

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**PAPEL DE LA HORQUILLA AMINO-TERMINAL COMO  
ELEMENTO CLAVE EN LA FUNCIONALIDAD DE LAS  
RIBOTOXINAS DE *ASPERGILLUS***

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR POR**  
Lucía García Ortega

Bajo la dirección de los Doctores:

Álvaro Martínez del Pozo  
José G. Gavilanes Franco

**Madrid, 2004**

**ISBN: 84-669-2662-3**

Universidad Complutense de Madrid  
Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I



Papel de la horquilla amino-terminal como  
elemento clave en la funcionalidad de las  
ribotoxinas de *Aspergillus*

Lucía García Ortega  
Tesis Doctoral  
Madrid, 2004



Universidad Complutense de Madrid  
Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I



Papel de la horquilla amino-terminal como  
elemento clave en la funcionalidad de las  
ribotoxinas de *Aspergillus*

Lucía García Ortega  
Tesis Doctoral  
Madrid, 2004



## Índice

<b>Abreviaturas, siglas y símbolos</b> .....	I
<b>Introducción</b> .....	1
La superfamilia de la barnasa .....	4
La familia de la RNasa T1 .....	7
Características estructurales .....	8
Mecanismo catalítico .....	8
Función biológica .....	10
La ribonucleasa U2 .....	11
Características estructurales .....	11
Mecanismo catalítico .....	12
Función biológica .....	13
Expresión heteróloga .....	13
Las ribotoxinas .....	14
Las ribotoxinas como RIP .....	15
Características generales .....	19
Características estructurales .....	21
Mecanismo catalítico .....	22
El ribosoma como sustrato de las ribotoxinas .....	23
Interacción con membranas .....	27
Citotoxicidad .....	28
Función biológica .....	29
$\alpha$ -Sarcina .....	29
Restrictocina .....	31
Asp f 1 .....	32
Inmunoterapia con ribotoxinas .....	36
<b>Objetivos</b> .....	37
<b>Resultados 1</b> .....	41
The solubility of the ribotoxin $\alpha$ -sarcin, produced as a recombinant protein in <i>Escherichia coli</i> , is increased in the presence of thioredoxin. García-Ortega et al, 2000 .....	45
Ribonuclease U2: cloning, production in <i>Pichia pastoris</i> and affinity chromatography purification of the active recombinant protein. Martínez-Ruiz et al, 2000 .....	51
RNase U2 and $\alpha$ -sarcin: a study of relationships. Martínez-Ruiz et al, 2001 .....	57
Optimización de la producción heteróloga de la ribonucleasa U2 en <i>Pichia pastoris</i> . .....	75

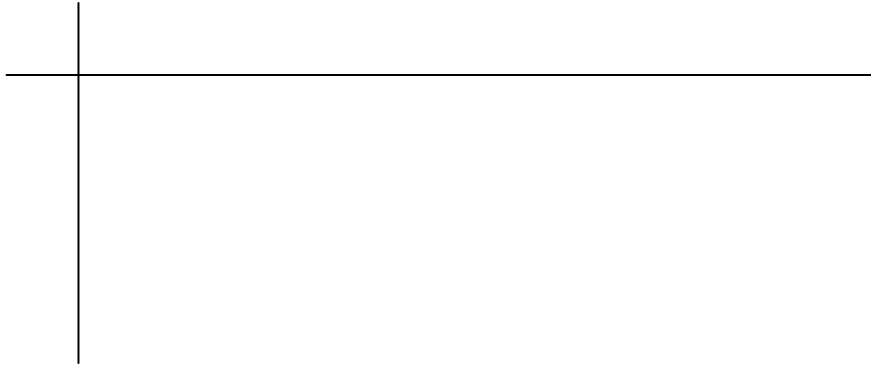
<b>Resultados 2</b> .....	81
Involvement of the amino-terminal $\beta$ -hairpin of the <i>Aspergillus</i> ribotoxins on the interaction with membranes and nonspecific ribonuclease activity. García-Ortega et al, 2001 .....	85
Deletion of the NH <sub>2</sub> -terminal $\beta$ -hairpin of the ribotoxin $\alpha$ -sarcin produces a nontoxic but active ribonuclease. García-Ortega et al, 2002 .....	97
<b>Resultados 3</b> .....	105
Production and characterization of a non-cytotoxic deletion variant of the <i>Aspergillus fumigatus</i> allergen Asp f 1 with reduced IgE-binding ability. García-Ortega et al, 2004 .....	109
<b>Discusión</b> .....	119
Producción heteróloga de formas recombinantes de $\alpha$ -sarcina y RNasa U2 ..	121
La horquilla amino-terminal de las ribotoxinas .....	122
La interacción con el ribosoma .....	128
Las ribotoxinas como alergenos .....	136
Consideraciones finales .....	141
<b>Conclusiones</b> .....	143
<b>Bibliografía</b> .....	147

## Abreviaturas, siglas y símbolos

A, C, G, U :	adenina, citidina, guanina, uracilo
aa :	aminoácido
ABPA :	aspergilosis broncopulmonar alérgica
ADP :	5'-difosfato de adenosina
APC :	célula presentadora de antígeno
ApA (C, G, U) :	adenilil (3'→5') adenosina (citosina, guanosina, uracilo)
β-MetOH :	2'-mercaptoetanol
cAMP :	2',3'-monofosfato cíclico de adenosina
CF :	fibrosis cística
CIB :	Centro de Investigaciones Biológicas
CNB :	Centro Nacional de Biotecnología
CSIC :	Centro Superior de Investigaciones Científicas
Ct/Nt :	extremo carboxilo terminal/amino terminal de una secuencia peptídica
DEAE :	dietilaminoetilo
DTT :	ditiotreitolo
EF-G (eEF-2) :	factor de elongación G (factor de elongación homólogo en eucariotas)
EF-Tu (eEF-1) :	factor de elongación Tu (factor de elongación homólogo en eucariotas)
ELISA :	enzimoinmunoanálisis
GpA (C, G, U) :	guanilil (3'→5') adenosina (citosina, guanosina, uracilo)
GTP :	5'-trifosfato de guanosina
GTPasa :	enzima que cataliza la hidrólisis de GTP en GDP +P <sub>i</sub>
ID <sub>50</sub> :	concentración de agente tóxico necesaria para producir el 50% de la muerte celular
IF-2 :	factor de iniciación 2
IgE, IgG :	inmunoglobulina tipo E, tipo G
K <sub>cat</sub> :	constante catalítica
(K)Da :	(Kilo)Dalton
K <sub>M</sub> :	constante de Michaelis
LDL :	liposoma de baja densidad
(m)(r)(t)RNA :	RNA (mensajero) (ribosomal) (de transferencia)
PDB :	base de datos Protein Data Bank
pI :	punto isoeléctrico
poli(A)/(G)/(I)/(U) :	ácido poliadenílico/poliguanílico/poliinosínico/poliuracílico
PS :	fosfatidilserina
Pu, Py :	base púrica, pirimidínica
RI :	inhibidor de ribonucleasas
RIP :	proteína(s) inactivante(s) de ribosomas
RMN	resonancia magnética nuclear
RNasa(s) :	ribonucleasa(s)
scFv :	cadena sencilla de la fracción variable de un anticuerpo
SDS-PAGE :	gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico
siRNA :	RNA pequeño de interferencia
SRL :	lazo sarcina/ricina
Th1(Th2) .	célula T ayudante de clase 1(2)
UCM :	Universidad Complutense de Madrid
UV :	ultravioleta







# **Introducción**



Las ribonucleasas (RNAsas) constituyen un conjunto de enzimas que muestran una diversidad estructural y funcional extraordinaria (Aravind y Koonin, 2001), pero que tienen en común su capacidad para romper enlaces fosfodiéster entre ribonucleótidos. Se encuentran en todos los organismos vivos y forman parte de procesos tan esenciales para el funcionamiento celular como la maduración del RNA (mensajero, ribosomal, de transferencia), su degradación, la regulación de la expresión génica (silenciamiento génico) y la traducción (sistemas de RNA de transferencia), entre otros (D'Alessio y Riordan, 1997; Beintema y Kleineidam, 1998; Bernstein et al, 2001; Nelson et al, 2003; Carmell y Hannon, 2004). Esta diversidad es tal que un mismo organismo puede llegar a expresar hasta 20 RNAsas diferentes con especificidades distintas o solapantes (Makarov e Ilinskaya, 2003).

Dentro de este gran grupo, las RNAsas extracelulares constituyen una población minoritaria, pero dividida en tres superfamilias muy distintas entre sí (Aravind y Koonin, 2001) (Tabla I). La función biológica de esta clase de enzimas no se conoce con detalle, aunque parecen estar implicadas en mecanismos de defensa del organismo productor y en la degradación de RNA como fuente de bases nitrogenadas y fosfato (Brandhorst et al, 1996; Rosenberg y Domachowske, 1999; MacIntosh et al, 2001; Deshpande y Shankar, 2002). A pesar de ello, su aplicación, especialmente en terapias contra diversos tipos de cáncer, está bastante desarrollada, aprovechando, entre otras cosas, su diferencia con las RNAsas intracelulares de las células diana (Rathore et al, 1997; Leland y Raines, 2001; Matousek, 2001).

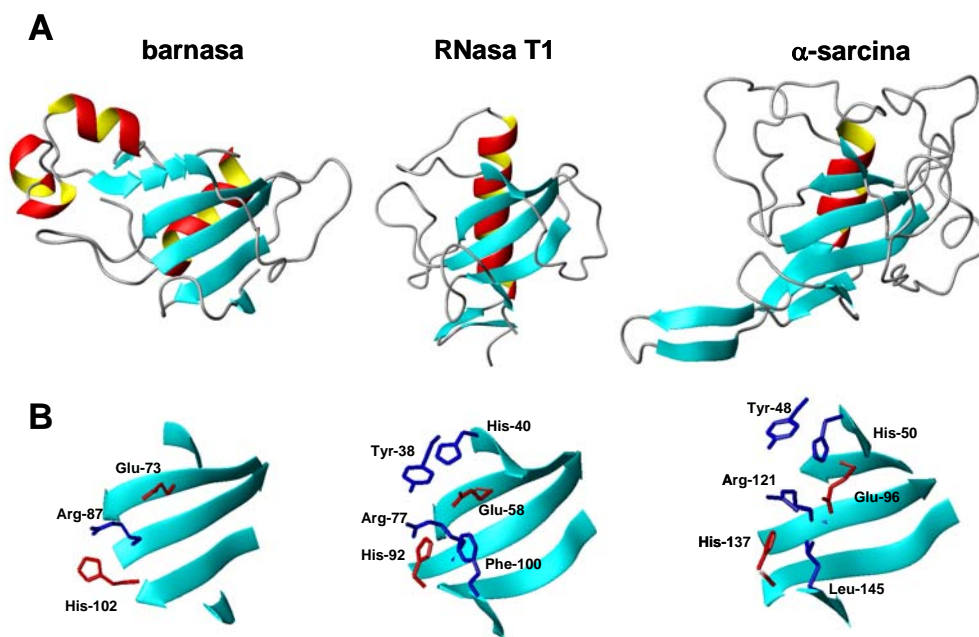
Una de estas tres superfamilias es la que engloba a aquellas RNAsas microbianas con un plegamiento homólogo al de la barnasa, el miembro principal (Tabla I) (Hartley, 1997; Irie, 1997; Yoshida, 2001; Wool, 1997).

Superfamilia	Origen	Residuos catalíticos	Familias	Ejemplos
<b>Barnasa</b>	Bacterias y hongos	ERH	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Barnasa:</li> <li>▪ RNasa T1:</li> <li>▪ Ribotoxinas:</li> </ul>	barnasa T1, U2 $\alpha$ -sarcina, Asp f 1
<b>RNasa A</b>	Eucariotas superiores	HKH	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Mamíferos:</li> <li>▪ Otros vertebrados:</li> </ul>	A, HP, BS(dímero), angiogenina, EDN onconasa (citotóxica)
<b>RNasa T2</b>	Ampliamente distribuidas	HH	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ RNasa T2:</li> </ul>	T2, I, LE, Rh

**Tabla I: Algunas características de las ribonucleasas extracelulares más representativas.** Barnasa, de *Bacillus amyloquefaciens*; T1, de *Aspergillus oryzae*; U2, de *Ustilago sphaerogena*;  $\alpha$ -sarcina, de *Aspergillus giganteus*; Asp f 1, de *Aspergillus fumigatus*; A, pancreática bovina; HP, pancreática humana; BS, seminal bovina; angiogenina, de numerosos tipos celulares humanos, especialmente tumorales; EDN, neurotóxica derivada de eosinófilos; Onconasa, de *Rana pipiens*; T2, de *Aspergillus oryzae*; I, de *Escherichia coli*; LE, de células de tomate (*Lycopersicon esculentum*); Rh, de *Rhizopus niveus*.

### La superfamilia de la barnasa

Comprende RNAsas formadas por una única cadena polipeptídica de pequeño tamaño, que son secretadas por bacterias (familia barnasa) y hongos (familias T1 y ribotoxinas) (Aravind y Koonin, 2001; Yoshida, 2001). Todas ellas muestran un patrón de plegamiento homólogo consistente en un núcleo formado por una lámina  $\beta$  antiparalela de cuatro hebras y un centro activo en el que participa la triada catalítica E-R-H (Figura 1). El hecho de poseer una distribución tan restringida dentro de los organismos vivos se relaciona con su aparición tardía en la evolución.



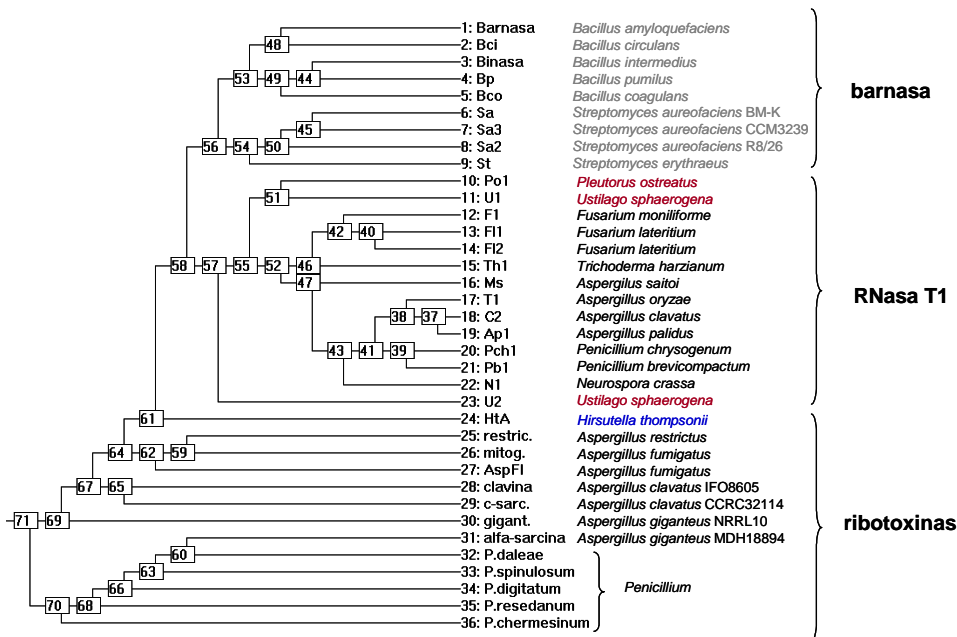
**Figura 1:** Estructuras tridimensionales de los principales miembros de la superfamilia de RNAsas extracelulares microbianas.

**A.- Estructuras obtenidas a partir de las coordenadas depositadas en el PDB:** barnasa, 1A2P (Mauguen et al, 1982); RNasa T1, 9RNT (Martínez-Oyanedel et al, 1991);  $\alpha$ -sarcina, 1DE3 (Pérez-Cañadillas et al, 2000).

**B.- Detalle de los centros activos.** En rojo los residuos esenciales para la catálisis ácido-base, en azul otros residuos con participación conocida en el mecanismo catalítico.

El árbol filogenético de esta superfamilia, así como sus identidades de secuencia, patrones de puentes disulfuro, y estructuras tridimensionales de algunas de ellas, permiten realizar una comparación exhaustiva entre sus miembros (Figuras 1, 2 y 3). De este modo, si consideramos los organismos productores, se ve que, fundamentalmente, producen RNAsas extracelulares los microorganismos de los géneros *Bacillus* (barnasa, Bcl, binasa, Bp, Bco), y *Streptomyces* (Sa, Sa3, Sa2, St), así como los hongos ascomicetos del tipo *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium* (familia T1 y ribotoxinas). De forma excepcional, existen

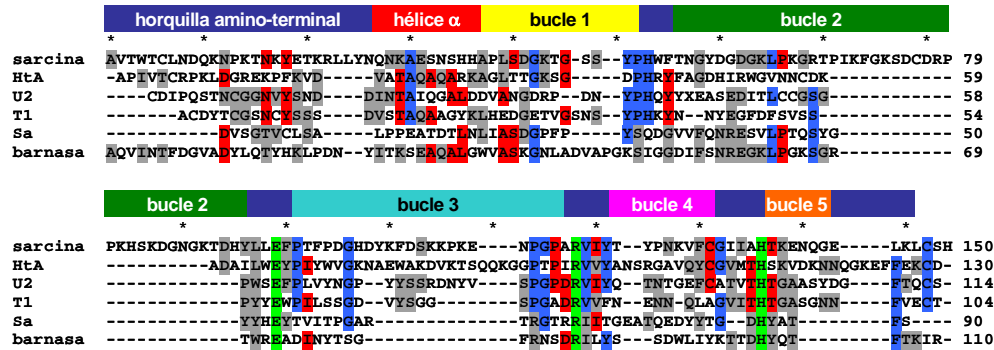
además dos especies de hongos basidiomicetos que también producen RNAsas de la familia T1 (Figura 2) (Martínez Ruiz, 2000). Sin embargo, a pesar de las diferencias claras que aparecen entre aquellas de origen procariota o eucariota, un análisis detallado de sus secuencias demuestra que las RNAsas secretadas por el género *Streptomyces* presentan una mayor similitud (incluido el patrón de puentes disulfuro) con las de la familia T1 que con el resto de RNAsas bacterianas, pudiéndose las considerar como un grupo evolutivo intermedio entre ambas familias. (Figuras 2 y 3).



**Figura 2: Árbol filogenético de las RNAsas pertenecientes a la superfamilia de la barnasa.** En gris aparecen los organismos productores procariotas (familia barnasa), en negro los hongos ascomicetos, en rojo los basidiomicetos y en azul se destaca el hongo entomopatígeno productor de la hirsutelina A, intermedio evolutivo entre las familias de la RNasa T1 y las ribotoxinas. Los números indican las distancias filogenéticas entre ellas (Martínez Ruiz, 2000).

Algo parecido ocurre al comparar las RNAsas de la familia T1 con las ribotoxinas, ambas producidas, principalmente, por el género de hongos *Aspergillus* (Figura 2). Las ribotoxinas poseen una serie de características únicas que las alejan del resto de miembros de la superfamilia, especialmente en términos funcionales. Son proteínas con unos 40 aminoácidos adicionales, y de carácter básico, que presentan, además, una especificidad extraordinaria frente a su sustrato natural (el RNA ribosomal) y son capaces de interactuar con membranas biológicas, ejerciendo, gracias a ello, su toxicidad frente a determinados tipos de células (Wool, 1997). Sin embargo, su similitud de secuencia con miembros de la familia T1 alcanza el 25% (Sacco et al, 1983), y mucho más importante es el alto grado de homología estructural, así como la conservación del centro activo responsable de la actividad fosfodiesterasa propia de estas enzimas. (Figuras 1 y 3) (Pérez-Cañadillas et al, 2000).

## A



## B

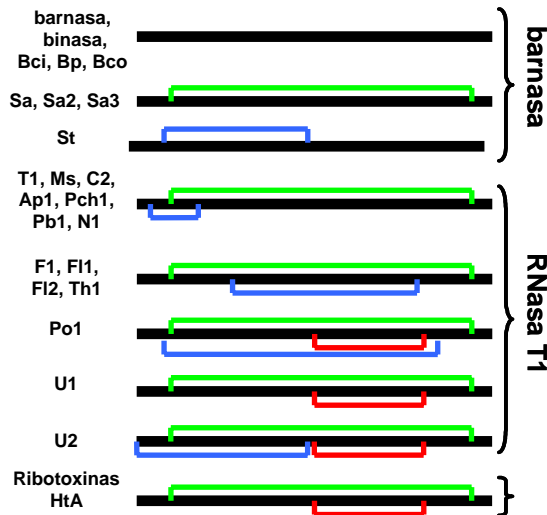


Figura 3: Secuencia de aminoácidos y puentes disulfuro de las proteínas de la superfamilia de la barnasa.

**A.- Secuencias de las principales ribonucleasas.** La identidad de secuencia se indica en orden decreciente con el siguiente código de colores: verde>azul>rojo>gris, estando conservados en todas las secuencias los residuos catalíticos esenciales ERH. La barra sobre el alineamiento representa los elementos de estructura secundaria en los que participan los distintos segmentos secuenciales para el caso de la  $\alpha$ -sarcina. Los colores significan: azul.- lámina  $\beta$  central (5 hebras) y horquilla amino-terminal; rojo.- hélice  $\alpha$ ; amarillo, verde, azul claro, rosa y naranja.- bucles 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. (-) indica ausencia de aminoácido. Secuencias obtenidas de la base de datos Swiss Prot.

**B.- Diferentes patrones de puentes disulfuro en la superfamilia.** El mismo color (verde, azul o rojo) indica equivalencia del enlace en las distintas secuencias. En el esquema se mantiene la proporción entre la posición de las Cys y la secuencia completa, aunque no entre las distintas secuencias.

Entre estas dos familias se ha considerado, recientemente, como intermedio evolutivo, un nuevo miembro de la familia de las ribotoxinas, la hirsutelina A (HtA) (Figuras 2 y 3) (Liu et al, 1996; Martínez-Ruiz et al, 1999b). Aunque sus propiedades funcionales coinciden con las de las ribotoxinas, presenta, al menos, dos diferencias claras. Además de ser producida por el hongo entomopatógeno *Hirsutela thompsonii*, que nada tiene que ver con los productores del resto de RNAsas extracelulares (clasificado hasta la fecha como deuteromiceto), su similitud de secuencia con las dos familias no supera el 25%. Tiene 20 aminoácidos menos que las ribotoxinas, correspondientes en su mayoría a las regiones expuestas adicionales que presenta esta familia respecto a la de la RNasa T1, pero parece que sí conservaría el núcleo de lámina  $\beta$  característico.

Dentro de la familia T1, las RNAsas U1 y U2, producidas por el hongo basidiomiceto *Ustilago sphaerogena*, son las más parecidas a las ribotoxinas, no sólo por su similitud de secuencia, sino también por su patrón de puentes disulfuro (Kanaya y Uchida, 1986; Takahashi y Hashimoto, 1988). En particular, la RNasa U2 posee 10 aminoácidos más que el resto de la familia (114 frente a 101-106) y su identidad con las ribotoxinas es del 34%, encontrándose a la menor distancia filogenética con respecto a ellas (Figuras 2 y 3).

Además del mecanismo enzimático de las RNAsas, que se detallará más adelante, otro de los aspectos ampliamente estudiados es su interacción con inhibidores, debido a su alta especificidad y a las implicaciones biológicas que suelen tener los mecanismos de regulación de la acción de estas enzimas. El denominado RI (*ribonuclease inhibitor*) está presente en los tejidos de mamíferos y actúa frente a la superfamilia de RNAsas tipo A, siendo esta inhibición una de las uniones más potentes que se conocen entre las moléculas biológicas; pero no se ha descrito que RI sea capaz de interaccionar con las RNAsas microbianas extracelulares (Kim et al, 1995; Hofsteenge, 1997). Sin embargo, sí se ha descrito un inhibidor proteico, denominado barstar, específico para las RNAsas extracelulares bacterianas (familia de la barnasa) (Hartley, 1997). Este inhibidor nada tiene que ver con el RI mencionado, ni desde un punto de vista estructural ni funcional. Su interacción con la RNasa barnasa se ha estudiado de forma exhaustiva, aunque su posible unión a otros miembros de la superfamilia, como la RNasa T1 y las ribotoxinas, permanece aún sin esclarecer. Sí parece lógico pensar que, el hecho de que únicamente aparezca en organismos procariotas, se deba a la ausencia en ellos de mecanismos de secreción que mantengan aislada la RNasa durante el proceso de transporte hasta el exterior celular.

### La familia de la RNasa T1

Esta familia de RNAsas está compuesta por una serie de proteínas extracelulares homólogas no tóxicas, que son secretadas por hongos, principalmente del género *Aspergillus* (Figura 2). Su principal miembro es la RNasa T1 que, junto con la ribonucleasa A (de la superfamilia de RNAsas pancreáticas) y la lisozima de clara de huevo de gallina, son las enzimas más exhaustivamente estudiadas de todas las que se conocen hasta hoy (Steyaert, 1997; Raines, 1998). Desde su aislamiento por primera vez en 1957 por R. Sato y F. Egami, la RNasa T1 se ha utilizado para llevar a cabo todo tipo de estudios, tanto



estructurales como funcionales. Como resultado de éstos, se conoce con gran detalle la reacción que cataliza, incluyendo el papel de los residuos implicados en la catálisis y en el reconocimiento del sustrato, así como su estructura acomplejada con distintos inhibidores y análogos del sustrato, algunos de los cuales representarían estados intermedios de su mecanismo catalítico (Figura 1) (Heinemann y Saenger, 1982; Arni et al, 1988; Gohda et al, 1994; Steyaert, 1997; Zegers et al, 1998; Loverix y Steyaert, 2001). La mayoría de sus características parecen ser extensibles al resto de miembros de la familia, bien porque hayan sido comprobadas directamente, bien porque simplemente se aceptan, basándose en su similitud de secuencia.

### **Características estructurales**

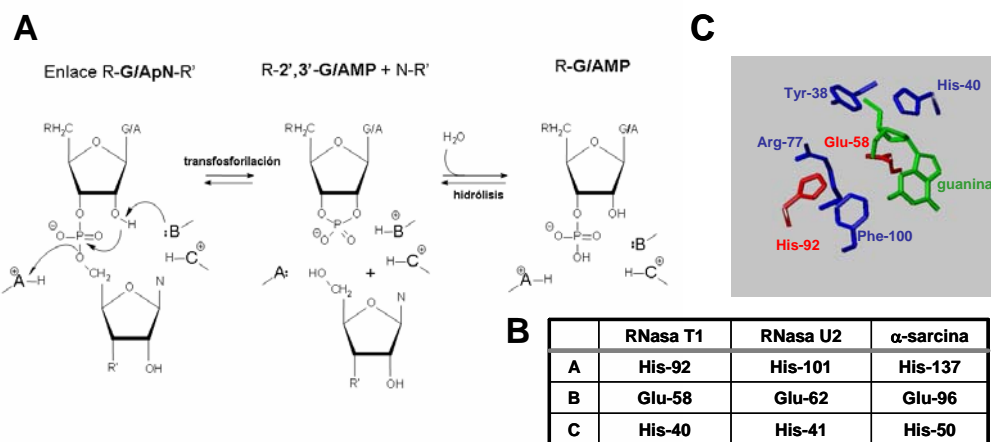
Son proteínas pequeñas de entre 100 y 114 residuos, con un marcado carácter ácido. La estructura tridimensional de la RNasa T1 (Arni et al, 1988) consiste en una lámina  $\beta$  central antiparalela compuesta por cinco hebras  $\beta$  y estabilizada por la presencia de una hélice  $\alpha$  acoplada, de forma perpendicular a ella, en su cara convexa. El resto de la molécula son cinco bucles expuestos al disolvente, sin una estructura ordenada, y otra pequeña lámina  $\beta$  de dos hebras, en el extremo amino terminal de la secuencia (Figura 1). A pesar de las grandes diferencias en cuanto a secuencia, éste es el patrón de plegamiento general de toda la superfamilia, incluidas las ribotoxinas (Mauguen et al, 1982; Pace et al, 1991; Pérez-Cañadillas et al, 2000).

Algo que también aparece conservado entre todas las RNasas extracelulares de organismos eucariotas es el puente disulfuro que une los extremos amino y carboxilo. Sin embargo, el resto de enlaces S-S (hasta un total de 3 en algunos casos) tiene una distribución diversa, pudiendo clasificarse los miembros de esta familia en 5 subfamilias, atendiendo a los distintos patrones conservados (Figura 3). Del mismo modo, los bucles periféricos, así como las regiones de los extremos, son los que presentan mayor diversidad, incluso dentro de la propia familia T1 (Figura 1).

### **Mecanismo catalítico**

Su actividad ribonucleolítica ocurre en dos etapas, siendo la primera, una transfosforilación reversible que da lugar a un intermediario cíclico (2',3'-ciclofosfato), la determinante (Figura 4A) (Loverix y Steyaert, 2001). La segunda etapa, hidrólisis de este intermediario cíclico en la que participa una molécula de agua, es más o menos reversible y rápida según la enzima. Este mecanismo es común para la mayoría de las RNasas (en algunos casos, sin embargo, se produce una hidrólisis directa) y se basa en una catálisis ácido-base en línea, en la que se producen desplazamientos nucleófilos de los átomos de oxígeno del grupo fosfato, originando estados de transición en los que el átomo de fósforo está unido pentacovalentemente al oxígeno. En cambio, el tipo de sustrato (RNA de cadena doble o simple), la especificidad del corte, los residuos catalíticos, tanto esenciales como no esenciales (Figura 1), así como las propiedades que definen a la enzima, varían según la familia de la que se trate. Para la familia T1, el sustrato que pueden hidrolizar es RNA de cadena simple, y son específicas de secuencias GpN (excepto la RNasa U2 que también hidroliza enlaces de tipo ApN) (Egami et al, 1980).

Los residuos catalíticos esenciales de la RNasa T1, que participan como ácido y base, respectivamente, en la primera etapa de la reacción, son His-92 y Glu-58 (Figuras 1 y 4) (Steyaert y Wyns, 1993). Ambos aparecen conservados en toda la superfamilia de la barnasa, mientras que en otros casos, por ejemplo el de la ribonucleasa A, son dos histidinas, en distinto estado de protonación, las responsables de la catálisis (Tabla I). De hecho, se ha planteado un mecanismo alternativo para la T1, en el que la acción del Glu-58 la lleva a cabo la His-40 (Nishikawa et al, 1987). Sin embargo, la verdadera función de este residuo en la enzima natural es la de contribuir a la activación nucleófila, cooperando con el Glu-58, próximo en la estructura, y estableciendo puentes de hidrógeno con el grupo 2'-OH de la ribosa que participa en el intermediario cíclico (Gohda et al, 1994). Otro residuo altamente conservado es la Arg-77, que parece participar en la estabilización del estado de transición aunque, como se verá más tarde, sólo ha podido estudiarse en el caso de las ribotoxinas (Figuras 1 y 4C) (Heinemann y Saenger, 1982; Masip et al, 2001). Además de éste, los residuos Tyr-38 y Phe-100 del centro activo participan en la optimización del grado de solvatación/desolvatación del intermediario. Este efecto es crítico en este tipo de catálisis ya que la estructura de bipirámide trigonal monoaniónica, que forma el grupo fosfato en la transición, aparece gracias a la presencia única de dos especies cargadas. Es decir, Tyr-38, Arg-77 y Phe-100 forman un microentorno, estructural y dieléctrico, complementario en forma, carga y capacidad de formar puentes de hidrógeno, con los átomos de oxígeno del estado de transición (revisado en Loverix y Steyaert, 2001).



**Figura 4: Hidrólisis de los enlaces fosfodiéster de RNA por parte de las ribonucleasas extracelulares fúngicas.**

**A.- Mecanismo en dos etapas a través de un intermediario cíclico.** La especificidad y eficacia según el tipo de enlace (bases A o G en 3', N en 5') depende de la RNasa ensayada; el tipo de sustrato (dinucleótido, homo o heteropolinucleótido) viene determinado por los restos R y R'. Los principales residuos que contribuyen a la catálisis están representados de forma esquemática por las letras A, B y C.

**B.- Residuos en las ribonucleasas T1, U2 y  $\alpha$ -sarcina.** A (ácido en la primera semirreacción, base en la segunda), B (base en la primera semirreacción, ácido en la segunda) y C, según el esquema de la parte A de la Figura.

**C.- Detalle del centro activo de la RNasa T1** deducido a partir de la estructura del complejo T1-análogo de GpU (entrada en PDB: 1b2m; Arni et al, 1999). En rojo aparecen los residuos A y B según el esquema anterior, en azul otros con implicación demostrada en la catálisis, en verde el extremo 3' del sustrato (guanina).

En cuanto a la especificidad de corte, la preferencia por guanina está determinada, en el caso de la RNasa T1, por interacciones adicionales de residuos del entorno del centro activo, en especial de las cadenas laterales de los residuos Tyr-42 y Glu-46 (Loverix et al, 1997). Así, la eficacia catalítica frente a sustratos del tipo GpN es del orden de  $10^6$  veces mayor que frente a ApN, a pesar de ser ambas bases púricas. Además, presenta un sitio secundario de unión al sustrato, encargado de discriminar la base en posición 5' según el orden siguiente: GpU>GpA>GpC (Osterman y Walz, 1978). Por tanto, el sustrato ideal para la RNasa T1 es GpC, lo que se justifica porque los residuos Asn-36 y Asn-98, producen un impedimento estérico en el hueco que deja el enlace 3'-P-5' (Steyaert et al, 1992). Para este dinucleótido, por ejemplo, la RNasa T1 presenta los siguientes parámetros enzimáticos en condiciones óptimas de reacción:  $K_M=200 \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}}=350 \text{ s}^{-1}$  y  $E_{\text{cat}}=1600 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Steyaert, 1997).

La conservación de estos residuos adicionales no es tan general dentro de las RNasas microbianas extracelulares (Figura 3), lo que explica, en muchos casos, las diferencias funcionales que aparecen entre ellas. De este modo, ninguno de estos cuatro residuos (36, 42, 46 y 98) está presente en la familia de la barnasa. Dentro de la propia familia de la RNasa T1 sólo aparece conservado en todos sus miembros el residuo de Tyr-42. El Glu-46 cambia únicamente en la RNasa U2, y las dos asparaginas mencionadas varían bastante dentro de las diferentes secuencias de esta familia de RNasas.

El centro activo se localiza en la cara cóncava de la lámina  $\beta$  central, y es la zona por la que la superposición de las distintas estructuras de esta superfamilia conocidas hasta la fecha muestra menores variaciones (Figura 1). Son los bucles que rodean este centro activo los que marcan la diferencia. En las RNasas del tipo T1 se encuentran totalmente accesibles al disolvente, siendo el bucle 5, el más corto, el que más interacciones presenta con las proximidades del centro catalítico. La estructura de la barnasa, en cambio, posee al menos uno de sus bucles con estructura parcial en hélice  $\alpha$  próximo al centro activo y, como se verá posteriormente, en las ribotoxinas éste está mucho más restringido por unos bucles de mayor tamaño en sus proximidades, e incluso por el establecimiento de interacciones entre residuos más alejados.

### ***Función biológica***

A pesar de lo mucho que se conoce en cuanto a la estructura y modo de catálisis de estas enzimas, su función biológica está aún sin esclarecer. Aunque muy escasos, hay ciertos estudios en los que se relaciona la presencia de una RNasa extracelular (en concreto la binasa, homóloga a la barnasa) con cambios en la superficie celular, aumentando la permeabilidad iónica y dando lugar a un efecto estimulante del crecimiento microbiano, aunque a mayores concentraciones este efecto se transforma en toxicidad (Makarov e Ilinskaya, 2003). Han sido más los estudios llevados a cabo con RNasas extracelulares de mamíferos. Tal es el caso, por ejemplo, de la angiogenina (de la superfamilia de la RNasa A) que, a sus conocidas propiedades angiogénicas a las que debe su nombre, añade una cierta actividad bactericida y antiviral, al secretarse en el lumen intestinal (Hooper et al, 2003).

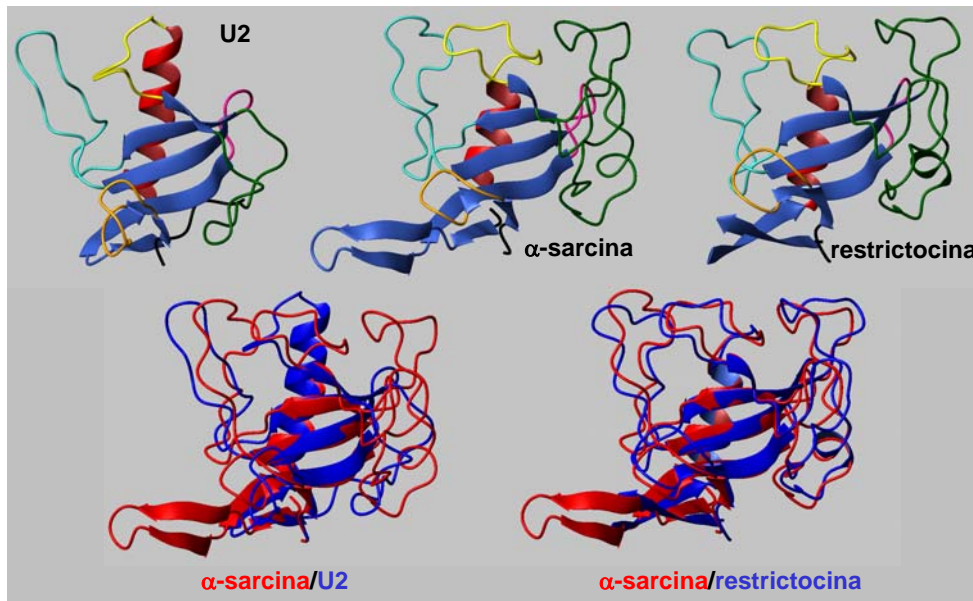
## La ribonucleasa U2

El descubrimiento de esta enzima se remonta al año 1968, al aislarse las ribonucleasas del medio extracelular de *Ustilago sphaerogena*, un parásito de plantas (Arima et al, 1968a y 1968b). Durante los años siguientes, se caracterizaron exhaustivamente sus propiedades enzimáticas, ya que su particular especificidad por purinas en el extremo 3' del enlace que hidroliza, y no sólo guaninas, como el resto de las RNAsas tipo T1, se utilizaba para la secuenciación de RNA y la síntesis de oligonucleótidos, algo que incluso hoy en día se sigue llevando a cabo (Lehmann y Bass, 2000). Sin embargo, su estudio se abandonó, y los únicos resultados publicados posteriormente se deben a la resolución de la estructura tridimensional, tanto de una isoforma modificada covalentemente como de varios complejos con análogos de sustrato, estos últimos solamente de forma preliminar (Noguchi et al, 1995; Noda et al, 1997). Ha sido recientemente, y en nuestro grupo, cuando el empleo de esta enzima, como el mejor modelo comparativo entre las ribotoxinas y las RNAsas de la familia T1, ha hecho que se retomara su estudio (Martínez Ruiz, 2000).

### **Características estructurales**

Se pueden detallar bastantes de sus características estructurales, bien gracias a estudios directos o por comparaciones con la RNasa T1, con la que comparte un 28 % de su secuencia (Noguchi et al, 1995). Es una proteína de 114 aminoácidos (12400 Da de masa molecular), un punto isoeléctrico de 3,18 y tres puentes disulfuro entre las posiciones 1-54, 55-95 y 9-113 (Figura 3) (Sato y Uchida, 1975a, 1975c). Este patrón explica, en parte, su posición en el árbol filogenético de la superfamilia de la barnasa (Figura 2). En este sentido, mientras que el enlace 9-113 está muy conservado entre las ribonucleasas extracelulares fúngicas, tanto en la familia de la T1 como en las ribotoxinas, el correspondiente a las cisteínas 55 y 95 es característico de las últimas y sólo se repite en las RNAsas no tóxicas secretadas por hongos basidiomicetos, esto es, U1, U2 y Po1. Otra característica es la presencia de dos isoformas al aislarse de su fuente natural (Uchida y Shibata, 1981; Kanaya y Uchida, 1986). La isoforma mayoritaria U2-A (o RNasa U2) es el producto original de la traducción del gen, mientras que la isoforma B posee una modificación postraducciona, un isoaspartato en la posición 32, que da lugar a una eficacia enzimática reducida, provocada por pequeños cambios conformacionales en la zona cercana al centro activo, como se dedujo de sus propiedades espectroscópicas. La estructura cristalina de esta proteína, obtenida en el año 1995 (Noguchi et al, 1995), permitió explicar la formación de esta modificación, al encontrarse el par Asn32-Gly33 justo antes de un bucle flexible que favorece el giro necesario de los ángulos de torsión entre estos residuos. Aunque en esta estructura aparece otro isoaspartato en la posición 44, éste proviene del tratamiento posterior de la muestra para la formación de los cristales. Además, con esta estructura se comprobó que la RNasa U2 mantenía el mismo plegamiento que el resto de la familia, con una superposición casi perfecta con la de la RNasa T1, a pesar de las diferencias en secuencia (Figuras 1 y 5). Por último, los residuos adicionales que esta enzima presenta afectan, fundamentalmente, a los bucles externos de la estructura, siendo, de este modo, algo más largos los bucles 2 (44-59), 3 (64-83) y el extremo amino-terminal

(Figura 3). También en estas regiones aparecen las mayores diferencias de secuencia con respecto a otras ribonucleasas; por contra, las zonas que incluyen a los residuos catalíticos son prácticamente idénticas. Estos hechos podrían explicar, por ejemplo, que la RNasa U2 y la T1 no se parezcan en cuanto a sus propiedades inmunogénicas (Uchida y Egami, 1971).



**Figura 5: Estructuras de la RNasa U2,  $\alpha$ -sarcina y restrictocina.** Las coordenadas provienen de los siguientes números de acceso del PDB respectivamente: 1RTU (Noguchi et al, 1995), 1DE3 (Pérez-Cañadillas et al, 2000) y 1AQZ (Yang y Moffat, 1996). Todas siguen el código de colores descrito en la Figura 3 para los distintos elementos de estructura secundaria, salvo en las superposiciones que se mantiene en rojo la  $\alpha$ -sarcina y en azul la RNasa U2 (izquierda) o la restrictocina (derecha).

### **Mecanismo catalítico**

En relación con su actividad ribonucleolítica, el intervalo de pH en el que ejerce su actividad fosfotransferasa es 3,5-5,5, diferencia fundamental con la RNasa T1, que actúa en un intervalo de pH más amplio, y la RNasa U1, también secretada por *Ustilago sphaerogena* de forma mayoritaria, para la que es de carácter neutro (Arima et al, 1968a y 1968b; Uchida y Egami, 1971). El estudio del mecanismo catalítico con distintos análogos de sustrato e intermediarios de la reacción permitió demostrar que se trataba también de una ribonucleasa ciclante, siendo la primera reacción reversible y la segunda, la hidrólisis del intermediario cíclico, mucho más lenta que en otros ejemplos de la familia, y asignar los pKa de los residuos ácido y base que participarían en la catálisis (Koike et al, 1971; Uchida y Egami, 1971; Yasuda e Inoue, 1982). Y, aunque no se ha demostrado mediante mutantes

del centro activo, la superposición de éste con el de la RNasa T1, además de estudios de modificación química, indican que estos residuos serían el Glu-62 y la His-101, contribuyendo posiblemente también a la catálisis, la His-41, la Arg-85 y la Phe-110. (Figura 4) (Sato y Uchida, 1975b; Egami et al., 1980; Noguchi et al, 1995).

En cuanto a la especificidad de corte, como en otros muchos ejemplos, se conserva a bajas concentraciones de enzima, siendo la preferencia de base en 3', A>G>>C>U, otra de las diferencias con la RNasa T1 (Uchida et al, 1970). Considerando el enlace completo, la ruptura es más eficaz en el caso de Pu-Py y Py-Pu que Pu-Pu y Py-Py, respectivamente (donde Pu es base púrica, A o G, Py es base pirimidínica, C o U, y los enlaces están esquematizados en sentido 3'-5') (Rushizky et al 1970). Esta variación en la especificidad, así como la ligera disminución de su actividad específica en condiciones óptimas, con respecto a la T1 (Uchida y Egami, 1971; Egami et al, 1980), se pueden explicar desde un punto de vista estructural. Por ejemplo, la secuencia 43-46 en la T1, que está implicada en el reconocimiento de la guanina, en el caso de la U2 cambia considerablemente, y el residuo Asp-49 (secuencia FDF) que interacciona con la molécula de agua en el segundo sitio de reconocimiento de la base, es una Thr en la U2 (secuencia ITL) (Figura 3) (Takahashi y Hashimoto, 1988). Por último, la disposición del bucle 2 deja el centro activo menos accesible al disolvente, lo que explicaría la menor actividad de la RNasa U2 (Figuras 1 y 5).

### **Función biológica**

Como ocurre con la mayoría de estas proteínas, tampoco ha sido estudiada. El hongo *Ustilago sphaerogena* es un patógeno de plantas, aunque se ha estudiado más el *Ustilago maydis*, patógeno de maíz (Blank y Dekker, 1975). En éste, el dimorfismo entre la forma de tipo levadura y la filamentosa es esencial para la patogénesis, induciéndose esta última al acidificar o con adición de pequeñas concentraciones de cAMP al medio (en los casos de falta de fuente de carbono) (Sánchez-Martínez y Pérez-Martín, 2001), condiciones que favorecerían la presencia de la RNasa U2 en el caso de que se dieran también para su organismo productor. Lo único que se conoce en cuanto a la producción de ribonucleasas por parte de *U. sphaerogena*, es que ésta se induce con la presencia de RNA en el medio, para utilizarlo como fuente de carbono (Glitz y Dekker, 1964).

Con todo ello, es la RNasa que más se parece a las ribotoxinas, no sólo por su proximidad filogenético y patrón de puentes disulfuro, sino también por su especificidad de sustrato y estructura tridimensional, con algunos de sus bucles más extensos que los de la RNasa T1, modelo de la familia.

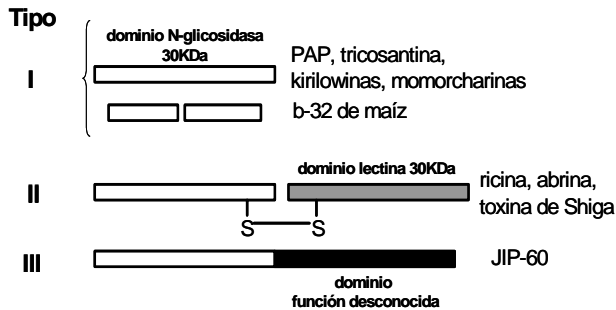
### **Expresión heteróloga**

Al considerarse un buen modelo para estudios comparativos entre las ribonucleasas extracelulares fúngicas, y con la intención de ser utilizada para el diseño de variantes y quimeras con otros miembros relacionados con ella, nuestro grupo abordó la expresión heteróloga de la RNasa U2 (Martínez-Ruiz, 2000). Muy brevemente, esto se puede resumir mencionando que se comenzó por el aislamiento y caracterización del correspondiente gen,

a partir de la cepa CBS 534.71 de *Ustilago sphaerogena*, lo que permitió demostrar la presencia de un intrón de 116 pb entre los codones de los residuos 36 y 37. Tras la obtención del cDNA, se realizaron unos primeros intentos de expresión en *E. coli*, tanto a nivel periplásmico como a nivel extracelular, aunque sin mucho éxito. Ello era debido, esencialmente, a la lisis de las células productoras, lo que sugería que esta proteína resultaba tóxica en este sistema. Por ello se cambió a la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. Las supuestas ventajas que este sistema presentaba, al tratarse de un organismo eucariota, eran una mejor formación de los puentes disulfuro, un control del pH del medio, que influiría en la formación de los enlaces isoaspartato característicos de esta proteína, y unas rutas de secreción parecidas a las que posee su productor natural. En cuanto al uso de esta especie frente a *Saccharomyces cerevisiae* u otros eucariotas superiores, *P. pastoris* es un sistema fácil, rápido y económico. En muchos casos la producción de proteínas recombinantes es superior en varios órdenes de magnitud, y el control de la expresión, utilizando sus sistemas de regulación para metabolizar metanol como fuente de carbono, se realiza de una forma muy estricta. El vector que mejores resultados dio fue pHLSU2 ya que no producía lisis celular y la proteína recombinante se secretaba al medio extracelular y, aunque en muy baja cantidad, sin contaminantes con actividad ribonucleolítica. La purificación de la RNasa U2 recombinante, del mismo modo que la silvestre, se llevó a cabo mediante una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa a pH 6,0 seguida de una de penetrabilidad en Sephadex G-75. Sin embargo, tras la caracterización de ambas preparaciones, supuestamente homogéneas, se observó que no eran idénticas, variando algunos de sus parámetros espectroscópicos y enzimáticos. Mientras que la RNasa U2 silvestre mostraba los mismos parámetros que se habían descrito previamente, la recombinante parecía adoptar una conformación ligeramente diferente, que sugería una reorganización de los puentes disulfuro debido a las dos cisteínas consecutivas en la secuencia. Estos datos indicaban, por tanto, la necesidad de una mejora en el sistema de aislamiento de la proteína recombinante, lo que forma parte de los Resultados de esta Memoria.

### Las ribotoxinas

Este calificativo se propuso para una familia de ribonucleasas del grupo de las RIP (*ribosome-inactivating proteins*) fúngicas que se encontraban entre los más potentes inhibidores del proceso de traducción, ya que, desde un primer momento, lo que más atrajo de ellas fue su extraordinaria capacidad citotóxica (Lamy y Davies, 1991; Lamy et al, 1992). De hecho, los estudios se enfocaron, en un principio, más que a la capacidad ribonucleasa al potencial efecto antitumoral que se podía desprender de su toxicidad, al verse ésta dirigida, en cierto modo, hacia determinados tipos celulares como los tumorales o los infectados por virus (Olson y Goerner, 1965; Olson et al, 1965; Fernández-Puentes y Carrasco, 1980; Fernández-Puentes, 1983; Hetler y Frankel, 1989).



**Figura 6: Esquema de los tres tipos de RIP (ribosome-inactivating protein) según los dominios o cadenas funcionales que poseen.** Los tres tipos mantienen el dominio N-glicosidasa, aunque en algún caso éste es procesado postraduccionalmente y está formado por más de una cadena polipeptídica. Dentro del tipo III se engloban todos aquellos ejemplos que no se ajustan a los anteriores, aunque el más representativo es el de la proteína JIP-60.

### Las ribotoxinas como RIP

El hecho de actuar de forma específica frente a ribosomas hizo que las ribotoxinas se incluyeran en el grupo de las proteínas inactivantes de ribosomas (RIP), aunque no compartan la mayor parte de las características que son comunes a todas ellas, razón por la cual, pocos autores las tienen en cuenta (Peumans et al, 2001). Este hecho, sin embargo, permite considerar una evolución convergente de estas dos familias. Las RIP, según su caracterización inicial, son secretadas por plantas, poseen un peso molecular de 27-32 KDa las de tipo I (formadas por una única cadena polipeptídica, descritas más de 50), y 56-65 KDa las de tipo II (formadas por dos cadenas polipeptídicas, 15 descritas), y actividad N-glicosidasa, ejercida de forma específica sobre un único nucleótido del RNA ribosomal (Figura 6) (Stirpe et al, 1992). En cuanto a su capacidad para internarse en las células diana, las de tipo II lo hacen gracias a la interacción de una de sus cadenas polipeptídicas, que es una lectina, con azúcares de la membrana, mientras que las de tipo I no tienen un mecanismo común, al no presentar un dominio específico para esa función, incluso muchas de ellas no son citotóxicas. Por lo tanto, las ribotoxinas, según sus características generales de interacción con membranas y su sustrato intracelular, tal y como se describirá más adelante, se podrían incluir en las RIP de tipo I con carácter citotóxico. Actualmente, debido a la aparición de numerosas excepciones a esta definición de RIP, se han modificado las características de la familia. Así, hay un nuevo grupo de RIP (tipo III), con proteínas que poseen dominios adicionales de funcionalidad desconocida (Figura 6) (Nielsen y Boston, 2001; Peumans et al, 2001). También se han descrito RIP de tipo I con un tamaño menor al esperado, lagenina y calcaelina (20KDa), e incluso producidas por otros organismos diferentes a las plantas (Wang y Ng, 2000; Ng et al, 2003). En cuanto a su actividad N-glicosidasa, ésta es tan destacable como la actividad ribonucleasa que ejercen las ribotoxinas, ya que también es una extraordinariamente específica frente al ribosoma, al dar lugar a una despurinización de la A<sup>4324</sup> (numeración del rRNA 28S de rata), situada junto al enlace fosfodiéster que hidrolizan las ribotoxinas, en el lazo sarcina/ricina (SRL) (Figura 7A y B) (Marchant y Hartley, 1995). Este SRL es una estructura muy característica del ribosoma, localizado dentro de la subunidad grande, en el mayor de los RNA ribosomales, y que resulta clave para su funcionalidad, como se describe en un apartado posterior de esta Memoria. El nombre de esta región del rRNA se explica fácilmente, ya que la ricina y la  $\alpha$ -sarcina son, respectivamente, la RIP de tipo II y la



ribotoxina mejor estudiadas, y de las toxinas más potentes, habiendo sido incluso la primera empleada en el diseño de armas biológicas (DaSilva et al, 2003). No obstante, una de las diferencias fundamentales entre estas dos toxinas se encuentra en la especificidad frente a distintos ribosomas. La ricina (aunque esto no es extensible a todas las RIP) sólo hidroliza ribosomas eucariotas, y sin embargo las ribotoxinas (en este caso, sí toda la familia) ejercen su acción frente a todos los tipos (Endo y Wool, 1982; Chaddock et al, 1996).

Tanto las RIP como las ribotoxinas producen la inhibición de la biosíntesis de proteínas que, en última instancia, es la causante de la muerte de las células diana. Sin embargo, recientemente se están descubriendo actividades adicionales de las RIP, que podrían estar relacionadas con diferencias sustanciales que se dan entre miembros de la familia, como un diferente mecanismo de acción, o función biológica, o especificidad de la toxicidad. Entre ellas se encuentra, por ejemplo, la actividad ribonucleasa de PAP, momorcharinas y kirilowinas; pero, aunque podría ser otra señal de la evolución convergente con las ribotoxinas, aún no está claramente demostrada, pues la posibilidad de la contaminación de las preparaciones no está del todo descartada (Mock et al, 1996; Peumans et al, 2001).

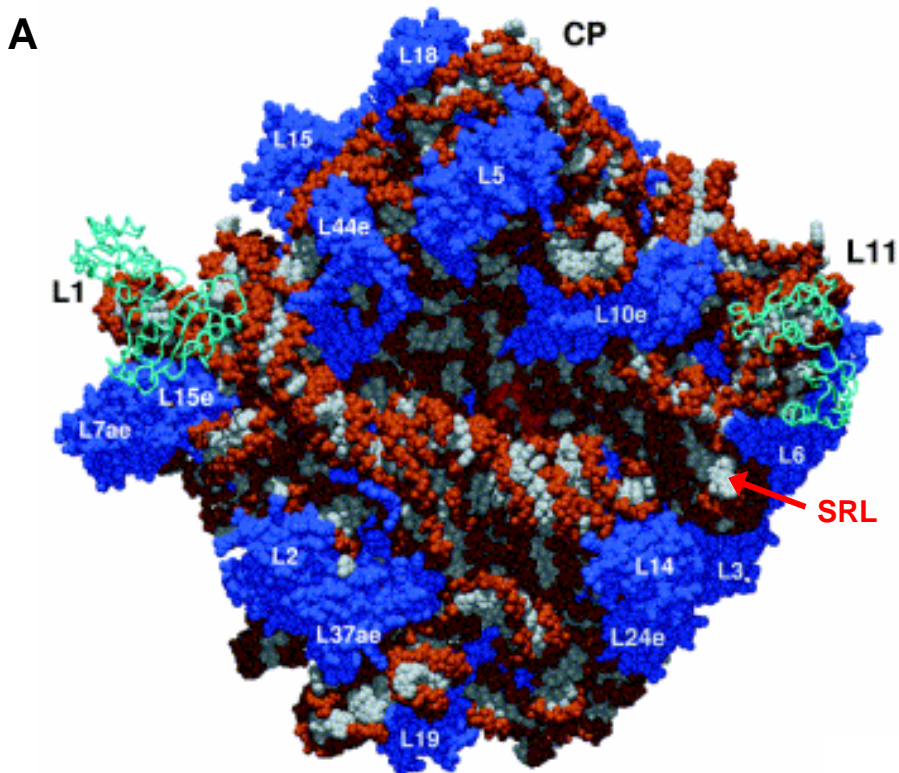
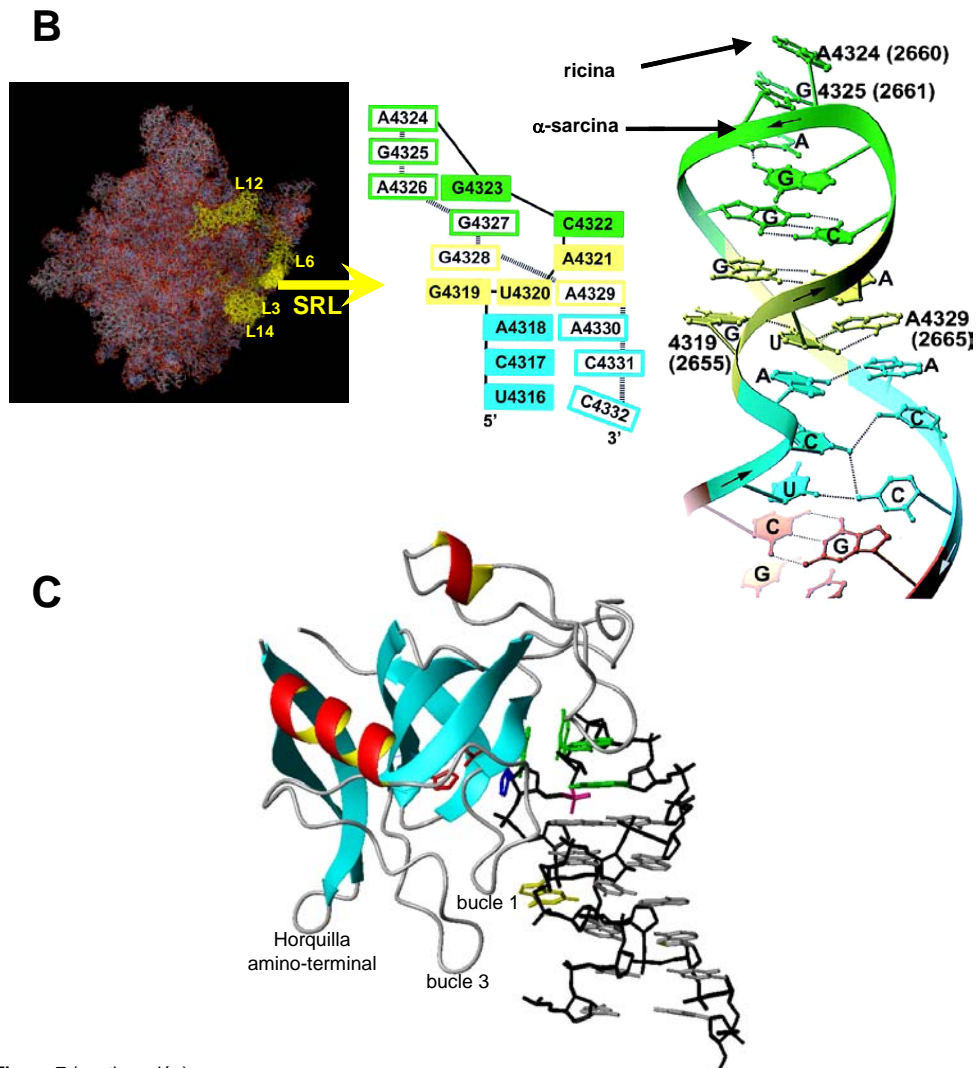


Figura 7: El sustrato de las ribotoxinas.

**A.- Estructura de la subunidad mayor del ribosoma de *H. marismortui* a 2.4 Å** (figura procedente de Steitz y Moore, 2003). Las proteínas (identificadas según la nomenclatura correspondiente) aparecen en azul y el RNA en blanco y rojo. Las proteínas mostradas como cintas verdes corresponden a estructuras obtenidas independientemente y acopladas en el modelo. Se indica la posición del lazo sarcina/ricina (SRL).

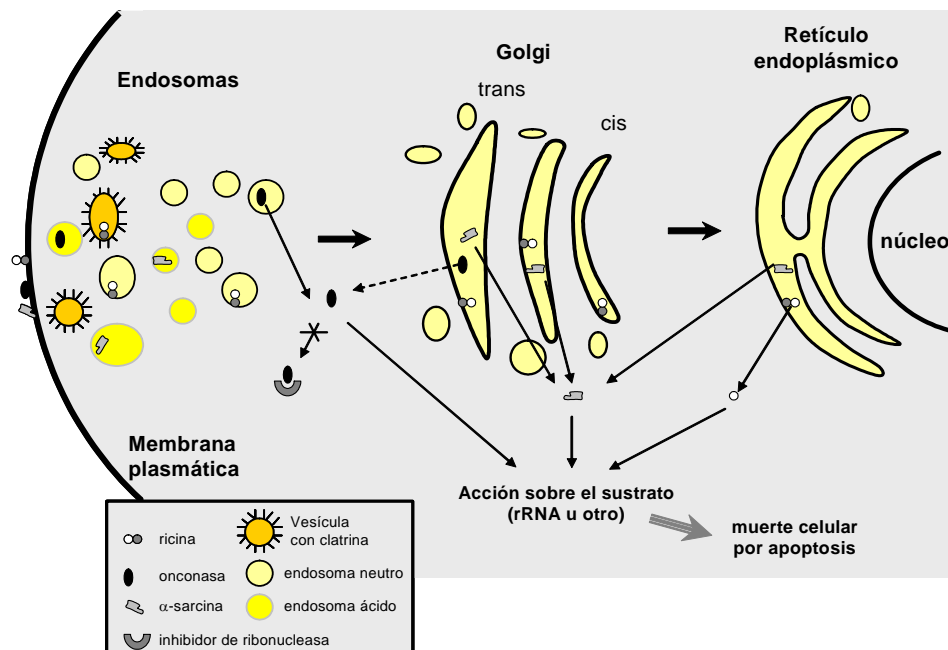


**Figura 7** (continuación):

**B.- Distintas características del lazo sarcina/ricina** (Correl et al, 1998). A la izquierda se señalan (amarillo) el SRL y algunas proteínas ribosomales adyacentes en la estructura tridimensional de la subunidad grande del ribosoma de *H. marismortui* (1JJ2 en el PDB). A la derecha se muestra la secuencia y estructura de dicho elemento procedente del ribosoma de rata (y entre paréntesis la numeración del correspondiente en *E. coli*). Con el mismo color aparece el mismo elemento de estructura secundaria en las dos representaciones; así, en rojo la zona con apareamientos de Watson y Crick, en azul la región previa a la G prominente (4319) y el giro S (amarillo), con apareamientos no canónicos, y en verde el tetrabucle, indicando las bases sobre las que actúan las proteínas ricina y  $\alpha$ -sarcina.

**C.- Estructura cristalina del complejo restrictocina-análogo de SRL** (Yang et al, 2001, número de acceso del PDB: 1JBS). En esta estructura el análogo del sustrato se encuentra distorsionado en la región del tetrabucle al compararlo con la estructura libre mostrada en B y por ello no se corta. La proteína se representa en modo de cinta con los residuos catalíticos resaltados en rojo, Glu-95, His-136 y azul, His-49. La nomenclatura de los bucles de la proteína es la misma que la que se ha dado a la  $\alpha$ -sarcina. En el RNA se señala el esqueleto fosfodiéster en negro y las bases nitrogenadas en gris a excepción de la G prominente en amarillo, el tetrabucle (GAnUdA) en verde, y el grupo fosfato objeto de corte por la enzima en rosa. (nU= 2'-amino-ribosa; dA= desoxirribosa).

A pesar de las grandes diferencias con las ribotoxinas, las RIP se pueden utilizar como modelo comparativo para explicar aspectos como la secreción por la célula productora, la internación en la célula diana, el reconocimiento del lazo sarcina/ricina en el ribosoma, la función biológica y las posibles aplicaciones terapéuticas. Así, la potencia como toxinas viene dada en ambos casos por su especificidad y rápido recambio a la hora de ejercer su actividad catalítica, siendo capaces, ambos tipos de toxinas, de matar una célula con una única molécula de proteína que alcance el citosol (Kao y Davies, 1995; Lord et al, 2003). En cuanto al reconocimiento del sustrato, la especificidad varía según la RIP; hay algunas que actúan únicamente sobre ribosomas eucariotas y otras sobre cualquiera (Chaddock et al, 1996). Por último, su mecanismo de secreción, mediante orgánulos membranosos, permite mantener en compartimentos diferentes las RIP y los ribosomas, además de producirse en forma de precursores inactivos que no adquieren la conformación nativa hasta encontrarse en las vacuolas (Frigerio et al, 1998). Para las ribotoxinas, sin embargo, debe darse una compartimentación efectiva durante su secreción porque los precursores son ribonucleolíticamente activos (Martínez-Ruiz et al, 1998).



