento de acrilamida se traslada a un "tip" estéril, al que se ha fundido la punta y, se le ha colocado un poquito de lana de vidrio. Entonces se le añaden 400µl de H₂O estéril y se trocea. Se cierra con "parafilm" y se deposita en un tubo estéril donde se mantiene agitándose durante 17h a 37°C. Pasado este tiempo, se eluye a través de la lana de vidrio, cortando la punta, y centrifugando. Para precipitar el DNA, se añade 1/10 del volumen de sales LiCl 4M, MgCl₂ 0.1M así como 2.5 vol. y ½ de etanol, dejándolo 20 minutos a -20°C. Se centrifuga 15 minutos a 4°C y se lava con 1 ml de etanol frío al 70%. Se elimina el etanol centrifugando de nuevo 5 minutos y, se deja secando a temperatura ambiente. Por último se disuelve en TE o H₂O.

2.7. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE BACTERIAS

2.7.1. Preparación de células competentes

El protocolo seguido se basó en el método de Hanahan (1983), con una modificación que implica el empleo de RbCl₂. Consistió en inocular en 5 ml de ψBroth una colonia reciente de las células deseadas e, incubarlas a 37°C, con agitación, hasta una DO_{600nm} de 0.3. Las

células, en esta fase de crecimiento temprana, fueron inoculadas de nuevo en 100 ml de medio fresco, creciéndose, esta vez, hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.48. Entonces, fueron sedimentadas por centrifugación a 2500xg y resuspendidas en 30 ml de Tfb₁ frío, manteniéndolas en hielo durante 90 minutos. Este paso se repitió empleando 4 ml de Tfb₂ frío. En este tampón se hicieron alícuotas (a razón de 200 μ l/vial) y se congelaron a $-80^{\circ}C$.

2.7.2. Transformación de células de *E.coli*

Las células competentes se descongelaron y mantuvieron en hielo durante 10 minutos. A continuación se añadió el DNA plasmídico, o la mezcla de ligación deseada (1-100ng de DNA), y se dejaron otros 15 minutos en hielo. Seguidamente la mezcla se sometió a un choque térmico de 4 minutos a $37^{\circ}C$ en baño de agua. Inmediatamente se devolvieron al hielo, enfriándose durante 2 minutos. A continuación se añadieron 4 volúmenes de Ψ Broth, incubándose a $37^{\circ}C$ durante 1 hora, para facilitar la recuperación de la membrana así como la expresión de los genes de resistencia. Finalmente, fueron sembradas en placas de LB, con los antibióticos adecuados, para una selección directa de las células transformadas.

2.7.2. Selección de colonias según el tamaño del plásmido

Esta técnica, (conocida en lenguaje coloquial como “minis de colonias”), parte de la siembra de cada colonia, obtenida de la transformación, en una placa fresca de LB-agar con el antibiótico adecuado, con objeto de aumentar su masa celular (al tratarse de un

ensayo cualitativo no es necesario que en todas se aplique la misma cantidad). Seguidamente se recogió una muestra de cada una con un asa de siembra y se rompieron las células con 40 μ l de tampón de lisis (ver soluciones de uso habitual) (Tris-HCl 1 M pH 7.4-8.0, EDTA 0.5 M, NaOH 10 N, SDS 20% (p/v), después se neutralizaron con 3 μ l de HCl 1 N, y se añadieron 5 μ l de tampón de aplicación 6x. La mezcla se congeló a -80°C durante 15 minutos, lo que hace precipitar el SDS, arrastrando al DNA cromosómico. El sobrenadante, con el DNA plasmídico, obtenido mediante centrifugación a 4°C , es analizado electroforéticamente en geles de agarosa, distinguiéndose los plásmidos sin inserto de los que lo hubiesen incorporado, por su diferente movilidad electroforética.

2.8. TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS

2.8.1. Aislamiento de α -sarcina fúngica fúngica

Las diferentes etapas de la purificación de la α -sarcina fúngica (Lacadena y *col.*, 1994) se basan en las descritas cuando se purificó por primera vez esta proteína (Olson y Goerner, 1965; Olson y *col.*, 1965). Primeramente, el hongo *A. giganteus* MDH 18894, se creció en el medio líquido adecuado (ver apartado “Medios de cultivo”) a 30°C durante 70-90 horas. La producción de α -sarcina se registró midiendo la absorbancia a 280 nm y el pH de las alícuotas del medio de cultivo tomadas a diferentes tiempos, así como mediante su análisis electroforético en geles de poliacrilamida en presencia SDS. La α -sarcina se secretaba al medio extracelular que, una vez separado del

micelio (por filtración en un embudo Büchner con dos capas de papel Whatman 3M), se dializó exhaustivamente frente a fosfato sódico 50mM, pH 7.0. La purificación de la proteína comenzó, entonces, mediante una primera cromatografía de intercambio iónico en una resina de Amberlita IRC-50, seguida de dos cromatografías de penetrabilidad en un Biogel P10 (1.5X120cm, rango de fraccionamiento: 1.5-20 kDa) y Biogel P2 (2x15 cm, rango de fraccionamiento: 100-1800 Da). La Amberlita, con la α -sarcina unida (15ml:5mg de proteína) se lavó con el tampón de retención (fosfato sódico 50mM, pH 7.0) y con el mismo tampón conteniendo NaCl 0.2 M. Posteriormente, se eluyó la proteína conteniendo NaCl 0.6 M. El conjunto de fracciones que contenían α -sarcina se concentró mediante liofilización, previa diálisis, y se aplicó en una columna de Biogel P10, equilibrada en Tris-HCl 50mM, pH 7.0, NaCl 0.1M. Las fracciones correspondientes a la α -sarcina se recogieron, y liofilizaron, para posteriormente desalarse en el Biogel P2, equilibrado en NH_4HCO_3 50mM, pH 7.0. El rendimiento de la purificación osciló entre (5-50mg/l) de medio de cultivo.

2.8.2. Purificación de formas recombinantes de α -sarcina y mutante

Para la producción de α -sarcina se utilizaron dos vectores de expresión diferentes: pET11b (Rosenberg y *col.*, 1987), y pINPG, una forma modificada de pINIII OmpA (Ghrayeb y *col.*, 1984). Las principales características generales de estos plásmidos se describen en el correspondiente apartado de materiales.

Vector de expresión pINPG α S

El sistema de expresión pINPG α S permitió la obtención de α -sarcina nativa y de sus diferentes formas mutantes. Para ello, en general, se crecieron bacterias RB791 conteniendo dicho plásmido en medio mínimo con ampicilina. La incubación se realizó a 30°C, durante 16 horas tras la inducción de la expresión por adición de IPTG a 2 mM. Este sistema de expresión produce una proteína de fusión formada por el péptido señal de la OmpA y la α -sarcina, secretándose ésta ya madura, al espacio periplásmico (Lacadena y *col.*, 1994). Una vez finalizado el cultivo, las células se sedimentaron por centrifugación de 20 min a 5000xg. Las células resuspendidas en Tris 33mM, EDTA 33 mM, pH 7.0 (5 ml/g de células), se sometieron a choque osmótico mediante una primera incubación con sacarosa al 40% (5ml/g de células) a temperatura ambiente y posterior centrifugación; y una segunda incubación en agua fría. De esta forma se rompía la pared celular, separándose la fracción periplásmica del sedimento celular mediante centrifugación. Por último se lisaron las células mediante sonicación obteniéndose la α -sarcina de la fracción soluble (Lacadena y *col.*, 1994). Recientemente, este método de producción se ha mejorado, mediante la coexpresión de la α -sarcina con tiorredoxina (García-Ortega y *col.*, 2000). Para ellos se utiliza un plásmido denominado pT-Trx, que confiere resistencia a cloranfenicol y sobreproduce tiorredoxina (Yasukawa y *col.*, 1995). Esto se traduce en un entorno redox que permite multiplicar hasta por 5 veces la cantidad de α -sarcina soluble producida (García-Ortega y *col.*, 2000). El protocolo empleado es el mismo, con la única variación de que se utilizan células BL21(DE3), que albergan tanto pINPG α S como pT-Trx, y que se añade, además de la ampicilina, cloranfenicol (34 μ g/ml).

La purificación de la α -sarcina soluble, a partir de las diferentes fracciones obtenidas, se llevó a cabo mediante una primera etapa cromatográfica de intercambio iónico en Amberlita IRC-50, seguida de dos cromatografías de penetrabilidad en Biogel P-10 y P-2, idénticas a las descritas para la purificación de la variedad fúngica. Las fracciones del eluido correspondientes a la a-sarcina se concentraron mediante centrifugación a 4°C, utilizando el sistema Centriprep-10 de Amicon, hasta lograr el volumen adecuado en cada caso. El rendimiento obtenido en la purificación fue de 1.5-2 mg por L de cultivo, y de 8-10 mg/L si se incluye el plásmido pT-Trx (García-Ortega y *col.*, 2000).

Vector de expresión pET11b α S

A partir del vector comercial pETT11b, se construyó el sistema de expresión pET11b α S. Los genes que se clonan en los vectores pET se encuentran bajo el control del promotor del fago T7 (Rosemberg y *col.*, 1987). Así, en ausencia de la RNA polimerasa del fago T7 la transcripción y, por tanto, la expresión de los genes, es prácticamente inexistente. Característica que convierte a estos vectores en sistemas de expresión muy útiles para la producción de proteínas tóxicas, como es el caso de la a-sarcina. Consecuentemente, la manipulación del DNA durante el clonaje en este sistema, se realizó empleando cepas de *E.coli*, como la HB101, que no contienen el gen de la RNA polimerasa del fago T7.

Para la expresión con pET11b α S se utilizó la cepa BL21(DE3), que contiene el gen de la RNA polimerasa T7 bajo el control del promotor lacUV5. De esta forma, la inducción de la expresión se realiza por adición de IPTG, a una concentración final de 0.4 mM, a un cultivo en

LB de células con una OD_{600} en torno a 1.0, e incubación del mismo a 37°C, durante 4 horas. La expresión en células BL21(DE3) conteniendo el vector pET11b α S permite la obtención, al igual que con pINPG α S, de α -sarcina nativa y soluble en la fracción periplásmica. Además, tras el proceso de purificación y caracterización, el rendimiento obtenido es igual al del caso anterior. Sorprendentemente, este sistema no se pudo compatibilizar con la expresión de tiorredoxina (García-Ortega y *col.*, 2000), a pesar de que, en principio, el plásmido pT-Trx fue diseñado para ser coexpresado con los vectores de la serie pET (Yasukawa y *col.*, 1995).

2.8.3. Reducción y carboxiamidometilación de α -sarcina

Los puentes disulfuro de la α -sarcina se redujeron y los grupos tiólicos se carboxiamidometilaron del siguiente modo: Una disolución de α -sarcina (10mg/ml) disuelta en tampón de desnaturizante (Tris-HCl 1.0 M, EDTA 2mM, cloruro de guanidinio 6M, pH 8.0) se mantuvo a 37°C durante 1 hora, tras lo cual se añadió ditioneitol sólido hasta una concentración final de 70 mM (exceso 10 veces molar sobre residuos de cisteína). Tras ser gaseada con nitrógeno, la disolución se mantuvo a 37°C durante 90 minutos. Finalmente, se añadió iodoacetamida sólida hasta una concentración final de 0.7M y se incubó en oscuridad a 37°C durante 60 minutos. La proteína, así tratada, se aisló mediante una cromatografía de penetrabilidad en una columna de Biogel P2 (2x15 cm) equilibrada en (AcH 50 mM, pH 7.0). Las fracciones con proteína se recogieron y se liofilizaron. La extensión de la modificación se verificó mediante hidrólisis ácida de la proteína y posterior análisis de aminoácidos.

2.8.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

La preparación de los geles de poliacrilamida y el desarrollo de la electroforesis se llevó a cabo en un sistema Mini-Protean II de Bio-Rad. La dimensión de cada gel fue de 6 x 9 x 0.07 cm. El porcentaje de acrilamida utilizado en el gel separador fue del 15-20% (acrilamida:bisacrilamida 30:1), en presencia de SDS al 0.1% (p/v). El gel concentrante contenía poliacrilamida al 4% (p/v).

Las muestras se aplicaron desnaturalizadas (15-20 minutos entre 80-90°C en baño de bloques) y, cuando fue oportuno reducidas con β -mercaptoetanol al 0.5% (v/v). La electroforesis se desarrolló a temperatura ambiente empleando tampón tris-glicocola y, manteniendo una intensidad constante de 25mA por gel.

La tinción de los geles se realizó con azul de Coomassie R-250 al 0.255% (p/v) en un sistema metanol-acético-agua en proporción 40:10:40 (v/v/v); la eliminación del exceso de colorante se llevó a cabo con una disolución de metanol-acético-agua 20:10:70 (v/v/v).

2.8.5. Electrotransferencia e inmunodetección

Tras una electroforesis en geles de poliacrilamida, y en presencia de SDS, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Inmobilon, Milipore) mediante un aparato de transferencia LKB (Pharmacia). Su desarrollo se completó al cabo de 1 hora aplicando una corriente de 0.9 mA/por cm² de gel, en tampón de transferencia [Tris 48 mM, Gly 39 mM, SDS 0.0375% (p/v), metanol 20% (v/v)].

Posteriormente la membrana se saturó en (PBS) con leche desnatada en polvo al 3% (p/v) durante 2 horas. A continuación se incubó durante 3 horas con anticuerpos frente a α -sarcina, convenientemente diluidos en PBS-leche en polvo al 0.1% (p/v) (1/30000). Tras un lavado con agua, seguido de otro con PBS-Tween al 0.5% (v/v), la membrana se incubó con un anticuerpo específico para la fracción constante de las IgG de conejo, conjugado con peroxidasa, diluido 1/3000 en PBS-leche al 0.1% (p/v), durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar la membrana, siguiendo el mismo procedimiento antes descrito, se realizó el revelado, por adición de una disolución que contiene tetrahidroclorato de 3-3'-diaminabencimidina (DAB) 0.03% (p/v) y H₂O₂ 0.016% (v/v) en PBS, el cual adquiere color por la reacción enzimática asociada a la peroxidasa. Una vez aparecidas las bandas, la reacción se paró por inmersión de la membrana en agua destilada.

2.8.6. Análisis de aminoácidos

Se llevaron a cabo en un analizador automático Beckman modelo 6300. Las muestras (alrededor de 25 μ g) se hidrolizaron empleando un volumen total de 0.1 ml de HCl 5.7 N, conteniendo fenol al 0.1% (p/v), durante 24 horas a 110°C, en tubos Pyrex cerrados a vacío. Posteriormente, las muestras fueron secadas y, a continuación, se sometieron a dos lavados con 200 μ l de agua destilada. Los hidrolizados secos se disolvieron en 50 μ L de tampón Na-S (Beckman). La muestra se pasó a un tubo cónico de teflón, de 4cm de longitud y 0.3 cm de diámetro, y se centrifugó durante 5 minutos a 10000 rpm, analizándose, posteriormente, un volumen fijo del sobrenadante de cada muestra (entre 10 y 30 μ l). Dicho análisis se efectúa mediante cromatografía de intercambio iónico de la mezcla de aminoácidos, que ha resultado de la

hidrólisis ácida anterior, en las condiciones de funcionamiento estándar del equipo citado. Una reacción colorimétrica, llevada a cabo en régimen de flujo continuo, y empleando ninhidrina, permite la detección y cuantificación de los aminoácidos. El número de nmoles de cada uno de ellos se calcula mediante integración del área del correspondiente pico cromatográfico, empleando como estándar interno una cantidad conocida de nor-leucina.

2.9. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

2.9.1. Espectros de absorción en la región ultravioleta

Los espectros de absorción ultravioleta de α -sarcina se obtuvieron indistintamente en un espectrofotómetro Beckman DU-7 ó Uvikon 930. Se emplearon cubetas de cuarzo de 0.1-1.0 cm de paso óptico (según volumen y concentración de la muestra), a una velocidad de barrido de 300 nm/min. La concentración molar de α -sarcina se determinó a partir de su coeficiente de extinción a 280 nm $E^{0.1\%}$ (280nm, 1 cm)=1.34 (Gavilanes y *col.*, 1983) y su masa molecular de 17KDa. En los mutantes dicho coeficiente hubo de calcularse para cada uno de ellos, a partir de disoluciones de las proteínas purificadas cuya concentración fue evaluada mediante análisis de aminoácidos.

2.9.2. Espectros de dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron con un espectropolarímetro JASCO J-715. Para los espectros registrados en la

región del UV-lejano (195-250 nm) se empleó una cubeta de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico y, la concentración de proteína se encontraba entre 0.1-0.5 mg/ml; en el UV-próximo (250-350 nm) el paso óptico fue de 1cm y la concentración osciló entre 0.5-1.0 mg/ml. Los espectros son el resultado de mediciones cada 0.2 nm, a una velocidad de barrido de 50 nm/min. La temperatura de la muestra se controló mediante un baño de agua circulante Neslab RTE-111. Y los tampones utilizados fueron fosfato sódico 50 mM pH 7.0, NaCl 0.1 M o ácido acético 50 mM pH 5.0, NaCl 0.1 M.

Los resultados se expresan en valores de elipticidad molar por residuo de aminoácido (Θ_{MRW}), en unidades de $\text{grados cm}^2 \text{xdmol}^{-1}$ considerando 113 como masa molecular promedio por residuo para la α -sarcina (Sacco y col., 1983) y para los mutantes. Todos los espectros considerados de este trabajo son el resultado de, al menos, 4 acumulaciones individuales.

El método empleado para evaluar los porcentajes de estructura secundaria a partir de los espectros de dicroísmo circular obtenidos en el UV-lejano fue CCA (*Convex Constrain Analysis*, Perczel y col., 1991 y 1992).

2.9.3. Espectros de fluorescencia

Los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron en un espectrofluorímetro SLM Aminco 8000C, equipado con un arco de Xenon de 450 W. Se empleó un paso óptico de excitación/emisión de 0.2x1 cm. La concentración de proteína se mantuvo alrededor de 0.1 mg/ml, ajustándose el voltaje de los canales del fotomultiplicador para obtener

una señal dentro de los límites aconsejados. Las anchuras de rendija para los haces de excitación y emisión de luz fueron de 4 nm en los dos casos. Los espectros de emisión de proteína se registraron en un intervalo de longitudes de onda comprendido entre 280 - 420 nm, y 300 - 420 nm, tras excitación a 275 nm y 295 nm, respectivamente. La temperatura de la muestra se mantuvo constante al valor seleccionado (25°C) mediante un baño de agua circulante Polystat (Haber).

En todos los casos la señal de fluorescencia de la muestra se dividió por la señal de emisión del canal de referencia, para compensar posibles variaciones debidas a fluctuaciones en la tensión eléctrica. Cuando el ensayo lo requirió se emplearon polarizadores de calcita Glan-Thompson con una orientación 90°/0° (el correspondiente a excitación se colocó horizontalmente y el de emisión en posición vertical). De esta forma se consigue minimizar la contribución de la dispersión de luz debida a la turbidez de alguna de las preparaciones.

Las unidades porcentuales en que se expresan son arbitrarias, tomando como 100% el valor máximo en el espectro de emisión para la excitación a 275 nm de la proteína no mutada. Todos los espectros fueron corregidos para el factor de respuesta instrumental del aparato y sustraída su línea base correspondiente.

2.9.4. Desnaturalización térmica de proteínas

La desnaturalización térmica de las proteínas se estudió mediante dicroísmo circular, en las regiones del enlace peptídico y de los residuos aromáticos para cada proteína en disolución, y mediante espectroscopía

de fluorescencia, tanto para las proteínas en disolución como para cada una de ellas en presencia de lípidos.

Dicroísmo circular: las curvas de desnaturalización térmica de las diferentes muestras se obtuvieron midiendo de forma continua la variación de la elipticidad a 210nm (en el UV-lejano), y a 292 nm (en el UV-próximo). La temperatura de la cubeta fue controlada mediante un baño Neslab RTE-111 (Newington, NH). El intervalo de temperatura osciló entre 25 y 85°C, siendo la velocidad de barrido de 0.5°C/min.

Espectroscopía de fluorescencia: las medidas se llevaron a cabo registrando los espectros de emisión de fluorescencia, excitando a 275 ó 295 nm, a diferentes temperaturas. Las cubetas fueron termostatzadas mediante un baño de agua circulante Polystat (Huber), en un intervalo comprendido entre 25 y 65°C. Los espectros se registraron aumentando progresivamente la temperatura cada 0.5°C, dejando un periodo de 10 minutos para su estabilización antes de empezar a medir.

La estabilidad de una proteína viene determinada por la variación de energía libre (ΔG) asociada al equilibrio entre el estado nativo (N) y el desnaturalizado (D). Normalmente, la estabilidad conformacional se define como el valor de $\Delta G_{25\text{ }^\circ\text{C}}$. Es por ello que la temperatura a la que se desnaturaliza una proteína no es el único parámetro que determina su estabilidad. No obstante, se puede obtener una valiosa información acerca de la estabilidad de una proteína a partir de sus curvas de desnaturalización térmica, obtenidas mediante medidas de CD o de emisión de fluorescencia, muy especialmente cuando se trata de formas mutadas de una misma molécula. En el caso de las formas mutantes W4F, W51F y W4/51F de la α -sarcina, el

análisis se efectuó a partir de las gráficas de CD, obtenidas con un menor error experimental que las de emisión de fluorescencia. Todos los cálculos posteriores se basan en la aproximación de que la desnaturalización responde a un equilibrio entre dos estados nativo (N) y desnaturalizado (D) $N \leftrightarrow D$. Para el caso de la α -sarcina, esta posibilidad ya ha sido verificada previamente mediante medidas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Gasset y col., 1995b) y, previsiblemente, también se cumple para sus mutantes de Trp. Esto no ocurre con la proteína asociada a vesículas lipídicas (Gasset y col., 1995b), por lo que los mencionados cálculos se han efectuado sólo para las proteínas en ausencia de lípidos.