**Figura 8: Representación esquemática de los mecanismos de entrada de distintas proteínas citotóxicas en la célula diana.** Se muestran la ricina como ejemplo de RIP tipo II (una cadena con actividad N-glicosidasa sobre el ribosoma y otra de reconocimiento del receptor de la membrana), la onconasa como ribonucleasa inespecífica capaz de evadir el inhibidor de ribonucleasas citosólico, y la  $\alpha$ -sarcina como ribotoxina. En los tres casos se da un proceso endocítico aunque de distintas características, especialmente en cuanto a la translocación al citosol se refiere.

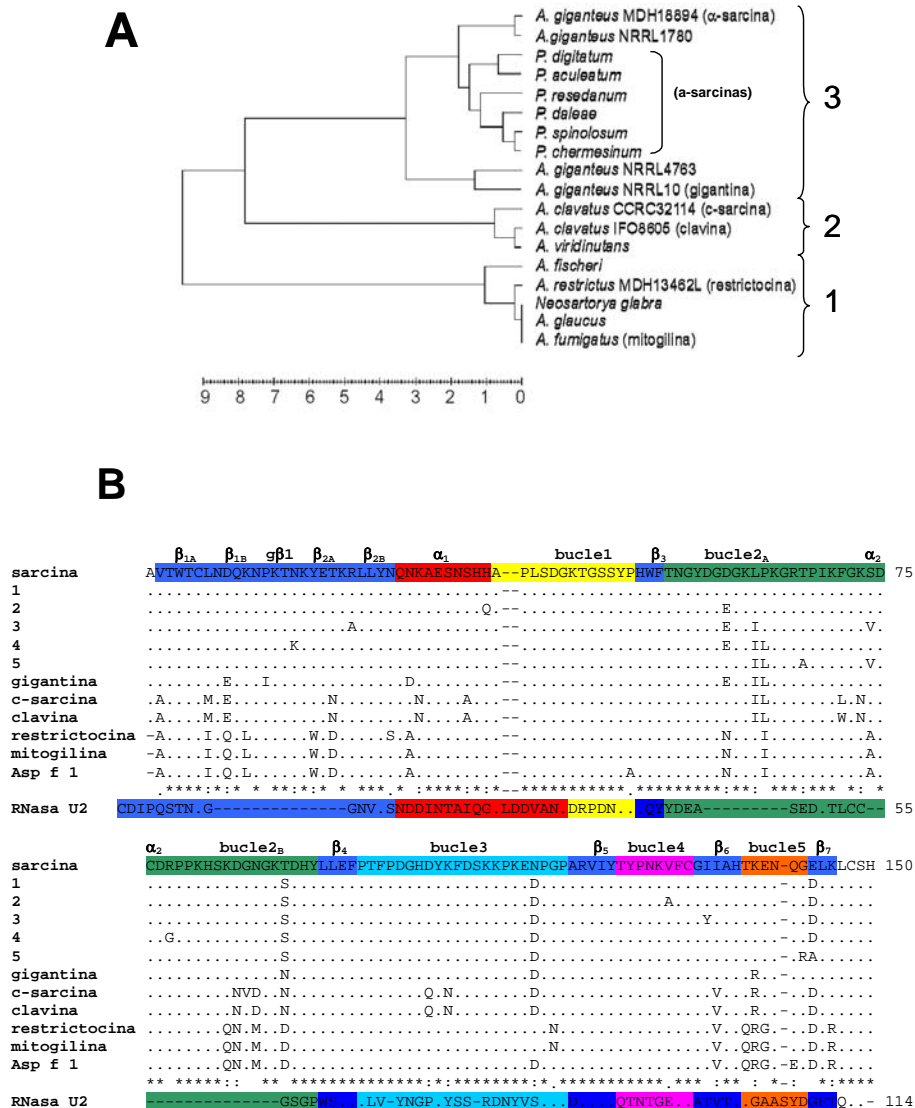
Respecto a la forma de entrada en la célula diana, la primera interacción con la membrana externa varía entre las RIP. Por ejemplo, las de tipo II interaccionan de forma específica con restos de galactosa (Agapov et al, 1997), y las de tipo I glicosiladas con receptores de carbohidratos (Nielsen y Boston, 2001), incluso algunas se unen al receptor de LDL o de quimiocinas (Chan et al, 2000b). La interacción directa con lípidos de la membrana, como ocurre con las ribotoxinas, se ha estudiado con RIP como la saponina (Liu et al, 1997). Posteriormente, la internación, que ha sido bien caracterizada para el caso de la ricina, se lleva a cabo mediante endocitosis, tanto dependiente como independiente de clatrina, llegando hasta el retículo endoplásmico donde, aprovechando el translocón, entra al citoplasma la subunidad catalítica y ejerce su actividad tóxica tras escapar del proteosoma (Figura 8) (Simpson et al, 1999; Sandvig y van Deurs, 2002; Lord et al, 2003). La muerte celular se produce por apoptosis (Bolognesi et al, 1996), en la que, según los casos, hay más factores implicados además de las caspasas (Zhang et al, 2001).

### **Características generales**

El primer miembro descubierto de la familia de las ribotoxinas fue la  $\alpha$ -sarcina, en el año 1963, dentro de un programa de búsqueda de sustancias antitumorales llevado a cabo por el Departamento de Salud de Michigan, recibiendo este nombre por los efectos inhibidores que producía ante el sarcoma 180 de rata (Olson y Goerner, 1965; Olson et al, 1965). De forma similar aparecieron la restrictocina y la mitogilina, pero no fue hasta finales de los años 70 cuando se descubrió su mecanismo molecular de acción (Schindler y Davies, 1977) y, ya en los 80, cuando se empezaron a establecer comparaciones con sus homólogas, las RNAsas microbianas extracelulares del tipo T1 (Sacco et al, 1983; López-Otín et al, 1984; Fernández-Luna, 1985).

Más recientemente se ha podido generalizar esta idea de ribonucleasas con funciones biológicas especiales (risbasas) al encontrarse casos similares entre otras superfamilias de RNAsas (D'Alessio et al, 1991). Dentro de la superfamilia de la RNasa A, por ejemplo, y a pesar de mantener el mismo plegamiento general en todos los casos, se encuentran, entre otras, la RNasa seminal bovina (BS) y la onconasa, con propiedades antitumorales (Matousek et al, 2003), la angiogenina con capacidad angiogénica y actividad "RIP" (Riordan, 2001) y la neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) (Rosenberg y Domachowske, 1999) (Tabla I). De este modo, es más correcto especificar "ribotoxinas fúngicas" para referirse a las homólogas a la RNasa T1.

Hasta la fecha, se han descrito como pertenecientes a esta familia 7 miembros producidos por el género *Aspergillus*, siendo los más representativos la  $\alpha$ -sarcina, la restrictocina, la mitogilina y Asp f 1. Además se han caracterizado seis genes de distintas cepas de *Penicillium* a los que se han denominado a-sarcinas, y un último estudio de distintas cepas fúngicas dio como resultado seis cepas más, positivas para la presencia del gen y de la proteína (cinco de *Aspergillus* y una de *Neosartorya glabra*). (Figuras 2 y 9) (Martínez-Ruiz et al, 1999a)



**Figura 9:**

**A.- Árbol filogenético de las ribotoxinas.** Se ha empleado la máxima secuencia nucleotídica, correspondiente a 76 aminoácidos, conocida en todos los organismos positivos para la presencia de ribotoxina (Martínez-Ruiz et al, 1999a). No está incluida la hirsutelina A. La escala es en porcentaje de distancias de Jukes y Cantor. Están agrupadas en tres subfamilias según estas distancias.

**B.- Alineamiento de secuencias de aminoácidos de las ribotoxinas.** Están incluidas todas las que se conocen de forma completa hasta la fecha excepto la hirsutelina A, además de la RNasa U2 como modelo comparativo. Se encuentran ordenadas según su identidad con respecto a la  $\alpha$ -sarcina. Los números 1-5 corresponden a las a-sarcinas de *Penicillium daleae*, *P. spinulosum*, *P. digitatum*, *P. resedanum* y *P. aculeatum* respectivamente. (.) representa el mismo residuo que en la secuencia de la  $\alpha$ -sarcina, (-) indica ausencia de aminoácido. Se señalan los distintos elementos de estructura secundaria para la  $\alpha$ -sarcina y la RNasa U2. El código de colores es el de las Figuras 3 y 5, la nomenclatura es la de la  $\alpha$ -sarcina. Secuencias obtenidas de la base de datos Swiss Prot.

Del análisis filogenético, realizado con la secuencia génica más larga que se conoce en todos estos casos, se extraen varias conclusiones (Figura 9A). La primera es que, a diferencia de lo que se pensó en un principio, la distribución de las ribotoxinas entre el reino de los hongos no está restringida sólo al género *Aspergillus* (Martínez-Ruiz et al, 1999a). El hecho de que las especies de *Penicillium* que contienen ribotoxinas aparezcan más próximas a ciertas especies de *Aspergillus*, que éstas últimas entre sí, tampoco debe sorprender tanto ya que estos dos géneros siempre han sido considerados como muy cercanos en la evolución, independientemente del método de análisis empleado (Verweij et al, 1995). Además, hay que destacar que algo similar ocurría ya dentro de la familia de la RNasa T1. Por último, esta clasificación permite hablar de tres grupos de ribotoxinas, aunque la máxima variabilidad de secuencia que aparece entre ellas es del 18%. Así, estarían la restrictocina, la mitogilina, la Asp f 1 (diferentes entre sí en un máximo de 5 aminoácidos) y las procedentes de *A. fischeri*, *A. glaucus* y *N. glabra* en el primer grupo; las secretadas por *A. clavatus* (clavina y c-sarcina) y *A. viridinutans*, en el segundo; y por último las del género *Penicillium* junto con las de *A. giganteus* (entre ellas  $\alpha$ -sarcina y gigantina).

Aunque mucho menos estudiadas, y con un tamaño más pequeño, han aparecido enzimas con una actividad similar a la de estas ribotoxinas fúngicas, siendo sus organismos productores diferentes a los mencionados hasta ahora. Es el caso de la tricolina (14 KDa, de *Trichoderma viride*) (Lin et al, 1991) y la hirsutelina A (14 KDa, de *Hirsutella thompsonii*) (Martínez-Ruiz et al, 1999b), de organismos microbianos, y de la RNasa (13 KDa) de *Biota orientalis* (Xu et al, 2004) y la lufina-S (10 KDa) de *Luffa cylindria* (Gao et al, 1994), producidas por plantas, aunque el mecanismo enzimático de esta última no se conoce lo suficiente como para clasificarla inequívocamente como ribotoxina. Esto corrobora la idea de que las ribotoxinas son enzimas más ubicuas de lo que hasta ahora se pensaba. Y el hecho de aparecer proteínas con una similitud de secuencia mucho menor que el 82%, que es el mínimo descrito para las anteriores, pero manteniendo propiedades funcionales, da idea de una evolución no tan reciente como se creía, que ha podido pasar por distintos intermediarios evolutivos lo que, de hecho, se piensa que representaría la hirsutelina A.

### **Características estructurales**

Todas las ribotoxinas fúngicas poseen 149-150 aminoácidos, son básicas y sus dos puentes disulfuro se encuentran perfectamente conservados, siendo uno de ellos homólogo a prácticamente todo el resto de RNasas microbianas extracelulares (6-148 en  $\alpha$ -sarcina, 6-103 en T1 y 9-113 en U2) y el otro igual al de las RNasas de los hongos basidiomicetos (76-132 en  $\alpha$ -sarcina, 55-95 en U2) (Figura 3) (Wool, 1997; Martínez-Ruiz et al, 1999a; Kao et al, 2001). En cuanto a su secuencia de aminoácidos, la comparación de todas las que se conocen deja ver la gran similitud entre ellas, pudiendo incluso considerarse que algunas fueran isoformas de una misma proteína (Figura 9B). Las mayores diferencias aparecen en las zonas amino y carboxilo terminal, así como en las regiones 59-74 y 84-90 (en el bucle 2), aunque muchos de los cambios son conservativos. Cuando se comparan con la de la RNasa U2, las secuencias adicionales que las ribotoxinas presentan se localizan esencialmente en las regiones 7-22, 64-74 y 82-97 (numeración de  $\alpha$ -sarcina) (Figura 9B). Además, se conoce la estructura tridimensional de dos de ellas, la  $\alpha$ -sarcina y la

restrictocina, que encajan perfectamente al superponerse, y mantienen el patrón de plegamiento general de las RNAsas microbianas extracelulares, una  $\alpha$ -hélice y 5 hebras  $\beta$  (Figuras 1 y 5) (Yang y Moffat, 1996; Pérez-Cañadillas et al, 2000), si bien en el caso de la restrictocina no se conoce la estructura de la segunda lámina  $\beta$  de la horquilla amino-terminal (Figura 9). En cuanto a las estructuras de las ribotoxinas y la de la RNasa U2 (Figura 5), llama la atención la estructura de la horquilla amino-terminal de las primeras, porque es mucho más larga y sobresale de lo que sería el núcleo estructural principal de la proteína (la segunda lámina y el giro  $\beta$  que son, simplemente, dos Gly en la RNasa U2) (Figura 9B). También destaca el bucle 2, de estructura no ordenada que es mucho más largo. Otras diferencias claras en cuanto a su estructura son, una  $\alpha$ -hélice algo más corta en las ribotoxinas y una distinta disposición de los cinco bucles que conectan el núcleo estructurado de todas estas proteínas. (Figura 5, superposición  $\alpha$ -sarcina/RNasa U2).

### **Mecanismo catalítico**

En cuanto a su actividad ribonucleolítica, también son ribonucleasas ciclantes ácidas (Figura 4), pero con una especificidad por el sustrato extraordinariamente más restringida que la simple preferencia por un tipo de nucleótido (Lacadena et al, 1998). Su sustrato natural es el ribosoma (de ahí el estar incluidas dentro de las RIP), y en concreto, como ya se ha comentado, el único enlace fosfodiéster que rompen ( $G^{4325}$ - $A^{4326}$  del rRNA 28S de rata) está localizado en el lazo sarcina/ricina, dando lugar al comúnmente llamado fragmento  $\alpha$  (488 bases en el rRNA 28S de rata) como producto de la reacción (Figura 7A y B) (Endo y Wool, 1982; Endo et al, 1983; Endo et al, 1988). La acción de las ribotoxinas desemboca en la inhibición de la síntesis de proteínas de la célula sobre la que actúan, al ser este corte suficiente como para impedir la unión al ribosoma de factores esenciales en el proceso de traducción, aminoacil-tRNA dependiente de EF-1:GTP y EF-2:GTP (o EF-Tu y EF-G, respectivamente, si son ribosomas procariontes) (Brigotti et al, 1989). Una vez descubierto su mecanismo de acción, éste ha sido objeto de numerosos estudios, con la intención de discernir el modo por el que las ribotoxinas son tan específicas. Así, no sólo la estructura del ribosoma, obtenida recientemente (revisado por Moore y Steitz, 2003), o la de las propias ribotoxinas, y complejos con análogos de sustrato (Yang et al, 2001), están arrojando luz a esta interacción (Figura 7A y C), sino también los estudios bioquímicos, con variantes tanto del sustrato como de la propia enzima, y cuyos orígenes se remontan a hace unos 30 años (Endo et al, 1988; Glück et al, 1994; Kao y Davies, 2000). En este sentido, sin embargo, los estudios comparativos entre los distintos miembros de la familia son escasos. De forma cualitativa se ha comprobado que todas las ribotoxinas de las que se conoce su secuencia de aminoácidos, y se han aislado a homogeneidad suficiente, conservan dicha especificidad cuando se utilizan a concentraciones bajas de proteína (intervalo nM). Del mismo modo que ocurre con la RNasa U2 y su familia, esta especificidad se pierde a medida que se aumenta la concentración de enzima. Con concentraciones del orden micromolar son capaces de hidrolizar el RNA de forma exhaustiva, presentando una preferencia por guanina en el extremo 3' (Endo et al, 1983). Esta pérdida de especificidad se demuestra con la hidrólisis por parte de las ribotoxinas de análogos de sustrato, como homopolinucleótidos del tipo poli(A), poli(G) y poli(I). Incluso el sustrato mínimo, un

dinucleótido, es susceptible a esta hidrólisis, a pesar de no tener mucho que ver con el sustrato natural en cuanto al modo en el que es reconocido por la enzima. Esta actividad “inespecífica” ha permitido estudiar el mecanismo catalítico a nivel molecular, comprobándose que, al igual que las otras RNAsas no tóxicas representadas por la RNasa T1, son ribonucleasas ciclantes, con un centro activo prácticamente idéntico (Figura 1) (Lacadena et al, 1998; Lacadena et al, 1999). Sin embargo, una diferencia fundamental es su eficacia catalítica en relación con esta actividad inespecífica, que es varios órdenes de magnitud menor. Por lo tanto, la ventaja que presentan las ribotoxinas, en cuanto a su actividad ribonucleasa, frente sus homólogas no tóxicas, es su extraordinaria especificidad. Es decir, considerando como sustrato el ribosoma completo, las ribotoxinas son mucho más eficaces que las RNAsas no específicas, ya que sólo necesitan hidrolizar un único enlace, de los cerca de 7000 presentes en el ribosoma, para inactivarlo (Endo et al, 1983).

### ***El ribosoma como sustrato de las ribotoxinas***

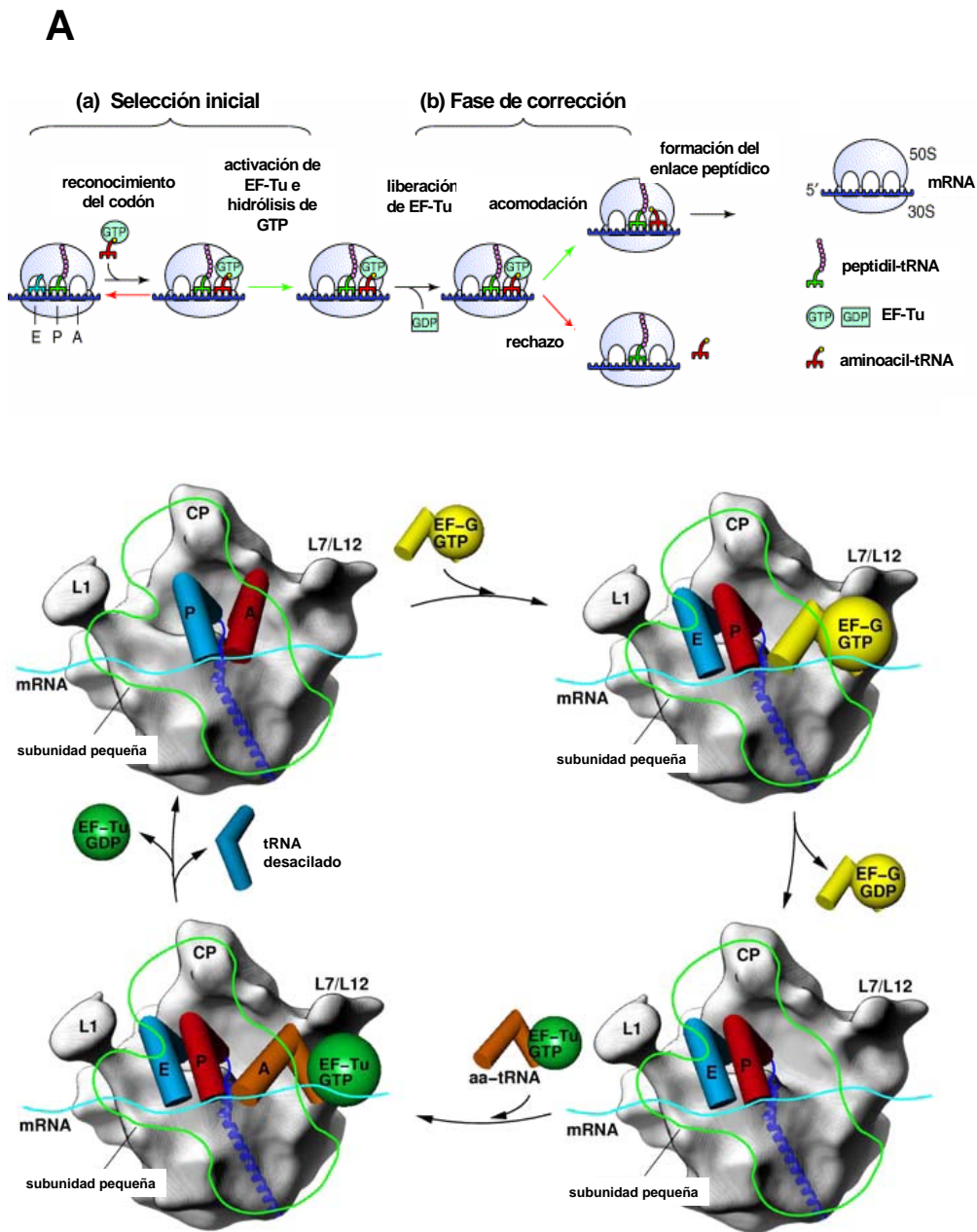
El ribosoma es uno de los complejos macromoleculares esenciales para cualquier organismo capaz de replicarse, y esto incluye no solamente a las células, tanto eucariotas como procariotas, sino también a los virus, que lo aprovechan de la célula que infectan. De hecho, se encuentran también en mitocondrias y cloroplastos, restos evolutivos de organismos vivos independientes (Mears et al, 2002). A pesar de su gran complejidad, el ribosoma está altamente conservado en todas las especies vivas, lo que da cuenta de la importancia de su función, la biosíntesis de proteínas. El interés que despierta se ve reflejado en el gran número de publicaciones recientes (véanse las referencias citadas en Brodersen et al, 2002 y Klein et al, 2004), especialmente centradas en la determinación de su estructura, pero también en su funcionalidad, tanto directa como en relación al metabolismo celular. En este contexto ha sido determinante el estudio del modo de acción de sustancias tóxicas, que interfieren en los distintos eventos que ocurren durante la formación del enlace peptídico. No se trata sólo de las ribotoxinas y las RIP, sino también antibióticos del tipo de la puromicina y la tioestreptona que, en definitiva, actúan bloqueando la formación del enlace peptídico (Rodríguez-Fonseca et al, 2000; Brandi et al, 2004), u otros como la eritromicina, que producen su efecto inhibitorio sobre el canal de salida del péptido formado (Tenson et al, 2003). Sin embargo, la mayor potencia de las RIP y las ribotoxinas, en comparación con los antibióticos mencionados, se basa en que son enzimas y, además, con una extraordinaria capacidad de recambio. Así, para la ricina, por ejemplo, ésta es de  $1500 \text{ min}^{-1}$  y para la  $\alpha$ -sarcina de  $55 \text{ min}^{-1}$  (Olsnes et al, 1975; Endo et al, 1983; Larsson et al, 2002).

La traducción del mRNA pasa por varias etapas clave, que se localizan en la zona de interacción de las dos subunidades del ribosoma (Figura 10A). Entre ellas está el reconocimiento, energéticamente favorable, del par codón-anticodón, entre el mRNA y el aminoacil-tRNA correspondiente, que se da en la subunidad pequeña, y la formación del enlace peptídico, catalizada por el centro GTPasa, en la subunidad grande (Ogle et al, 2003; Rodnina y Wintermeyer, 2003). El hecho de que este centro GTPasa esté constituido enteramente por rRNA permite considerar al ribosoma, en esencia, como una ribozima (Steitz y Moore, 2003). En ambos procesos participa el aminoacil-tRNA portador del



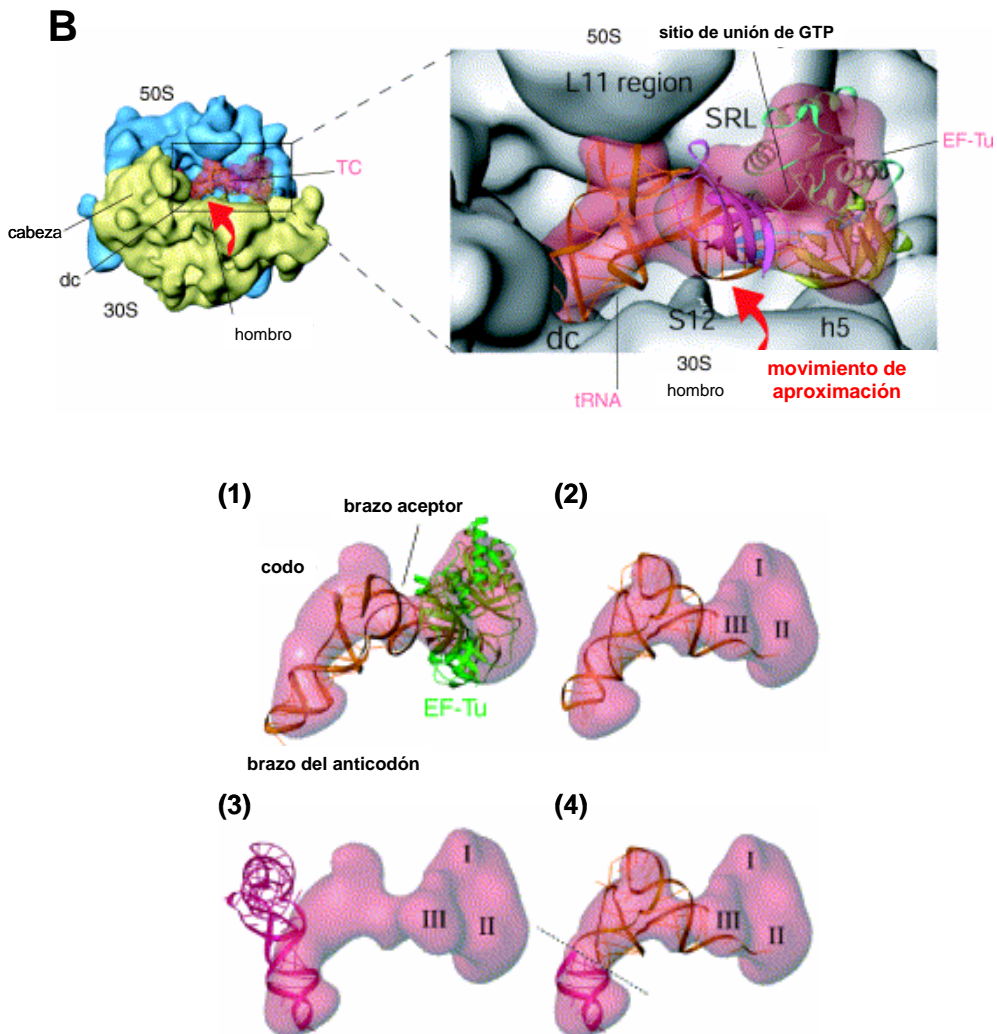
aminoácido que se va a incorporar a la cadena peptídica, aunque en conformaciones diferentes, y para ello, entre otras cosas, se requiere de la interacción con el factor de elongación Tu (o eEF-1 de eucariotas). Este complejo ternario, aminoacil-tRNA:EF-Tu:GTP, se ancla en el ribosoma, de forma que el reconocimiento del anticodón del tRNA favorece la hidrólisis de GTP por parte del factor de elongación (por un reordenamiento de su dominio G), que se libera, dando lugar al cambio conformacional requerido por el tRNA para que se forme el enlace peptídico (Figura 10) (Rodnina et al, 1995; Valle et al, 2003a). La mayor parte de las interacciones esenciales que se dan a lo largo de este proceso ocurren en la subunidad grande del ribosoma, tanto con el RNA ribosomal (el centro GTPasa y el SRL), como con proteínas ribosomales: la L11, que ayuda a mantener la conformación del centro GTPasa, el heterodímero L7/L12, y, algo más alejadas, la L3, L6 y L14 (nomenclatura de organismos procariontes para todas ellas) (Figuras 7A y 10) (Ban et al, 1999; Uchiumi et al, 1999; Uchiumi et al, 2002; Wilson y Nechifor, 2004). Los estudios bioquímicos que han demostrado estas interacciones se han corroborado con las numerosas estructuras obtenidas por difracción de rayos X, tanto de proteínas ribosomales y de fragmentos del rRNA, como de las subunidades completas de ribosomas procariontes (Noller et al, 2001; Olge et al, 2003; Steitz y Moore, 2003). Además, la criomicroscopía electrónica está permitiendo estudiar distintos pasos individuales de la elongación, con distintos factores y moduladores unidos (Valle et al, 2003a y 2003b; Gilbert et al, 2004).

En el ribosoma, el SRL, el lazo localizado en el dominio VI del rRNA 23S (o 28S en rata), está formado por un tallo de RNA en doble hélice, que mantiene el tetrabucle GAGA y la guanina denominada G prominente, y tiene un total de 30-35 nucleótidos, de los que 12 están universalmente conservados (5'-AGUACGAG↓AGGA<sup>A</sup>/cC-3') (Figura 7B) (Szewczak et al, 1993; Szewczak y Moore, 1995; Seggerson y Moore, 1998). Se ha resuelto la estructura de este lazo de forma independiente, coincidiendo con la que muestra en el ribosoma, y observándose que se encuentra expuesto dentro de la subunidad grande (Figura 7A y B) (Correll et al, 1998 y 1999; Ban et al, 1999). Además, los ensayos bioquímicos han demostrado que, no sólo las ribotoxinas (que hidrolizan el segundo enlace GA del tetrabucle) y las RIP que actúan como la ricina (desadenilando la primera A del tetrabucle), sino que también los factores de elongación EF-Tu y EF-G (EF-1 y EF-2 respectivamente en eucariotas) interaccionan con este SRL, con lo que se daría una competencia en una situación *in vivo* (Moazed et al, 1988). Hasta ahora, por lo que se ha descrito, parece que el reconocimiento de este sustrato por las ribotoxinas se da a través de la G prominente y el giro S que, según el cristal SRL-restrictocina, interaccionaría con los bucles 1 y 3 de la proteína, siendo dicho nucleótido el único realmente esencial para la actividad ribonucleolítica específica (Figura 7C) (Macbeth y Wool, 1999; Yang et al, 2001). Una vez "anclada" la ribotoxina, ésta ejercería su acción sobre el enlace situado a 12 Å de esa G prominente, no siendo estrictamente necesario el que en él participe otra G (Glück y Wool, 1996). Por último, parece darse un cambio de conformación en el tetrabucle GAGA, provocado por la interacción RNA-proteína, para permitir la reacción de hidrólisis a través del intermediario cíclico, algo, por otro lado, también descrito para la RNasa T1 en su mecanismo catalítico (Correll et al, 1998).



**Figura 10: Diagrama del proceso de biosíntesis de proteínas por el ribosoma.**

**A.- Dinámica de la formación del enlace peptídico.** (Parte superior) Unión del complejo aminoacil-tRNA-EF-Tu al sitio A del ribosoma y etapa de comprobación de la lectura correcta del par codón-anticodón, acontecimientos previos a la formación del enlace peptídico (Ramakrishnan, 2002). (Parte inferior) Secuencia de la unión, hidrólisis de GTP y liberación de los dos factores de elongación, EF-Tu y EF-G, así como algunos de los cambios conformacionales observados con respecto a los aminoacil-tRNAs unidos al ribosoma (Ban, 2004).



**Figura 10 (continuación):**

**B.- Detalle de la estructura del complejo aminoacil-tRNA-EF-Tu unido al ribosoma** (Valle et al, 2002). (Parte superior) La estructura cristalina del complejo ternario unido al ribosoma se ha acoplado a la densidad electrónica correspondiente obtenida por criomicroscopía. Se señalan los elementos de contacto del aminoacil-tRNA-EF-Tu (TC) con ambas subunidades, destacando el SRL. (dc: zona de interacción codón-anticodón). (Parte inferior) Ajuste de la estructura cristalina del complejo ternario en su forma libre (completo en 1; sólo el tRNA, en naranja, en 2), y la del aminoacil-tRNA, procedente de un complejo con el ribosoma (en 3 y 4, color rosa), al mapa obtenido por criomicroscopía. La combinación de ambos ajustes sugiere el posible movimiento ejercido por el tRNA tras la liberación de EF-Tu (3 y 4) para la formación del enlace peptídico, inducido por el movimiento de cierre de la subunidad pequeña sobre la grande del ribosoma (indicado en la parte superior).

En cuanto a la inactivación del ribosoma producida por esta hidrólisis, se debe a la imposibilidad de unión de los factores de elongación a esa región (y probablemente también de los de iniciación y terminación), necesaria para anclar los aminoacil-tRNA y promover,

posteriormente, una conformación adecuada para la formación del enlace peptídico (EF-Tu) así como su translocación dentro del ribosoma (EF-G) (Figura 7A) (Miller y Bodley, 1991; Furutani et al, 1992; Andersen et al, 2003). Aunque esto no está estudiado en detalle, probablemente sea un cambio de conformación del SRL, tras su hidrólisis, lo que desencadene el efecto inhibitorio (Larsson et al, 2002).

El reconocimiento de proteínas ribosomales por parte de las ribotoxinas no parece esencial, ya que éstas también producen la hidrólisis específica del rRNA desnudo, aunque mucho menos eficazmente (Miller y Bodley, 1988). Pero sí se han observado ciertas interacciones, no sólo con la  $\alpha$ -sarcina, sino también con otras RIP, como la PAP o la ricina, que estarían de acuerdo con el entorno del SRL definido mediante cristalografía. Por ejemplo, la L3 (conservada en eucariotas y procariotas) parece verse afectada por la  $\alpha$ -sarcina y la ricina, mientras que la L14e (que sólo aparece en eucariotas) sólo lo estaría por esta última (Terao et al, 1988). Otro factor a tener en cuenta es que las proteínas que contactan con el SRL no están universalmente conservadas en los organismos vivos, pudiendo estar en ellas la clave de la diferente actividad de ribotoxinas y RIP en ribosomas eucariotas o procariotas (Uchiumi et al, 2002).

### ***Interacción con membranas***

La capacidad para atravesar la membrana plasmática de la célula diana es la principal diferencia de las ribotoxinas con respecto a las RNAsas de la familia T1, y es el factor limitante de su citotoxicidad. Descubierta su actividad antitumoral y la base molecular de ésta, se comenzó el estudio de su interacción con membranas. Inicialmente se buscó un receptor que les confiriera cierta especificidad ya que, a pesar de que su sustrato catalítico natural está universalmente conservado, la acción citotóxica es más efectiva en unos tipos celulares que en otros. Sin embargo, al contrario que otras RIP con actividad tóxica, como son las de tipo II, representadas por la ricina (Stirpe et al, 1992), no se ha encontrado dicho receptor específico. Además, al ser las ribotoxinas proteínas sin glicosilar, tampoco se puede pensar en un reconocimiento inespecífico de azúcares por parte de algún receptor de la célula diana. Los estudios llevados a cabo por nuestro grupo, acerca de la interacción de la  $\alpha$ -sarcina con vesículas lipídicas modelo, han permitido concluir que la interacción con los fosfolípidos de la bicapa es suficiente en estas proteínas para su translocación (Oñaderra et al, 1993), mostrando especificidad por los lípidos presentes (Gasset et al, 1989). Su preferencia por fosfolípidos ácidos, como la fosfatidilserina y el fosfatidilglicerol, es clara, lo que sería explicable por su carácter básico, que favorecería las interacciones electrostáticas (Gasset et al, 1991b; Mancheño et al, 1994). Esto podría explicar la preferencia de las ribotoxinas por células diana de tipo tumoral, o infectadas por virus, en las que la pérdida de asimetría de la membrana plasmática expone al medio extracelular una concentración de PS mucho mayor que la que se da en una célula normal (Fernández-Puentes y Carrasco, 1980; Turnay et al, 1993). Aún así, éste es todavía un terreno bastante desconocido, ya que las estructuras lipídicas de las membranas biológicas son mucho más complejas que los sistemas modelo habituales, no sólo en cuanto a composición sino también por el recambio constante de lípidos entre ellas, al participar en una gran diversidad de procesos biológicos, principalmente relacionados con el transporte.

**Citotoxicidad**

Si los estudios a nivel de vesículas modelo no explican todavía determinados aspectos de la interacción ribotoxina-membrana, los llevados a cabo *in vivo* tampoco han sido definitivamente clarificadores. Sí se sabe que las ribotoxinas son citotóxicas para toda una variedad de tipos celulares (Fernández-Puentes, 1983; Turnay et al, 1993; Lipandri et al, 1997), pero no hay modelos de entrada en la célula diana que puedan explicar las diferencias entre unos casos y otros. Lo más concluyente se ha observado para la  $\alpha$ -sarcina, cuya llegada al citoplasma de las células diana ocurre por transporte mediante endosomas ácidos, independiente de clatrina, dándose su translocación desde el aparato de Golgi (Figura 8) (Olmo et al, 2001). Además, la toxicidad que ejerce es totalmente dependiente de su actividad sobre los ribosomas, que desencadena el proceso apoptótico implicando a la caspasa-3. A pesar de no conocerse muchos más datos al respecto, se pueden extrapolar algunos de los resultados obtenidos con otras ribonucleasas, e incluso con algunas RIP, como lo que se ha comentado acerca de la ricina (Figura 8).

En el universo de las ribonucleasas, las ribotoxinas no son las únicas proteínas citotóxicas. Dentro de la superfamilia de la barnasa, algunas de las ribonucleasas microbianas también lo son, como la propia barnasa y la binasa, ambas con efectos nefrotóxicos (Makarov e Ilinskaya, 2003), y la RNasa Sa3, capaz de matar ciertas células tumorales (Sevcik et al, 2002). La citotoxicidad de esta última ha sido atribuida, recientemente, a su particular basicidad al compararse con la de otros miembros de la familia, tan cercanos como Sa (50% de similitud) (Figura 2). De hecho, aumentar la carga positiva de la RNasa Sa, pasando de tener  $pI=3,5$  a  $pI=10,2$ , le confiere una toxicidad similar a la de Sa3 (Ilinskaya et al, 2002). Más alejadas filogenéticamente se encuentran las ribonucleasas de la superfamilia de la RNasa A. En cuanto a ellas, destacan los estudios comparativos de citotoxicidad entre la RNasa BS, la onconasa y la propia RNasa A (Matousek et al, 2003). Al ser enzimas procedentes de organismos eucariotas, y de patrón de plegamiento similar, es esperable que sean susceptibles al inhibidor intracelular (RI) de ribonucleasas. La toxicidad que presenta la RNasa BS, en contraposición a la RNasa A, se atribuye a su capacidad de dimerizar, lo que posibilitaría su interacción con membranas y su escape a la acción del RI (Antignani et al, 2001; Leland y Raines, 2001). La onconasa (ya en fase III de estudios clínicos), con un 30% de similitud con la RNasa A, tampoco es inhibida por RI y, además, es más básica que ésta y mucho más estable (Haigis et al, 2003). Confirma esta relación citotoxicidad-incapacidad de unión a RI el hecho de que aumentando la basicidad de la RNasa A, así como dimerizándola, se consigue incrementar su citotoxicidad (Di Donato et al, 1994; Vatzaki et al, 1999). Recientemente, se ha observado que tanto la RNasa A como la onconasa se unen a la superficie de las células diana de tipo carcinoma y también penetran en ellas vía endocitosis ácida hasta llegar al trans-Golgi (Haigis y Raines, 2003). La acidez de los endosomas no es necesaria, sin embargo, para la translocación de estas proteínas al citosol. De hecho, la única diferencia a este respecto entre ambas es que la onconasa no necesita llegar al aparato de Golgi para pasar al citosol (Figura 8). Variaciones en los pasos finales de la endocitosis, relacionados con su citotoxicidad, también ocurren con la RNasa BS que, a pesar de ser capaz de internarse en células normales y transformadas, sólo alcanza el citosol si lo hace desde el

aparato de Golgi, y esto ocurre, únicamente, en las células malignas (Bracale et al, 2002).

Por todo ello, parece claro que uno de los factores claves en la citotoxicidad es la basicidad de la toxina, lo que permite incluso especular con interacciones glicosídicas con la membrana diana, ya sea a través de glicoproteínas o de glicolípidos. Apoya esta teoría el caso de las defensinas y las cecropinas, péptidos anfipáticos básicos y tóxicos, capaces de aumentar la permeabilidad de la membrana en tumores (Johnstone et al, 2000). Pero no sólo influye la basicidad, sino también las diferencias entre distintas células y distintas ribonucleasas, en lo referente al proceso de endocitosis, así como la susceptibilidad a los inhibidores de ribonucleasas.

Otra hipótesis que se está contemplando actualmente acerca de la toxicidad implica a las actividades secundarias que se están descubriendo en las ribonucleasas. Para el caso de las ribonucleasas bacterianas, su toxicidad parece estar relacionada con la actividad de los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$ , que se encuentran desregulados en células malignas (Ilinskaya et al, 2004). La onconasa aparece implicada en la participación de los siRNA en la señalización celular, desencadenando, en última instancia, respuestas relacionadas con el oncogen ras (Ardelt et al, 2003). En el caso de la  $\alpha$ -sarcina, sin embargo, hay una correlación clara entre su capacidad de inhibir la biosíntesis de proteínas, y la apoptosis que provoca en las células diana (Olmo et al, 2001). Lo que no se ha encontrado, en ningún caso, son receptores específicos en la membrana extracelular, aunque la unión sea inicialmente reversible y saturable.

### ***Función biológica***

Poco se conoce a este respecto. Las RIP, por ejemplo, también secretadas y potentes toxinas, tienen funciones biológicas principalmente relacionadas con la defensa de plantas ante patógenos (Nielsen y Boston, 2001). Las de tipo II (ricina) ejercen su toxicidad frente a todo tipo de organismos excepto hongos y bacterias, y las de tipo I, en muchos casos, son potentes antivirales, y es el estrés, tanto biótico como abiótico, el que induce su expresión. Sin embargo, para las ribotoxinas, sólo hay un par de estudios en los que se ha relacionado su expresión con la maduración de los conidióforos de los hongos productores, al encontrarse mayoritariamente en los primeros pasos de este proceso, y no en las hifas (Brandhorst y Kenealy, 1992). Parece, además, que su función sería evitar la destrucción del hongo por parte de insectos, como escarabajos, con los que actúa de forma sinérgica al parasitar plantas como las gramíneas (Brandhorst et al, 1996). Los conidios sólo serían ingeridos una vez maduros, y por tanto resistentes, favoreciéndose así su dispersión para la colonización que han de llevar a cabo.

### ***$\alpha$ -Sarcina***

Desde los primeros estudios, relacionados con su actividad antitumoral, hasta los más recientes análisis de su estructura tridimensional, resuelta por RMN, la  $\alpha$ -sarcina es la ribotoxina más estudiada. Además, ha sido clonada, siendo nuestro grupo el que diseñó el sistema de producción heteróloga de la proteína, dirigida al periplasma de *E. coli*, con su secuencia nativa completa (Gasset et al, 1994; Lacadena et al, 1994). La purificación de la proteína recombinante soluble, con buen rendimiento, ha permitido su caracterización

estructural y funcional, así como el diseño de diversos mutantes de residuos específicos. En este sentido, destaca, por ejemplo, la demostración de que los residuos His-137, Glu-96 e His-50 (homólogos a los del centro activo de la RNasa T1) son catalíticos y actúan según un mecanismo ciclante (Figuras 1 y 4) (Lacadena et al, 1998; Lacadena et al, 1999). En este caso también parece que la His-50 podría ser el residuo responsable de un mecanismo de catálisis alternativo, actuando como base en la primera reacción. Los estudios con otros residuos del centro activo, como la Arg-121 (Masip et al, 2001) y la Leu-145 (Masip et al, 2003), han demostrado su participación en la funcionalidad de la  $\alpha$ -sarcina. En particular, la Arg-121 (Arg-77 en la RNasa T1) está implicada en la orientación de sustratos grandes dentro del centro activo y, más llamativo aún, su carga positiva es esencial para la interacción de la proteína con membranas. La Leu-145 (Phe en las RNasas no tóxicas) mantiene interacciones con la His-137, siendo en parte responsables de su bajo pKa (5,8, siendo 7,8 en RNasa T1), y está relacionada con la distinta orientación del bucle 5 de las ribotoxinas, que disminuye la accesibilidad del centro activo al disolvente (Figura 5).

Las propiedades enzimáticas, comparadas con la RNasa U2 y RNasa T1, presentan importantes diferencias a nivel del centro activo. Utilizando homopolinucleótidos como sustratos, donde la actividad observada es inespecífica, se ha observado que la  $\alpha$ -sarcina degrada poli(A), poli(G) y poli(I) (Endo et al, 1983), algo que también ocurre con la RNasa U2, con un perfil de actividad frente al pH restringido hacia pH ácidos. En cuanto a dinucleótidos, para la hidrólisis de ApA a pH 5,0, la  $\alpha$ -sarcina tiene  $K_M=40 \mu\text{M}$  y  $k_{\text{cat}}=2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  (Lacadena et al, 1994), lo que supone una eficacia catalítica 8 veces menor que la RNasa T1, siendo especialmente significativa la menor  $k_{\text{cat}}$ . Observando los centros activos de las RNasas U2 y T1, y de la  $\alpha$ -sarcina, se aprecia cómo el de esta última es el más restringido en cuanto a su exposición al disolvente, siendo uno de los factores determinantes para ello, como se ha comentado anteriormente, la posición del bucle 5 (Figuras 1 y 5). Tanto las interacciones de este bucle con la horquilla amino-terminal, como su longitud, repercuten en el entorno de la His catalítica principal (137 en  $\alpha$ -sarcina). En el caso de la RNasa T1, con el bucle más pequeño y orientado hacia el lado contrario al centro activo, éste se encuentra mucho más expuesto. Esto explicaría las diferencias en cuanto a la eficacia catalítica de estas dos enzimas, pero no su diferente especificidad, por lo que, probablemente, estén implicadas interacciones del sustrato con residuos de otros bucles, que son llamativamente más complejos en la  $\alpha$ -sarcina.

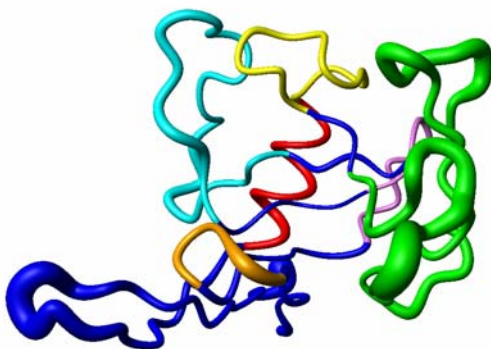
Los residuos aromáticos, y en particular los triptófanos (dos en la secuencia de la  $\alpha$ -sarcina), han permitido caracterizar espectroscópicamente su interacción con vesículas lipídicas modelo (De Antonio et al, 2000). En este sentido, ya se ha mencionado cómo la  $\alpha$ -sarcina interacciona con vesículas ácidas (de fosfatidilserina y fosfatidilglicerol) (Gasset et al, 1989; Gasset et al 1991a; Mancheño et al, 1994). Ello ocurre, en primer lugar, por una interacción de carácter electrostático, fácilmente explicable por la densidad de carga positiva que la proteína expone al disolvente, especialmente en el bucle 2. Posteriormente, interacciona con la zona hidrofóbica de la bicapa, llegando a translocarse al interior de las vesículas (Oñaderra et al, 1993; Gasset et al, 1994; Gasset et al, 1995a). En esta interacción hidrofóbica participa, al menos, la región 116-139, como se demostró con un péptido sintético con esa secuencia, que consiste en dos hebras de la lámina  $\beta$  antiparalela

central, que es la zona menos cargada de la proteína (Figura 9B) (Mancheño et al, 1995). Incluso un péptido que comprendía únicamente la secuencia 131-139 era capaz de mimetizar los efectos de la proteína completa (Mancheño et al, 1998). La traslocación se correspondería con el descenso de estabilidad de la proteína observado al interactuar con las bicapas lipídicas (Oñaderra et al, 1993; Gasset et al, 1995b) y la aparición de un elevado porcentaje de lámina  $\beta$  (Gasset et al, 1991a). Además, tras la translocación, la proteína mantiene su conformación, al menos la necesaria para mostrar su actividad de ribonucleasa inespecífica. Todo ello se parece a la hipótesis que se mantiene para la ricina, para la que la translocación no se daría hasta la llegada a orgánulos internos (aparato de Golgi y retículo endoplásmico), porque los primeros eventos de la endocitosis no requieren nada más que la interacción electrostática (Figura 8). La ricina parece desnaturalizarse, al menos parcialmente, en el retículo endoplásmico para ser reconocida por el translocón, y así pasar al citosol donde se renaturalizaría, escapando de la acción del proteosoma (Lord et al, 2003).

### **Restrictocina**

Esta proteína, producida por *A. restrictus*, se diferencia tan solo en un aminoácido de la mitogilina (Figura 9), secretada por *A. fumigatus* (Rodríguez et al, 1982). Por ello, los datos aquí presentados valdrían para ambas y, de hecho, muchos de ellos se han obtenido con la mitogilina.

Como para la  $\alpha$ -sarcina, también se conoce su estructura tridimensional, en este caso resuelta por cristalografía de rayos X, aunque falta la parte más expuesta de la horquilla amino-terminal (Figura 5) (Yang y Moffat, 1996). La razón de esto, como además se puede comprobar con los estudios dinámicos realizados con la  $\alpha$ -sarcina, es que esta zona es una de las más móviles de las ribotoxinas, junto con el bucle 2 (Figura 11) (Pérez-Cañadillas et al, 2002). Ambas estructuras, la de la restrictocina y la  $\alpha$ -sarcina, se superponen con gran precisión, a pesar de sus 22 aminoácidos de diferencia, excepto en algunos elementos como el bucle 5, probablemente debido a esa mayor movilidad (Figura 5).



**Figura 11: Representación tubular de la superposición de las estructuras los 47 conformeros de la  $\alpha$ -sarcina obtenidos por RMN** (Pérez-Cañadillas et al, 2000). La anchura de la sección es inversamente proporcional al grado de definición. El código de colores es el mismo que en las Figuras 3 y 5. La mayor o menor definición estructural se correlaciona bien con el dinamismo de las distintas regiones de proteína (Pérez-Cañadillas et al, 2002).

El estudio a nivel molecular, incluido su clonaje para la producción heteróloga, ha sido llevado a cabo por varios grupos (Lamy y Davies, 1991; Lamy et al, 1992; Glück et al, 1994; Kao y Davies, 1995, 1999 y 2000; Rathore et al, 1996; Nayak y Batra, 1997; Kao et al, 1998



y 2001; Nayak et al, 1999, 2000 y 2001; Goyal et al, 2002; Glück y Wool, 2002). Del mismo modo que para la  $\alpha$ -sarcina, la mutagénesis dirigida de residuos individuales, y las variantes de delección, han servido para ir elucidando los residuos esenciales para la catálisis y el reconocimiento del ribosoma, aunque nada se ha realizado a este nivel en cuanto a su interacción con membranas (Kao y Davies, 1999; Kao y Davies, 2000; Glück y Wool, 2002). Muchas de las conclusiones son idénticas a las ya mencionadas para la  $\alpha$ -sarcina, como por ejemplo, la caracterización de los residuos implicados en el centro activo (Glu-95, His-136, His-49, Arg-120) (Kao et al, 1998; Nayak et al, 2001). Asimismo, la H49 de la restrictocina se ha comparado con la correspondiente en la RNasa U2 (H41) y la RNasa T1 (H40) (Nayak y Batra, 1997). De acuerdo con estos resultados, la RNasa U2 nuevamente aparece como la más próxima a las ribotoxinas, ya que His-49 (restrictocina) e His-50 ( $\alpha$ -sarcina) tienen una posición ligeramente distinta a His-40 (RNasa T1) y no son esenciales para el mecanismo de catálisis, aunque sí para el reconocimiento del sustrato en cuanto a la especificidad de base. No obstante hay que resaltar que estos resultados (Nayak y Batra, 1997) son objeto de controversia y no se ha descartado que no se deban a la presencia de una actividad ribonucleolítica contaminante en la preparación de restrictocina utilizada.

También se ha construido una serie de mutantes de delección. De esta manera se ha demostrado cómo el segmento K106-K113 (secuencia homóloga a la que presenta la proteína ribosomal S12 de distintos organismos) del bucle 3 participa en el reconocimiento de la "G prominente" del lazo sarcina/ricina, perdiéndose la especificidad cuando se elimina, siendo la Lys-113 el residuo más importante (Figuras 7C y 9B) (Kao y Davies, 1999; Kao y Davies, 2000). Estos datos se corroboran con la estructura cristalina de la restrictocina y el análogo del SRL, mencionado previamente. Por último, queda señalar un estudio realizado con el péptido correspondiente a los residuos 53-91 (bucle 2), que ya se suponía que participaba en la interacción con membranas por su marcado carácter básico ( $pI=10,7$ ) y su homología con E<sub>rms</sub> (glicoproteína de la cubierta del virus de la peste), que ha demostrado su capacidad para translocarse en células en cultivo (Langedijk, 2002). Es, por tanto, la primera prueba de que una porción de una ribotoxina interacciona con membranas en ensayos *in vivo*.

Como se puede apreciar, los estudios realizados con  $\alpha$ -sarcina y restrictocina arrojan resultados cualitativamente similares. No obstante se puede suponer que ambas proteínas muestran diferencias funcionales significativas ya que presentan notables variaciones en su secuencia y en su estructura, especialmente en la horquilla amino-terminal y en los bucles 2 y 5 (Figura 9B).

### **Asp f 1**

La tercera ribotoxina más estudiada es el alérgeno Asp f 1, producida por el principal organismo responsable de las patologías y síndromes alérgicos en humanos debidos a infecciones fúngicas, el hongo *Aspergillus fumigatus* (Figura 12) (Kurup et al, 2002; Kurup, 2003). Su secuencia sólo difiere en cinco aminoácidos de la de la restrictocina, por lo que serían de aplicación los resultados comentados anteriormente para ésta (Figura 9) (Moser et al, 1992). No obstante, y desde el punto de vista inmunológico, se ha de tener en cuenta que, pese a su similitud estructural,  $\alpha$ -sarcina y restrictocina tienen un diferente

comportamiento frente a anticuerpos policlonales generados en conejo (Conde et al, 1978). En el caso de Asp f 1, su estudio se ha centrado más en sus propiedades inmunológicas, al ser uno de los principales alérgenos de *A. fumigatus*, con destacada prevalencia en síndromes alérgicos de cierta gravedad, como la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) (Figura 12) (Greenberger, 2002). Dentro de los alérgenos descritos en dicho hongo, y que generan una respuesta humoral en pacientes afectados por aspergilosis invasiva, Asp f 1 es uno de los primeros en producirse, lo que es importante en cuanto a la inducción de la respuesta alérgica (Weig et al, 2001). Sin embargo, se ha visto que no es esencial para la patogenicidad de *A. fumigatus* (Paris et al, 1993; Smith et al, 1993 y 1994). Por ello, la investigación a este respecto se ha centrado esencialmente en la implicación de Asp f 1 en las respuestas celulares del sistema inmune en las patologías producidas por *A. fumigatus* (Knutsen et al, 1994; Hemmann et al, 1998; Kurup et al, 2001). Estas investigaciones sufrieron un cambio sustancial a comienzos de la década de los noventa, cuando se clonó la proteína Asp f 1 (Moser et al, 1992), siendo a partir de entonces cuando aumentaron los estudios en busca de sus determinantes alérgicos con el fin de poder utilizarla en diagnóstico y terapia de enfermedades causadas por *A. fumigatus* (Kurup et al, 1996; Kurup et al, 1998). La proteína recombinante se ha empleado en pruebas cutáneas y, más recientemente, debido a su toxicidad y para una mejor reproducibilidad de los resultados, en sistemas *in vitro*, como el semi-automatizado *Pharmacia CAP System* y en *microarrays*, junto con otros varios alérgenos (Cramer et al, 1996; Nikolaizik et al, 1996; Hiller et al, 2002).

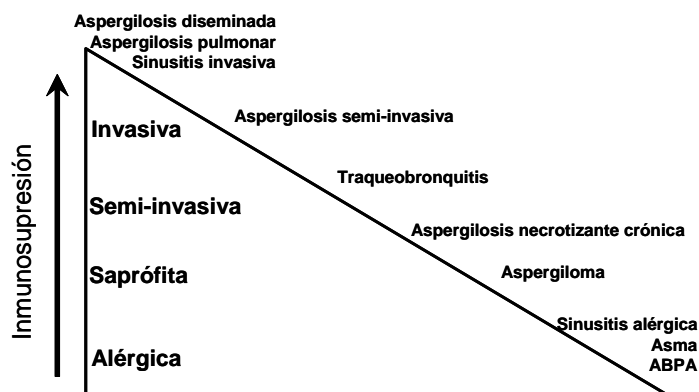


Figura 12: Patologías ocasionadas por hongos del género *Aspergillus* en relación con el grado de inmunosupresión del paciente (Marr et al, 2002).

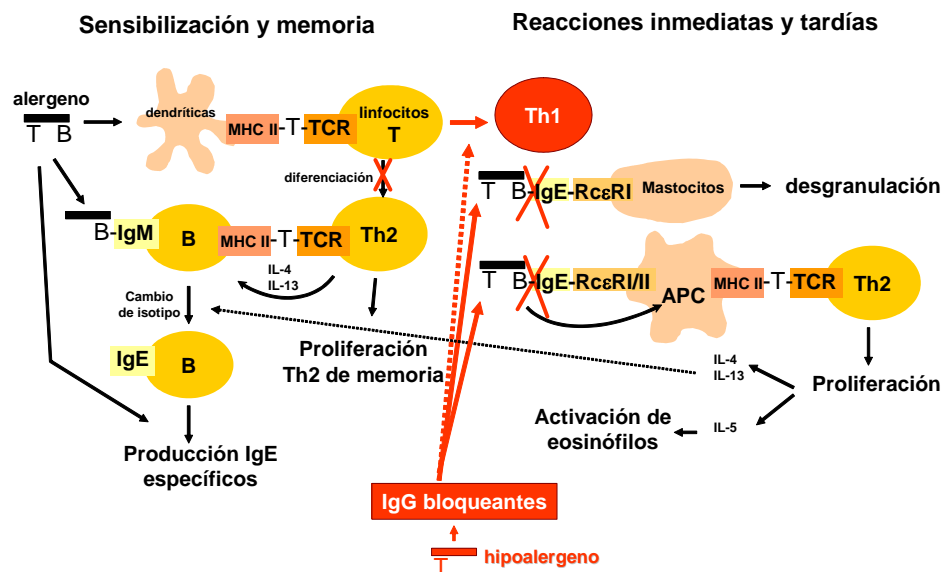
En el 90% de las afecciones relacionadas con hongos, *A. fumigatus* es el principal responsable, debido a su ubicuidad y termoresistencia. Las numerosas patologías asociadas a la presencia de *A. fumigatus* en el tracto respiratorio se clasifican según el grado de inmunosupresión del individuo infectado, y de entre ellas, las alergias de tipo I (mediadas por anticuerpos IgE), son las mayoritarias. En ellas, a pesar de que el sistema inmune no se encuentre dañado, sí se produce una respuesta anómala de éste ante los elementos antigénicos de la molécula extraña (Figura 12) (Marr et al, 2002). Además, las

alergias respiratorias (los hongos usan esta vía como la principal para la colonización del individuo) son las que más predominan.

En la alergia de tipo I (Figura 13), el primer paso consiste en la sensibilización del paciente, por la cual la presencia del antígeno induce la diferenciación de células Th2 específicas, así como de células B productoras de IgE específicas (que reconocen epítomos de tipo B, conformacionales), que darán lugar a las células y a las IgE de memoria frente a ese alérgeno. En esta sensibilización, tanto las características genéticas del individuo como el sitio de contacto con el alérgeno, su dosis y su conformación, son decisivas. En cambio, tanto los individuos alérgicos como los sanos, sólo producen niveles muy bajos de IgG específicas para el alérgeno. Posteriormente, en sucesivos contactos con el alérgeno, las IgE unidas a sus receptores en mastocitos, y ayudadas por células Th2, desencadenan la respuesta inflamatoria. Como última fase de la reacción alérgica, se produce una proliferación de las células Th2 de memoria, gracias a la presentación de epítomos T del antígeno por parte de células presentadoras de antígeno (APC), dando lugar a su infiltración y a la activación de eosinófilos. Al ser una respuesta antígeno-dependiente, la terapia contra la alergia se basa en el uso controlado de formas derivadas de los alérgenos capaces de producir IgG defensivas (del tipo IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>4</sub>) que compitan con las IgE específicas para dichos alérgenos, inhibiendo la respuesta que estas inmunoglobulinas desencadenan y promoviendo un cambio de producción de células de tipo Th2 a Th1 (Figura 13) (Miescher y Vogel, 2002; Valenta, 2002). Sin embargo, en la práctica esta terapia está todavía en fase experimental y los estudios clínicos son aún contradictorios. El trabajo con proteínas recombinantes ha proporcionado nuevas herramientas que solventan los principales problemas de este tipo de tratamiento, como son los efectos secundarios, incluidos los choques anafilácticos, provocados por la poca homogeneidad que presentan los extractos naturales usados en la terapia (Valenta y Kraft, 2002). En concreto, la idea de utilizar moléculas hipoalérgicas, con una actividad alérgica reducida, pero preservando los epítomos T y las estructuras necesarias para inducir respuestas IgG bloqueantes, es una de las principales propuestas estudiadas recientemente (Flicker y Valenta, 2003). El diseño de estas moléculas, que actualmente se basa en utilizar fragmentos peptídicos o proteínas desestructuradas, busca destruir los epítomos IgE conformacionales. Además, es necesario el estudio de las respuestas celulares del sistema inmune que estas moléculas modificadas desencadenan, como los procesos linfoproliferativos y la liberación de citocinas. Con este tipo de terapia, no solo son posibles los tratamientos para bloquear la respuesta alérgica una vez iniciada, sino que también sería adecuada para una vacunación profiláctica (Chapman et al, 2000).

En el caso de las alergias fúngicas, sin embargo, este tipo de aproximación no está muy estudiada todavía. Se conocen unos 40 componentes alérgicos de *A. fumigatus*, estando clonados muchos de los que tienen naturaleza proteica (Kurup et al, 2002; Banerjee y Kurup, 2003); pero, en cuanto a la aplicación clínica, ésta sigue realizándose con extractos del hongo que, aunque algunos se comercializan, no están bien estandarizados (Esch, 2003). Sí se han caracterizado los alérgenos mayoritarios, así como su prevalencia en distintas afecciones alérgicas, para su posible uso diagnóstico. Aparecen tanto secretados (Asp f 1 y 3) como a nivel intracelular (Asp f 2, 4, 6), y con funciones diversas, como Asp f 3

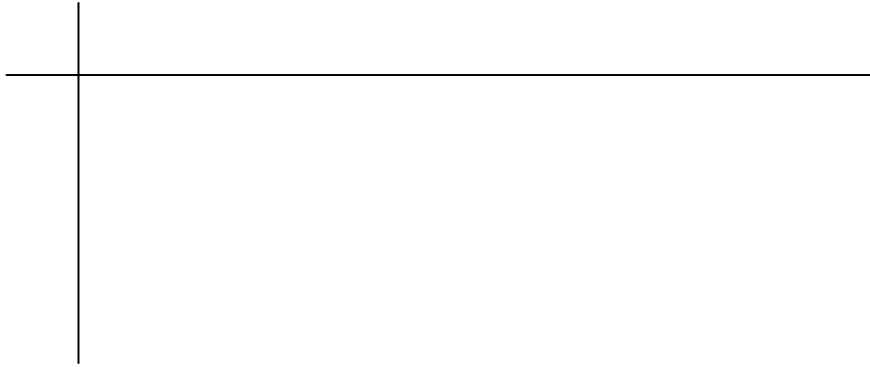
que es una proteína peroxisomal, o Asp f 6, que es una superóxido dismutasa. Los alérgenos 1, 2, 4 y 6 son reconocidos por pacientes sensibilizados a *A. fumigatus* con fibrosis quística y/o ABPA, mientras que, en los que son simplemente asmáticos, su prevalencia es menor (Hemmann et al, 1998; Kurup et al, 2000). En cuanto a la respuesta que desencadenan, experimentos en ratones, usando los alérgenos 1, 3 y 4, han demostrado la capacidad de producir una respuesta alérgica tipo Th2 (inflamación e hiperreactividad en el tracto respiratorio) (Kurup et al, 2001). En concreto con el alérgeno Asp f 1, el análisis de sus epítomos B y T, se ha llevado a cabo mediante el uso de péptidos lineales (epítomos T, respuesta Th1) o con cierta estructura secundaria (epítomos B que se reconocen por IgE y dan lugar a una respuesta de células B) (Kurup et al, 1998; Svirshchetskaya et al, 2000). Parece que la zona carboxilo-terminal de la molécula posee determinantes alérgenos, y en especial los residuos 115-130, localizados en el bucle 3, la hebra  $\beta_5$  y el bucle 4. Sin embargo, muchas de las conclusiones extraídas son contradictorias, probablemente debido a las diferentes estructuras adquiridas por los péptidos, ya que, en pocos casos se tiene en cuenta la conformación adoptada en el conjunto de la molécula completa. Por ejemplo, con relación a la zona amino-terminal de la proteína, los resultados son opuestos en cuanto a la unión a IgE o la estimulación de células T según los autores o según el fragmento de la secuencia utilizado (Chauhan et al, 1996; Kurup et al, 1996; Kurup et al, 1998; Svirshchetskaya et al, 2000).



**Figura 13: Diagrama de la respuesta alérgica de tipo I.** Principales eventos moleculares y celulares durante el proceso de sensibilización y memoria (izquierda) y las siguientes exposiciones al alérgeno (derecha). En rojo se señala el modo de acción contra esta respuesta alérgica de moléculas hipoalérgicas capaces de generar anticuerpos defensivos de tipo IgG. En el dibujo se representan los epítomos T (secuenciales) y B (conformacionales) del alérgeno con dichas letras.

### ***Inmunoterapia con ribotoxinas***

Uno de los objetivos míticos de los tratamientos terapéuticos es la obtención de las denominadas “balas mágicas” (término acuñado por Ehrlich en 1957; Sandvig y van Deurs, 2000), con las que se conseguiría una acción terapéutica específica, eliminando los efectos secundarios de los fármacos al actuar únicamente sobre la diana para la que habrían sido diseñadas. Y en este contexto hay que señalar la construcción de inmunotoxinas. Estas moléculas consisten en la conjugación de un anticuerpo, o un fragmento de éste, con una toxina. El anticuerpo sería el responsable de la especificidad de la inmunotoxina, dirigiéndola únicamente hacia las células que reconoce, tumorales, infectadas por virus, causantes de desórdenes neuronales o problemas autoinmunes, y la toxina sería la encargada de producir la muerte celular (Lamy et al, 1992; Perentesis et al, 1992). Este tipo de estudios comenzó en los años 80, pero, hasta la fecha no hay ensayos clínicos con inmunotoxinas que sean totalmente satisfactorios, debido a la inmunogenicidad intrínseca de los conjugados y a su toxicidad basal inespecífica (Newton y Rybak, 2001). Entre los anticuerpos utilizados, actualmente se emplean fragmentos scFv, pequeños aunque suficientes para el reconocimiento y con capacidad de unirse a moléculas receptoras de la superficie de la célula diana, como por ejemplo el receptor de transferrina (Rathore y Batra, 1996). En cuanto a la toxina, se han realizado estudios con proteínas bacterianas, como la exotoxina A de *Pseudomonas* y la toxina diftérica (Onda et al, 2004), de plantas y organismos inferiores, como la ricina (la subunidad catalítica) y la onconasa (Kreitman, 2001; Newton et al, 2001), así como de humanos, para evitar choques inmunogénicos, como la angiogenina (Huhn et al, 2001). También las ribotoxinas fúngicas se han empleado para la construcción de estos complejos y, de hecho, junto con la ricina, son las toxinas más potentes de todas las mencionadas. Además, como ventajas frente a la cadena A de la ricina, son de un tamaño menor, son más estables y son menos inmunogénicas (Wawrzynczak et al, 1991). Sin embargo, aunque los resultados obtenidos hasta la fecha en células en cultivo son optimistas, todavía no se han realizado experimentos *in vivo*. Los mejores datos provienen de las inmunotoxinas RSFv y FvSR (scFv del anticuerpo contra el receptor de transferrina unido por un espaciador, que se corta intracelularmente por furina, a la restrictocina por el extremo Nt o el Ct), con un ID<sub>50</sub> (concentración necesaria para producir el 50% de la muerte celular) en el intervalo de concentración pM para células T leucémicas, frente al 0.1 μM en células control no transformadas (Rathore y Batra, 1997; Goyal y Batra, 2000). Como se puede observar, uno de los problemas, todavía pendientes de resolver, radica en la toxicidad basal frente a células no diana, con lo que las mejoras en este campo se plantean a través del uso de variantes modificadas de estas ribotoxinas, principalmente en cuanto a su interacción con membranas y capacidad de translocación.



## **Objetivos**



En el momento del comienzo del presente trabajo de investigación, nuestro grupo trataba de producir mutantes de  $\alpha$ -sarcina con los que elucidar las bases moleculares de su funcionalidad, además de perseguir la obtención de una forma recombinante de la ribonucleasa U2 como sistema modelo de  $\alpha$ -sarcina en términos de estructura-función. En este contexto, esta investigación, en concreto, se dirigió hacia una de las regiones donde las ribotoxinas presentan más variabilidad, tanto de secuencia (Figura 9) como de dinámica estructural (Figura 11), y, más importante aún, que no aparece en las RNAsas no tóxicas de la familia T1: **la horquilla amino-terminal** (Figuras 1 y 5). Esta horquilla está formada por dos pequeñas láminas  $\beta$  consecutivas, siendo la más expuesta de ellas (secuencia 7-22) específica dentro de la superfamilia de la barnasa, (Figuras 1 y 3). El hecho de tratarse de una región, además de expuesta al disolvente, con un plegamiento independiente del resto de la molécula, así como su variabilidad de secuencia entre las propias ribotoxinas (cambios no conservativos, Figura 9), sugería que tuviera un importante papel en la especificidad y citotoxicidad únicas de las ribotoxinas, además de una relación directa con sus propiedades inmunogénicas.

Así, la investigación que se ha realizado, y que se recoge en esta Tesis Doctoral, se dirigió hacia los siguientes objetivos:

**1.- Mejora de los sistemas de producción de proteínas recombinantes:** *E. coli* para la  $\alpha$ -sarcina y *P. pastoris* para la RNasa U2 (resultados recogidos en: García-Ortega et al, 2000; Martínez-Ruiz et al, 2000; Martínez-Ruiz et al, 2001; Anexo I).

**2.- Estudio de variantes mutantes de la  $\alpha$ -sarcina en la horquilla amino-terminal.** Restrictocina y RNasa U2 como modelos comparativos (resultados recogidos en: García-Ortega et al, 2001; García-Ortega et al, 2002).

**3.- Caracterización de las variantes de delección de las ribotoxinas como hipoadesivos.** Asp f 1 y  $\alpha$ -sarcina como modelos (resultados recogido en: García-Ortega et al, 2004).







## **Resultados 1**



Como primer objetivo, se abordó la mejora de los sistemas de producción de las proteínas recombinantes que se utilizarían a lo largo del presente trabajo de investigación, ya que, a pesar de haberse desarrollado en el laboratorio una metodología preliminar, el rendimiento, muy bajo en algunos casos, seguía siendo un paso limitante para los posteriores estudios estructura-función.

De este modo, sobre el sistema de expresión heteróloga en *E. coli* de  $\alpha$ -sarcina recombinante que se había descrito en nuestro laboratorio años antes (Lacadena et al, 1994), se planteó una modificación basada en el control del ambiente redox de la bacteria, con la idea de aumentar la cantidad de proteína soluble gracias a una correcta formación de sus puentes disulfuro. Para ello se coexpresó la proteína tiorredoxina, encargada de mantener un potencial reductor en el citoplasma de la bacteria. Los resultados obtenidos se reflejan en García-Ortega et al, 2000.

La otra enzima modelo en este estudio es la RNasa U2, cuyo sistema de expresión heteróloga es muy distinto, la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. El manejo de esta proteína en nuestro laboratorio se comenzó más recientemente, y rendimiento conseguido para la forma recombinante era muy pobre hasta el inicio de este proyecto de investigación, obteniéndose, además, una proteína con algunas variaciones estructurales y funcionales con respecto a la natural (Martínez Ruiz, 1999). Por lo tanto, en un primer lugar se abordó la mejora de su purificación, con la introducción de una cromatografía de afinidad (Martínez-Ruiz et al, 2000). Por otro lado, para incrementar los niveles de expresión de la proteína por parte de la levadura se cambió el sistema, empleando un vector de nueva generación comercializado por Invitrogen (Anexo I).

En ambos casos, tanto para la  $\alpha$ -sarcina como para la RNasa U2, las proteínas recombinantes obtenidas se caracterizaron estructural y funcionalmente, para comprobar la validez de los nuevos sistemas de aislamiento y purificación empleados. La metodología empleada para ello, que constituye también el punto de partida para los estudios posteriores con variantes de estas proteínas, se detalla en los artículos mencionados así como en la revisión Martínez-Ruiz et al, 2001.



## The solubility of the ribotoxin $\alpha$ -sarcin, produced as a recombinant protein in *Escherichia coli*, is increased in the presence of thioredoxin

L. García-Ortega, J. Lacadena<sup>†</sup>, V. Lacadena, M. Masip, C. de Antonio, A. Martínez-Ruiz and Á. Martínez del Pozo

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Química, Universidad Complutense, Madrid, Spain

0005/1999: received 15 November 1999, revised 22 December 1999 and accepted 5 January 2000

L. GARCÍA-ORTEGA, J. LACADENA, V. LACADENA, M. MASIP, C. DE ANTONIO, A. MARTÍNEZ-RUIZ AND Á. MARTÍNEZ DEL POZO. 2000. The yield of purified recombinant  $\alpha$ -sarcin increases approximately three- to fourfold when this toxin is co-expressed in *Escherichia coli* with thioredoxin. This increased production is attributed to the existence, in the presence of thioredoxin, of a reducing environment which allows rearrangement of incorrect disulphide bonds to produce the soluble native conformation. The protein thus produced retains the structural, spectroscopic and enzymatic features of the natural fungal  $\alpha$ -sarcin.

### INTRODUCTION

$\alpha$ -Sarcin is a highly specific ribonuclease, secreted by the mould *Aspergillus giganteus* MDH 18894 (Olson and Goerner 1965; Olson *et al.* 1965), that inhibits protein biosynthesis by inactivating ribosomes (Schindler and Davies 1977). This ribonucleolytic action is exerted by cleaving a single phosphodiester bond in the 28S rRNA, producing the so-called  $\alpha$ -fragment.  $\alpha$ -Sarcin is also the best characterized member of a group of proteins, known as ribotoxins, which display high sequence similarity and identical cytotoxic activities (Martínez-Ruiz *et al.* 1999). They also belong to a larger family of microbial extracellular RNases, most of them without toxic properties, RNase T1 being the best one known of all them (Kao and Davies 1995; Mancheño *et al.* 1995). Sequence alignment reveals that these proteins share significant similarity in elements of ordered secondary structure (Fig. 1) (Campos-Olivas *et al.* 1996a, >b). The larger differences are observed within the loops connecting these elements, which are longer in the ribotoxins group (Fig. 1) (Kao and Davies 1995; Mancheño *et al.* 1995; Campos-Olivas *et al.* 1996a, >b). The three-dimensional structures of  $\alpha$ -sarcin and different variants are being solved by means of multidimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy (Campos-Olivas *et al.* 1996a, b).  $\alpha$ -Sarcin was cloned and overproduced in *Escherichia coli* (Lacadena *et al.* 1994). However, most of

the protein produced remained insoluble, even though the construct employed had been designed to export the recombinant  $\alpha$ -sarcin into the periplasmic space (Lacadena *et al.* 1994). This is not surprising given that the production of eukaryotic proteins in *E. coli* is usually linked to the formation of insoluble aggregates. Sometimes this situation offers the advantage of easier purification if the recombinant protein can be properly solubilized. These aggregates are the main obstacle hindering the study of macromolecular structures. Even when they are solubilized, this does not always guarantee that they have properly folded into the native conformation.

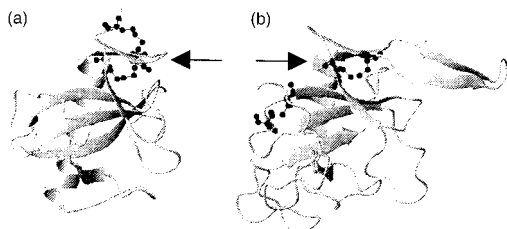
It has been reported that overproduction of thioredoxin (Trx) dramatically increases the solubility of foreign proteins produced in *E. coli* (Yasukawa *et al.* 1995). This observation was explained in terms of thioredoxin's ability to prevent the formation of abnormal disulphide bonds (Yasukawa *et al.* 1995) which may otherwise occur due to the different redox state between *E. coli* and the eukaryotic cells (Kondo *et al.* 1993).  $\alpha$ -Sarcin has two disulphide bonds (Fig. 1), linking cysteines 6 and 148, and 76 and 132 (Sacco *et al.* 1983). The former bond is conserved in all microbial extracellular RNases (Mancheño *et al.* 1995). Mismatching of these cysteines could be then related to the insolubility of *E. coli*-produced  $\alpha$ -sarcin. In this work we show that the coproduction of Trx and  $\alpha$ -sarcin in *E. coli* significantly increases the final yield of soluble, native toxin.

### MATERIALS AND METHODS

All materials and reagents used were molecular biology grade. Cloning procedures and bacterial manipulations

Correspondence to: Á. Martínez del Pozo, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Química, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain (e-mail: mayte@solea.quim.ucm.es).

<sup>†</sup>Present address: Facultad de Biología, Universidad SEK, 40003 Segovia, Spain.



**Fig. 1** Schematic representations of the three-dimensional structures of (a) RNase T1 (Pace *et al.* 1991) and (b)  $\alpha$ -sarcin (Campos-Olivas *et al.* 1996b). The cysteine residue side chains are also shown in black (arrows have been employed to indicate the Cys-pair conserved in both proteins)

were carried out according to standard procedures (Sambrook *et al.* 1989), as described previously (Lacadena *et al.* 1994, 1999). The plasmids pINPG $\alpha$ S and pET11bzS were used to overproduce the recombinant  $\alpha$ -sarcin in *E. coli* (Lacadena *et al.* 1994, 1999). They confer resistance to ampicillin and, upon induction with IPTG, allow the production of a fusion protein consisting of  $\alpha$ -sarcin and a modified version of the OmpA signal peptide (Lacadena *et al.* 1994), which should result in accumulation of mature native  $\alpha$ -sarcin within the periplasmic space. In the case of the pINPG $\alpha$ S construct, the  $\alpha$ -sarcin-coding DNA is under the control of both the *lpp* promoter and the *lac* promoter-operator (Ghrayeb *et al.* 1984) and the protein was produced by cells grown overnight at 37 °C in minimal medium (Sambrook *et al.* 1989; Lacadena *et al.* 1994). In the plasmid pET11bzS, this DNA is under the tight control of strong bacteriophage T7 signals (Rosenberg *et al.* 1987) and expression of recombinant  $\alpha$ -sarcin is only possible by providing a source of T7 RNA polymerase in the host cells. With this purpose, *E. coli* BL21(DE3) (F' *ompT* [*lon*] *hsdB* [*r<sub>B</sub>* *m<sub>B</sub>*]) cells (lysogens of bacteriophage DE3) incubated for 4 h in LB-medium were employed (Lacadena *et al.* 1999). The third plasmid employed (pT-Trx) was the generous gift from Dr S. Ishii from the University of Tsukuba (Japan). It contains the Trx coding region linked to the T7 promoter and inserted into a vector inducible by IPTG and containing a chloramphenicol resistance marker (Yasukawa *et al.* 1995).

Protein production and purification were performed as described previously (Lacadena *et al.* 1994, 1999), with the only difference being that the cells employed were cotransformed with pT-Trx in addition to the  $\alpha$ -sarcin-coding construct (pINPG $\alpha$ S or pET11bzS). To ensure the growth of cells harboring both plasmids, not only ampicillin (100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) but also chloramphenicol (34  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) were

included in the media employed to culture the cells. Fungal natural  $\alpha$ -sarcin was also produced and purified to detectable homogeneity according to (Olson and Goerner 1965; Lacadena *et al.* 1994). Polyacrylamide gel electrophoresis of proteins, protein hydrolysis and amino acid analysis was also performed according to standard procedures as described (Lacadena *et al.* 1994, 1999).

Absorbance measurements were carried out on a Uvikon 930 spectrophotometer (Kontron Instruments, Milan, Italy) at 100 nm min<sup>-1</sup> scanning speed, at room temperature, and in 1-cm optical-path cells. CD spectra were obtained on a Jasco 715 spectropolarimeter (Easton, MD, USA) at 0.2 nm s<sup>-1</sup> scanning speed; 0.1 and 1.0 cm optical-path cells were used in the far- and near-u.v., respectively. Mean residue weight ellipticities were expressed in units of degree  $\times$  cm<sup>2</sup>  $\times$  dmol<sup>-1</sup>. The extinction coefficient E (0.1%, 1 cm, 280 nm) was calculated from the absorbance spectrum and amino acid analyses. Thermal denaturation was performed by measuring the temperature dependence of the ellipticity at 220 nm in the range of 25–65 °C; the temperature was continuously changed at the rate of 0.5 °C min<sup>-1</sup>. Fluorescence emission spectra were obtained on a SLM Aminco 8000 spectrofluorimeter (Urbana, IL, USA) at 25 °C and in 0.2 cm optical-path cells.

The specific ribonucleolytic activity of  $\alpha$ -sarcin was followed by detecting the release of the 400 nt  $\alpha$ -fragment (Schindler and Davies 1977) from a cell-free rabbit reticulocyte lysate (Promega, Madison, WI, USA) as described previously (Lacadena *et al.* 1994, 1999).

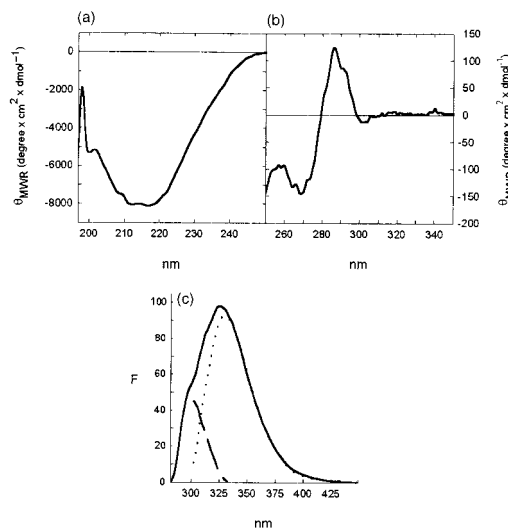
The activity of the purified proteins against poly(A) (Endo and Wool 1982) was measured after subjecting the samples to an electrophoretic procedure in 15% polyacrylamide gels, containing 0.1% SDS and 0.3 mg ml<sup>-1</sup> poly(A). This method, designated as a 'zymogram' assay, was based on one described previously (Blank *et al.* 1982; Lacadena *et al.* 1994, 1999).

## RESULTS AND DISCUSSION

The plasmid pT-Trx was designed to be compatible and cotransformed with pET plasmids to express mammalian proteins in *E. coli* (Yasukawa *et al.* 1995). Consequently, competent cells BL21(DE3), harbouring pT-Trx, were transformed with pET11bzS and selected on LB-agar plates containing ampicillin and chloramphenicol. Several colonies were grown and induced with IPTG to observe whether the production of soluble  $\alpha$ -sarcin was improved. Although high levels of thioredoxin were observed in all colonies (data not shown) the amount of  $\alpha$ -sarcin, soluble or insoluble, was surprisingly much smaller than in the previous system lacking thioredoxin. It is not easy to explain this result at the moment, especially if the experiments described below are considered. Production of  $\alpha$ -sar-

cin in rich medium, based on the use of pET11b $\alpha$ S, takes place for a relatively short period of time. Perhaps, as a consequence of co-expression with thioredoxin, the tolerance levels of soluble toxin within the cell are quickly reached. Thus, these  $\alpha$ -sarcin-producing cells would be killed and cells synthesizing only thioredoxin would be selected. This would not happen in the absence of thioredoxin precisely because most of the ribotoxin produced precipitates and remains insoluble. A similar problem of cytotoxicity in the producing cells was observed when restrictocin was produced in *Saccharomyces cerevisiae* (Yang and Kenealy 1992). However, this did not happen when  $\alpha$ -sarcin was expressed in another yeast, *Pichia pastoris* (Martínez-Ruiz *et al.* 1998) because, in this micro-organism, proteins are translocated to the endoplasmic reticulum mainly cotranslationally, thus minimizing the presence of mature-folded ribotoxin in the same compartment as the ribosomes. In contrast, the predominant translocation pathway in *S. cerevisiae* is post-translational and ribosomes can therefore be hydrolysed by the toxin (Yang and Kenealy 1992).

The other  $\alpha$ -sarcin production system, based on pINPG $\alpha$ S (Lacadena *et al.* 1994), was then assayed. In this case, cells cotransformed with pINPG $\alpha$ S and pT-Trx were grown in minimal medium and, after induction with IPTG, production of recombinant  $\alpha$ -sarcin took place overnight. In the absence of pT-Trx, this system produces the same amount of soluble  $\alpha$ -sarcin as the one based on pET11b $\alpha$ S (Lacadena *et al.* 1999) but in this case co-expression with thioredoxin increased the amount of soluble toxin produced dramatically. In minimal medium, the growth of bacteria is much slower. It appears that under these conditions, the folding and export machinery is still able to sustain the production of large amounts of soluble recombinant  $\alpha$ -sarcin, which is safely exported to the periplasm. One of the colonies producing  $\alpha$ -sarcin was chosen for the purification of the protein (Lacadena *et al.* 1994, 1999), from 21 culture in minimal medium. This produced 14 mg of  $\alpha$ -sarcin, which represent a three- to fourfold increase in the yield obtained when the same system is employed in the absence of pT-Trx (Lacadena *et al.* 1994). The electrophoretic mobility of recombinant  $\alpha$ -sarcin in the presence of SDS was identical to that of the fungal protein and no additional bands were observed. Its amino acid composition is consistent with that expected for fungal wild-type  $\alpha$ -sarcin. Both facts indicate that the protein is highly pure. The spectroscopic characterization revealed that the far- and near-u.v. CD and fluorescence emission spectra (Fig. 2) of the recombinant toxin are identical to those of the wild type protein (Gavilanes *et al.* 1983; Martínez del Pozo *et al.* 1988), indicating that the three-dimensional structure of the  $\alpha$ -sarcin obtained in higher yield is preserved. The thermal stability of the recombinant



**Fig. 2** (a) Far-u.v. and (b) near u.v. CD spectra of the purified recombinant  $\alpha$ -sarcin co-expressed with thioredoxin. (c) Fluorescence emission spectra of the purified recombinant  $\alpha$ -sarcin, co-expressed with thioredoxin, for excitation at 275 nm (continuous line) and 295 nm, after normalization (dotted line). The normalization procedure is based on the fact that the emission of tyrosine is negligible at wavelengths longer than 380 nm. The tyrosine contribution (dashed line), calculated as the difference between the other two spectra, is also shown. Fluorescence is expressed in arbitrary units

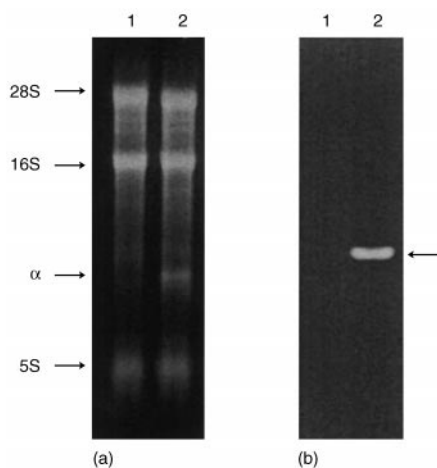
$\alpha$ -sarcin did not change; its denaturing temperature, 51 °C, was the same as that obtained for the fungal protein (Lacadena *et al.* 1999). Furthermore, it produced the  $\alpha$ -fragment when 40 ng was assayed against rabbit ribosomes, indicating that the specific ribonucleolytic activity is maintained (Fig. 3). Finally, when its activity was measured in the zymogram assay no other ribonucleolytic activity was detected (Fig. 3).

In summary, co-expression of  $\alpha$ -sarcin and thioredoxin in minimal medium results in a yield increase of soluble homogeneous protein while retaining the structural and enzymatic properties of the natural fungal protein.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grant PB96/0601 from the Dirección General de Enseñanza Superior (Spain). L.G.-O., V.L., M.M., C.deA. and A.M.-R. are recipients of fellowships from the Ministerio de Educación y Cultura





**Fig. 3** Ribonucleolytic activity of the purified recombinant  $\alpha$ -sarcin, co-expressed with thioredoxin. (a) Ethidium bromide-stained agarose gel of the rRNA extracted from rabbit ribosomes incubated in the absence (1) or in the presence (2) of 40 ng of the purified toxin. The arrows indicate the position of the different rRNA components and the  $\alpha$ -fragment released from the 28S rRNA by  $\alpha$ -sarcin. (b) Poly(A) zymogram without (1) or with (2) 0.5  $\mu$ g of recombinant  $\alpha$ -sarcin. In this case, the arrow indicates the position of  $\alpha$ -sarcin

(Spain). We thank Dr S. Ishii for supplying us with the plasmid pT-Trx and Dr D. Laurents for critically reading the manuscript.

## REFERENCES

- Blank, A., Sugiyama, R.H. and Dekker, C. (1982) Activity staining of nucleolytic enzymes after sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis: Use of aqueous isopropanol to remove detergent from gel. *Analytical Biochemistry* **120**, 267–275.
- Campos-Olivas, R., Bruix, M., Santoro, J., Martínez del Pozo, A., Lacadena, J., Gavilanes, J.G. and Rico, M. (1996a)  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$  nuclear magnetic resonance assignment and secondary structure of the cytotoxic ribonuclease  $\alpha$ -sarcin. *Protein Science* **5**, 969–972.
- Campos-Olivas, R., Bruix, M., Santoro, J., Martínez del Pozo, A., Lacadena, J., Gavilanes, J.G. and Rico, M. (1996b) Structural basis for the catalytic mechanism and substrate specificity of the ribonuclease  $\alpha$ -sarcin. *FEBS Letters* **399**, 163–165.
- Endo, Y. and Wool, I.G. (1982) The site of action of  $\alpha$ -sarcin on eukaryotic ribosomes: The sequence at the  $\alpha$ -sarcin cleavage-site in 28S ribosomal ribonucleic acid. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 9054–9060.
- Gavilanes, J.G., Vázquez, D., Soriano, F. and Méndez, E. (1983) Chemical and spectroscopic evidence on the homology of three antitumor proteins:  $\alpha$ -sarcin, mitogillin and restrictocin. *Journal of Protein Chemistry* **2**, 251–261.
- Ghrayeb, J., Kimura, H., Takahara, M., Hsiung, H., Masui, Y. and Inouye, M. (1984) Secretion cloning vectors in *Escherichia coli*. *EMBO Journal* **3**, 2437–2442.
- Kao, R. and Davies, J. (1995) Fungal ribotoxins: a family of naturally engineered targeted toxins? *Biochemistry and Cell Biology* **73**, 1151–1159.
- Kondo, T., Yoshida, K., Urata, Y., Goto, S., Gasa, S. and Taniguchi, N. (1993)  $\gamma$ -Glutamylcysteine synthetase and active transport of glutathione S-conjugate are responsive to heat shock in K562 erythroid cells. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 20366–20372.
- Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Barbero, J.L., Mancheño, J.M., Gasset, M., Oñaderra, M., López-Otín, C., Ortega, S., García, J. and Gavilanes, J.G. (1994) Overproduction and purification of biologically active native fungal  $\alpha$ -sarcin in *Escherichia coli*. *Gene* **142**, 147–151.
- Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Martínez-Ruiz, A., Pérez-Cañadillas, J.M., Bruix, M., Mancheño, J.M., Oñaderra, M. and Gavilanes, J.G. (1999) Role of histidine-50, glutamic acid-96, and histidine-137 in the ribonucleolytic mechanism of the ribotoxin  $\alpha$ -sarcin. *Proteins: Structure, Function and Genetics* **37**, 474–484.
- Mancheño, J.M., Gasset, M., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M. and Gavilanes, J.G. (1995) Predictive study of the conformation of the cytotoxic protein  $\alpha$ -sarcin: a structural model to explain  $\alpha$ -sarcin–membrane interaction. *Journal of Theoretical Biology* **172**, 259–267.
- Martínez del Pozo, A., Gasset, M., Oñaderra, M. and Gavilanes, J.G. (1988) Conformational study of the antitumour protein  $\alpha$ -sarcin. *Biochimica et Biophysica Acta* **953**, 280–288.
- Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, A., Lacadena, J., Mancheño, J.M., Oñaderra, M., López-Otín, C. and Gavilanes, J.G. (1998) Secretion of recombinant pro- and mature fungal  $\alpha$ -sarcin ribotoxin by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* **12**, 315–322.
- Martínez-Ruiz, A., Kao, R., Davies, J. and Martínez del Pozo, A. (1999) Ribotoxins are a more widespread group of proteins within the filamentous fungi than previously believed. *Toxicon* **37**, 1549–1563.
- Olson, B.H. and Goerner, G.L. (1965)  $\alpha$ -Sarcin, a new antitumor agent. I. Isolation, purification, chemical composition, and the identity of a new amino acid. *Applied Microbiology* **13**, 314–321.
- Olson, B.H., Jennings, J.C., Roga, V., Junek, A.J. and Schuurmans, D.M. (1965)  $\alpha$ -Sarcin, a new antitumor agent. II. Fermentation and antitumor spectrum. *Applied Microbiology* **13**, 322–326.
- Pace, C.N., Heinemann, U., Hahn, U. and Saenger, W. (1991) Ribonuclease T1: Structure, function and stability. *Angewandte Chemie (International Edition)* **30**, 343–360.
- Rosenberg, A.H., Lode, B.N., Chui, D., Lin, S., Dunn, J.J. and Studier, F.W. (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* **56**, 125–135.

- Sacco, G., Drickamer, K. and Wool, I.G. (1983) The primary structure of the cytotoxin  $\alpha$ -sarcin. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 5811–5818.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schindler, D.G. and Davies, J. (1977) Specific cleavage of ribosomal RNA caused by  $\alpha$ -sarcin. *Nucleic Acids Research* **4**, 1097–1110.
- Yang, R. and Kenealy, W.R. (1992) Effects of amino terminal extensions and specific mutations on the activity of restrictocin. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 16801–16805.
- Yasukawa, T., Kanei-Ishii, C., Maekawa, T., Fujimoto, J., Yamamoto, T. and Ishii, S. (1995) Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 25328–25331.





## Ribonuclease U2: cloning, production in *Pichia pastoris* and affinity chromatography purification of the active recombinant protein

Antonio Martínez-Ruiz <sup>a</sup>, Lucía García-Ortega <sup>a</sup>, Richard Kao <sup>b</sup>, Mercedes Oñaderra <sup>a</sup>,  
 José M. Mancheño <sup>a</sup>, Julian Davies <sup>b</sup>, Álvaro Martínez del Pozo <sup>a,\*</sup>,  
 José G. Gavilanes <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Química, Universidad Complutense, E-28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia, 6174 University Blvd., Vancouver, BC, Canada V6T 1Z3

Received 2 June 2000; accepted 14 June 2000

### Abstract

RNase U2 is an endoribonuclease secreted by the fungus *Ustilago sphaerogena*. Its genomic DNA (*rmu2*), containing an intron of 116 bp, has been isolated and cloned. The corresponding cDNA has also been synthesized. The recombinant RNase U2 was successfully produced in *Pichia pastoris*, fused to the yeast alkaline phosphatase signal peptide. The recombinant RNase U2, purified by affinity chromatography, contains three extra amino acids at its amino-terminal end and retains the enzymatic and spectroscopic properties of the natural fungal protein. © 2000 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Microbial RNase; Ribotoxin; RNase T1;  $\alpha$ -Sarcin

### 1. Introduction

RNase U2 [EC 3.1.27.4] is an endoribonuclease (114 amino acids) secreted by the smut fungus *Ustilago sphaerogena* [1]. Its three-dimensional structure closely resembles that of other microbial extracellular RNases such as RNase T1 from *Aspergillus oryzae* [2]. However, RNase U2 displays unique enzymatic properties such as an optimum pH for enzymatic activity at pH 3.5–5.5 [1] and a specificity for hydrolyzing phosphodiester bonds of 3'-linked purine nucleotides, A/GpN [3,4]. Both characteristics are shared by  $\alpha$ -sarcin, a specific RNase secreted by *Aspergillus giganteus* [5–7].  $\alpha$ -Sarcin is a cytotoxic protein (150 amino acids), which cleaves a single phosphodiester bond of the larger rRNA at a highly conserved sequence [8] after entering its target cells [9]. This protein is one of the best known members of the family of microbial ribotoxins [8]. Although the ribotoxins are larger than the non-toxic RNases T1 and U2, both groups of proteins display a highly similar folding pattern but differ in length and arrangement of the protein loops of non-periodic

structure [2,10]. Thus, the cytotoxicity of the ribotoxins could be related to such loops [10–14]. Since the three-dimensional structures of RNase U2 [2] and  $\alpha$ -sarcin [10], for which the non-toxic RNase U2 displays higher structural similarity than RNase T1 [10], are known, this hypothesis could be analyzed by producing chimeric versions of the nucleases in which different loops are exchanged by genetic manipulation. Such experiments have been impaired by the lack of characterization of the RNase U2 gene and a suitable system for the production of this RNase as recombinant protein. We herein report the solution to these problems.

### 2. Materials and methods

*U. sphaerogena* ATCC 12421 and CBS 534.71 were used to isolate both genomic DNA and RNA and fungal RNase U2, respectively. Cloning procedures and bacterial and yeast manipulations were carried out according to standard methods [15,16].

DNA purification was performed from potato dextrose broth fungal cultures as described [13,17]. The RNase U2 genomic DNA was amplified by standard polymerase chain reaction (PCR) procedures, by using partially degen-

\* Corresponding author. Tel.: +34 (91) 394 4259;  
 Fax: +34 (91) 394 4159; E-mail: mayte@solea.quim.ucm.es

```

TCGGACATCCCTCAGTCCCCAACTGCGGGCGCAACGTTTACTCTAACGACGACATCAAC 60
C D I P Q S T N C G G N V Y S N D D I N 20

ACTGCCATTCAAGGCGCACTTGACGACGTTGCTAACGGTGATCGTCCTGGTGAGCTTTAC 120
T A I Q G A L D D V A N G D R P ----- 36

TTCCCTTGCCAAACACAACAAACACACTTTGCTTTCCATCCCTCCTAATTGGTTTGG 180
-----intron-----

CCCCTGCGGCTGACACTTTTTCTCTTGGCTCATCATCTCAACAGACAATTATCCTCATC 240
----- D N Y P H 41

AGTACTACGATGAAGCGTCTGAAGACATTACTCTTTGCTGTGGATCGGTCCTTGGTCCG 300
Q Y Y D E A S E D I T L C C G S G P W S 61

AATTCCTCTCGTTTACAATGGACCTTATTACTCGAGTAGAGATAACTATGTTTCTCCCG 360
E F P L V Y N G P Y Y S S R D N Y V S P 81

GCCCTGATCGTGTATTATCAGACAACACGGGAGAGTTTGTGCAACCGTCACTCATA 420
G P D R V I Y Q T N T G E F C A T V T H 101

CGGGTGCAGCTAGTTACGACGCTTCACCCAGTCTCGTAA 461
T G A A S Y D G F T Q C S End 114

```

Fig. 1. Sequence of *rmu2* including its translation into amino acids. The cDNA is identical except for the 116 bp intron. The sequences imposed by the primers used for the cDNA PCR are boxed. This sequence has been deposited at the EMBL Database under accession number AJ004827.

erate deoxyoligonucleotides (5' ACCAACTGCGGGCGG-CAACGTSTA 3') and (5' GCACTGGGTGAAGCCG-TCRTA 3'), corresponding to amino acid sequences 7–14 and 107–113, respectively.

RNA was extracted from *U. sphaerogena* mycelium in a denaturing buffer containing guanidine isothiocyanate [18] and ultracentrifuged onto a CsCl cushion [15,19]. This RNA (5 µg) was used to synthesize cDNA by means of the Marathon Amplification Kit (Clontech). Amplification of the RNase U2 cDNA was performed using primers corresponding to the ends of the complete protein sequence (Fig. 1), with extensions containing convenient restriction sites. Sequence reactions were performed with the ABI Prism Dye terminator Cycle Ready Reaction Kit and analyzed on an ABI Prism 377 DNA sequencer (Perkin-Elmer).

The plasmid pING3552 [12,20] was used to clone the RNase U2 cDNA in *Escherichia coli*. The expression of the gene is controlled by the *araB* promoter from *Salmonella typhimurium* and induced by L-arabinose. The DNA sequence corresponding to the mature form of RNase U2 was fused to the *pelB* signal sequence of *Erwinia carotovora* which results in extracellular protein production. This plasmid (pINPGU2) was used to transform an *E. coli* host derivative of W3110 cells to produce the protein as described [12,14,20].

RNase U2 cDNA was also cloned and expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, using the plasmids pPIC9 and pHIL-S1 (Invitrogen). *P. pastoris* GS115 cells carrying the integrated plasmid constructs, pPICU2 and pHSU2 (Fig. 2) were screened as described [21,22]. His<sup>+</sup>Mut<sup>s</sup> RNase-producing strains were further selected by their ability to cleave RNA embedded in agar plates [23].

Fungal RNase U2 was purified from the extracellular medium of *U. sphaerogena* cultures grown at 30°C for 100 h as described [1]. Large-scale production of recombinant protein was carried out in buffered minimal medium as described [22], but without yeast extract and peptone. The extracellular medium was exhaustively dialyzed against 20 mM piperazine, pH 6.0, and then loaded onto DEAE-cellulose equilibrated in the same buffer. The protein was eluted with a 0–0.5 M NaCl linear gradient. Fractions containing acidic ribonucleolytic activity were pooled, dialyzed against 50 mM sodium acetate, pH 4.5, and chromatographed on a 2',5'-ADP-Sepharose (Pharmacia) column, which acts as an affinity bed for fully active RNase U2. It was finally eluted with a linear gradient, 50 mM sodium acetate (pH 4.5)/50 mM Tris-HCl (pH 7.0) containing 50 mM NaCl. The purified protein was concentrated and dialyzed against 50 mM ammonium acetate, pH 4.5.

Ribonucleolytic activity against *Torula* yeast RNA (Sigma, type VI) was measured essentially as described [24] but at pH 4.5. The assays were performed for 15 min at 37°C in 250 µl of 0.1 M KCl, 50 mM sodium acetate, 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 4.5, containing 0.01% (w/v) bovine serum albumin and 2 mg ml<sup>-1</sup> of *Torula* RNA. The reaction was stopped by adding 250 µl of ice-cold 10% (v/v) perchloric acid, containing 0.25% (w/v) uranyl acetate. The resulting suspension was maintained for 30 min in an ice-bath and then centrifuged at 14000×g for 15 min at 4°C. The supernatant was 10-fold diluted and its optical density at 260 nm was measured on a Beckman DU-7 spectrophotometer. The resulting values are proportional to the concentration of soluble oligonucleotides, resulting from ribonuclease activity, up to

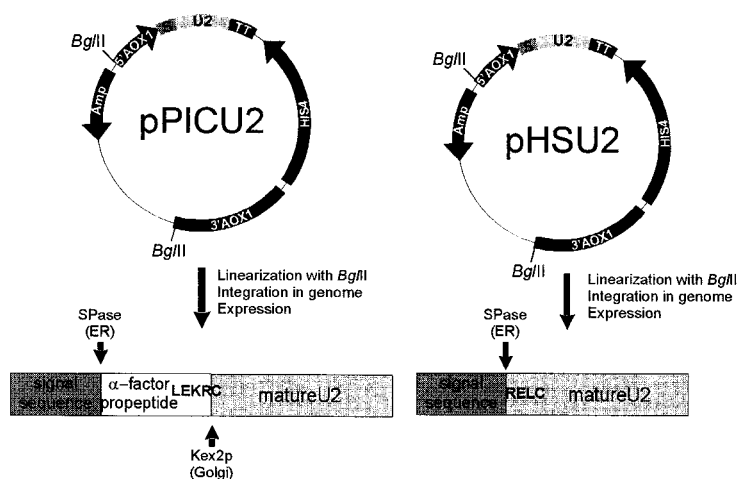


Fig. 2. Strategies for production of RNase U2 in *P. pastoris*. The potential cleavage sites for endoplasmic reticulum (ER) signal peptidase (SPase) and Kexp-like convertase are shown in the lower part.

OD<sub>260</sub> = 0.6. One enzyme unit is defined as the amount of protein producing a  $\Delta$ OD<sub>260</sub> = 0.4; e.g. producing an increase of OD<sub>260</sub> = 0.4 on incubation under the above conditions for 30 min.

Ribonucleolytic activity against polyadenylic acid [poly(A)] was assayed by zymograms on polyacrylamide gels as described [7,22,25].

The hydrolysis of ApA [26] was measured on a Peltier-thermostatted Beckman DU-640 spectrophotometer, at 25°C in 0.4–1.0 cm optical-path cells. The OD<sub>262</sub> of the substrate (10–60 μM) solution (0.78 ml in 50 mM sodium acetate, pH 4.5, containing 50 mM NaCl) was lower than 1.0. The reaction was started by adding 20 μl of the enzyme solution (200 nM, final concentration).  $K_m$  and  $k_{cat}$  were calculated by adjusting the initial rate values (triplicate assays) to the Michaelis–Menten equation (Sigma Plot v5.0, Jandel). The linearity of the assays for enzyme and substrate concentrations used was verified.

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), amino acid analysis and spectroscopic characterization of purified proteins were performed according to standard procedures as described [7,19,22].

### 3. Results and discussion

Four different DNA fragments were obtained by PCR amplification of the genomic DNA isolated from *U. sphaerogena*. DNA sequencing revealed that only the smallest one corresponded to the expected RNase U2 gene (*rmu2*), including an intron of 116 bp between the codons coding for Pro-36 and Asp-37 (Fig. 1). Two new primers, designed to cover the full mature protein sequence (Fig. 1), were used to amplify the cDNA prepared

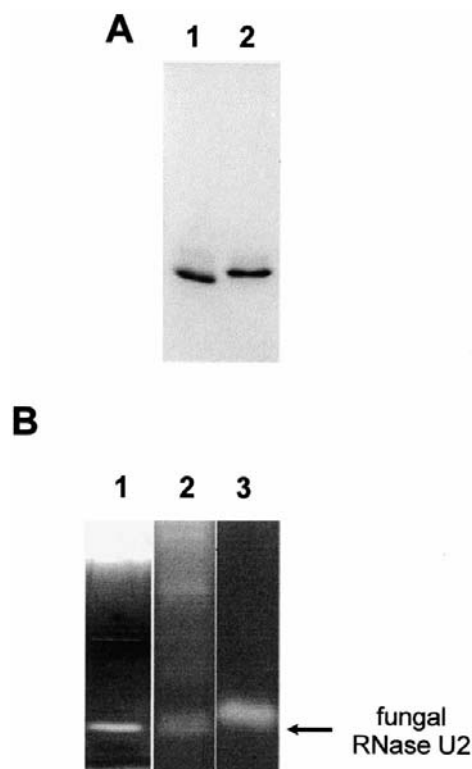


Fig. 3. (A) SDS-PAGE of fungal (1) and recombinant (2) RNase U2. (B) Zymogram assays of the extracellular medium of cultures of *E. coli* hosting pINGU2 (1) and *P. pastoris* transformed with pPICU2 (2) or pHSU2 (3).

Table 1  
Purification of recombinant RNase U2 produced in *P. pastoris*

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U mg <sup>-1</sup> )	Yield (%)
Crude extract	141.4	6816	48	100
DEAE-cellulose column	11.1	5394	485	79
2',5'-ADP-Sepharose column	0.6	2265	3775	33

from *U. sphaerogena* RNA. The sequence of the single band obtained completely matched that of *rmu2* but lacked the intron (Fig. 1). Therefore, this RNase U2 cDNA was used to prepare recombinant expression vectors for *E. coli* (pINPGU2) and *P. pastoris* (pPICU2 and pHSU2) (Fig. 2).

The production of recombinant RNase U2 in heterologous hosts presents several problems: folding due to three disulfide bridges with two consecutive cysteines involved in different bonds [27]; modification of structural and enzymatic properties by a pH-dependent formation of isoaspartate bonds [2,28]; and toxicity of the recombinant RNase to the host.

To overcome the risk of host death on intracellular production of RNases, periplasmic production in *E. coli* was first attempted, based on the fusion of *rmu2* to a modified version of the OmpA signal peptide [19], a similar system to that used for the production of  $\alpha$ -sarcin. However, no RNase U2 production was detected in the different fractions of the many *E. coli* strains tested. Indeed, bacterial lysis was routinely observed upon induction with IPTG, suggesting RNase toxicity. The extracellular production of the protein was also attempted, but a homogeneous sample could not be obtained. Very low levels of RNase U2, with an additional contaminating RNase activity, could be detected by zymogram analysis in the extracellular medium from bacteria carrying the plasmid pINPGU2, but not by Coomassie Blue staining (Fig. 3).

The methylotrophic yeast *P. pastoris* was then chosen considering that the secretion pathways of this eukaryotic microorganism may prevent intracellular RNase toxicity. This was attempted by using the plasmid pPICU2 (Fig. 2). Low levels of RNase U2 were obtained together with additional ribonuclease activities absent in the extracellular medium of the host (Fig. 3). These activities may arise from an incorrect cleavage of the propeptide by the Kex2p-like endopeptidase, presumably due to the disulfide bridge involving Cys-1 of RNase U2. In the second construct, pHSU2 (Fig. 2), the mature protein is fused to a

signal peptide that is cleaved prior to disulfide formation. In this case, only one band of ribonuclease activity was obtained, with slightly lower electrophoretic mobility than that of fungal RNase U2 (Fig. 3). This is probably due to the presence of three additional amino acid residues (-3)Arg-Glu-Leu(-1) at the NH<sub>2</sub>-terminal end (Fig. 2). Homogeneous recombinant RNase U2 (about 1.4 mg l<sup>-1</sup> crude extract; Table 1), according to its sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE behavior (Fig. 3) and amino acid composition, was obtained from the extracellular medium after 2 days of induction, by ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose followed by an affinity separation on 2',5'-ADP-Sepharose. The kinetic parameters of the purified protein (Table 2), calculated using ApA as substrate, were very similar to those reported for the fungal RNase U2 [26,29]. The absorption coefficient (0.1% w/v, 1 cm, 280 nm) was 1.80. The far-UV circular dichroism spectrum was coincident with that reported for the fungal RNase U2 [29]. Finally, the emission spectrum upon excitation of 275 nm, showed a single maximum around 300 nm, indicating that the single Trp residue is strongly quenched, as also reported for the fungal RNase U2 [28].

These results indicate that the protein produced in *P. pastoris* retained the structural and enzymatic features of the native RNase U2. This system now allows protein engineering studies required for a more extensive study of the enzymatic mechanism of RNase U2 and its relationship to the cytotoxic activity of the ribotoxins.

#### Acknowledgements

This work was supported by a grant from the MEC (Spain) and NSERC (Canada; R.K. and J.D.). A.M.-R. and L.G.-O. are recipients of fellowships from the MEC (Spain).

#### References

- [1] Arima, T., Uchida, T. and Egami, F. (1968) Studies on extracellular ribonucleases of *Ustilago sphaerogena*. Purification and properties. *Biochem. J.* 106, 601–607.
- [2] Noguchi, S., Satow, Y., Uchida, T., Sasaki, C. and Matsuzaki, T. (1995) Crystal structure of *Ustilago sphaerogena* ribonuclease U2 at 1.8 Å resolution. *Biochemistry* 34, 15583–15591.
- [3] Rushizky, G.W., Mozejko, J.H., Rogerson, D.J.Jr. and Sober, H. (1970) Characterization of enzymatic specificity of a ribonuclease from *Ustilago sphaerogena*. *Biochemistry* 9, 4966–4971.

Table 2  
Kinetic constants for ApA hydrolysis of recombinant RNase U2

	$K_m$ ( $\mu$ M)	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ )
Fungal	234 $\pm$ 35 <sup>a</sup>	200 $\pm$ 20 <sup>a</sup>	8.5 $\times$ 10 <sup>5</sup>
Recombinant	200 $\pm$ 27	35 $\pm$ 4	1.8 $\times$ 10 <sup>5</sup>

<sup>a</sup>[26].

- [4] Uchida, T., Arima, T. and Egami, F. (1970) Specificity of RNase U2. *J. Biochem.* 67, 91–102.
- [5] Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Lacadena, V., Martínez-Ruiz, A., Mancheño, J.M., Oñaderra, M. and Gavilanes, J.G. (1998) The cytotoxin  $\alpha$ -sarcin behaves as a cyclizing ribonuclease. *FEBS Lett.* 424, 46–48.
- [6] Pérez-Cañadillas, J.M., Campos-Olivas, R., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Gavilanes, J.G., Santoro, J., Rico, M. and Bruix, M. (1998) Characterization of  $pK_a$  values and titration shifts in the cytotoxic ribonuclease  $\alpha$ -sarcin by NMR. Relationship between electrostatic interactions, structure and catalytic function. *Biochemistry* 37, 15865–15876.
- [7] Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Martínez-Ruiz, A., Pérez-Cañadillas, J.M., Bruix, M., Mancheño, J.M., Oñaderra, M. and Gavilanes, J.G. (1999) Role of histidine-50, glutamic acid-96 and histidine-137 in the ribonucleolytic mechanism of the ribotoxin  $\alpha$ -sarcin. *Proteins* 37, 474–484.
- [8] Wool, I.G., Glück, A. and Endo, Y. (1992) Ribotoxin recognition of ribosomal RNA and a proposal for the mechanism of translocation. *Trends Biochem. Sci.* 17, 266–269.
- [9] Turnay, J., Olmo, N., Jiménez, J., Lizarbe, M.A. and Gavilanes, J.G. (1993) Kinetic study of the cytotoxic effect of  $\alpha$ -sarcin, a ribosome inactivating protein from *A. giganteus*, on tumor cell lines protein biosynthesis inhibition and cell binding. *Mol. Cell Biochem.* 122, 39–47.
- [10] Campos-Olivas, R., Bruix, M., Santoro, J., Martínez del Pozo, A., Lacadena, J., Gavilanes, J.G. and Rico, M. (1996) Structural basis for the catalytic mechanism and substrate specificity of the ribonuclease  $\alpha$ -sarcin. *FEBS Lett.* 399, 163–165.
- [11] Kao, R. and Davies, J. (1995) Fungal ribotoxins: a family of naturally engineered targeted toxins? *Biochem. Cell Biol.* 73, 1151–1159.
- [12] Kao, R. and Davies, J. (1999) Molecular dissection of mitogillin reveals that the fungal ribotoxins are a family of naturally engineered ribonucleases. *J. Biol. Chem.* 274, 12576–12582.
- [13] Martínez-Ruiz, A., Kao, R., Davies, J. and Martínez del Pozo, A. (1999) Ribotoxins are a more widespread group of proteins within the filamentous fungi than previously believed. *Toxicon* 37, 1549–1563.
- [14] Kao, R. and Davies, J. (2000) Single amino acid substitutions affecting the specificity of the fungal ribotoxin mitogillin. *FEBS Lett.* 466, 87–90.
- [15] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- [16] Rose, M.D., Winston, F. and Hieter, P. (1990) *Methods in Yeast Genetics. A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- [17] Wirth, J., Martínez del Pozo, A., Mancheño, J.M., Martínez-Ruiz, A., Lacadena, J., Oñaderra, M. and Gavilanes, J.G. (1997) Sequence determination and molecular characterization of gigantins, a cytotoxic protein produced by the mould *Aspergillus giganteus* IFO 5818. *Arch. Biochem. Biophys.* 343, 188–193.
- [18] Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- [19] Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Barbero, J.L., Mancheño, J.M., Gasset, M., Oñaderra, M., López-Otin, C., Ortega, S., García, J.L. and Gavilanes, J.G. (1994) Overproduction and purification of biologically active native fungal  $\alpha$ -sarcin in *Escherichia coli*. *Gene* 142, 147–151.
- [20] Better, M., Bernhard, S.L., Lei, S.P., Fishwild, D. and Carrol, S.F. (1992) Activity of recombinant mitogillin and mitogillin immunconjugates. *J. Biol. Chem.* 267, 16712–16718.
- [21] Huecas, S., Villalba, M., González, E., Martínez-Ruiz, A. and Rodríguez, R. (1999) Production and characterization of biologically active olive pollen allergen Ole e 1 secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *Eur. J. Biochem.* 261, 539–545.
- [22] Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, A., Lacadena, J., Mancheño, J.M., Oñaderra, M., López-Otin, C. and 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 Exp. Purif.* 12, 315–322.
- [23] Quaas, R., Landt, O., Grunert, H.-P., Beineke, M. and Hahn, U. (1989) Indicator plates for rapid detection of ribonuclease T1 secreting *Escherichia coli* clones. *Nucleic Acids Res.* 17, 3318.
- [24] García-Segura, J.M., Orozco, M.M., Fominaya, J.M. and Gavilanes, J.G. (1986) Purification, molecular and enzymic characterization of an acid RNase from the insect *Ceratitis capitata*. *Eur. J. Biochem.* 158, 367–372.
- [25] Blank, A., Sugiyama, R.H. and 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.
- [26] Yasuda, T. and Inoue, Y. (1982) Studies of catalysis by ribonuclease U2. Steady-state kinetics for transphosphorylation of oligonucleotide and synthetic substrates. *Biochemistry* 21, 364–369.
- [27] Sato, S. and Uchida, T. (1975) The disulfide bridges of ribonuclease U2 from *Ustilago sphaerogena*. *J. Biochem.* 77, 1171–1176.
- [28] Kanaya, S. and Uchida, T. (1986) Comparison of the primary structures of ribonuclease U2 isoforms. *Biochem. J.* 240, 163–170.
- [29] Uchida, T. and Shibata, Y. (1981) An affinity adsorbent, 5'-adenylate-aminohexyl-Sepharose. I. Purification and properties of two forms of RNase U2. *J. Biochem.* 90, 463–471.





## [21] RNase U2 and $\alpha$ -Sarcin: A Study of Relationships

By ANTONIO MARTÍNEZ-RUIZ, LUCÍA GARCÍA-ORTEGA, RICHARD KAO,  
JAVIER LACADENA, MERCEDES OÑADERRA, JOSÉ M. MANCHEÑO,  
JULIAN DAVIES, ÁLVARO MARTÍNEZ DEL POZO, and JOSÉ G. GAVILANES

### Introduction

Elsewhere in this volume,<sup>1</sup> it was mentioned that it would be interesting to insert the targeting motifs of ribotoxins (presumably responsible for the ability to gain access to the cytoplasm of eukaryotic cells, and the exquisite specificity toward ribosomes) into other enzyme sequences, in order to generate specific targeted toxins. In this regard,  $\alpha$ -sarcin, one of the most representative ribotoxins,<sup>1</sup> and RNase U2 seem to be the best candidates for exchange of selected sequence motifs. RNase U2 is a nontoxic extracellular enzyme of the RNase T1 family<sup>2</sup> which shows the closest phylogenetic relationship with ribotoxins.<sup>3,4</sup> Although  $\alpha$ -sarcin and RNase U2 display different biological actions, they share structural (amino acid sequence and global fold) and enzymatic similarities. This suggests that both proteins may have been descended from a common ancestor. It is therefore tempting to speculate on the features that distinguish  $\alpha$ -sarcin as a cytotoxic ribonuclease.

<sup>1</sup> R. Kao, A. Martínez-Ruiz, A. Martínez del Pozo, R. Cramer, and J. Davies, *Methods Enzymol.* **341**, [21] 2001 (this volume).

<sup>2</sup> M. Irie and K. Ohgi, *Methods Enzymol.* **341**, [3] 2001 (this volume).

<sup>3</sup> G. Sacco, K. Drickamer, and I. G. Wool, *J. Biol. Chem.* **258**, 5811 (1983).

<sup>4</sup> J. M. Mancheño, M. Gasset, J. Lacadena, A. Martínez del Pozo, M. Oñaderra, and J. G. Gavilanes, *J. Theor. Biol.* **172**, 259 (1995).

*RNase U2*

The smut fungus *Ustilago sphaerogena* secretes at least four different RNases, U1, U2, U3, and U4.<sup>5,6</sup> RNase U1 is a guanylic acid-specific enzyme of the RNase T1 type,<sup>5-9</sup> RNase U4 is a nonspecific RNA exonuclease,<sup>5,6,10</sup> and RNases U2 and U3 are two similar enzymes that display specificity for purines.<sup>5,6,11</sup>

RNase U2 [EC 3.1.27.4] is a single polypeptide chain of 114 amino acids (12,490 molecular mass).<sup>12</sup> It shows a strong preference for 3' linked purine nucleotide phosphodiester linkages (A > G ≫ C > U),<sup>13,14</sup> which is rather unusual within the group of microbial extracellular RNases<sup>11,15</sup> (RNase T1 from *Aspergillus oryzae*, for example, shows strict specificity for the guanylyl group).<sup>2</sup> RNase U2 also differs in its optimum pH (4.5) from RNase T1,<sup>6</sup> but both are cyclizing enzymes, cleaving RNA in two separate stages, transphosphorylation and hydrolysis.<sup>16</sup>

The amino acid sequence of RNase U2<sup>12,17,18</sup> shows that the enzyme lacks Lys residues and displays a high content of acidic residues (*pI* of 2.8–3.3). It contains one Trp residue, although its fluorescence emission is strongly quenched under native conditions.<sup>19</sup> A summary of its physicochemical and kinetic properties is reported elsewhere.<sup>19-21</sup> RNase U2 exists as a mixture of two isoforms, U2A (the one originally isolated, which is easily converted to the other species after alkali treatment)<sup>22</sup> and U2B, which are different in terms of specific activity and secondary structure content due to the presence of an isoaspartate bond in RNase U2B.<sup>17,22</sup> A third isoform, RNase U2C, containing another isoaspartate

<sup>5</sup> T. Arima, T. Uchida, and F. Egami, *Biochem. J.* **106**, 601 (1968).

<sup>6</sup> T. Arima, T. Uchida, and F. Egami, *Biochem. J.* **106**, 609 (1968).

<sup>7</sup> K. Sato and F. Egami, *J. Biochem.* **44**, 753 (1957).

<sup>8</sup> D. G. Glitz and C. A. Dekker, *Biochemistry* **2**, 1185 (1963).

<sup>9</sup> W. C. Kenney and C. A. Dekker, *Biochemistry* **10**, 4962 (1971).

<sup>10</sup> A. Blank and C. A. Dekker, *Biochemistry* **11**, 3956 (1972).

<sup>11</sup> J. M. Adams, P. G. N. Jeppeson, F. Sanger, and B. G. Barrell, *Nature* **223**, 1009 (1969).

<sup>12</sup> S. Sato and T. Uchida, *Biochem. J.* **145**, 353 (1975).

<sup>13</sup> G. W. Rushizky, J. H. Mozejko, D. J. Rogerson, Jr., and H. Sober, *Biochemistry* **9**, 4966 (1970).

<sup>14</sup> T. Uchida, T. Arima, and F. Egami, *J. Biochem.* **67**, 91 (1970).

<sup>15</sup> T. Uchida, L. Bonen, H. W. Schauf, B. J. Lewis, L. Zablen, and C. Woese, *J. Mol. Evol.* **3**, 63 (1974).

<sup>16</sup> T. Yasuda and Y. Inoue, *Biochemistry* **21**, 364 (1982).

<sup>17</sup> S. Kanaya and T. Uchida, *Biochem. J.* **240**, 163 (1986).

<sup>18</sup> S. Kanaya and T. Uchida, *J. Biochem.* **118**, 681 (1995).

<sup>19</sup> S. Minato and A. Hirai, *J. Biochem.* **85**, 327 (1979).

<sup>20</sup> T. Uchida and F. Egami, in "The Enzymes" (P. D. Boyer, ed.), Vol. 4, pp. 205–250. Academic Press, New York, 1971.

<sup>21</sup> F. Egami, T. Oshima, and T. Uchida, in "Molecular Biology, Biochemistry, and Biophysics" (F. Chapeville and A.-L. Haenni, eds.), Vol. 32, p. 250. Springer-Verlag, Heidelberg, 1980.

<sup>22</sup> T. Uchida and Y. Shibata, *J. Biochem.* **90**, 463 (1981).

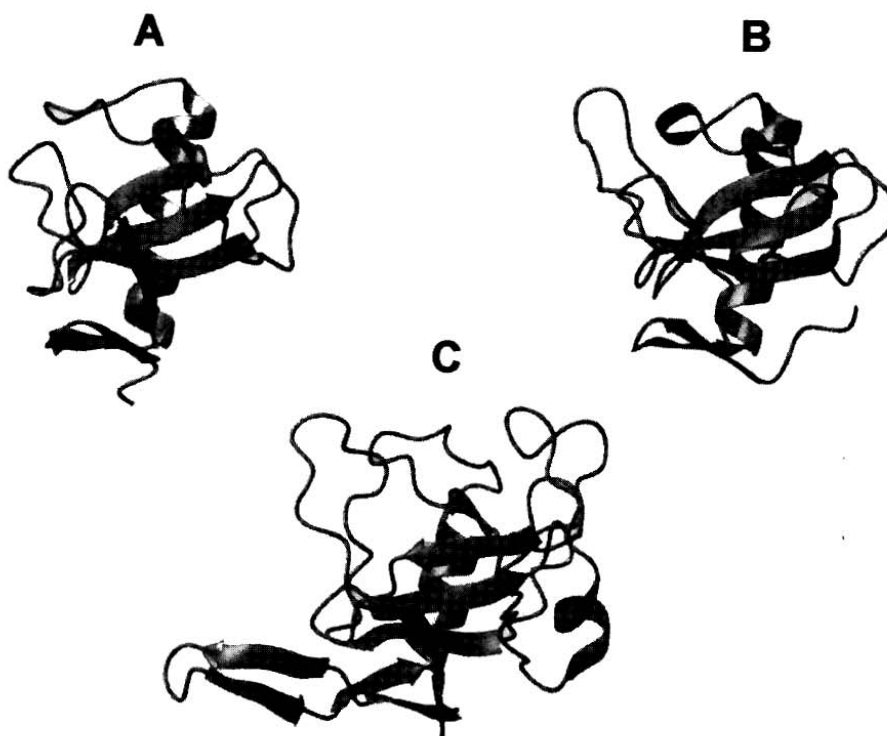


FIG. 1. Schematic representation of the three-dimensional structures of (A) RNase T1,<sup>24</sup> (B) RNase U2,<sup>23</sup> and (C)  $\alpha$ -sarcin.<sup>25</sup>

modification, was found during the resolution of the three-dimensional structure of the protein (at 1.8 Å resolution).<sup>23</sup>

The structure of RNase U2 is very similar to that of RNase T1<sup>24</sup> and  $\alpha$ -sarcin<sup>25</sup> (Fig. 1). The three proteins display a common structural core constituted by a central  $\beta$  sheet packed against a small  $\alpha$  helix. A long, protruding loop, containing residues Tyr-67 to Gly-82, and three disulfide bridges (located at positions 1–53, 9–112, and 54–95)<sup>12,26</sup> are distinctive features of the RNase U2 structure (Fig. 2).

#### $\alpha$ -Sarcin

$\alpha$ -Sarcin is a microbial ribonuclease secreted by the mold *Aspergillus giganteus*.<sup>27,28</sup> It is extremely specific since it only cleaves a single phosphodiester

<sup>23</sup> S. Noguchi, Y. Satow, T. Uchida, C. Sasaki, and T. Matsuzaki, *Biochemistry* **34**, 15583 (1995).

<sup>24</sup> C. N. Pace, U. Heinemann, U. Hahn, and W. Saenger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**, 343 (1991).

<sup>25</sup> J. M. Pérez-Cañadillas, J. Santoro, R. Campos-Olivas, J. Lacadena, A. Martínez del Pozo, J. G. Gavilanes, M. Rico, and M. Bruix, *J. Mol. Biol.* **299**, 1061 (2000).

<sup>26</sup> S. Sato and T. Uchida, *J. Biochem.* **77**, 795 (1975).