En una desnaturalización entre dos estados se cumple:

$$f_N + f_D = 1 \quad (1)$$

siendo f_N y f_D las fracciones molares de proteína presente en cada uno de los dos estados. Por ello, cualquier variable espectroscópica (y) se puede expresar en función de dichas fracciones:

$$y = f_N y_N + f_D y_D \quad (2)$$

siendo y_N e y_D los valores de dicha variable correspondientes al estado nativo y desnaturalizado, respectivamente. Estos valores se pueden calcular a partir de la correspondiente gráfica de desnaturalización térmica, obtenida como medida de la variación de y con la temperatura (Tabla X). En el caso de la α -sarcina y de sus mutantes de Trp, y fue la elipticidad a 210 nm

La constante del equilibrio de desnaturalización, $K = f_D/f_N$, según las ecuaciones (1) y (2), tiene el valor:

$$K = (y - y_N)/(y_D - y) \quad (3)$$

De donde podemos estimar ΔG , habida cuenta que:

$$\Delta G = -R T \ln K = \Delta H - T \Delta S \quad (4)$$

donde R es la constante de los gases ($R = 1.987 \text{ cal/}^\circ \text{K/mol}$)

De este modo, el análisis de las curvas de desnaturalización térmica, y *versus* T, permite obtener la representación gráfica de ΔG *versus* T. Esta gráfica proporciona con mayor exactitud el valor de T_m , (temperatura media de la transición a la que $f_N = f_D$ y, por tanto, $K = 1$ y $\Delta G = 0$). Además, la pendiente de dicha gráfica a $T = T_m$ es $-\Delta S_m$ ($\text{cal/}^\circ\text{K/mol}$). En efecto, de la ecuación (4) se deduce que a $T = T_m$ se cumple:

$$\Delta G_m = 0 = \Delta H_m - T_m \Delta S_m$$

Los valores de T_m y ΔS_m permiten calcular la variación de entalpía a dicha temperatura:

$$\Delta H_m = T_m \Delta S_m \quad (5)$$

Asimismo, la ecuación de van't Hoff, $d(\ln K)/d(1/T) = -\Delta H/R$, permite calcular el valor de ΔH_m , gracias a la representación gráfica de $\ln K$ *versus* $1/T$. (K calculada según la ecuación (3)). La pendiente de la

curva para $1/T = 1/T_m$ resulta ser de $-\Delta H_m/R$. La coincidencia de los valores de ΔH_m según se determina por un método u otro es una prueba de que la hipótesis de la existencia de un equilibrio entre dos estados es correcta.

Por otro lado, $d(\Delta H)/dT = \Delta C_p = C_p (N) - C_p (D)$, con lo que una representación de ΔH versus T , determinados en diferentes condiciones (por ejemplo, a partir de curvas de desnaturalización obtenidas a distintos valores de pH), proporciona el valor de ΔC_p como su pendiente. De este modo, la estabilidad conformacional de la proteína, ($\Delta G_{25^\circ C}$) resulta ser:

$$\Delta G_{25^\circ C} = \Delta H_m (1 - T/T_m) - \Delta C_p [(T_m - T) + T \ln(T/T_m)] \quad (6)$$

Este cálculo viene afectado de mucho error si se ha hecho uso sólo de curvas de desnaturalización térmica y no de medidas calorimétricas. Sin embargo, el error es pequeño cuando se trata de análisis comparativos, cosa que ocurre al estudiar formas mutantes de una proteína, cual es el caso que se está tratando. Becktel y Schellman (1987) han mostrado que el valor de la variación en estabilidad producida por una mutación generada en una proteína se puede aproximar por:

$$\Delta(\Delta G) \approx \Delta H_m \Delta T_m/T_m \quad (7)$$

siendo ΔH_m y T_m los valores correspondientes a la forma silvestre y $\Delta T_m = T_m$ (mutante) - T_m (silvestre).

2.9.5. Resonancia Magnética Nuclear de protones

Las muestras para realizar los espectros de Resonancia Magnética Nuclear fueron preparadas mediante disolución, de la proteína liofilizada, en H_2O/D_2O (9/1 v/v) a una concentración aproximada de 0.5 mM, y el pH fue ajustado a 3.7 (no corregido para los efectos del isótopo).

El espectro de RMN fue obtenido en un espectrofotómetro Bruker AMX600 a una T^a de 25°C empleando un pulso de secuencias estándar con pre-saturación de la señal de agua. Los ensayos fueron realizados en el Instituto de Química-Física Rocasolano (CSIC) por el equipo de resonancia magnética nuclear de Manuel Rico.

2.10. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

2.10.1. Sobre ribosomas

La actividad ribonucleolítica de la α -sarcina se determinó por la liberación del fragmento α , partiendo de un lisado de reticulocitos de conejo libre de células (Promega), como describen Lamy y Davies (1991). Para ello se trataron 50 μ l de este sustrato con la proteína a ensayar (40-100ng) en tampón Tris-HCl 40mM, KCl 40mM, EDTA 10mM pH 7.5 durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se paró por adición de 250 μ l de Tris-HCl 50 mM pH 7.5, SDS 0.5%

(p/v), incubándose la mezcla 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se extrajo el RNA con fenol saturado en agua, y precipitándolo con alcohol isopropílico. El análisis de RNA se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa al 2.4% (p/v) en Mops 0.2M, acetato sódico 50mM, EDTA 10mM pH 7.0 y formaldehído al 16% (v/v), visualizándolo, mediante tinción con bromuro de etidio, tras la irradiación del gel con luz UV. La cuantificación de las bandas correspondientes, se realizó mediante la integración del volumen de cada una. Para ello se empleó un sistema de fotodocumentación UVI-tech, con el software *UVI-soft UVI-band Windows Application V97.04*.

2.10.2. Sobre poli(A) (zimograma)

La detección *in situ* de la actividad de enzimas previamente separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida, se ha empleado desde hace varias décadas para enzimas muy distintas. Este tipo de ensayos se conocen con el nombre de “zimogramas” pues un sólo ensayo puede servir para analizar, además de la cantidad de enzima presente, su homogeneidad o su posible contaminación por actividades similares, aunque estén presentes en muy pequeña cantidad. Además, se puede usar tanto para extractos biológicos crudos como para las enzimas purificadas.

La actividad ribonucleolítica de la α -sarcina, y la de los mutantes, frente a este sustrato, se estudió mediante el desarrollo de una electroforesis en PAGE-SDS que contenía 0.3 mg/ml de poli(A). La longitud del homopolinucleótido le impide moverse en el gel bajo la acción del campo eléctrico.

Las muestras no se redujeron previamente para que la desnaturalización inducida por el SDS fuera reversible. El umbral de detección se encuentra en 0.1µg de proteína, aplicándose, por ello, entre 0.5 y 1 µg de proteína. Finalizada la electroforesis se procedió a renaturalizar la proteína tratando el gel como se describe en Blank y *col.* (1982): se lavó el gel dos veces con Tris-HCl 10mM, pH7.5 durante 15 minutos, otras dos con isopropanol al 25% y, por último, de nuevo con el tampón inicial. Posteriormente, se incubó el gel durante 2 horas con Tris-HCl 0.1M pH 7.5 a 37°C terminando con un lavado igual a los primeros. La detección se llevó a cabo tiñendo con azul de toluidina al 0.2%, que se une a ácidos nucleicos. La degradación de poli(A) se observó tras sucesivos lavados con agua, pues la hidrólisis de éste impide que la zona del gel conteniendo la enzima activa se tiña de color azul. En este caso, la cuantificación de las bandas del gel, convenientemente desteñido, se llevó a cabo como se describe en el apartado anterior, con la única diferencia de que en este caso se empleó luz blanca para su irradiación.

2.11. INTERACCIÓN CON VESÍCULAS LIPÍDICAS

2.11.1. Formación de vesículas de fosfolípidos

La preparación de vesículas conlleva la hidratación de una película lipídica, obtenida por evaporación a vacío de una disolución del correspondiente lípido en cloroformo/metanol (2:1 v/v). La hidratación se realiza durante 1h, en el tampón seleccionado, a una temperatura superior a la T_m del fosfolípido. En el caso del DMPG esta T_m es de

23°C. La suspensión de lípidos, constituida por vesículas multilamelares, se somete a cinco ciclos sucesivos de extrusión en un Extruder (Lipex Biomembranes, Inc) a través de dos filtros de policarbonato (Nuclepore, Costar) de 100 nm de diámetro de poro. La extrusión se realizó a 37°C y se consiguió aplicando una presión de 200b al aparato. Con esta metodología se obtiene una población de vesículas unilamelares con un diámetro promedio igual al diámetro del poro del filtro (Mayer y col., 1985, 1986; Hope y col., 1985). Para aquellas vesículas que fueron marcadas con antraceno, éste se incorporó a la película lipídica mediante previa mezcla de la disolución del lípido con la sonda disuelta, asimismo, en cloroformo:metanol (2:1v/v). La relación molar antraceno:lípido fue de 1/100, aunque en algunos casos también se empleó 1/200. A partir de aquí el protocolo fue idéntico al descrito anteriormente. En el caso del DPH también se actuó de igual manera, añadiéndose esta sonda fluorescente a una relación 1:100 con respecto a la cantidad de fosfolípido presente.

2.11.2. Ensayos de unión proteína-vesícula

Los estudios de unión de α -sarcina a vesículas lipídicas se llevaron a cabo mediante ultracentrifugación. Las muestras correspondientes a diferentes relaciones molares lípido-proteína (que oscilaron entre 1/10 y 1/130 DMPG/sarcina) se incubaron a 30°C durante 1h en tampón Mops 50mM pH 7.0, NaCl 0.1 M, EDTA 1mM. La concentración de proteína se mantuvo constante en todos los tubos a 18.75 μ g/ml. Como control se utilizó proteína sin lípido. De acuerdo a los análisis electroforéticos, en las condiciones del ensayo, la sedimentación de proteína libre, en ausencia de vesículas, es nula; y no hay indicios de vesículas en el sobrenadante (esto último ya había sido

puesto a punto en su día mediante el uso de fosfolípidos marcados radiactivamente). El complejo lípido-proteína se sometió a un campo centrífugo de 160000xg (90000 rpm) en una AIR-FUGA (Beckman Airfuge) empleando un rotor A-110, durante 60 minutos, a 4°C. Tras la ultracentrifugación se determinó el contenido en proteína del sobrenadante, así como el de fósforo. Para cuantificar la unión de los diferentes muestras se valoró la cantidad de proteína libre que quedaba en suspensión, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y, posterior, cuantificación de las bandas empleando el sistema de fotodocumentación UVI-tech, con el software *UVI-soft UVI-band Windows Application V97.04*.

2.11.3. Valoración de fósforo

Para calcular la concentración de fosfolípido en los ensayos que se describen a continuación se utilizó el método descrito por Barlett (1959), pero introduciendo algunas pequeñas variaciones. El reactivo de Fiske-Subbarow se preparó disolviendo 6.25 mg de ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico (ANSA) y 5g de bisulfito sódico en agua destilada hasta completar 25 ml de disolución. La reacción se basa en la reducción de molibdeno hexavalente del complejo fosfomolibdato amónico, con el reactivo de Fiske-Subbarow para formar un complejo de color azul. El protocolo consiste en añadir 0.3 ml de ácido sulfúrico 10N a la muestra a valorar, dejándola 2 horas a 190-200°C. Posteriormente, y tras dejarla enfriar, se adicionan 3 gotas de H₂O₂ al 30%, agitando y volviendo a dejarla otras 2 horas. Por último, se diluye la muestra con 0.3 ml. de agua destilada y se añaden 0.2 ml. de disolución de molibdato amónico al 5% y 0.2 ml. del reactivo, agitando y

calentando a 80-90°C hasta la aparición de color azul. Se mide la absorbancia a 830nm y los valores resultantes se interpolan en una recta de calibrado obtenida a partir de disoluciones de KH_2PO_4 con cantidades comprendidas entre los 50 y 1000ng.

2.11.4. Ensayos de agregación a vesículas

Se llevaron a cabo midiendo la variación de absorción a 360 nm en función del tiempo de una suspensión de vesículas de DMPG recién preparadas (concentración final de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) tras añadir proteína a diferentes concentraciones (de 0-24 $\mu\text{g}/\text{ml}$), manteniendo el volumen de la mezcla de reacción en 1 ml. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU-640 equipado con portacubetas múltiple termostatizado. En todos los estudios se consideraron controles en ausencia de proteína a una temperatura de 30°C. Los ensayos se realizaron en Mops 50mM (ó Tris 15mM) pH 7.0, NaCl 0.1 M, EDTA 1mM.

2.11.5. Ensayos de mezcla de lípidos

La mezcla de lípidos entre las vesículas se estudió observando la variación de la transferencia de energía de resonancia entre sondas fluorescentes de acuerdo a lo descrito previamente (Struck y *col.*, 1981). Para ello se prepararon vesículas de DMPG conteniendo incorporadas en la membrana las sondas fluorescentes NBD-PE al 1% (que actúa de donador) y Rh-PE al 0.6% (como aceptor). En estas condiciones la densidad superficial de sondas es tal que permite una elevada transferencia de energía por resonancia entre ellas.

En un ensayo típico después de añadir la proteína (5-35 µg/ml final) a una suspensión de vesículas de DMPG (50µg/ml) formada por vesículas marcadas fluorescentemente y sin marcar en una proporción 1:9, se observó el aumento de la emisión de fluorescencia a 530nm tras excitar la muestra a 450nm. Una vez se alcanzó un valor estable en la emisión, se registró un espectro en el intervalo 470-610nm. Estos espectros presentaron dos máximos centrados alrededor de 530nm (debido al NBD-PE) y de 585nm (debido a la Rh-PE). La disminución de la densidad superficial de sondas como consecuencia de la fusión con bicapas carentes de ellas se traduce en una disminución lineal de la eficacia de la transferencia de energía entre las sondas. La eficacia de transferencia se definió como:

$$\%RET = (1 - F/F_0) \times 100$$

donde F es la intensidad de fluorescencia a 530 nm de la mezcla, y Fo la de una suspensión de vesículas marcadas sólo con NBD-PE al 0.1% a la misma concentración total de lípido que la empleada en los anteriores ensayos.

Todas las medidas se realizaron en un espectrofluorímetro SLM Aminco 8000, equipado con polarizadores Glan-Thompson.

2.11.6. Medidas de polarización de fluorescencia

Las medidas de polarización de fluorescencia de la sonda 1,6 difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) se llevaron a cabo en un espectrofluorímetro SLM Aminco 8000C, en cubetas de 0.2 cm de paso

óptico de excitación y 1cm. de emisión. Para ello se emplearon polarizadores de calcita Glan-Thompson. Las vesículas fueron marcadas con DPH de acuerdo a Gavilanes y *col.* (1985). La relación DPH/lípido fue de 1/1000. El tampón empleado fue Mops 50mM pH7.0, NaCl 0.1M, EDTA 1mM, siendo la concentración total de lípido de 80µg/ml. Las medidas de emisión de fluorescencia a 425 nm, tras excitar a 365nm, se realizaron previa estabilización de los complejos proteína:lípido a la temperatura seleccionada.

El espectrofluorímetro empleado está equipado con dos fotomultiplicadores que permiten registrar simultáneamente, para cada muestra y temperatura utilizadas la luz polarizada emitida tanto vertical como horizontalmente. Los resultados se expresan en forma de anisotropía de fluorescencia. Los complejos estudiados se formaron inicialmente incubando las vesículas y la correspondiente proteína durante 60 minutos a 30°C.

2.11.7. Ensayos de Transferencia de Energía entre Triptófano y Antraceno

Aprovechando el solapamiento que existe entre el espectro de absorción del triptófano y el espectro de emisión del antraceno, se diseñó un ensayo de transferencia de energía sin radiación. En este caso el espectro de absorción del antraceno solapa con el espectro de emisión del triptófano confiriendo a este por la posibilidad de transferirse energía. Para ello, se incorporó antraceno en la bicapa de vesículas de DMPG, y se realizaron los espectros de emisión de fluorescencia a los correspondientes complejos de proteína-lípido. Dichos complejos se formaron a una relación molar proteína:DMPG de 1:100, mediante

adición de proteína (3 μ M concentración final) a vesículas de DMPG (0.3 mM concentración final de lípido) que contenían antraceno incorporado, a una relación molar 1:100 sonda:DMPG. La mezcla proteína:lípido:sonda se incubó a 30°C durante 1 hora, antes de obtener el espectro de emisión correspondiente. El mismo ensayo se repitió a una temperatura de 55°C. Los espectros se registraron en el intervalo, de longitudes de onda, 300-440 nm, tras excitar la muestra a 295 nm. En todos los ensayos realizados fue registrada la línea base correspondiente a vesículas marcadas con antraceno. La eficiencia de energía de transferencia se definió, de nuevo, como:

$$\%RET = (1 - F/F_0) \times 100$$

en este caso, F es la intensidad de fluorescencia a 340 nm de los complejos proteína:lípido:antraceno y, F₀ el valor medio para los mismos complejos, a esta longitud de onda, en ausencia de antraceno.

Todas las medidas se realizaron en un espectrofluorímetro SLM Aminco 8000 empleando polarizadores de calcita Glan-Thompson (90°/0°), y equipado con un baño de agua circulante Polystat (Haber). Se emplearon cubetas de cuarzo de 0.2 cm de paso óptico de excitación y, 1cm de paso óptico de emisión.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL

3.1.1 Aislamiento y purificación

Todas las proteínas analizadas en este estudio se purificaron a homogeneidad, si bien sus rendimientos fueron muy variados (Tabla IV). Los criterios empleados para evaluar su grado de pureza fueron su comportamiento electroforético en PAGE-SDS, así como su composición de aminoácidos (Tabla V). Esta última fue consistente en todos los casos con las mutaciones planteadas. No es fácil encontrar una explicación razonable para justificar el bajo rendimiento de los aislamientos correspondientes al doble mutante de triptófano (W4/51F), si bien, probablemente esto es debido a su menor estabilidad y al papel crucial de estos residuos en el plegamiento y/o estabilidad de la proteína, como se discutirá más adelante. Este hecho dificultó la realización de algunos de los análisis que requerían grandes cantidades de proteína; en concreto, la mayoría de los experimentos de interacción con vesículas de fosfolípidos.

	<i>Rendimiento</i>
WT	4-8 mg
W4F	1-2 mg
W51F	1-2 mg
W4/51F	< 0.1 mg

Tabla IV Rendimientos obtenidos tras la purificación. Los resultados se expresan en miligramos de proteína por litro de cultivo, de igual forma para α -sarcina (WT) y sus mutantes de triptófano.

aminoácido	WT	W4F	W51F	W4/51F
Asx	21.7	22.0	22.1	22.2
Thr	10.2	10.3	10.3	10.8
Ser	8.2	8.6	8.5	8.7
Glx	9.4	9.6	10.3	9.9
Pro	13.8	12.7	12.6	13.3
Gly	13.5	13.8	13.7	13.9
Ala	5.3	5.4	5.9	5.9
Cys	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Met	0.2	0.2	0.1	0.07
Ile	3.5	3.6	3.9	3.3
Leu	9.4	9.7	9.8	9.6
Tyr	8.3	8.5	8.1	8.0
Phe	6.3	7.6	7.5	8.2
Trp	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
His	8.3	8.9	8.4	8.8
Lys	20.0	20.0	20.0	20.0
Arg	4.0	4.0	4.6	4.0

Tabla V Composición de aminoácidos de las 4 proteínas.
n.d. : aminoácidos no detectables por el método empleado.

3.1.2. Caracterización enzimática

La α -sarcina es una exquisita ribonucleasa, que presenta una alta actividad enzimática, pero muy específica, cuando se utilizan ribosomas como sustrato. Ya se ha comentado cómo a concentraciones nanomolares (15-40nM) produce el fragmento α (Wool, 1984; Endo y col., 1983; Lacadena y col., 1999), al romper un único enlace del rRNA. Sin embargo, también es capaz de degradar completamente RNA, de forma inespecífica, si se emplean mayores concentraciones. En concreto, si se ensayan del orden de 1-5 μ g de proteína en un zimograma frente a poli(A) (veáse el apartado de Métodos) se detecta una banda incolora, tras el correspondiente proceso de tinción-desteñido, producida por la fragmentación de este homopolinucleotido. Esta actividad inespecífica es, obviamente, mucho menor y, tal vez, no tenga significación biológica, pero permite asegurarse de que las proteínas empleadas mantienen las características esenciales de una ribonucleasa y es muy útil para detectar la presencia de otras actividades contaminantes.

Tabla VI Porcentajes de actividad enzimática: específica, frente a ribosomas, e inespecífica, frente a poli-(A). Datos relativos a la proteína silvestre (WT).

	<i>ribosomas</i>	<i>poli-A</i>
WT	100 %	100 %
W4F	100 %	100 %
W51F	50 %	50 %
W4/51F	50 %	50 %

Como se recoge en la Tabla VI, las tres variantes de α -sarcina eran enzimáticamente activas. Producían la inactivación de los ribosomas, originando el fragmento- α de 400 nt a partir del RNA ribosomal 28S. Sin embargo, mientras esta actividad era idéntica para la α -sarcina y el mutante sencillo W4F, en las variantes que afectaban al Trp-51 estaba reducida al 50%. Resultados similares fueron los que se obtuvieron frente al mencionado poli(A). Es decir, en los tres mutantes estudiados se conservaba la actividad enzimática. Este resultado era previsible a la vista del mecanismo catalítico de la enzima y de la geometría y localización de los residuos que constituyen su centro activo. Hasta el momento, se han identificado inequívocamente cuatro de ellos (His50, Arg121, Glu96 e His137) cuya sustitución por Gln anula la capacidad de la α -sarcina para hidrolizar tanto los ribosomas, como poli(A) (Lacadena y *col.*, 1995, 1999; Campos-Olivas y *col.*, 1996b; Pérez-Cañadillas y *col.*, 1998; Masip y *col.*, 2001).

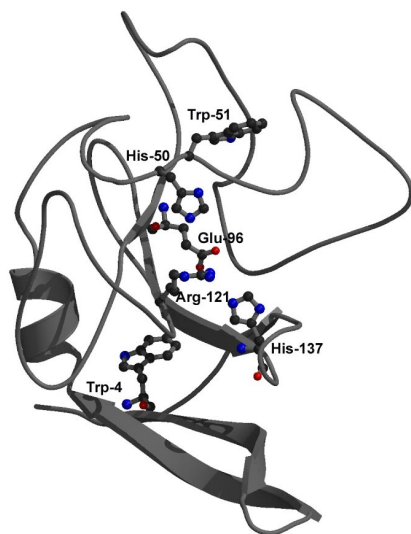


Figura 12 Se muestran los 4 residuos catalíticos que forman el centro activo de α -sarcina, contiguo a uno de ellos se encuentra el Trp-51, se destaca también la cadena lateral del Trp-4 (lámina N-terminal).

En la figura 12, en la que se muestra la disposición de estos residuos catalíticos en la lámina β principal de la α -sarcina, se puede observar cómo el Trp4 se localiza en el extremo amino-terminal, alejado de dicho centro activo, lo que explicaría que su sustitución por Phe no afecte apenas a la actividad enzimática de la α -sarcina. Por el contrario, el Trp-51 sí se halla localizado en las proximidades del centro activo (Campos-Olivas *y col.*, 1996a y b, Pérez-Cañadillas *y col.*, 2000) (fig. 12) y es contiguo a la His50, por lo que la disminución de la actividad específica de las variantes mutadas que implican a este residuo puede ser explicada considerando las perturbaciones locales producidas alrededor de dicho aminoácido catalítico.

3.2. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y ESPECTROSCÓPICA

3.2.1. Espectros de absorción ultravioleta

Los espectros de absorbancia en la región del UV de las tres variantes de triptófano fueron coherentes con las sustituciones realizadas, como se puede apreciar en la figura 13. Los valores que experimentalmente se determinaron para $E^{0.1\%}$ a 280 nm y aquellos predichos, coincidían con una diferencia de un 5%, excepto para la variante W4/51F, donde la diferencia era significativamente mayor (13%) (Tabla VII). Esto no resulta sorprendente si se considera que la estimación de los coeficientes de extinción con el método empleado es menos exacta para proteínas carentes de residuos de triptófano (Pace *y col.*, 1995).