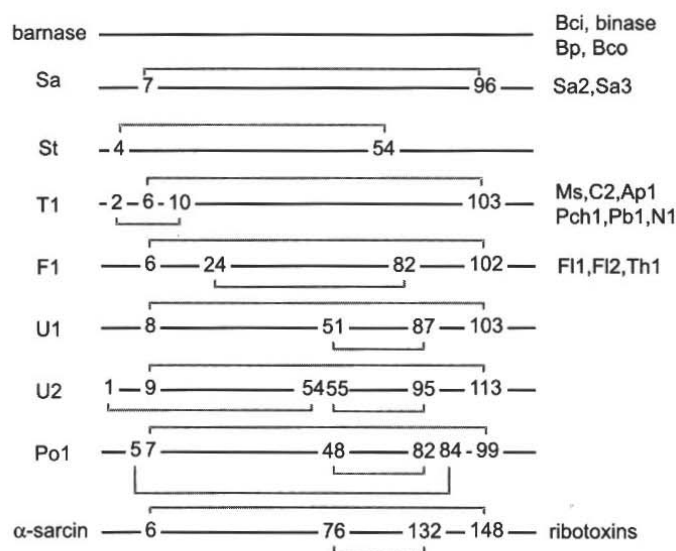


FIG. 2. Disulfide bridge patterns of different microbial RNases.<sup>4,103</sup> Ap1, RNase Ap1 from *Aspergillus palidus*; Barnase, RNase from *Bacillus amyloquefaciens*; Bci, RNase Bci from *Bacillus circulans*; Bco, RNase Bco from *Bacillus coagulans*; Binase, RNase from *Bacillus intermedius*; Bp, RNase Bp from *Bacillus pumilus*; C2, RNase C2 from *Aspergillus clavatus*; F1, RNase F1 from *Fusarium moniliforme*; F11 and F12, RNases F11 and F12 from *Fusarium lateritium*; Ms, RNase Ms from *Aspergillus saitoi*; N1, RNase N1 from *Neurospora crassa*; Pb1, RNase Pb1 from *Penicillium brevicompactum*; Pch1, RNase Pch1 from *Penicillium chrysogenum*; Po1, RNase Po1 from *Pleurotus ostreatus*; Sa, Sa2, and Sa3, RNases Sa, Sa2, and Sa3 from *Streptomyces aureofaciens*;  $\alpha$ -sarcin, ribotoxin from *Aspergillus giganteus*; T1, RNase T1 from *Aspergillus oryzae*; Th1, RNase Th1 from *Trichoderma harzianum*; U1 and U2, RNases U1 and U2 from *Ustilago sphaerogena*.

bond of the large-subunit rRNA.<sup>1,29</sup> This inhibits protein biosynthesis and leads to cellular death.<sup>1,30-32</sup> Similar to RNase U2,  $\alpha$ -sarcin is an acid cyclizing RNase that can hydrolyze A/GpA dinucleotides, although with low specific activity.<sup>33-35</sup>

<sup>27</sup> B. H. Olson and G. L. Goerner, *Applied Microbiol.* **13**, 314 (1965).

<sup>28</sup> B. H. Olson, J. C. Jennings, V. Roga, A. J. Junek, and D. M. Schuurmans, *Applied Microbiol.* **13**, 322 (1965).

<sup>29</sup> D. G. Schindler and J. E. Davies, *Nucleic Acid Res.* **4**, 1097 (1977).

<sup>30</sup> Y. Endo, P. W. Hubert, and I. G. Wool, *J. Biol. Chem.* **258**, 2662 (1983).

<sup>31</sup> I. G. Wool, *Trends Biochem. Sci.* **9**, 14 (1984).

<sup>32</sup> I. G. Wool, A. Glück, and Y. Endo, *Trends Biochem. Sci.* **17**, 266 (1992).

<sup>33</sup> J. Lacadena, A. Martínez del Pozo, V. Lacadena, A. Martínez-Ruiz, J. M. Mancheño, M. Oñaderra, and J. G. Gavilanes, *FEBS Lett.* **424**, 46 (1998).

<sup>34</sup> J. M. Pérez-Cañadillas, R. Campos-Olivas, J. Lacadena, A. Martínez del Pozo, J. G. Gavilanes, J. Santoro, M. Rico, and M. Bruix, *Biochemistry* **37**, 15865 (1998).

<sup>35</sup> J. Lacadena, A. Martínez del Pozo, A. Martínez-Ruiz, J. M. Pérez-Cañadillas, M. Bruix, J. M. Mancheño, M. Oñaderra, and J. G. Gavilanes, *Proteins* **37**, 474 (1999).

The target rRNA sequence for  $\alpha$ -sarcin, and its related ribotoxins, is conserved in all ribosomes so far studied.<sup>1,36,37</sup> However,  $\alpha$ -sarcin is quite selective against intact cells. For example, it does not kill bacteria or fungi,<sup>28</sup> and it is especially active against virus-infected<sup>38,39</sup> and transformed eukaryotic cells.<sup>28,40,41</sup> This selectivity is probably related to the ability of  $\alpha$ -sarcin to destabilize bilayers containing negatively charged phospholipids since no membrane protein receptors have been found. Such an interaction with membranes promotes their aggregation and fusion<sup>42-46</sup> resulting in protein translocation across the bilayers of model vesicles.<sup>47-49</sup>

Although  $\alpha$ -sarcin is a basic protein ( $pI > 8.0$ )<sup>3</sup> and longer (150 amino acids) than RNase U2, both proteins display a high degree of sequence similarity,<sup>3,4</sup> the two disulfide bridges of  $\alpha$ -sarcin being conserved in RNase U2 (Fig. 2). An even greater degree of similarity can be seen in comparing the three-dimensional structures. As mentioned above,  $\alpha$ -sarcin<sup>25,50</sup> exhibits the same global fold as RNase U2 (Fig. 1). Significant differences are present in the long unstructured loops of  $\alpha$ -sarcin, which contain a number of basic residues. This evidence suggests that the specific action of the ribotoxin on ribosomes and membranes is related to these loops.<sup>1,4,51-55</sup>

The three-dimensional structure similarity extends to the residues considered as catalytic.<sup>25,34,35,50</sup> His-137 and Glu-96 of  $\alpha$ -sarcin act as general acid and base

<sup>36</sup> S. P. Miller and J. W. Bodley, *FEBS Lett.* **229**, 388 (1988).

<sup>37</sup> A. A. Szewczak, P. B. Moore, Y.-L. Chan, and I. G. Wool, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* **90**, 9581 (1993).

<sup>38</sup> L. Carrasco and M. Esteban, *Virology* **117**, 62 (1982).

<sup>39</sup> C. Fernández-Puentes and L. Carrasco, *Cell* **20**, 769 (1980).

<sup>40</sup> N. Olmo, J. Turnay, M. A. Lizarbe, and J. G. Gavilanes, *STP Pharma Sci.* **3**, 93 (1993).

<sup>41</sup> J. Turnay, N. Olmo, J. Jiménez, M. A. Lizarbe, and J. G. Gavilanes, *Mol. Cell. Biochem.* **122**, 39 (1993).

<sup>42</sup> M. Gasset, A. Martínez del Pozo, M. Oñaderra, and J. G. Gavilanes, *Biochem. J.* **258**, 569 (1989).

<sup>43</sup> M. Gasset, M. Oñaderra, P. G. Thomas, and J. G. Gavilanes, *Biochem. J.* **265**, 815 (1990).

<sup>44</sup> J. M. Mancheño, M. Gasset, J. Lacadena, F. Ramón, A. Martínez del Pozo, M. Oñaderra, and J. G. Gavilanes, *Biophys. J.* **67**, 1117 (1994).

<sup>45</sup> J. M. Mancheño, M. Gasset, J. P. Albar, J. Lacadena, A. Martínez del Pozo, M. Oñaderra, and J. G. Gavilanes, *Biophys. J.* **68**, 2387 (1995).

<sup>46</sup> J. M. Mancheño, A. Martínez del Pozo, J. P. Albar, M. Oñaderra, and J. G. Gavilanes, *J. Peptide Res.* **51**, 142 (1998).

<sup>47</sup> M. Oñaderra, J. M. Mancheño, M. Gasset, J. Lacadena, G. Schiavo, A. Martínez del Pozo, and J. G. Gavilanes, *Biochem. J.* **295**, 221 (1993).

<sup>48</sup> M. Gasset, J. M. Mancheño, J. Lacadena, J. Turnay, N. Olmo, M. A. Lizarbe, A. Martínez del Pozo, M. Oñaderra, and J. G. Gavilanes, *Curr. Topi. Peptide Protein Res.* **1**, 99 (1994).

<sup>49</sup> M. Oñaderra, J. M. Mancheño, J. Lacadena, V. De los Ríos, A. Martínez del Pozo, and J. G. Gavilanes, *Mol. Membr. Biol.* **15**, 141 (1998).

<sup>50</sup> R. Campos-Olivas, M. Bruix, J. Santoro, A. Martínez del Pozo, J. Lacadena, J. G. Gavilanes, and M. Rico, *FEBS Lett.* **399**, 163 (1996).

<sup>51</sup> A. Martínez del Pozo, M. Gasset, M. Oñaderra, and J. G. Gavilanes, *Biochim. Biophys. Acta* **953**, 280 (1988).

catalytic residues of the transphosphorylation step, respectively, while His-50 stabilizes the transition state.<sup>34,35</sup> The equivalent conserved amino acids in RNase U2 would be His-101, Glu-62, and His-41.<sup>4,56</sup> In fact, crystal structures of RNase U2 complexed with different substrate (di- and trinucleotides) and analogs,<sup>57</sup> and chemical modification with ethoxyformic anhydride<sup>26</sup> indicate that either His-41 or Glu-62 must act as a general base while His-101 behaves as a general acid in the first step of the RNA cleavage reaction.

The spectroscopic characteristics of  $\alpha$ -sarcin are consistent with the presence of 8 Tyr and 2 Trp residues.<sup>51,58</sup> Recent site-directed mutagenesis experiments have revealed that the near-UV circular dichroism spectrum of the protein is dominated by Trp-51 while most of the fluorescence emission is due to Trp-4.<sup>59</sup>

### Methods

The methods outlined below focus on the production and characterization of natural and recombinant forms of RNase U2 and  $\alpha$ -sarcin in order to produce and study these chimeric proteins with exchanged loops.

### Cloning and Expression

**Synthesis of cDNA.** RNase U2-producing *Ustilago sphaerogena* strain can be obtained either from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, ATCC 12421) or the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS 534.71). The standard growth medium (SGM) consists of 2.0% (w/v) glucose, 0.2% (w/v) glycine, 0.05% (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% (w/v) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.01% (w/v) MgSO<sub>4</sub>, 0.01% (w/v) KCl, and 0.01% (w/v) CaCl<sub>2</sub>.<sup>5</sup> The most widely used  $\alpha$ -sarcin producing *A. giganteus* strain, originally isolated in Michigan<sup>27</sup> (MDH 18894), is not available from any of the well-known microorganism collections. The presence of the protein has been detected in other isolates,<sup>60,61</sup> but they have not been used for its production and

<sup>52</sup> B. Lamy, J. Davies, and D. Schindler, in "Genetically Engineered Toxins" (A. E. Frankel, ed.), pp. 237–258, Marcel Dekker, New York, 1992.

<sup>53</sup> R. Kao and J. Davies, *J. Biochem. Cell Biol.* **73**, 1151 (1995).

<sup>54</sup> R. Kao and J. Davies, *J. Biol. Chem.* **274**, 12576 (1999).

<sup>55</sup> R. Kao and J. Davies, *FEBS Lett.* **466**, 87 (2000).

<sup>56</sup> A. Martínez-Ruiz, A. Martínez del Pozo, J. Lacadena, M. Oñaderra, and J. G. Gavilanes, *J. Invertebr. Pathol.* **74**, 96 (1999).

<sup>57</sup> N. Noda, S. Noguchi, and Y. Satow, *Nucl. Acids Symp. Series* **37**, 285 (1997).

<sup>58</sup> J. G. Gavilanes, D. Vázquez, F. Soriano, and E. Méndez, *J. Protein. Chem.* **2**, 251 (1983).

<sup>59</sup> C. De Antonio, A. Martínez del Pozo, J. M. Mancheño, M. Oñaderra, J. Lacadena, A. Martínez-Ruiz, J. M. Pérez-Cañadillas, M. Bruix, and J. G. Gavilanes, *Proteins* **41**, 350 (2000).

<sup>60</sup> S. Wnendt, H. Felske-Zech, P.-P. C. Henze, N. Ulbrich, and U. Stahl, *Gene* **124**, 239 (1993).

<sup>61</sup> A. Martínez-Ruiz, R. Kao, J. Davies, and A. Martínez del Pozo, *Toxicon* **37**, 1549 (1999).

purification. The culture medium employed<sup>28,62</sup> contains 1.5% (w/v) beef extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) corn starch, and 0.5% (w/v) sodium chloride.

RNA is isolated from the mycelial culture at the time of maximum protein production.<sup>62,63</sup> Therefore, the method employs strong denaturing conditions to inactivate all present RNases.<sup>62-64</sup> Mycelium (300 mg wet weight) of *U. sphaerogena* or *A. giganteus* is suspended in 2 ml of 4 M guanidinium isothiocyanate, 25 mM sodium citrate, 0.5% (w/v) lauryl sarcosinate, pH 7.5, and 10  $\mu$ l of 2-mercaptoethanol and 2  $\mu$ l of 289-Sigma antifoam is added. This mixture is homogenized by three cycles of 20 sec with a Polytron (Brinkmann Instruments, Westbury, NY), previously sterilized with chloroform, avoiding foam formation. The soluble fraction is collected by centrifugation (3000g, 10 min at room temperature) and loaded onto a CsCl cushion. The remaining steps are described in detail elsewhere.<sup>65</sup> The procedure yields a RNA preparation which is used (5  $\mu$ g) to synthesize the cDNA by a conventional reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification. Appropriate primers, including the stop codon, are 5'TGCGACATCCCTCAGTCCA3' and 5'TTACGAGCACTGGGTGAAGC3', and 5'GCCGTGACCTGGACCTGCT3' and 5'CTAATGAGAGCAGAGCTTA3' for cDNA of RNase U2<sup>63</sup> and  $\alpha$ -sarcin,<sup>62</sup> respectively. Extensions containing convenient restriction sites for each construct planned should be also included.

*Construction of Expression Plasmids.* Native recombinant  $\alpha$ -sarcin has been produced in *Escherichia coli*.<sup>62,66</sup> RNase U2 has been expressed as a recombinant protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.<sup>63</sup> Attempts to produce large amounts of native protein in *E. coli* have not been so far successful. A system to produce  $\alpha$ -sarcin in *P. pastoris* has been also reported<sup>67</sup> but the yield is not as good as that obtained in bacteria.

The approach for RNase U2 production is based on the plasmid pHLS1 (Invitrogen), which allows fusion of the gene to the signal peptide of the *P. pastoris* alkaline phosphatase. This construct, named pHSU2, produces extracellular RNase U2 that possesses three extra amino acids (Arg-Glu-Leu) at its NH<sub>2</sub>-terminal end.<sup>63</sup> For this purpose, the RNase U2 cDNA is amplified with the oligonucleotides described above but containing convenient extensions, to

<sup>62</sup> J. Lacadena, A. Martínez del Pozo, J. L. Barbero, J. M. Mancheño, M. Gasset, M. Oñaderra, C. López-Otín, S. Ortega, J. L. García, and J. G. Gavilanes, *Gene* **142**, 147 (1994).

<sup>63</sup> A. Martínez-Ruiz, L. García-Ortega, R. Kao, M. Oñaderra, J. M. Mancheño, J. Davies, A. Martínez del Pozo, and José G. Gavilanes, *FEMS Microbiol. Lett.* **189**, 165 (2000).

<sup>64</sup> P. Chomczynski and N. Sacchi, *Anal. Biochem.* **162**, 156 (1987).

<sup>65</sup> J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

<sup>66</sup> L. García-Ortega, J. Lacadena, V. Lacadena, M. Masip, C. De Antonio, A. Martínez-Ruiz, and A. Martínez del Pozo, *Lett. Applied Microbiol.* **30**, 298 (2000).

<sup>67</sup> A. Martínez-Ruiz, A. Martínez del Pozo, J. Lacadena, J. M. Mancheño, M. Oñaderra, C. López-Otín, and J. G. Gavilanes, *Protein Expr. Purif.* **12**, 315 (1998).



harbor *MfeI* and *BglII* restriction sites, and cloned into the corresponding compatible *EcoRI* and *BamHI* sites of pHILS1. *Pichia pastoris* GS115 cells are transformed by standard procedures.<sup>67–69</sup> Screening for gene replacement of the RNase U2 constructs yielding a ( $\text{His}^+$  Mut<sup>s</sup>) phenotype is performed by patching the  $\text{His}^+$  colonies on two different types of His-deficient media, one containing glucose (MD) and the other with methanol (MM) as the only carbon source<sup>63,67–69</sup>

The best RNase-producing  $\text{His}^+$  Mut<sup>s</sup> strains are further selected according to their ability to cleave RNA embedded in agar plates.<sup>63,70</sup> Agar minimal medium containing methanol (MM), 2 g/liter *Torula* RNA (Type VI Sigma), and 50 mg/ml toluidine blue is used to grow the colonies for this purpose. Those secreting RNase U2 produce a red halo, its diameter being proportional to the ribonucleolytic activity present.

The procedure employed to clone  $\alpha$ -sarcin is not so straightforward as that used for RNase U2 and has been described in detail before.<sup>62</sup> Essentially, the  $\alpha$ -sarcin sequence is fused to a modified version of the OmpA signal peptide. This construct, pINPG $\alpha$ S, produces  $\alpha$ -sarcin that is exported to the periplasm, thus avoiding the toxicity of the recombinant protein. Other systems to produce  $\alpha$ -sarcin in *E. coli* have been described,<sup>71–75</sup> some of them yielding higher amounts of protein.<sup>74,75</sup> However, a slightly modified protein was produced in some of these examples<sup>72,74</sup> and the recombinant protein obtained in all these cases was not characterized in such detail as that obtained through the method herein described.<sup>25,50,62</sup>

#### *Production and Purification*

*Fungal RNase U2.* A sample (100 ml) of 40 h PDB *U. sphaerogena* culture is used to inoculate 3 liters of SGM distributed in Erlenmeyer flasks (4:1 flask volume to medium volume ratio). This culture is incubated at 30° with strong shaking, and aliquots are taken every 12 h for measuring ribonucleolytic activity at pH 4.5 as an indicator of RNase U2 production. The fungus must grow with a “yeastlike” morphology since an aggregated mycelium corresponds with low RNase levels.

<sup>68</sup> M. D. Rose, F. Winston, and P. Hieter, “Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Manual.” Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1990.

<sup>69</sup> S. Huecas, M. Villalba, E. González, A. Martínez-Ruiz, and R. Rodríguez, *Eur. J. Biochem.* **261**, 539 (1999).

<sup>70</sup> R. Quaas, O. Landt, H.-P. Grunert, M. Beineke, and U. Hahn, *Nucl. Acids Res.* **17**, 3318 (1989).

<sup>71</sup> P. P. C. Henze, U. Hahn, V. A. Erdmann, and N. Ulbrich, *Eur. J. Biochem.* **192**, 127 (1990).

<sup>72</sup> T. Oka, Y. Aoyana, Y. Natori, T. Katano, and Y. Endo, *Biochim. Biophys. Acta* **1130**, 182 (1992).

<sup>73</sup> D. Rathore, S. K. Nayak, and J. K. Batra, *Gene* **190**, 31 (1997).

<sup>74</sup> I. D. Sylvester, L. M. Roberts, and J. M. Lord, *Biochim. Biophys. Acta* **1358**, 53 (1997).

<sup>75</sup> D. Parente, G. Raucci, B. Celano, A. Pacilli, I. Zaroni, S. Canevari, E. Adorate, M. I. Colnaghe, F. Dosio, S. Arpicco, L. Catell, A. Mele, and R. de Santis, *Eur. J. Biochem.* **239**, 272 (1998).

Once the production is maximum (about 100 h), the extracellular medium is collected by filtration through two layers of Whatman (Clifton, NJ) 3MM paper and dialyzed against 20 mM piperazine, pH 6.0, and mixed overnight, under continuous and gentle stirring, at 4° with 10 ml of DEAE-cellulose (DE32, Whatman) equilibrated in the same buffer. The resin is packed in a column, washed with 20 mM piperazine, pH 6.0, and eluted with a 0–0.5 M NaCl gradient in the same buffer. In the resulting fractions, ribonuclease activity is measured at pH 4.5 and 7.5, to distinguish among the different RNases produced by the fungus. Those containing the acidic activity are concentrated using Centriprep 3 (Amicon, Danvers, MA) devices, and loaded on a Sephadex G-75 column (1.8 × 82 cm) equilibrated in 50 mM ammonium acetate, pH 4.5. Fractions containing acidic RNase activity are collected and concentrated, yielding about 0.3 mg of homogenous RNase U2.

A fermentation procedure involving 10 liter of medium cultured for 4 days at 30° in a New Brunswick fermentor has been also described.<sup>13</sup> A large-scale fermentation (3,000 liter) of *U. sphaerogena* grown in 0.8% ammonium sulfate, 0.1% (w/v) urea, and 5.0% (w/v) corn meal produced more than 10 g of purified RNase U2.<sup>19</sup> Many of the studies with this enzyme were obtained from this batch of protein.

*Recombinant RNase U2.* Production of RNase U2 from *P. pastoris* is regulated by the *AOX1* promoter, which is fully induced when methanol is the sole carbon source, but biomass production is first achieved by growing the yeast on a different medium. A volume of 2 liter of buffered minimal glycerol medium (BMG; 10 g/liter glycerol, 13.4 g/liter yeast nitrogen base without amino acids, 400  $\mu$ g/l biotin, 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.0; this medium is advised so as to avoid anionic nonprotein contaminants that were difficult to eliminate during the later purification steps) is inoculated with 50 ml preinoculum in the same medium. After 2 days of incubation at 30°, the cells are harvested by centrifugation, resuspended in 400 ml of buffered minimal methanol medium (BMM; as BMG using 5 g/liter methanol instead of glycerol), and further incubated for 2 days in two baffled 1-liter flasks covered with two layers of Miracloth. Methanol is replenished up to 0.5% twice each day. Finally, the extracellular medium is collected by centrifugation. Recombinant RNase U2 is purified as described for the fungal protein but replacing the last gel filtration step by affinity chromatography<sup>22,63</sup> to remove a contamination responsible for an apparent Trp fluorescence. Thus, the pooled fractions from the DEAE cellulose column step are dialyzed against 50 mM sodium acetate, pH 4.5, 50 mM NaCl, and loaded on a 2',5'-ADP-Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Sweden) column. The elution is performed with a linear gradient of 50 mM sodium acetate, pH 4.5/50 mM Tris-HCl, pH 7.0, both containing 50 mM NaCl. RNase activity-containing fractions are concentrated and dialyzed against 50 mM ammonium acetate, pH 4.5. The recombinant RNase U2 obtained (1.5 mg/liter of crude extract) is homogeneous according to its SDS-PAGE

behavior, amino acid composition, kinetic parameters, and spectroscopic features, including the fluorescence spectrum.<sup>63</sup>

Finally, it is noteworthy that only unreduced RNase U2 behaves as a monomer, whereas reduction results in a single SDS-PAGE band with mobility corresponding to the protein dimer (unpublished results). This anomalous behavior is observed for both fungal and recombinant RNase U2.

*Fungal  $\alpha$ -Sarcin.* Production and purification of the protein are performed essentially as described,<sup>27</sup> with some modifications.<sup>62</sup> Using the original culture medium described<sup>28</sup> (see above) is crucial since small changes in its composition result in a dramatic drop in the final yield.

*Aspergillus giganteus* spores are seeded and precultured for 24 h at 30° in 250 ml of medium. A sample of this culture is employed for inoculation of a second identical culture that is further used to inoculate the final production medium (usually 5 liter distributed in 10 1-liter Erlenmeyer flasks). This is incubated at 30°, with rapid shaking, for about 80 h. The production of  $\alpha$ -sarcin is maximum at the time when the pH of the culture reaches pH 8.0–8.5. The culture medium is filtered through two layers of Whatman 3M paper, dialyzed against 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, and mixed overnight with 80 ml of Amberlite IRC50 equilibrated in the same buffer. The resin is packed on a column and washed with phosphate buffer containing 0.2 M NaCl, and the protein is eluted with the same buffer but containing 0.6 M NaCl.  $\alpha$ -Sarcin-containing fractions are pooled, dialyzed against water and lyophilized. The resulting sample is dissolved in 10 ml of 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, containing 0.1 M NaCl and loaded on a Bio-Gel P10 column (2 × 150 cm, Bio-Rad) equilibrated in the same buffer. The  $\alpha$ -sarcin-containing fractions are treated as above, and finally dissolved in 4 ml of 50 mM acetic acid. This sample is loaded on a Bio-Gel P2 column (1 × 20 cm) to completely remove any salts, and the protein-containing fractions are lyophilized. All the lyophilization steps can be substituted by concentrating in Centriprep-10 devices (Amicon). This procedure yields 5.0–20.0 mg of homogeneous  $\alpha$ -sarcin per liter of original culture.

*Recombinant  $\alpha$ -Sarcin.* Production of recombinant  $\alpha$ -sarcin<sup>62,66</sup> is achieved using *E. coli* BL21 (DE3) harboring two plasmids, pINPG $\alpha$ S for  $\alpha$ -sarcin and pT-Trx for thioredoxin,<sup>76</sup> in order to improve its solubility. One colony is used to inoculate 250 ml of LB medium containing ampicillin (100  $\mu$ g/ml) and chloramphenicol (34  $\mu$ g/ml), which is incubated overnight at 37°. This preinoculum is used to seed 10 1-liter Erlenmeyer flasks (25 ml of preinoculum per flask) each containing 0.5 liter of M9 minimal medium,<sup>65</sup> supplemented with both antibiotics and 0.2% (w/v) glucose. The culture is incubated at 37° until an OD<sub>600</sub> of 0.7 is reached and then induced with IPTG (1 mM final concentration) and cultured with shaking for 16–18 h at 37°.

<sup>76</sup> T. Yasukawa, C. Kanei-Ishii, T. Mackaura, J. Fujimoto, T. Yamamoto, and S. Ishii, *J. Biol. Chem.* **270**, 25328 (1995).

The extracellular medium is collected by centrifugation (5000g, 15 min, 25°). Its pH is adjusted to 7.0 with 0.1 M NaOH and maintained at 4°. The cellular pellet is *carefully* suspended in 150 ml of 33 mM Tris-HCl, pH 7.0, containing 33 mM EDTA, mixed with 150 ml of 40% (w/v) sucrose, and *gently* shaken for 15 min at room temperature to release the periplasmic fraction by osmotic shock. The solution is centrifuged (10,000g, 15 min, 25°) and the sucrose-containing supernatant is also maintained at 4°. The cellular pellet is *very carefully* suspended in 300 ml of ice-cold water and shaken for 15 min at 4°C. The supernatant obtained after centrifugation (12,000g, 30 min, 4°) is enriched in the periplasmic fraction. The pellet is once more suspended in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, and sonicated (seven pulses of 20 KHz for 1 min in an ice bath). The intracellular soluble fraction is obtained by centrifugation at 12,000g for 30 min at 4°. The three soluble cellular fractions (sucrose-enriched, periplasmic, and intracellular) are mixed and the pH adjusted to 7.0.

Amberlite IRC-50, equilibrated in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, is added to the extracellular medium and to the mixed soluble cellular fractions (15 and 60 ml of resin, respectively). The following steps are as described previously for separation of the fungal protein. This procedure yields 25–55 mg of homogeneous native  $\alpha$ -sarcin.<sup>66</sup>

#### Activity Assays

**Ribonucleolytic Activity.** As explained above, RNase U2 can be considered a nonspecific ribonuclease when compared with  $\alpha$ -sarcin. RNase U2 at catalytic concentration (nanomolar) extensively degrades RNA with a strong preference for purines, while  $\alpha$ -sarcin cleaves a single phosphodiester bond of the larger rRNA. However, at higher concentrations (micromolar),  $\alpha$ -sarcin completely digests RNA<sup>30,77</sup> and slowly cleaves G/ApA substrates<sup>33</sup> while RNase U2 can also cleave phosphodiester bonds flanking pyrimidine nucleotides.<sup>13,14,16</sup> Both enzymes display optimum pH around 5.0.<sup>6,34,35</sup> The assays for the characteristic activity of  $\alpha$ -sarcin have been described elsewhere in this volume<sup>1</sup> and several chapters are also dedicated to methods to analyze RNase activities.<sup>78,79</sup> Consequently, only three types of activity assays are described here. Both apply to RNase U2 and  $\alpha$ -sarcin, but much larger enzyme concentrations must be used when the ribotoxin is assayed.

The first assay, employed in RNase purification protocols, uses *Torula* RNA (Type VI Sigma) as substrate<sup>80</sup> (it can also be used for  $\alpha$ -sarcin<sup>77</sup> but it is not very

<sup>77</sup> A. Martínez del Pozo, M. Gasset, M. Oñaderra, and J. G. Gavilanes, *Int. J. Peptide Res.* **33**, 406 (1989).

<sup>78</sup> T. Yasuda, T. Takeshita, and K. Kishi, *Methods Enzymol.* **341**, [7] 2001 (this volume).

<sup>79</sup> K. Korn, T. Dreiner-Stöffele, and U. Hahn, *Methods Enzymol.* **341**, [10] 2001 (this volume).

<sup>80</sup> J. M. García-Segura, M. M. Orozco, J. M. Fominaya, and J. G. Gavilanes, *Eur. J. Biochem.* **158**, 367 (1986).

useful because the culture medium contains more active nonspecific ribonucleases). The RNA substrate has to be fractionated to remove contaminants and small oligonucleotides. For this purpose, 100g of *Torula* RNA is slowly dissolved in 500 ml of ice-cold distilled water maintaining the pH around 7.0. Sodium acetate and acetic acid are added to obtain pH 5.5 and 3 M final salt concentration and the solution is maintained overnight at  $-20^{\circ}$ . The brownish pellet, containing high molecular weight insoluble RNA, is recovered by centrifugation (13,000g, 30 min, at  $-20^{\circ}$ ) and then resuspended. This procedure is repeated twice. The resulting RNA pellet is dissolved in 500 ml of water, and 1 liter of ethanol (previously cooled to  $-20^{\circ}$ ) is added, maintaining the suspension overnight at  $-20^{\circ}$ . A white RNA pellet is recovered by centrifugation under the above conditions, which is dissolved in 25 mM EDTA and dialyzed against 20 volumes of first 25 mM EDTA, then 0.15 M NaCl, and finally water. This solution is freeze-dried and maintained at  $-20^{\circ}$ . About 3 g of purified RNA is obtained.

The assay is performed in tubes containing 50  $\mu$ l of 0.5 M KCl, 0.25 M sodium acetate, 0.25 M Tris-HCl, 25 mM EDTA, pH 4.5, 25  $\mu$ l of distilled water, 25  $\mu$ l of 0.1% (w/v) BSA, and 25  $\mu$ l of the protein sample. The mixture (125  $\mu$ l) is incubated for 15 min at  $37^{\circ}$  and the reaction is started by the addition of 125  $\mu$ l of the purified RNA (4 mg/ml) and vigorous shaking. In a standard assay this mixture is incubated for 15 min at  $37^{\circ}$ , and the reaction is stopped by addition of 250  $\mu$ l of ice-cold 10% (v/v) perchloric acid, containing 0.25% (w/v) uranyl acetate. The resulting suspension is maintained for 30 min in an ice bath and then centrifuged at 14,000g for 15 min at  $4^{\circ}$ . The supernatant is diluted 10-fold and absorbance at 260 nm is measured. This value is dependent (the  $A_{260}$  value is linear up to 0.6) on the concentration of soluble oligonucleotides produced by the ribonuclease activity. One activity unit is defined as the enzyme amount required to produce an absorbance increment of 0.4 in the conditions of a standard assay.

Ribonuclease activity against homopolynucleotides can be assayed by an electrophoretic procedure. This method, designated as *zymogram*, has been described in this volume.<sup>1</sup> In this particular case, the only differences are the homopolynucleotide used, poly(A), and the buffer employed, 0.1 M sodium acetate, pH 4.5.

The third type of assay involves measurement of the cleavage of dinucleotides. This is carried out by spectrophotometry for RNase U2,<sup>16</sup> and HPLC for  $\alpha$ -sarcin.<sup>33</sup> In the former case, 780  $\mu$ l of dinucleotide substrate (10–60  $\mu$ M) in 50 mM sodium acetate, pH 4.5, containing 50 mM NaCl, is placed in a 1-cm optical-path cell (or smaller if the absorbance value becomes higher than 1.0) in a thermostated spectrophotometer. The reaction is started by adding enzyme (in 20  $\mu$ l of the same buffer; approximately 200 nM final concentration) and the absorbance change at 262 nm is recorded for 5–10 min. The difference in molar extinction coefficients at 262 nm between the substrate and the products<sup>16</sup> is used to evaluate the initial rates, which allows calculation of  $K_m$  and  $K_{cat}$  by hyperbolic fitting to the Michaelis-Menten equation.

To assay  $\alpha$ -sarcin against dinucleotides,<sup>33–35</sup> the enzyme (about 2  $\mu$ M) and the substrate (5–100  $\mu$ M) are placed in microcentrifuge tubes (150  $\mu$ l final volume) and the mixture is incubated at room temperature for 14–15 h. The reaction is stopped by freezing the tubes in liquid nitrogen (keep the tubes frozen at  $-20^\circ$ ). Substrate and products are fractionated by HPLC,<sup>33,81</sup> injecting the thawed, centrifuged samples onto a reversed phase C<sub>18</sub> column (5  $\mu$ m, 0.46  $\times$  15 cm). Elution (1.0 ml/min flow rate) is performed with a 35 min linear gradient from 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, to 90 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, in 32.5% (v/v) methanol, at room temperature. The eluting products are detected by continuous reading of absorbance at 254 nm. The amount of product is calculated from the area under the corresponding peak using calibration plots constructed with convenient standards. Such amounts are used to estimate the initial rates.

#### *Interaction with Phospholipid Vesicles*

The interaction of  $\alpha$ -sarcin and its mutant forms with lipid membranes has been analyzed by measuring the effects on large unilamellar vesicles (LUVs). In particular we have monitored (i) vesicle aggregation; (ii) lipid mixing from different bilayers; (iii) leakage of vesicular aqueous contents; and (iv) changes in the thermotropic behavior of the lipid. This set of assays provides a general picture about the potential ability of a protein to interact with membranes.

*Preparation of Unilamellar Vesicles.* A phospholipid (1–5 mg) solution in 2 : 1 (v/v) chloroform:methanol is dried under flow of nitrogen for at least 60 min. The resulting lipid film is stored in the darkness at  $-20^\circ$  until use. A lipid dispersion is prepared by adding the required aqueous buffer over the lipid film (at 1–5 mg/ml concentration), briefly vortexing the sample, and incubating for 60 min above the melting temperature ( $T_c$ ) of the corresponding phospholipid. The heterogeneous (in size and lamellae per vesicle) suspension of multilamellar vesicles (MLVs) is then introduced into an Extruder (Lipex Biomembranes Inc., Vancouver, B.C., Canada), containing two opposed polycarbonate filters (Nuclepore Costar, Cambridge, MA) with a defined pore size, usually between 100 and 400 nm. Five to ten cycles of extrusion through the polycarbonate filters are sufficient to obtain a fairly homogeneous population of LUVs with the average diameter of the filter pores.<sup>82–84</sup> The phospholipid concentration is determined from its phosphorus content.<sup>85</sup> The absence of lysophospholipids is verified by chromatographic methods.<sup>86</sup>

<sup>81</sup> R. Shapiro, J. W. Fett, D. J. Strydom, and B. L. Vallee, *Biochemistry* **25**, 7255 (1986).

<sup>82</sup> L. D. Mayer, M. J. Hope, P. R. Cullis, and A. S. Janoff, *Biochim. Biophys. Acta* **817**, 193 (1985).

<sup>83</sup> L. D. Mayer, M. J. Hope, and P. R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta* **858**, 161 (1986).

<sup>84</sup> M. J. Hope, M. B. Bally, G. Webb, and P. R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta* **812**, 55 (1985).

<sup>85</sup> G. R. Bartlett, *J. Biol. Chem.* **234**, 466 (1959).

<sup>86</sup> J. G. Gavilanes, M. A. Lizarbe, A. M. Municio, and M. Oñaderra, *Biochemistry* **20**, 5689 (1981).

*Protein Binding to Vesicles.* Analysis of protein binding to vesicles is performed by ultracentrifugation on an Airfuge (Beckman, Palo Alto, CA) under conditions in which vesicle-bound protein is sedimented. Different protein/vesicle samples (in the 0–200 lipid/protein molar ratio range) are prepared by mixing a protein solution (0.2 mg/ml, final constant protein concentration) and the required amount of the LUVs suspension in a total volume of 250  $\mu$ l. Prior to addition of protein, the vesicle suspension is maintained at a temperature above the  $T_c$  of the phospholipid, and after mixing, incubation is continued for 60 min in a thermostatted water bath under gentle agitation. Control samples with no vesicles are also included.

Aliquots (175  $\mu$ l if polyallomer tubes and a Beckman A-110 rotor are used) from the above samples are centrifuged for 60 min at 4° at a pressure of 25 psi (164,000 relative centrifugal field). Under these conditions, lipid vesicles sediment, as previously verified by using traces of radioactive phospholipids incorporated in the vesicles. The absence of nonspecific protein adsorption to the centrifugation tubes is also verified with the control samples.

The concentration of free unbound protein is determined from Coomassie blue stained SDS–PAGE gels of the resulting supernatants. The volumogram (density or quantity of a spot calculated from its volume made of the sum of all pixel intensities composing the spot) of each protein band is obtained on a Photodocumentation System (UVItec, Cambridge, UK). A linear relationship between protein amount loaded on the gel and value of the corresponding volumogram is previously verified with control samples.

*Aggregation of Phospholipid Vesicles.* Aggregation of phospholipid vesicles is analyzed by measuring the increase of light scattering of a vesicle sample on addition of the protein.<sup>42–45</sup> The aggregation of individual vesicles induced by  $\alpha$ -sarcin occurs in a millisecond to second time scale, as revealed by stopped-flow light-scattering measurement,<sup>44</sup> but further aggregation of large protein–lipid complexes occurs in a minute time scale. Monitoring this last process by measuring the increase in apparent absorbance at 360 nm reveals the ability of the protein to aggregate model membranes.

LUVs (1 mg/ml lipid concentration) are prepared as described above. An aliquot of the protein solution (20  $\mu$ l) is added to a vesicle suspension at a temperature above the  $T_c$  of the corresponding lipid in 1-cm optical path cuvettes (1 ml final volume; 0.02 mg/ml final lipid concentration). The time-dependent change in  $A_{360}$  is recorded until a constant value is attained. Control analyses in the absence of protein (no absorbance variation was observed) are also carried out. This kinetic study must be performed under continuous stirring of the reaction mixture to avoid sedimentation of large protein–lipid aggregates in the cuvette, which would result in an aberrant decrease of the recorded  $A_{360}$  value.

*Lipid Mixing of Vesicles.* Perturbation of bilayers leading to the merging of lipids from different vesicles<sup>42–46,87</sup> can be readily revealed by a fluorescence assay.<sup>88</sup> This is based on the measurement of fluorescence resonance energy transfer (RET) between a donor and acceptor pair, in this case, two derivatives

of phosphatidylethanolamine (PE), labeled in their polar region with *N*-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (NBD-PE), and *N*-(Lissamine) rhodamine B sulfonyl (Rh-PE), respectively.<sup>42–46,87,89–91</sup> These probes are nonexchangeable between vesicles even when they are aggregated.<sup>91</sup> In a typical assay, both probes are incorporated in the same bilayer at proportions displaying high RET efficiency, i.e., low fluorescence emission of NBD-PE (donor). Fusion of the labeled bilayer with unlabeled membranes results in a decrease of the RET efficiency due to dilution of the probes into the newly formed membrane, and hence in an increase of the donor fluorescence.

Vesicles containing both NBD-PE and Rh-PE are prepared essentially as described above and maintained in the darkness. Both probes are incorporated into the organic solution containing the phospholipids (usually 1% NBD-PE and 0.6% Rh-PE mol%, although a linear response between donor fluorescence and probe dilution must be checked in order to accurately measure lipid mixing<sup>92</sup>). In addition, vesicles containing only the donor probe are prepared for calibration of the 100% donor fluorescence.

Fluorescence-labeled and unlabeled vesicles are mixed (1 : 9 ratio; 0.1 mg/ml total lipid concentration), and the fluorescence emission at 530 nm for excitation at 450 nm is recorded by using polarizers to eliminate the potential contribution of the sample turbidity to the fluorescence signal. The protein sample to be tested (100  $\mu$ l) is added to the thermostated and magnetically stirred vesicle sample (2 ml total volume). The RET efficiency (%*E*) is calculated once the fluorescence intensity becomes constant. (%*E*) is defined as  $100 \times (1 - F/F_0)$ , where *F* and *F*<sub>0</sub> are the fluorescence intensities at 530 nm in presence and absence of Rh-PE (acceptor), respectively. The (%*E*) value of the initial vesicle mixture must be 75–80%.

*Leakage of Intravesicular Aqueous Contents.* The breakdown of the permeability barrier of lipid bilayers can be analyzed using an assay employing the fluorescence probe 8-aminonaphthalene-1,3,5-trisulfonic acid (ANTS) and its collisional quencher *p*-xylene bis(pyridinium) bromide (DPX).<sup>87,93–95</sup> When both are encapsulated into lipid vesicles, the release of the intravesicular contents to the

<sup>87</sup> J. M. Mancheño, M. Oñaderra, A. Martínez del Pozo, P. Díaz-Achirica, D. Andreu, L. Rivas, and J. G. Gavilanes, *Biochemistry* **35**, 9892 (1996).

<sup>88</sup> D. K. Struck, D. Hoekstra, and R. E. Pagano, *Biochemistry* **20**, 4093 (1981).

<sup>89</sup> A. Walter and D. P. Siegel, *Biochemistry* **32**, 3271 (1993).

<sup>90</sup> J. Wilschut, S. Nir, J. Scholma, and D. Hoekstra, *Biochemistry* **24**, 4630 (1985).

<sup>91</sup> J. Wilschut, in "Membrane Fusion" (J. Wilschut and D. Hoekstra, eds.), pp. 89–125. Marcel Dekker, New York, 1991.

<sup>92</sup> A. J. M. Driessen, D. Hoekstra, G. Scherphof, R. D. Kalicharan, and J. Wilschut, *J. Biol. Chem.* **260**, 10880 (1985).

<sup>93</sup> H. Ellens, J. Bentz, and F. C. Szoka, *Biochemistry* **24**, 3099 (1985).

<sup>94</sup> H. Ellens, J. Bentz, and F. C. Szoka, *Biochemistry* **25**, 4141 (1986).

<sup>95</sup> V. De los Ríos, J. M. Mancheño, M. E. Lanio, M. Oñaderra, and J. G. Gavilanes, *Eur. J. Biochem.* **252**, 284 (1998).



external medium results in a dilution of both probe and quencher and a concomitant increase of the ANTS fluorescence. This assay allows the study of both the extent and mechanism (*all or none*, or graded) of leakage.<sup>96,97</sup>

Vesicles encapsulating ANTS/DPX are prepared as described above by hydrating the lipid films in aqueous buffer containing both fluorophore and quencher (15 mM Tris, pH 7.5, 20 mM NaCl, 12.5 mM ANTS, and 45 mM DPX). To increase the encapsulation efficiency, MLVs are subjected to 5 to 10 cycles of freezing and thawing with liquid nitrogen prior to 5 cycles of extrusion (100 nm average filter pore diameter). Unencapsulated material is separated from the vesicles by gel filtration on a Sephadex G-75 column equilibrated in 15 mM Tris, pH 7.0, containing 0.1 M NaCl and 1 mM EDTA, the buffer for the leakage assays, which is isosmotic with the hydration buffer.

The fluorescence intensity, measured through a 3-68 Corning cutoff filter (>530 nm) on excitation at 386 nm of the vesicle sample in the absence of protein is considered as 0% leakage (background signal). The fluorescence measured after addition of 50  $\mu$ l of 10% Triton X-100 (total vesicle lysis) corresponds to 100% leakage. Polarizers are used to eliminate potential contribution of sample turbidity to the fluorescence. The extent of leakage (%L) is defined as (%L) = 100  $(F_P - F_0)/(F_T - F_0)$ , where  $F_P$  and  $F_0$  are the fluorescence intensity values after and prior to the addition of protein, respectively, and  $F_T$  is the value after detergent addition. The stability of the vesicles must be verified prior to any leakage assay since unstable vesicles may generate a continuous increase in the fluorescence intensity.

*Thermotropic Behavior of Lipids.* Protein-induced structural and dynamic membrane changes can be studied by fluorescence techniques after selective probe-labeling of the bilayers. The assumption is made that the order and dynamics of the fluorophore moiety reflect the behavior of the surrounding lipid molecules.<sup>98,99</sup> The most popular fluorophores are 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH; probes the center of the bilayer<sup>100</sup>) and its derivative 1-(4-trimethylammonium-phenyl)-6-phenylhexatriene (TMA-DPH; probes the polar headgroup region<sup>101,102</sup>).

DPH-labeled vesicles are used to characterize the effect of  $\alpha$ -sarcin on the thermotropic gel-to-liquid crystal phase transition of phospholipid vesicles.<sup>42-46</sup> Vesicles containing these probes are prepared essentially as described above and

<sup>96</sup> W. C. Wimley, M. E. Selsted, and S. H. White, *Protein Sci.* **3**, 1362 (1994).

<sup>97</sup> A. S. Ladokhin, W. C. Wimley, and S. H. White, *Biophys. J.* **69**, 1964 (1995).

<sup>98</sup> L. W. Engel and F. G. Prendergast, *Biochemistry* **20**, 7338 (1981).

<sup>99</sup> P. K. Wolber and B. S. Hudson, *Biochemistry* **20**, 2800 (1981).

<sup>100</sup> L. Davenport, R. E. Dale, R. H. Bisby, and R. B. Cundall, *Biochemistry* **24**, 4097 (1985).

<sup>101</sup> B. R. Lentz, *Chem. Phys. Lipids* **50**, 171 (1989).

<sup>102</sup> F. G. Prendergast, R. P. Haugland, and P. J. Callahan, *Biochemistry* **20**, 7333 (1981).

<sup>103</sup> M. Irie, in "Ribonucleases: Structures and Functions" (G. D'Alessio and J. F. Riordan, eds.), pp. 101-130. Academic Press, New York, 1997.

maintained in the dark until use. DPH is dissolved in tetrahydrofuran and added to the initial lipid solution (1000 : 1 lipid/probe weigh ratio).

The thermotropic behavior of the phospholipid is shown by the thermal variation around the  $T_c$  of the fluorescence polarization degree of the probe at 425 nm for excitation at 365 nm. This is analyzed by 1° stepwise increase (10 min equilibration at each temperature) from temperatures below  $T_c$ . Any change in order and mobility of the phospholipids produced by the protein results in a modification of the thermotropic plot.

### Acknowledgments

This work was supported by grant from the MEC (Spain) and NSERC (Canada; R.K., J.D.). A.M.-R. and L.G.-O. are recipients of fellowships from the M.E.C. (Spain).



## Optimización de la producción heteróloga de la ribonucleasa U2 en *Pichia pastoris*

### Introducción

Si se trataba de utilizar la RNasa U2 para construir quimeras y mutantes relacionados con las ribotoxinas, no sólo era necesario el disponer de un sistema de expresión heteróloga que produjera la proteína con las mismas propiedades que la natural y de un método de purificación adecuado, sino que era necesario un buen rendimiento del proceso. Se ha de tener en cuenta que determinados estudios necesitan una elevada cantidad de masa, como, por ejemplo, estudios estructurales a nivel de resonancia magnética nuclear.

En los inicios de esta investigación se disponía de un sistema de expresión extracelular en la levadura *Pichia pastoris*, gracias al vector pHLS1, que emplea la secuencia señal de la fosfatasa alcalina para exportar la proteína, y de un esquema de purificación utilizando una cromatografía de afinidad (2',5'-ADP-Sepharose) que permitía separar la forma bien plegada (según su caracterización estructural) de la que presentaba ligeras diferencias, como una menor actividad específica y una emisión de fluorescencia del residuo de triptófano que en la proteína natural está completamente apagado. La proteína recombinante poseía tres aminoácidos adicionales en el extremo amino-terminal debido al péptido de fusión diseñado. Sin embargo, el rendimiento de este sistema no superaba los 1,4 mg/L cultivo. Por esta razón, se trató de mejorarlo utilizando un nuevo vector de expresión, pPICZ $\alpha$ A, de Invitrogen.

### Materiales y Métodos

#### **Construcción del sistema de expresión**

Se siguió el esquema de la Figura 1, partiendo del vector comercial pPICZ $\alpha$ A y el obtenido previamente pHLSU2. La integridad de la secuencia nucleotídica en el nuevo sistema se comprobó mediante secuenciación automática de DNA (servicio de genómica de la UCM). La construcción final, pPICZ $\alpha$ U2, contiene la secuencia señal del factor  $\alpha$  en el extremo amino-terminal del cDNA de la RNasa U2 para su transporte al medio extracelular, y entre ambos una secuencia susceptible de proteólisis específica. La degradación proteolítica completa en esta zona dejaría en el extremo amino-terminal de la secuencia original de la RNasa U2 los residuos adicionales Glu-Leu. Esta metodología se aplicó en *E. coli*, siguiendo los procedimientos habituales.

### Selección de transformantes

La cepa de *P. pastoris* utilizada para la expresión fue KM71, una vez electroporada con el vector pPICz $\alpha$ U2 linealizado. Con este sistema, los recombinantes positivos son resistentes al antibiótico zeocina y siempre Mut<sup>S</sup> (crecimiento lento en presencia de metanol como fuente de carbono), ya que la cepa tiene interrumpido el gen de la enzima alcohol oxidasa, que participa en el metabolismo del metanol. Se pueden seleccionar transformantes múltiples aumentando la concentración de zeocina en el medio (hasta 1500  $\mu$ g/mL), aunque esto no signifique siempre una mayor expresión del gen introducido (Invitrogen). Para realizar una selección rápida de los transformantes que expresaban la RNasa U2 de forma efectiva, y la secretaban al medio extracelular, se llevó a cabo un estudio de la actividad ribonucleasa *in situ* creciendo las distintas colonias en placas con RNA, siendo positivas aquellas en las que se observaba un cambio en la tinción del halo donde se producía degradación del sustrato de forma extracelular (descrito anteriormente).

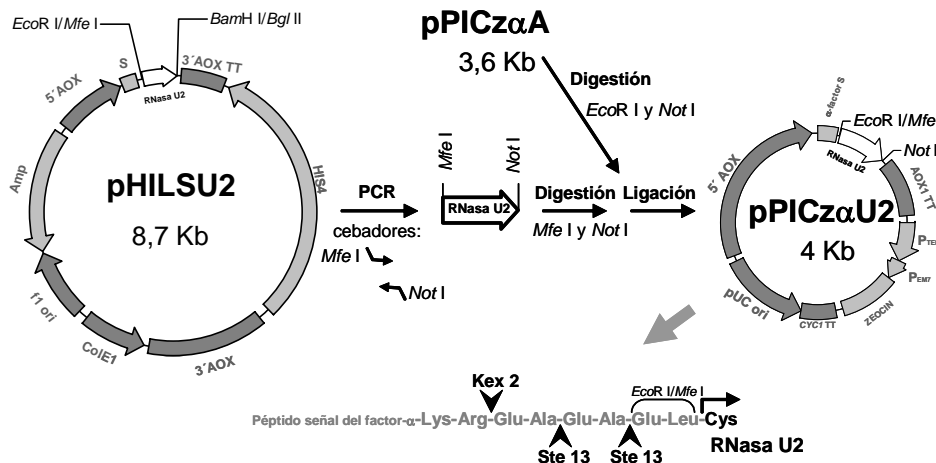


Figura 1: Esquema de la obtención del vector pPICz $\alpha$ U2 para la expresión de la RNasa U2. Abajo se detalla la secuencia adicional del extremo amino-terminal en esta construcción y los posibles cortes por proteasas.

### Expresión, purificación y ensayos de actividad ribonucleolítica

La expresión se realizó en medios semimínimos BMGH (crecimiento) y BMMH (inducción) (Invitrogen). Tras crecer la cepa hasta saturación (dos días con fuerte agitación y aireación en medio con glicerol como fuente de carbono) se pasó al medio inductor (1/5 del volumen inicial, con metanol como única fuente de carbono), en el que la producción de proteína en el medio extracelular fue máxima tras tres días de inducción. La purificación posterior siguió el mismo protocolo empleado para la RNasa U2 recombinante obtenida con el sistema pHILSU2 y la proteína fúngica, incluyendo la cromatografía de afinidad. El seguimiento del nivel de expresión y de los sucesivos pasos de purificación, se llevó a cabo mediante medidas espectroscópicas, movilidad electroforética y ensayos de actividad ribonucleolítica (tanto zimogramas como ensayos frente a RNA de levadura, descritos previamente).

### **Caracterización estructural**

La pureza de la RNasa U2 recombinante obtenida se analizó mediante SDS-PAGE al 15% y análisis de aminoácidos, siguiendo los procedimientos estándar. La secuenciación del extremo amino-terminal fue llevada a cabo en el Servicio de Química de Proteínas del CIB. Los estudios de espectrometría de masas, con distintas formas de la proteína, se realizaron en los Servicios de Proteómica de la UCM y del CNB. La caracterización espectroscópica se realizó de la forma habitual, como se describe a lo largo de esta Memoria. El tampón utilizado fue acetato amónico 50 mM, pH 4,5.

## **Resultados**

### **Obtención de la cepa KM71 productora de RNasa U2**

Tras la obtención de colonias de *P. pastoris* KM71 con el vector pPICz $\alpha$ U2 insertado en el genoma, se realizó un muestreo (*screening*) para seleccionar aquellas productoras de la proteína utilizando placas de RNA, siendo positivas el 88% de las analizadas. Se llevó a cabo una expresión a pequeña escala de 8 de ellas y el resultado, analizado por SDS-PAGE y zimogramas, demostró que no había un aumento significativo en la producción de RNasa U2 en aquellas colonias seleccionadas con elevada concentración de zeocina en el medio (supuestamente multitransformantes). Se eligió una de ellas para realizar la producción a gran escala.

### **Expresión y purificación de la RNasa U2 recombinante**

Se llevó a cabo el protocolo descrito anteriormente partiendo de dos litros de medio de cultivo BMGH. Tras la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa, se continuó la purificación con dos eluidos procedentes de ésta, estando el primero de ellos más contaminado según el comportamiento en geles de poliacrilamida. Tras la cromatografía de afinidad las bandas adicionales de este eluido desaparecieron, al no retenerse en el soporte cromatográfico. Por lo tanto, los pasos siguientes fueron idénticos en ambos casos. El rendimiento final fue de 3,5 mg/L cultivo, comportándose ambas fracciones de forma idéntica en SDS-PAGE y zimogramas frente a poli(A) (Figura 2A), deduciéndose que se trataba de una preparación homogénea. En condiciones reductoras, se observaba una única banda de movilidad electroforética mucho menor a la que correspondía con su masa molecular y sin actividad ribonucleolítica, algo que ya se había descrito previamente (Martínez Ruiz, 2000). En ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol, donde el comportamiento sí era el esperado, aparecía una banda minoritaria adicional con una movilidad algo menor, también activa frente a poli(A) (Figura 2A).

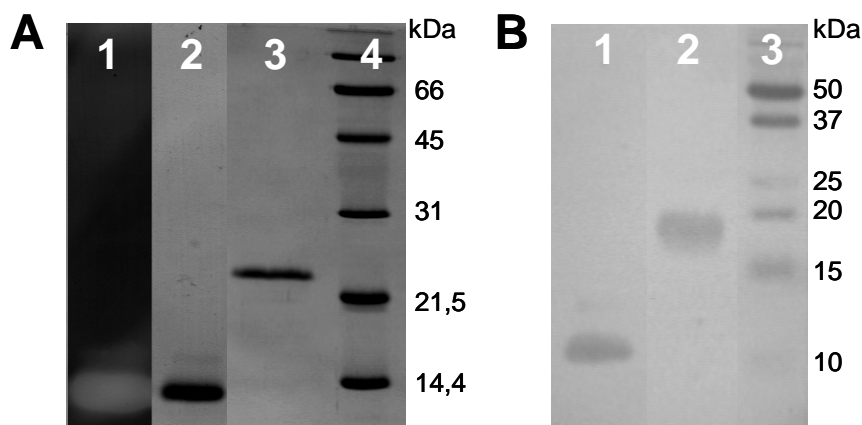
### **Caracterización de la RNasa U2 recombinante**

Con el análisis del extremo amino-terminal se concluyó que éste poseía seis aminoácidos adicionales, debido al ineficaz procesamiento por parte de las proteasas de *P. pastoris*: N<sub>T</sub>-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Leu-Cys (Figura 1). La espectrometría de masas de la proteína nativa dio como resultado la presencia de dos formas, de masa molecular 13024

Da y 12894 Da (siendo la teórica, teniendo en cuenta los seis residuos extra, de 12984 Da), cuya diferencia sería atribuible a la presencia o ausencia del primer residuo de Glu. El análisis de aminoácidos fue coherente con estos resultados y permitió el cálculo del coeficiente de absorción. El valor de éste ( $E^{0,1\%}$  a 280 nm) fue de  $1,70 \text{ mg}^{-1} \times \text{mL} \times \text{cm}^{-1}$ .

En cuanto a la caracterización espectroscópica, los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano y próximo fueron idénticos a los descritos para la proteína silvestre, así como la emisión de fluorescencia, donde destaca el total apagamiento del único residuo de triptófano (Trp-60).

La proteína purificada y caracterizada se utilizó para obtener anticuerpos policlonales de conejo anti-RNasa U2 (gracias al Dr. Fernando Vivanco, en el Servicio de Inmunología, Fundación Jiménez Díaz), los cuales reconocieron por igual tanto la proteína recombinante como la silvestre, en condiciones nativas (mediante ELISA) y reducidas (*western-blot*). En el caso de los *immunoblottings*, sólo fue posible realizar estos ensayos con la proteína reducida ya que la nativa no se transfería adecuadamente a la membrana utilizada. Debido a esto, para obtener una señal de acuerdo con la movilidad electroforética de la proteína sin reducir, el gel se sometía a un tratamiento con un agente reductor (tres horas a 37°C en  $\beta$ -mercaptoetanol 50 mM), una vez desarrollada la electroforesis y antes de llevar a cabo la transferencia (Figura 2).

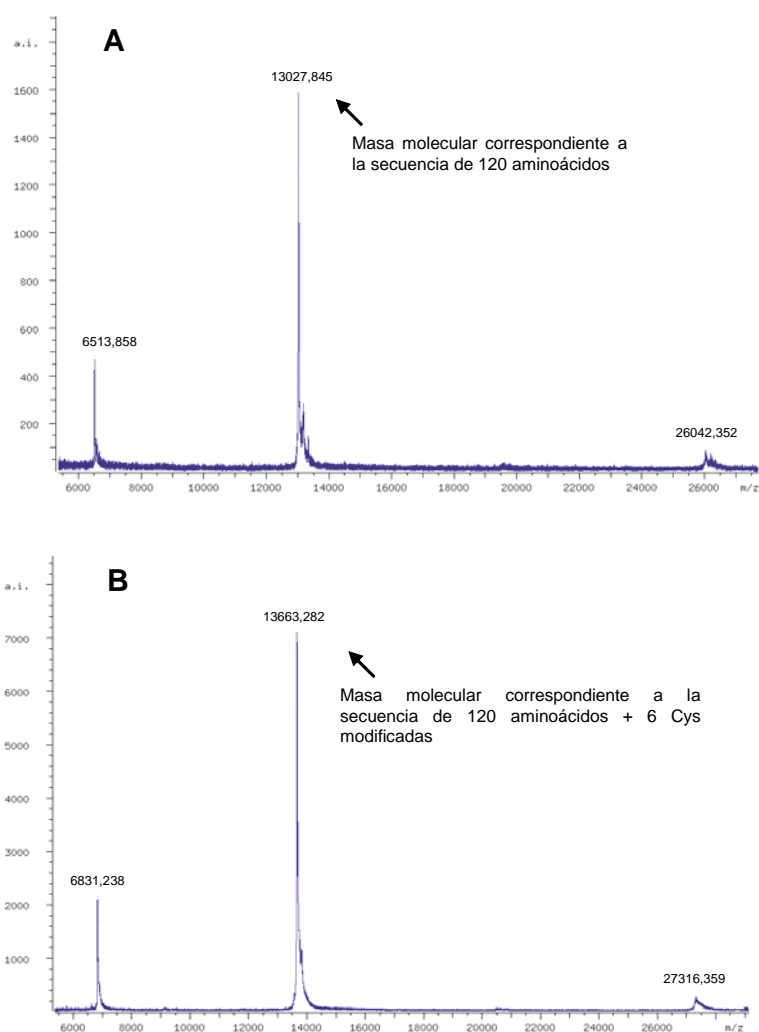


**Figura 2: Caracterización de la RNasa U2 recombinante purificada.**

**A.-** (1) Zimograma en presencia de poli(A) a pH 4,5 con la muestra sin reducir, y (2) tinción con azul de Coomassie de una muestra equivalente tras una SDS-PAGE. (3) Igual que (2), pero con la muestra reducida. (4) Patrones de masa molecular.

**B.-** Inmunotinción con anticuerpos policlonales de conejo anti-RNasa U2. (1) muestra aplicada en presencia de agente reductor, (2) muestra aplicada sin  $\beta$ -mercaptoetanol. Una vez desarrollada la electroforesis y previo a la transferencia, el gel se incubó durante 3 horas a 37°C en  $\beta$ -MetOH 50 mM (ver resultados). (3) patrones de masa molecular preteñidos.

Por último, tanto la proteína nativa como la reducida, con el comportamiento anómalo en SDS-PAGE (Figura 2), se analizaron por espectrometría de masas (Servicio de Proteómica del CNB). Para ello, se obtuvo la forma estable de la proteína reducida mediante un tratamiento con DTT 10 mM a 100°C y pH 8,5 y posterior alquilación de las Cys libres con 4-vinilpiridina. Una vez purificada mediante puntas de micropipetas Zip Tip (Millipore), se analizó, junto con una muestra de RNasa U2 sin reducir, en un espectrómetro de masas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight*). En ambos casos se observó una especie mayoritaria con una masa correspondiente al monómero de 120 residuos (lo que incluye el extremo amino-terminal adicional), más la modificación de los residuos de Cys en el caso de la muestra reducida (Figura 3).



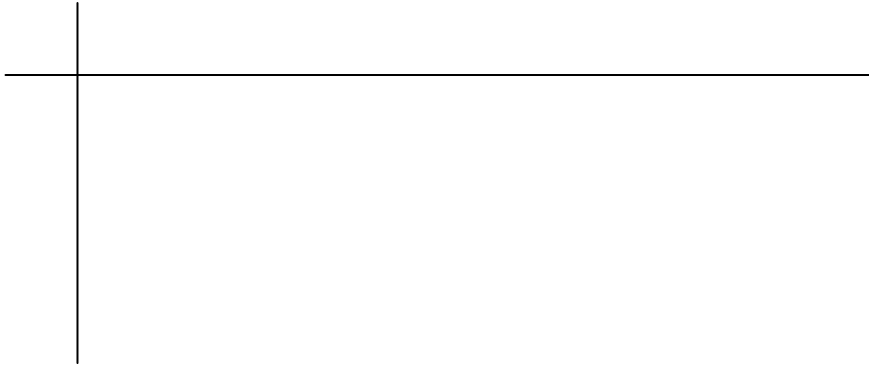
**Figura 3: Espectros de masas (MALDI-TOF) de la RNasa U2 recombinante en condiciones nativas (A) y tras reducirla y alquilarla con 4-vinilpiridina (B).** Las especies mayoritarias señaladas se corresponden con las masas moleculares teóricas para los respectivos monómeros en cada caso: 12959 Da (A) y 13589 Da (B).



## Discusión

El empleo de este nuevo sistema de expresión heteróloga en la levadura *P. pastoris* de la RNasa U2 (pPICz $\alpha$ U2), ha permitido aumentar el rendimiento de la producción en más de dos veces, obteniéndose una enzima pura (más del 99%) con las mismas propiedades, tanto estructurales como funcionales, que la proteína silvestre, a pesar de los seis residuos adicionales que presenta en el extremo amino-terminal. En este sentido, la presencia de dos formas, que difieren en el residuo de Glu amino-terminal, no afecta a la homogeneidad de la muestra ni a las características que definen a la RNasa U2. Este dato explica la presencia de dos bandas en SDS-PAGE en condiciones no reductoras, de movilidad muy parecida y con actividad ribonucleolítica.

Esta optimización podrá ser aplicada para la obtención de variantes y quimeras de esta proteína, además de abrir la posibilidad de estudios complementarios al disponer de masa suficiente. En este sentido, por ejemplo, en este trabajo se ha podido descartar la hipótesis que se barajaba acerca de la formación de puentes disulfuro intermoleculares que daban lugar a dímeros de RNasa U2 en condiciones reductoras, planteada a partir de los resultados previos de migración en geles de poliacrilamida (Figura 2A). Al ser monoméricas ambas formas (tanto la reducida como la nativa) (Figura 3), la movilidad anómala que presenta la forma reducida en SDS-PAGE no se debe a una dimerización inducida por el agente reductor, sino más bien a un artefacto de la propia técnica electroforética. La obtención de anticuerpos policlonales anti-RNasa U2, así como la puesta a punto de un sistema de detección de ambas formas de la proteína con distinta movilidad electroforética (Figura 2B), supone otra gran ventaja a la hora de plantearse la expresión y seguimiento de distintas formas mutantes y, en especial, variantes inactivas o de distinto tamaño.



## **Resultados 2**



Una de las principales incógnitas entorno a las ribotoxinas eran las bases moleculares de la extraordinaria especificidad de su actividad ribonucleasa frente a los ribosomas. También quedaba pendiente de resolver hasta qué punto, la capacidad de atravesar membranas lipídicas, de una forma parcialmente selectiva, se debía a las propiedades estructurales y dinámicas de esta familia de proteínas. Con estos objetivos en mente, se planteó el estudio de una zona de la estructura de estas proteínas muy particular, la horquilla amino-terminal. La idea de que estuviese implicada en alguna de estas funciones de las ribotoxinas partía de evidencias tales como su presencia exclusiva en esta familia al compararla con otras ribonucleasas microbianas no tóxicas, y su gran variabilidad y dinámica conformacional. Además, la variabilidad de su secuencia dentro de las ribotoxinas, anómala debido al alto grado de homología que presentan todos sus miembros, intuía cierta responsabilidad de esa región en las ligeras diferencias funcionales que aparecían entre distintas ribotoxinas.

Con todo ello, se llevaron a cabo dos aproximaciones experimentales para el estudio de esta horquilla amino-terminal. En un primer lugar se quiso realizar un estudio dentro de la familia de las ribotoxinas y para ello se construyeron los mutantes individuales K11L y T20D, y el correspondiente doble K11L/T20D de la  $\alpha$ -sarcina, en los que dos aminoácidos de la zona más expuesta de la horquilla se sustituyeron por sus homólogos en la restrictocina (García-Ortega et al, 2001). En la segunda parte del estudio, la comparación se estableció entre la  $\alpha$ -sarcina, como modelo de las ribotoxinas, y la RNasa U2, como el modelo más cercano de las ribonucleasas no tóxicas de la familia T1. En este caso, la segunda lámina  $\beta$  de la horquilla de la  $\alpha$ -sarcina, la secuencia 7-22, se sustituyó por dos Gly que conforman esa zona en la RNasa U2 (García-Ortega et al, 2002). En ambos trabajos, tras las caracterizaciones estructurales pertinentes, se estudiaron detalladamente las propiedades funcionales, tanto a nivel de su actividad ribonucleolítica como de su interacción con membranas, comparándose con las proteínas silvestres empleadas como modelo.



---

## Involvement of the amino-terminal $\beta$ -hairpin of the *Aspergillus* ribotoxins on the interaction with membranes and nonspecific ribonuclease activity

---

LUCÍA GARCÍA-ORTEGA,<sup>1</sup> JAVIER LACADENA,<sup>1,3</sup> JOSÉ M. MANCHEÑO,<sup>1</sup>  
MERCEDES OÑADERRA,<sup>1</sup> RICHARD KAO,<sup>2,4</sup> JULIAN DAVIES,<sup>2</sup> NIEVES OLMO,<sup>1</sup>  
ÁLVARO MARTÍNEZ DEL POZO,<sup>1</sup> AND JOSÉ G. GAVILANES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Química, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

<sup>2</sup>Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, V6T 1Z3 Canada

(RECEIVED March 9, 2001; FINAL REVISION May 22, 2001; ACCEPTED May 22, 2001)

### Abstract

Ribotoxins are a family of potent cytotoxic proteins from *Aspergillus* whose members display a high sequence identity (85% for about 150 amino acid residues). The three-dimensional structures of two of these proteins,  $\alpha$ -sarcin and restrictocin, are known. They interact with phospholipid bilayers, according to their ability to enter cells, and cleave a specific phosphodiester bond in the large subunit of ribosome thus inhibiting protein biosynthesis. Two nonconservative sequence changes between these proteins are located at the amino-terminal  $\beta$ -hairpin of  $\alpha$ -sarcin, a characteristic structure that is absent in other nontoxic structurally related microbial RNases. These two residues of  $\alpha$ -sarcin, Lys 11 and Thr 20, have been substituted with the equivalent amino acids in restrictocin. The single mutants (K11L and T20D) and the corresponding K11L/T20D double mutant have been produced in *Escherichia coli* and purified to homogeneity. The spectroscopic characterization of the purified proteins reveals that the overall native structure is preserved. The ribonuclease and lipid-perturbing activities of the three mutants and restrictocin have been evaluated and compared with those of  $\alpha$ -sarcin. These proteins exhibit the same ability to specifically inactivate ribosomes, although they show different activity against nonspecific substrate analogs such as poly(A). The mutant variant K11L and restrictocin display a lower phospholipid-interacting ability correlated with a decreased cytotoxicity. The results obtained are interpreted in terms of the involvement of the amino-terminal  $\beta$ -hairpin in the interaction with both membranes and polyadenylic acid.

**Keywords:** Cytotoxic protein; protein–bilayer interaction; restrictocin; ribosome-inactivating protein;  $\alpha$ -sarcin; site-directed mutagenesis

Ribotoxins are a group of secreted fungal ribonucleases (RNases) that inactivate ribosomes and inhibit protein bio-

synthesis by cleaving a single phosphodiester bond of the larger rRNA, releasing a characteristic RNA fragment (known as the  $\alpha$ -fragment; Schindler and Davies 1977; Endo and Wool 1982). The target bond, located at a highly conserved rRNA sequence present in all known prokaryota and eukaryota, is known as the sarcin/ricin loop (SRL; Wool et al. 1992; Szewczak and Moore 1995; Correll et al. 1998, 1999) recognized by ribosome-inactivating proteins such as ricin (Endo et al. 1990). Ribotoxins are among the most potent inhibitors of translation because the hydrolysis of the phosphodiester bond abolishes both the elongation factor

---

Reprint requests to: Álvaro Martínez del Pozo, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Química, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain; e-mail: alvaro@bbm1.ucm.es; fax: 34-913944159.

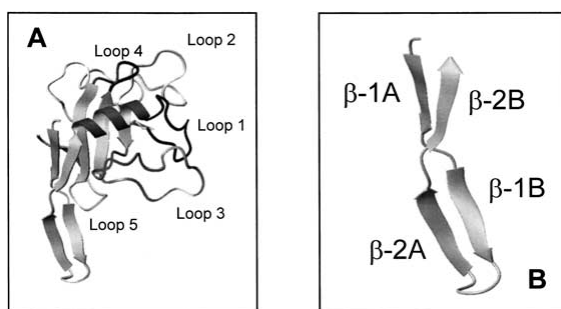
Present addresses: <sup>3</sup>Facultad de Biología, Universidad SEK, 40003 Segovia, Spain; <sup>4</sup>Hong Kong University Pasteur Research Center, Pokfulam, Hong Kong.

Article and publication are at <http://www.proteinscience.org/cgi/doi/10.1101/ps.9601>.

1-dependent binding of aminoacyl-tRNA and the GTP-dependent binding of elongation factor 2 to ribosomes. Ribotoxins inactivate ribosomes from all living species tested so far when assayed in a cell-free lysate system (Miller and Bodley 1988); however, they display selectivity when assayed against intact cells (Olson et al. 1965; Turnay et al. 1993). This selectivity is likely related to a differential recognition of membrane phospholipids, as observed for  $\alpha$ -sarcin in lipid model systems, because no protein membrane receptors have been found for these toxins. In fact,  $\alpha$ -sarcin interacts with membranes containing acid phospholipids promoting aggregation of vesicles, lipid-mixing between aggregated bilayers, and leakage of the intravesicular aqueous contents (Gasset et al. 1989, 1990, 1994; Mancheño et al. 1995b, 1998; Oñaderra et al. 1998). It gains access to cleave tRNA encapsulated in liposomes (Oñaderra et al. 1993). One of the initial steps in  $\alpha$ -sarcin-vesicle interactions is the formation of a vesicle dimer maintained by protein molecules, as demonstrated by stopped-flow techniques (Mancheño et al. 1994a), suggesting the involvement of different regions of the protein molecule in bridging together the vesicles.

Ribotoxins show a high degree of sequence similarity (Wirth et al. 1997; Martínez-Ruiz et al. 1999a,b).  $\alpha$ -Sarcin, and restrictocin (150 and 149 amino acid residues, respectively) are most extensively characterized and display 85% sequence identity. Their three-dimensional structures have been solved (Campos-Olivas et al. 1996; Yang and Moffat, 1996; Pérez-Cañadillas et al. 2000), revealing that their global shape and overall main-chain fold are closely matched. Both proteins display a core composed of a small  $\alpha$ -helix packed against a five-stranded antiparallel  $\beta$ -sheet and connected by large loops (Fig. 1A). These loops have been proposed to be involved in the cytotoxic activity—related to the ability for entering cells—because they are absent from other nontoxic microbial extracellular RNases (RNases U2 and T1) with a highly similar polypeptide fold (Martínez del Pozo et al. 1988; Kao and Davies 1995, Mancheño et al. 1995a). In fact, loop-2 of  $\alpha$ -sarcin has been proposed to be one of the protein regions involved in the

interaction with lipid vesicles (de Antonio et al. 2000). In this respect, preliminary studies with restrictocin have revealed a lower ability of this protein to perturb lipid membranes (L. García-Ortega, J.M. Mancheño, M. Oñaderra, R. Kao, A. Martínez del Pozo, and J.G. Gavilanes, unpubl.).  $\alpha$ -Sarcin contains an amino-terminal  $\beta$ -hairpin (residues 2–26) that forms a solvent-exposed protuberance and shows a complex topology that can be considered as two consecutive minor  $\beta$ -sheets connected by a hinge region (Fig. 1B; Pérez-Cañadillas et al. 2000). The second  $\beta$ -sheet of this amino-terminal hairpin is absent in the nontoxic RNases U2 and T1 (Pace et al. 1991; Noguchi et al. 1995). The region between residues 11 and 16 of this amino-terminal hairpin in restrictocin showed ill-defined electron density, which precluded its structural analysis (Yang and Moffat 1996).  $\alpha$ -Sarcin and restrictocin sequences differ in only 20 residues. Nine of these changes are of conservative character, and only five result in charge modification (amino-terminal hairpin: K11L, T20D; loop 2: K84Q, T90D; loop 5: E140G;  $\alpha$ -sarcin/restrictocin). Because restrictocin exhibits a decreased membrane-perturbing ability in comparison with  $\alpha$ -sarcin, and the mentioned charge changes involve both loop-2 (one of the proposed bilayer-interacting regions of  $\alpha$ -sarcin) and the amino-terminal  $\beta$ -hairpin, the latter appears to be a second region potentially required to maintain a vesicle dimer. In addition, the amino-terminal hairpin has been suggested to modulate the catalytic activity on the basis of results obtained with different mutants of mitogillin, a ribotoxin with a single substitution relative to restrictocin (Kao and Davies 1999, 2000). Lys 11 and Thr 20 have relevant and specific structural roles in  $\alpha$ -sarcin. Lys 11 is involved in a salt bridge with Glu 140, which displays unusual torsion backbone angles forced to adopt a conformation identical to the Gly located at the equivalent position in other ribotoxins. Thr 20 is very close to Asp 9, which is involved in a salt bridge with Lys 139 and hydrogen bonded to HN of Glu 140 (Pérez-Cañadillas et al. 2000). Considering the potential involvement of the amino-terminal hairpin in cytotoxicity and ribonuclease activity of ribotoxins and the specific structural role of Lys 11 and Thr 20 in



**Fig. 1.** Diagrams corresponding to the three-dimensional structure of  $\alpha$ -sarcin (A) and its amino-terminal  $\beta$ -hairpin (B) constructed from the atomic coordinates deposited in PDB (Protein Data Bank; reference 1DE3). Images were generated by the MOLMOL program (Koradi et al. 1996). Residues corresponding to loops in A are: loop 1 (black), 38–49; loop 2 (light grey), 53–93; loop 3 (grey), 98–119; loop 4 (black), 126–132; loop 5 (light grey), 139–143.

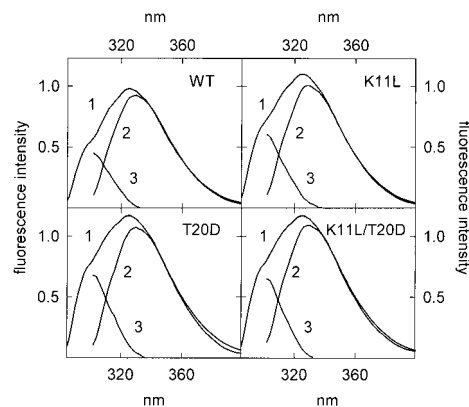
$\alpha$ -sarcin, we prepared mutants of  $\alpha$ -sarcin by substituting these two residues of the hairpin with their sequence counterparts in restrictocin: Lys 11 by Leu (variant K11L) and Thr 20 by Asp (variant T20D). These single variants and the corresponding K11L/T20D double mutant proteins have been purified and characterized to analyze the involvement of this protein region in the structure–function relationships of  $\alpha$ -sarcin.

## Results

### Purification and structural characterization of the mutants

The three mutants were isolated with a yield ranging from 2 to 4 mg/L of original culture medium, slightly lower than that obtained for recombinant wild-type  $\alpha$ -sarcin. The amino acid composition was in agreement with the mutations made in each case. The  $E^{0.1\%}$  (280 nm, 1 cm) calculated from the corresponding UV-absorption spectra showed only small variations (Table 1). Far- and near-ultraviolet (UV) circular dichroism (CD) spectra of the three variants were coincident with those already reported for the native fungal enzyme (Gavilanes et al. 1983; Martínez del Pozo et al. 1988) and some other mutants (Lacadena et al. 1995, 1999). The fluorescence quantum yield of the three variants was higher than that of the wild-type protein (Fig. 2). Differential analysis of the tyrosine and tryptophan contributions, upon excitation at 275 and 295 nm, revealed a larger increase for the Tyr quantum yield. T20D and K11L/T20D variants showed nearly the same Tyr and Trp emission increments, which were larger than for the K11L variant (Table 1). Restrictocin cannot be used for comparison because the counterpart of Tyr 18 in  $\alpha$ -sarcin is Trp 17 in restrictocin.

The optimum pH for the RNase activity of wild-type  $\alpha$ -sarcin is 5.0 (Pérez-Cañadillas et al. 1998; Lacadena et al. 1999). Thus, thermal denaturation of fungal  $\alpha$ -sarcin and the three mutants was studied at pH 5.0 and pH 7.0 by continuous recording of the thermal variation of the ellipticity at 220 nm (Fig. 3). The  $T_m$  value for the wild-type



**Fig. 2.** Fluorescence emission spectra of wild-type  $\alpha$ -sarcin (WT) and the K11L, T20D, and K11L/T20D mutant variants, at identical protein concentrations, for excitation at 275 nm (1) and 295 nm (2) (tryptophan contribution) normalized at wavelengths above 380 nm. (3) Calculated difference spectra 1 – 2 (tyrosine contribution). Fluorescence emission is expressed in arbitrary units considering the intensity at the wavelength of the emission maximum of the wild-type protein for excitation at 275 nm as 1.00.

protein at pH 7.0 was 52°C, in good agreement with that obtained by differential scanning calorimetry (Gasset et al. 1995). This value increased up to 62°C at pH 5.0 (Table 2). The K11L variant showed a higher  $T_m$  at both pH values whereas the T20D and K11L/T20D variants displayed decreased values. The enthalpy changes calculated from these plots were in the range 140–145 kcal/mole. The  $\Delta H_{cal}$  value determined for the wild-type protein at pH 7.0 from differential scanning calorimetric measurements was 136 kcal/mole (Gasset et al. 1995). According to the calculated  $\Delta(\Delta G)$ , the K11L substitution would involve a slight stabilization of the protein at both pH values, but replacement of Thr 20 by Asp would produce a decrease in stability (Table 2). Restrictocin was also studied for comparison (Table 2). Its  $T_m$  value was 7°C higher than that of  $\alpha$ -sarcin at both pH values. It is striking that *A. restrictus*, the mold that produces restrictocin, can grow at 37°C whereas the growth of *A. giganteus*, the microorganism producing  $\alpha$ -sarcin, shows impaired growth above 30°C.

### Ribonucleolytic characterization

The three mutants of  $\alpha$ -sarcin exhibited the same activity against ribosomes in a cell-free lysate (Fig. 4). The amounts of  $\alpha$ -fragment produced by these protein forms were in the  $\pm 10\%$  range of the wild-type protein. In this regard,  $\alpha$ -sarcin and restrictocin produced identical extents of protein synthesis inhibition in a cell-free lysate (Fando et al. 1985).

**Table 1.** Spectroscopic features of wild-type  $\alpha$ -sarcin and the three mutants studied<sup>a</sup>

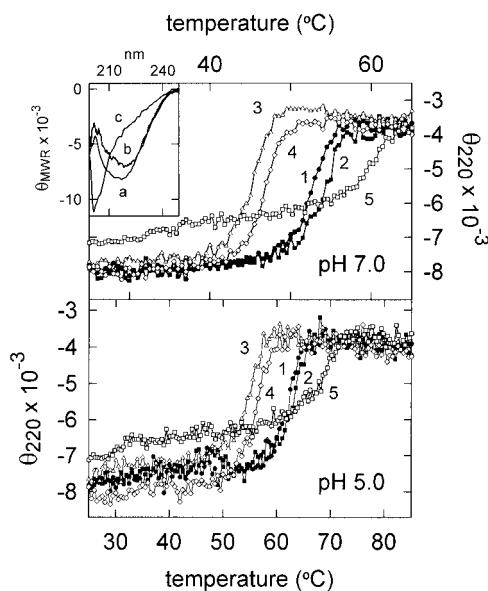
Protein	$E^{0.1\%}$ (280 nm, 1 cm)	$Q_{Tyr}^b$	$Q_{Trp}^b$
Wild-type	1.34	1	1
K11L	1.31	1.32	1.08
T20D	1.49	1.41	1.25
K11L/T20D	1.45	1.41	1.21

Values are the average of three different determinations.

<sup>a</sup> SD  $\pm$  0.05.

<sup>b</sup> Relative quantum yield of Tyr and Trp referred to the values of the wild-type protein.





**Fig. 3.** Thermal denaturation profiles of wild-type  $\alpha$ -sarcin (1), K11L (2), T20D (3), K11L/T20D (4), and restrictocin (5) at pH 7.0 and pH 5.0. The measurements were performed by continuous recording of the mean residue weight ellipticity at 220 nm ( $\theta_{220}$ ). (Inset) Far-UV circular dichroism spectra of (a) wild-type:  $\alpha$ -sarcin, K11L, T20D, and K11L/T20D mutant variants at both pH 5.0 and pH 7.0; (b) restrictocin at both pH 5.0 and pH 7.0; and (c) thermally denatured proteins at both pH 5.0 and pH 7.0. Mean residue weight ellipticity ( $\theta_{MRW}$ ) is expressed in units of  $^{\circ}\text{cm}^2/\text{dmole}$ .

Ribotoxins also cleave homopolynucleotides, synthetic substrates lacking the characteristic structural element required for the exquisite specificity of ribotoxins against ribosomes (Endo et al. 1983, 1990) through a cyclizing mechanism

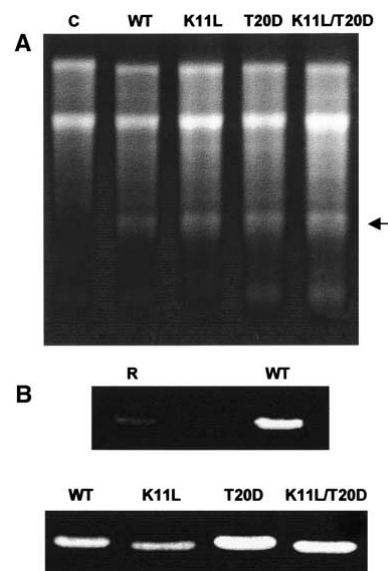
**Table 2.** Thermal denaturation parameters of wild-type  $\alpha$ -sarcin and the three mutants studied calculated from ellipticity at 220 nm versus temperature profiles<sup>a</sup>

Protein	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )		$\Delta(\Delta G)^b$ (Kcal/mol)	
	pH 5.0	pH 7.0	pH 5.0	pH 7.0
Wild-type	62	52	—	—
K11L	63	54	0.2	0.7
T20D	55	45	-2.3	-3.3
K11L/T20D	56	47	-2.0	-2.8
Restrictocin	69	59		

Average values obtained from three independent denaturation profiles.

<sup>a</sup>  $\text{SD} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

<sup>b</sup>  $\Delta(\Delta G) = (\Delta H \times \Delta T_m / T_m)$  is the stability change produced by the mutation [ $\Delta H$ , enthalpy change for the wild-type protein;  $\Delta T_m = T_m(\text{mutant}) - T_m(\text{wild-type})$ ;  $T_m$ , value obtained for the mutant variant] (Becktel and Schellman 1987).



**Fig. 4.** (A) Ribosome-inactivating activity assay of (WT) wild-type  $\alpha$ -sarcin, and its K11L, T20D, and K11L/T20D mutant variants (C, control in the absence of ribotoxin). The highly specific ribonuclease activity of the ribotoxins is shown by the release of the 400-nt  $\alpha$ -fragment (arrow) from the 28S rRNA of eukaryotic ribosomes. Cell-free reticulocyte lysates were incubated in the presence of 100 ng of each protein. The reaction mixture was analyzed on 2.4% agarose gels and stained with ethidium bromide. (B) Zymograms corresponding to the ribonucleolytic activity of (WT) wild-type  $\alpha$ -sarcin and its mutant variants, and (R) restrictocin. The amount of protein analyzed was 500 ng. The poly(A)-degrading activity of the proteins produced a nonstained region in this negative-staining analysis.

(Lacadena et al. 1998). The K11L mutant showed a decreased activity against polyadenylic acid [poly(A); 70% of the wild-type activity] but the other variants, T20D and K11L/T20D, displayed higher activity, 126% and 130%, respectively. Restrictocin showed a very low activity against poly(A) (Fig. 4).

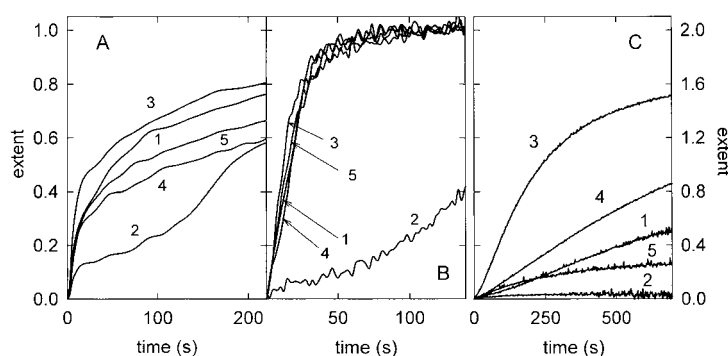
#### Protein-lipid interaction

It is well documented that  $\alpha$ -sarcin interacts with lipid model vesicles containing acid phospholipids through electrostatic and hydrophobic interactions. Regarding this specific requirement for acid phospholipids, it is important to mention that some tumor cells express much more acid phospholipids in the membrane outer leaflet than their non-tumor counterparts (Utsugi et al. 1991), and  $\alpha$ -sarcin was discovered because of its antitumor action (Olson et al. 1965). Although  $\alpha$ -sarcin is a basic protein, its effect on membranes cannot be explained simply by charge interac-

tion. This charge interaction has been also observed for other basic proteins like bovine seminal ribonuclease, a homodimeric basic protein (pI, 10.4). The native and the monomer form are active ribonucleases, but only the dimeric protein presents antitumor activity and destabilizes negatively charged membranes (Mancheño et al. 1994b). The interaction of  $\alpha$ -sarcin with membranes occurs through a complex process that can be dissected in three steps: vesicle aggregation, mixing of phospholipids from different bilayers, and leakage of intravesicular aqueous contents. Stopped-flow analysis (Mancheño et al. 1994a) has revealed that one of the first steps of vesicle aggregation is the formation of a vesicle dimer maintained by protein molecules through essentially electrostatic interactions. This initial step occurs on a scale of milliseconds, but vesicle aggregation continues to form large aggregates of complex structure on a scale of minutes. Vesicle aggregates scatter more light than unaggregated vesicles, and the process can be followed by measurement of the resulting apparent absorbance at 360 nm of a reaction mixture. The membranes are perturbed by the protein within the vesicle aggregates, and further mixing of phospholipids from different bilayers occurs. This process can be followed by a resonance energy transfer assay by use of two fluorescent phospholipid probes (donor and acceptor) incorporated into the membranes. The assay is performed with a mixture of fluorescence-labeled and unlabeled vesicles (1 : 9 ratio, labeled to unlabeled, respectively). The lipid mixing results in dilution of the two phospholipid probes and consequently in decrease of the fluorescence energy transfer. This decrease can reach a maximum value (infinite dilution of the probes in the assay) although mixing of lipids continues. As consequence of this perturbation promoted by the protein in the membrane, its permeability is altered, and leakage of the intravesicular aqueous content occurs. This effect can be measured by

co-encapsulation of a fluorescence probe and its specific collisional quencher. Leakage results in dilution of both molecules into the extravascular medium, and the fluorescence quenching decreases.

From a general point of view, vesicle-interacting proteins can produce either simply vesicle aggregation or leakage without vesicle aggregation (e.g., proteins promoting the formation of membrane pores) or lipid mixing between aggregated vesicles without or with leakage of aqueous contents.  $\alpha$ -Sarcin promotes aggregation, lipid mixing and leakage of aqueous content of its target vesicles. The native protein and its three mutants bound to phosphatidylglycerol-containing vesicles to the same extent, saturation being reached at the same protein/lipid ratio in all the cases. However, significant differences in their vesicle-interacting ability were observed. All three promoted vesicle aggregation and lipid-mixing but only T20D and K11L/T20D produced leakage of intravesicular contents (Fig. 5). Regarding vesicle aggregation, all the studied proteins promoted a similar final variation of the apparent absorbance at 360 nm. However, significant differences were observed on comparison of the kinetic traces (Fig. 5) and initial rates (Table 3) of the absorbance variation. T20D displayed a higher initial rate of vesicle aggregation than that observed for the wild-type protein, whereas K11L showed a lower initial rate; the double mutant form behaved essentially as the average of the two single mutants. The variation of the apparent absorbance promoted by K11L displayed a biphasic behavior (Fig. 5A) that may be related to the formation of a critical vesicle aggregate that further evolves to larger aggregates. The different behavior of the K11L mutant was also observed when lipid mixing was analyzed (Fig. 5B). The measured lipid mixing reached the same final extent for all the studied proteins, although the process was slower for the K11L mutant, suggesting that phospholipid mixing oc-



**Fig. 5.** Effect of wild-type  $\alpha$ -sarcin (1), K11L (2), T20D (3), K11L/T20D (4), and restrictocin (5) on phospholipid vesicle aggregation (A), lipid-mixing (B), and leakage of aqueous contents (C). The extent is referred to the final effect of wild-type  $\alpha$ -sarcin considered as unit in all the cases. Assays were performed at 20 : 1 phospholipid/protein saturating molar ratio.

**Table 3.** Relative initial rate ( $r_{in}$ ) and final extent of vesicle aggregation, lipid-mixing and leakage of intravesicular aqueous contents promoted by wild-type  $\alpha$ -sarcin (WT), its three studied mutant variants and restrictocin on acid vesicles composed of phosphatidylglycerol, at saturating lipid/protein molar ratios<sup>a</sup>

Protein	Aggregation		Lipid-mixing		Leakage	
	( $r_{in}$ )	Extent	( $r_{in}$ )	Extent	( $r_{in}$ )	Extent
WT	1	1	1	1	1	1
K11L	0.4	0.8	0.1	1	0	0
T20D	1.5	1	1.5	1	4.9	2
K11L/T20D	0.9	0.9	0.7	1	1.4	1.7
Restrictocin	0.8	1	1.2	1	1.2	0.5

Results are expressed as relative values of those corresponding to WT considered as unit.

Average values from three different determinations.

<sup>a</sup> SD  $\pm$  0.07 for  $r_{in}$  and SD  $\pm$  0.05 for extent.

curs only within the above-mentioned critical vesicle aggregate. Furthermore, the K11L mutant did not perturb the permeability barrier of the bilayer enough to produce leakage of intravesicular contents (Fig. 5C). The T20D mutant otherwise displayed a higher initial rate for lipid mixing and leakage, and the final extent of this later process was double that produced by the wild-type protein (Table 3; Fig. 5B,C). Although restrictocin and wild-type  $\alpha$ -sarcin showed similar behavior regarding vesicle aggregation and lipid-mixing, distinct differences were observed in their permeabilizing abilities (Fig. 5C and Table 3).

#### Cytotoxicity activity

$\alpha$ -Sarcin has been reported to be cytotoxic for different human tumor cell lines including RD cells (from human rhabdomyosarcoma; Turnay et al. 1993). These cells were used to assay the cytotoxic activity of the studied proteins. Wild-type  $\alpha$ -sarcin and its T20D and K11L/T20D variants exhibited similar  $IC_{50}$  values (concentration required for 50% protein biosynthesis inhibition), 0.6, 0.7, and 0.8  $\mu$ M, respectively, whereas the values obtained for K11L and restrictocin were two- (1.5  $\mu$ M) and threefold (2.0  $\mu$ M) increased, respectively.

## Discussion

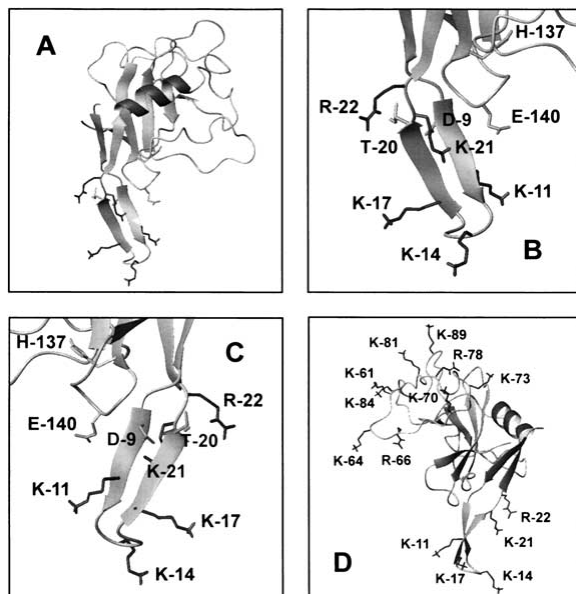
#### Structural and spectroscopical characterization

Wild-type  $\alpha$ -sarcin and the three mutants showed the same secondary and tertiary structural arrangement according to their near- and far-UV CD spectra. The substitutions engineered produce small, although significant, variations in the local environment of the aromatic chromophores as deduced from the spectroscopical properties of the mutant variants (Table 1). This result could be explained on the basis of the

known structure of  $\alpha$ -sarcin. In fact, the fluorescence properties of native  $\alpha$ -sarcin are strongly dominated by the Trp 4 emission (de Antonio et al. 2000), a residue located at the amino-terminal  $\beta$ -hairpin. Moreover, Tyr 18 and Tyr 25 are also in the vicinity of the changed residues. In addition, Lys 11 is involved in the formation of a salt bridge with Glu 140 (loop 5), Tyr 18 displaying a  $\pi$ -cation interaction with Lys 139 (loop5), which also forms a salt bridge with Asp 9 (Pérez-Cañadillas et al. 2000).

It is also clear from the results presented that the  $T_m$  of wild-type  $\alpha$ -sarcin is much higher (about 10°C) at pH 5.0 than at pH 7.0 (Table 2). The individual  $pK_a$  values of most of the  $\alpha$ -sarcin ionizable groups in the pH range of 3.0–8.5 have been determined (Pérez-Cañadillas et al. 1998). Therefore, it is tempting to assign this  $T_m$  increment to certain residues titrating within the pH 5.0 to pH 7.0 range. Inspection of the three-dimensional structure of  $\alpha$ -sarcin reveals that His 36 ( $pK_a$  of 6.8) and His 104 ( $pK_a$  of 6.5) form surface salt bridges with Asp 102 and Asp 105, which display altered  $pK_a$  values (Pérez-Cañadillas et al. 1998, 2000). It has even been proposed that these salt bridges would contribute to the global stability of the protein (Pérez-Cañadillas et al. 2000). Indeed, Glu 31, His 35, and His 36, located in the single  $\alpha$ -helix of  $\alpha$ -sarcin, form a group of titratable amino acids on the basis of their spatial proximity. This group of residues also titrate in the pH 5.0 to pH 7.0 range (Pérez-Cañadillas et al. 1998). The increased  $T_m$  at pH 5.0 for wild-type  $\alpha$ -sarcin can be explained in terms of a higher degree of protonation for these His residues, which favors the formation of the salt bridges. All the residues mentioned are located in loop 3 or in the helix, in regions far away from the amino-terminal  $\beta$ -hairpin, which explains why this pH-dependent  $T_m$  increment is very similar for the three mutants; that is, the mutations do not affect the ionization equilibrium of the groups responsible for the increased stability at acid pH.

The additive character of the effects of the mutations studied on the  $T_m$  values suggests these changes are independent, presumably promoting only local structural changes. Loop 5 of  $\alpha$ -sarcin (residues 139–143) connects the last two strands of the central  $\beta$ -sheet and establishes many interactions with other parts of the protein (Fig. 6). In particular, Glu 140 has unusual backbone torsional angles to maintain the unique conformation adopted by this loop (Pérez-Cañadillas et al. 2000). It has been proposed that mutating this Glu to Gly would stabilize  $\alpha$ -sarcin (Pérez-Cañadillas et al. 2000). The salt bridge between Lys 11 and Glu 140 mentioned above would contribute to maintaining the unusual conformation of Glu 140. This salt bridge is not present in the K11L variant, and its increased stability would reflect the release of conformational tension. The T20D substitution has a destabilizing effect in both single and double mutant variants. In this regard, positions Glu 9 and Asp 20 are very close in the three-dimensional structure



**Fig. 6.** Diagrams corresponding to the three-dimensional structure of  $\alpha$ -sarcin (A) and details of the amino-terminal  $\beta$ -hairpin (B, C). Positively charged residues of loop 2 (from Lys 64 to Lys 89) and amino-terminal  $\beta$ -hairpin (from Lys 11 to Arg 22) are shown in the diagram in D. Images were generated by the MOLMOL program (Koradi et al. 1996).

of  $\alpha$ -sarcin (4.4 Å is the distance between the two C $\alpha$ s; Fig. 6). Therefore, the presence of the negative charge in the T20D mutant might result in destabilization of the protein structure by charge repulsion between Glu 9 and Asp 20. In addition, the sequence around this position is highly charged (17-Lys-Tyr-Glu-Thr-Lys-Arg-22) in  $\alpha$ -sarcin and the presence of Asp 20 in the mutants may also explain the decreased stability of the corresponding variants. As mentioned above, the structure of the amino-terminal region of restrictocin is not known and, therefore, it is not possible to assign this effect to a particular residue or group of residues.

#### Ribonucleolytic activity

Resolution of the three-dimensional structures of  $\alpha$ -sarcin and restrictocin has allowed modeling of the docking of these proteins and their SRL substrate (Yang and Moffat 1996; Campos-Olivas et al. 1996; Pérez-Cañadillas et al. 2000). According to these analyses, the extraordinary high substrate specificity of  $\alpha$ -sarcin would be based on the existence of two regions interacting with SRL RNA that are separated by >11 Å (Pérez-Cañadillas et al. 2000). One would be the lysine-rich region in loop 3 (residues 110–114) responsible for the interaction with the bulged G. This prediction seemed to be confirmed by the fact that deletion of the corresponding loop in mitogillin created a mutant that failed to recognize and cleave the SRL RNA (Kao and

Davies 1999). The other region would be loop 5, which, in the model, is in close proximity to the RNA GAGA loop that is actually cleaved by the protein. The fact that the three  $\alpha$ -sarcin mutants studied retain their capacity to specifically cleave the ribosomes suggests that the regions involved in SRL RNA recognition are not affected by the mutations, in agreement with the docking model, which suggested that loops 3 and 5 are responsible for such recognition (Fig. 4A).

The nonspecific activity of  $\alpha$ -sarcin seems to be slightly affected by the mutations (Fig. 4B). Substitution of Lys 11 with Leu yielded an enzyme displaying a lower activity against poly(A) whereas the T20D activity was increased. These results agree with the fact that  $\alpha$ -sarcin and restrictocin display different activity against poly(A) although they behave very similarly in ribosome cleavage (Fando et al. 1985). The enzymatic efficiency of  $\alpha$ -sarcin would be dependent on the interactions between the catalytic His residue, loop 5, and the amino-terminal  $\beta$ -hairpin on the basis of comparison with the nontoxic RNase T1 (Pace et al. 1991; Noguchi et al. 1995; Pérez-Cañadillas et al. 2000).  $\alpha$ -Sarcin His 137 is one of the two catalytic residues playing a general acid–base role during the ribonucleolytic action (Pérez-Cañadillas et al. 1998; Lacadena et al. 1999). It is deeply buried in a special environment as revealed by its anomalously low  $pK_a$  of 5.8, because loop 5 folds toward the active center (Pérez-Cañadillas et al. 1998). In RNase T1, the loop folds in the opposite direction, and the catalytic

His 92 is in an exposed environment exhibiting a higher  $pK_a$  (Inagaki et al. 1981; Steyaert et al. 1990). In addition, the side chain of  $\alpha$ -sarcin His 137 is hydrogen bonded to the carbonyl oxygen of Gly 143 (loop 5) although this hydrogen bond is not formed in RNase T1. The active site of  $\alpha$ -sarcin is connected with the amino-terminal  $\beta$ -hairpin via the salt bridge established between Lys 11 and Glu 140 (Pérez-Cañadillas et al. 2000). Thus, the catalytic properties of ribotoxins against nonspecific substrates would be dependent on interactions involving some residues of the amino-terminal hairpin of these proteins. Disrupting these interactions by introducing single mutations in the amino-terminal region could affect the environment and/or accessibility of His 137, and consequently the nonspecific activity of  $\alpha$ -sarcin. A similar proposal was made (Kao and Davies 1999, 2000) on the basis of analysis of deletion mutants in different regions of mitogillin. Deletions comprising stretches between residues 13 and 23 (corresponding to 14 and 24 in  $\alpha$ -sarcin) gave rise to mitogillin variants with elevated nonspecific ribonucleolytic activity, which is in good agreement with the higher activity of T20D against poly(A) observed in our study (Fig. 4B), even considering that, in our case, only single amino acid changes have been made.

#### *Interaction with lipids*

$\alpha$ -Sarcin is a highly polar (Martínez del Pozo et al. 1988; Pérez-Cañadillas et al. 2000), water soluble protein that binds to and crosses membranes. The effect of this protein on phospholipid vesicles as well as the conditions required for this interaction to be established have been well documented (Gasset et al. 1989, 1990, 1994; Mancheño et al. 1994a,b, 1998; Oñaderra et al. 1993, 1998). It was predicted that the  $\alpha$ -sarcin central  $\beta$ -sheet defined a hydrophobic core that could contribute to the interaction with membranes (Mancheño et al. 1995a). This prediction seemed to be confirmed in the light of the results obtained with different peptides containing sequences corresponding to some of the  $\beta$ -strands that conform this region (Mancheño et al. 1995b, 1998). Apart from these experiments, no other data have been reported concerning the participation of any ribotoxin structural element in their interaction with phospholipids, and very little is known about the protein structural determinants that would mediate this interaction. All the ribotoxin mutants studied so far either behaved like the wild-type protein (Lacadena et al. 1995; de Antonio et al. 2000) or had not been tested against phospholipid vesicles (Kao and Davies 1995, 1999; Nayak and Batra 1997; Kao et al. 1998; Lacadena et al. 1999).

Inspection of the  $\alpha$ -sarcin structure reveals that its surface is highly charged, with some regions within which positive charges concentrate (Fig. 6D; Pérez-Cañadillas et al. 2000). This feature could explain its preference for negative phospholipids (Gasset et al. 1989, 1990). But, it is not easy to

draw any other conclusion about the regions of the molecule that could be responsible for its specific passage across membranes. Yang and Moffat (1996) suggested that loop L3 (corresponding to loop 2 in  $\alpha$ -sarcin nomenclature) would be involved in the membrane fusion process induced by  $\alpha$ -sarcin (Gasset et al. 1990), but no experimental confirmation of this hypothesis has been obtained.

The results presented here suggest that the region around the 11th and 20th residues might be involved in the interaction of  $\alpha$ -sarcin with lipid vesicles (Fig. 6A–C). Substitution of K11 with Leu resulted in a decreased ability of the protein to perturb the bilayers whereas substitution of Thr 20 with Asp resulted in increased initial rates of perturbation in spite of the net positive charge decreases. The side chains of Thr 20 and Asp 9 are near in the three-dimensional structure of wild-type  $\alpha$ -sarcin (4.4 Å between C $\alpha$ s). The presence of Asp at position 20 in the T20D variant would result in electrostatic repulsion, that may change the orientation of the side chains of Lys 21 and Arg 22, favoring potential electrostatic interactions with the acidic phospholipids through Lys 11, Lys 14, and Lys 17 (which are located in the highly exposed protuberance, residues 9–20, of the amino-terminal  $\beta$ -hairpin), thus explaining the increased initial rates of perturbation of this mutant variant. Substitution of Lys 11 with Leu would reduce this effect.

Vesicle aggregation induced by the K11L mutant follows a biphasic kinetics (Fig. 5A). This observation suggests the formation of an intermediate protein-vesicle complex that further evolves to a large aggregate. The initial step of vesicle aggregation is the formation of a vesicle dimer maintained by electrostatic interactions. This dimer is favored when the vesicle-interacting protein displays two lipid binding regions. A decreased affinity in one of these regions requires a higher concentration of an intermediate protein-vesicle complex to form large aggregates. One of the lipid-interacting regions of  $\alpha$ -sarcin has been related to Lys and Arg residues of loop 2 (surface accessibilities >50%). In fact, Trp 51, close to this loop, is located in the hydrophobic core of the bilayer upon protein-vesicle interaction as its fluorescence is quenched by anthracene incorporated in the core of the membrane (de Antonio et al. 2000). Residues from the amino-terminal  $\beta$ -hairpin, located in the opposite side of the  $\alpha$ -sarcin molecule with respect to loop 2, might contribute to the second lipid-binding region. The K11L change would decrease the affinity for electrostatic interaction with vesicles thus explaining the observed vesicle aggregation kinetics (Fig. 5A).

#### *Cytotoxicity*

The observed differences in lipid-interacting ability of the studied proteins correlate well with their cytotoxic effect. Restrictocin and the K11L mutant variant are the least effective in inhibiting both cellular protein biosynthesis and

ability to perturb the phospholipid bilayer. These observations strongly suggest the involvement of the amino-terminal  $\beta$ -hairpin in the interaction with membranes and the notion that the cytotoxicity of ribotoxins is related to both ribonuclease and lipid-interacting activities.

### Conclusions

The results show that a single amino acid substitution in  $\alpha$ -sarcin can alter its cytotoxicity without altering the overall structural folding or the activity against ribosomes. It is clear from these experiments that the amino-terminal  $\beta$ -hairpin of ribotoxins plays a role in their ability to penetrate different cells. Its absence from other nontoxic RNases, such as T1 and U2, could explain, in part, why they are not cytotoxic. Furthermore, this amino-terminal stretch is one of the regions of the molecule that shows a high degree of sequence variation among all known ribotoxins (Wirth et al. 1997; Martínez-Ruiz et al. 1999a,b), resulting in varying cytotoxicity.

### Materials and methods

#### DNA manipulations

All materials and reagents were molecular biology grade. Cloning procedures and bacteria manipulations were carried out according to standard methods (Sambrook et al. 1989) as described previously (Lacadena et al. 1994, 1995, 1999). Oligonucleotide site-directed mutagenesis was used to replace Lys 11 by Leu (K11L) and Thr 20 by Asp (T20D) as described previously (Kunkel et al. 1987; Lacadena et al. 1994, 1995, 1999). To obtain the double mutant, a second mutagenic round was performed with T20D DNA as template. The mutagenic primers used were 5'-TTGAAC-GACCAGCTGAACCCCAAGACC-3' for K11L and 5'-AA-CAAGTATGAGGACAAACGCCTCCTC-3' for T20D (the site of mutation is underlined). The *E. coli* strains used were BW313 {(HfrKL16 *pol45* [*LysA* (61–62)] *dut1 ung1 thi1 relA*)} to obtain the uridine-rich ssDNA, DH5 $\alpha$ F'({[F'] *endA1 hsdR17* ( $r_{\text{K}}^- m_{\text{K}}^-$ ) *supE44 thi-1 recA1 gyrA* (Na<sup>R</sup>) *relA1*  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *deoR* [ $\Delta$ 80 *dlac*  $\Delta$ (*lacZ*) M15]}) for the expression constructs, and BL21(DE3)(F' *ompT* [*lon*] *hsd<sub>B</sub>* ( $r_{\text{B}}^- m_{\text{B}}^-$ )) for protein production. The thioredoxin-producing plasmid (pT-Trx; Yasukawa et al. 1995) was a generous gift of Dr. S. Ishii, from the Riken Tsukuba Life Science Center (Japan).

#### Protein production and purification

BL21(DE3) cotransformed with pT-Trx and the corresponding  $\alpha$ -sarcin mutant plasmid were used to produce and purify the mutants, as described for the wild-type protein (Lacadena et al. 1994; García-Ortega et al. 2000). Wild-type  $\alpha$ -sarcin and restrictocin were produced and purified according to methods reported previously (Olson and Goerner 1965; Gavilanes et al. 1983; Lacadena et al. 1994). Polyacrylamide gel electrophoresis of proteins, protein hydrolysis, and amino acid analysis were also performed according to standard procedures (Gavilanes et al. 1983; Lacadena et al. 1994).

#### Spectroscopic characterization

Absorbance measurements were carried out with a Uvikon 930 spectrophotometer at 100 nm/min scanning speed, at room temperature, and in 1-cm optical-path cells. CD spectra were obtained on a Jasco 715 spectropolarimeter at 0.2 nm/sec scanning speed; 0.1- and 1.0-cm optical-path cells were used for the far- and near-UV, respectively. Mean residue weight ellipticities were expressed in units of degree  $\times$ cm<sup>2</sup>/dmole. Extinction coefficients E(0.1%, 1 cm, 280 nm) were calculated from their absorbance spectra and amino acid analyses. Thermal denaturation profiles were obtained by measurement of the temperature dependence of the ellipticity at 220 nm in the range of 25°C–85°C; the temperature was continuously changed at a rate of 0.5°C/min.  $T_m$  values were calculated assuming a two-state unfolding mechanism. Fluorescence emission spectra were obtained on an SLM Aminco 8000 spectrofluorimeter at 25°C and in 0.2-cm optical-path cells, as described previously (Gavilanes et al. 1983; Lacadena et al. 1999).

#### Ribonucleolytic activity

The specific ribonucleolytic activity of  $\alpha$ -sarcin was followed by detection of the release of the 400-nt  $\alpha$ -fragment (Schindler and Davies 1977; Endo and Wool 1982; Endo et al. 1983) from a cell-free reticulocyte lysate (Promega) (Lacadena et al. 1994, 1995, 1999). The production of the 400-nt  $\alpha$ -fragment was visualized by ethidium bromide staining after electrophoresis on a 2.4% agarose gel. The amount of  $\alpha$ -fragment was estimated from the ethidium bromide-stained gel with the photo documentation system UVI-Tec and the software facility UVISoft UVI band Windows Application V97.04. The residual 16S rRNA was used as reference for normalization. The activity of the purified proteins against poly(A) was assayed at pH 4.5 in 15% polyacrylamide gels containing 0.1% SDS and 0.3 mg/mL of the homopolynucleotide. This zymogram method was based on one described previously (Blank et al. 1982; Lacadena et al. 1994, 1995; Kao and Davies 1995, 1999, 2000). Proteins exhibiting ribonuclease activity appear as colorless bands after appropriate destaining. Volumograms (density or quantity of a spot calculated from its volume made of the sum of all pixel intensities composing the spot) of these bands (obtained with the photo documentation system described above) were also used to quantify the activity. All assays were performed with controls to test potential nonspecific degradation of the substrates, which does not occur under the conditions used.

#### Protein-lipid interactions

All phospholipids used were purchased from Avanti Polar Lipids Inc. Vesicles were formed by hydration of a dry lipid film with Tris buffer (15 mM Tris [pH 7.0] containing 0.1 M NaCl and 1 mM EDTA) for 60 min at 37°C. The lipid suspension was subjected to five cycles of extrusion through two stacked 0.1  $\mu$ m (pore diameter) polycarbonate membranes (Mancheño et al. 1994a). The average diameter of the vesicle population was 100 nm (85% of the vesicles in the range 75–125 nm), as determined by electron microscopy studies (Mancheño et al. 1994a). Phospholipid concentration was determined as described (Barlett 1959).

Aggregation of phospholipid vesicles was monitored as described before (Gasset et al. 1989) by measurement of the increase in the absorbance at 360 nm of a suspension of phosphatidylglycerol vesicles in Tris buffer (30  $\mu$ M final lipid concentration) after addition of a small aliquot of a freshly prepared solution of protein. Intermixing of membrane lipids was analyzed by considering fluo-

rescence energy transfer assays (Struck et al. 1981) as described (Mancheño et al. 1994a,b). A decrease in the donor-to-acceptor fluorescence energy transfer indicates lipid-mixing between membranes. Leakage of vesicle aqueous contents was measured by use of the 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid/*N,N'*-*p*-xylylenebispyridinium bromide assay also as described previously (Mancheño et al. 1995b, 1998). Binding of the proteins to the lipid vesicles was analyzed by measurement of the free protein concentration in the supernatant obtained by centrifugation (160000g/60 min, Beckman Airfuge) of protein-vesicle mixtures at different protein/lipid ratios. This protein concentration was calculated by analysis with a photo documentation system of the Coomassie-stained SDS gels resulting from subjecting supernatant aliquots to SDS-PAGE. A calibration plot, volumogram of the protein band (obtained as described above) versus protein concentration (determined by amino acid analysis of acid-hydrolyzed protein samples) was used for these calculations. Other experimental details were as reported previously (Gasset et al. 1989, 1990, 1994; Mancheño et al. 1994a,b, 1998; Oñaderra et al. 1993, 1998).

#### Cytotoxicity assay

This assay was performed essentially as described (Turnay et al. 1993) by use of RD (human rhabdomyosarcoma) cells. Protein synthesis was analyzed by measurement of the incorporation of L-[4,5-<sup>3</sup>H]leucine (166 Ci/mmol). The radioactivity was measured in a Beckman LS 3801 liquid scintillation counter. The results are expressed as percentage of incorporation in control samples. A plot of these percentage values versus toxic protein concentration in the cytotoxicity assay allows the calculation of the IC<sub>50</sub> values. Those values reported correspond to the average of triplicate experiments.

#### Acknowledgments

This work was supported by grants BMC2000-0551 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología and PB98-0083 from the Ministerio de Educación y Cultura (MEC) (Spain) and Natural Sciences and Engineering Research Council (Canada; R.K., J.D.). L.G.-O. is recipient of a fellowship from the MEC (Spain).

The publication costs of this article were defrayed in part by payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734 solely to indicate this fact.

#### References

- Barlett, G.R. 1959. Colorimetric assay methods for free and phosphorylated glyceric acids. *J. Biol. Chem.* **234**: 466-468.
- Becktel, W.J. and Schellman, J.A. 1987. Protein stability curves. *Biopolymers* **26**: 1859-1877.
- Blank, A., Sugiyama, R.H., and 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.
- Campos-Olivas, R., Bruix, M., Santoro, J., Martínez del Pozo, A., Lacadena, J., Gavilanes, J.G., and Rico, M. 1996. Structural basis for the catalytic mechanism and substrate specificity of the ribonuclease  $\alpha$ -sarcin. *FEBS Lett.* **399**: 163-165.
- Correll, C.C., Munishkin, A., Chan, Y.L., Ren, Z., Wool, I.G., and Steitz, T.A. 1998. Crystal structure of the ribosomal RNA domain essential for binding elongation factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 13436-13441.
- Correll, C.C., Wool, I.G., and Munishkin, A. 1999. The two faces of the *Escherichia coli* 23 S rRNA sarcin/ricin domain: The structure at 1.11 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **292**: 275-287.
- De Antonio, C., Martínez del Pozo, A., Mancheño, J.M., Oñaderra, M., Lacadena, J., Martínez-Ruiz, A., Pérez-Cañadillas, J.M., Bruix, M., and Gavilanes, J.G. 2000. Assignment of the contribution of the tryptophan residues to the spectroscopic and functional properties of the ribotoxin  $\alpha$ -sarcin. *Proteins* **41**: 350-361.
- Endo, Y. and Wool, I.G. 1982. The site of action of  $\alpha$ -sarcin on eukaryotic ribosomes: The sequence at the  $\alpha$ -sarcin cleavage-site in 28S ribosomal ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **257**: 9054-9060.
- Endo, Y., Hubert, P.W., and Wool, I.G. 1983. The ribonuclease activity of the cytotoxin  $\alpha$ -sarcin: The characteristics of the enzymatic activity of  $\alpha$ -sarcin with ribosomes and ribonucleic acids as substrates. *J. Biol. Chem.* **258**: 2662-2667.
- Endo, Y., Glück, A., Chan, Y.-L., Tsurugi, K., and Wool, I.G. 1990. RNA-protein interaction: An analysis with RNA oligonucleotides of the recognition by  $\alpha$ -sarcin of a ribosomal domain critical for function. *J. Biol. Chem.* **265**: 2216-2222.
- Fando, J.L., Alaba, I., Escarmis, C., Fernández-Luna, J.L., Méndez, E., and Salinas, M. 1985. The mode of action of restrictocin and mitogillin on eukaryotic ribosomes. *Eur. J. Biochem.* **149**: 29-34.
- García-Ortega, L., Lacadena, J., Lacadena, V., Masip, M., De Antonio, C., Martínez-Ruiz, A., and Martínez del Pozo, A. 2000. The solubility of the ribotoxin  $\alpha$ -sarcin, produced as a recombinant protein in *Escherichia coli*, is significantly increased in the presence of thioredoxin. *Letts. Applied Microbiol.* **30**: 298-302.
- Gasset, M., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M., and Gavilanes, J.G. 1989. Study of the interaction between the antitumor protein  $\alpha$ -sarcin and phospholipid vesicles. *Biochem. J.* **258**: 569-575.
- Gasset, M., Oñaderra, M., Thomas, P.G., and Gavilanes, J.G. 1990. Fusion of phospholipid vesicles produced by the anti-tumour protein  $\alpha$ -sarcin. *Biochem. J.* **265**: 815-822.
- Gasset, M., Mancheño, J.M., Lacadena, J., Turnay, J., Olmo, N., Lizarbe, M.A., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M., and Gavilanes, J.G. 1994.  $\alpha$ -Sarcin, a ribosome-inactivating protein that translocates across the membrane of phospholipid vesicles. *Curr. Topics Peptide Protein Res.* **1**: 99-104.
- Gasset, M., Mancheño, J.M., Laynez, J., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M., and Gavilanes, J.G. 1995. Thermal unfolding of the cytotoxin  $\alpha$ -sarcin. Phospholipid binding induces destabilization of the protein structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1252**: 126-134.
- Gavilanes, J.G., Vázquez, D., Soriano, F., and Méndez, E. 1983. Chemical and spectroscopic evidence on the homology of three antitumor proteins:  $\alpha$ -Sarcin, mitogillin and restrictocin. *J. Protein. Chem.* **2**: 251-261.
- Inagaki, F., Kawano, Y., Shimada, I., Takahashi, K., and Miyazawa, T. 1981. Nuclear magnetic resonance study on the microenvironments of histidine residues of ribonuclease T1 and carboxymethylated ribonuclease T1. *J. Biochem.* **89**: 1185-1195.
- Kao, R. and Davies, J. 1995. Fungal ribotoxins: A family of naturally engineered targeted toxins? *Biochem. Cell Biol.* **73**: 1151-1159.
- . 1999. Molecular dissection of mitogillin reveals that the fungal ribotoxins are a family of naturally engineered ribonucleases. *J. Biol. Chem.* **274**: 12576-12582.
- . 2000. Single amino acid substitutions affecting the specificity of the fungal ribotoxin mitogillin. *FEBS Lett.* **466**: 87-90.
- Kao, R., Shea, J.E., Davies, J., and Holden, D.W. 1998. Probing the active site of mitogillin, a fungal ribotoxin. *Mol. Microbiol.* **29**: 1019-1027.
- Koradi, R., Billeter, M., and Wütrich, K. 1996. MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* **14**: 51-55.
- Kunkel, T.A., Roberts, J.D., and Zakour, R.A. 1987. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* **154**: 367-382.
- Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Barbero, J.L., Mancheño, J.M., Gasset, M., Oñaderra, M., López-Otín, C., Ortega, S., García, J.L., and Gavilanes, J.G. 1994. Overproduction and purification of biologically active native fungal  $\alpha$ -sarcin in *Escherichia coli*. *Gene* **142**: 147-151.
- Lacadena, J., Mancheño, J.M., Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, A., Gasset, M., Oñaderra, M., and Gavilanes, J.G. 1995. Substitution of histidine-137 by glutamine abolishes the catalytic activity of the ribosome-inactivating protein  $\alpha$ -sarcin. *Biochem. J.* **309**: 581-586.
- Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Lacadena, V., Martínez-Ruiz, A., Mancheño, J.M., Oñaderra, M., and 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., and Gavilanes, J.G. 1999. Role of histidine-50, glutamic acid-96 and histidine-137 in the ribonucleolytic mechanism of the ribotoxin  $\alpha$ -sarcin. *Proteins* **37**: 474-484.
- Mancheño, J.M., Gasset, M., Lacadena, J., Ramón, F., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M., and Gavilanes, J.G. 1994a. Kinetic study of the aggregation

- and lipid-mixing produced by  $\alpha$ -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., Oñaderra, M., Gavilanes, J.G., and D'Alessio, G. 1994b. Bovine seminal ribonuclease destabilizes negatively charged membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**: 119–124.
- Mancheño, J.M., Gasset, M., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M., and Gavilanes, J.G. 1995a. Predictive study of the conformation of the cytotoxic protein  $\alpha$ -sarcin: A structural model to explain  $\alpha$ -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., and Gavilanes, J.G. 1995b. Membrane interaction of a  $\beta$ -structure-forming synthetic peptide comprising the 116–139<sup>th</sup> sequence of the cytotoxic protein  $\alpha$ -sarcin. *Biophys. J.* **68**: 2387–2395.
- Mancheño, J.M., Martínez del Pozo, A., Albar, J.P., Oñaderra, M., and Gavilanes, J.G. 1998. A peptide of nine amino acid residues from  $\alpha$ -sarcin cytotoxin is a membrane-perturbing structure. *J. Peptide Res.* **51**: 142–148.
- Martínez del Pozo, A., Gasset, M., Oñaderra, M., and Gavilanes, J.G. 1988. Conformational study of the antitumor protein  $\alpha$ -sarcin. *Biochim. Biophys. Acta* **953**: 280–288.
- Martínez-Ruiz, A., Kao, R., Davies, J., and 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., and Gavilanes, J.G. 1999b. Hirsutellin A displays significant homology to microbial extracellular ribonucleases. *J. Invertebr. Pathol.* **74**: 96–97.
- Miller, S.P. and Bodley, J.W. 1988. The ribosomes of *Aspergillus giganteus* are sensitive to the cytotoxic action of  $\alpha$ -sarcin. *FEBS Lett.* **229**: 388–390.
- Nayak, S.K. and Batra, J.K. 1997. A single amino acid substitution in ribonucleolytic toxin restrictocin abolishes its specific substrate recognition activity. *Biochemistry* **36**: 13693–13699.
- Noguchi, S., Satow, Y., Uchida, T., Sasaki, C., and Matsuzaki, T. 1995. Crystal structure of *Ustilago sphaerogena* ribonuclease U2 at 1.8 Å resolution. *Biochemistry* **34**: 15583–15591.
- Olson, B.H. and 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., and Schuurmans, D.M. 1965.  $\alpha$ -Sarcin, a new antitumor agent. II. Fermentation and antitumor spectrum. *Applied Microbiol.* **13**: 322–326.
- Oñaderra, M., Mancheño, J.M., Gasset, M., Lacadena, J., Schiavo, G., Martínez del Pozo, A., and Gavilanes, J.G. 1993. Translocation of  $\alpha$ -sarcin across the lipid bilayer of aslectin vesicles. *Biochem. J.* **295**: 221–225.
- Oñaderra, M., Mancheño, J.M., Lacadena, J., De los Ríos, V., Martínez del Pozo, A., and Gavilanes, J.G. 1998. Oligomerization of the cytotoxin  $\alpha$ -sarcin associated to phospholipid membranes. *Mol. Membr. Biol.* **15**: 141–144.
- Pace, C.N., Heinemann, U., Hahn, U., and Saenger, W. 1991. Ribonuclease T1: Structure, function and stability. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**: 343–360.
- Pérez-Cañadillas, J.M., Campos-Olivas, R., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Gavilanes, J.G., Santoro, J., Rico, M., and Bruix, M. 1998. Characterization of pK<sub>a</sub> values and titration shifts in the cytotoxic ribonuclease  $\alpha$ -sarcin by NMR. Relationship between electrostatic interactions, structure and catalytic function. *Biochemistry* **37**: 15865–15876.
- Pérez-Cañadillas, J.M., Santoro, J., Campos-Olivas, R., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Gavilanes, J.G., Rico, M., and Bruix, M. 2000. The highly refined solution structure of the cytotoxic ribonuclease  $\alpha$ -sarcin reveals the structural requirements for substrate recognition and ribonucleolytic activity. *J. Mol. Biol.* **299**: 1061–1073.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schindler, D.G. and Davies, J.E. 1977. Specific cleavage of ribosomal RNA caused by  $\alpha$ -sarcin. *Nucleic Acids Res.* **4**: 1097–1100.
- Steyaert, J., Hallegh, K., Wyns, L., and Stansens, P. 1990. Histidine-40 of ribonuclease T1 acts as base catalyst when the true catalyst base, glutamic acid-58, is replaced by alanine. *Biochemistry* **29**: 9064–9072.
- Struck, D.K., Hoekstra, D., and Pagano, R.E. 1981. Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry* **20**: 4093–4099.
- Szewczak, A.A. and Moore, P.B. 1995. The sarcin/ricin loop, a modular RNA. *J. Mol. Biol.* **247**: 81–98.
- Turnay, J., Olmo, N., Jiménez, J., Lizarbe, M.A., and Gavilanes, J.G. 1993. Kinetic study of the cytotoxic effect of  $\alpha$ -sarcin, a ribosome inactivating protein from *A. giganteus*, on tumor cell lines: Protein biosynthesis inhibition and cell binding. *Mol. Cell. Biochem.* **122**: 39–47.
- Utsugi, T., Schroit, A.J., Connor, J., Bucana, C., and 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.
- Wirth, J., Martínez del Pozo, A., Mancheño, J.M., Martínez-Ruiz, A., Lacadena, J., Oñaderra, M., and Gavilanes, J.G. 1997. Sequence determination and molecular characterization of gigantin, a cytotoxic protein produced by the mould *Aspergillus giganteus* IFO 5818. *Arch. Biochem. Biophys.* **343**: 188–193.
- Wool, I.G., Glück, A., and Endo, Y. 1992. Ribotoxin recognition of ribosomal RNA and a proposal for the mechanism of translocation. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 266–269.
- Yang, X.J. and 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.
- Yasukawa, T., Kanei-Ishii, C., Mackaura, T., Fujimoto, J., Yamamoto, T., and Ishii, S. 1995. Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **270**: 25328–25331.