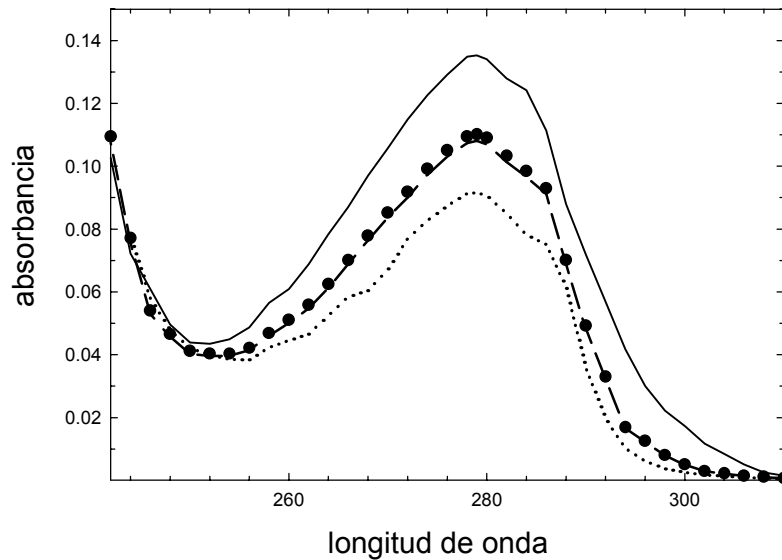


Figura 13 Espectros de absorbancia de α -sarcosina (—), W4F (●), W51F (---) y W4/51F (···) a una concentración de 0.1mg/ml.

<i>Coefficientes de extinción</i>	<i>Wild-type</i>	<i>W4F</i>	<i>W51F</i>	<i>W4/51F</i>
$E^{0.1\%}$ teórico	1.32	1.03	1.03	0.73
$E^{0.1\%}$ experimental	1.34	1.07	1.09	0.82

Tabla VII Coeficientes de extinción, a 280nm, real y predichos de las cuatro proteínas estudiadas.

3.2.2. Espectros de dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular de las tres variantes modificadas y de la proteína fúngica silvestre se muestran en la figura 14. En principio cabe esperar que los residuos de fenilalanina no contribuyan de manera significativa a la señal de CD en la región del UV-próximo porque, entre otras cosas, este residuo no absorbe apenas a longitudes de onda superiores a los 275 nm. Por ello, el espectro de los distintos mutantes podía ser utilizado, además de para evaluar el grado de plegamiento de cada uno de ellos, para descomponer la contribución de los triptófanos sustituidos. Sorprendentemente, la sustitución del Trp-4 produjo cambios muy pequeños, tanto en el UV-próximo como en el UV-lejano (fig 14), mientras que la sustitución del Trp-51 dio lugar a variaciones muy pronunciadas. La contribución de cada residuo de Trp fue estimada por sustracción del correspondiente espectro de la proteína con un triptófano mutado del espectro de la proteína fúngica natural (fig. 14). Es notable, asimismo, que la suma de estas contribuciones individuales de ambos triptófanos coincida con el espectro diferencia obtenido tras sustraer la señal del doble mutante W4/51F del correspondiente a la silvestre. Por tanto, dado que las contribuciones a la señal de dicroísmo de otros componentes, diferentes de los propios residuos de triptófano, son coincidentes para las tres variantes, se puede presumir que poseen la misma conformación.

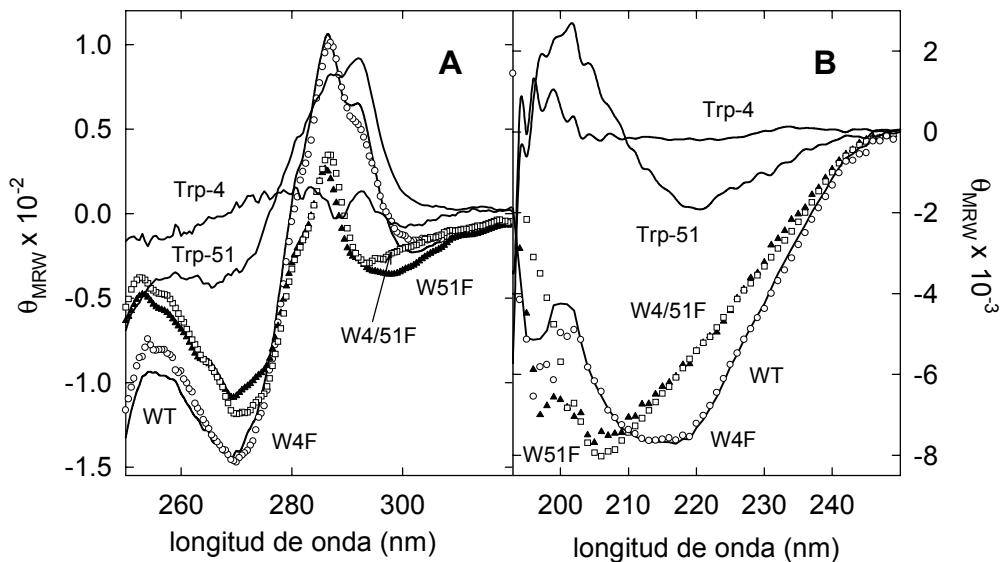


Figura 14 Espectros de dicroísmo circular en el UV-próximo (**A**) y en el lejano (**B**) de los mutantes simples y doble de triptófano, así como de α -sarcosina nativa (WT, del inglés wild-type). Por sustracción de cada espectro simple al de α -sarcosina se han obtenido las contribuciones de cada triptófano al espectro de la proteína nativa, apareciendo indicadas también.

Aparte de lo ya discutido, la conclusión más obvia de estos resultados sería que la contribución del Trp-51 al espectro de dicroísmo circular en el UV-próximo de la proteína nativa es mayor que la del Trp-4. Esto sugiere que la movilidad del Trp-51 se halla muy restringida en un entorno marcadamente anisotrópico. Curiosamente, el Trp-51 se encuentra en la hebra $\beta 3$ (que comprende los residuos 50-52) (Tabla III de la Introducción), localizada en la lámina β central de la proteína, y lo suficientemente próximo a algunos residuos de tirosina como para poder interactuar con ellos (fig. 15). Esta lámina β , además, es la región de menor movilidad dinámica, como se infiere de los estudios de

relajación de RMN-¹⁵N (Campos-Olivas y *col.*, 1996 a y b; Pérez-Cañadillas y *col.*, 2000). El Trp-4, sin embargo, se halla en la hebra β 1 (posiciones 2-12) (Tabla III de la Introducción) relativamente lejos de cualquier residuo de tirosina (Pérez-Cañadillas y *col.*, 2000) (fig. 15).

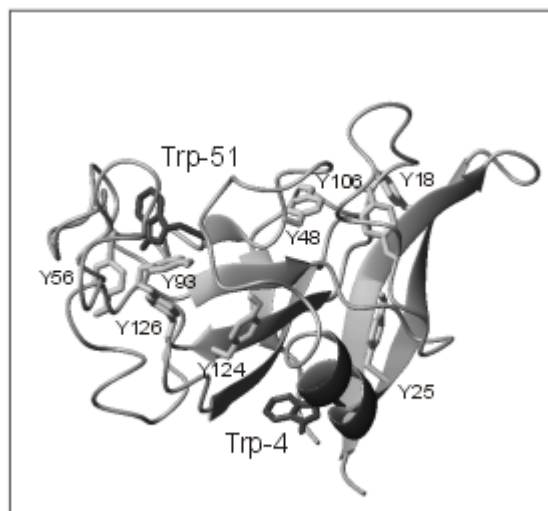


Figura 15 Se indican los dos triptófanos y las 8 tirosinas que contiene α -sarcina. Figura realizada en el programa MOLMOL (Koradi 1996).

Todo ello concordaría con el hecho de que el Trp-51 se encuentra en un entorno mucho más rígido y asimétrico que el Trp-4 y, también, con la interpretación de los espectros de fluorescencia que se discuten más adelante. Se debe también destacar cómo la contribución de ambos triptófanos en la región del UV-próximo muestra bandas positivas a longitudes de onda mayores de 280nm, transiciones correspondientes a Lb, y contribuciones negativas entre 250-280 nm, que se deberían a transiciones La. Estas últimas transiciones están caracterizadas por bandas más anchas, que normalmente no muestran

ninguna estructura vibracional. Este comportamiento difiere del que se habría esperado a la vista de que, mediante cálculos teóricos, se ha predicho que los Trp muestran una preferencia por bandas positivas para las transiciones La (Woody, 1978). De esta manera, las dos bandas presentes alrededor de 285 y 295 nm podrían ser asignadas a los dos componentes vibracionales de la transición 1L_b del triptófano (Havel 1996; Lacowicz, 1999), los cuales pueden ser positivos o negativos, pero no tener un carácter mixto (Perzcel y *col.*, 1992).

Consideraciones similares a las anteriores pueden hacerse con los espectros obtenidos en la región del UV-lejano. Así, mientras la contribución esperada del Trp-4 es despreciable, la del Trp-51 muestra un valor extremo a 220 nm de $-1,900 \text{ grados} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$. Este valor es bastante significativo para un espectro como el de la α -sarcina, que muestra una señal relativamente modesta debido, probablemente, a su bajo contenido en α -hélice. Obviamente, esta contribución debe afectar al cálculo sobre el contenido de estructura secundaria de la proteína. De hecho, la estimación de estructura secundaria (Perzcel y *col.*, 1991) a partir del espectro de la variante W4/51F, que carece de la contribución de los triptófanos, ofrece unos resultados (7% de α -hélice y un 37% de estructura- β) que concuerdan notablemente bien con los calculados a partir de la estructura tridimensional (6.7% y 31.3% de α -hélice y estructura β , respectivamente) (Pérez- Cañadillas y *col.*, 2000). Esto no es así en el caso de la proteína silvestre (Tabla VIII) y ahora se puede afirmar que es debido a la distorsión que introduce la contribución del Trp51.

3.2.3. RMN de protones

Con la intención de descartar cambios conformacionales de carácter no local inducidos por las mutaciones que afectan al Trp-51, y que podrían poner en tela de juicio algunas de las conclusiones anteriores, también se llevó a cabo un análisis estructural cualitativo de la variante W51F, mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). Se eligió este mutante porque su espectro de dicroísmo en el lejano era sensiblemente distinto al de la forma silvestre, como se acaba de discutir. La resonancia magnética nuclear de protones es un método particularmente sensible para el análisis de la conformación de proteínas en solución acuosa (Wütrich, 1986). Es bien conocido que la complejidad del espectro de RMN de proteínas globulares surge principalmente por la dispersión de los desplazamientos químicos dependiente de la conformación de la cadena polipeptídica. Esta dispersión de los desplazamientos químicos es consecuencia de los diferentes entornos en los que un mismo grupo químico de una proteína puede localizarse, dependiendo de su grado de exposición al disolvente y de la presencia de otros grupos en su entorno. Es por ello que el espectro de ^1H RMN de una proteína nativa muestra una significativa dispersión de las señales y un buen número de resonancias bien resueltas que son característicos de una conformación plegada.

En la figura 16 se muestran los espectros de protón de la α -sarcina nativa y del mutante W51F. La comparación de ambos permite asignar fácilmente varios protones en el espectro del mutante W51F. Como ejemplo algunos de ellos aparecen marcados en dicha figura 16. Además, una inspección global del espectro revela, en primer lugar, que la mutación W51F no produce cambios significativos en la

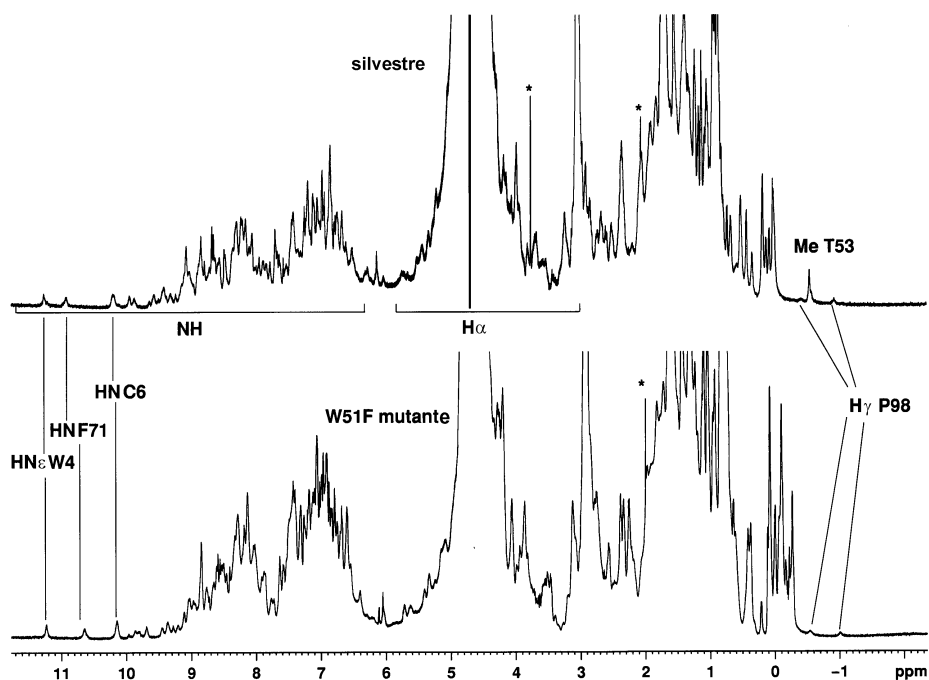


Figura 16 Espectros de Resonancia Magnética Nuclear (^1H RMN) de la α -sarcosina (arriba) y el mutante W51F (abajo) a concentraciones de 1.2mM y 0.5 mM respectivamente. Se indican las regiones correspondientes a los átomos de NH y $\text{H}\alpha$; asimismo algunos picos bien resueltos se han marcado como referencia: $\text{HN}\epsilon$ Trp4, HN Phe71, HN Cys6, $\text{H}\gamma$ y $\text{H}\gamma'$ Pro 98 y $\text{CH}_3\gamma$ Thr 53. Los espectros fueron registrados a 35°C y a pH 3.5.

dispersión de las señales de proteína. Como puede verse, la dispersión de los desplazamientos químicos en distintas regiones del espectro correspondientes a protones HN, alfa y de residuos alifáticos se conserva en el espectro del mutante. Los protones gamma de Pro-98, que tienen valores inusuales de desplazamientos químicos (-0.3 y -0.8 ppm) debido a su proximidad espacial a los anillos aromáticos pertenecientes a Tyr-48 y Phe-97, tampoco se ven afectados. Por otra

parte, teniendo en cuenta la estructura tridimensional de la α -sarcina (Pérez-Cañadillas y *col.*, 2000), queda claro que el grupo metilo de Thr-53 se encuentra muy cerca de la cadena lateral del Trp-51 (fig. 17). Efectivamente, las sustituciones de este triptófano por fenilalanina ocasionan una perturbación en el entorno local de este grupo metilo, produciendo un cambio en su desplazamiento químico (fig. 16).

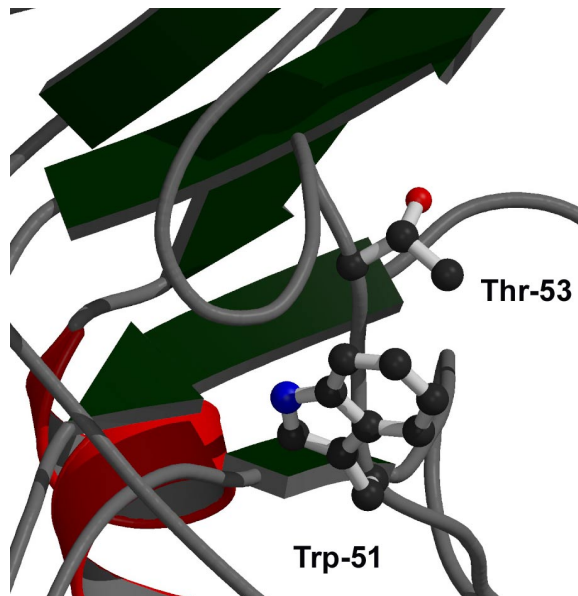


Figura 17 Detalle mostrando la proximidad del **grupo metilo de treonina-53** a la posición 51 de α -sarcina silvestre.

También es conocido que los desplazamientos químicos de protones son extremadamente sensibles a la cercanía de los anillos aromáticos, y que pequeñas variaciones en la orientación relativa de éstos pueden causar cambios dramáticos en los desplazamientos químicos de los protones cercanos. Así pues, el completo acuerdo en los desplazamientos químicos de H γ Pro-98 en la proteína nativa y el mutante W51F, junto con los cambios esperados en la posición del grupo metilo de Thr-53, son buenos indicadores de la preservación de

la estructura tridimensional de la proteína mutante. Por último, la similitud entre los desplazamientos químicos de los protones NH de las diferentes zonas de la estructura de la proteína (Cys-6 y Phe-71) también corroboran la coincidencia estructural entre el mutante y la proteína nativa. Considerando estos resultados, se puede asumir que la sustitución de Trp-51 por Phe solamente ocasiona cambios locales menores en el entorno del citado aminoácido.

3.2.4. Desnaturalización térmica

La desnaturalización térmica de las variantes mutadas fue estudiada mediante dicroísmo circular en la región del enlace peptídico. Para ello, se midió la variación de la elipticidad a 210 nm al aumentar gradualmente la temperatura. Se eligió esta longitud de onda porque la proteína nativa y las tres formas mutadas exhibían el mismo valor de elipticidad a esta longitud de onda en condiciones nativas (fig. 14). Como puede verse en la figura 18, en todos los casos se observan transiciones térmicas únicas, lo que, unido al hecho de que todas ellas mostraban un espectro idéntico tras la desnaturalización (fig. 18), facilita notablemente su comparación. Estas curvas de desnaturalización térmica (Pace y *col.*, 1998), permiten además considerar que en los cuatro casos el proceso transcurre según un mecanismo entre dos estados: nativo y desnaturalizado. Por ello, se puede aplicar el tratamiento matemático descrito en el apartado de Métodos para calcular los diferentes parámetros termodinámicos. Los valores de temperatura correspondientes al punto medio de la transición (T_m) aparecen en las Tablas IX y X. El valor correspondiente

a la proteína fúngica natural coincide con el obtenido por calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Gasset y *col.*, 1995b) lo que refuerza la

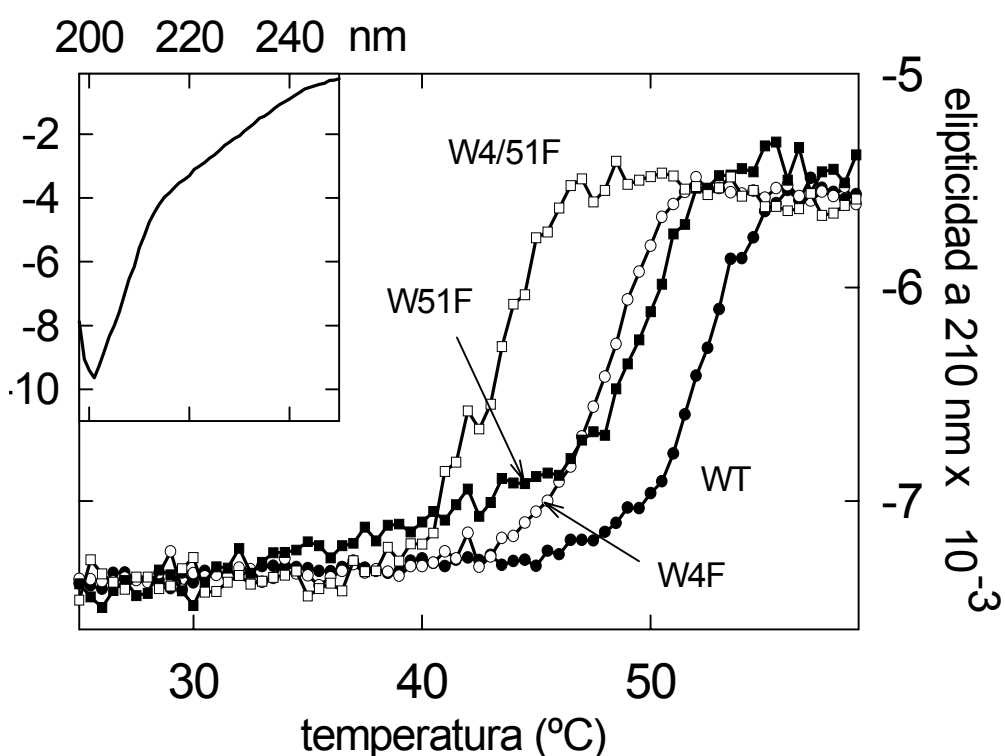


Figura 18 Curvas de desnaturalización térmica de la proteína α -sarcina (WT) (\bullet) y de sus 3 mutantes de Trp: W4F (\circ), W51F (\blacksquare) y W4/51F (\square). Los valores de elipticidad fueron registrados de forma continua a 210nm. La figura insertada muestra el espectro de dicroísmo circular en el UV-lejano de las proteínas desnaturalizadas térmicamente (a 65 $^{\circ}\text{C}$); las 4 proteínas mostraban idéntico espectro.

confianza en la validez de estos resultados. Estos valores coinciden, asimismo con aquellos que se obtuvieron mediante medidas de espectroscopía de fluorescencia, como se discute más adelante. La principal conclusión que se puede extraer de este análisis es que todas

las mutaciones suponían un efecto desestabilizador, lo cual no era necesariamente previsible considerando que los residuos de triptófano de la α -sarcina habían sido reemplazados por fenilalanina, precisamente para minimizar dicho efecto desestabilizador de la conformación nativa debido a la sustitución. Así pues, cada cambio de Trp por Phe produjo una disminución de aproximadamente 4°C en el valor de la T_m con respecto a la proteína nativa, y de 9°C en el doble mutante.

	<i>WT</i>	<i>W4F</i>	<i>W51F</i>	<i>W4/51F</i>
DC (libre)	52	48	49	43
F (libre)	51	46	48	<i>nd.</i>
F (unida)	47	35	42	<i>nd.</i>

Tabla IX Valores de temperatura media de desnaturalización (en °C) determinados por (DC) dicroísmo circular y (F) fluorescencia en ausencia y presencia de vesículas de DMPG, a una relación molar prot/lípido de 1:100. La formación de agregados, que, a esa relación prot/lípido, provocan una elevada dispersión en la muestra, impide la medición en presencia de vesículas lipídicas por dicroísmo circular. SD: \pm 1°C y \pm 2°C para CD y medidas de fluorescencia, respectivamente. Los valores obtenidos por DSC para la α -sarcina silvestre, libre y unida a DMPG, fueron 52.6°C y 49.1°C, respectivamente (Gasset y col., 1995b). *nd.*: no determinado.

Los resultados del análisis termodinámico de las curvas de desnaturalización, según se describe en el apartado de Materiales y Métodos, aparecen en la Tabla X. Estos resultados se traducen en

cambios de la entalpía que oscilan entre 140-145 kcal/mol para las proteínas estudiadas y, que también coinciden razonablemente con el valor obtenido para la α -sarcina silvestre (136 kcal/mol) mediante DSC (Gasset y *col.*, 1995). En términos generales se puede concluir que las mutaciones producen un marcado descenso en la estabilidad de la proteína, como se puede apreciar en el descenso del valor de ΔG (Tabla X) y que se traduce en un aumento en el valor de $K_{25^\circ\text{C}}$ de un orden de magnitud para los mutantes simples, pero de tres órdenes para el mutante doble. Por último, es muy importante destacar cómo también desde este punto de vista las mutaciones producen efectos que se pueden considerar independientes. Es decir, dentro de los límites de error de la experimentación empleada, la desestabilización provocada por la mutación doble en términos de $\Delta(\Delta G)$, no es muy diferente del valor obtenido tras la suma de los valores correspondientes a las dos mutaciones individuales.

	T_m ($^\circ\text{C}$)	T_m ($^\circ\text{K}$)	ΔS_m (cal/ $^\circ\text{K}/\text{mol}$)	ΔH_m (kcal/mol)	$\Delta(\Delta G)^a$ (kcal/mol)	$\Delta(\Delta G)^b$ (kcal/mol)
WT	52	325	439	142		
W4F	48	321	436	140	- 1.7	- 1.7
W51F	49	322	448	144	- 1.3	- 1.3
W4/51F	43	316	459	145	- 3.8	- 4.0

Tabla X Variables termodinámicas correspondientes a la desnaturalización de los mutantes de Trp de α -sarcina.

^a Calculados a partir del valor de $\Delta H_{\text{cal}} = 136$ kcal/mol (determinado por DSC; Gasset y *col.*, 1995).

^b Calculados según la ecuación (7).

3.2.5. Emisión de fluorescencia

Los espectros de emisión de fluorescencia de la α -sarcina silvestre y de los mutantes de Trp estudiados en este trabajo se muestran en la figura 19. Este resultado, *a priori*, debería ser especialmente significativo pues el triptófano suele ser el fluoróforo cuya emisión predomina en proteínas. Por ello, se emplearon dos longitudes de onda de excitación diferentes, 275 y 295 nm. Así, tras la correspondiente normalización, este planteamiento permite descomponer la contribución de Tyr y Trp al espectro (fig. 19). De acuerdo con estos espectros, concretamente, de la longitud de onda del máximo de emisión, se puede afirmar que el entorno en el que se localizan dichos residuos de triptófano es relativamente hidrofóbico, lo cual es consistente con los valores de accesibilidad (Pérez-Cañadillas y *col.* 2000) al solvente calculados a partir de la estructura tridimensional de la proteína (8% y 11% para Trp-4 y Trp-51, respectivamente).

El resto de los resultados obtenidos, si bien son explicables a la vista de la estructura tridimensional de la α -sarcina, y de los espectros de dicroísmo ya discutidos en las páginas precedentes, también resultaron relativamente sorprendentes. Lo primero que llama la atención es que la sustitución del Trp-51 por Phe apenas si tiene reflejo sobre el espectro de emisión, mientras que el cambio del Trp-4 por Phe prácticamente anula la fluorescencia. El doble mutante, como era de esperar, no mostraba emisión de fluorescencia cuando se empleaba una longitud de onda de excitación 295 nm. A esta longitud de onda, la emisión de fluorescencia de Phe puede considerarse nula así que todo ello, en su conjunto, era consistente con el hecho de que el Trp-4,

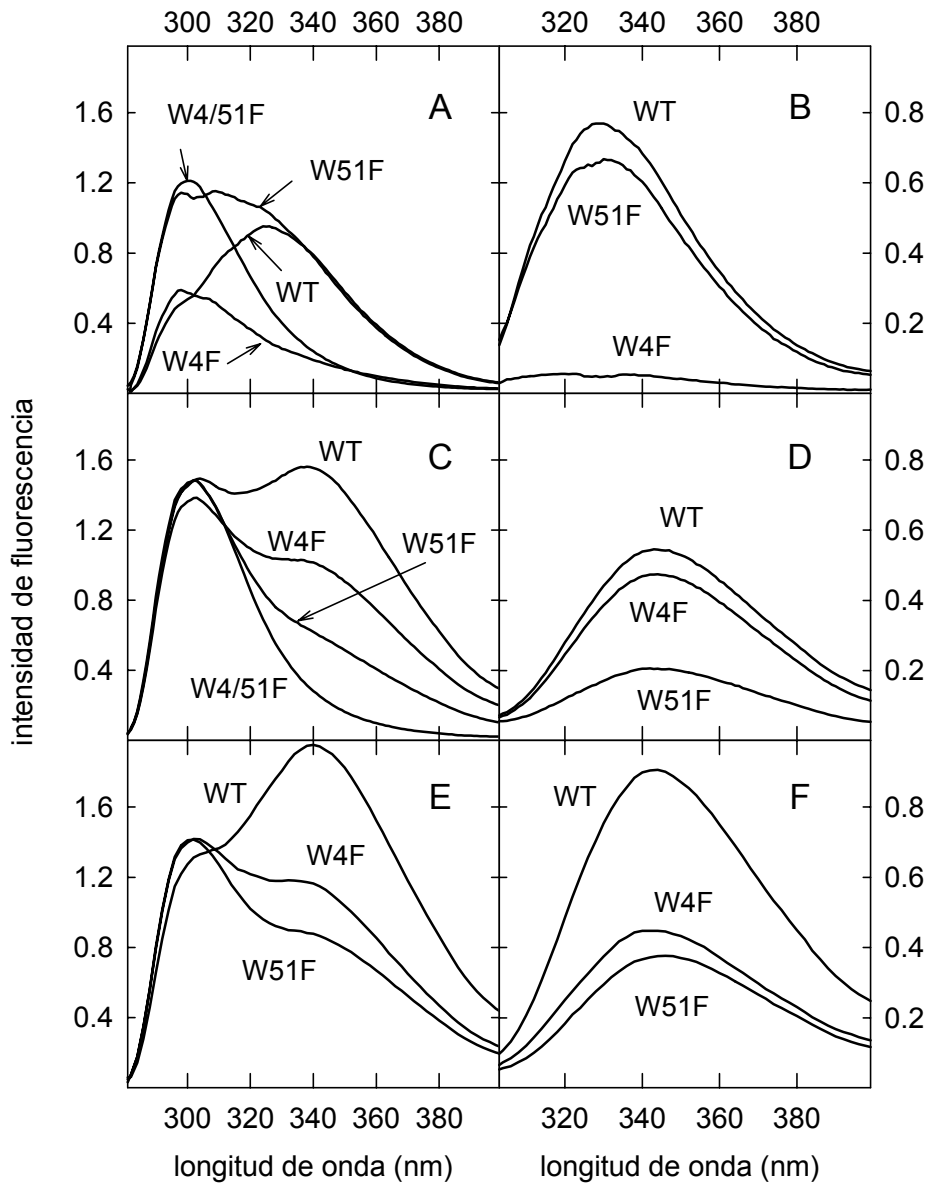


Figura 19 Espectros de emisión de fluorescencia de α -sarcosina (WT) y sus tres variantes de Trp: W4F, W51F y W4/51F. Se emplearon dos longitudes de onda diferentes: 275nm (A, C y E) y 295nm (B, D y F). Los valores de intensidad de fluorescencia están expresados en unidades arbitrarias, siendo los mismos en los 6 paneles mostrados. Espectros de emisión de fluorescencia en condiciones nativas, A y B; en presencia de Urea 6M, C y D; y con los dos puentes disulfuro reducidos carboxiamidometilados, E y F. Todos los espectros fueron realizados a una temperatura de 25°C

precisamente por ser poco accesible al disolvente, no se halle sometido a un alto grado de desactivación no radiativa de carácter colisional.

Asimismo tampoco parece sufrir desactivación estática, lo que indica que las interacciones que pueda establecer con otros residuos de la proteína no tienen una gran influencia sobre su rendimiento cuántico en condiciones nativas. Todo ello concordaría también con que posea un grado de libertad conformacional lo suficientemente grande como para que no se reflejase en el espectro de dicroísmo de UV-próximo. El Trp-51, por el contrario, se encontraría fuertemente apagado, y esencialmente inmóvil, debido a su interacción con otros residuos de la proteína por lo que su rendimiento cuántico es prácticamente nulo y su señal de dicroísmo muy intensa. Al observar la estructura tridimensional de la α -sarcina se puede apreciar que en el estado nativo, las cadenas laterales de Trp51 y His82 se encuentran cercanas y prácticamente apiladas (figuras 9 y 20) (Pérez-Cañadillas y col., 2000). Este apilamiento aromático se encuentra favorecido por la carga positiva del anillo imidazólico, hecho que queda reflejado en un elevado pKa de His-82 (pKa=7.3) (Pérez-Cañadillas y col., 1998). Por todo ello, se propone la existencia de una interacción catión- π , que aparece con bastante frecuencia como un elemento estabilizador de la conformación de las proteínas (Ma y Dougherty, 1997). El orbital π de las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos da lugar a la existencia de dos zonas de elevada densidad electrónica por encima y por debajo del anillo aromático, que define regiones de densidad de carga negativa, mientras que el plano definido por los núcleos atómicos del anillo posee una densidad de carga positiva. Gracias a esta distribución electrónica, dichas estructuras aromáticas poseen un momento cuadrupolar

susceptible de interactuar electrostáticamente con otros cuadrupolos, cargas puntuales, dipolos permanentes o, en general, cualquier estructura que posea una distribución de carga no esférica. En las proteínas, este tipo de interacciones suelen implicar las cadenas laterales de aminoácidos aromáticos y grupos NH (Scrutton, y Raines, 1996). La distancia entre el centro del anillo aromático y el grupo NH involucrado suele situarse entre 3.5 y 6.0 Å, y la disposición geométrica que adopta el grupo NH es aproximadamente perpendicular al plano del anillo, para evitar el contacto con la zona de densidad de carga positiva del mismo. Si el grupo NH no está cargado, como ocurre en Asn y Gln, la interacción es mucho más débil y contribuye mucho menos a la estabilidad general de la proteína. En la Barnasa, por ejemplo, la protonación de un residuo de His favorece la interacción con un Trp cercano e incrementa la estabilidad de la proteína alrededor de 1.0 Kcal/mol (Lowenthal y *col.*, 1992). Un caso similar sería el que aquí se discute. La cadena lateral del Trp-51 interactuaría con el imidazol de la His-82 y su sustitución también supondría una importante desestabilización.

En cuanto a la contribución de las tirosinas (cuyo máximo de emisión se encuentra situado alrededor de 300 nm cuando se excita a 275nm), ésta es casi coincidente en la proteína silvestre y en la variante W4F, y mucho menor que la de los mutantes W51F y W4/51F, revelando la posible existencia de transferencia de energía desde alguna de ellas al Trp-51 (fig. 19). En la conformación nativa de la α -sarcina se encuentran más residuos de tirosina próximos al Trp-51, que al Trp-4, (fig. 15). Particularmente, Tyr-93 y Tyr-56 son las cadenas laterales de tirosinas más cercanas al Trp-51, como se pone de manifiesto al constatar que los átomos (C δ 1) de W51F y Tyr-93 se

encuentran separados por 3.6 Å (fig. 20) (Pérez-Cañadillas *y col.*, 2000). Por ello, estos dos residuos de tirosina serían los principales candidatos implicados en la transferencia de energía observada.

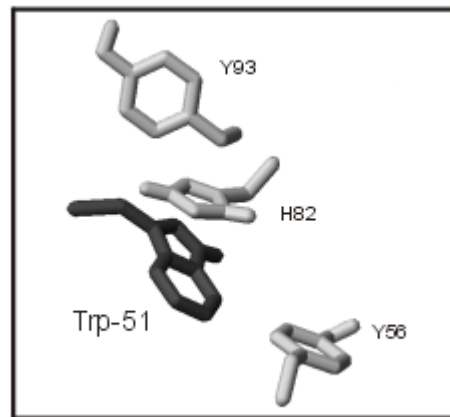


Figura 20 Orientación relativa de las cadenas laterales de tirosinas próximas al Trp-51, así como del anillo imidazol de His-82. Las distancias interatómicas entre éste y el indol del triptófano se mantienen alrededor de los 3.2Å en la estructura de α -sarcina.

La interpretación del espectro de emisión de fluorescencia de proteínas nativas puede resultar difícil debido a las numerosas interacciones locales en las que participan los fluoróforos y que pueden afectar a dicha emisión. Con objeto de conseguir un entorno lo más homogéneo posible para los fluoróforos de la α -sarcina y sus variantes, se llevó a cabo un estudio similar al expuesto anteriormente pero en presencia de urea 6.0 M. En estas condiciones la α -sarcina silvestre se encuentra desnaturalizada y cabría esperar que el entorno de todos los fluoróforos fuese muy parecido.

La curva de desnaturalización por urea de la α -sarcina nativa puede ser explicada en términos de una transición entre dos estados con un punto medio a 4.5 M urea (fig.21), de forma que la proteína

estaría completamente desnaturalizada en presencia de urea 6.0 M. Así pues, el espectro de emisión de la α -sarcina y sus variantes de Trp fueron también registrados en presencia de este agente desnaturalizante. Como era de esperar, la emisión de fluorescencia los residuos de tirosina fue idéntica para las cuatro formas proteicas (fig. 19), lo cual es coherente con la ausencia de procesos de transferencia de energía en el estado desnaturalizado y de la eliminación de las interacciones en las que participan este tipo de residuos en el mantenimiento de la estructura tridimensional. Por otra parte, la emisión de fluorescencia del Trp-51 (fig. 19) se incrementó, lo cual confirmaba la existencia del apagamiento estructural que afecta a este residuo en la conformación nativa y que sería abolido por la desnaturalización de la proteína.

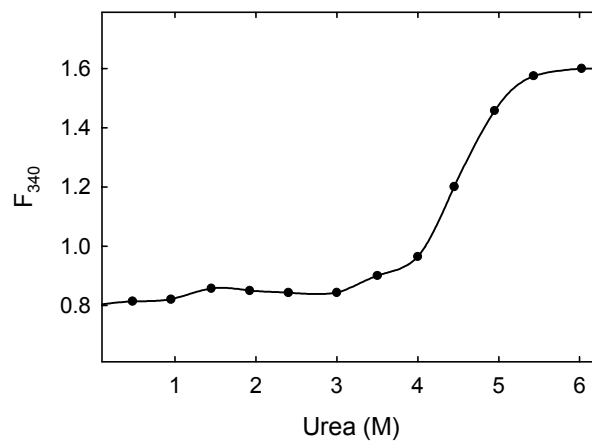


Figura 21 Desnaturalización de α -sarcina en función de la concentración de urea (M) seguida por fluorescencia, excitando a 275nm y registrando la emisión a 340nm.

No es probable que una interacción tipo catión- π se mantenga en el estado desnaturalizado (Ma y Dougherty, 1997). Así que, en definitiva, todos los indicios volvían a apuntar como principal responsable del apagamiento de la emisión del triptófano-51 a la His-82 en la conformación nativa. Sorprendentemente, la contribución a la emisión de fluorescencia del triptófano-4 (mutante W51F) disminuía en presencia de 6.0 M urea (fig. 19). Este residuo de triptófano se encuentra en las proximidades de uno de los dos puentes disulfuro de la α -sarcina, el establecido entre los residuos de cisteína 6 y 148 (fig. 9 de la Introducción) (Campos-Olivas y *col.*, 1996 a y b), con lo que quizás este Trp podría encontrarse afectado por dicho enlace. Para analizar esta posibilidad, la proteína silvestre, así como las variantes W4F y W51F, fueron reducidas y carboxiamidometiladas. Este tratamiento ya había sido realizado con anterioridad con la proteína nativa y proporcionaba un espectro de CD en el UV-lejano que era reflejo de una elevada contribución de estructura desordenada (Gasset y *col.*, 1995). El espectro de emisión de fluorescencia de estas proteínas modificadas químicamente también se muestra en la figura 8R. La contribución de triptófano, esta vez, era prácticamente idéntica para W4F y W51F como era de esperar, pues ambas proteínas contienen un único residuo de este tipo. Ello parecía confirmar la influencia del puente disulfuro al espectro de las proteínas en presencia de 6.0 M urea. La contribución de tirosina (fig. 19) resultaba ser igual que la observada en presencia de 6.0 M urea (fig. 19). Por lo tanto, el mencionado puente disulfuro parece apagar la emisión de fluorescencia del Trp-4 en condiciones desnaturalizantes. Varios casos sobre el apagamiento de la emisión de triptófanos por puentes disulfuro han sido descritos con anterioridad a este trabajo. Como ejemplo se puede citar el incremento observado tras la reducción del disulfuro en el sitio activo

del dominio de tiorredoxina de la proteína DsbA de *E.coli* donde la emisión de fluorescencia del triptófano se triplica, incluso cuando los residuos de triptófano de la proteína no se encuentran en contacto con los puentes disulfuro (Henecke y col., 1997). Por otro lado, el triptófano resulta eficazmente apagado en la tiorredoxina oxidada ya que se ha observado un incremento de 3.5 veces de su fluorescencia en condiciones reductoras, lo que ha sido interpretado como la eliminación del apagamiento de la fluorescencia de triptófano por un puente disulfuro (Holmgren, 1972).

	T_m (°C)	T_m (°K)	ΔS_m (cal/°K/mol)	ΔH_m (kcal/mol)	$\Delta(\Delta G)^a$ (kcal/mol)	$\Delta(\Delta G)^b$ (kcal/mol)
WT	52	325	439	142		
W4F	48	321	436	140	- 1.7	- 1.7
W51F	49	322	448	144	- 1.3	- 1.3
W4/51F	43	316	459	145	- 3.8	- 4.0

Tabla X Variables termodinámicas correspondientes a la desnaturalización de los mutantes de Trp de α -sarcina.

^a Calculados a partir del valor de $\Delta H_{cal} = 136$ kcal/mol (determinado por DSC; Gasset et al., 1995).

^b Calculados según la ecuación (7).

3.3. CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN CON MEMBRANAS

La citotoxicidad de la α -sarcina reside en su actividad ribonucleolítica específica, la cual es ejercida sobre ribosomas una vez que la proteína ha llegado al citosol (Turnay y *col.*, 1993). Este paso crítico de llegar al citosol está directamente relacionado con la habilidad de la α -sarcina para interactuar con los fosfolípidos cargados negativamente, promoviendo la agregación de liposomas ácidos y la fusión de membranas (Gasset y *col.*, 1989; Mancheño y *col.*, 1994a y b y 1995a y b). Estos efectos se traducen en una translocación operativa de la toxina a través de la membrana de vesículas de asolectina en ausencia de agentes permeabilizantes (Oñaderra y *col.*, 1993). Ambas características funcionales, la habilidad para perturbar la membrana y la actividad ribonucleolítica, pueden ser desacopladas pues ha sido probado que un mutante carente de actividad enzimática obtenido por sustitución de His-137 induce los mismos efectos sobre vesículas lipídicas que la proteína nativa (Lacadena y *col.*, 1995), mientras que no es capaz de inducir la muerte celular por apoptosis que produce la α -sarcina fúngica natural (Olmo y *col.*, 2001).

Por ello se llevó a cabo una caracterización de la capacidad de los mutantes individuales (W4F y W51F) para interactuar con vesículas modelo.

3.3.1. Unión a vesículas de DMPG

En primer lugar, se estudió la capacidad de la α -sarcina y sus mutantes individuales de Trp para unirse a vesículas formadas por fosfolípidos ácidos. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de ultracentrifugación de mezclas de proteína:vesículas como se describe en el correspondiente apartado de Métodos. En todos los casos, los resultados fueron idénticos entre sí, y, a su vez, indistinguibles de aquellos obtenidos para la α -sarcina silvestre (fig. 22). Siendo la relación molar de saturación de 100:1 (lípid/proteína).

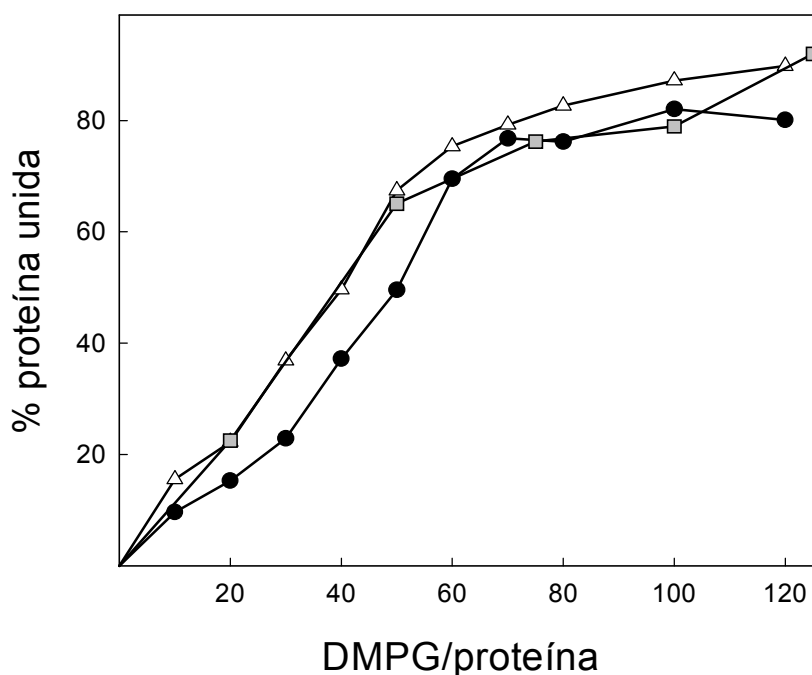


Figura 22 Curvas de unión proteína-vesícula lipídica que muestran el porcentaje de proteína unida (por cuantificación en gel de la proteína libre que queda después de ultracentrifugar), frente a la relación molar DMPG/proteína. (●) α -sarcina, (Δ) W4F y (■) W51F.

3.3.2. Agregación de vesículas

Las variantes W4F y W51F también promovieron la agregación de vesículas compuestas por el fosfolípido ácido DMPG (fig. 23), un proceso que se halla gobernado principalmente por interacciones electrostáticas (Oñaderra y *col.*, 1989; Gasset y *col.*, 1990). Este efecto se analizó midiendo la variación a lo largo del tiempo de la absorbancia aparente a 360 nm de una suspensión de vesículas, tras la adición de diferentes cantidades de proteína. El aumento en esta absorción aparente se debe a la agregación de las vesículas producida por la formación de los complejos lípido-proteína (Gasset y *col.*, 1989 y 1990; Mancheño y *col.*, 1994b). Al igual que en el apartado anterior, se obtuvo la misma curva de titulación, ΔA_{360} versus relación molar proteína/fosfolípido, para las dos variantes sencillas de triptófano y para la α -sarcina silvestre (fig 23).

El análisis de las cinéticas de agregación, y no sólo el valor final de la absorbancia aparente, puede contribuir al esclarecimiento del mecanismo por el cual transcurre la interacción de la proteína con las membranas plasmáticas. Por ejemplo, mientras que la α -sarcina silvestre da lugar a cinéticas de agregación monofásicas, algunos mutantes individuales (García-Ortega y *col.*, 2001) y de delección (García-Ortega y *col.*, 2002) de la horquilla β amino-terminal, producen curvas bifásicas, sin que se altere la estequiometría del complejo, ni la magnitud de la cantidad de luz dispersada una vez alcanzado el estado final. Ello se ha interpretado mediante a la asignación a dicha región de la proteína de un papel determinante a la hora de establecerse las

interacciones proteína-proteína que dan lugar a la agregación de las vesículas (Mancheño y col., 1994b y 1998a y b).