## Deletion of the NH<sub>2</sub>-terminal $\beta$ -Hairpin of the Ribotoxin $\alpha$ -Sarcin Produces a Nontoxic but Active Ribonuclease\*

Received for publication, January 29, 2002, and in revised form, March 13, 2002  
Published, JBC Papers in Press, March 15, 2002, DOI 10.1074/jbc.M200922200

Lucía García-Ortega<sup>‡§</sup>, Manuel Masip<sup>‡§</sup>, José M. Mancheño<sup>‡</sup>, Mercedes Oñaderra<sup>‡</sup>,  
M. Antonia Lizarbe<sup>‡</sup>, M. Flor García-Mayoral<sup>¶||</sup>, Marta Bruix<sup>¶</sup>, Álvaro Martínez del Pozo<sup>‡\*\*</sup>,  
and José G. Gavilanes<sup>‡ ††</sup>

From the <sup>‡</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense, Madrid 28040, Spain and the <sup>¶</sup>Instituto de Química Física "Rocasolano," Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid 28006, Spain

Ribotoxins are a family of highly specific fungal ribonucleases that inactivate the ribosomes by hydrolysis of a single phosphodiester bond of the 28 S rRNA.  $\alpha$ -Sarcin, the best characterized member of this family, is a potent cytotoxin that promotes apoptosis of human tumor cells after internalization via endocytosis. This latter ability is related to its interaction with phospholipid bilayers. These proteins share a common structural core with nontoxic ribonucleases of the RNase T1 family. However, significant structural differences between these two groups of proteins are related to the presence of a long amino-terminal  $\beta$ -hairpin in ribotoxins and to the different length of their unstructured loops. The amino-terminal deletion mutant  $\Delta(7-22)$  of  $\alpha$ -sarcin has been produced in *Escherichia coli* and purified to homogeneity. It retains the same conformation as the wild-type protein as ascertained by complete spectroscopic characterization based on circular dichroism, fluorescence, and NMR techniques. This mutant exhibits ribonuclease activity against naked rRNA and synthetic substrates but lacks the specific ability of the wild-type protein to degrade rRNA in intact ribosomes. The results indicate that  $\alpha$ -sarcin interacts with the ribosome at two regions, *i.e.* the well known sarcin-ricin loop of the rRNA and a different region recognized by the  $\beta$ -hairpin of the protein. In addition, this latter protein portion is involved in interaction with cell membranes. The mutant displays decreased interaction with lipid vesicles and shows behavior compatible with the absence of one vesicle-interacting region. In agreement with this conclusion, the deletion mutant exhibits a very low cytotoxicity on human rhabdomyosarcoma cells.

Fungal extracellular ribonucleases are a diverse group of proteins, with RNase T1 being its best known representative

\* This work was supported by Grant BMC2000-0551 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología and Grants PB98-0083 and PB98-0677 from the Ministerio de Educación y Cultura. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Recipients of a fellowship from the Ministerio de Educación y Cultura.

|| Recipient of a fellowship from the Comunidad Autónoma de Madrid.

\*\* To whom correspondence may be addressed: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Química, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain. Tel.: 34-913-944-158; Fax: 34-913-944-159; E-mail: alvaro@bbm1.ucm.es.

†† To whom correspondence may be addressed: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Química, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain. Tel.: 34-913-944-158; Fax: 34-913-944-159; E-mail: ppgf@bbm1.ucm.es.

(1). They show different substrate specificity, but most of them degrade RNA in a nonspecific manner. However, among this group of RNases, there is a family displaying an exquisite specificity because they are capable of cleaving a single phosphodiester bond of those present in the ribosome. These enzymes are named ribotoxins (2), and their target bond is located in the larger rRNA at a sequence known as the sarcin-ricin loop conserved in all prokaryota and eukaryota (3, 4). This cleavage releases a characteristic oligonucleotide, the  $\alpha$ -fragment (the oligonucleotide released from the 3' end of the 28 S rRNA in the large ribosomal subunit by the action of  $\alpha$ -sarcin). As a result ribosomes are inactivated, and protein biosynthesis is inhibited (5, 6), placing ribotoxins among the most potent inhibitors of translation (2, 7). In addition, ribotoxins are cytotoxic proteins because they are able to gain entry into some cells (8, 9). The best characterized member of this family of highly specific RNases is  $\alpha$ -sarcin, which is a single polypeptide chain protein composed of 150 amino acid residues and secreted by the mold *Aspergillus giganteus* (10, 11). This ribotoxin has been shown to be cytotoxic for many human tumor cells (8–10) by producing the  $\alpha$ -fragment, which leads to cell death via apoptosis (9). Endocytosis is the mechanism responsible for the cell internalization of  $\alpha$ -sarcin (9), which is probably related to its ability to interact with phospholipid bilayers (12–16). The three-dimensional structures of  $\alpha$ -sarcin (17) and restrictocin (18), another member of the ribotoxin family, have been solved. This information has revealed that ribotoxins share a common structural core with the family of fungal extracellular nontoxic RNases, represented by RNase T1 (1), composed of a central antiparallel  $\beta$ -sheet packed against a small  $\alpha$ -helix and a conserved active site located on the other side (see Fig. 1).

Although proteins from the RNase T1 family display a low degree of sequence similarity with ribotoxins, RNase U2 is the member more closely related to  $\alpha$ -sarcin (11, 19). This RNase is a nontoxic protein secreted by the smut fungus *Ustilago sphaerogena* and composed of a single polypeptide chain of 104 amino acid residues (20). Whereas  $\alpha$ -sarcin, a basic protein (pI > 8) (11), hydrolyzes a single bond in ribosomal RNA and interacts with membranes, RNase U2, a highly acidic protein (pI = ~3) (21, 22), causes extensive degradation of the RNA but does not interact with lipid bilayers and is not cytotoxic (23). Nevertheless, both share a common three-dimensional structure pattern (17, 24) (see Fig. 1). *In vitro* assays have revealed that nanomolar concentrations of  $\alpha$ -sarcin result in the specific hydrolysis of the large rRNA or a synthetic oligoribonucleotide mimicking the SRL (25), but micromolar concentrations result in a less specific cleavage of the substrates (25), showing only a preference for the 3'-side of purines.  $\alpha$ -Sarcin can also cleave A/GpA dinucleotides, although with low specific activity (26–

28). RNase U2 displays a low specificity beyond a strong preference for 3'-linked purine nucleotide phosphodiester bonds ( $A > G \gg C > U$ ) (29, 30). Both proteins,  $\alpha$ -sarcin and RNase U2, are cyclizing RNases because they produce a 2',3'-cyclic intermediate as a result of the cleavage reaction (26, 30). However, the catalytic efficiency of RNase U2 against naked RNA, homopolynucleotides, or dinucleotides is several orders of magnitude higher (26, 30, 31). Thus,  $\alpha$ -sarcin specifically cleaves a phosphodiester bond in ribosomes, whereas RNase U2 causes extensive digestion of the RNA and is a more efficient ribonucleolytic enzyme.

It is therefore of interest to find out which portions of  $\alpha$ -sarcin, absent in related fungal RNases, account for its ribonuclease specificity and cytotoxicity. Comparison of the three-dimensional structures of RNase U2 and  $\alpha$ -sarcin (17, 24) reveals that the greatest differences are present in both the unstructured loops and the amino-terminal region (see Fig. 1). In  $\alpha$ -sarcin there is a NH<sub>2</sub>-terminal  $\beta$ -hairpin (residues 1–26) that forms a solvent exposed protuberance and shows a complex topology that can be considered as two consecutive minor  $\beta$ -sheets connected by a hinge region (17) (see Fig. 1). The second minor  $\beta$ -sheet of this amino-terminal hairpin is composed of two short strands (Asp<sup>9</sup>-Asn<sup>12</sup> and Lys<sup>17</sup>-Thr<sup>20</sup>) connected by a type I  $\beta$ -turn (Pro<sup>13</sup>-Asn<sup>16</sup>). This structural component is absent in RNase U2 (see Fig. 1), although residues 7–14 constitute a shorter  $\beta$ -hairpin structure. The K11L mutant of  $\alpha$ -sarcin shows both decreased ability to interact with lipid bilayers and reduced cytotoxicity (32). This led to the proposal that the absence of the second minor  $\beta$ -sheet at the NH<sub>2</sub>-terminal of RNases U2 or T1 could explain why they are not cytotoxic (32). We have prepared, isolated, and characterized  $\alpha$ -sarcin  $\Delta$ (7–22), a deletion mutant in which residues 7–22 were replaced by two Gly residues. Thus, the hinge region, the second minor  $\beta$ -sheet, and the turn in the amino-terminal hairpin of  $\alpha$ -sarcin were replaced by the Gly-Gly turn connecting the first minor  $\beta$ -sheet present in RNase U2 (see Fig. 1).

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**DNA Manipulations**—All of the materials and reagents were molecular biology grade. Cloning procedures and bacteria manipulations were carried out according to standard methods (33), as described previously (27, 34). Site-directed mutagenesis was used to obtain the deletion mutant as previously described (27, 34–36). The mutagenic primer used was: 5'-GTGACCTGGACCTGCGGGCCCTCCTCTACA-ACCAG-3'. The two codons that substitute the  $\alpha$ -sarcin sequence stretch from Leu<sup>7</sup> to Arg<sup>22</sup> by Gly-Gly are underlined (Fig. 1). The *Escherichia coli* strains used were BW313 (*Hfr*KL16 *pol*45 (*Lys*A (61–62) *dut*1 *ung*1 *thi*1 *rel*A1) to obtain the uridine-rich single-stranded DNA, DH5 $\alpha$ F' ((F') *end*A1 *hsd*R17 (*r*<sub>K</sub> *m*<sup>-</sup> *r*<sub>K</sub>) *sup*E44 *thi*-1 *rec*A1 *gyr*A (Nal<sup>R</sup>) *rel*A1  $\Delta$ (*lac*ZYA-*arg*F) U169 *deo*R (#80 *dlac*  $\Delta$ (*lac*Z) M15)) for the expression constructs, and BL21(DE3)(F' *omp*T (*lon*) *hsd*<sub>B</sub> (*r*<sub>B</sub> *m*<sup>-</sup> *r*<sub>B</sub>)) for protein production. The thioredoxin producing plasmid (pT-Trx) (37) was a generous gift of Dr. S. Ishii (Riken Tsukuba Life Science Center).

**Protein Production and Purification**—BL21(DE3) cotransformed with pT-Trx and the corresponding  $\alpha$ -sarcin mutant plasmid were used to produce and purify the mutant as described for the wild-type protein (34, 38). Fungal wild-type  $\alpha$ -sarcin was produced and purified according to methods previously reported (10, 34). Recombinant RNase U2 was purified from the extracellular medium of *Pichia pastoris* cultures as described (31). This protein retains the enzymatic and spectroscopic properties of the fungal natural RNase U2 (31). Polyacrylamide gel electrophoresis of proteins, protein hydrolysis, and amino acid analysis were also performed according to standard procedures (34).

**Spectroscopic Characterization**—Absorbance measurements were carried out at room temperature in 1-cm optical path cells on a UVikon 930 spectrophotometer (Kontron Instruments, Milan, Italy) at 100 nm/min scanning speed. Extinction coefficients  $E$ (0.1%, 1 cm, 280 nm) were calculated from the absorbance spectra of the proteins and amino acid analyses to determine concentration. Circular dichroism spectra were obtained on a Jasco 715 spectropolarimeter (Easton, MD) at 0.2 nm/s scanning speed; 0.1- and 1.0-cm optical path cells were used in the far and near UV, respectively. Mean residue weight ellipticities were ex-

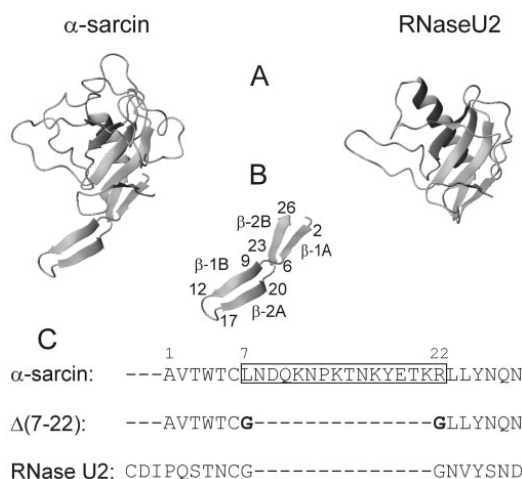


FIG. 1. Structures of  $\alpha$ -sarcin and RNase U2. **A**, diagrams corresponding to the three-dimensional structures of  $\alpha$ -sarcin and RNase U2 constructed from the atomic coordinates deposited in the Protein Data Bank (codes 1DE3 and 1RTU, respectively). Both structures have been fitted to the coordinates of the peptide bond atoms of residues His<sup>50</sup>, Glu<sup>96</sup>, Arg<sup>121</sup>, and His<sup>137</sup> of  $\alpha$ -sarcin and His<sup>41</sup>, Glu<sup>62</sup>, Arg<sup>85</sup>, and His<sup>101</sup> of RNase U2, those involved in catalysis. **B**, diagram showing the NH<sub>2</sub>-terminal region of  $\alpha$ -sarcin including the deleted amino-terminal  $\beta$ -hairpin (residues 7–22). The numbers refer to the sequence position of the residues defining each  $\beta$  strand element. Images were generated by the MOLMOL program (65). **C**, NH<sub>2</sub>-terminal sequences of  $\alpha$ -sarcin, RNase U2, and the mutant  $\Delta$ (7–22) are shown. The residues substituted by two glycines (which are in bold) in the mutant variant are in boxes.

pressed in units of degrees  $\times$  cm<sup>2</sup>  $\times$  dmol<sup>-1</sup>. Thermal denaturation profiles were obtained by measuring the temperature dependence of the ellipticity at 220 nm in the range of 25–85 °C; the temperature was continuously changed at a rate of 0.5 °C/min.  $T_m$  values (temperature at the midpoint of the thermal transition) were calculated assuming a two-state unfolding mechanism. Fluorescence emission spectra were obtained on a SLM Aminco 8000 spectrofluorimeter (Urbana, IL) at 25 °C in 0.2-cm path cells. All of these determinations were made as described previously (27).

**NMR Experiments**—Mutant  $\Delta$ (7–22) was dissolved at 1.5 mM concentration in 0.5 ml of H<sub>2</sub>O-D<sub>2</sub>O (9:1 v/v) at pH 6.0. The data were collected at 35 °C, using sodium 3-trimethylsilyl(2,2,3,3,4-<sup>2</sup>H<sub>5</sub>) propionate as internal reference. NMR experiments were performed on a Bruker Avance 800 MHz spectrometer (Karlsruhe, Germany) equipped with a triple resonance probe and three axis pulsed field gradients. <sup>1</sup>H homonuclear total correlation spectra (39) with a mixing time of 60 ms and nuclear Overhauser effect spectra (40) with a mixing time of 50 ms were recorded by standard methods with water suppression achieved by including the WATERGATE module (41) in the original pulse sequences. The size of the acquisition data matrix was 2048  $\times$  512 words in  $f_2$  and  $f_1$ , respectively. Before Fourier transformation, the two-dimensional data matrix was multiplied by a phase-shifted sine bell or square sine bell window function in both dimensions. The corresponding shift was optimized in every experiment. Base-line correction was applied in both dimensions. All of the spectra were processed and analyzed using the Bruker software package XWINNMR and ANSIG (42) on an IRIS Indigo work station (Silicon Graphics, Mountain View, CA). <sup>1</sup>H NMR resonances were assigned using standard sequential assignment procedures (43). Spin systems were identified by analysis and comparison of the total correlation spectroscopy spectra with those of the wild-type protein (44). The through-space connectivities were then determined using the nuclear Overhauser effect spectra.

**Ribonucleolytic Activity**—The specific ribonucleolytic activity of  $\alpha$ -sarcin was followed by detecting the release of the 400-nucleotide  $\alpha$ -fragment (5, 6) from a cell-free reticulocyte lysate (Promega, Madison, WI) (34, 35), which was visualized by ethidium bromide staining after electrophoresis on 2.4% (w/v) agarose. The activity of  $\alpha$ -sarcin was also analyzed on naked rRNA extracted from *E. coli* with acid phenol-guanidinium thiocyanate-chloroform (33). The culture was homoge-

nized by sonication in a water bath after addition of the above denaturant solution. The integrity of the purified RNA was verified by electrophoresis, which confirmed the predominance of the 23 and 16 S rRNA species. The activity assay was performed with this RNA preparation under conditions identical to those described for the reticulocyte lysate. The reaction was stopped by addition of SDS to a final concentration of 1% (w/v), and the products were analyzed by electrophoresis on agarose gels. The specific cleavage of a synthetic 35-mer RNA by  $\alpha$ -sarcin was also studied. The synthesis of this synthetic 35-mer RNA was carried out as described (7) by using synthetic and urea-PAGE purified DNA templates: (T7-promoter) 5'-TTCTAATACGACTCACTA-TAG-3' and (template) 3'-AAGATTATGCTGAGTGATATCCCTTAGG-ACGAGTCATGCTCTCCTTGCGCTCCAA-5' and the AmpliScribe T7 transcription kit (Epicentre Technologies; Madison, WI). The resulting product was purified by electrophoresis on 8% (w/v) polyacrylamide gel containing 7 M urea in 45 mM Tris-borate buffer, pH 8.3, containing 1 mM EDTA (33). The assay was performed with 2  $\mu$ M synthetic 35-mer RNA and a protein concentration (wild-type  $\alpha$ -sarcin or deletion mutant) in the 6 nM to 6  $\mu$ M range, after incubation for 20 min at 37 °C in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 (7). The reaction products were detected by ethidium bromide staining after electrophoretic separation on a denaturing 19% (w/v) polyacrylamide gel. The specific action of  $\alpha$ -sarcin produces both 21- and 14-mer fragments.

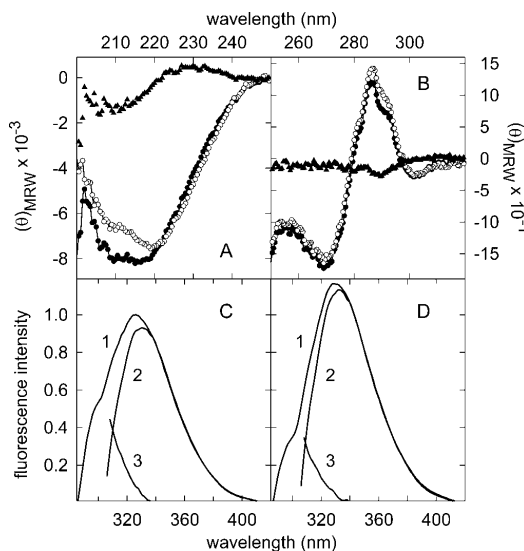
The activity of the purified proteins against poly(A) was assayed in 15% (w/v) polyacrylamide gels containing 0.1% (w/v) SDS and 0.3 mg/ml of the homopolynucleotide. This zymogram method (34, 35, 45) was based on one previously described (46). After electrophoresis, the gel was incubated at 37 °C for 3 h and then stained with 0.2% (w/v) toluidine blue. The proteins exhibiting ribonuclease activity appear as colorless bands, because of degradation of the polynucleotide, after appropriate destaining. This assay, which was performed at two different pH values (4.5 and 7.0), is useful to detect the presence of other RNA degrading activities in the protein samples. Volumograms of these bands (based on integrating all of the pixel intensities composing the spot) were obtained with the photo documentation system UVI-Tec (Cambridge, UK) and the software facility UVIsoft UVI band Windows Application V97.04. These data were used to quantify the activity.

The activity of the proteins against dinucleotides (ApA and ApG) was measured at pH 5.0 as described elsewhere (26) by analysis of the reaction products (ApA/G, adenosine or guanosine, 3'-AMP, and 2',3'-cAMP) resolved by HPLC (26).<sup>1</sup> RNase U2 was assayed at lower protein/substrate ratio and shorter incubation time than  $\alpha$ -sarcin because of its considerably higher enzyme activity. All of the assays were performed with controls to test potential nonspecific degradation of the substrates, which does not occur under the conditions used.

**Protein-Lipid Interaction**—All of the phospholipids used were purchased from Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL). The vesicles were formed by hydrating a dry lipid film with Tris buffer (15 mM Tris, pH 7.0, containing 0.1 M NaCl and 1 mM EDTA) for 60 min at 37 °C. The lipid suspension was subjected to five cycles of extrusion through two stacked 0.1- $\mu$ m (pore diameter) polycarbonate membranes (14). The average diameter of the vesicle population was 100 nm (85% of the vesicles in the range 75–125 nm), as determined by electron microscopy studies (14). Phospholipid concentration was determined as described (47).

Aggregation of phospholipid vesicles, monitored as described before (12), was measured by the increase in absorbance at 360 nm of a suspension of phosphatidylglycerol vesicles in Tris buffer (final lipid concentration, 30  $\mu$ M) after addition of a small aliquot of a freshly prepared protein solution. Intermixing of membrane lipids was analyzed by fluorescence energy transfer assays as described (13, 14). A decrease in the donor-to-acceptor fluorescence energy transfer indicates lipid mixing between membranes. Leakage of vesicle aqueous contents was measured by using the 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid/*N,N*-*p*-xylene-bispyridinium bromide assay as previously described (48). Other experimental details were as reported previously (12–16, 48, 49).

**Cytotoxicity Assay**—This assay was performed essentially as described (8, 9) by using human rhabdomyosarcoma cells. Protein synthesis was analyzed by measuring the incorporation of L-[4,5-<sup>3</sup>H]leucine (166 Ci/mmol). The radioactivity was measured on a Beckman LS 3801 liquid scintillation counter (Palo Alto, CA). The results are expressed as percentages of radioactivity incorporation in control samples. A plot of these percentage values *versus* toxic protein concentration in the cyto-



**FIG. 2. Spectroscopic characterization of the  $\Delta(7-22)$  mutant of  $\alpha$ -sarcin.** A and B, circular dichroism spectra in the far UV and near UV regions, respectively, of WT  $\alpha$ -sarcin (solid circles) and  $\Delta(7-22)$  mutant (empty circles). Calculated difference spectra wild type -  $\Delta(7-22)$  mutant (triangles). Mean residue weight ellipticity,  $\langle \theta \rangle_{MRW}$ , is expressed in units of degrees  $\times$  cm<sup>2</sup>  $\times$  dmol<sup>-1</sup>. C and D, fluorescence emission spectra of wild-type  $\alpha$ -sarcin and the  $\Delta(7-22)$  mutant, respectively, at identical protein concentrations. *Spectra 1* were obtained for excitation at 275 nm. *Spectra 2* (tryptophan contribution) were obtained for excitation at 295 nm and normalized at wavelengths above 380 nm. *Spectra 3* (tyrosine contribution) were calculated as the difference spectra (*spectrum 1* - *spectrum 2*). Fluorescence emission is expressed in arbitrary units considering the intensity at the wavelength of the emission maximum of the wild-type protein, for excitation at 275 nm, as 1. All of the spectra were recorded at 25 °C and pH 7.0.

toxicity assay allows the calculation of the IC<sub>50</sub> values (protein concentration required for 50% protein synthesis inhibition). The reported values correspond to the averages of triplicate experiments.

## RESULTS

**Spectroscopic and Structural Characterization**—The deletion mutant  $\Delta(7-22)$  of  $\alpha$ -sarcin was purified to homogeneity as determined by its behavior on SDS-PAGE. A single immunoreactive band was found also after staining with anti- $\alpha$ -sarcin polyclonal antibodies in a Western-blot analysis. The amino acid composition of the purified protein was in agreement with the mutation performed. The purified recombinant mutant protein was obtained in good yield (~13 mg of protein/liter of induced bacterial culture), which is more than twice that described for wild-type  $\alpha$ -sarcin in the same expression system (38). The experimentally determined *E*(0.1%, 280 nm, 1 cm) value for the mutant was 1.38, which is within 5% of the value predicted from its amino acid composition.

The circular dichroism spectra of the mutant showed slight differences in comparison with that of WT  $\alpha$ -sarcin (Fig. 2). Convex constraint analysis (50) of the calculated far UV CD difference spectrum (wild type *minus* mutant; Fig. 2A) revealed the contribution of six residues in  $\beta$ -structure, four residues in turns, and four residues in unordered conformation, which is in fair agreement with the performed deletion of the  $\beta$ -hairpin. From the near UV spectra, it can be concluded that the tertiary structure of  $\alpha$ -sarcin is essentially retained in the  $\Delta(7-22)$  mutant. The slight differences observed in this spectral region (Fig. 2B) can be related to tryptophan-4. In fact, the near UV

<sup>1</sup> The abbreviations used are: HPLC, high performance liquid chromatography; SRL, sarcin-ricin loop; WT, wild-type.

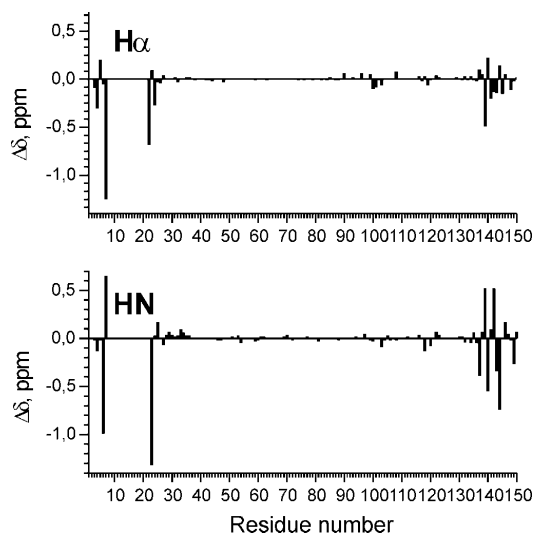


FIG. 3. Comparison of the <sup>1</sup>H NMR chemical shifts of WT  $\alpha$ -sarcin and the  $\Delta(7-22)$  mutant. Chemical shift variations ( $\Delta\delta = \delta_{\text{mut}} - \delta_{\text{wt}}$ ) in the protein backbone resonances for H $\alpha$  (top panel) and amide protons (bottom panel), pH 6.0, temperature = 35 °C. The residue numbers correspond to those of the WT protein.

CD spectrum of  $\alpha$ -sarcin is dominated by the contribution of Trp<sup>51</sup> (a positive CD maximum of about 100 degrees  $\times$  cm<sup>2</sup>  $\times$  dmol<sup>-1</sup> at 293 nm), whereas the contribution of Trp<sup>4</sup> is about 15 degrees  $\times$  cm<sup>2</sup>  $\times$  dmol<sup>-1</sup> of residue in the range 285–293 nm (51). The calculated difference spectrum (wild type *minus* mutant; Fig. 2B) was in the ellipticity range of this latter contribution and showed the same spectral features.

The fluorescence emission of the  $\Delta(7-22)$  mutant displayed characteristics similar to those of the WT protein (Fig. 2, C and D). Nevertheless, the tryptophan emission is 1.2-fold increased in the deletion mutant, whereas the tyrosine contribution is 0.2-fold decreased in comparison with the corresponding quantum yields of the WT protein. The variation in the tyrosine contribution is readily explained by the removal of Tyr<sup>18</sup> in the deletion mutant. The fluorescence emission of  $\alpha$ -sarcin is dominated by the contribution of Trp<sup>4</sup>, because the other tryptophan residue of the molecule, Trp<sup>51</sup>, is strongly quenched in the WT protein (51). Thus, the increased Trp quantum yield in the  $\Delta(7-22)$  mutant could be attributed to local changes in the Trp<sup>4</sup> microenvironment upon deletion, which would be in agreement with the variation observed in the near UV CD spectrum.

Standard two-dimensional NMR methodology was used to assign the proton spectra. The process was greatly facilitated by comparison with the previous assignment of native  $\alpha$ -sarcin (44). At least one sequential nuclear Overhauser effect could be unambiguously assigned for all residues, including those corresponding to the mutated region Cys<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Gly<sup>22</sup>-Leu<sup>23</sup> (wild-type numbering). With the exception of rapidly exchanging protons, <sup>1</sup>H assignments were almost complete. A comparison of the backbone amide protons and H $\alpha$  chemical shifts of WT  $\alpha$ -sarcin and  $\Delta(7-22)$  mutant is shown in Fig. 3. Most of the chemical shift variations were located in very restricted regions of the protein sequence, all spatially close to the deleted region. For the H $\alpha$ , a large majority of chemical shifts of  $\Delta(7-22)$  mutant were within 0.05 ppm of their values in WT  $\alpha$ -sarcin. The largest variations were located at the NH<sub>2</sub>-terminal hairpin (Trp<sup>4</sup>, Thr<sup>5</sup>, Gly<sup>7</sup>, Gly<sup>22</sup>, and Leu<sup>24</sup>) and at loop 5 (residues Lys<sup>139</sup>-Leu<sup>145</sup>). The amide proton chemical shift differences

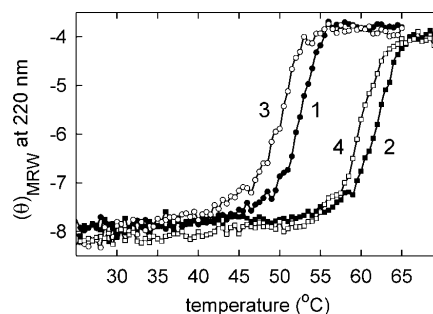
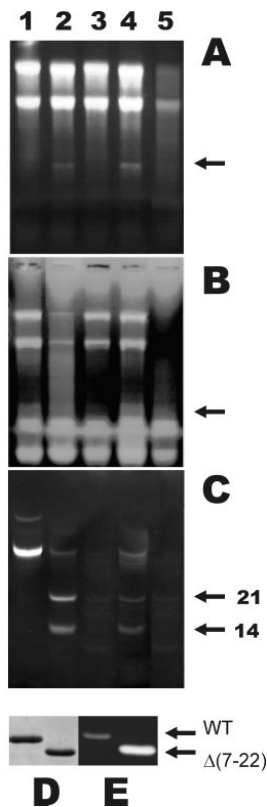


FIG. 4. Thermal denaturation profiles of WT  $\alpha$ -sarcin and the  $\Delta(7-22)$  mutant. Filled symbols ((1) and (2)), WT  $\alpha$ -sarcin; open symbols ((3) and (4)),  $\Delta(7-22)$  mutant. Circles, pH 7.0; squares, pH 5.0. The measurements were performed by continuously recording the mean residue weight ellipticity at 220 nm ( $\theta_{\text{MRW}}$ ) expressed in units of  $10^{-3} \times$  degrees  $\times$  cm<sup>2</sup>  $\times$  dmol<sup>-1</sup>.

were also within 0.05 ppm for the large majority of the residues. Significant differences were observed for the amide protons of Trp<sup>4</sup>, Cys<sup>6</sup>, Gly<sup>7</sup>, Leu<sup>23</sup>, His<sup>137</sup>, Glu<sup>140</sup>, Gln<sup>142</sup>, Gly<sup>143</sup>, Glu<sup>144</sup>, and Ser<sup>149</sup>. All of these differences refer to residues surrounding the deleted portion. The observed shifts may have their origin either in conformational rearrangements of the protein groups or in field effects arising from the different distribution of anisotropic groups in the  $\Delta(7-22)$  protein. In contrast, most of the protein proton resonances were virtually unaffected upon mutation. This finding strongly indicated that the substitution of the native sequence Leu<sup>7</sup>-Arg<sup>22</sup> by Gly-Gly did not induce global conformational changes in  $\alpha$ -sarcin.

The mutant variant showed a slightly decreased conformational stability in comparison with the WT protein (Fig. 4). The  $T_m$  value was decreased by 2 °C (from 62 to 60 °C at pH 5.0 and from 52 to 50 °C at pH 7.0), which corresponded to a decreased stability of only about 4 kJ/mol (estimated from the corresponding  $\Delta\Delta G$  values) (52). This very low  $\Delta\Delta G$  value also indicates that the mutant protein displays an overall conformation similar to that of the WT protein.

**Ribonucleolytic Activity**—The  $\Delta(7-22)$  mutant variant of  $\alpha$ -sarcin did not show the high ribonuclease activity of the WT protein on ribosomes (Fig. 5A). The  $\alpha$ -fragment characteristic of the  $\alpha$ -sarcin activity was not detected when the mutant was assayed, although a nonspecific degradation of rRNA was observed when large amounts of the mutant variant (200 ng) were tested. However, both proteins hydrolyzed naked bacterial rRNA specifically to produce the  $\alpha$ -fragment, and nonspecific degradation of this substrate occurred when large amounts of both proteins were tested, with the  $\Delta(7-22)$  mutant exhibiting higher activity than the WT protein (Fig. 5B). The deletion mutant, as well as WT  $\alpha$ -sarcin, also degraded a synthetic 35-mer oligoribonucleotide that mimics the sarcin-ricin loop of 28 S rRNA producing the 21- and 14-mer fragments (Fig. 5C). This information has been used to study substrate specificity of ribotoxins (7). The  $\Delta(7-22)$  mutant also degraded the polymeric nonspecific substrate poly(A). Its activity on this substrate was higher than that of the WT protein (8- and 6-fold higher at pH values of 4.5 and 7.0, respectively; Fig. 5, C and D). Dinucleotides are also low specificity substrates of  $\alpha$ -sarcin (26, 32) with an optimum pH of 5.0 (27, 28). Therefore, the activity against the dinucleotide ApA was also assayed. WT  $\alpha$ -sarcin and the  $\Delta(7-22)$  mutant variant displayed very similar catalytic efficiencies (expressed as the  $k_{\text{cat}}/K_m$  ratio), although the  $k_{\text{cat}}$  and  $K_m$  values were 1 order of magnitude higher for the mutant (Table I). However, a dramatic difference was observed when the nature of the products was analyzed. As shown in Fig.



**FIG. 5. Ribonuclease activity assays of WT  $\alpha$ -sarcin and its  $\Delta(7-22)$  mutant.** A, ribosome inactivating activity assay of WT  $\alpha$ -sarcin and the  $\Delta(7-22)$  mutant. The high specific activity of  $\alpha$ -sarcin is shown by the release of the 400-nucleotide  $\alpha$ -fragment (arrow) from the 28 S rRNA of eukaryotic ribosomes. Cell-free reticulocyte lysates (lane 1) were incubated in the presence of 50 ng (lane 2), and 100 ng (lane 4) of WT protein, as well as 50 ng and 100 ng of  $\Delta(7-22)$  (lanes 3 and 5, respectively). The reaction mixture was analyzed by agarose gels and stained with ethidium bromide. B, *E. coli* ribosomal RNA (lane 3) was incubated in the presence of 110 ng (lane 1) and 250 ng (lane 2) of WT protein, as well as 1 ng and 110 ng of  $\Delta(7-22)$  (lanes 4 and 5, respectively). The reaction mixture was analyzed by agarose gels and stained with ethidium bromide. C, 35-mer oligoribonucleotide (lane 1) was incubated in the presence of 65 ng (lane 2) and 650 ng (lane 3) of WT  $\alpha$ -sarcin and 55 ng (lane 4) and 550 ng (lane 5) of  $\Delta(7-22)$ . The reaction mixture was analyzed by polyacrylamide gels and stained with ethidium bromide. D and E, Coomassie Blue-stained SDS-PAGE (D) and zymogram assay (E) of the ribonucleolytic activity against poly(A), at pH 4.5, of 500 ng of either wild-type  $\alpha$ -sarcin or  $\Delta(7-22)$  mutant. When the zymogram was performed at pH 7.0, qualitatively identical results were obtained.

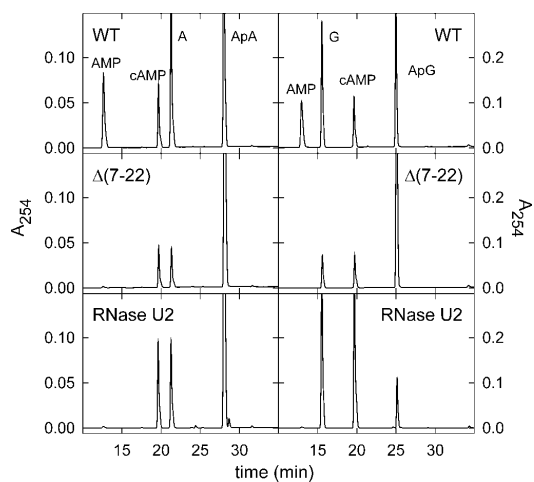
6,  $\alpha$ -sarcin behaved as the typical cyclizing RNase (26), *i.e.* it first catalyzes the transphosphorylation of ApA, producing adenosine and 2',3'-cAMP, and then it cleaves the cyclic intermediate to 3'-AMP (Fig. 6). Under identical conditions, only the first reaction was performed by the mutant (Fig. 6). Neither was the 3'-AMP product produced when recombinant native (31) RNase U2 was employed (Fig. 6), although in this case a much shorter incubation and a much lower enzyme concentration were used. The specificity of native RNase U2 against dinucleotides showed that ApA is one of the poorest dinucleotides substrates for this enzyme (30). To rule out the possibility that the absence of the 3'-nucleotide product was due to an inefficient reaction, the same experiment was performed using

**TABLE I**  
Activity against ApA at pH 5.0 of WT  $\alpha$ -sarcin and its  $\Delta(7-22)$  mutant

Protein	$K_m$	$k_{cat}$	$k_{cat}/K_m$
	$\mu M$	$s^{-1}$	$M^{-1} s^{-1}$
Wild type <sup>a</sup>	$40 \pm 4$	$(2.7 \pm 1.0) \times 10^{-4}$	$6.7 \pm 0.7$
$\Delta(7-22)$	$500 \pm 35$	$(11.5 \pm 0.2) \times 10^{-4}$	$2.3 \pm 0.1$
RNase U2 <sup>b</sup>	$200 \pm 27$	$(5.8 \pm 0.1) \times 10^{-1}$	$(2.9 \pm 0.4) \times 10^4$

<sup>a</sup> Kinetic parameters ( $\pm$  S.D.) determined from the transesterification of ApA by linear regression analysis of double reciprocal plots from three different determinations (26, 27).

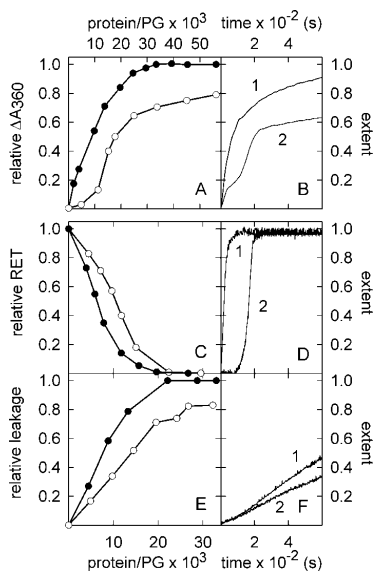
<sup>b</sup> Recombinant RNase U2 (31).



**FIG. 6. Ribonuclease activity assay of WT  $\alpha$ -sarcin and its  $\Delta(7-22)$  mutant on dinucleotides.** HPLC separation profiles, obtained by recording absorbance at 254 nm ( $A_{254}$ ), of the reaction products resulting from the cleavage of ApA (three left panels) and ApG (three right panels) after incubation with WT  $\alpha$ -sarcin, the  $\Delta(7-22)$  mutant, and RNase U2 at pH 5.0. The substrate concentrations were 40 and 50  $\mu M$  for ApA and ApG, respectively. An enzyme concentration of 2  $\mu M$  and an incubation time of 14.5 h at room temperature were employed for the wild-type protein and the  $\Delta(7-22)$  mutant. The reaction for RNase U2, a much less specific enzyme, was incubated for only 5 min, and the enzyme concentration was 145 nM.

saturating concentrations (50  $\mu M$ ) of ApG, the best dinucleotide substrate for RNase U2 (30); qualitatively identical results were obtained for the three proteins studied (Fig. 6). Thus, cleavage of ApG by WT  $\alpha$ -sarcin produced guanosine, 2',3'-cAMP, and 3'-AMP, whereas the latter 3'-nucleotide product did not appear when this dinucleotide was assayed against the  $\Delta(7-22)$  mutant variant of  $\alpha$ -sarcin or recombinant RNase U2 (Fig. 6).

**Interaction with Phospholipid Vesicles**—It is well documented that  $\alpha$ -sarcin interacts with lipid vesicles through electrostatic and hydrophobic interactions (12–16). In particular, this ribotoxin promotes aggregation of vesicles, intermixing of phospholipids from different vesicles (lipid mixing), and leakage of their aqueous contents. These effects were also promoted by the  $\Delta(7-22)$  mutant. However, there were clear differences between both proteins in terms of the kinetics and completion of these processes (Fig. 7 and Table II). Thus, the extent of vesicle aggregation was lower in the case of the mutant variant, and the kinetic traces displayed a biphasic behavior (Fig. 7, A and B). Also, the observed initial rates of the aggregation were lower for the mutant than for WT  $\alpha$ -sarcin (Table II). The initial rates of the lipid mixing induced by the mutant variant were lower than those of the WT protein (Fig. 7C and Table II), and the kinetics of the process promoted by the mutant variant



**FIG. 7. Effect of WT  $\alpha$ -sarcin and its  $\Delta(7-22)$  mutant on phosphatidylglycerol (PG) vesicles.** A, aggregation of vesicles measured from the increase of absorbance at 360 nm induced by the protein on a vesicle sample (*relative*  $\Delta A_{360}$ , referred to that of WT  $\alpha$ -sarcin considered as unit) versus protein/lipid molar ratio. B, kinetic traces corresponding to samples at 0.052 protein/phosphatidylglycerol molar ratio, as an example. C, mixing of phospholipids from different bilayers measured as the decrease of resonance energy transfer (*relative* RET, referred to that of WT  $\alpha$ -sarcin considered as unit) versus protein/lipid molar ratio. D, kinetic traces corresponding to samples at 0.030 protein/PG molar ratios as an example. E, leakage of intravesicular aqueous contents (*relative* leakage considering that produced by WT  $\alpha$ -sarcin as unit) versus protein/lipid molar ratio. F, kinetic traces corresponding to samples at 0.032 protein/phosphatidylglycerol molar ratio as example. Trace 1, WT protein; trace 2,  $\Delta(7-22)$  mutant.

displayed a lag phase (Fig. 7D). The results from the leakage measurements also revealed less leakage and a lower initial rate for the mutant (Fig. 7, E and F, and Table II).

**Cytotoxic Activity**— $\alpha$ -Sarcin has been reported to be cytotoxic for different human tumor cell lines including human rhabdomyosarcoma cells (8, 9). These cells were used to assay the cytotoxic activity of WT  $\alpha$ -sarcin and its  $\Delta(7-22)$  variant, which exhibited very different behavior (Fig. 8). The former displayed an  $IC_{50}$  value of 0.6  $\mu$ M, whereas the corresponding value for the  $\Delta(7-22)$  mutant was more than 40-fold higher.

#### DISCUSSION

Ribotoxins are an intriguing group of proteins in terms of structure-function relationships. Their three-dimensional pattern closely resembles that of nonspecific ribonucleases, suggesting that both groups of proteins may have descended from a common ancestor (2, 45). However, ribotoxins are highly specific ribonucleases in degrading rRNA, which makes them a useful tool in determining tertiary structures of rRNA and in studying RNA-protein interactions (53). This high specificity converts ribotoxins into potent inhibitors of translation, and immunoconjugates of ribotoxins with monoclonal antibodies directed against cancer cell targets are currently employed (54–56). Moreover, ribotoxins can be involved in allergic reactions. Thus, Asp f 1, the ribotoxin produced by *Aspergillus fumigatus* (the ethiological agent isolated in about 80% of the *Aspergillus* infections in humans) is associated with IgE-mediated allergic asthma and bronchopulmonary aspergillosis and

severe allergic pulmonary complications in immunocompromised patients (57). Because this is the major allergen of this microorganism (7, 58) and displays >85% sequence identity with other ribotoxins, cross-reactivity at the T and B cell level would be expected. Therefore, elucidation of structural clues responsible for the differences between nontoxic and cytotoxic RNases would be very useful for designing engineered proteins with the desired properties.

With this aim in mind, we have prepared the deletion mutant  $\Delta(7-22)$  variant of  $\alpha$ -sarcin. Its spectroscopic characterization showed that the three-dimensional structure of the variant is highly similar to that of the WT protein. The changes observed in the far UV CD spectrum can be explained by the removal of the characteristic NH<sub>2</sub>-terminal  $\beta$ -hairpin of  $\alpha$ -sarcin. The near UV CD and fluorescence emission analyses indicated minor changes in the microenvironment of Trp<sup>4</sup>, which is to be expected from the absence of the proximal hairpin in the  $\Delta(7-22)$  variant. NMR data also indicate the lack of any large conformational change in the protein caused by the mutation. As expected, the largest variations in chemical shifts, reflecting changes in the magnetic environment, are found in residues next to the deleted region. All amide protons and H $\alpha$   $\delta$  changes in residues distant in the primary structure from the mutated segment can be analyzed on the basis of the three-dimensional structure of the WT protein (17). The deletion will abolish structural interactions between the second half of the NH<sub>2</sub>-terminal hairpin and loop 5 (hydrogen bond between H $\delta$  21 of Asn<sup>8</sup> and O of His<sup>137</sup>, salt bridge between Lys<sup>11</sup> and Glu<sup>140</sup>, and  $\pi$ -cation interaction between Tyr<sup>18</sup> and Lys<sup>139</sup>) and likely account for the observed NMR changes. Moreover, the decreased stability of the mutant variant could be also related to the abolition of the above mentioned interactions involving residues of the hairpin and loop 5 (17).

The results obtained reveal that the elimination of the amino-terminal  $\beta$ -hairpin of  $\alpha$ -sarcin produces an active ribonuclease but one devoid of the ability to cleave the 28 S rRNA in the ribosomes. The  $\Delta(7-22)$  mutant does not produce the  $\alpha$ -fragment in the ribosomes, but this fragment is observed when the variant acts on naked rRNA. The  $\Delta(7-22)$  variant also shows the characteristic specific activity of the WT protein on the 35-mer SRL oligoribonucleotide. Therefore, the well characterized recognition of the SRL of the rRNA is not enough for both production of the  $\alpha$ -fragment and inactivation of the ribosomes by  $\alpha$ -sarcin. The amino-terminal  $\beta$ -hairpin is involved in an additional specific interaction with ribosomes required for the cytotoxic activity. In addition, elimination of the NH<sub>2</sub>-terminal  $\beta$ -hairpin also somehow affects the  $\alpha$ -sarcin active center, producing an enzyme that cannot cleave the cyclic intermediate. The role of 2',3'-cyclic phosphodiesterases in the RNases catalyzed cleavage of RNA has been controversial. However, now it seems clear that they are true products of the reaction and not just intermediates (59–61). Studies performed with RNase A indicated that the initial protonation state of the active site residues of this enzyme, and perhaps other RNases, is recovered by a pathway that does not involve substrate molecules (60). This is probably the case for RNase U2 too, because its molecular activity for 2',3'-cyclic AMP is 100 times slower than for the dinucleotide ApC (30, 62), *i.e.* the second step of the reaction is much slower than the first one. In fact, the 3'-monophosphate derivative was not observed in the assays performed with recombinant RNase U2 against dinucleotides (Fig. 6). Thus, in this regard, it also seems that the deletion mutant of  $\alpha$ -sarcin would behave like RNase U2. From the structural point of view, this close relationship between both proteins can be easily understood. In the environment of the catalytic center, WT  $\alpha$ -sarcin and RNase U2 differ in the orientation of loop 5 be-

TABLE II

Relative initial rate ( $r_{in}$ ) and final extent of vesicle aggregation, lipid mixing, and leakage of intravesicular aqueous contents promoted by WT  $\alpha$ -sarcin and its  $\Delta(7-22)$  mutant on vesicles composed of phosphatidylglycerol, at saturating protein/lipid molar ratios

The protein/lipid molar ratios ( $\times 10^3$ ) required for half of the maximum extent ( $C_{50}$ ) are also given. The results (average from three different determinations) are expressed as values relative to those of WT  $\alpha$ -sarcin considered as 1. S.D.  $\pm 0.07$  for  $r_{in}$ ; S.D.  $\pm 0.05$  for the extent; and S.D.  $\pm 1.5 \times 10^{-3}$  for  $C_{50}$ .

Protein	Aggregation			Lipid-mixing			Leakage		
	$r_{in}$	Extent	$C_{50}$	$r_{in}$	Extent	$C_{50}$	$r_{in}$	Extent	$C_{50}$
Wild type	1	1	8	1	1	7	1	1	8
$\Delta(7-22)$	0.5	0.8	17	0.1	1	11	0.7	0.8	15

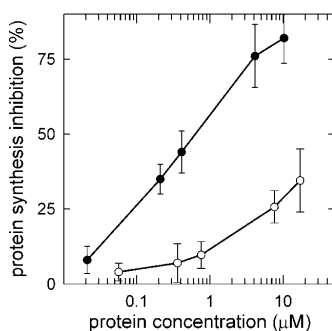


FIG. 8. Protein biosynthesis inhibition promoted by WT  $\alpha$ -sarcin and  $\Delta(7-22)$  mutant in human rhabdomyosarcoma cells. Protein biosynthesis was measured after 18 h of incubation in the presence of different concentrations of WT  $\alpha$ -sarcin (solid circles) and  $\Delta(7-22)$  mutant (empty circles). The data are expressed as percentages of control samples in the absence of toxin and are the averages  $\pm$  S.D. of three independent experiments with two different samples.

cause of the presence or absence of specific interactions with the NH<sub>2</sub>-terminal  $\beta$ -hairpin (17). Because the  $\Delta(7-22)$  mutant lacks these interactions, it is probable that the orientation of loop 5 and consequently the electrostatic properties of the catalytic His<sup>137</sup> resemble those of the nonspecific RNases (His<sup>137</sup> is one of the few residues of the mutant displaying differences in the backbone HN chemical shifts). Thus, the similarity deduced from the structure of the proteins could explain the similar substrate affinity, activity, and enzymatic mechanism of the  $\Delta(7-22)$  mutant and RNase U2. The mutant retains the ability of WT  $\alpha$ -sarcin to interact with acidic model vesicles but with a decreased efficiency. The interaction of  $\alpha$ -sarcin with bilayers is initiated by the formation of a vesicle dimer maintained by electrostatic interactions. Studies performed with single amino acid mutants at Trp<sup>51</sup> (51), Arg<sup>121</sup> (63), and Lys<sup>11</sup> (32) have suggested that loop 2 and the amino-terminal  $\beta$ -hairpin, located at two extremes of the protein molecule, are vesicle-interacting regions. Removal of one of these regions, as in the present deletion mutant, would result in biphasic kinetics because the large vesicle aggregates (those producing more light-scattering) would result from the accumulation of a protein-vesicle complex. On the other hand, WT protein with two vesicle-interacting regions could directly bridge lipid vesicles. This would also explain the lag phase observed in the lipid mixing from different membranes, a process that occurs among bilayers of aggregated vesicles (Fig. 7).

Endocytosis is the mechanism responsible for the internalization of  $\alpha$ -sarcin via acidic vesicles (9). Subsequently, it escapes from the endosomal compartment via Golgi structures and exerts its cytotoxic effect on the cytoplasm (9). Because the ability of  $\alpha$ -sarcin to interact with membranes is retained in the mutant, it seems safe to conclude that the absence of the NH<sub>2</sub>-terminal  $\beta$ -hairpin almost abolishes its cytotoxic properties by impairing its ability to specifically cleave ribosomes.

Thus, it seems clear that this structural element is involved in the interaction with the cell membranes but primarily participates in the recognition of the ribosome.

It can be concluded from our results that the ribonucleolytic machinery of  $\alpha$ -sarcin is preserved in the  $\Delta(7-22)$  mutant and even improved in terms of catalytic efficiency. However, the characteristic specificity of the cytotoxin on ribosomes was lost. This suggests some involvement of the  $\beta$ -hairpin of  $\alpha$ -sarcin in substrate recognition. In this context, the crystal structures of some restrictocin-inhibitor complexes have been recently elucidated (64) and reveal that Lys<sup>110</sup>, Lys<sup>111</sup>, and Lys<sup>113</sup> of restrictocin (Lys<sup>111</sup>, Lys<sup>112</sup>, and Lys<sup>114</sup> are their counterparts in  $\alpha$ -sarcin) contact the base of G4319, the only nucleotide known to be critical for recognition of the SRL. These residues are far apart from the  $\beta$ -hairpin (at about 30 Å), which makes the loss of specificity in the  $\Delta(7-22)$  mutant intriguing. It could be argued that potential conformational changes in the protein may occur upon binding to the substrate, bringing these three residues and the  $\beta$ -hairpin region in close proximity and explaining its involvement in specificity. However, such an induced fit after complex formation does not make important changes in the protein structure. The C $\alpha$  atoms of uncomplexed and complexed restrictocin superimpose with a root mean square deviation ranging from 0.5 to 0.7 Å for the different inhibitors studied (64). We have two potential explanations for the loss of specificity yet preservation of ribonuclease catalysis. First, it has been reported (45, 53) that the sequence <sup>15</sup>TNKYETK<sup>21</sup> of  $\alpha$ -sarcin, which is highly conserved among all of the members of this family of ribotoxins (the most dissimilar sequence is TNKWEDK), displays significant similarity (only conservative changes are observed) to a sequence found in some elongation factors that interact with the SRL. Therefore, the  $\beta$ -hairpin of  $\alpha$ -sarcin, which possesses this sequence, may be an additional interacting region with the ribosome that is required for the ribotoxin specificity even though it is distant from the three lysines contacting G4319. On the other hand, a docking model has been constructed for the three-dimensional structures of  $\alpha$ -sarcin and a 20-mer RNA substrate analog (3) and reveals that two protein regions separated by more than 11 Å display suitable geometric and electrostatic properties to potentially interact with the oligonucleotide (17). One region corresponds to the three lysine residues mentioned above. The second one is formed by two segments, residues 51–55 and loop 5 (residues 139–143). Similar results were reported for the crystal structure of restrictocin (18). Several residues of loop 5 of  $\alpha$ -sarcin are involved in interactions with the  $\beta$ -hairpin: Lys<sup>139</sup> with Asp<sup>9</sup> and Glu<sup>140</sup> with Lys<sup>11</sup> form salt-bridges; Lys<sup>139</sup> and Tyr<sup>18</sup> display a  $\pi$ -cation interaction; and Glu<sup>140</sup> is hydrogen-bonded to Asp<sup>9</sup>. The loss of these interactions could change the orientation of loop 5 and may also alternatively explain the intriguing absence of specificity in this active ribonuclease  $\Delta(7-22)$  mutant of  $\alpha$ -sarcin. The elucidation of the three-dimensional structure of this mutant is currently in progress to evaluate structure-activity relationships at an atomic level.

In summary, the NH<sub>2</sub>-terminal  $\beta$ -hairpin of  $\alpha$ -sarcin is not

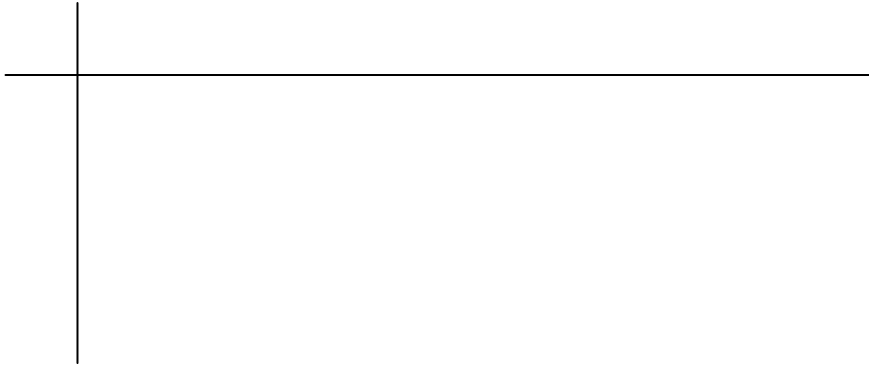


essential for its ribonuclease activity, but it is responsible for the specific ribosome-inactivating activity of the protein. The corresponding deletion mutant behaves like RNase U2 in terms of enzyme mechanism. In addition, this hairpin is one of those regions involved in protein-membrane interaction. The deletion mutant is able to gain access to the interior of the cell, but a large amount of it is required for cytotoxicity both because of its decreased ability to interact with membranes and because of the absence of catalytic efficiency in specifically degrading the ribosomal RNA. Assignment of specific  $\alpha$ -sarcin functions to a well defined protein region like the amino-terminal  $\beta$ -hairpin opens the possibility of engineering ribonucleases for the preparation of specific cytotoxins.

**Acknowledgments**—We are grateful to Dr. M. Gairi (Unitat de Resonància Magnètica Nuclear, Parc Científic de Barcelona) for technical assistance in NMR data acquisition. We are indebted to Dr. J. M. Manning (Northeastern University, Boston, MA) and Dr. D. V. Laurents (CSIC, Madrid, Spain) for critical reading of the manuscript and valuable suggestions.

## REFERENCES

- Steyaert, J. (1997) *Eur. J. Biochem.* **247**, 1–11
- Lamy, B., Davies, J., and Schindler, D. (1992) *Genetically Engineered Toxins*, pp. 237–257, Marcel Dekker, New York
- Correll, C. C., Munishkin, A., Chan, Y. L., Ren, Z., Wool, I. G., and Steitz, T. A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 13436–13441
- Correll, C. C., Wool, I. G., and Munishkin, A. (1999) *J. Mol. Biol.* **292**, 275–287
- Schindler, D. G., and Davies, J. E. (1977) *Nucleic Acids Res.* **4**, 1097–1100
- Endo, Y., and Wool, I. G. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 9054–9060
- Kao, R., Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, A., Cramer, R., and Davies, J. (2001) *Methods Enzymol.* **341**, 324–335
- Turnay, J., Olmo, N., Jiménez, J., Lizarbe, M. A., and Gavilanes, J. G. (1993) *Mol. Cell. Biochem.* **122**, 39–47
- Olmo, N., Turnay, J., González de Buitrago, G., López de Silanes, I., Gavilanes, J. G., and Lizarbe, M. A. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**, 2113–2123
- Olson, B. H., and Goerner, G. L. (1965) *Applied Microbiol.* **13**, 314–321
- Sacco, G., Drickamer, K., and Wool, I. G. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 5811–5818
- Gasset, M., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M., and Gavilanes, J. G. (1989) *Biochem. J.* **258**, 569–575
- Gasset, M., Oñaderra, M., Thomas, P. G., and Gavilanes, J. G. (1990) *Biochem. J.* **265**, 815–822
- Mancheño, J. M., Gasset, M., Lacadena, J., Ramón, F., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M., and Gavilanes, J. G. (1994) *Biophys. J.* **67**, 1117–1125
- Mancheño, J. M., Gasset, M., Albar, J. P., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M., and Gavilanes, J. G. (1995) *Biophys. J.* **68**, 2387–2395
- Oñaderra, M., Mancheño, J. M., Lacadena, J., De los Ríos, V., Martínez del Pozo, A., and Gavilanes, J. G. (1998) *Mol. Membr. Biol.* **15**, 141–144
- Pérez-Cañadillas, J. M., Santoro, J., Campos-Olivas, R., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Gavilanes, J. G., Rico, M., and Bruix, M. (2000) *J. Mol. Biol.* **299**, 1061–1073
- Yang, X. J., and Moffat, K. (1996) *Structure* **4**, 837–852
- Mancheño, J. M., Gasset, M., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M., and Gavilanes, J. G. (1995) *J. Theor. Biol.* **172**, 259–267
- Yoshida, H. (2001) *Methods Enzymol.* **341**, 28–41
- Satto, S., and Uchida, T. (1975) *Biochem. J.* **145**, 353–360
- Kanaya, S., and Uchida, T. (1995) *J. Biochem. (Tokyo)* **118**, 681–682
- Martínez-Ruiz, A., García-Ortega, L., Kao, R., Lacadena, J., Oñaderra, M., Mancheño, J. M., Davies, J., Martínez del Pozo, A., and Gavilanes, J. G. (2001) *Methods Enzymol.* **341**, 335–351
- Noguchi, S., Satow, Y., Uchida, T., Sasaki, C., and Matsuzaki, T. (1995) *Biochemistry* **34**, 15583–15591
- Endo, Y., Glück, A., Chan, Y.-L., Tsurugi, K., and Wool, I. G. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 2216–2222
- Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Lacadena, V., Martínez-Ruiz, A., Mancheño, J. M., Oñaderra, M., and Gavilanes, J. G. (1998) *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., and Gavilanes, J. G. (1999) *Proteins* **37**, 474–484
- Pérez-Cañadillas, J. M., Campos-Olivas, R., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Gavilanes, J. G., Santoro, J., Rico, M., and Bruix, M. (1998) *Biochemistry* **37**, 15865–15876
- Rushizky, G. W., Mozejko, J. H., Rogerson, D. J., Jr., and Sober, H. (1970) *Biochemistry* **9**, 4966–4971
- Uchida, T., and Egami, F. (1971) *The Enzymes*, pp. 205–250, Academic Press, New York
- Martínez-Ruiz, A., García-Ortega, L., Kao, R., Oñaderra, M., Mancheño, J. M., Davies, J., Martínez del Pozo, A., and Gavilanes, J. G. (2000) *FEMS Microbiol. Lett.* **189**, 165–169
- García-Ortega, L., Lacadena, J., Mancheño, J. M., Oñaderra, M., Kao, R., Davies, J., Olmo, N., Martínez del Pozo, A., and Gavilanes, J. G. (2001) *Protein Sci.* **10**, 1658–1668
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Barbero, J. L., Mancheño, J. M., Gasset, M., Oñaderra, M., López-Otin, C., Ortega, S., García, J. L., and Gavilanes, J. G. (1994) *Gene (Amst.)* **142**, 147–151
- Lacadena, J., Mancheño, J. M., Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, A., Gasset, M., Oñaderra, M., and Gavilanes, J. G. (1995) *Biochem. J.* **309**, 581–586
- Kunkel, T. A., Roberts, J. D., and Zakour, R. A. (1987) *Methods Enzymol.* **154**, 367–382
- Yasukawa, T., Kanei-Ishii, C., Mackaura, T., Fujimoto, J., Yamamoto, T., and Ishii, S. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 25328–25331
- García-Ortega, L., Lacadena, J., Lacadena, V., Masip, M., de Antonio, C., Martínez-Ruiz, A., and Martínez del Pozo, A. (2000) *Lett. Appl. Microbiol.* **30**, 298–302
- Bax, A., and Davies, D. G. (1985) *J. Magn. Reson.* **65**, 355–360
- Kumar, A., Ernst, R. R., and Wüthrich, K. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**, 1–6
- Piotto, M., Saudek, V., and Sklenár, V. (1992) *J. Biomol. NMR* **2**, 661–665
- Kraulis, P. J., Domaille, P. J., Campbell-Burk, S. L., van Aken, T., and Laue, E. D. (1994) *Biochemistry* **33**, 3515–3531
- Wüthrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley & Sons, Inc., New York
- Campos-Olivas, R., Bruix, M., Santoro, J., Martínez del Pozo, A., Lacadena, J., Gavilanes, J. G., and Rico, M. (1996) *Protein Sci.* **5**, 969–972
- Kao, R., and Davies, J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 12576–12582
- Blank, A., Sugiyama, R. H., and Dekker, C. A. (1982) *Anal. Biochem.* **120**, 267–275
- Barlett, G. R. (1959) *J. Biol. Chem.* **234**, 466–468
- Mancheño, J. M., Martínez del Pozo, A., Albar, J. P., Oñaderra, M., and Gavilanes, J. G. (1998) *J. Peptide Res.* **51**, 142–148
- Oñaderra, M., Mancheño, J. M., Gasset, M., Lacadena, J., Schiavo, G., Martínez del Pozo, A., and Gavilanes, J. G. (1993) *Biochem. J.* **295**, 221–225
- Perzcel, A., Hollósi, M., Tusnády, G. and Fasman, G. D. (1991) *Protein Eng.* **4**, 669–679
- de Antonio, C., Martínez del Pozo, A., Mancheño, J. M., Oñaderra, M., Lacadena, J., Martínez-Ruiz, A., Pérez-Cañadillas, J. M., Bruix, M., and Gavilanes, J. G. (2000) *Proteins* **41**, 350–361
- Becktel, W. J., and Schellman, J. A. (1987) *Biopolymers* **26**, 1859–1877
- Kao, R., and Davies, J. (1995) *Biochem. Cell Biol.* **73**, 1151–1159
- Hertler, A. A., and Frankel, A. E. (1989) *J. Clin. Oncol.* **7**, 1932–1942
- Wawrzynczak, E. J., Henry, R. V., Cumber, A. J., Parnell, G. D., Derbyshire, E. J., and Ulbrich, N. (1991) *Eur. J. Biochem.* **196**, 203–209
- Better, M., Bernhard, S. L., Lei, S. P., Fishwild, D. M., and Carroll, S. F. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 16712–16718
- Kurup, V. P., and Kumar, A. (1991) *Clin. Microbiol. Rev.* **4**, 439–456
- Moser, M., Cramer, R., Menz, G., Schneider, T., Dudler, T., Virchow, C., Gmahl, M., Blaser, K., and Suter, M. (1992) *J. Immunol.* **149**, 454–460
- Moussaoui, M., Nogués, M. V., Guasch, A., Barman, T., Travers, F., and Cuchillo, C. M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 25565–25572
- Loverix, S., Laus, G., Martins, J. C., and Steyaert, J. (1998) *Eur. J. Biochem.* **257**, 286–290
- Eftink, M. R., and Biltonen, R. L. (1983) *Biochemistry* **22**, 5134–5140
- Egami, F., Oshima, T., and Uchida, T. (1980) *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*, pp. 250–277, Springer-Verlag New York Inc., New York
- Masip, M., Lacadena, J., Mancheño, J. M., Oñaderra, M., Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, A., and Gavilanes, J. G. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**, 1–8
- Yang, X., Gérczei, T., Glover, L. T., and Correll, C. C. (2001) *Nat. Struct. Biol.* **8**, 968–973
- Koradi, R., Billeter, M., and Wüthrich, K. (1996) *J. Mol. Graph.* **14**, 51–55



## **Resultados 3**



Una vez vistos los efectos que producía la eliminación de la horquilla amino-terminal en las ribotoxinas, fundamentalmente a nivel del reconocimiento del ribosoma y, como consecuencia, en la citotoxicidad ejercida por estas proteínas, se planteó un nuevo campo de estudio, basándonos en la alergenicidad de estas moléculas y en el desarrollo y la aplicación reciente de variantes con alergenicidad reducida, denominados hipoalergenos, en el estudio, diagnóstico y tratamiento de la alergia.