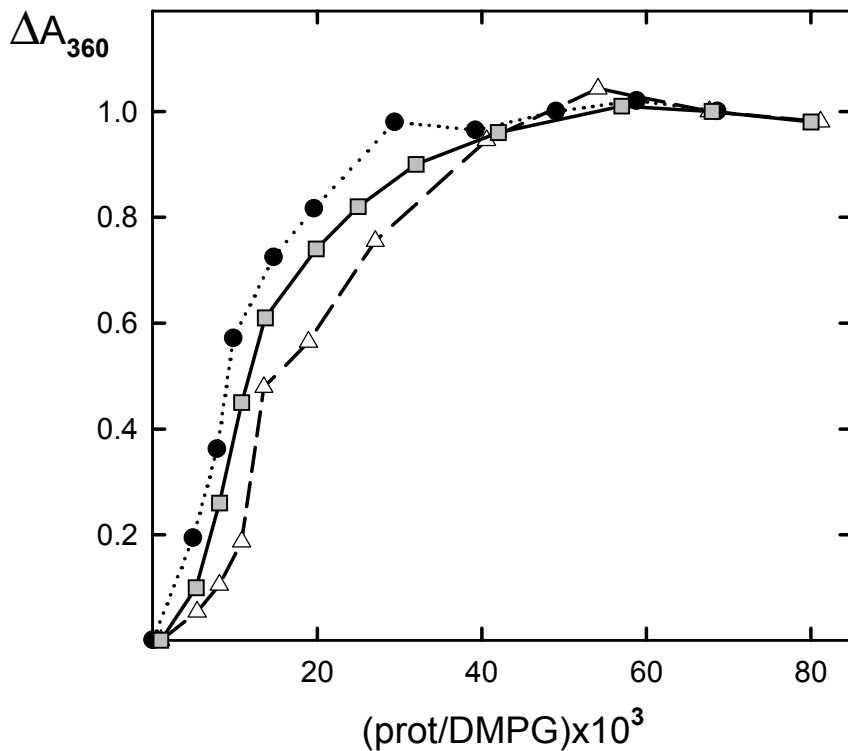


Figura 23 Curvas de variación de absorbancia a 360nm frente a la relación molar de proteína/DMPG. (- Δ -) W4F, (\blacksquare) W51F y (\bullet - \bullet -) WT.

En el caso que nos ocupa, el mutante W51F y la proteína silvestre dieron lugar a cinéticas de la misma naturaleza, mientras que en el caso de la variante W4F se observaron sólo ligeras variaciones. Estas, aunque pequeñas, podían interpretarse de acuerdo con el hecho de que, en definitiva el Trp-4 forma también parte de la horquilla β amino-terminal.

3.3.3. Mezcla de lípidos y comportamiento termotrópico

La desestabilización de la membrana producida por la α -sarcina da lugar, entre otras cosas, a la mezcla de fosfolípidos de distintas bicapas (Gasset y *col.*, 1990, Mancheño y *col.*, 1994b). En este caso, este comportamiento fue analizado utilizando un ensayo de transferencia de energía de resonancia. Así, vesículas que contienen dos sondas fluorescentes, que constituyen un par donador/aceptor, se mezclaron con vesículas carentes de sondas, en una proporción 1:9, respectivamente. Si tiene lugar la mezcla de lípidos entre bicapas marcadas y no marcadas, se produce una disminución de la transferencia de energía de resonancia, debido a la dilución de los pares de sondas donador/aceptor en las membranas fusionadas (Struck y *col.*, 1981). Una vez más, el comportamiento de los mutantes W4F y W51F fue prácticamente indistinguible del correspondiente a la proteína nativa (fig. 24). Por tanto estos resultados sugerían que las variantes W4F y W51F de la α -sarcina no sólo interaccionarían electrostáticamente con los fosfolípidos de igual forma que la proteína silvestre sino que además conservarían también el componente hidrofóbico que contribuye a incrementar su habilidad para perturbar las bicapas lipídicas, tal y como previamente había sido descrito para esta toxina en su versión original (Gasset y *col.*, 1990). Dicho componente hidrofóbico se puede poner de manifiesto estudiando el comportamiento termotrópico de las vesículas, en presencia y ausencia de las distintas proteínas. Para ello, se midió la polarización de la fluorescencia de vesículas marcadas con la sonda DPH en función de la temperatura. De este modo, se vio que las variantes simples volvían a producir las mismas modificaciones que la proteína nativa (Gasset y *col.*, 1995 a y b, 1991). Por ejemplo, las tres proteínas inducían aproximadamente la

misma disminución en la amplitud de la transición de fase, produciendo un pequeño aumento de la temperatura de dicha transición. Este efecto fue interpretado en términos de un cambio en el grado de la movilidad de las cadenas de acilo de los lípidos, lo cual efectivamente sugiere la penetración de la proteína en la zona hidrofóbica de la bicapa (Gasset y *col.*, 1989; Oñaderra y *col.*, 1993). La dependencia de este efecto con la concentración de proteína resultaba asimismo, prácticamente idéntica en los tres casos (fig. 24). A la vista del conjunto de todos estos resultados se concluyó que ambas variantes sencillas de triptófano de la α -sarcina retenían las características moleculares propias de esta proteína para interactuar con bicapas de fosfolípidos, promoviendo los mismos efectos sobre las vesículas de DMPG, que la α -sarcina silvestre.

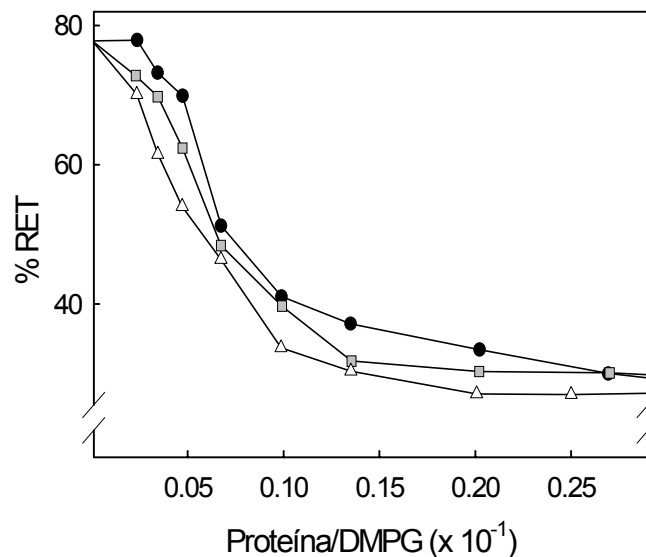


Figura 24 Porcentaje de transferencia de energía de resonancia, por fluorescencia, entre las sondas NBD-PE y Rh-PE en vesículas de DMPG a medida que se eleva la concentración de moléculas de proteína en las vesículas, para (●) α -sarcina (WT), (Δ) W4F y (■) W51F.

3.3.4. Emisión de fluorescencia de proteínas en presencia de vesículas de DMPG

Es de sobra conocido que la emisión de fluorescencia de los residuos de triptófano es altamente sensible a la polaridad del entorno, lo que convierte a este residuo en una herramienta muy útil para registrar la interacción de proteínas con la región hidrofóbica de las membranas (Mcknight *y col.*, 1991; Doring *y col.*, 1995; Ladokhin y Holloway, 1995; Martin *y col.*, 1996; Chen y Barkley, 1998; Yau *y col.*, 1998; Ladokhin, 1999; Clayton y Sawyer, 1999; Killian y von Heijne, 2000). En este sentido, ya había sido demostrado que la emisión de fluorescencia de la α -sarcina se veía modificada por la interacción con vesículas lipídicas (Gasset *y col.*, 1991b) pero no se conocía la contribución individual de cada triptófano. Para llevar a cabo esta descomposición se registraron también los cambios en la emisión de fluorescencia de las variantes W4F y W51F, tras su interacción con vesículas de DMPG. En la figura 16R se puede ver un resumen de los resultados obtenidos.

La emisión del Trp-51 (variante W4F) se incrementó más de 7 veces debido a su interacción con las membranas cuando se utilizaron relaciones molares DMPG/proteína saturantes (100:1), mientras que la del Trp-4 (variante W51F) resultaba sólo ligeramente modificada en idénticas condiciones (fig. 25). Se debe recordar que la cantidad de proteína unida a vesículas era la misma en ambos casos (fig. 22) por lo que los cambios mencionados no se debían a que la capacidad de interacción de ambas proteínas fuese diferente. El incremento de la fluorescencia del Trp-51 era muy similar al observado tras la desnaturalización de la proteína, tanto en presencia de urea 6.0 M,

como tras el proceso de reducción y carboxiamidometilación (fig. 19), y recuérdese que dicho aumento fue interpretado como debido a la pérdida del apilamiento entre los anillos aromáticos del Trp-51 y la His-82 en condiciones desnaturalizantes. Así pues, el incremento de la fluorescencia en presencia de vesículas de fosfolípidos podría ser también interpretado en el mismo sentido; es decir, como un cambio conformacional que afectaría a la interacción entre estos dos residuos, de manera que la His-82 dejaría de afectar a la fluorescencia del Trp-51.

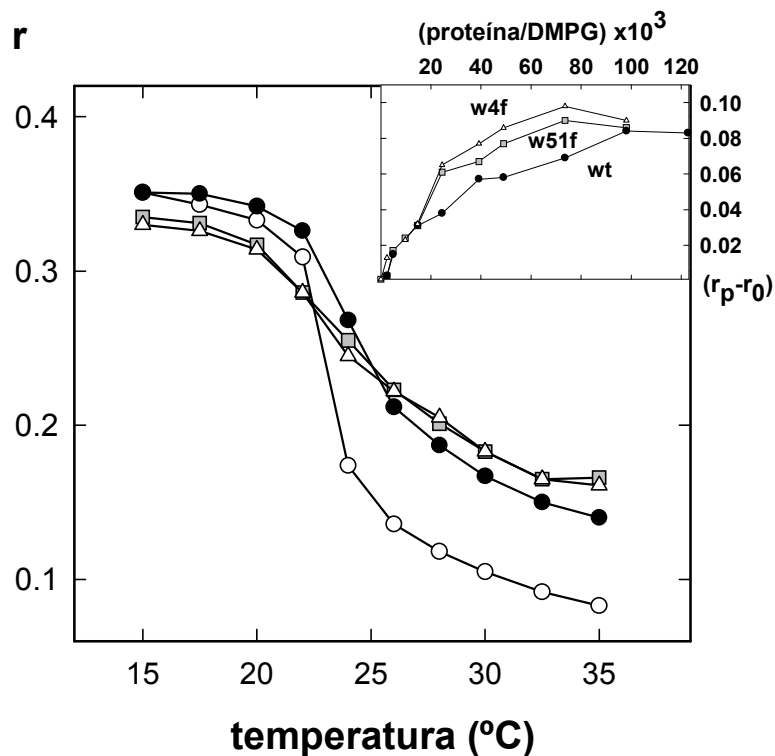


Figura 25 Medidas de variación de la anisotropía, de la sonda DPH, con la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) de las distintas proteínas. (\bullet) α -sarcina, (Δ) W4F, (\blacksquare) W51F y (\circ) control de vesículas de DMPG.

Cuando se realizó este mismo experimento con la proteína silvestre se observó un incremento en la fluorescencia emitida de 1.6 veces en presencia de una concentración de vesículas saturante (fig. 26). El valor absoluto de este incremento coincidía con la suma de los correspondientes al W4F y W51F, lo que sugería que los cambios conformacionales correspondientes a cada variante mutada también tenían lugar en la proteína nativa.

Se ha descrito que la interacción de la α -sarcina con las vesículas se traduce, entre otras cosas en la desestabilización térmica de la proteína (Gasset *y col.*, 1995b). Por este motivo se pensó en llevar a cabo este mismo estudio con las variantes de Trp caracterizadas en este trabajo. Ya se ha demostrado en las páginas anteriores cómo la desnaturalización de estas proteínas puede analizarse mediante el registro de su elipticidad en el UV-lejano en función de un aumento de la temperatura. Este análisis, sin embargo, no se pudo realizar en presencia de lípidos. La agregación de las vesículas, promovida por las proteínas, dio lugar a muestras muy turbias cuyo espectro de dicroísmo circular no se podía registrar con suficiente exactitud.

Por otra parte, la emisión de fluorescencia es una técnica mucho más sensible, que permite trabajar con disoluciones de proteína muy diluidas y, por ello, con unos niveles de turbidez mucho menores. De acuerdo con esta idea, también las medidas de emisión de fluorescencia fueron utilizadas para analizar el efecto de las vesículas de DMPG sobre el proceso de desnaturalización térmica de los mutantes de α -sarcina. Es importante señalar que la temperatura de fusión (T_m) de estas vesículas lipídicas es de 23°C (fig. 25) y, por tanto,

se encuentran en estado fluido a la temperatura a la que se realizaron los ensayos por encima de 30°C. Es decir, los resultados obtenidos no se encuentran afectados por el componente térmico de la transición de fase del lípido.

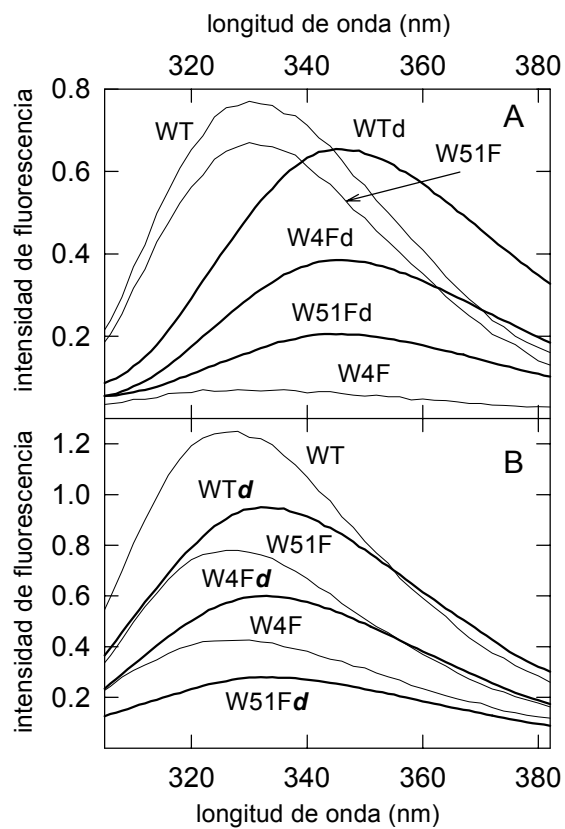


Figura 26 Espectros de emisión de fluorescencia de α -sarcosina (WT), W4F y W51F excitando a una longitud de onda de 295nm. **(A)** en ausencia y **(B)** en presencia de vesículas lipídicas a una relación molar de 100:1 DMPG/PROT. **d**: realizados a 65°C donde todas las proteínas están desnaturalizadas. La intensidad de fluorescencia está expresada en las mismas unidades que la figura 19.

En primer lugar, se analizó el comportamiento de la α -sarcina fúngica natural. En la parte A de la figura 26 se muestra cómo la desnaturalización de la proteína dio lugar a un desplazamiento hacia el rojo de la banda de emisión del Trp, provocado, muy probablemente, por la exposición de estos residuos a un medio más polar, como es el del disolvente. La representación de la relación de intensidades de fluorescencia F_{340}/F_{370} en función de la temperatura es equivalente a representar una curva de desnaturalización. En el caso de la proteína silvestre, la disminución de este valor observada (fig. 27), debida al desplazamiento hacia mayores longitudes de onda del máximo de emisión, se tradujo en una curva de la que se deducía un valor de T_m prácticamente idéntico al obtenido mediante dicroísmo (Tabla X) o calorimetría diferencial de barrido (Gasset y col., 1995b). La coincidencia de ambos resultados confirman la validez del método empleado.

Un resultado equivalente se obtuvo cuando se realizó este mismo experimento con la variante W51F (fig. 27 y Tablas IX y X). Algo más compleja fue la situación del mutante W4F de la α -sarcina. Esta variedad contiene un único triptófano, el 51, que, como se ha discutido anteriormente, se encuentra apagado por su interacción con la cadena lateral de la His-82. Por ello, en este caso la desnaturalización no se traducía tanto en un desplazamiento del espectro, que también tenía lugar (fig. 27), como en un aumento generalizado del rendimiento cuántico, debido a la desaparición de la interacción entre los dos residuos mencionados al desnaturalizarse la proteína. De la inspección de la parte A de la figura 27, se deduce que a la hora de estudiar la desnaturalización térmica de la variante W4F era mucho más exacto

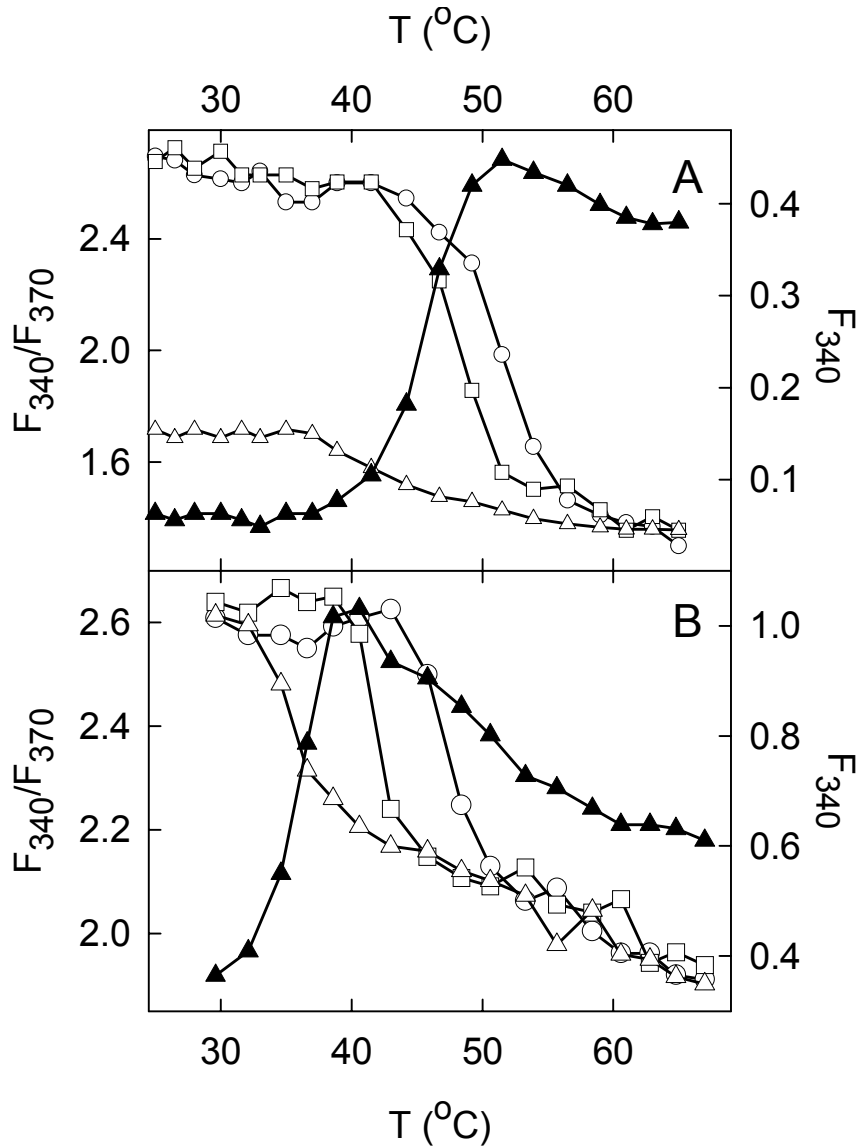


Figura 27 Variación térmica de la relación de intensidades de emisión de fluorescencia F_{340}/F_{370} , excitando a 295 nm, (\circ) α -sarcina wild-type, (\square) W51F y (\triangle)W4F. (\blacktriangle) Intensidad de emisión fluorescencia a 340nm de la variante W4F. Valores obtenidos (A) en ausencia, y (B) en presencia de vesículas lipídicas a una relación molar 100:1 DMPG:proteína. La intensidad de fluorescencia está expresada en las mismas unidades que en la figura 5.

registrar este aumento en la fluorescencia a cualquier longitud de onda cercana al máximo de emisión, que representaría la relación de intensidades a 340 y 370 nm. Esta representación permitió también calcular una T_m equivalente a la deducida mediante el registro de la elipticidad a 210 nm (fig. 27 y Tabla IX).

El espectro de emisión de fluorescencia de las proteínas desnaturalizadas era prácticamente idéntico al observado en presencia de 6.0 M urea (fig. 19) incluyendo el apagamiento del Trp-4, observado en la variante W51F desnaturalizado, y que ha sido asignado a la proximidad del puente disulfuro establecido entre las Cys 6 y 148.

Cuando el mismo tipo de experimentos se realizó en presencia de vesículas de fosfolípidos, se observó que éstas promovían una disminución en los valores de T_m de todas las proteínas estudiadas (fig. 27 y Tabla IX). El análisis mediante calorimetría diferencial de barrido de la desnaturalización de la proteína nativa ya había revelado que esta disminución del valor de T_m está acompañada por una disminución de la entalpía calorimétrica, lo cual evidencia una desestabilización de la ribotoxina tras su interacción con membranas (Gasset y *col.*, 1995b). Aunque, normalmente, las gráficas de desnaturalización pueden ser utilizadas para calcular la constante aparente del equilibrio del proceso de desnaturalización, mediante el cálculo de la fracción de proteína nativa a cada temperatura, (véase el apartado de Métodos), en este caso, dicho planteamiento no es correcto porque el proceso de desnaturalización de la α -sarcina unida a vesículas lipídicas no se ajusta a una transición entre dos estados.

En este sentido, sin embargo, los resultados mostrados en la Tabla IX, a pesar de que sólo están referidos a valores de T_m , pueden ser también interpretados en términos similares. La disminución del valor de la T_m para el mutante W4F es alrededor del doble de la del W51F y α -sarcina nativa, sugiriendo que la desestabilización provocada por las vesículas es mucho más acusada cuando se trata del mutante en que el Trp sustituido ha sido el 4.

Por último, resulta también de utilidad el estudio de los espectros de emisión de fluorescencia en los complejos proteína-DMPG. En todos ellos se observa un desplazamiento del máximo hacia el azul, con respecto a su posición en el caso de la proteína correspondiente en ausencia de fosfolípidos. Ello se debe interpretar como un cambio en el entorno de estos fluoróforos, que pasa a ser todavía más hidrofóbico. Es más, tras la transición térmica desnaturante, existían sólo pequeñas variaciones en la posición del máximo de emisión, como se observa al comparar los espectros a 30°C con aquellos a 65°C (fig. 26), lo que indicaría que las proteínas se mantienen acomplejadas con el lípido, en el mismo entorno, incluso después de la desnaturación.

3.3.5. Apagamiento de la fluorescencia de triptófano por antraceno

Mientras que las propiedades de fluorescencia de un fluoróforo son reflejo de su entorno, la transferencia de energía a un aceptor fluorescente está relacionada con su distancia relativa y orientación. El antraceno es un compuesto hidrofóbico que puede ser incorporado en la región de las cadenas de acilo de la bicapa. Su espectro de

absorción solapa con el espectro de emisión del grupo indol del triptófano permitiendo, de esta forma, la existencia de transferencia de energía entre ambos (Uemura y *col.*, 1983). Dichos análisis ya fueron realizados con α -sarcina salvaje, y en ellos se mostraba cómo la emisión de Trp decrecía en presencia de antraceno incorporado en vesículas, mientras que la emisión de éste compuesto se incrementaba (Mancheño y *col.*, 1994). En el trabajo aquí presentado se han realizado experimentos similares con las variantes sencillas de triptófano (fig. 28).

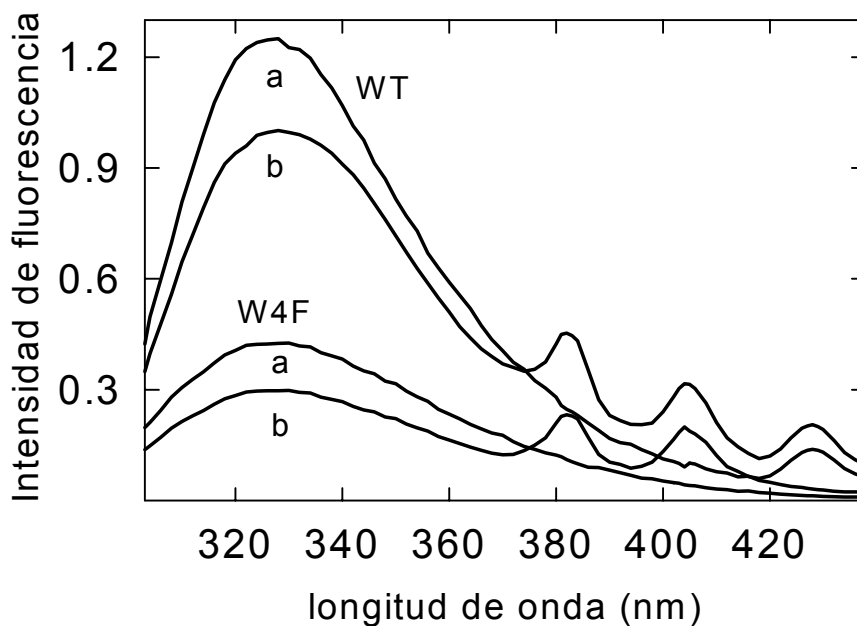


Figura 28 Espectros de emisión de fluorescencia, excitando a 295nm, de α -sarcina (WT) y W4F en presencia de vesículas lipídicas a una relación molar 100:1 DMPG/proteína. (a) en ausencia y (b) en presencia de antraceno (relación molar DMPG/antraceno 100:1). Espectros registrados a 30°C.

Se eligió una temperatura de 30°C, porque era lo suficientemente elevada para que las vesículas de DMPG se encontrasen en estado fluido, pero también lo suficientemente baja como para garantizar que los resultados obtenidos no eran el reflejo de la desnaturalización térmica de las proteínas empleadas. En estas condiciones solamente la variante W4F se comportaba como α -sarcina nativa, de forma que la emisión del Trp-51 era apagada por el antraceno (un 20% para la proteína nativa y un 30% para el mutante W4F). Por el contrario, la emisión del Trp-4 en la variante W51F no se afectó por la presencia de las vesículas con antraceno. Así pues, sólo el Trp-51 exhibiría una adecuada orientación y distancia relativa con respecto al antraceno incorporado en la bicapa. (Este resultado, junto con el hecho de que el Trp-51 fuese el principal responsable de la señal de CD de la proteína en la región del UV-próximo, sugiere que exhibe una movilidad restringida en el interior de la bicapa que hace posible la efectiva transferencia de energía al aceptor). La transferencia de energía es dependiente de la concentración del compuesto aceptor (antraceno, en este caso), pero es independiente de la concentración del donador (triptófano) (Uemura y col., 1983). Si en vez de a igualdad de concentración de proteína, estos experimentos se realizaban a la misma concentración de Trp para cada una de las formas estudiadas se obtenían los mismos resultados. Es preciso destacar que no fue posible disminuir la concentración de proteína hasta los niveles adecuados que permitiesen estudiar las variaciones en la transferencia de energía producida por la distinta concentración del donador debido a razones instrumentales, dado que ya se manejaba una concentración muy baja de proteína para minimizar las interferencias causadas por las vesículas sobre las medidas espectroscópicas.

Cuando la temperatura se incrementó por encima de los 55°C, condiciones en las que todas las proteínas estudiadas se hallaban desnaturalizadas (figuras 26 y 27), ninguna de las variantes resultaba

apagada por antraceno. Así, aunque los espectros de las proteínas desnaturalizadas en presencia de lípidos permiten suponer que en estas condiciones las proteínas se mantienen unidas a las vesículas, el Trp-51 no se hallaría adecuadamente orientado para permitir la transferencia de energía observada a 30°C.

Estas diferencias de comportamiento que se observan entre los triptófanos 4 y 51 deben estar relacionadas con la proximidad de este último al bucle 2 de la proteína (Campos-Olivas y *col.*, 1996a y b, Pérez-Cañadillas y *col.*, 2000), el cual sería un candidato razonable para ser el responsable de la interacción característica de las ribotoxinas con membranas cargadas negativamente. De hecho, este bucle, comprendido entre los residuos 53-93, posee una carga neta positiva y una superficie accesible de más del 50% para las cadenas laterales de sus residuos de lisina y arginina (fig. 29) y se encuentra unido al núcleo de la proteína por el puente disulfuro establecido entre Cys-76 y Cys-132. Este enlace y la extensa longitud de dicho bucle son una exclusiva característica de las ribotoxinas de *Aspergillus* cuando se comparan con otras ribonucleasas microbianas no-citotóxicas, que no son capaces de interaccionar con membranas.

4. CONCLUSIONES

La sustitución por fenilalanina de los dos residuos de Trp de la α -sarcina no modifica apenas las propiedades funcionales de la proteína en términos de actividad enzimática tanto específica como no específica. Además la habilidad de la proteína para interactuar con membranas tampoco se altera a la vista de las medidas de agregación y fusión de membranas, y el efecto de la proteína sobre el comportamiento termotrópico de vesículas de DMPG.

El Trp-51 es el responsable de prácticamente toda la actividad óptica de la α -sarcina en la región del UV-próximo y también contribuye significativamente en el UV-lejano. Esto representa alrededor del 25% del total de elipticidad de la proteína a 220nm lo que impide una precisa estimación del contenido en estructura secundaria del polipéptido a través de las medidas de CD. Este efecto es muy acusado debido al bajo contenido de α -hélice de la proteína. La fluorescencia del aminoácido Trp-51 se encuentra completamente apagada en la conformación nativa, probablemente debido a una interacción de tipo catión- π con el anillo imidazólico del residuo de histidina-82. Estas deducciones son consistentes con el hecho de que este residuo se encuentre en la zona central de la principal lámina- β de la proteína, la cual exhibe la más baja movilidad de la molécula. Por el contrario, Trp-4, el único indol fluorescente de la α -sarcina, no contribuye significativamente al espectro de CD de la proteína. Estas diferentes propiedades de emisión permiten el estudio independiente del entorno local de cada residuo de triptófano.

Los cambios espectrales observados para cada variante mutada Trp→Phe son aditivos indicando que las mutaciones sólo representan modificaciones locales. La variante W4F exhibe un espectro de dicroísmo circular idéntico en la región del enlace peptídico al de α -sarcina silvestre pero se desnaturaliza a una temperatura más baja.

La sustitución de cada triptófano por fenilalanina disminuye 4°C la temperatura media de desnaturalización térmica de α -sarcina (9°C para la variante del doble mutante), revelando un papel crucial de los Trp en la estabilidad de la proteína.

Los dos residuos de Trp ofrecen una baja accesibilidad al solvente (8% y 11% para Trp-4 y Trp-51 respectivamente, datos de la estructura tridimensional), como también se deduce de la longitud de onda del máximo de emisión, indicativo de la relativa hidrofobicidad de sus entornos locales. Sólo el Trp-51 se encuentra implicado en la transferencia de energía a antraceno incorporado en el interior de la bicapa, y la interacción entre este residuo y la His-82 se modifica cuando se halla interaccionando con vesículas. Estos resultados indican que la región alrededor del Trp-51 está localizada en el núcleo de la bicapa después de interaccionar con las vesículas. Puesto que el Trp-4 y el Trp-51 se encuentran alejados en la estructura tridimensional (21Å), esto debe indicar que existe una interacción preferente de la región alrededor del Trp-51 de la α -sarcina.

BIBLIOGRAFÍA

- Argent, R.H., Parrott, A.M., Day, P.J., Roberts, L.M., Stockley, P.G., Lord, J.M. y Radford, S.E. (2000) Ribosome-mediated folding of partially unfolded ricin A-chain. *J. Biol. Chem.* **275**, 9263-9269.
- Arruda, L.K., Platts-Mills, T.A., Fox, J.W. y Chapman, M.D. (1990) *Aspergillus fumigatus* allergen I, a major IgE-binding protein, is a member of the mitogillin family of cytotoxins. *J. Exp. Med.* **172**, 1529-1532.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Capel, M., Moore, P.B. y Steitz, T.A. (1999) Placement of protein and RNA structures into a 5 Å resolution map of the 50S ribosomal subunit. *Nature* **400**, 841-847.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B. y Steitz, T.A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**, 905-920.
- Barlett, G.R. (1959) Colorimetric assay methods for free and phosphorylated glyceric acids. *J. Biol. Chem.* **234**, 466-468.
- Becktel, W.J. y Schellman, J.A. (1987) Protein stability curves. *Biopolymers* **11**, 1859-1877.
- Ben-Tal, N., Honig, B., Miller, C., McLaughlin, S. (1997) Electrostatic binding of proteins to membranes. Theoretical predictions and experimental results with charibdotxin and phospholipid vesicles. *Biophys. J.* **73**, 1717-1727.
- de Benito, F.M., Citores, L., Iglesias, R., Ferreras, J.M., Soriano, F., Arias, J., Mendez, E. y Girbes, T. (1995) Ebulitins: a new family of type 1 ribosome-inactivating proteins (rRNA N-glycosidases) from leaves of *Sambucus ebulus* L. that coexist with the type 2 ribosome-inactivating protein ebulin 1. *FEBS Lett.* **360**, 299-302.
- de Benito, F.M., Citores, L., Iglesias, R., Ferreras, J.M., Camafeita, E., Mendez, E. y Girbes, T. (1997) Isolation and partial characterization of a novel and uncommon two-chain 64-kDa

ribosome-inactivating protein from the bark of elder (*Sambucus nigra* L.). *FEBS Lett.* **413**, 85-91.

- de Benito, F.M., Iglesias, R., Ferreras, J.M., Citores, L., Camafeita, E., Mendez, E. y Girbes, T. (1998) Constitutive and inducible type 1 ribosome-inactivating proteins (RIPs) in elderberry (*Sambucus nigra* L.). *FEBS Lett.* **428**, 75-79.
- Better, M., Bernhard, S.L., Lei, S.P., Fishwild, D. y Carrol, S.F. (1992) Activity of recombinant mitogillin and mitogillin immunoconjugates. *J. Biol. Chem.* **267**, 16712-16718.
- Blank, A., Sugiyama, R.H. y Dekker, C.A. (1982) Activity staining of nucleolytic enzymes after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: use of aqueous isopropanol to remove detergent from gels. *Anal. Biochem.* **120**, 267-275.
- Brandhorst, T. y Kenealy, W.R. (1992) Production and localization of restrictocin in *Aspergillus restrictus*. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 1429-1435.
- Brandhorst, T., Dowd, P.F. y Kenealy, W.R. (1996) The ribosome-inactivating protein restrictocin deters insect feeding on *Aspergillus restrictus*. *Microbiology* **142**, 1551-1556.
- Brandhorst, T., Dowd, P.F. y Kenealy, W.R. (2001) The effect of fungal ribosome inactivating proteins upon feeding choice in *C. freemani*, and indications of a mutualistic relationship with *A. restrictus*. *Environmental mycology. Mycopathologia* **152**, 155-158.
- Brigotti, M., Rambelli, F., Zamboni, M., Montanaro, L. y Sperti, S. (1989) Effect of α -sarcin and ribosome inactivating proteins on the interaction of elongation factors with ribosomes. *Biochem. J.* **257**, 723-727.
- Campbell, M.K. y Ts'o, O.P. (1971) Binding of purine nucleoside monophosphates by ribonuclease T1. A model system for protein nucleic acid interaction. *Biochimica et Biophysica Acta* **232**, 427-435.

- Campos-Olivas, R., Bruix, M., Santoro, J., Martínez del Pozo, A., Lacadena, J., Gavilanes, J.G. y Rico, M. (1996a) ^1H and ^{15}N nuclear magnetic resonance assignment and secondary structure of the cytotoxic ribonuclease α -sarcin. *Protein Sci.* **5**, 969-972.
- Campos-Olivas, R., Bruix, M., Santoro, J., Martínez del Pozo, A., Lacadena, J., Gavilanes, J.G. y Rico, M. (1996b). Structural basis for the catalytic mechanism and substrate specificity of the ribonuclease α -sarcin. *FEBS Lett.* **399**, 163-165.
- Carrasco, L. y Esteban, M. (1982) Modification of membrane permeability in vaccinia virus-infected cells. *Virology* **117**, 62-69.
- Chan, Y.L., Endo, Y. y Wool, I.G. (1983) The sequence of the nucleotide at the α -sarcin cleavage site in 28S ribosomal ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **258**, 12768-12770.
- Chan, Y.L., Sitikov, A.S. y Wool, I.G. (2000) The phenotype of mutations of the base-pair C2658.G2663 that closes the tetraloop in the sarcin/ricin domain of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* **298**, 795-805.
- Chaudhry, B., Muller-Uri, F., Cameron-Mills, V., Gough, S., Simpson, D., Skriver, K. y Mundy, J. (1994) The barley 60 kDa jasmonate-induced protein (JIP60) is a novel ribosome-inactivating protein. *Plant. J.* **6**, 815-824.
- Chen, R., Xu, Y.Z., Wu, J., Pu, Z., Jin, S.W., Liu, W.Y. y Xia, Z.X. (1999) Purification and characterization of trichomaglin--a novel ribosome-inactivating protein with abortifacient activity. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **47**, 185-193.
- Chen, Y. y Barkeley, M.D. Toward understanding Trp fluorescence in proteins. (1998) *Biochemistry* **37**, 9976-9982.
- Chin, K., Sharp, K.A., Honig, B. y Pyle, A.M. (1999) Calculating the electrostatic properties of RNA provides new insights into molecular interactions and function. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 1055-1061.

- Chow, L.P., Chou, M.H., Ho, C.Y., Chuang, C.C., Pan, F.M., Wu, S.H. y Lin, J.Y. (1999) Purification, characterization and molecular cloning of trichoanguin, a novel type I ribosome-inactivating protein from the seeds of *Trichosanthes anguina*. *Biochem. J.* **338**, 211-219.
- Clayton, A.H. y Sawyer, W.H. (1999) Tryptophan rotamer distributions in amphipathic peptides at a lipid surface. *Biophys. J.* **76**, 3235-3242.
- Conde, F.P., Fernández-Puentes, C., Montero, M.T. y Vázquez, D. (1978) Protein toxins that catalytically inactivate ribosomes from eukaryotic microorganisms. Studies of the mode of action of α -sarcin, mitogillin and restrictocin: response to α -sarcin antibodies. *FEMS Microbiol. Lett.* **4**, 349-355.
- Conde FP, Orlandi R, Canevari S, Mezzanzanica D, Ripamonti M, Muñoz SM, Jorge P y Colnaghi MI. (1989) The *Aspergillus* toxin restrictocin is a suitable cytotoxic agent for generation of immunoconjugates with monoclonal antibodies directed against human carcinoma cells. *Eur. J. Biochem.* **178**, 795-802.
- Connor, J., Bucana, C., Fiedler, I.J. y Schiort, A.J. (1989) Differentiation-dependent expression of phosphatidylserine in mammalian plasma membranes: quantitative assessment of outer-leaflet lipid by prothrombinase complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3184-3188.
- Correl, C.C., Munishkin, A., Chan, Y.L., Ren, Z., Wool, I.G. y Steitz, T.A. (1998) Crystal structure of the ribosomal RNA domain essential for binding elongation factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13436-13441.
- Correll, C.C., Wool, I.G. y Munishkin, A. (1999) The two faces of the *Escherichia coli* 23S rRNA sarcin/ricin domain: the structure at 1.11 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **292**, 275-287.
- Dathe, M., Schüman, M., Wieprecht, T., Winkler, A., Beyermann, M., Krause, E., Matsuzaki, K., Murase, O. y Bienert, M. (1996) Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid

bilayers and biological membranes. *Biochemistry* **35**, 12612-12622.

- Dathe, M., Wieprecht, T., Nikolenko, L., Handle, W., Maloy, D.L., MacDonald, D.L., Beyermann, M. y Bienert, M. (1997) Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Lett.* **403**, 208-212.
- Dathe, M. y Wieprecht, T. (1999) Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1462**, 71-87.
- Dente, L. y Cortese, R. (1987) pEMBL: A new family of single stranded plasmid for sequencing DNA. *Methods Enzymol.* **155**, 111-119.
- Denisov, G., Wanaski, S., Luan, P., Glaser, M. y McLaughlin, S. (1998) Binding of basic peptides to membranes produces lateral domains enriched in the acidic lipids phosphatidylserine and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: an electrostatic model and experimental results. *Biophys. J.* **74**, 731-744.
- Devaux, P.F. (1993) Lipid transmembrane asymmetry and "flip-flop" in biological membranes and in lipid bilayers. *Curr. Op. Struct. Biol.* **3**, 489-494.
- Devaux, P.F. y Zachowki, A. (1994) Maintenance and consequences of membrane phospholipid asymmetry. *Chem. Phys. Lipids* **73**, 107-120.
- Doring, K., Konermann, L., Surrey, T. y Jahnig, F. (1995) A long lifetime component in the tryptophan fluorescence of some proteins. *Eur. Biophys. J.* **23**, 423-432.
- Ding, J.P., Koellner, G., Grunert, H.P. y Saenger, W. (1991) Three-dimensional structure of ribonuclease T1 complexed with adenosine 2'-phosphate at 1.8 Å resolution. *J. Biol. Chem.* **266**, 15128-15134.

- Endo, Y. y Wool, I.G. (1982) The site of action of α -sarcin on eukaryotic ribosomes: the sequence at the α -sarcin cleavage-site in 28S ribosomal ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **257**, 9054-9060.
- Endo, Y., Hubert, P.W. y Wool, I.G. (1983) The ribonuclease activity of the cytotoxin α -sarcin: The characteristics of the enzymatic activity of α -sarcin with ribosomes and ribonucleic acids as substrates. *J. Biol. Chem.* **258**, 2662-2667.
- Endo, Y., Mitsui, M., Motizuki, M. y Tsurugi, K. (1987) The mechanism of action of ricin and related toxin lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28S ribosomal RNA caused by the toxins. *J. Biol. Chem.* **262**, 5908-5912.
- Endo, Y. y Tsurugi, K. (1988) The RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. *J. Biol. Chem.* **263**, 8735-8739.
- Endo, Y., Tsurugi, K. y Lambert, J.M. (1988) The site of action of six different ribosome-inactivating proteins from plants on eukaryotic ribosomes: the RNA N-glycosidase activity of the proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**, 1032-1036.
- Endo, Y., Gluck, A., Chan, Y.-L., Tsurugi, K. y Wool, I.G. (1990) RNA-protein interaction: an analysis with RNA oligonucleotides of the recognition by α -sarcin of a ribosomal domain critical for function. *J. Biol. Chem.* **265**, 2216-2222.
- Endo, Y., Gluck, A. y Wool, I.G. (1991) Ribosomal RNA identity elements for ricin A-chain recognition and catalysis. *J. Mol. Biol.* **221**, 193-207.
- Endo, Y., Oka, T. y Natori, Y. (1993a) The biosynthesis of a cytotoxic protein, α -sarcin, in a mold *Aspergillus giganteus*. I. Synthesis of prepro- and pro- α -sarcin in vitro. *Tokushima J. Exp. Med.* **40**, 1-6.
- Endo, Y., Oka, T., Natori, Y. y Yokota, S. (1993b) The biosynthesis of a cytotoxic protein, α -sarcin, in a mold *Aspergillus giganteus*. II. Maturation of precursor form of α -sarcin in vivo. *Tokushima J. Exp. Med.* **40**, 7-12.

- Epand, R.M., Shai, Y., Segrest, J.P. y Anantharamaiah, G.M. (1995) Mechanism for the modulation of membrane bilayer by amphipathic helical peptides. *Biopolymers* **37**, 319-338.
- Epand, R.M. (1998) Lipid Polymorphism and protein-lipid interactions. *Biochimia et Biophysica Acta (BBA)/ Reviews on Biomembranes* **1376**, 353-368.
- Epand, R.M. y Vogel, H.J. (1999) Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimia et Biophysica Acta* **1462**, 11-28.
- Eschenburg, S., Krauspenhaar, R., Mikhailov, A., Stoeva, S., Betzel, C. y Voelter, W. (1998) Primary structure and molecular modeling of mistletoe lectin I from *Viscum album*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 367-372.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L. y Henson, P.M. (1992a) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* **148**, 2207-2216.
- Fadok, V.A., Savill, J.S., Haslett, C., Bratton, D.L., Doherty, D.A., Campbell, P.A. y Henson, P.M. (1992b) Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J. Immunol.* **149**, 4029-4035.
- Falpnès, P.Ø. y Sandvig, K. (2000) Penetration of protein toxins into cells. *Current Opinion in Cell biology* **12**, 407-13.
- Fando, J.L., Alaba, I., Escarmis, C., Fernández-Luna, J.L., Méndez, E. y Salinas, M. (1985) The mode of action of restrictocin and mitogillin on eukaryotic ribosomes. *Eur. J. Biochem.* **149**, 29-34.
- Fernández-Luna, J.L., López-Otín, C., Soriano, F. y Méndez, E. (1985) Complete amino acid sequence of the *Aspergillus* cytotoxin mitogillin. *Biochemistry* **24**, 861-867.
- Fernández-Puentes, C. y Vázquez, D. (1977) Effects of some proteins that inactivate the eukaryotic ribosome. *FEBS Lett.* **78**, 143-146.