La ribotoxina Asp f 1 es un alergen importante involucrado en la alergia a hongos, y en concreto a *Aspergillus*. Por lo tanto, la posibilidad de que la eliminación de la horquilla amino-terminal de esta molécula pudiera disminuir su capacidad alergénica, al ser una zona candidata a poseer epítomos B reconocibles por IgE, además de los efectos vistos hasta ahora en los trabajos previos, nos condujo al estudio de la variante de delección del alergen Asp f 1 desde un punto de vista inmunológico.

Para ello, se llevó a cabo un estudio similar al realizado anteriormente con la variante  $\alpha$ -sarcina  $\Delta(7-22)$  una vez clonadas, tanto la proteína silvestre (procedente de la fuente natural, el hongo *A. fumigatus*) como el mutante de delección. Posteriormente, en el estudio inmunológico, en el que se incluyeron también la  $\alpha$ -sarcina y su variante, se analizó la capacidad de unión a IgE de las distintas proteínas, empleando una amplia batería de sueros de pacientes alérgicos de diferente diagnóstico. (García-Ortega et al, 2004).



## Production and characterization of a non-cytotoxic deletion variant of the *Aspergillus fumigatus* allergen Asp f 1 with reduced IgE-binding ability

Lucía GARCÍA-ORTEGA\*, Javier LACADENA\*, Mayte VILLALBA\*, Rosalía RODRÍGUEZ\*, Jesús F. CRESPO†, Julia RODRÍGUEZ†, Cristina PASCUAL‡, Nieves OLMO\*, Mercedes OÑADERRA\*, Álvaro MARTÍNEZ DEL POZO\*§, and José G. GAVILANES\*¶

\*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Química, Universidad Complutense, Madrid, Spain, †Servicio de Alergia. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid. Spain, and ‡Servicio de Alergia. Hospital Infantil La Paz. Madrid. Spain

*Aspergillus fumigatus* is responsible for many allergic respiratory diseases, standing out allergic bronchopulmonary aspergillosis because of its severity. Asp f 1 is a major allergen of this fungus. This protein of 149 amino acids belongs to the ribotoxins family, whose best characterized component is  $\alpha$ -sarcin. The proteins of this group are cytotoxic ribonucleases that degrade a unique bond in ribosomal RNA impairing protein biosynthesis. Asp f 1 and its deletion mutant Asp f 1  $\Delta(7-22)$ , as well as  $\alpha$ -sarcin and its  $\Delta(7-22)$  mutant, have been produced as recombinant proteins. The deleted region corresponds to an exposed  $\beta$ -hairpin involved in ribosome recognition. The conformation of these proteins has been studied by circular dichroism and fluorescence spectroscopy. Their enzymatic

activity and cytotoxicity against human rhabdomyosarcoma cells were also measured. Their allergenic properties have been studied by using 58 individual sera of patients sensitized to *Aspergillus*. From these studies, it can be concluded that the deleted portion of Asp f 1 is an important allergenic region. Asp f 1  $\Delta(7-22)$  lacks cytotoxicity and shows a remarkable reduced IgE reactivity but retains IgG epitopes. Results are discussed in terms of the potential use of these engineered proteins in immunomodulation therapies against *Aspergillus* hypersensitivity.

Key words: *A.fumigatus* allergy; allergen; Asp f 1; ribonuclease; ribotoxin;  $\alpha$ -sarcin.

### INTRODUCTION

Ribotoxins are secreted fungal ribonucleases whose toxicity comes from their ability to reach the cytosol via endocytosis without any receptor interaction [1]. Once inside the host cell, ribotoxins inhibit protein biosynthesis by inactivating the ribosomes what leads to cell death [2]. They cleave a unique fosfodiester bond localized in the so called sarcin/ricin loop (SRL) of the large rRNA [3,4].  $\alpha$ -Sarcin (produced by *Aspergillus giganteus*) and restrictocin (from *A. restrictus*) are their best-known members. Numerous molecular and functional studies have been performed with this family of proteins, particularly with  $\alpha$ -sarcin [5-7]. Its three-dimensional structure reveals a phylogenetic proximity of ribotoxins to proteins from the RNase T1 family, which are also secreted microbial ribonucleases but lacking the toxic character [6-9]. Both families of proteins share the same overall fold, with an almost identical arrangement of the residues involved in their catalytic active site [6-8]. However, ribotoxins have much longer loops, which are supposedly involved in their

specificity, toxicity and antigenicity. In this sense, it has been demonstrated how the NH<sub>2</sub>-terminal  $\beta$ -hairpin of  $\alpha$ -sarcin is involved in the ribosome recognition [10,11] since a correctly folded deletion variant [ $\alpha$ -sarcin  $\Delta(7-22)$ ] (Figures 1A & B) did not specifically cleave the ribosomes and was not toxic against host cells [11,12]. This (7-22)-region is not present in the non-toxic proteins of the RNase T1 family and shows the highest amino acid sequence variability among ribotoxins [9].

Another protein that belongs to the ribotoxins family is Asp f 1, a major and one of the best-characterized allergens of *A. fumigatus* [13].  $\alpha$ -Sarcin and restrictocin differ from fungal Asp f 1 in only 21 (85 % identity) and 1 (99 % identity) residues, respectively (Figure 1C). From this point of view, they can be considered as natural variants of Asp f 1. Five out of the 21 amino acid differences between  $\alpha$ -sarcin and Asp f 1 are located in the NH<sub>2</sub>-terminal  $\beta$ -hairpin, a highly flexible and exposed region of ribotoxins, independently folded from the protein core [7,12] (Figure 1A). These facts suggest that this  $\beta$ -hairpin is a good candidate to be a major determinant of the immunoreactivity of these proteins.

Abbreviations used: ABPA, allergic bronchopulmonary aspergillosis;  $\alpha$ -fragment, the oligonucleotide released from the 3' end of the 28S rRNA in the large ribosomal subunit by the action of ribotoxins; CD, circular dichroism;  $\Delta(7-22)$  mutant, protein variant of either  $\alpha$ -sarcin or Asp f 1, in which residues 7-22 have been deleted and substituted by Gly-Gly; nt, nucleotide; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; RD cells, human rhabdomyosarcoma cells; SDS, sodium dodecylsulfate; SRL, sarcin/ricin loop.

§To whom correspondence may be addressed: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Química, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain. Tel.: 34-913-944-158; Fax: 34-913-944-159; E-mail: [alvaro@bbm1.ucm.es](mailto:alvaro@bbm1.ucm.es).

¶To whom correspondence may be addressed: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Química, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain. Tel.: 34-913-944-158; Fax: 34-913-944-159; E-mail: [ppgf@bbm1.ucm.es](mailto:ppgf@bbm1.ucm.es).

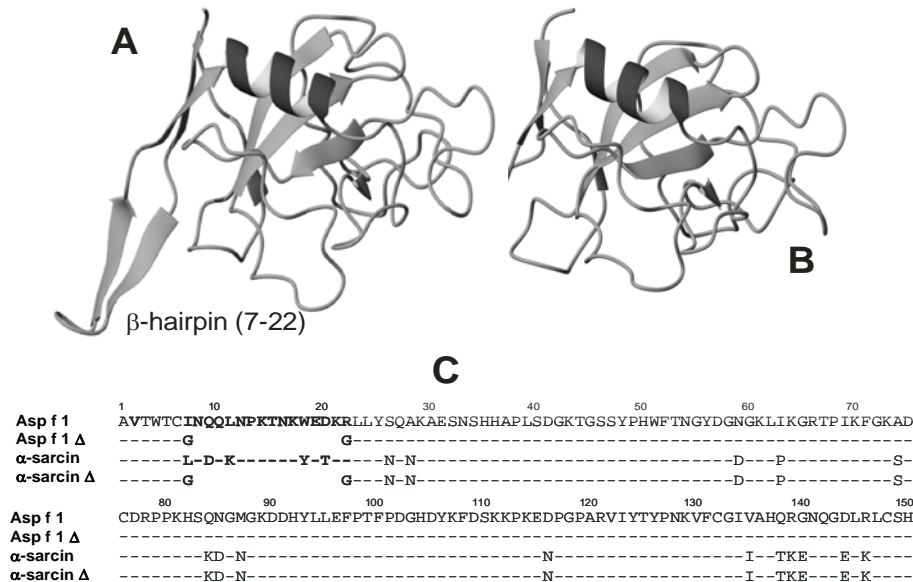


Figure 1 Structure of the recombinant proteins

Diagrams corresponding to the three dimensional structures of (A)  $\alpha$ -sarcin and (B)  $\alpha$ -sarcin  $\Delta$ (7-22) constructed from the atomic coordinates deposited in the Protein Data Bank (codes 1DE3 and 1R4Y, respectively). Both structures have been fitted to the coordinates of the peptide bond atoms of the catalytic residues of the proteins, His-50, Glu-96 and His-137 in  $\alpha$ -sarcin and His-36, Glu-82, and His-123 in  $\alpha$ -sarcin  $\Delta$ (7-22). Images were generated by the MOLMOL program [32] and subsequently rendered with MegaPov. (C) Sequence alignments of the recombinant proteins: Asp f 1, Asp f 1  $\Delta$ (7-22),  $\alpha$ -sarcin, and  $\alpha$ -sarcin  $\Delta$ (7-22) [11,13,33]. Two Gly in the deletion mutants substituted the deleted portion, marked in bold characters. The recombinant Asp f 1 and Asp f 1  $\Delta$ (7-22) have an extra Val residue at the second position of the N-terminal with respect to the natural fungal protein.

Fungi, and in particular *Aspergillus* species, are responsible for several human lung pathologies ranging from allergic manifestations to invasive infections [14]. Among them, allergic inhalant diseases are common within the population and bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) is the most severe form (it can eventually lead to proximal bronchiectasis and lung fibrosis). ABPA has a prevalence of 1-2 % in patients with persistent asthma but this figure rises up to 15 % in those individuals with cystic fibrosis [15]. *Aspergillus fumigatus* is usually the mold involved, because it is a very ubiquitous fungus with small and thermotolerant spores that may colonize the respiratory tract of the host leading to the pathological events [16]. Asp f 1 is one of the allergens with a high prevalence within ABPA patients. In the field of the allergen-specific immunotherapy, the use of hypoallergenic variants of well-characterized allergens is one of the most promising treatments [17]. Considering the above arguments and the structural characteristics of the NH<sub>2</sub>-terminal  $\beta$ -hairpin, it seemed interesting to test whether its removal would reduce the immunoreactivity of the resulting protein. If this engineered variant showed a reduced IgE reactivity but retaining that against blocking IgG antibodies, it might be useful as starting point to obtain hypoallergenic forms of Asp f 1 for clinical application. On the basis of these ideas, the allergen Asp f 1 and a deletion variant, in which the mentioned hairpin was substituted by two Gly residues (Figure 1C), have been produced as recombinant proteins and characterized from structural, enzymatic, and immunologic

points of view.

## EXPERIMENTAL

### DNA constructs

All materials and reagents were molecular biology grade. Cloning procedures and bacteria manipulations were carried out according to standard methods [18]. Recombinant  $\alpha$ -sarcin and its deletion mutant [ $\alpha$ -sarcin  $\Delta$ (7-22)] were obtained as previously described [11,19]. The cDNA of Asp f 1 was generated by RT-PCR amplification from a preparation of *Aspergillus fumigatus* mRNA obtained as described [20]. The primers used were: Nt-Asp f 1 (5'-GTCGTCTTGGCGT-CACCTGGACATGCATCAACGACAG-3') and Ct-Asp f 1 (5'-GTCGTCTTGGATCCTCTCGAGTCTCAATGAGAA-CACAGTCTCAAGTC-3'). These primers contained *Bst*EII and *Bam*HI sites and were used to generate a fragment that was cloned in the same sequencing and expression vectors as  $\alpha$ -sarcin [19]. Kunkel's oligonucleotide-site directed mutagenesis method [21] was used to obtain the deletion mutant Asp f 1  $\Delta$ (7-22), using the mutagenic primer: 5'-GTCACCTGGACATGCGGCGCCTTCTATACAATCAA-3'. The integrity of both sequences was confirmed by DNA sequencing. All of these procedures were also as previously described [11,19,22].

### Proteins production and purification

*Escherichia coli* BL21(DE3) cells cotransformed with pT-Trx (thioredoxin producing plasmid) and the corresponding Asp f 1, Asp f 1  $\Delta$ (7-22),  $\alpha$ -sarcin, or  $\alpha$ -sarcin  $\Delta$ (7-22) pINPG plasmids were used to produce these proteins. Cells harboring both plasmids were selected in ampicillin (100  $\mu$ g/ml) and chloramphenicol (34  $\mu$ g/ml) and grown at 37 °C in minimal medium up to an optical density at 600 nm of 0.7. Then, the protein production was induced with 2 mM IPTG and the cells were further incubated for 18 h. The extracellular material was removed by centrifugation. The cellular pellet was subjected to an osmotic shock and centrifuged. The resulting pellet was suspended in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, and exhaustively sonicated. This preparation was centrifuged at 10,000 g for 30 min. The proteins were purified from the resulting supernatant by using ion-exchange and molecular exclusion chromatographies, as described before for  $\alpha$ -sarcin and its deletion mutant [11,19,22]. Polyacrylamide (15 % w/v) gel electrophoresis and amino acid analysis of proteins were performed according to standard procedures. Immunodetection by western blot was carried out using rabbit polyclonal antiserum risen against a homogeneous preparation of recombinant Asp f 1.

### Spectroscopic characterization

Protein samples for these analyses were dissolved in sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M NaCl. Absorbance measurements were carried out on an Uvikon 930 spectrophotometer at 100 nm/min scanning speed, at room temperature, and in 1-cm optical-path cells. Extinction coefficients  $E$  (0.1 %, 1 cm, 280 nm) were calculated from the absorbance spectra and amino acid analyses. Circular dichroism (CD) spectra were obtained on a Jasco 715 spectropolarimeter at 50 nm/min scanning speed; 0.1- and 1.0-cm optical-path cells, and 0.1 and 0.5 mg/ml protein concentration were used in the far- and near-UV, respectively. Mean residue weight ellipticities were expressed in units of degree  $\times$  cm<sup>2</sup>  $\times$  dmol<sup>-1</sup>. Thermal denaturation profiles were obtained by measuring the temperature dependence of the ellipticity at 220 nm in the range of 25-85 °C; the temperature was continuously changed at a rate of 0.5 °C/min.  $T_m$  (temperature at the midpoint of the thermal transition) and  $\Delta\Delta G$  values were calculated assuming a two-state unfolding mechanism [23]. Fluorescence emission spectra were obtained on a SLM Aminco 8000 spectrofluorimeter at 25 °C and in 0.2-cm optical-path cells. The protein concentration employed was 0.05 mg/ml. All these determinations were performed as previously described [11,19,22].

### Ribonucleolytic activity

The specific ribonucleolytic activity was followed by detecting the release of the 400 nt  $\alpha$ -fragment [2] from a cell-free reticulocyte lysate (Promega Corporation) when protein amounts were added in the 50-200 ng range [11,19,24]. The production of this 400 nt  $\alpha$ -fragment was visualized by ethidium bromide staining after electrophoresis on 2.4 % (w/v) agarose gels. The specific cleavage of a synthetic SRL 35-mer RNA by ribotoxins was also studied. The synthesis and

purification of this substrate was carried out as previously described [2,11]. The assay was performed by incubating 2  $\mu$ M SRL 35-mer with 3  $\mu$ M (300 ng) protein for 20 min at 37 °C in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, containing 0.1 M NaCl and 5 mM EDTA [2,11]. The reaction products were detected by ethidium bromide staining after electrophoretic separation on a denaturing polyacrylamide gel. The activity of the purified proteins against poly(A) was assayed at pH 7.0 in 15 % (w/v) polyacrylamide gels containing 0.1 % (w/v) SDS and 0.3 mg/ml of the homopolynucleotide. In these zymograms, proteins exhibiting ribonuclease activity appear as colorless bands after appropriate destaining [2,11,24]. Volumograms of these bands, obtained with a photo documentation system UVI-Tec and the software facility UVIsoft UVI band Windows Application V97.04, were used to quantify the activity. All assays were performed with controls to test potential non-specific degradation of the substrates.

### Cytotoxicity assay

This assay was performed essentially as previously described [1] using human rhabdomyosarcoma (RD) cells. Briefly, protein synthesis was analyzed by measuring the incorporation of L-[4,5-<sup>3</sup>H]leucine (166 Ci/mmol) after 18 h of incubation with the protein. The radioactivity was measured on a Beckman LS 3801 liquid scintillation counter. The results are expressed as percentage of radioactivity incorporation with respect to control samples (without protein addition). A plot of these percentage values vs. toxic protein concentration in the cytotoxicity assay allows the calculation of the IC<sub>50</sub> values (protein concentration required for 50 % protein synthesis inhibition). The reported values are the average of triplicate experiments.

### Patient sera

Sera from 58 *A. fumigatus*-sensitized patients were included in this study. They were distributed in four groups attending to diagnosis of asthma, ABPA and cystic fibrosis: asthma (n = 35), cystic fibrosis (n = 13), and ABPA (n = 10). All patients had increased serum levels of specific-A. *fumigatus* IgE, as determined by using the Pharmacia UniCAP System. The allergic phenotype was established by the clinical history, diagnosis, and serology. The diagnosis of ABPA in asthma and cystic fibrosis was based on the criteria reviewed by Greenberger [15].

### Immunologic characterization

ELISA was performed in microtitre 96 wells plates coated with 100  $\mu$ l of protein/well (1  $\mu$ g/ml), according to methods previously described [2,25]. Peroxidase reaction was measured at 492 nm in a microplate reader Expert 96 using the MicroWin 2000 software. Absorbance values under 0.1 were considered as negative responses. ELISA inhibition assays were also performed as previously described [25]. In this case, before the step of IgE binding to the coated antigen, the patient sera were incubated with different concentrations of inhibitor (1 ng/ml - 100  $\mu$ g/ml; 0.1 ng - 10  $\mu$ g). For immunoblotting, proteins transferred to Immobilon membranes were incubated



with a 1/25,000 dilution of rabbit polyclonal anti-Asp f 1 antiserum or a 1/10 dilution of patient sera. The following incubations were the same as in ELISA. The peroxidase reaction was colorimetrically developed using fresh substrate. In both types of assays, ELISA or immunoblotting, binding of rabbit polyclonal anti-Asp f 1 antiserum was detected by peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG (Bio Rad Life Science Research Products) diluted 1:3,000. When human sera were assayed, IgE binding was detected by mouse anti-human IgE (kindly donated by Dr. M. Lombardero, ALK-Abelló, Madrid, Spain) diluted 1:5,000, followed by a peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG (Pierce Biotechnology) diluted 1:2,500. Results are the average of at least duplicate measurements.

## RESULTS

### Production and isolation of recombinant proteins

The recombinant protein Asp f 1 and its deletion mutant Asp f 1  $\Delta(7-22)$  were purified to homogeneity as determined by their behavior on SDS-PAGE (Figure 2A). Single immunoreactive bands were also found in the corresponding Western blots developed with anti-Asp f 1 polyclonal antibodies (Figure 2B). The amino acid compositions of these proteins were in agreement with their respective sequences (Figure 1C). The yield of these purifications (2-3 mg per liter of culture) was in the same range of that previously described for  $\alpha$ -sarcin using the same expression system [19,22]. Wild-type and  $\Delta(7-22)$  recombinant forms of  $\alpha$ -sarcin were also produced and isolated as described [11,19] for their inclusion in this study (Figure 2).

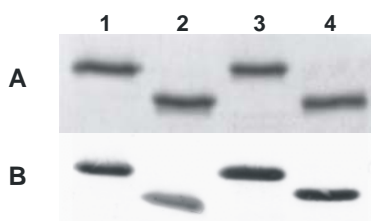


Figure 2 SDS-PAGE analysis

(A) Coomassie Blue stained (0.5  $\mu$ g of protein loaded), and (B) immunoblotting (0.1  $\mu$ g of protein) using a rabbit polyclonal antibody anti-Asp f 1, of the four analyzed proteins:  $\alpha$ -sarcin (1),  $\alpha$ -sarcin  $\Delta(7-22)$  (2), Asp f 1 (3), and Asp f 1  $\Delta(7-22)$  (4). The samples were previously reduced with 5 % (v/v) 2-mercaptoethanol and boiled for 20 min.

### Spectroscopic and structural analysis of recombinant proteins

The experimentally determined E (0.1 %, 280 nm, 1 cm) values were 1.61 for Asp f 1 and 1.26 for its deletion mutant (Table 1). Both proteins displayed similar CD spectra in the far UV range, with a minimum at 219 nm and a shoulder around 225 nm (Figure 3). The small differences observed between both spectra should be related to the contribution of the deleted region in Asp f 1  $\Delta(7-22)$ . The spectra of Asp f 1, Asp f 1  $\Delta(7-22)$  and  $\alpha$ -sarcin  $\Delta(7-22)$  were almost indistinguishable but slightly different from that one of wild-type  $\alpha$ -sarcin (Figure 3,

*Inset*). The near UV CD spectra of Asp f 1 and Asp f 1  $\Delta(7-22)$  showed higher differences (Figure 3) and, although similar, they were not coincident with those reported for  $\alpha$ -sarcin and its corresponding deletion mutant  $\Delta(7-22)$  (Figure 3, *Inset*) [11]. These differences were small but significant.

**Table 1** Extinction coefficients, E (0.1 %, 280 nm, 1 cm), relative Tyr ( $\Phi_{Tyr}$ ) and Trp ( $\Phi_{Trp}$ ) emission quantum yields for excitation at 275 nm, and  $T_m$  values and conformational stability parameters relative to  $\alpha$ -sarcin of the different proteins studied.

Protein	E <sup>0.1%</sup>	$\Phi_{Tyr}$	$\Phi_{Trp}$	$T_m$ (°C)	$\Delta\Delta G$ (Kcal/mol)
$\alpha$ -sarcin <sup>a</sup>	1.34	1.00	1.00	52.0	-
$\alpha$ -sarcin $\Delta(7-22)$ <sup>b</sup>	1.38	0.80	1.20	50.0	-0.96
Asp f 1	1.61	0.53	1.37	61.0	+3.77
Asp f 1 $\Delta(7-22)$	1.26	0.62	1.28	56.6	+1.92

<sup>a</sup>) Ref. [31]; <sup>b</sup>) Ref. [11]

Regarding the fluorescence emission spectra (Figure 4), both Asp f 1 variants displayed very similar Tyr and Trp contributions, which indicated that the emission of Trp-18, present in the deleted portion, is strongly quenched in the complete protein. However, the Trp quantum yield in both Asp f 1 variants was higher than in  $\alpha$ -sarcin (Table 1), where Trp-18 is substituted by a Tyr residue (Figure 1C). The Trp emission in  $\alpha$ -sarcin is mostly due to Trp-4 because the emission of the other Trp residue (Trp-51) of the molecule is negligible [26]; therefore, local differences in the microenvironment of Trp-4 between  $\alpha$ -sarcin and Asp f 1 should account for the increased emission of this residue in the latter protein. The Tyr contribution of the two Asp f 1 variants was lower than for  $\alpha$ -sarcin (Table 1) what is easily explained by the presence of Tyr-18 in the latter.

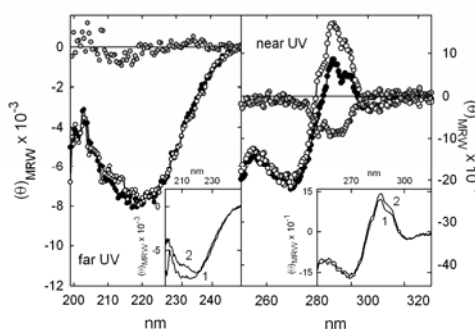


Figure 3 Circular dichroism spectra in the far- and near-UV regions

Asp f 1 (solid circles) and Asp f 1  $\Delta(7-22)$  (empty circles). Difference spectra [Asp f 1 minus Asp f 1  $\Delta(7-22)$ ] in gray circles. Mean residue weight ellipticity,  $(\theta)_{MRW}$ , is expressed in units of degrees  $\times$  cm<sup>2</sup>  $\times$  dmol<sup>-1</sup>. The spectra were recorded at pH 7.0. Wild-type  $\alpha$ -sarcin (1) and  $\alpha$ -sarcin  $\Delta(7-22)$  (2) far-UV and near-UV CD spectra are given in the corresponding insets.

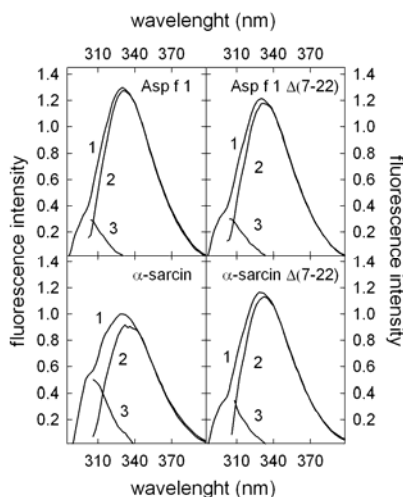


Figure 4 Fluorescence emission spectra

All the spectra were recorded at 25 °C, pH 7.0 and identical protein concentrations: *Spectra 1*, for excitation at 275 nm; *Spectra 2*, for excitation at 295 nm (tryptophan contribution) and normalized at wavelengths above 380 nm; *Spectra 3*, (tyrosine contribution) from spectrum 1 minus spectrum 2. The spectra of  $\alpha$ -sarcin and  $\alpha$ -sarcin  $\Delta(7-22)$  are included as reference. Fluorescence intensity units were arbitrary, considering the maximum emission value of the  $\alpha$ -sarcin spectrum 1 as 1.0.

Thermal denaturation profiles showed a single thermal transition in all cases (Figure 5), what would be in good agreement with a folded-to-unfolded transition in these proteins, corroborating the folded status of the Asp f 1 recombinant preparations. A  $T_m$  of 61 °C was observed for Asp f 1, 9 °C higher than the reported value for  $\alpha$ -sarcin but closer to 59 °C, the  $T_m$  of the restrictocin ribotoxin [10]. The  $T_m$  value for the deletion mutant was 57 °C. The calculated  $\Delta\Delta G$  values, in comparison with  $\alpha$ -sarcin, for Asp f 1 and Asp f 1  $\Delta(7-22)$  were 3.77 and 1.92 Kcal/mol, respectively (Table 1), which were in accordance with increased thermal stabilities. These changes in stability can be explained by the sequence variations between Asp f 1 (or restrictocin) and  $\alpha$ -sarcin, and also by the loss of a region of the protein in the deletion mutant [11,12].

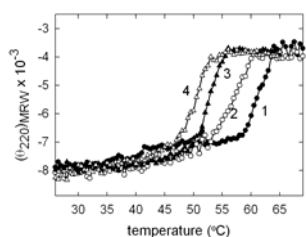


Figure 5 Thermal denaturation profiles

(1), Asp f 1; (2), Asp f 1  $\Delta(7-22)$ ; (3),  $\alpha$ -sarcin; and (4),  $\alpha$ -sarcin  $\Delta(7-22)$  at pH 7.0. Measurements were performed by continuously recording the mean residue ellipticity,  $(\theta)_{MRW}$ , at 220 nm, expressed in units of degrees  $\times$  cm<sup>2</sup>  $\times$  dmol<sup>-1</sup>.

Taking into account all of these results, it could be safely assumed that both Asp f 1 and Asp f 1  $\Delta(7-22)$  recombinant proteins were properly folded.

#### Ribonucleolytic activity

Purified recombinant Asp f 1 displayed the specific activity of ribotoxins when assayed against ribosomes from a cell-free reticulocyte lysate, since it released the characteristic 400-nt fragment ( $\alpha$ -fragment) when incubated with this substrate (Figure 6A). However, the deletion mutant lacked this ability and just a slight and non-specific ribonucleolytic activity was observed in this case (Figure 6A). When the 35-mer oligoribonucleotide mimicking the sarcin/ricin loop (SRL) was used as substrate, both proteins specifically cleaved only one phosphodiester bond releasing two fragments, 14 and 21-mer, as reaction products (Figure 6B). The non-specific ribonucleolytic activity of Asp f 1 and its deletion mutant was also studied in a zymogram assay using a poly(A) adsorbed in a polyacrylamide gel (Figure 6C). This assay showed the absence of any other contaminating ribonucleolytic-like activity in the protein preparations, as well as an increased non-specific activity of the mutant, about four-fold higher than that of Asp f 1 as deduced from the volumogram analysis of the corresponding gels. Altogether, these results were coincident with those previously reported for wild-type  $\alpha$ -sarcin and its  $\Delta(7-22)$  mutant [11].

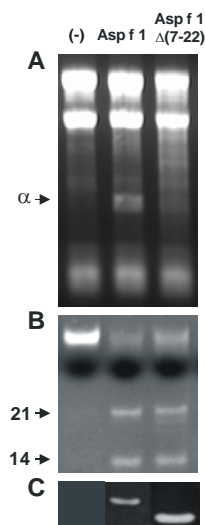


Figure 6 Ribonuclease activity assays of Asp f 1 and its deletion mutant

(A) Ribosomal RNA cleaving activity assay performed with cell-free reticulocyte lysates and 200 ng of protein. The  $\alpha$ -fragment ( $\alpha$ ) only appeared in the case of the wild-type protein. Identical results were obtained with 50 ng of protein (data not shown). (B) Incubation of a 35-mer oligoribonucleotide (SRL analogue) with 300 ng of protein. Two new fragments appeared (14 and 21 nucleotides) in the presence of both proteins. (C) Zymogram assay against poly(A). In negative controls (-), buffer substituted the protein solution.

#### Cytotoxic activity

The cytotoxic activity of Asp f 1 and its  $\Delta(7-22)$  deletion mutant was studied with rhabdomyosarcoma cells. The IC<sub>50</sub> (concentration required for 50 % protein biosynthesis inhibition) of Asp f 1 was 0.7  $\mu$ M, which was similar to that observed for  $\alpha$ -sarcin (0.6  $\mu$ M) [1]. However, the cytotoxicity of the deletion variant was strongly impaired since its IC<sub>50</sub> was about ten-fold higher (Figure 7), as it also occurred for the corresponding  $\alpha$ -sarcin  $\Delta(7-22)$  mutant [11].

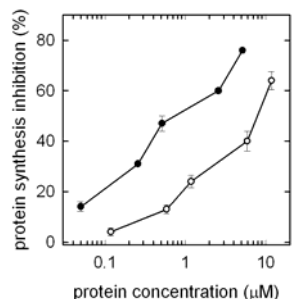


Figure 7 Cytotoxicity assay against rhabdomyosarcoma cells

Asp f 1 (solid circles) and Asp f 1  $\Delta(7-22)$  (empty circles). Protein biosynthesis inhibition (%) was calculated as  $100 \times (1 - I/C)$  where I was the radioactivity incorporation at each point and C was the incorporation when no protein was added. Protein concentration is plotted in a logarithmic scale. The standard deviation of the measurements is also shown.

#### Allergenic characterization

Binding of human specific IgE to the proteins was investigated by ELISA using individual sera of 58 patients sensitized to *Aspergillus*. These sera were classified according to the patient diagnosis, as asthma (n = 35), cystic fibrosis (n = 13) and ABPA (n = 10). Asp f 1-specific IgE antibodies were detected in 26 out of 58 (44.8 %) sera (6 from the asthma and 10 from each cystic fibrosis and ABPA patients groups). The prevalence of sera having specific IgE antibodies to Asp f 1 within the different allergic phenotypes ranged from 17 % (6/35) of sera from asthma to 100 % (10/10) of sera from ABPA patients (Table 2A). Asp f 1  $\Delta(7-22)$ ,  $\alpha$ -sarcin, and  $\alpha$ -sarcin  $\Delta(7-22)$  showed a very similar prevalence but displaying a significant decrease in the IgE-binding capability in comparison to Asp f 1. The average reduction was about 30 % for Asp f 1  $\Delta(7-22)$  and  $\alpha$ -sarcin, and 50 % for  $\alpha$ -sarcin  $\Delta(7-22)$  (Table 2B), thus suggesting a potential hypoallergenic behavior for these variants.

In order to further characterize the allergenic properties of Asp f 1  $\Delta(7-22)$ ,  $\alpha$ -sarcin, and  $\alpha$ -sarcin  $\Delta(7-22)$ , IgE-specific immunoblots were performed using an equivolometric pool of 11 sera displaying similar values of IgE-binding to Asp f 1 and selected from the 26 sera containing Asp f 1-specific IgE antibodies. Two different sets of assays were performed. In the first one, the samples were not subjected to a reducing treatment before being loaded onto the gel. However, ribotoxins have two disulfide bonds whose integrity is essential for a proper folding after the electrophoretic separation. Thus, a second assay was also performed after reducing the protein samples. In this second case, the proteins analyzed would not contain most of the conformational constraints corresponding to the native proteins. The four recombinant proteins were reactive with specific IgE antibodies in both sets of experiments, although the reactivity decreased greatly after the reductive treatment of the disulfide bridges (Figure 8). In addition, significant differences were observed among the four proteins, showing that the degree of IgE-binding decreased in the following order: Asp f 1 > Asp f 1  $\Delta(7-22)$  >  $\alpha$ -sarcin >  $\alpha$ -sarcin  $\Delta(7-22)$ . Both approaches

allowed the preliminary analysis of the contribution of conformational and/or linear epitopes to the antibody binding response, showing how the IgE-binding capability of the (7-22)-portion was partially preserved even in the reduced samples.

Table 2 Allergenic characterization of the different proteins studied

(A) IgE-binding prevalence of the four proteins studied within the different diagnostic groups of *A. fumigatus* sensitized patients (values expressed as percentages of the total population of 58 sera). The data have been grouped according to the diagnostic of the patients whose sera were analyzed (asthmatics, cystic fibrosis patients, and ABPA patients with or without cystic fibrosis).

Diagnostic (patients number)	Asp f 1	$\alpha$ -sarcin	Asp f 1 $\Delta(7-22)$	$\alpha$ -sarcin $\Delta(7-22)$
Asthma (n=35)	17	17	17	17
Cystic fibrosis (n=13)	77	77	69	62
ABPA (n=10)	100	90	100	80

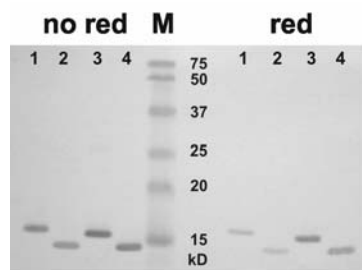
(B) Reduction of the IgE-binding of the studied proteins within groups of sera from Asp f 1 sensitized patients (values are expressed as average percentages considering the value for Asp f 1 as 100 %).

Diagnostic	Asp f 1 $\Delta(7-22)$	$\alpha$ -sarcin	$\alpha$ -sarcin $\Delta(7-22)$
Asthma	23	33	42
Cystic fibrosis	39	33	56
ABPA	26	31	50

(C) Percentage of sera from Asp f 1 sensitized patients whose IgE showed at least 50 % reduction of their ability to bind the antigens.

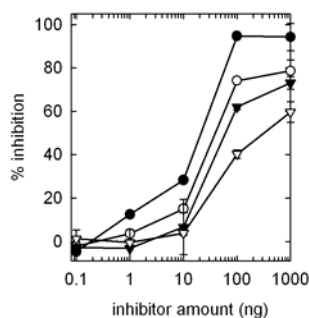
Diagnostic	Asp f 1 $\Delta$ vs. Asp f 1	$\alpha$ -sarcin vs. Asp f 1	$\alpha$ -sarcin $\Delta$ vs. Asp f 1	$\alpha$ -sarcin $\Delta$ vs. $\alpha$ -sarcin
Asthma	33	33	50	20
Cystic fibrosis	50	30	89	33
ABPA	20	33	70	22

In order to quantitatively estimate the ability of Asp f 1  $\Delta(7-22)$ ,  $\alpha$ -sarcin, and  $\alpha$ -sarcin  $\Delta(7-22)$  to inhibit the IgE binding to Asp f 1, inhibition ELISA experiments were performed using the above sera pool (Figure 9). The percentages of inhibition were 80 % for Asp f 1  $\Delta(7-22)$ , 75 % for  $\alpha$ -sarcin, and 60 % for  $\alpha$ -sarcin  $\Delta(7-22)$ . Consequently, these results showed that the deleted NH<sub>2</sub>-terminal  $\beta$ -hairpin of ribotoxins is involved in the allergenic response to Asp f 1, but also that other different regions of these molecules can behave as relevant allergenic epitopes.



**Figure 8** IgE-specific immunoblotting

A serum pool from 11 patients with anti-Asp f 1 antibodies was used. The four proteins (0.4  $\mu$ g) [1,  $\alpha$ -sarcin; 2,  $\alpha$ -sarcin  $\Delta$ (7-22); 3, Asp f 1; and, 4, Asp f 1  $\Delta$ (7-22)] were analyzed in SDS-PAGE under non-reducing (no red) and reducing (red) conditions. Before loading onto the gel, the samples were boiled for 20 min. This treatment was made in the presence of 5% (v/v) 2-mercaptoethanol in the case of the reduced samples. Bio Rad pre-stained molecular weight markers (M) are shown.



**Figure 9** Asp f 1-specific IgE ELISA inhibition

Plate wells were coated with 0.1  $\mu$ g of wild-type Asp f 1. The pool of sera was pre-incubated independently with the four proteins as inhibitors: Asp f 1 (solid circles), Asp f 1  $\Delta$ (7-22) (empty circles),  $\alpha$ -sarcin (solid triangles) and  $\alpha$ -sarcin  $\Delta$ (7-22) (empty triangles). The inhibitor amount is plotted in logarithmic scale. The standard deviation of the measurements is shown. The serum pool employed is the same as in Figure 8.

## DISCUSSION

Ribotoxins are a family of proteins with a high degree of sequence identity, as  $\alpha$ -sarcin and Asp f 1 exemplify (Figure 1C). Most of the differences among them involve the exposed regions, mainly the NH<sub>2</sub>-terminal  $\beta$ -hairpin that is the subject of this work. The three-dimensional structures of  $\alpha$ -sarcin [7] and  $\alpha$ -sarcin  $\Delta$ (7-22) [12] are known (Figures 1A & B). In  $\alpha$ -sarcin, residues 1 to 26 form a long  $\beta$ -hairpin that can be considered as two consecutive minor  $\beta$ -sheets connected by a hinge region. The second  $\beta$ -sheet, coincident with the portion deleted in this work, juts out as a solvent exposed protuberance and is one of the regions with highest conformational flexibility [7,27]. It is important to remark that  $\alpha$ -sarcin and its

$\Delta$ (7-22) mutant show no significant conformational differences except for the deleted region [12]. Altogether, all these structural data are a good reference in order to discuss the spectroscopic and enzymatic features of Asp f 1 and Asp f 1  $\Delta$ (7-22).

Both Asp f 1 and Asp f 1  $\Delta$ (7-22) displayed very similar far-UV CD spectra, indicating that the deleted region scarcely determines the overall protein folding. The near-UV CD spectrum of Asp f 1 (Figure 3) shows extreme values centered at 270 and 287 nm, mainly corresponding to aromatic amino acids contributions.  $\alpha$ -Sarcin near-UV CD spectrum is dominated by Trp-51 [26], one of the two Trp residues of this protein and conserved in all ribotoxins known so far. This fact would explain why the deletion of the NH<sub>2</sub>-terminal  $\beta$ -hairpin of Asp f 1 resulted in only small changes in the near-UV region. The different near-UV CD spectra of Asp f 1 and  $\alpha$ -sarcin can be explained by considering the Tyr/Trp change at position 18 between the two proteins.

Asp f 1 and Asp f 1  $\Delta$ (7-22) displayed very similar fluorescence emission spectra showing that the Trp-18 contribution was very small in the complete protein (Figure 4).  $\alpha$ -Sarcin fluorescence emission is mostly due to Trp-4 whereas Trp-51 is highly quenched by its interaction with His-82 [26]. By means of using Trp to Phe mutants, the existence of Tyr to Trp-51 energy transfer has been shown to occur in  $\alpha$ -sarcin [26], where removal of the NH<sub>2</sub>-terminal  $\beta$ -hairpin results in enhancement of the Trp emission [11]. Therefore, the fluorescence emission differences observed for the four studied proteins could be explained by considering local effects due to the particular microenvironments surrounding their Trp-4 residue.

The Asp f 1 thermostability was significantly higher than that of  $\alpha$ -sarcin (Table 1). The destabilization observed between the complete protein and the deletion mutant (Table 1) was in the same range as that previously found when comparing  $\alpha$ -sarcin and its deletion variant [11]. Thus, the small number of sequence changes existing between  $\alpha$ -sarcin and Asp f 1 are enough to produce the differences observed in stability, but those ones located at the NH<sub>2</sub>-terminal  $\beta$ -hairpin would not play a determinant role in this regard since their deletion did not make both mutants closer in T<sub>m</sub> value. These results also support that the NH<sub>2</sub>-terminal  $\beta$ -hairpin of Asp f 1 is a structure that somehow behaves independently of the rest of the protein, as it had been demonstrated for  $\alpha$ -sarcin [7,11,12]. Among the amino acid sequence differences for both proteins, there are two of them that could explain these changes in thermal stability. Pro-63 of  $\alpha$ -sarcin is located within the hydrophobic protein core and it is substituted by Ile in Asp f 1, what may lead to a more stable structure. But more important, Glu-140 in  $\alpha$ -sarcin has unusual backbone torsional angles [7] and lacks the special flexibility of the corresponding Gly residue in Asp f 1 (Figure 1C). Based on this fact, it was proposed that mutation of Glu-140 by Gly would result in a variant of  $\alpha$ -sarcin with increased stability [7] as now observed for Asp f 1. On the other hand, it is known that *A. fumigatus*, the mould responsible for the production of Asp f 1, grows optimally at 37 °C whereas the producer of  $\alpha$ -sarcin, *A. giganteus*, cannot grow at temperatures above 30 °C [28].

A major conclusion from these structural results is that Asp f 1  $\Delta$ (7-22) retains the main overall fold of the wild-type protein. Thus, the immunological and enzymatic changes discussed below can be safely attributed to the deleted portion and not to large conformational changes.

Regarding the enzymatic characterization, it has been previously described how the NH<sub>2</sub>-terminal  $\beta$ -hairpin is an essential element for the ribosome recognition by  $\alpha$ -sarcin [11]. The same conclusion can be extracted from the results herein shown for Asp f 1. Asp f 1  $\Delta$ (7-22) retains the ability to specifically cleave the SRL oligoribonucleotide analogue, and it is even a more active ribonuclease than the complete protein when a non-specific substrate such as poly(A) is employed, but it lacks the elements to both recognize the ribosome and maintain the exquisite and unique specificity of ribotoxins (Figure 6).

In terms of their cytotoxic effect, Asp f 1 and  $\alpha$ -sarcin display very similar toxicity, what agrees with their identical ability to specifically cleave the rRNA in ribosomes. However, the deletion mutant of Asp f 1 was significantly less cytotoxic than the complete protein, although this effect was not as high as in  $\alpha$ -sarcin  $\Delta$ (7-22) [11] (Figure 7). The IC<sub>50</sub> of the former was 8  $\mu$ M versus 25  $\mu$ M of the latter one. This difference could be related to a basal toxicity arising from the different activity of both deletion mutants against non-specific substrates such as poly(A).

Asp f 1, Asp f 1  $\Delta$ (7-22),  $\alpha$ -sarcin, and  $\alpha$ -sarcin  $\Delta$ (7-22) were characterized from an immunologic standpoint. The relevance of Asp f 1 as a major allergen in hypersensitivity to *Aspergillus* [13] was a good reason for the study of its allergenic features and the role of the deleted portion in the IgE antibody recognition. In fact, it has been generally assumed that exposed and highly flexible regions are usually good candidates to be B-cell epitopes in proteins. But it is important to remark that several studies with synthetic peptides overlapping the mentioned region have produced controversial results regarding its antigenic behavior [29,30]. Our data show a significant prevalence of Asp f 1-specific IgE antibodies in sera from patients sensitized to *Aspergillus*, as reported by other authors [2,15,16], but particularly in ABPA patients since anti-Asp f 1 antibodies were detected in 100 % of patients (Table 2). This finding provides additional evidence to support the screening of human sera for anti-Asp f 1 antibodies as a valuable tool to improve the ABPA diagnosis.

The three other proteins studied [Asp f 1  $\Delta$ (7-22),  $\alpha$ -sarcin, and  $\alpha$ -sarcin  $\Delta$ (7-22)] showed a marked decrease in their reactivity to Asp f 1 IgE antibodies, ranging from 23 % to 56 % within the three groups of sera (Table 2B), suggesting their hypoallergenic character. In this regard,  $\alpha$ -sarcin  $\Delta$ (7-22) is the most remarkable since it displayed the largest reduction of IgE-binding and this indeed occurred for most of the sera (specially for those from cystic fibrosis and ABPA patients) (Table 2B & C).

Many of the sequence differences found between Asp f 1 and  $\alpha$ -sarcin are located at the NH<sub>2</sub>-terminal  $\beta$ -hairpin (Figure 1C). Both proteins differ in only 20 amino acids (86.7 % of identity; the recombinant Asp f 1 used in this study contains one extra Val residue at position 2, which is absent in the natural protein; Figure 1C). Five of these changes are located within the 16 residues of the deleted region. Thus, the amino acid sequence identity is reduced to 68.8 % in this  $\beta$ -hairpin structure. As it can be observed in Table 2 and Figure 9, Asp f 1  $\Delta$ (7-22) shows a diminished reactivity to IgE, indicating that the deleted portion is involved in at least one allergenic epitope. However, this is not the only important allergenic epitope within this molecule, as can be deduced from the ELISA-inhibition experiments (Figure 9). There are other epitopes in Asp f 1 that are absent in wild-type  $\alpha$ -sarcin, since

the response against the sera of the patients is still lower for the latter than for the Asp f 1  $\Delta$ (7-22) mutant (Table 2 and Figure 9). Many of them would be indeed conformational epitopes as shown by the clear reduction in IgE recognition to these proteins after being reduced (Figure 8). Regarding  $\alpha$ -sarcin  $\Delta$ (7-22), it displayed the lowest response against Asp f 1-specific IgE since it lacks the NH<sub>2</sub>-terminal  $\beta$ -hairpin as well as some of the other Asp f 1 epitopes responsible for the different IgE reactivity found for wild-type  $\alpha$ -sarcin. In this case, half of the Asp f 1-positive allergic asthmatic patients showed a reduction higher than 50 % in binding to their IgE antibodies, but the number of patients increased to 70-90 % in the other two groups (those ones with ABPA or cystic fibrosis) (Table 2C). This effect was confirmed when inhibition ELISA were performed with the randomized pool of sera (Figure 9). The relevance of these observations is reinforced taking into account that the three protein variants still retained enough antigenic properties as to be recognized by polyclonal antibodies raised against wild-type Asp f 1 (Figure 2).

In summary,  $\alpha$ -sarcin, which can be considered as a natural variant of the major allergen Asp f 1, shows a remarkable lower IgE-binding capability but it is cytotoxic. The two deletion mutant variants genetically engineered have lost their cytotoxicity and the deleted NH<sub>2</sub>-terminal  $\beta$ -hairpin has been revealed as a significant allergenic region of Asp f 1. In spite of this decreased IgE reactivity, their prevalence remains essentially non-affected and they still retain IgG epitopes. Thus, both variants would potentially be suitable molecules to be employed in immunomodulating therapies in *Aspergillus* hypersensitivity, since they accomplished the requirements of retaining the immunogenic response against IgG but showing a highly diminished reactivity to IgE. In addition, they can be purified to homogeneity in large amounts. The feasibility of using these molecules with these purposes in the near future seems promising and would deserve to be *in vivo* explored.

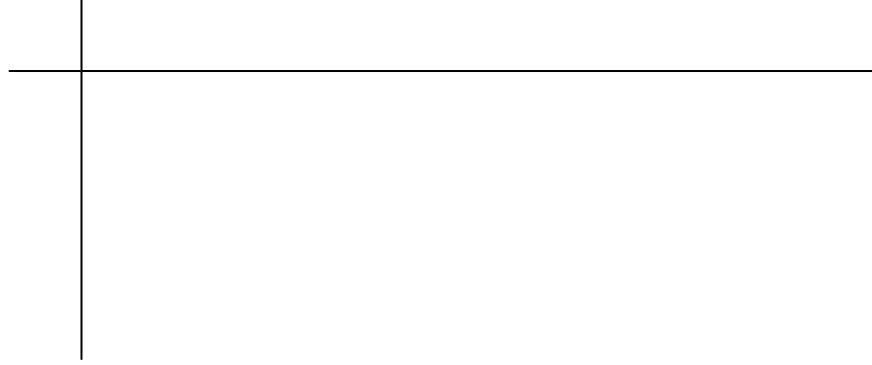
This work was supported by grant BMC2003-03227 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain).

## REFERENCES

1. Olmo, N., Turnay, J., González de Buitrago, G., López de Silanes, I., Gavilanes, J.G. and Lizarbe, M.A. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**, 2113-2123
2. Kao, R., Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, A., Cramer, R. and Davies, J. (2001) *Methods Enzymol.* **341**, 324-335
3. Endo, Y. and Wool, I.G. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 9054-9060
4. Correll, C.C., Wool, I.G. and Munishkin, A. (1999) *J. Mol. Biol.* **292**, 275-287
5. Gasset, M., Mancheño, J.M., Lacadena, J., Turnay, J., Olmo, N., Lizarbe, M.A., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M. and Gavilanes, J.G. (1994) *Curr. Topics Peptide Prot. Res.* **1**, 99-104
6. Yang, X. and Moffat, K. (1996) *Structure* **4**, 837-852
7. Pérez-Cañadillas, J.M., Santoro, J., Campos-Olivas, R., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Gavilanes, J.G., Rico, M. and Bruix, M. (2000) *J. Mol. Biol.* **299**, 1061
8. Steyaert, J. (1997) *Eur. J. Biochem.* **247**, 1-11
9. Martínez-Ruiz, A., García-Ortega, L., Kao, R., Lacadena, J., Oñaderra, M., Mancheño, J.M., Davies, J., Martínez del Pozo, A. and Gavilanes, J.G. (2001) *Methods Enzymol.* **341**, 335-351
10. García-Ortega, L., Lacadena, J., Mancheño, J.M., Oñaderra, M., Kao, R., Davies, J., Olmo, N., Martínez del Pozo, A. and Gavilanes, J.G. (2001) *Protein Sci.* **10**, 1658-1668

11. García-Ortega, L., Masip, M., Mancheño, J.M., Oñaderra, M., Lizarbe, M.A., García-Mayoral, M.F., Bruix, M., Martínez del Pozo, A. and Gavilanes, J.G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 18632-18639
12. García-Mayoral, M.F., García-Ortega, L., Lillo, M.P., Santoro, J., Martínez del Pozo, A., Gavilanes, J.G., Rico, M. and Bruix, M. (2004) *Prot. Sci.* **13**, 1000-1011
13. Moser, M., Cramer, R., Menz, G., Schneider, T., Dudler, T., Virchow, C., Gmachl, M., Blaser, K. and Suter, M. (1992) *J. Immunol.* **149**, 454-460
14. Kurup, V.P., Shen, H.D. and Vijay, H. (2002) *Int. Arch. Allergy Immunol.* **129**, 181-188
15. Greenberger, P.A. (2002) *J. Allergy. Clin. Immunol.* **110**, 685-692
16. Banerjee, B. and Kurup, V.P. (2003) *Front. Biosci.* **8**, s128-s139
17. Valenta, R. and Kraft, D. (2002) *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 718-727
18. Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
19. Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Barbero, J.L., Mancheño, J.M., Gasset, M., Oñaderra, M., López-Otín, C., Ortega, S., García, J.L. and Gavilanes, J.G. (1994) *Gene* **142**, 47-51
20. Martínez-Ruiz, A., Kao, R., Davies, J. and Martínez del Pozo, A. (1999) *Toxicol.* **37**, 1549-1563
21. Kunkel T.A., Roberts, J.D. and Zakour, R.A. (1987) *Methods Enzymol.* **154**, 367-382
22. García-Ortega, L., Lacadena, J., Lacadena, V., Masip, M., de Antonio, C., Martínez-Ruiz, A. and Martínez Del Pozo, A. (2000) *Lett. Appl. Microbiol.* **30**, 298-302
23. Beckett, W.J. and Schellman, J.A. (1987) *Biopolymers* **26**, 1859-1877
24. Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Martínez-Ruiz, A., Pérez-Cañadillas, J.M., Bruix, M., Mancheño, J.M., Oñaderra, M. and Gavilanes, J.G. (1999) *Proteins* **37**, 474-484
25. Tejera, M.L., Villalba, M., Batanero, E. and Rodríguez, R. (1999) *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**, 797-802
26. De Antonio, C., Martínez del Pozo, A., Mancheño, J.M., Oñaderra, M., Lacadena, J., Martínez-Ruiz, A., Pérez-Cañadillas, J.M., Bruix, M. and Gavilanes, J.G. (2000) *Proteins* **41**, 350-361
27. Pérez-Cañadillas, J.M., Guenneugues, M., Campos-Olivas, R., Santoro, J., Martínez del Pozo, A., Gavilanes, J.G., Rico, M. and Bruix, M. (2002) *J. Biomol. NMR* **24**, 301-316
28. Olson B.H. and Goerner, G.L. (1965) *Appl. Microbiol.* **13**, 314-321.
29. Kurup, V.P., Banerjee, B., Murali, P.S., Greenberger, P.A., Krishnan, M., Hari, V. and Fink, J.N. (1998) *Peptides* **19**, 1469-1477
30. Madan, T., Priyadarsiny, P., Vaid, M., Kamal, N., Shah, A., Haq, W., Katti, S.B. and Sarma, P.U. (2004) *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **11**, 552-558
31. Gasset, M., Mancheño, J.M., Laynez, J., Lacadena, J., Fernández-Ballester, G., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M. and Gavilanes, J.G. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1252**, 126-134
32. Koradi, R., Billeter, M. and Wütrich, K. (1996) *J. Mol. Graph.* **14**, 51-55
33. Sacco, G.K., Drickamer, I.G. and Wool, I.G. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 5811-5818





## **Discusión**





Se denomina “ingeniería de proteínas” a la manipulación de la secuencia de aminoácidos de una proteína mediante técnicas de genética molecular, tratando de modificar de manera consciente sus propiedades, ya sean funcionales o estructurales, y sus características enzimáticas, químicas o físicas. Esta metodología no es, sin embargo, sino una copia de lo que la evolución ha ido generando, desde, por ejemplo, la adaptación de moléculas a condiciones extremas, hasta la unión o separación de dominios diferentes o complementarios funcionalmente.

La metodología que se ha manejado en este estudio se basa en estos conceptos. La ingeniería de proteínas nos ha servido para avanzar en el conocimiento acerca de las diferencias existentes entre las ribotoxinas, y entre éstas y otras RNAsas microbianas no tóxicas, además de caracterizar un dominio funcional de esta familia, el extremo amino-terminal. Por último, el conjunto de estos resultados ha permitido también iniciar un proyecto con vistas a su aplicación con fines terapéuticos en el tratamiento de enfermedades como la alergia.

### **Producción heteróloga de formas recombinantes de $\alpha$ -sarcina y RNasa U2**

A la hora de modificar proteínas y aislarlas con suficiente pureza y rendimiento, es crítico disponer de un buen sistema heterólogo de producción. Por ello, y durante un periodo de tiempo no despreciable, durante el inicio del trabajo recogido en esta Memoria se dedicó un gran esfuerzo a la mejora de los métodos ya existentes.

Así, en el caso de la  $\alpha$ -sarcina se consiguió incrementar el rendimiento de la purificación hasta, en algunos casos, cuatro veces, sin más que alterar el entorno redox del citoplasma celular de las bacterias. Para ello se utilizó un plásmido que sobreexpresa la tiorredoxina (Yasukawa et al, 1995) que rindió excelentes resultados (en esta Memoria: García-Ortega et al, 2000) ya que se purifica a homogeneidad una cantidad de proteína que oscila entre 6 y 8 mg por litro de cultivo original. Este sistema fue el que luego se empleó, también satisfactoriamente, con el resto de los mutantes de  $\alpha$ -sarcina que se describen en los apartados posteriores de esta Memoria.

En el caso de la RNasa U2, primeramente se agotaron todas las posibilidades de producción en *E. coli*, explorando aquellas que todavía no habían sido probadas con anterioridad (Martínez Ruiz, 2000) confirmándose que éste no era el sistema adecuado. Por tanto, se utilizó finalmente *P. pastoris*, si bien se mejoró, tanto el sistema de producción puesto a punto anteriormente, como el método de purificación que se venía utilizando (Martínez Ruiz, 2000). En cuanto a este segundo aspecto, se introdujo una cromatografía de afinidad en 2',5'ADP-Sepharose que permitía resolver dos fracciones, una, que no se retenía en la columna y cuya actividad específica era muy baja, y otra que sí era retenida y que, una vez eluida, mostraba unas características enzimáticas muy similares a las de la proteína natural (en esta Memoria: Martínez-Ruiz et al, 2000 y 2001).

En cuanto a la mejora del rendimiento, se optó por cambiar de plásmido utilizando uno de nueva generación, denominado pPIC $\alpha$ A, que se diferenciaba del anterior fundamentalmente en dos características. Primeramente, el péptido señal utilizado para dirigir la proteína al medio extracelular era completamente diferente. En segundo lugar, la selección de las colonias productoras de la proteína recombinante se hacía mediante la utilización de un antibiótico, zeocina, y no mediante el empleo de medios deficientes en nutrientes como la histidina o el metanol. En conjunto, estas modificaciones permitieron la purificación a homogeneidad de una RNasa U2 recombinante, con características espectroscópicas y enzimáticas equivalentes las que presenta la natural, y con un rendimiento de 3,5 mg por litro de cultivo original (Anexo I).

Estos dos sistemas fueron, por tanto, el punto de partida sobre el que se basó el diseño de los distintos mutantes y proteínas quiméricas cuya producción, purificación y caracterización se abordó durante el tiempo dedicado a la obtención del resto de los resultados recogidos en esta Memoria.

### **La horquilla amino-terminal de las ribotoxinas**

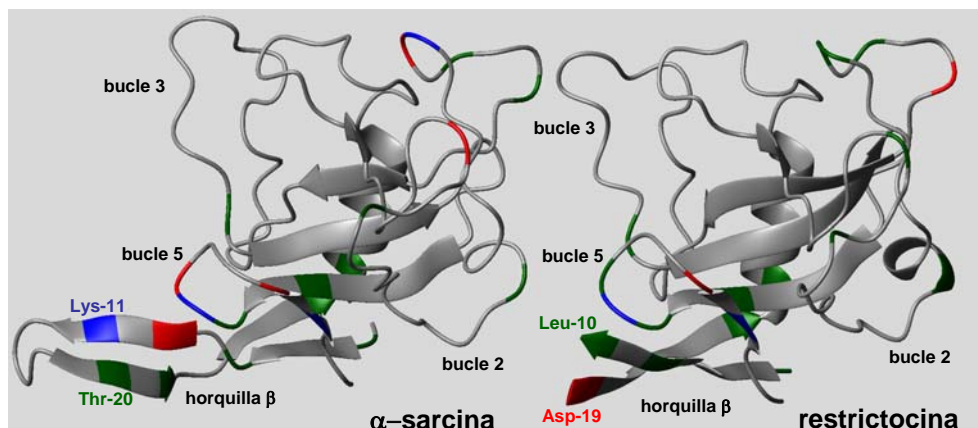
El hecho de que las ribotoxinas presentasen una identidad de secuencia tan elevada y apareciesen en unos géneros tan restringidos del reino de los hongos, hizo pensar que su evolución había sido muy reciente. Sin embargo, el reciente descubrimiento de otras proteínas parecidas, producidas por organismos diferentes, parece indicar una evolución anterior (Martínez-Ruiz et al, 1999a y 1999b). El ejemplo más significativo es la hirsutelina (HtA), considerada como intermedio evolutivo entre las RNasas de la familia de la T1 y las ribotoxinas, aunque aún está sin caracterizar exhaustivamente (Martínez-Ruiz et al, 1999b). No son las únicas ribonucleasas que se secretan por organismos inferiores, ya que también es el caso de las de las familias T1 y T2, pero sí son las únicas que presentan actividad citotóxica por su capacidad de internarse en las células diana y su actividad tan específica y eficaz frente al ribosoma, del mismo modo que lo hacen la mayoría de las RIP descritas. Es decir, no sólo habrían adquirido funciones adicionales a las que ya presentan las RNasas microbianas tipo T1, dando lugar a una semejanza con las RIP en cuanto a su función biológica (probablemente de defensa), sino que, al mantener la actividad ribonucleolítica intrínseca, podrían también ejercer la correspondiente a estas RNasas extracelulares, como la movilización de fosfato extracelular en momentos de estrés nutricional.

La rica funcionalidad de las ribotoxinas hace que, aunque llevan siendo estudiadas desde hace mucho tiempo, aún queden aspectos sin resolver; especialmente aquellos que son importantes con vistas a su posible utilización terapéutica. Su mecanismo ribonucleolítico, su actividad tan específica frente a un sustrato tan esencial para la síntesis de proteínas *in vivo*, y su interacción con membranas, son aspectos que no están suficientemente explicados. La demostración de que poseían un centro catalítico prácticamente idéntico al del resto de RNAsas tipo T1 fue uno de los primeros pasos que se dieron desde el punto de vista de la ingeniería de proteínas (Lacadena et al, 1999). Demostración que fue inducida por los resultados obtenidos al comparar la secuencia y estructura de las ribotoxinas con las RNAsas de la familia T1. Los residuos en esta zona, y en especial los considerados catalíticos, se conservan en los dos grupos de proteínas, así como la lámina  $\beta$  central que los soporta (Figuras 1 y 3A). Sin embargo, esto por sí solo no explica la funcionalidad *in vivo* de estas proteínas, ya que sus parámetros enzimáticos como ribonucleasas inespecíficas corresponden a los de una enzima muy pobre y, en principio, estos residuos, protegidos en la estructura global de las ribotoxinas, no parecían ser los responsables de la interacción con membranas y con el ribosoma.

Una vez que se resolvió la estructura tridimensional de las dos ribotoxinas más estudiadas, la  $\alpha$ -sarcina y la restrictocina (Campos-Olivas et al, 1996a, 1996b; Yang y Moffat, 1996; Pérez-Cañadillas et al, 2000), se realizaron estudios más detallados en cuanto a las diferencias existentes entre ellas y las RNAsas de tipo T1. Es llamativa la presencia de bucles largos en las zonas expuestas de las ribotoxinas, así como la flexibilidad conformacional de algunos de ellos, lo que se deduce de los trabajos de dinámica estructural y de los 22 confórmeros de la  $\alpha$ -sarcina, obtenidos de los mapas de resonancia magnética nuclear por el grupo de la doctora M. Bruix (Figura 11) (Pérez-Cañadillas et al, 2000 y 2002). La comparación de la secuencia y la estructura de estas dos ribotoxinas que, además, representan la mayor variabilidad dentro del grupo (22 cambios entre ellas, un 85% de identidad de secuencia), permitió determinar que las principales diferencias se localizaban en la horquilla amino-terminal y en los bucles 2 y 5 (Figuras 9B y 14). Estas eran, también, las zonas de mayor flexibilidad, hasta tal punto que la región más expuesta de la horquilla  $\beta$  no pudo ser asignada en el cristal de la restrictocina (Yang y Moffat, 1996). La localización de este extremo amino-terminal en la molécula, cuya estructura parece prácticamente independiente del resto, y esta flexibilidad, podrían ser las responsables de que este elemento participase en el reconocimiento del ribosoma, de las membranas lipídicas o de ambos. Además, la variabilidad de secuencia en esta zona, y ciertas diferencias que se habían observado entre miembros de la familia tanto a nivel inmunológico (Conde et al, 1978; Salvarelli et al, 1994) como de interacción con membranas (resultados no publicados obtenidos en nuestro laboratorio), hicieron plantearse si algunos de estos residuos de esta región estarían implicados en la funcionalidad de estas proteínas.