- Fernández-Puentes, C. y Carrasco, L. (1980) Viral infection permeabilizes mammalian cells to protein toxins. *Cell* **20**, 769-775.
- Freifelder, D. (1982) *Physical Biochemistry: Applications to Biochemistry and Molecular Biology* 2nd ed. WH Freeman. New York.
- Furutani, M., Kashiwagi, K., Ito, K., Endo, Y. e Igarashi, K. (1992) Comparison of the modes of action of a Vero toxin (a Shiga-like toxin) from *Escherichia coli*, of ricin, and of α -sarcin. *Arch. Biochem. Biophys.* **293**, 140-146.
- Gao, W., Ling, J., Zhong, X., Liu, W., Zhang, R., Yang, H., Cao, H., Zhang, Z. (1994) Luffin-S--a small novel ribosome-inactivating protein from *Luffa cylindrica*. Characterization and mechanism studies. *FEBS Lett.* **347**, 257-260.
- García-Ortega, L., Lacadena, J., Lacadena, V., Masip, M., de Antonio, C., Martínez-Ruiz, A. y Martínez del Pozo, A. (2000) The solubility of the ribotoxin α -sarcin, produced as a recombinant protein in *Escherichia coli*, is significantly increased in the presence of thioredoxin. *Let. Applied Microbiol.* **4**, 298-302.
- García-Ortega, L., Lacadena, J., Mancheño, J.M., Oñaderra, M., Kao, R., Davies, J., Olmo, N., Martínez del Pozo, A.M. y Gavilanes, J.G. (2001) Involvement of the amino-terminal beta-hairpin of the *Aspergillus* ribotoxins on the interaction with membranes and nonspecific ribonuclease activity. *Protein Sci.* **8**, 1658-1668.
- García-Ortega, L., Masip, M., Mancheño, J.M., Oñaderra, M., Lizarbe, M.A., García-Mayoral, M.F., Bruix, M., Martínez Del Pozo, A. y Gavilanes, J.G. (2002) Deletion of the NH₂-terminal beta-hairpin of the ribotoxin α -sarcin produces a non-toxic but active ribonuclease. *J. Biol. Chem.* **277**, 18632-18639.
- Gasset, M., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1989) Study of the interaction between the antitumor protein α -sarcin and phospholipid vesicles. *Biochem. J.* **258**, 569-575.

- Gasset, M., Oñaderra, M., Thomas, P.G. y Gavilanes, J.G. (1990) Fusion of phospholipid vesicles produced by the anti-tumor protein α -sarcin. *Biochem. J.* **265**, 815-822.
- Gasset, M., Oñaderra, M., Martínez del Pozo, A., Schiavo, G.P., Laynez, J., Usobiaga, P. y Gavilanes, J.G. (1991a) Effect of the antitumor protein α -sarcin on the thermotropic behaviour of acid phospholipid vesicles. *Biochimia et Biophysica Acta* **1068**, 9-16.
- Gasset, M., Oñaderra, M., Goormaghtigh, E. y Gavilanes, J.G. (1991b) Acid phospholipid vesicles produce conformational changes on the antitumor protein α -sarcin. *Biochimia et Biophysica Acta* **1080**, 51-58.
- Gasset, M., Mancheño, J.M., Lacadena, J., Turnay, J., Olmo, N., Lizarbe, M.A., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1994) α -Sarcin, a ribosome-inactivating protein that translocates across the membrane of phospholipid vesicles. *Current Topics in Peptide and Protein Research* **1**, 99-104.
- Gasset, M., Mancheño, J.M., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1995a) Spectroscopic characterization of the alkylated α -sarcin cytotoxin: analysis of the structural requirements for the protein-lipid bilayer hydrophobic interaction. *Biochimia et Biophysica Acta* **1252**, 43-52.
- Gasset, M., Mancheño, J.M., Laynez, J., Lacadena, J., Fernández-Ballester, G., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M. y Gavilanes, J. (1995b) Thermal unfolding of the cytotoxin α -sarcin: phospholipid binding induces destabilization of the protein structure. *Biochim Biophys Acta* **1252**, 126-134.
- Gavilanes, J.G., Vázquez, D., Soriano, F. y Méndez, E. (1983) Chemical and spectroscopic evidence on the homology of three antitumor proteins: α -sarcin, mitogillin and restrictocin. *J. Protein Chem.* **2**, 251-261.

- Gavilanes, J.G., Lizarbe, M.A., Municio, A.M. y Oñaderra, M. (1985) Interaction of dipalmitoylphosphatidylcholine with calf thymus histone H1. *Int. J. Pept. Protein Res.* **26**, 187-194.
- Gawlak, S.L., Neubauer, M., Klei, H.E., Chang, C.Y., Einspahr, H.M. y Siegall, C.B. (1997) Molecular, biological, and preliminary structural analysis of recombinant bryodin 1, a ribosome-inactivating protein from the plant *Bryonia dioica*. *Biochemistry* **36**, 3095-3103.
- Ghrayeb, J., Kimura, H., Tanaka, M., Hsiung, H., Masui, Y. e Inouye, M. Secretion cloning vectors in *Escherichia coli* (1984). *EMBO J.* **3**, 2437-2442.
- Girbes, T., Citores, L., Iglesias, R., Ferreras, J.M., Munoz, R., Rojo, M.A., Arias, F.J., Garcia, J.R., Mendez, E. y Calonge, M. (1993) Ebulin 1, a nontoxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from *Sambucus ebulus* L. leaves. *J. Biol. Chem.* **268**, 18195-18199.
- Gluck, A., Endo, Y. y Wool, I.G. (1992) Ribosomal RNA identity elements for ricin A-chain recognition and catalysis. Analysis with tetraloop mutants. *J. Mol. Biol.* **226**, 411-424.
- Glück, A. y Wool, I.G. (1996) Determination of the 28S ribosomal RNA identity element (G4319) for α -sarcin and the relationship of recognition to the selection of the catalytic site. *J. Mol. Biol.* **256**, 838-840.
- Goldin, A., Serpick, A.A. y Mantel, N. (1966) Experimental screening procedures and clinical predictability value. *Cancer Chemotherapy Reports* **50**, 173-218.
- Grauzin, J., Land, R.P., Grunert, H. y Heinemann, U. (1992) RNase T1 mutant Glu46Gln binds the inhibitors 2'-GMP and 2'-AMP at the 3' subsite. *J. Mol. Biol.* **225**, 533-542.
- Grunert, H.P., Zouni, A., Beineke, M., Quaas, R., Georgalis, Y., Saenger, W. y Hahn, U. (1991) Studies on RNase T1 mutants affecting enzyme catalysis. *Eur. J. Biochem.* **197**, 203-207.

- Gutell, R.R. y Fox, G.E. (1988) A compilation of large subunit RNA sequences presented in a structural format. *Nucl. Acids Res.* **16**, 175-269.
- Habuka, N., Murakami, Y., Noma, M., Kudo, T. y Horikoshi, K. (1989) Amino acid sequence of Mirabilis antiviral protein, total synthesis of its gene and expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**, 6629-6637.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Havel, H.A. (1996) Spectroscopic methods for determining protein structure in solution. Edited by Henry A. Havel VCH Publisher Inc. New York
- Hartley, R.W. (1997) Barnase and barstar. En Ribonucleases: structures and functions. D'Alessio G y Riordan JF, eds. *Academic Press*, pp. 51-100.
- Hebert, E.J., Giletto, A., Sevcik, J., Urbanikova, L., Wilson, K.S., Dauter, Z. y Pace, C.N. (1998) Contribution of a conserved asparagine to the conformational stability of ribonucleases Sa, Ba and T1. *Biochemistry* **37**, 16192-16200.
- Heinemann, U., Wernitz, M., Pähler, A., Saenger, W., Menke, G. y Rüterjans, H. (1980) Crystallization of a complex between ribonuclease T1 and guanylic acid. *Eur. J. Biochem.* **109**, 109-114.
- Heinemann, U. y Saenger, W. (1982) Specific protein-nucleic acid recognition in ribonuclease T1-2'-guanylic acid complex an X-ray study. *Nature* (London) **299**, 27-31.
- van Helvoort, A., Smith, A.J., Sprong, H., Fritzsche, I., Schinkel, A.H., Borst, P. y Van Meer, G. (1996) MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* **87**, 507-517.
- Hennecke, J., Sillew, A., Huber-Wunderlich, M., Engelborghs, Y. y Glockshuber, R. (1997) Quenching of tryptophan fluorescence

by the active-site disulfide bridge in the DsbA protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **36**, 6391-6400.

- Hill, C., Dodson, G., Heinemann, U., Saenger, W., Mitsui, Y., Nakamura, K., Borisov, S., Tischenko, G., Polyakov, K. y Pavlovsky, S. (1983) The structural and sequence homology of a family of microbial ribonucleases. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 1-6.
- Hinck, A.P., Markus, M.A., Huang, S., Grzesiek, S., Kustonovich, I., Draper, D.E. y Torchia, D.A. (1997) The RNA binding domain of ribosomal protein L11: Three-dimensional structure of the RNA-bound form of the protein and its interaction with 23S rRNA. *J. Mol. Biol.* **274**, 101-113.
- Hobden, A.N. y Cundliffe, E. (1978) The mode of action of α -sarcin and a novel assay of the puromycin reaction. *Biochem. J.* **170**, 57-61.
- Holmgren, A. (1972) Tryptophan fluorescence study of conformational transitions of the oxidized and reduced form of thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **247**, (1992)-(1998).
- Honig, B. y Nicholls, A. (1995) Classical electrostatics in biology and chemistry. *Science* **268**, 1144-1149.
- Hope, M.J., Bally, M.B., Webb, G. y Cullis, P.R. (1985) Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochimica et Biophysica Acta* **812**, 55-65.
- Hornung, E., Wajant, H., Jeske, H. y Mundry, K.W. (1996) Cloning of a cDNA encoding a new ribosome-inactivating protein from *Beta vulgaris vulgaris* (mangold). *Gene* **170**, 233-236.
- Huang, K.C., Hwang, Y.Y., Hwu, L. y Lin, A. (1997) Characterization of a new ribotoxin gene (c-sar) from *Aspergillus clavatus*. *Toxicon* **35**, 383-392.
- Kao, R. y Davies, J. (1995) Fungal ribotoxins: A family of naturally engineered targeted toxins? *Biochem. Cell Biol.* **73**, 1151-1159.

- Kao, R. y Davies, J. (1999) Molecular dissection of mitogillin reveals that the fungal ribotoxins are a family of natural genetically engineered ribonucleases. *J. Biol. Chem.* **274**, 12576-12582.
- Killian, J.A. y von Heijne, G. (2000) How protein adapt to a membrane-water interface. *Trends In Biological Sciences* **25**: 429-434.
- Koradi, R., Billeter, M. y Wüthrich, K. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphs.* **14**, 51-55.
- Krupakar, J., Swaminathan, C.P., Das, P.K., Surolia, A. y Podder, S.K. (1999) Calorimetric studies on the stability of the ribosome-inactivating protein abrin II: effects of pH and ligand binding. *Biochem. J.* **338**, 273-279.
- Kunkel, T.A., Roberts, J.D. y Zakour, R.A. (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* **154**, 367-382.
- Kuznetsova, I.M. y Turoverov, K.K. (1998) What determines the characteristics of the intrinsic UV-fluorescence of proteins? Analysis of the microenvironment and features of the localization of their tryptophan residues. *Tsitologiya* **40**, 747-762.
- Kraulis, P. (1991) *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946-950.
- Kwon, S.Y., An, C.S., Liu, J.R. y Paek, K.H. (1997) A ribosome-inactivating protein from *Amaranthus viridis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 1613-1614.
- La Rocca, P., Biggin, P.C., Tieleman, D.P. y Sansom, M.S. (1999) Simulation studies of the interaction of antimicrobial peptides and lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* **1462**, 185-200.
- Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Barbero, J.L., Mancheño, J.M., Gasset, M., Oñaderra, M., López-Otín, C., Ortega, S., García, J. y Gavilanes, J.G. (1994) Overproduction and purification of biologically active native fungal α -sarcin in *Escherichia coli*. *Gene* **142**, 147-151.

- Lacadena, J., Mancheño, J.M., Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, A., Gasset, M., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1995) Substitution of histidine-137 by glutamine abolishes the catalytic activity of the ribosome-inactivating protein α -sarcin. *Biochem. J.* **309**, 581-586.
- Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Lacadena, V., Martínez-Ruiz, A., Mancheño, J.M., Onaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1998) The cytotoxin alpha-sarcin behaves as a cyclizing ribonuclease. *FEBS Lett.* **424**, 46-48.
- Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Martínez-Ruiz, A., Pérez-Cañadillas, J.M., Bruix, M., Mancheño, J.M., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1999) Role of histidine-50, glutamic acid-96, and histidine-137 in the ribonucleolytic mechanism of the ribotoxin α -sarcin. *Proteins* **37**, 474-484.
- Lacy, D.B. y Stevens, R.C. (1998) Unraveling the structures and modes of action of bacterial toxins. *Curr. Op. in Struct. Biol.* **8**, 778-784.
- Lakowicz, J.R. (1999) Principles of Fluorescence Spectroscopy, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Ladokhin, A.S. y Holloway, P.W. (1995) Fluorescence of membrane-bound tryptophan octyl ester: a model for studying intrinsic fluorescence of protein-membrane interactions. *Biophys. J.* **69**, 506-517.
- Ladokhin, A.S. (1999) Analysis of protein and peptide penetration into membranes by depth-dependent fluorescence quenching: theoretical considerations. *Biophys. J.* **76**, 946-955.
- Ladokhin, A.S. y White, S.H. (1999) Folding of amphipatic alpha-helices on membranes: energetics of helix formation by melittin. *J. Mol. Biol.* **285**, 1363-1369.
- Lamy, B. y Davies, J. (1991) Isolation and nucleotide sequence of the *Aspergillus restrictus* gene coding for the ribonucleolytic toxin restrictocin and its expression in *Aspergillus nidulans*: the leader sequence protects producing strains from suicide. *Nucl. Acids Res.* **19**, 1001-1006.

- Lamy, B., Davies, J. y Schindler, D. (1992) The *Aspergillus* ribonucleolytic toxins (ribotoxins). In: Frankel AE, editor. *Genetically engineered toxins* New York: Marcel Bekker Inc.; p237-258.
- Lee, A.G. (2000) It's only a phase. *Current Biology*. **10**, R377-R380.
- Leenhouts, J.M., van den Wijngaard, P.W., de Kroon, A.I. y de Kruijff, B. (1995) Anionic phospholipid can mediate membrane insertion of the anionic part of a bound peptide. *FEBS Lett.* **370**, 189-192.
- Legname, G., Bellosta, P., Gromo, G., Modena, D., Keen, J.N., Roberts, L.M. y Lord, J.M. (1991) Nucleotide sequence of cDNA coding for dianthin 30, a ribosome inactivating protein from *Dianthus caryophyllus*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1090**, 119-122.
- Li, X.D., Liu, W.Y. y Niu, C.L. (1996) Purification of a new ribosome-inactivating protein from the seeds of *Cinnamomum porrectum* and characterization of the RNA N-glycosidase activity of the toxic protein. *Biol. Chem.* **377**, 825-831.
- Li, X.D., Chen, W.F., Liu, W.Y. y Wang, G.H. (1997) Large-scale preparation of two new ribosome-inactivating proteins--cinnamomin and camphorin from the seeds of *Cinnamomum camphora*. *Protein Expr. Purif.* **10**, 27-31.
- Lin, A., Huang, K.-C., Hwu, L. y Tzean, S.S. (1995) Production of type II ribotoxins by *Aspergillus* species and related fungi in Taiwan. *Toxicon* **33**, 105-110.
- Liprandi, F., Moros, Z., Gerder, M., Ludert, J.E., Pujol, F.H., Ruiz, M.C., Michelangeli, F., Charpilienne, A. y Cohen, J. (1997) Productive penetration of rotavirus in cultured cells induces coentry of the translation inhibitor α -sarcin. *Virology* **237**, 430-438.
- Liu, J.C., Boucias, D.G., Pendland, J.C., Liu, W.Z. y Maruniak, J. (1996) The mode of action of hirsutellin A on eukaryotic cells. *J. Invertebr. Pathol.* **67**, 224-228.

- Loewenthal, R., Sancho, J. y Fersht, A.R. (1991) Fluorescence spectrum of barnase: contributions of three Trp residues and a His-related pH dependence. *Biochemistry* **30**, 6775-6779.
- López-Otín, C., Barber, D., Fernández Luna, J.L., Soriano, F. y Méndez, E. (1984) The primary structure of the cytotoxin restrictocin. *Eur. J. Biochem.* **149**, 621-634.
- Lord, J.M., Roberts, L.M. y Robertus, J.D. (1994) Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB J.* **8**, 201-208.
- Loris, R., Langhorts, U., de Vos, S., Decanniere, K., Bouckaert, J., Maes, D., Transue, T.R. y Steyaert, J. (1999) Conserved water molecules in a large family of microbial ribonucleases. *Proteins.* **36**, 117-134.
- Ma, J.C. y Dougherty, D.A. (1997) The cation $-\pi$ interaction. *Chem. Rev.* **97**, 1303-1324.
- Magnet-Dana, R. (1999) The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1462**, 109-140.
- Malenbaum, S.E., Collier, R.J. y London, E. (1998) Membrane topography of the T domain of diphtheria toxin probed with single tryptophan mutants. *Biochemistry.* **37**, 17915-17922.
- Mancheño, J.M., Gasset, M., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1994a) Molecular interactions involved in the passage of the cytotoxic protein α -sarcin across membranes. In: Opden-Kamp JAF, editor. *Biological membranes: structure, biogenesis and dynamics*. Berlin: Springer-Verlag: pp. 269-276.
- Mancheño, J.M., Gasset, M., Lacadena, J., Ramón, F., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1994b) Kinetic study of the aggregation and lipid-mixing produced by α -sarcin on phosphatidylglycerol and phosphatidylserine vesicles: stopped-flow light scattering and fluorescence energy transfer measurements. *Biophys. J.* **67**, 1117-1125.

- Mancheño, J.M., Gasset, M., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1995a) Predictive study of the conformation of the cytotoxic protein α -sarcin: A structural model to explain α -sarcin-membrane interaction. *J. Theor. Biol.* **172**, 259-267.
- Mancheño, J.M., Gasset, M., Albar, J.P., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1995b) Membrane interaction of a β -structure forming synthetic peptide comprising the 116-139th sequence region of the cytotoxic protein α -sarcin. *Biophys. J.* **68**, 2387-2395.
- Mancheno, J.M., Martinez del Pozo, A., Albar, J.P., Onaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1998a) A peptide of nine amino acid residues from α -sarcin cytotoxin is a membrane-perturbing structure. *J. Pept. Res.* **51**, 142-148.
- Mancheño, J.M., Gasset, M., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1998b) Aggregation and lipid-mixing of dimyristoyl-phosphatidylserine vesicles induced by the cytotoxin α -sarcin. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat. (Esp.)* **92**, 185-193.
- Maraganore, J.M., Joseph, M. y Bailey, M.C. (1987) Purification and characterization of trichosanthin. Homology to the ricin A chain and implications as to mechanism of abortifacient activity. *J. Biol. Chem.* **262**, 11628-11633.
- di Maro, A., Valbonesi, P., Bolognesi, A., Stirpe, F., De Luca, P., Siniscalco, G.G., Gaudio, L., Delli, B.P., Ferranti, P., Malorni, A. y Parente, A. (1999) Isolation and characterization of four type-1 ribosome-inactivating proteins, with polynucleotide:adenosine glycosidase activity, from leaves of *Phytolacca dioica* L. *Planta* **208**, 125-131.
- Martin, I., Ruyschaert, J.M., Sanders, D. y Giffard, C.J. (1996) Interaction of the lantibiotic nisin with membrane revealed by fluorescence quenching of an introduced tryptophan. *Eur. J. Biochem.* **239**, 156-164.

- Martínez del Pozo, A., Gasset, M., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1988) Conformational study of the antitumor protein α -sarcin. *Biochimia et Biophysica Acta* **953**, 280-288.
- Martínez del Pozo, A., Gasset, M., Onaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1989) Effect of divalent cations on structure-function relationships of the antitumor protein α -sarcin. *Int. J. Pept. Protein Res.* **34**, 416-422.
- Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, A., Lacadena, J., Mancheno, J.M., Oñaderra, M., Lopez-Otín, C. y Gavilanes, J.G. (1998) Secretion of recombinant pro- and mature fungal alpha-sarcin ribotoxin by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: the Lys-Arg motif is required for maturation. *Protein Expr. Purif.* **12**, 315-322.
- Martínez-Ruiz, A., Kao, R., Davies, J. y Martínez del Pozo, A. (1999a) Ribotoxins are a more widespread group of proteins within the filamentous fungi than previously believed. *Toxicon* **37**, 1549-1563.
- Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, A., Lacadena, J., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1999b) Hirsutellin A displays significant homology to microbial extracellular ribonucleases. *J. Invertebr. Pathol.* **74**, 96-97.
- Masip, M., Lacadena, J., Mancheno, J.M., Oñaderra, M., Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, A. y Gavilanes, J.G. (2001) Arginine 121 is a crucial residue for the specific cytotoxic activity of the ribotoxin α -sarcin. *Eur. J. Biochem.* **268**, 6190-6196.
- Mayer, L.D., Bally, M.B., Hope, M.J., Cullis, P.R. y Janoff, A.S. (1985) Uptake of antineoplastic agents into large unilamellar vesicles in response to a membrane potential. *Biochimia et Biophysica Acta* **816**, 294-302.
- McKnight, C.J., Rafalski, M. y Gierasch, L.M. (1991) Fluorescence analysis of tryptophan-containing variants of the LambB signal sequence upon insertion into a lipid bilayer. *Biochemistry* **30**, 6241-6246.

- Merola, M., Martínez del Pozo, A., Ueno, H., Recsei, P., di Donato, A., Manning, J.M., Tanizawa, K., Mosu, Y., Asano, S., Tanaka, H., Soda, K., Ringe, D. y Petsko, G.A. (1989) Site-directed mutagenesis of the cysteinyl residues and the active site serine residue of bacterial D-amino acid transaminase. *Biochemistry* **28**, 505-509.
- Merrill, A.R., Palmer, L.R. y Szabo, A.G. (1993) Acrylamide quenching of the intrinsic fluorescence of tryptophan residues genetically engineered into the soluble colicin-E1 channel peptide. Structural characterization of the insertion-competent state. *Biochemistry* **32**, 6974-6981.
- Messing, J. (1983) New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* **101**, 70-79.
- Miller, S.P. y Bodley, J.W. (1988) The ribosomes of *Aspergillus giganteus* are sensitive to the cytotoxic action of alpha-sarcin. *FEBS Lett.* **229**, 388-390.
- Moazed, D., Robertson, J.M. y Noller, H.F. (1988) Interaction of elongation factors EF-G and EF-Tu with a conserved loop in 23S RNA. *Nature* **334**, 362-364.
- Moser, M., Cramer, R., Menz, G., Schneider, T., Dudler, T., Virchow, C., Gmachl, M., Blaser, K. y Suter, M. (1992) Cloning and expression of recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen I/a (rAsp f I/a) with IgE binding and type I skin test activity. *J. Immunol.* **149**, 454-460.
- Mueller, F., Sommer, I., Baranov, P., Matadeen, R., Stoldt, M., Wöhnert, J., Görlach, M., Van Heel, M. y Brimacombe, R. (2000) The 3D Arrangement of the 23S and 5S rRNA in the *Escherichia coli* 50S Ribosomal subunit based on a Cryo-electron Microscopic Reconstruction at 7.5 Å resolution. *J Mol Biol.* **298**, 35-59.
- Muñoz, A., Castrillo, J.L. y Carrasco, L. (1985) Modification of membranes permeability during *Senliki Forest Virus* infection. *Virology* **146**, 203-212.
- Munishkin, A. y Wool, I.G. (1997) The ribosome-in-pieces: Binding of elongation factor EF-G to oligoribonucleotides that mimic the

sarcin/ricin and thiostrepton domains of 23S ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 12280-12284.

- Murray, D., Arbuzova, A., Hangyas-Mihalyne, G., Gambhir, A., Ben-Tal, N., Honig, B. y McLaughlin, S. (1999) Electrostatic properties of membranes containing acidic lipids and adsorbed basic peptides: theory and experiment. *Biophys. J.* **77**, 3176-3188.
- Myers, D.E., Irvin, J.D., Smith, R.S., Kuebelbeck, V.M. y Uckun, F.M. (1991) Production of a pokeweed antiviral protein (PAP)-containing immunotoxin, B43-PAP, directed against the CD19 human B lineage lymphoid differentiation antigen in highly purified form for human clinical trials. *J. Immunol. Methods* **136**, 221-237.
- Ng, T.B., Liu, W.K., Sze, S.F. y Yeung, H.W. (1994) Action of alpha-momorcharin, a ribosome inactivating protein, on cultured tumor cell lines. *Gen Pharmacol.* **25**, 75-77.
- Nishimoto, E., Yamashita, S., Szabo, A.G. e Imoto, T. (1998) Internal motion of lysozyme studied by time-resolved fluorescence depolarization of Trp residues. *Biochemistry* **37**, 5599-5607.
- Noguchi, S., Satow, Y., Uchida, T., Sasaki, C. y Matsuzaki, T. (1995) Crystal structure of *Ustilago sphaerogena* ribonuclease U2 at 1.8 Å resolution. *Biochemistry* **34**, 15583-15591.
- Nonaka, T., Nakamura, K.T., Uesugi, S., Ikehara, M., Irie, M. y Mitsui, Y. (1993) Crystal structure of ribonuclease Ms (as a ribonuclease T1 homologue) complexed with a guanydyl-3',5'-cytidine analogue. *Biochemistry* **32**, 11825-11837.
- O'Brien, A.D. y Holmes, R.K. (1987) Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* **51**, 206-220.
- O'Connor, M. y Dahlberg, A.E. (1996) The influence of base identity and base pairing on the function of the alpha-sarcin loop 23S rRNA. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2701-2705.
- Olmo, N., Turnay, J., Lizarbe, M.A. y Gavilanes, J.G. (1993) Cytotoxic effect of α -sarcin, a ribosome-inactivating protein, in cultured Rugli cells. *STP Pharma Sci.* **3**, 93-96.

- Olmo, N., Turnay, J., González de Buitrago, G., López de Silanes, I., Gavilanes, J.G. y Lizarbe, M.A. (2001) Cytotoxic mechanism of the ribotoxin α -sarcin. Induction of cell death via apoptosis. *Eur J Biochem.* **268**, 2113-2123.
- Olsnes, S. y Pihl, A. (1981) Chimeric toxins. *Pharmacol Ther.* **15**, 355-381.
- Olsnes, S. y Pihl, A. (1982) Toxic lectins and related proteins. En *Molecular Action of toxins and viruses*. Cohen P. y van Heyningen S., eds. *Elsevier Biomedical Press*, Nueva York, pp. 51-105.
- Olson, B.H. y Goerner, G.L. (1965) Alpha-sarcin, a new antitumor agent. I. Isolation, purification, chemical composition, and the identity of a new amino acid. *Applied Microbiol.* **13**, 314-321.
- Olson, B.H., Jennings, J.C., Roga, V., Junek, A.J. y Schurmans, D.M. (1965). α -Sarcin, a new antitumor agent II. Fermentation and antitumor spectrum. *Applied Microbiol.* **13**, 322-326.
- Olson, B.H. y Goerner, G.L. (1966) Process for the production of mitogillin by *Aspergillus restrictus* and the resulting product. Patente US3230153.
- Oñaderra, M., Gasset, M., Martínez del Pozo, A. y Gavilanes, J.G. (1989) Molecular aspects of α -sarcin penetration in phospholipid bilayers. *Biochem. Soc. Transac.* **17**, 999-1000.
- Oñaderra, M., Mancheño, J.M., Gasset, M., Lacadena, J., Schiavo, G., Martínez del Pozo, A. y Gavilanes, J.G. (1993) Translocation of α -sarcin across the lipid bilayer of asolectin vesicles. *Biochem. J.* **295**, 221-225.
- Oñaderra, M., Mancheño, J.M., Lacadena, J., de los Ríos, V., Martínez del Pozo, A. y Gavilanes, J.G. (1998) Oligomerization of the cytotoxin α -sarcin associated to phospholipid membranes. *Mol. Membr. Biol.* **15**, 141-144.
- Orlandi, R., Canevari, S., Conde, F.P., Leoni, F., Mezzanatica, D., Ripamonti, M. y Colnaghi, M.I. (1988) Immunoconjugate generation between the ribosome inactivating protein

restrictocin and an anti-human breast carcinoma MAB. *Cancer Immunol. Immunother.* **26**, 114-120.

- Osterman, H.L. y Walz, F.G. Jr. (1978). Subsites and catalytic mechanism of ribonuclease T1. Kinetic studies using GpA, GpC, GpG and GpU as substrates. *Biochemistry* **17**, 4124-4130.
- Otero, M.J. y Carrasco, L. (1986) External ATP permeabilizes transformed cells to macromolecules. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **134**, 453-460.
- Otero, M.J. y Carrasco, L. (1987) Proteins are cointernalized with virion particles during early infection. *Virology* **160**, 75-80.
- Otero, M.J. y Carrasco, L. (1988) Exogenous phospholipase C permeabilizes mammalian cells to proteins. *Exp. Cell. Res.* **177**, 154-161.
- Pace, C.N., Heinemann, U., Hahn, U. y Saenger, W. (1991) Ribonuclease T1: structure, function and stability. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**, 343-360.
- Pace, N., Vajdos, F., Fee, L., Grisley, G. y Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**, 2411-2423.
- Pace, C.N., Hebert, E.J., Shaw, K.L., Schell, D., Both, V., Krajcikova, D., Sevcik, J., Wilson, K.S.; Dauter, Z., Hartley, R.W. y Grimsley, G.R. (1998) Conformational stability and thermodynamics of folding of ribonucleases Sa, Sa2 and Sa3. *J. Mol. Biol.* **279**, 271-286.
- Parente, D., Raucci, G., Celano, B., Pacilli, A., Zanoni, L., Canevari, S., Adobati, E., Colnaghi, M.I., Dosio, F., Arpicco, S., Cattel, L., Mele, A., de Santis, R. (1996) Clavin, a type-1 ribosome-inactivating protein from *Aspergillus clavatus* IFO 8605. cDNA isolation, heterologous expression, biochemical and biological characterization of the recombinant protein. *Eur. J. Biochem.* **239**, 272-280.
- Park, C.B., Kim, H.S. y Kim, S.C. (1998) Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by

penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**, 253-257.

Parker, M.W. y Pattus, F. (1993) Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial proteins toxins. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 391-395.

Parker, M.W., van der Goot, F.G. y Buckley, J.T. (1996) Aerolisyn--the ins and outs of a model channel-forming toxin. *Mol. Microbiol.* **19**, 205-212.

Perczel, A., Hollósi, M., Tusnády, G. y Fasman, G.D. (1991) Convex constraint analysis: a natural deconvolution of circular dichroism curves. *Protein Eng.* **4**, 669-679.

Perczel, A., Park, K. y Fasman, G.D. (1992) Analysis of the circular dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm: a practical guide. *Anal. Biochem.* **203**, 83-93.

Pérez-Cañadillas, J.M., Campos-Olivas, R., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Gavilanes, J.G., Santoro, J., Rico, M. y Bruix, M. (1998) Characterization of pKa values and titration shifts in the cytotoxic ribonuclease α -sarcin by NMR. Relationship between electrostatic interactions, structure and catalytic function. *Biochemistry* **37**, 15865-15876.

Pérez-Cañadillas, J.M., Campos-Olivas, R., Santoro, J., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Gavilanes, J.G., Rico, M. y Bruix, M. (1999) Solution structure of the cytotoxic ribonuclease alpha-sarcin. Base de datos Protein Data Bank (PDB), número de acceso 1DE3.

Pérez-Cañadillas, J.M., Santoro, J., Campos-Olivas, R., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Gavilanes, J.G., Rico, M. y Bruix, M. (2000) The highly refined solution structure of the cytotoxic ribonuclease α -sarcin reveals the structural requirements for substrate recognition and ribonucleolytic activity. *J. Mol. Biol.* **299**, 1061-1073.

- Perez-Cañadillas, J.M. y Varani, G. (2001) Recent advances in RNA-protein recognition. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 53-58. Review.
- Porse, B.T. y Garret, R.A. (1999) Ribosomal mechanics, antibiotics and GTP hydrolysis. *Cell* **97**, 423-426.
- Rapaport, D., Hague, G.R., Pouny, Y. y Shai, Y. (1993) pH- and ionic strength-dependent fusion of phospholipid vesicles induced by pardaxin analogues or by mixtures of charge-reversed peptides. *Biochemistry* **32**, 3291-3297.
- Rathore, D. y Batra, J.K. (1996) Generation of active immunotoxins containing recombinant restrictocin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **212**, 58-63.
- Rathore, D. y Batra, J.K. (1997a) Construction, expression and characterization of chimeric toxins containing the ribonucleolytic toxin restrictocin. *Biochem. J.* **324**, 815-822.
- Rathore, D. y Batra, J.K. (1997b) Cytotoxic activity of ribonucleolytic toxin restrictocin-based chimeric toxins targeted to epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett.* **407**, 275-279.
- Rathore, D., Nayak, S.K. y Batra, J.K. (1997) Overproduction of fungal ribotoxin alpha-sarcin in *Escherichia coli*: generation of an active immunotoxin. *Gene* **190**, 31-35.
- Ren, J., Lew, S., Wang, Z. y London, E. (1997) Transmembrane orientation of hydrophobic α -helices is regulated both by the relationship of the helix length to bilayer thickness and by the cholesterol concentration. *Biochemistry* **36**, 10213-10220.
- Ren, J., Lew, S., Wang, J. y London, E. (1999) Control of the transmembrane orientation and interhelical interactions within membranes by hydrophobic helix length. *Biochemistry* **38**, 5905-5912.
- Rodríguez, R., López-Otín, C., Barber, D., Fernández-Luna, J.L., González, G. y Méndez, E. (1982) Amino acid sequence homologies in α -sarcin, restrictocin and mitogillin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **108**, 315-321.

- Roga, V., Hedeman, L.P. y Olson, B.H. (1971) Evaluation of mitogillin (NSC-69529) in the treatment of naturally occurring canine neoplasms. *Cancer Chemotherapy Reports* **55**, 101-113.
- Rojo, M.A., Yato, M., Ishii-Minami, N., Minami, E., Kaku, H., Citores, L., Girbes, T. y Shibuya, N. (1997) Isolation, cDNA cloning, biological properties, and carbohydrate binding specificity of sieboldin-b, a type II ribosome-inactivating protein from the bark of Japanese elderberry (*Sambucus sieboldiana*). *Arch. Biochem. Biophys.* **340**, 185-194.
- Rosenberg, A.H., Lode, B.N., Chui, D., Lin, S., Dunn, J.J. y Studier, F.W. (1987) Vectors for expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* **56**, 125-135.
- Sacco, G., Drickamer, K. y Wool, I.G. (1983) The primary structure of the cytotoxin α -sarcin. *J. Biol. Chem.* **258**, 5811-5818.
- Salvarelli, S., Muñoz, S. y Conde, F.P. (1994) Purification and characterization of a ribonuclease from *Aspergillus giganteus* IFO 5818, the gigantín. Immunological and enzymic comparison with alphasarcin. *Eur. J. Biochem.* **225**, 243-251.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor (Nueva York).
- Schiffer, M., Chang, C.H. y Stevens, F.J. (1992) The functions of tryptophan residues in membrane proteins. *Protein Eng.* **5**, 213-214.
- Schindler, D.G. y Davies, J.E. (1977) Specific cleavage of ribosomal RNA caused by α -sarcin. *Nucleic Acids Res.* **4**, 1097-1110.
- Scrutton, N.S. y Raine, A.R. (1996) Cation- π bonding and amino-aromatic interactions in the biomolecular recognition of substituted ammonium ligands. *Biochem. J.* **319**, 1-8.
- Sharpe, J.C. y London, E. (1999) Diphtheria toxin forms pores of different sizes depending on its concentration in membranes: probable relationship to oligomerization. *J Membr. Biol.* **171**, 209-221.

- Sitaram, N. y Nagarag, R. (1999). Interactions of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. *Biochimia et Biophysica Acta* **1462**, 29-54.
- Smit, J.J., Schinkel, A.H., Oude Elferink, R.P., Groen, A.K., Wagenaar, E., Van Deemter, L., Mol, C.A., Ottenhof, R., van der Lugt, N.M., van Roon, M.A., van der Valk, M.A., Offerhaus, G.J., Berns, A.J. y Borst, P. (1993) Homozygous disruption of the murine *mdr-2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* **75**, 451-462.
- Steinberg, G. (2000) The cellular roles of molecular motors in fungi. *Trends in Microbiology*. **8**, 162-168.
- Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L. y Painter, P.R. (1988) Microbiología. Ed. Reverté
- Stelzl, U., Spahn, C.M. y Nierhaus, K.H. (2000) Selecting rRNA binding sites for the ribosomal proteins L4 and L6 from randomly fragmented rRNA: Application of a method called SERF. *PNAS*. **97**, 4597-4602.
- Stirpe, F., Barbieri, I., Batelli, M.G., Soria, M. y Lappi, D.A. (1992) Ribosome inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology* **10**, 405-412.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dann, J.J. y Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60-89.
- Struck, D., Hoekstra, D. y Pagano, R.G. (1981) Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry* **20**, 4093-4099.
- Szewczak, A.A., Moore, P.B., Chan, Y.-L. y Wool, I.G. (1993) The conformation of the sarcin/ricin loop from 28S ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. USA* **90**, 9581-9585.
- Szewczak, A.A. y Moore, P.B. (1995) The sarcin/ricin loop, a modular RNA. *J. Mol. Biol.* **247**, 81-98.

- Takahashi, K. (1970) The structure and function of ribonuclease T1. IX. Photooxidation of ribonuclease T1 in the presence of rose bengal. *J. Biochem.* **67**, 833-839.
- Takahashi, K. (1985) A revision and confirmation of the amino acid sequence of ribonuclease T1. *J. Biochem.* **98**, 815-817.
- Tang, X., Halleck, M.S., Schlegel, R.A. y Williamson, P. (1996) A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science* **272**, 1495-1497.
- Tapio, S. e Isaksson, L.A. (1991) Base 2661 in *Escherichia coli* 23S rRNA influences the binding of elongation factor Tu during protein synthesis in vivo. *Eur. J. Biochem.* **202**, 981-984.
- Tapprich, W.E. y Dahlberg, A.E. (1990) A single mutation at position 2661 in *E.coli* 23S ribosomal RNA affects the binding of ternary complex to the ribosome. *EMBO J.* **9**, 2649-2655.
- Turnay, J., Olmo, N., Jiménez, A., Lizarbe, M.A. y Gavilanes, J.G. (1993) Kinetic study of the cytotoxic effect of α -sarcin, a ribosome inactivating protein from *Aspergillus giganteus* on tumour cell lines: protein biosynthesis inhibition and cell binding. *Mol. Cell Biochem.* **122**, 39-47.
- Turoverov, K.K. y Kuznetsova, I.M. (1986) What causes the variation of polarization degree across the emission spectrum of proteins? *Biophys. Chem.* **24**, 327-335.
- Uchiumi, T., Sato, N., Nada, A. y Hachimori, A. (1999) Interaction of the sarcin/ricin domain of 23S ribosomal RNA with proteins L3 and L6. *JBC* **8**, 681-686.
- Uemura, A., Kimura, S. e Imanishii, Y. (1983) Investigation on the interactions of peptides in the assembly of liposome and peptide by fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* **729**, 28-34.
- Utsugi, T., Schroit, A.J., Connor, J., Bucana, C.D. y Fidler, I.J. (1991) Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer Res.* **51**, 3062-3066.

- Vassilyev, D.G., Katayanagi, K., Ishikawa, K., Tusjimoto-Hirano, M., Danno, M., Pahler, A., Matsumoto, O., Matsushima, M., Yodhida, H. y Morikawa, K. (1993) Crystal structures of ribonuclease F1 of *Fusarium moniliforme* in its free form and in complex with 2'-GMP. *J. Mol. Biol.* **230**, 979-996.
- del Vecchio Blanco, F., Bolognesi, A., Malorni, A., Sande, M.J., Savino, G. y Parente, A. (1997) Complete amino-acid sequence of PD-S2, a new ribosome-inactivating protein from seeds of *Phytolacca dioica* L. *Biochimica et Biophysica Acta* **1338**, 137-144.
- van Voorst, F. y de Kuyff, B. (2000) Role of lipids in the translocation of proteins across membranes. *Biochem. J.* **347**, 601-612.
- Wang, H. y Ng, T.B. (1998) Ribosome inactivating protein and lectin from bitter melon (*Momordica charantia*) seeds: sequence comparison with related proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**, 143-146.
- Wang, Y.X., Jacob, J., Wingfield, P.T., Palmer, I., Stahl, S.J., Kaufman, J.D., Huang, P.L., Lee-Huang, S. y Torchia, D.A. (2000). Anti-HIV and antitumor protein MAP30, a 30 kDa single strand type I RIP shares similar secondary structure and β -sheet topology with the A-chain of ricin, a type two RIP. *Protein Sci.* **9**, 138-144.
- Wawrzynczak, E.J., Henry, R.V., Cumber, A.J., Parnell, G.D., Derbyshire, E.J. y Ulbrich, N. (1991) Biochemical, cytotoxic and pharmacokinetic properties of an immunotoxin composed of a mouse monoclonal antibody Fib75 and the ribosome-inactivating protein alpha-sarcin from *Aspergillus giganteus*. *Eur. J. Biochem.* **196**, 203-209.
- Wesche, J., Rapak, A. y Olsnes, S. (1999) Dependence of ricin toxicity on translocation of the toxin A-chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *J. Biol. Chem.* **48**, 34443-34449.
- Wessels, J.G. (1999) Fungi in Their Own Right. *Fungal Genetics and Biology* **27**, 134-145.

- Wieprecht, T., Dathe, M., Epanand, R.M., Beyermann, M., Krause, E., Maloy, W.L., McDonal, D.L. y Bienert, M. (1997a) Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides. *Biochemistry* **36**, 12869-12880.
- Wieprecht, T., Dathe, M., Krause, E., Beyermann, M., Maloy, W.L., MacDonal, D.L. y Bienert, M. (1997b) Modulation of membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides by slight modifications of the hydrophobic moment. *FEBS Lett.* **417**, 135-140.
- Williamson, P. y Schlegel, R.A. (1994) Back and forth: the regulation and function of transbilayer phospholipid movement in eukaryotic cells. *Mol. Membr. Biol.* **11**, 199-216.
- Wirth, J., Martínez del Pozo, A., Mancheño, J.M., Martínez-Ruiz, A., Lacadena, J., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1997) Sequence determination and molecular characterization of gigantín, a cytotoxic protein produced by the mould *Aspergillus giganteus* IFO 5818. *Arch. Biochem. Biophys.* **343**, 188-193.
- Wong, R.N., Dong, T.X., Ng, T.B., Choi, W.T. y Yeung, H.W. (1996) α -Kirilowin, a novel ribosome-inactivating protein from seeds of *Trichosanthes kirilowii* (family Cucurbitaceae): a comparison with beta-kirilowin and other related proteins. *Int. J. Pept. Protein Res.* **47**, 103-109.
- Woody, R.W. (1978) Aromatic side-chain contributions to the far ultraviolet circular dichroism of peptides and proteins. *Biopolymers* **17**, 1451-1467.
- Wool, I.G. (1984) The mechanism of action of the cytotoxic nuclease α -sarcin and its use to analyse ribosome structure. *Trends Biochem. Sci.* **9**, 14-17.
- Wool, I.G., Gluck, A. y Endo, Y. (1992) Ribotoxin recognition of ribosomal RNA and a proposal for the mechanism of translocation. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 266-269.
- Wool, I.G. (1996) Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 164-165.

- Wool, I.G. (1997) Structure and mechanism of action of the cytotoxic ribonuclease α -sarcin. En Ribonucleases: structures and functions. D'Alessio G y Riordan JF., eds. *Academic Press*, pp. 131-162.
- Wu, T.H., Chow, L.P. y Lin, J.Y. (1998) Sechiumin, a ribosome-inactivating protein from the edible gourd, *Sechium edule* Swartz--purification, characterization, molecular cloning and expression. *Eur. J. Biochem.* **255**, 400-408.
- Wüthrich, K. (1986). NMR of proteins and nucleic acids. New York, NY: J. Wiley and Sons.
- Xia, X-f. y Sui, S-f. (2000) The membrane insertion of trichosanthin is membrane-surface- pH- dependent. *Biochem. J.* **349**, 835-841.
- Yang, R. y Kenealy, W.R. (1992)a Effects of amino terminal extensions and specific mutations on the activity of restrictocin. *J. Biol. Chem.* **267**, 16801-16805.
- Yang, X. y Moffat, K. (1996) Insights into specificity of cleavage and mechanism of cell entry from the crystal structure of the highly specific *Aspergillus* ribotoxin, restrictocin. *Structure* **4**, 837-852.
- Yang, X., Gérzei, T., Glover, L.T. y Correll, C.C. (2001) Crystal structures of restrictocin-inhibitor complexes with implications for RNA recognition and base flipping. *Nature* **8**, 968-973.
- Yasukawa, T., Kanei-Ishii, C., Mackaura, T., Fujimoto, J., Yamamoto, T. e Ishii, S. (1995) Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **270**, 25328-25331.
- Yau, W.-M., Wimley, W.C., Gawrisch, K. y White, S.H. (1998) The Preference of Tryptophan for Membrane Interfaces. *Biochemistry* **37**, 14713-14718.
- Yoshida, H. (2001) The ribonuclease T1 family. *Methods Enzymol.* **341**, 28-41

Yoshinari, S., Yokota, S., Sawamoto, H., Koresawa, S., Tamura, M. y Endo, Y. (1996) Purification, characterization and subcellular localization of a type-1 ribosome-inactivating protein from the sarcocarp of *Cucurbita pepo*. *Eur. J. Biochem.* **242**, 585-591.

Yoshinari, S., Koresawa, S., Yokota, S., Sawamoto, H., Tamura, M. y Endo, Y. (1997) Gypsophilin, a new type 1 ribosome-inactivating protein from *Gypsophila elegans*: purification, enzymatic characterization, and subcellular localization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 324-331.

Zachowski, A. (1993) Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem. J.* **294**, 1-14.