De los 8 cambios que aparecen entre la restrictocina y la  $\alpha$ -sarcina en esta horquilla  $\beta$ , se estudiaron los menos conservados, esto es K11 y T20 en la  $\alpha$ -sarcina, correspondientes a L10 y D19 en la restrictocina. Para ello, se obtuvieron las variantes K11L, T20D y K11L/T20D de la  $\alpha$ -sarcina. Como control se utilizaron ambas proteínas silvestres (en esta Memoria: García-Ortega et al, 2001). Tras comprobarse que estos cambios puntuales no modificaban la estructura global de la proteína (Tablas 1 y 3, Fig. 2 y 3, en García-Ortega et

al, 2001), se analizaron a fondo sus características funcionales. Como ya se había demostrado previamente, estas dos ribotoxinas no presentaron diferencias significativas en cuanto a su actividad específica frente a ribosomas eucariotas (Fando et al, 1985), indicando que este reconocimiento no está drásticamente mediado por estos residuos. Sin embargo, sí aparecieron diferencias relacionadas con la actividad inespecífica frente a sustratos del tipo de poli(A), siendo ésta significativamente menor para el caso de la restrictocina. De acuerdo con esto, las variantes de la  $\alpha$ -sarcina presentaron también diferente actividad en este sentido (Fig. 4 en García-Ortega et al, 2001). La explicación en este caso sería que aunque el reconocimiento del sustrato esté mediado, principalmente, por los residuos del centro activo y, aunque los residuos alterados se encuentran lejos de éste, en la estructura de la  $\alpha$ -sarcina se observan contactos específicos entre la horquilla amino-terminal, el bucle 5 y el centro activo. Esencialmente, se establece un puente salino entre K11 y D140 (bucle 5) y un puente de hidrógeno entre la histidina catalítica H137 y G143 (bucle 5) (Pérez Cañadillas, 1999) (Fig. 6 en García-Ortega et al, 2001). Sutiles variaciones en esta red de interacciones podrían afectar al acoplamiento del sustrato en el centro activo, así como a la posición relativa de la His-137, esencial para la catálisis.



**Figura 14: Diferencias secuenciales en las estructuras de la  $\alpha$ -sarcina y la restrictocina.** Se señalan los residuos que son diferentes entre ambas, en rojo los que tienen carga negativa: Asp y Glu, en azul con carga positiva: Arg, His y Lys, y en verde los residuos sin carga, tanto polares como hidrofóbicos.

El hecho de que estas supuestas pequeñas alteraciones del centro activo no produzcan ningún efecto cuando se usan ribosomas como sustrato no debe extrañar, pues, al fin y al cabo, los residuos mutados se han sustituido por los equivalentes de otra ribotoxina. En definitiva, ambas proteínas silvestres,  $\alpha$ -sarcina y restrictocina, inactivan el ribosoma con parecida eficacia e idéntica especificidad. Además, hay indicios de que la conformación de estas proteínas en su forma libre es distinta de aquella que presentan unidas al sustrato. Por ejemplo, como se explica en la Introducción de esta Memoria, se ha obtenido una estructura cristalina correspondiente a un complejo formado entre un oligoribonucleótido análogo del SRL y la restrictocina (Yang et al, 2001). Pese a que corresponde a una forma

en la que el sustrato no está correctamente colocado (por eso no se hidroliza), permite observar como incluso en dicho cristal aparecen ligeras variaciones en la estructura de la proteína con respecto a la de su forma libre. Por ejemplo, la horquilla amino-terminal es presumiblemente más estática, lo que sí permite su visualización en el complejo (Figura 7C); algo que no es posible en el cristal de la proteína aislada (Yang et al, 2001). Esta situación tiene que ser, además, mucho más compleja cuando se trate del ribosoma completo, pues se pueden dar un mayor número de interacciones. Es posible, por tanto, que un cambio conformacional a ese nivel neutralizase esas pequeñas diferencias relacionadas con el centro activo de las distintas ribotoxinas.

En cambio, sí aparecieron diferencias más marcadas a nivel de la interacción con membranas (Tabla 3 y Fig. 5 en García-Ortega et al, 2001). En los ensayos con vesículas modelo, la restrictocina fue cuantitativamente menos activa a la hora de producir la agregación y la liberación de los contenidos acuosos de las mismas, traducándose en una menor citotoxicidad frente a células tumorales diana en cultivo. Además, el hecho de que las variantes obtenidas también presentaran estos parámetros alterados, es señal de la implicación de esta zona en dicha interacción con lípidos ácidos y, por tanto, con las membranas biológicas. Teniendo en cuenta que el primer paso en la interacción es una unión de tipo electrostático, parece fácilmente explicable el hecho de que esta zona de la proteína, muy expuesta, y con carácter cargado, esté implicada. En este sentido, los cambios introducidos producen una variación local de la carga de la proteína, dando lugar, probablemente, a las diferencias observadas (Fig. 6 en García-Ortega et al, 2001). Sin embargo, la horquilla amino-terminal de las ribotoxinas no es esencial para su interacción con las membranas, como se vio, y se mencionará más adelante, con los estudios de la variante de delección (en esta Memoria: García-Ortega et al, 2002). Por otro lado, el hecho de que no sea imprescindible, está de acuerdo con las hipótesis planteadas anteriormente, en las que el bucle 2, el más largo de las ribotoxinas y con elevada carga positiva (Figuras 5 y 9B), aparece con candidato principal, al menos para el primer contacto de tipo electrostático (De Antonio et al, 2000; Masip et al, 2001) (Fig. 6 en García-Ortega et al, 2002).

Por lo tanto, las sutiles diferencias funcionales entre las ribotoxinas se pueden explicar en parte recurriendo a cambios puntuales observados en su horquilla  $\beta$  amino-terminal. En esta primera parte del trabajo, quedaría entonces demostrada la implicación de dos residuos, Lys-11 y Thr-20, en la funcionalidad de la  $\alpha$ -sarcina. En concreto, el cambio K11L parece, en gran parte, responsable de una menor actividad ribonucleolítica inespecífica por parte de la restrictocina, así como una menor capacidad de interacción con vesículas lipídicas y consecuente citotoxicidad. Si observamos todas las secuencias de las ribotoxinas obtenidas hasta la fecha, la sustitución K11L sólo aparece en tres de ellas, restrictocina, mitogilina y Asp f 1, que forman el subgrupo dentro de las ribotoxinas más alejado de la  $\alpha$ -sarcina (Figura 9A). Sin embargo la clavina que, a pesar de diferenciarse de la  $\alpha$ -sarcina en 18 residuos, se encuentra en su mismo grupo filogenético, sí que posee Lys y Thr en las posiciones 11 y 20. Podría ser, por tanto, un buen candidato para corroborar estos resultados, aunque los datos que aparecen en la bibliografía con ella son escasos para este tipo de análisis. En términos evolutivos, y ya que no se puede asegurar cuál de estos subgrupos apareció primero, se pueden plantear dos hipótesis. En la primera, la mutación K11L habría aparecido junto con alguna otra complementaria, como por ejemplo D9Q o

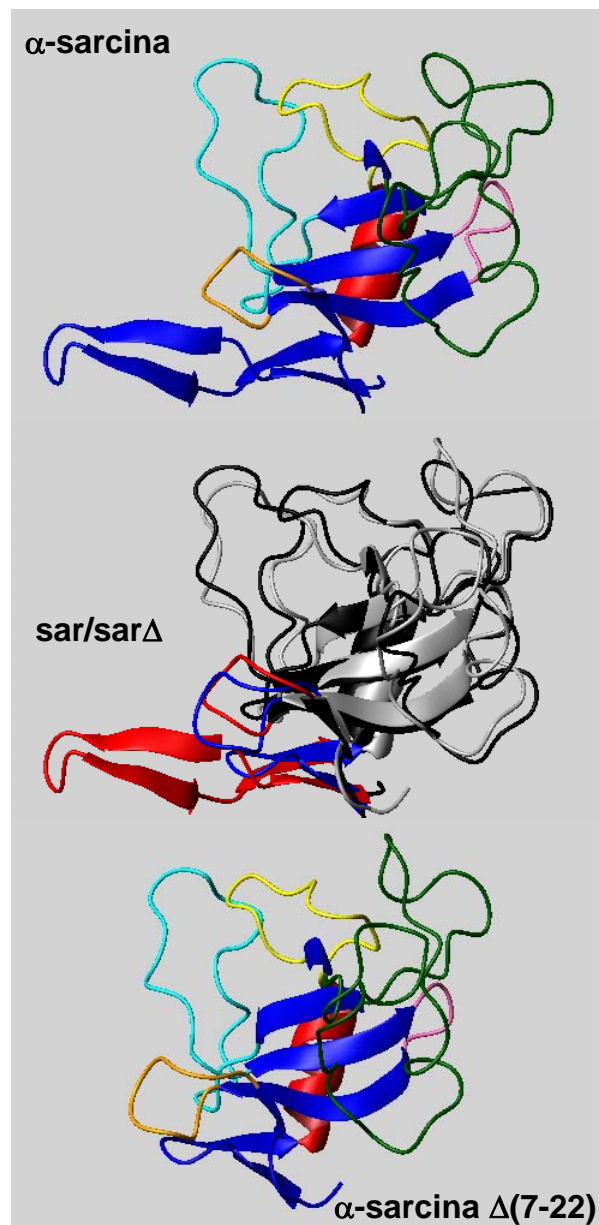
T20D para compensar sus efectos. Otra posibilidad sería que el subgrupo de la  $\alpha$ -sarcina hubiera evolucionado desde la restrictocina, mediante la introducción de este residuo, convirtiéndose así en más potente en cuanto a toxicidad.

Tras la obtención de este primer grupo de resultados, se pudo deducir que la horquilla  $\beta$  amino-terminal de la ribotoxinas, ausente en el resto de RNAsas microbianas no tóxicas, es una región importante para el mantenimiento de la funcionalidad citotóxica específica de estas proteínas. Por lo tanto, como segunda aproximación se planteó su delección. Comparando las estructuras y secuencias de las RNAsas microbianas no tóxicas, U2 y T1, con la de la  $\alpha$ -sarcina, la zona adicional correspondía a la segunda lámina  $\beta$  antiparalela junto con el giro  $\beta$ , siendo éstos los residuos más expuestos al medio (en esta Memoria: García-Ortega et al, 2002). La variante obtenida, denominada  $\alpha$ -sarcina  $\Delta(7-22)$ , tiene sustituida la secuencia aminoacídica 7-22 por dos Gly, tal y como aparece en la RNasa U2 (Figuras 5 y 9B) (Fig. 1 en García-Ortega et al, 2002). Recientemente, el grupo de la Dra. M. Bruix (Instituto de Química Física Rocasolano, CSIC) ha resuelto su estructura por RMN, corroborando los resultados que aquí se presentan, en el sentido de que el mutante aislado mantiene la estructura global de la  $\alpha$ -sarcina (Fig. 2, 3 y 4 en García-Ortega et al, 2002), asumiéndose que su conformación es independiente de la del resto de la molécula en términos generales (Figura 15) (García-Mayoral et al, 2004). Esta estructura y las interacciones puntuales que de ella se pueden extraer permiten ahora explicar con detalle los resultados funcionales obtenidos en este trabajo de investigación.

En primer lugar, la mayor actividad ribonucleolítica de esta variante  $\Delta(7-22)$  frente a sustratos inespecíficos del tipo de poli(A) o dinucleótidos como ApA (Fig. 5 y 6 en García-Ortega et al, 2002), se puede explicar recurriendo a los cambios que se producen en las interacciones intramoleculares, ya comentadas, que conectan la horquilla  $\beta$  con el centro activo a través del bucle 5, corroborados ahora con la resolución de la estructura por RMN. Del mismo modo, las variaciones en el mecanismo catalítico, más parecido al de la RNasa U2, al dar lugar a la acumulación del intermedio cíclico, tienen su origen en estos mismos cambios (Tabla I y Fig. 6 en García-Ortega et al, 2002). De hecho, el bucle 5 presenta una mayor flexibilidad en la  $\alpha$ -sarcina  $\Delta(7-22)$  que en la proteína completa y deja el centro activo más accesible al disolvente como ocurre en las ribonucleasas T1 y U2 (Figura 15) (García-Mayoral et al, 2004). Una de las interacciones que desaparecen en el mutante es el puente de hidrógeno entre el residuo catalítico H137 y N8, lo que probablemente estabilice la forma catiónica de la histidina, favoreciéndose de esta forma la primera semireacción del mecanismo catalítico (Figura 4).

En cuanto a la interacción con membranas, el efecto que produce la eliminación de la horquilla  $\beta$  no es tan significativo como cabría esperar del estudio previo con variantes individuales en esta región (Fig. 5 y Fig. 7 en García-Ortega et al, 2001 y 2002, respectivamente). La agregación y la ruptura de vesículas ácidas modelo es más lenta y alcanza valores menores que con la proteína completa, pero el efecto final permite deducir que no es un dominio esencial para esta función. Probablemente, la pérdida de esta zona de la proteína se compense con una mayor dinámica rotacional en la variante de delección (García-Mayoral et al, 2004), favoreciéndose la interacción a través de la otra zona propuesta, el bucle 2. Por lo tanto, la poca citotoxicidad que presenta este mutante (Fig. 8 en García-Ortega et al, 2002) se correlacionaría mejor con su incapacidad para inactivar los ribosomas de las células diana que con defectos en el proceso de endocitosis donde la

interacción con membranas sí jugaría un papel esencial. Aun así, este proceso endocítico no ha sido objeto de estudio en este trabajo por lo que no se puede descartar que también se vean afectadas las distintas etapas implicadas hasta la llegada de la proteína tóxica al citosol.



**Figura 15: Comparación de las estructuras de la  $\alpha$ -sarcina y la variante  $\alpha$ -sarcina  $\Delta(7-22)$ .** Los colores siguen el patrón de las Figuras 3 y 5. En la superposición (sar/sar $\Delta$ ) aparece la  $\alpha$ -sarcina en color negro y la variante de delección en gris. Se señalan las regiones sensiblemente diferentes: la horquilla amino-terminal y el bucle 5 (rojo para la  $\alpha$ -sarcina y azul para la  $\alpha$ -sarcina  $\Delta(7-22)$ ). Las coordenadas provienen del PDB: 1DE3 para la  $\alpha$ -sarcina (Pérez-Cañadillas et al, 2000) y 1R4Y para la  $\alpha$ -sarcina  $\Delta(7-22)$  (García-Mayoral et al, 2004).



Sin lugar a dudas, el resultado más importante y llamativo fue la pérdida de citotoxicidad debida a la falta del reconocimiento específico del ribosoma que tan característico es de la proteína silvestre. Es decir, la delección no afecta a la interacción con vesículas modelo de forma drástica, de forma que no es esencial para la interacción con membranas, pero sí es clave a la hora de ejercer su actividad ribonucleolítica sobre el enlace fosfodiéster característico del lazo sarcina/ricina cuando forma parte de un ribosoma (Fig. 5 en García-Ortega et al, 2002). Este resultado cobra mayor importancia si se considera que la proteína mutada no ha perdido su capacidad ribonucleolítica, como se ha comentado, porque no sólo sigue siendo capaz de degradar sustratos menos específicos como poli(A) o ApA, sino que reconoce y degrada específicamente el oligo de 35-mer que mimetiza la estructura del SRL (Fig. 5 y 6 en García-Ortega et al, 2002). El hecho de que la delección no modifique la interacción  $\alpha$ -sarcina-SRL estaría, sin embargo, de acuerdo con resultados como los obtenidos tras la modelización de la interacción  $\alpha$ -sarcina-SRL a partir de las estructuras de ambos por separado (Pérez Cañadillas, 1999), o la cristalización de complejos de restrictocina-SRL (aunque éstos correspondan a formas mal acopladas) (Yang et al, 2001), ya que en ambos modelos, la horquilla amino-terminal aparece muy alejada de la molécula de RNA (Figura 7C). Además, a pesar de la red de interacciones intramoleculares en la que está implicada, que llegan a afectar a residuos del centro activo, ésta es una de las zonas de secuencia más variable dentro de las ribotoxinas, sin que estas variaciones puntuales parezcan afectar significativamente al reconocimiento del ribosoma por parte de distintas ribotoxinas como se ha demostrado aquí al comparar la  $\alpha$ -sarcina y la restrictocina (García-Ortega et al, 2001), y como ya habían indicado otros autores (Salvarelli et al., 1994). En la estructura del mutante  $\alpha$ -sarcina  $\Delta(7-22)$  sí se observan variaciones sutiles de los bucles 3 y 5, ambos propuestos como los responsables del reconocimiento del SRL a nivel de la G prominente, pero los resultados demuestran que estos cambios no son suficientes para alterar el comportamiento específico de la proteína a este nivel (Figura 15). No parece, por tanto, que el papel de la horquilla  $\beta$  corresponda a una interacción específica de secuencia, ni tampoco directamente relacionada con el SRL. Estos resultados sugieren una hipótesis según la cual serían otros contactos por parte de esta zona con otras del ribosoma, proteicas o no, y próximas al SRL, las responsables del reconocimiento específico de los ribosomas por parte de las ribotoxinas. Dado que la secuencia de la zona eliminada varía bastante de unas ribotoxinas a otras (Figura 9B), cabe esperar que la zona del ribosoma que reconoce no mantenga tampoco una estricta conservación de secuencia a este nivel, sino que, más bien, se conserve en cuanto a conformación específica. Es decir, la protuberancia en la estructura de las ribotoxinas originada por esta horquilla  $\beta$  favorecería, bien por impedimentos estéricos o bien por el establecimiento de interacciones específicas con ciertas regiones del ribosoma, la orientación necesaria de la molécula para ejercer su acción sobre el SRL.

### **La interacción con el ribosoma**

En el trabajo recogido en esta Memoria no se incluyen experimentos en los que se estudie la interacción de las ribotoxinas con los ribosomas, salvo los distintos ensayos de actividad frente a lisados de reticulocitos. Sin embargo, los datos aquí presentados y la gran

cantidad de información existente sobre la estructura y modo de acción del ribosoma permiten profundizar en este estudio y establecer modelos que expliquen esta interacción con bastante rigor, modelos que puedan ser utilizados como hipótesis de partida en posteriores trabajos.

La biosíntesis de proteínas es un proceso dinámico en el que el ribosoma juega un papel crucial, ya que es la plataforma a la que se unen las distintas moléculas que participan en la formación del enlace peptídico (mRNA, tRNA, factores de iniciación, elongación y terminación) además de aportar elementos que son esenciales, como el propio rRNA y algunas de las proteínas ribosomales (Figura 10). Así, durante el proceso de traducción se dan toda una serie de reacciones, interacciones, y cambios conformacionales, que afectan a las relaciones establecidas entre todas las macromoléculas implicadas incluyendo la interacción entre ambas subunidades (Tama et al, 2003). Entre todos estos acontecimientos moleculares, uno de los más estudiados es el del reconocimiento codón-anticodón en la subunidad pequeña que provoca cambios conformacionales en el complejo ternario aminoacil-tRNA-EF-Tu (o eEF-1 en eucariotas) (factor implicado en la formación del enlace peptídico), necesarios para una eficaz actividad GTPasa y posterior liberación del factor de elongación, siendo todos estos pasos previos necesarios para la formación del enlace peptídico en la subunidad grande (Figura 10). De forma simultánea ocurre un movimiento de cierre de la subunidad pequeña respecto de la grande, que es correcto cuando el reconocimiento codón-anticodón es el adecuado, y que promueve la inducción de los cambios esenciales en la subunidad grande (Ogle et al, 2001; Rodnina y Wintermeyer, 2001). Esta interacción, tan acoplada y dinámica entre las subunidades del ribosoma, se pone de manifiesto al observar el mecanismo de acción de antibióticos como la streptomicina, que produce un defecto en la fidelidad del acoplamiento codón-anticodón tras unirse en la subunidad pequeña, y bloquea estas transiciones conformacionales desencadenando un defecto en la actividad GTPasa del factor de elongación en la subunidad grande.

El SRL, sustrato *in vivo* de las ribotoxinas, se localiza en la subunidad grande ribosomal, en concreto en la región donde se unen los factores de elongación y se cataliza la hidrólisis de GTP, y próximo al centro peptidil-transferasa (donde ocurre la formación del enlace peptídico), y, como se verá a continuación, participa activamente en estos procesos. En cuanto a la hidrólisis de GTP por los factores de elongación, Gromadski y Rodnina (2004) describen que ésta requiere de un residuo esencial en el factor EF-Tu (His84), que debe estar correctamente orientado, orientación que es inducida por diversas interacciones, tanto proteína-proteína, como proteína-RNA. Entre ellas se encuentra la interacción EF-Tu con el complejo proteico L7/L12 (nomenclatura de procariontes) y con el aminoacil-tRNA al que se encuentra unido, pero, además, parece muy probable que los contactos entre el SRL y las regiones "switch" I y II del factor de elongación, donde se localiza el bolsillo de unión al nucleótido, sean esenciales, según la analogía con otras proteínas de unión a GTP. Posteriormente a la hidrólisis de GTP y a la liberación del factor de elongación, se produce la formación del enlace peptídico, cuya catálisis es enteramente dependiente del componente RNA del ribosoma y en la que el SRL también parece formar parte. Rodnina y Wintermeyer (2003) atribuyen esta catálisis a un conjunto de bases del rRNA 23S próximas al lazo sarcina/ricina, diferenciando entre las que participan en la catálisis ácido/base necesaria para la reacción y las que llevan a cabo la catálisis posicional de los extremos

CCA de los tRNA para una correcta formación del enlace. Dentro de este último grupo de bases nitrogenadas se encuentra el par 2588-2589, localizado en el mismo elemento de estructura secundaria que el SRL.

Por otra parte, la interacción directa de los factores de elongación con el lazo sarcina/ricina, ha sido claramente demostrada por otros autores. Por ejemplo, en uno de los trabajos más recientes se ha conseguido un entrecruzamiento entre la secuencia UAG(2655)U de un análogo del SRL y el factor que se une tras la liberación del EF-Tu, el EF-G (el homólogo en eucariotas es eEF-2), necesario para la traslocación de los tRNA y mRNA. Esta secuencia corresponde a la G prominente y al giro S, la zona de reconocimiento de las ribotoxinas (Figura 7) (Chan et al, 2004). Estos datos se han refinado aún más en el entorno del ribosoma, observándose que estos contactos son más fuertes tras la hidrólisis de GTP y la traslocación de los tRNA y mRNA, justo antes de la liberación del factor, corroborando el papel dinámico de estas interacciones (Wilson y Nechifor, 2004). Una función que se le atribuye al lazo sarcina/ricina, en relación con este factor, es la actuar de puente entre sus dominios 1 y 5, siendo el primero el responsable de la función GTPasa y el segundo relacionado con el cambio conformacional del factor necesario para la translocación (Ban et al, 1999; Savelsbergh et al, 2000). La analogía entre los factores EF-G, EF-Tu y el menos estudiado IF-2 en cuanto a la zona de unión al ribosoma y los cambios conformacionales en los que participan (Brandi et al, 2004), presumen una función similar del SRL, esencial en algún paso de la hidrólisis de GTP por parte de estos factores y los movimientos intramoleculares e intermoleculares que se inducen entre ellos y otras partes del ribosoma para el buen funcionamiento de la biosíntesis de proteínas (Figura 10).

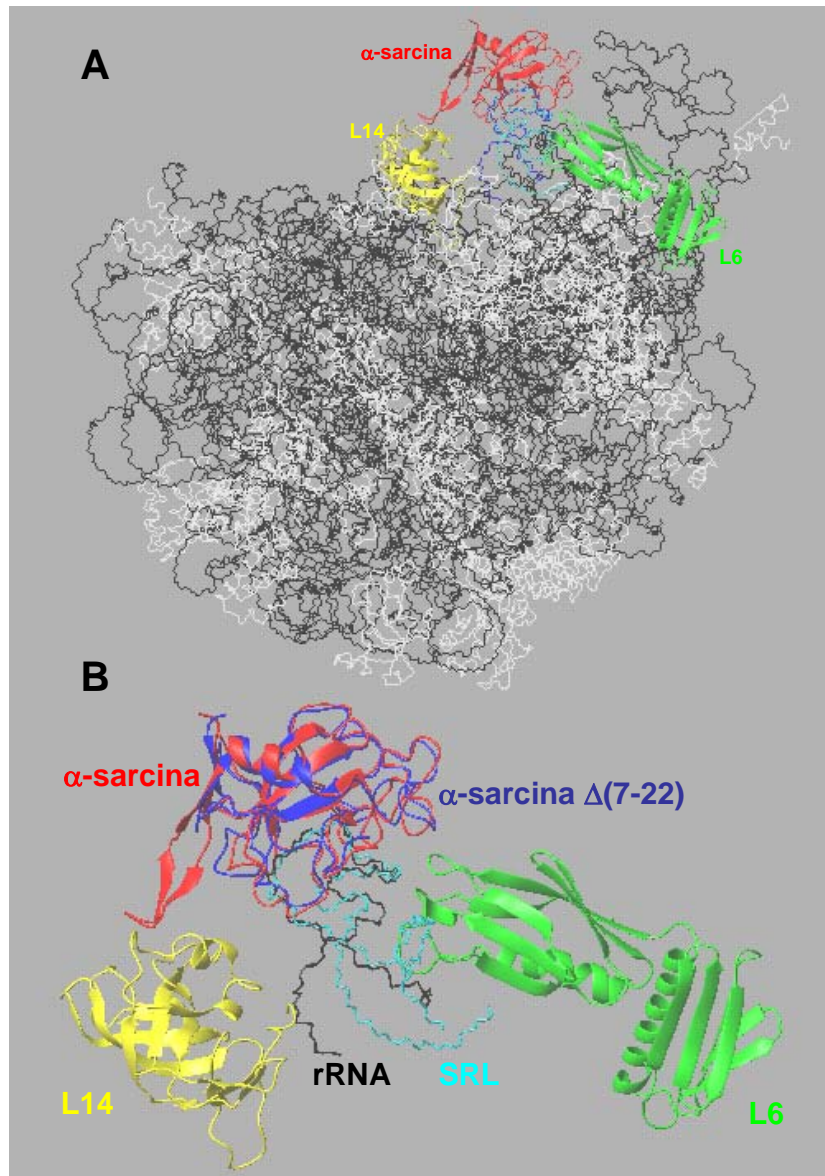
En relación con la acción de las ribotoxinas sobre el SRL en el ribosoma, en un principio podría parecer sorprendente que la rotura de un único enlace fosfodiéster fuera capaz de inactivar por completo el ribosoma. Este hecho es, en realidad, bastante general pues la mayoría de las RIP actúan sobre el mismo sustrato y provocan el mismo efecto, si bien es verdad que, en este caso, el resultado de su acción catalítica es distinto, pues se trata de una despurinización en la misma región estructural de este lazo de RNA (Figura 7B). En este sentido, se han estudiado los efectos sobre el ribosoma derivados de la acción de toxinas como la ricina. Holmberg y Nygard (1996) concluyeron, por ejemplo, que las partículas ribosomales se volvían menos flexibles tras la acción de esta RIP, observándose cambios en la reactividad de dominios del rRNA 28S próximos al SRL.

En cuanto a los cambios en el entorno proteico del SRL, la RIP denominada PAP, por ejemplo, interacciona, a través del bolsillo estructural en el que se localiza su centro activo, con la proteína ribosomal L3, localizada en el centro peptidiltransferasa (Figura 7) (Rajamohan et al, 2001). La cadena A de la ricina lo hace con las proteínas L9 y L10e (L6 y L10 en procariotas) (Vater et al, 1995), favoreciéndose de esta forma su acción inactivante sobre el ribosoma, sin que estas interacciones sean esenciales ya que esta proteína es capaz de producir el mismo efecto, aunque con menor eficacia, sobre el rRNA desnudo. La posición del complejo L10.L7/L12 (P0.P1/P2 en eucariotas) en el centro GTPasa influye en la accesibilidad del SRL a ciertas RIP (Uchiumi et al, 2002), y recientemente se han atribuido cambios en su conformación, a través de la proteína L7 debido a la unión de factores de elongación y la hidrólisis de GTP (Bocharov et al, 2004). L3 y L6 interaccionan con el SRL, incluso con la base donde se produce el corte por las ribotoxinas (Uchiumi et al, 1999), aunque dejando accesible, al menos temporalmente, el tetrabucle completo como se

demuestra con las estructuras obtenidas de diversos ribosomas. Por último, en cuanto a la especificidad de especie que se observa en algunas RIP, ésta parece depender más del factor proteico en el ribosoma que del propio RNA, del mismo modo que ocurre con los factores de elongación (Uchiumi et al, 2002).

Todo lo comentado pone de manifiesto la gran complejidad del sustrato de las ribotoxinas desde el punto de vista estructural debido al gran número de elementos que participan y a la propia dinámica del proceso. Por lo tanto, no es sólo una cuestión de conocer los elementos con los que interactúan estas proteínas, sino también en qué momento ocurren estas interacciones. Sin embargo, en general, se carece de este tipo de estudios con estas proteínas y, en concreto, con la  $\alpha$ -sarcina. Está claro que su capacidad inhibitoria de la biosíntesis de proteínas es dependiente de su actividad ribonucleasa, ya que está ausente en variantes inactivos en el centro catalítico (Lacadena et al, 1999). Así, la competencia que aparece entre los factores de elongación y esta proteína por la unión al ribosoma (Brigotti et al, 1989; Miller y Bodley, 1991), y su posible interacción con otras zonas de éste, no son suficientes, entre otras cosas porque se ha observado que el recambio es muy alto, lo que, además, imposibilita los experimentos de entrecruzamiento o unión al propio ribosoma. A pesar de estar clara la necesidad de la actividad ribonucleasa, la especificidad sigue siendo sorprendente. La hidrólisis de ese enlace en el SRL, al igual que la despurinización de una base en el caso de las RIP, son los causantes de la inhibición de la biosíntesis de proteínas. La causa parece ser una desestabilización de la estructura del SRL, hipótesis que tiene como base la dinámica de esta zona y la posibilidad de encontrarse en conformaciones diferentes en el ribosoma, aunque no está corroborada todavía. Esta desestructuración podría afectar a interacciones tan esenciales como las anteriormente mencionadas con los factores de elongación, los centros GTPasa y peptidil-transferasa, y las proteínas adyacentes, a través de, por ejemplo, efectos de tipo bloqueante o, por el contrario, mediante la relajación de la estructura en su entorno. Por último, lo que en principio parece una acción muy localizada y específica implicaría a todo el ribosoma debido a la íntima conexión de sus subunidades, que utilizan esta región para establecer la comunicación entre ellas.

El trabajo presentado en esta Memoria permite contribuir al esclarecimiento de la razón molecular de su especificidad. Gracias a los modelos moleculares ya mencionados, que simulan la interacción de las ribotoxinas con el SRL mediante su acoplamiento (*docking*) y a las conclusiones extraídas por el grupo de Correll (Yang et al, 2001; Correll et al, 2004), utilizando los complejos cristalizados entre restrictocina y análogos de dicho SRL, se ha podido concluir que el reconocimiento de la G prominente tiene lugar a través de los bucles 1 y 3 de la proteína (nomenclatura de  $\alpha$ -sarcina). Este acoplamiento provoca un cambio conformacional en el RNA, que desestructura el tetrabucle. De esta manera se favorece el ataque en línea por parte del oxígeno nucleofílico 2' y puede tener lugar la rotura correcta del enlace, como ocurre con la RNasa T1. En el ribosoma, el SRL está accesible a la toxina (Figura 7), con el tetrabucle correctamente plegado. La  $\alpha$ -sarcina no necesitaría mucha energía para alterar su conformación. Simplemente el impedimento estérico provocado tras reconocer la G prominente y el giro S provocaría el cambio conformacional mencionado. Parece que, además, ocurre algo similar con la ricina, ya que la conformación del SRL acomplejado con ella es distinta a la que muestra en el ribosoma (Weston et al, 1994; Yang et al 2001).



**Figura 16: Modelo de acoplamiento de las estructuras de la  $\alpha$ -sarcina y  $\alpha$ -sarcina  $\Delta(7-22)$  con la subunidad grande del ribosoma.** El ajuste en ambos casos se llevó a cabo con un primer paso de acoplamiento de la proteína al análogo de SRL y un segundo utilizando ese complejo y superponiéndolo con el ribosoma en la región del tetrabucle del SRL. Se señalan las proteínas ribosomales más próximas a la ribotoxina. El modelo fue realizado por el grupo de la Dra. Bruix (Instituto de Química-Física Rocasolano, CSIC) y las siguientes estructuras depositadas en el PDB: 1DE3 ( $\alpha$ -sarcina), 1R4Y ( $\alpha$ -sarcina  $\Delta(7-22)$ ), 430D (SRL sintético de 29 nucleótidos) y 1JJ2 (subunidad grande del ribosoma de *H. marismortui*).

**A.- Vista completa del acoplamiento de la  $\alpha$ -sarcina a la subunidad grande del ribosoma.** En negro aparece el RNA ribosomal, en gris las proteínas ribosomales (excepto L6 y L14), en azul el SRL procedente del ribosoma y en azul claro el análogo del SRL utilizado para el modelo.

**B.- Detalle de las regiones de contacto en el modelo con ambas ribotoxinas ( $\alpha$ -sarcina y la variante de delección).** El SRL del ribosoma aparece en negro y el análogo sintético en azul claro.

Si ahora, utilizando como punto de partida el modelo de acoplamiento propuesto por Pérez-Cañadillas et al (2000), se acopla el complejo  $\alpha$ -sarcina-análogo de SRL a la estructura cristalina del ribosoma de *H. marismortui* (el único cuya conformación se conoce con tan alta resolución), se observa que los elementos del ribosoma que aparecen más próximos a la ribotoxina son las proteínas L6 y L14 (nomenclatura de procariotas) (Figura 7). En concreto, el bucle 2 de la ribotoxina interaccionaría con el giro 5 del dominio carboxilo terminal de la proteína L6, y la horquilla amino-terminal con el bucle 8 de la proteína L14 (Figuras 16 y 17). Las menores distancias encontradas entre  $\alpha$ -sarcina y estas proteínas ribosomales fueron entre Lys84 y Asp85 de la ribotoxina con Tyr88, Ser89, His90, Phe91 y Pro92 de la proteína ribosomal L6 (entre 1.5 y 5 amgstron); y entre Pro13 ( $\alpha$ -sarcina) y Asp99 (L14), Lys11 ( $\alpha$ -sarcina) y Glu100 (L14), Pro13Lys14 ( $\alpha$ -sarcina) y Asn101 Arg105 (L14) (entre 4 y 6 amgstron) (Figura 17). Este modelo explica, en buena parte, los resultados e hipótesis comentados a raíz del estudio de la variante de delección  $\alpha$ -sarcina  $\Delta(7-22)$ , ya que la horquilla  $\beta$  amino-terminal estaría directamente relacionada con el reconocimiento del ribosoma y en una zona distinta de su sustrato catalítico, el SRL, y del rRNA adyacente. Además, a pesar de que aparece otra zona de la proteína también implicada en este reconocimiento, como es el bucle 2, muy alejado en la estructura, al menos la que se da con la horquilla amino-terminal es esencial, ya que con su eliminación se pierde esa capacidad (en esta Memoria: García-Ortega et al, 2002). La posibilidad de que el efecto de la horquilla  $\beta$  sobre el ribosoma sea indirecto, por cambios inducidos en otras zonas de la proteína, queda descartada, ya que las variaciones conformacionales observadas en la estructura del mutante  $\alpha$ -sarcina  $\Delta(7-22)$ , en relación con la molécula completa, como ya se ha comentado previamente, no afectan al bucle 2, al menos en la supuesta región de interacción con el ribosoma (Figura 15) (García-Mayoral et al, 2004). Todo esto se corroboró al construir un segundo modelo, en idénticas condiciones a las del anterior, pero utilizando la estructura de la  $\alpha$ -sarcina  $\Delta(7-22)$ . Como se observa en la Figura 16B, ambos modelos, basados en estructuras reales, sólo se diferencian en la falta de la horquilla amino-terminal en el caso del mutante de delección, y por lo tanto en la zona próxima a la proteína L14, atribuyéndosele de esta manera a la ausencia de dicho contacto la incapacidad de cortar específicamente el lazo sarcina/ricina.

En cuanto a la interacción con la proteína L14, ésta ocurriría, según el modelo, entre zonas no estrictamente conservadas en ambas proteínas (Figura 17). Como ya se ha comentado, la horquilla  $\beta$  es una de las regiones más variables de las ribotoxinas. Y en la proteína ribosomal ocurre algo parecido. A pesar de ser una de las más conservadas a nivel de procariotas y eucariotas, la supuesta zona de contacto con la  $\alpha$ -sarcina es variable dentro de las secuencias que se conocen y no corresponde a ninguna de las descritas como candidatas para la interacción con otras proteínas o RNA (Davies et al, 1996). De hecho, la utilizada para el modelo presentado, procedente de *H. marismortui* (cuyo ribosoma es el mejor caracterizado) tiene un carácter especialmente ácido, anormal en las secuencias homólogas de otros organismos. Teniendo esto en cuenta, así como los resultados frente a ribosomas con los mutantes de la horquilla  $\beta$  amino-terminal presentados en esta Memoria (García-Ortega et al, 2001 y 2002), se podría pensar que la participación de esta región de las ribotoxinas en el reconocimiento del sustrato es la que marca las diferencias observadas en cuanto a la acción de estas proteínas frente a distintos tipos de ribosomas. De hecho, a pesar de que las ribotoxinas se han descrito como capaces

de actuar sobre todos los ribosomas, ya que el SRL se conserva en todas ellas, la  $\alpha$ -sarcina, por ejemplo, actúa más eficientemente frente a ribosomas eucariotas que procariotas aunque, realmente, sólo se han ensayado los procedentes de levaduras, hongos, conejo, rata y *E. coli* (Schindler y Davies, 1977; Endo y Wool, 1982). Como se puede ver en la Figura 17, en todos los eucariotas mencionados se conservan los residuos N-K---K en las posiciones 99, 101 y 105 de la proteína equivalente a la L14 en el modelo del ribosoma de *H. marismortui*, mientras que en *E. coli* sólo se conserva la primera Asn. Este patrón supondría un motivo de reconocimiento común en eucariotas que, además, explicaría la menor eficacia de las ribotoxinas frente a los ribosomas de *E. coli*. No se conocen hasta la fecha datos cuantitativos acerca de su acción frente a ribosomas de otros procariotas. En cuanto a la secuencia de contacto en la horquilla  $\beta$  de las ribotoxinas, los residuos supuestamente implicados se mantienen bastante conservados, a excepción, una vez más, de la Lys-11 (Figura 17), y ello a pesar de la alta variabilidad de secuencia en esta región. Por lo tanto, queda abierta la puerta acerca de que la posible especificidad de la interacción esté mediada, por ejemplo, a través de los residuos Pro-13 y Lys-14. Hay que tener en cuenta, también, que todas las ribotoxinas no causan el mismo efecto, a nivel cuantitativo, frente a los ribosomas, lo que podría ser también el resultado de estas variaciones en la secuencia, no en los residuos supuestamente esenciales, sino en otros próximos a ellos.

	Ribotoxinas				L14		L6			
	Horquilla Nt		bucle 2		bucle 8		giro 5			
	9	15	82	87	99	105	88	92		
$\alpha$ -sarcina	Nt-DQKNPKT	(-)	-H	SKDGN-Ct	Hm	Nt-DENEDPR	Ct	Hm	Nt-YSHFP	-Ct
a-sarcinas	Nt-..	..	(-)	..	Mv	Nt-TPEGT	K-Ct	Mv	Nt-.A...	-Ct
gigantina	Nt-E..	I..	(-)	..	Bs	Nt-.DKS-	..-Ct	Bs	Nt-GVGYR	-Ct
c-sarcina	Nt-E..	..	(-)	..	Ec	Nt-NNS	Q..I-Ct	Ec	Nt-GVGYR	-Ct
clavina	Nt-E..	..	(-)	..	So (Cl)	Nt-.QEGN	K-Ct	Gt (Cl)	Nt-GVGYR	-Ct
restrictocina	Nt-Q..	I..	(-)	..	Cr (Cl)	Nt-NKEGN	..-Ct	At	Nt-.A...	-Ct
mitogilina	Nt-Q..	I..	(-)	..	Sc	Nt-NPKGEMK	-Ct	Sc	Nt-.A...	-Ct
Asp f 1	Nt-Q..	I..	(-)	..	Hs	Nt-NNKGEMK	-Ct	Hs	Nt-.A...	-Ct
					Rn	Nt-NNKGEMK	-Ct	Rn	Nt-.A...	-Ct

**Figura 17: Secuencias implicadas en la interacción de las ribotoxinas con las proteínas ribosomales L14 y L6 según el modelo de la Figura 16.** Se muestra la variabilidad de las secuencias dentro de la familia de las ribotoxinas y entre las proteínas ribosomales más representativas de los distintos reinos (arqueobacterias: *Halobacterium marismortui* (Hm), *Methanococcus vannielii* (Mv); bacterias: *B. stearothermophilus* (Bs), *E. coli* (Ec); cloroplastos: *Spinacia oleracea* (So(Cl)), *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr(Cl)), *Guillardia theta* (Gt(Cl)); eucariotas: *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Arabidopsis thaliana* (At), *Homo sapiens* (Hs) y *Rattus norvegicus* (Rn)). Las proteínas homólogas a la L14 y la L6 en procariotas son la L23 (o L17) y la L9, respectivamente, en eucariotas. Sombreados en el mismo color aparecen los residuos potencialmente implicados en el contacto entre estas proteínas según el modelo anterior. Nt y Ct: extremos amino y carboxilo terminal de las secuencias. (-) fragmento de secuencia omitido. (.) mismo residuo que en la primera secuencia. Las secuencias se han obtenido de la base de datos Swiss Prot (Golden et al, 1993; Davies et al, 1996).

Es curioso, y por eso se destaca, que este estudio tan detallado de la  $\alpha$ -sarcina haya desembocado en la proteína ribosomal L14. Y se dice que es curioso porque la proteína L14 (L17 o L23 en eucariotas) no ha sido objeto de muchos estudios, a pesar de su localización en la zona de unión de factores de elongación. No es característica por su dinamismo dentro de la función ribosomal (Tama et al, 2003), ni tampoco se ha hecho mucho hincapié en dilucidar su función o interacción crítica con zonas próximas dentro del

ribosoma. Según la estructura y su localización en el ribosoma, interaccionaría con EF-G (dominios 2 y 3), EF-Tu, y el brazo aceptor del tRNA unido a este último, y también parece que interviene en el establecimiento de las interacciones que mantienen unidas a las dos subunidades ribosomales (Ban et al, 1999); pero, hasta ahora se le ha asignado un papel más bien anodino. Los resultados presentados en esta Memoria permiten prever, sin embargo, que juegue un importante papel dentro del ribosoma, probablemente de anclaje de los factores de elongación y, como en el caso que nos ocupa, de las ribotoxinas.

En cuanto a la proteína L6 (L9 en eucariotas), su actuación dentro de ribosoma sí está mejor definida. Se encuentra en contacto con el complejo L7/L12, formando la base de esa protuberancia (Figura 7), siendo toda ella una de las zonas más móviles del ribosoma (Tama et al, 2003; Valle et al, 2003a). Su particular estructura dimérica se mantiene tanto en el mundo procariota como en el eucariota (Golden et al, 1993), aunque sus correspondientes secuencias se diferencien bastante en ambos reinos. En concreto, la secuencia implicada en el contacto con la  $\alpha$ -sarcina en el modelo propuesto es de las más conservadas, pero completamente diferente si se comparan arqueobacterias y eucariotas con bacterias y cloroplastos (Figura 17). Tampoco las ribotoxinas son idénticas en los residuos 84 y 85 supuestamente responsables de la interacción. Por esto, la idea de una interacción específica de residuo entre el bucle 2 de las ribotoxinas y la proteína ribosomal L6 es bastante menos probable que en el caso de la L14.

Con este modelo (Figura 16) se explicaría el efecto que produce la eliminación de la horquilla amino-terminal sobre la funcionalidad de las ribotoxinas, aunque aún queda pendiente por demostrar la naturaleza molecular de la interacción con la proteína L14, lo que permitiría explicar y estudiar más sistemáticamente las diferencias según la procedencia de los ribosomas y la ribotoxina empleados. Conviene, aun así, precisar que este modelo queda por ser corroborado experimentalmente ya que, entre otras cosas, se ha llevado a cabo con el ribosoma de una arqueobacteria por ser la única estructura del ribosoma resuelta con suficiente resolución por el momento, pero que nunca se ha ensayado *in vitro* frente a la  $\alpha$ -sarcina y que es diferente en muchos detalles de los eucariotas comúnmente utilizados. Además de una posible explicación de la función de la horquilla amino-terminal, este modelo abre la puerta a nuevas hipótesis y estudios similares, en concreto con el bucle 2 de la  $\alpha$ -sarcina, aunque la variabilidad dentro de las ribotoxinas en esa zona de la secuencia presume una implicación menos relevante en el contacto de la toxina con el ribosoma.

Por último, una de las cosas que queda por dilucidar es el efecto, a nivel molecular, que produce la ruptura del enlace diana en el lazo sarcina/ricina y en su entorno para llegar a desestabilizar completamente la función ribosomal. La forma más directa consistiría en el estudio de ribosomas mutantes en el SRL, con un bucle más largo o con alguna de sus características, y en especial el tetrabucle GAGA, distorsionadas. De hecho, se ha llevado a cabo un estudio en este sentido, analizando el efecto producido en ribosomas al distorsionar el enlace que cierra el tetrabucle del SRL. Los autores (Chan et al, 2000a) concluyeron que, dependiendo de la mutación, se alteraba en mayor o menor grado la unión de factores de elongación, la biosíntesis de proteínas y el crecimiento celular, aunque sin profundizar a nivel molecular. Con estos y otros tipos de mutantes, la alterada funcionalidad de los ribosomas y las variaciones estructurales en ellos, serían atribuibles a esta región o a cambios inducidos por ella en zonas adyacentes, como podrían ser las



proteínas L6 y L14. Incluso las propias ribotoxinas podrían ser una herramienta perfecta en estos análisis debido a los numerosos y específicos contactos en este entorno en los que están implicadas. Además del comentado, existen en la literatura algunos precedentes de este tipo de metodología, en unos casos basada en la búsqueda y análisis de mutantes al azar de los rRNA ribosomales con fenotipos interesantes mediante experimentos *in vivo* o *in vitro*, y en otros consistente en la formación de ribosomas con alguno de sus componentes modificados (Macbeth y Wool, 1999; Chan et al, 2000a; Cochella y Green, 2004).

### **Las ribotoxinas como alergen**

En la última parte del trabajo presentado en esta Memoria se ha intentado dar un salto cualitativo, pasando del estudio molecular a la práctica clínica. El conocimiento acumulado durante la realización de los estudios discutidos en los apartados anteriores ha facilitado esta aproximación y ha abierto una nueva vía a la utilización de las ribotoxinas con fines terapéuticos. Hasta ahora, sólo se había explotado su potencial como inmunotoxinas en el tratamiento del cáncer, con muy diverso éxito (Orlando et al, 1988; Conde et al, 1989; Wawrzynczak et al, 1991; Better et al, 1992; Goyal y Batra, 2000). Sin embargo, dado que la ribotoxina Asp f 1 es uno de los principales alergen

producidos por *Aspergillus fumigatus*, el hongo responsable de la mayor parte de las infecciones y alergias fúngicas causadas en humanos, nos planteamos si alguna de las moléculas caracterizadas durante el transcurso de esta Tesis podría tener utilidad diagnóstica o terapéutica frente a este tipo de patologías (en esta Memoria: García-Ortega et al, 2004).

De forma general, las alergias que tienen como origen las vías respiratorias son las más comunes, y son éstas, precisamente, la principal vía de entrada de los hongos en el organismo, produciendo así diversas formas de patologías, no necesariamente siempre de tipo alérgico (Figura 12). De hecho, los hongos son la tercera causa más frecuente de patología alérgica respiratoria, tras los ácaros y los pólenes. Sin embargo, a pesar de estas evidencias, no se han seguido métodos rigurosos en el análisis y posibles soluciones para este tipo de alergia. Los extractos fúngicos utilizados para estos estudios, que en un principio eran la única fuente para la diagnosis y el tratamiento, son muy variados. Incluso los métodos de extracción y las fuentes no están estandarizados entre las distintas compañías o laboratorios implicados en este campo. Por ejemplo, existen en el mercado americano hasta 200 productos diferentes relativos a alergen

fúngicos. Este déficit de coordinación en cuanto a este tipo de alergen

hace que los avances en la alergia de origen fúngico sean muy pobres, y que disminuyan las posibilidades de conseguir una inmunoterapia efectiva a corto plazo (Esch, 2004).

Actualmente, y de forma general, existen dos formas de abordar el campo de la alergia desde un punto de vista aplicado. En relación con el diagnóstico, la alternativa más aceptada es el uso de baterías de alergen

purificados y bien controlados. Por otro lado, los hipoalergen

o formas con alergen

reducida, se consideran buenos candidatos para los posibles tratamientos. Las aproximaciones para conseguir estas variantes son, esencialmente, de cuatro tipos: la producción de fragmentos del alergen, la obtención de péptidos con epít

opos B o T, la modificación química de los alergen

o el diseño de variantes con mutaciones puntuales o deleciones (Vrtala et al, 2004). Es precisamente en

este último terreno en el que la tecnología del DNA recombinante ha abierto vías muy prometedoras, permitiendo la producción y purificación de alergenios puros, homogéneos y perfectamente estandarizables, que están empezando a dar buenos resultados tanto en ensayos *in vitro*, como *in vivo*. Esta tecnología permite además modificar estas moléculas de forma controlada con vistas a reducir su alergenicidad, de forma que se pueden obtener moléculas potencialmente aptas para su utilización en inmunoterapias.

Como se ha dicho, Asp f 1 es uno de los alergenios principales involucrado en la alergia frente a *A. fumigatus* y la presencia de IgE reactivas frente a esta proteína es especialmente significativa en el caso de la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA). Desafortunadamente, Asp f 1 como tal no puede ser usado en humanos, no sólo porque podría desencadenar un choque anafiláctico, sino porque se trata de una potente toxina. Es en este contexto en el que se planteó el abordaje del estudio de Asp f 1 y  $\alpha$ -sarcina, consideradas como isoformas naturales, y de sus correspondientes mutantes de delección  $\Delta(7-22)$  como potenciales moléculas hipoalergénicas (en esta Memoria: García-Ortega et al, 2004).

La aceptación de una molécula como hipoalergénica requiere de un gran número de estudios tanto a nivel molecular como celular. Desde este punto de vista, el trabajo presentado en esta Memoria debe ser considerado únicamente como una primera aproximación, a nivel molecular, que, por otra parte, ha rendido resultados prometedores. Así, las variantes supuestamente hipoalergénicas se han caracterizado estructural y enzimáticamente y se ha estudiado su comportamiento frente al reconocimiento por anticuerpos tipo IgG e IgE, utilizando un número estadísticamente significativo de sueros de pacientes afectados. Estos resultados, en su conjunto, constituyen el primer ejemplo de una comparación a nivel cuantitativo de las diferencias en cuanto a inmunogenicidad y alergenicidad de las ribotoxinas. Asp f 1 y  $\alpha$ -sarcina muestran una identidad de secuencia superior al 85% (Fig. 1 en García-Ortega et al, 2004). Sin embargo, en los ensayos de inhibición de la unión de las IgE de los pacientes seropositivos a Asp f 1, ambas proteínas muestran unas diferencias alérgicas considerables, diferencias del 30% en la capacidad de inhibición (Fig 9 en García-Ortega et al, 2004). Obviamente ese 30% de alergenicidad corresponde a epítomos diferentes entre ambas, una diferencia mayor de lo que cabría esperar, *a priori*, al comparar sus secuencias de aminoácidos. Los epítomos reconocidos por anticuerpos del tipo IgE son, fundamentalmente, conformacionales. Ahora bien, una vez que los alergenios son procesados por los primeros efectores celulares de la respuesta alérgica, como las células presentadoras de antígeno, sus antígenos se convierten en fragmentos peptídicos pequeños, de aproximadamente unos 15 aminoácidos, dando lugar a epítomos lineales que son los responsables de la estimulación de las células T (Figura 13). En el caso que nos ocupa, es difícil atribuir la diferencia de alergenicidad entre ambas proteínas a epítomos concretos debido a que la distribución de los cambios en sus secuencias no es homogénea. La horquilla  $\beta$  amino-terminal es, sin embargo, un importante candidato a la hora de explicar estas diferencias de alergenicidad. No sólo se concentran en ella muchas de las diferencias de secuencia, sino que constituye una región polar, protuberante y cuya estructura parece ser relativamente independiente del resto de la proteína (Figuras 9B y 15). Este último aspecto parece confirmado, de hecho, por la caracterización estructural realizada con ambos mutantes de delección, tanto  $\alpha$ -sarcina  $\Delta(7-22)$  como Asp f 1  $\Delta(7-22)$  (Fig. 2 y 3 en García-Ortega et al, 2002 y Fig. 3 y 4 en García-

Ortega et al, 2004). Efectivamente, viendo la capacidad de inhibición de la interacción Asp f 1-IgE por parte de Asp f 1  $\Delta(7-22)$ ,  $\alpha$ -sarcina y  $\alpha$ -sarcina  $\Delta(7-22)$ , se puede afirmar que la horquilla  $\beta$  de las ribotoxinas contiene determinantes alérgicos que constituyen un 20% de la alergenidad total de la molécula. Además, de los resultados obtenidos se extrae que la interacción horquilla  $\beta$ -IgE no es absolutamente dependiente de la particular secuencia en esa zona de Asp f 1, ya que los datos de inhibición no son iguales para la  $\alpha$ -sarcina y su variante de delección (Fig. 9 en García-Ortega et al, 2004). Es decir, que a pesar de tener una secuencia diferente, la horquilla  $\beta$  de la  $\alpha$ -sarcina sigue teniendo residuos implicados en el epítipo y sigue siendo capaz de interactuar con los anticuerpos aunque con menor afinidad. Queda abierta, sin embargo, la posibilidad contraria, y es que la alergenidad de la región amino terminal de las ribotoxinas sea comparable en toda la familia, independientemente de las variaciones en cuanto a la secuencia. Por supuesto, la horquilla  $\beta$  no es el único epítipo alérgico de las ribotoxinas, algo que era de esperar dado el patrón de plegamiento aparentemente común a toda la familia, donde gran parte de la estructura tiene carácter expuesto y por tanto accesible a los anticuerpos de tipo IgE.

Estos resultados, en su conjunto, parecen apoyar la hipótesis de partida, sugiriendo que, tanto la  $\alpha$ -sarcina natural, como las variantes de delección estudiadas, presentan características moleculares y de interacción con las IgE de los pacientes alérgicos que permitirían considerarlas como potencialmente hipoalérgicas. Aun así, otros aspectos quedarían todavía pendientes de ser estudiados. En este sentido, los hipoalérgenos deben ser capaces de provocar la síntesis de IgG defensivas en modelos animales, de inducir la proliferación de células T y de disminuir la liberación de histamina por los basófilos de los pacientes. Por último, las pruebas cutáneas en pacientes alérgicos son los primeros experimentos que deben dar resultados satisfactorios de cara a poderse utilizar como tratamiento real. A pesar de ello, dentro de las características de los distintos tipos de hipoalérgenos, los construidos, como en este caso, mediante delecciones de zonas que no estén implicadas en el mantenimiento de la estructura terciaria de la proteína, presentan ciertas ventajas con respecto a otros, por lo que, *a priori*, permiten ser optimistas en cuanto a estudios posteriores. Estas variantes delecionadas presentan una mayor estabilidad que cuando se utilizan fragmentos, y mantienen, de forma general, la estructura global, conservando, de este modo, los epítopos necesarios para que se desencadene una respuesta inmunológica defensiva que bloquee la alérgica. Esto es algo que, por ejemplo, no ocurre con los alérgenos cuando se modifican o eliminan los puentes disulfuro, desestructurándolos.

Por otro lado, la inducción de anticuerpos policlonales (de isotipo IgG) en conejos por inyección de las ribotoxinas es relativamente fácil, obteniéndose títulos muy buenos a pesar de que en un principio su citotoxicidad no lo augurase así, siendo esto indicativo de la rica inmunogenicidad de estas proteínas. Estos anticuerpos son, además, capaces de reaccionar con todas las formas ensayadas, tanto las proteínas completas como las variantes de delección (Fig. 2 en García-Ortega et al, 2004). Estos aspectos son muy favorables ya que es sabido cómo el modo de acción en tratamientos con moléculas hipoalérgicas pasa, en la mayor parte de los casos, por la inducción de una respuesta de tipo IgG que contrarreste la producción de IgE que desencadena la alergia.

Una vez concluido que la eliminación de la horquilla amino-terminal da lugar a variantes de las ribotoxinas con una reducida capacidad de interacción con IgE, y no sólo eso, sino

que la  $\alpha$ -sarcina es por sí sola hipoalergénica al compararla con Asp f 1, quedaría valorar su citotoxicidad con vistas a una posible aplicación terapéutica. Si bien es cierto que los experimentos mostrados en esta Memoria corresponden a células sensibles a la acción de las ribotoxinas, y que el efecto de éstas sobre células normales no sería tan drástico, esta citotoxicidad no deja de ser un serio inconveniente. Tan serio que el tratamiento antitumoral con ribotoxinas se tuvo que abandonar tras los primeros ensayos con perros, en los años 60 (Goldin et al, 1966), debido a sus efectos secundarios y a pesar de que resultaban eficaces a la hora de eliminar los tumores. Por lo que, el hecho de que las variantes de delección pierdan esa capacidad citotóxica, es una ventaja adicional (Fig. 8 y 7 en García-Ortega et al, 2002 y 2004, respectivamente).

En conclusión, el mejor candidato para continuar el desarrollo de una molécula hipoalergénica de Asp f 1 es la  $\alpha$ -sarcina  $\Delta(7-22)$  al presentar una reducción de alergenicidad del 40% y ser inocua en comparación con el resto. Y, aunque éste sólo constituye el primer paso hasta llegar a la clínica, ejemplos de moléculas hipoalergénicas en estudios más avanzados parten de una reducción de alergenicidad del mismo orden, como son las variantes y fragmentos del alérgeno Bet v 1 de abedul (Mahler et al, 2004) o el alérgeno Par j 1 de polen modificado sin cisteínas (Orlandi et al, 2004), pero ninguno hasta el momento con alérgenos fúngicos. Además, si fuera necesario y ya que se dispone de la metodología, se podría continuar el estudio, tomando como base el mutante de delección ya caracterizado, y eliminando o modificando otras zonas como el bucle 5, también interesante desde el punto de vista de su funcionalidad y alergenicidad. Es importante recalcar que éstas son las únicas variantes hipoalergénicas de Asp f 1 caracterizadas hasta la fecha, ya que los estudios preliminares realizados con este alérgeno se han limitado al uso de péptidos secuenciales de la proteína o elegidos mediante criterios erróneos (Kurup et al, 1998; Svirshchevskaya et al, 2000; Madan et al, 2004). Algo similar ocurre con las variantes estudiadas recientemente para los alérgenos Asp f 2, Asp f 3 y Asp f 4, en los que se eliminan elementos presumiblemente clave para el mantenimiento de la estructura de la proteína como son los puentes disulfuro (Banerjee et al, 2002; Ramachandran et al, 2002; Ramachandran et al, 2004).

Por último, no es despreciable tampoco la posible aplicación clínica de estas moléculas, no tóxicas y con su alergenicidad significativamente reducida, en relación con ciertas patologías provocadas por *Aspergillus*, como la mencionada ABPA. En el estudio aquí presentado se muestra un amplio panel de sueros susceptibles de contener IgE frente a Asp f 1, ya que todos ellos pertenecen a pacientes que presentan sensibilización frente a *Aspergillus*. El número es lo suficientemente grande (58), además de pertenecer a distintos grupos sintomáticos, como para que las conclusiones extraídas, expuestas a continuación, sean estadísticamente significativas. En este caso, el trabajo ha permitido obtener datos claros sobre la prevalencia de este alérgeno entre ellos, ya que, si bien se habían realizado previamente varios estudios en este sentido, los resultados eran un tanto confusos (Cramer et al, 1998; Kurup et al, 2000). Por otro lado, los resultados comentados anteriormente sobre las diferencias encontradas al ensayar las variantes hipoalergénicas, corresponden a la población general individuos sensibilizados a Asp f 1, y por tanto también son fiables y significativos. En cuanto a la prevalencia de Asp f 1, ésta es considerablemente mayor en individuos sensibilizados a *Aspergillus* con un diagnóstico más grave que el asma, como es la fibrosis quística (CF) y la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) (Tabla 2 en García-

Ortega et al, 2004). A pesar de que las diferencias en prevalencia entre individuos alérgicos con fibrosis cística (77%) e individuos con ABPA (100%) no hagan de este alérgeno el más adecuado para el diagnóstico diferencial entre estos dos casos, podría servir, sin embargo, como diagnóstico prematuro de una posible ABPA en los pacientes con fibrosis cística, ya que en ellos, la prevalencia de esta enfermedad, es mucho mayor que en la población asmática (Greenberger, 2002; esta Memoria) debido a las características de la fibrosis cística. Está descrito, además, que los anticuerpos frente a los alérgenos Asp f 1 y Asp f 3 son los que aparecen de forma más temprana en el ABPA (Hemmann et al, 1998; Svirshchevskaya et al, 2000) y presentan diferencias significativas entre los periodos de gravedad y remisión de la enfermedad (Knutsen et al, 2004). De hecho, y aunque en este momento no sería factible en nuestro caso, el seguimiento del estado de dichos pacientes sería la prueba para demostrar esta hipótesis.

Hay que destacar que el diagnóstico de ABPA no es sencillo. En la actualidad se deben cumplir una serie de parámetros diagnósticos, ya que no hay un solo factor inequívoco característico de esta enfermedad. En lo que a la serología se refiere, lo único estandarizado son unos niveles altos de anticuerpos IgE e IgG específicos contra *A. fumigatus* en el paciente. Como se ha visto, Asp f 1 podría ser útil en este diagnóstico, acompañado de la detección de otros alérgenos mayoritarios de *A. fumigatus* como Asp f 2, Asp f 4 y Asp f 6, que sí parecen presentar diferencias entre ABPA y CF-alergia (Cramer et al, 1998; Hemmann et al, 1999; Kurup et al, 2000). Si este fuera el caso, se podría argumentar que el uso de las variantes hipoalérgicas presentadas anteriormente no estaría justificado, ya que lo que se pretende en la diagnosis es valorar la respuesta alérgica. Sin embargo, variantes de Asp f 1 en relación con su toxicidad (variantes del centro activo como los descritos para la  $\alpha$ -sarcina), o incluso alguno de los hipoalérgenos podrían ser útiles para las pruebas realizadas directamente sobre los pacientes, especialmente en aquellos casos en los que se prevean choques anafilácticos de gravedad. Sí tendría sentido, sin lugar a dudas, en el tratamiento de ABPA o en la realización de una vacunación profiláctica en casos, por ejemplo, de fibrosis cística. El ABPA es la enfermedad alérgica causada por *A. fumigatus* más difícil de tratar debido a su compleja inmunopatogénesis y la complicación, en la mayoría de los casos, con asma y fibrosis cística. Además, es en el caso más crítico, la fibrosis cística, en el que la prevalencia de ABPA es mayor. Desde el inicio del desarrollo de la enfermedad con el crecimiento de *A. fumigatus* en la cavidad pulmonar, ésta se puede agravar considerablemente con sucesivos infiltrados dañándose las paredes bronquiales como consecuencia de una exacerbada respuesta alérgica, llegando hasta bronquiectasias. Los tratamientos actuales, basados fundamentalmente en agentes antifúngicos, no pueden ser utilizados de forma indefinida, aspirándose con ellos, si el tratamiento se comienza a tiempo, a remitir la enfermedad, aunque en muchos casos sólo se consigue un estado de crisis recurrentes o de asma dependiente de corticoesteroides. La máxima en estos casos es evitar la progresiva pérdida de función pulmonar y mantener a los pacientes en el mejor estado respiratorio posible (Greenberger, 2002). Por lo tanto, parece obvia la necesidad de un avance en el tratamiento de esta enfermedad, y una buena alternativa es la inmunoterapia con hipoalérgenos.

## Consideraciones finales

En resumen, estos estudios han resultado ser la primera caracterización exhaustiva de un dominio estructural y funcional de las ribotoxinas, ya que, aunque otros autores han realizado un par de trabajos más en este sentido (Kao y Davies, 1999; Glück y Wool, 2002), la falta de estudios estructurales no permitían extraer conclusiones a tan detallado nivel. Además, a pesar de que el modelo de partida fue la  $\alpha$ -sarcina, a lo largo de esta investigación se requirió el empleo de otras ribotoxinas como la restrictocina y la Asp f 1, permitiendo, en su conjunto, un estudio completo y comparativo de esta familia.

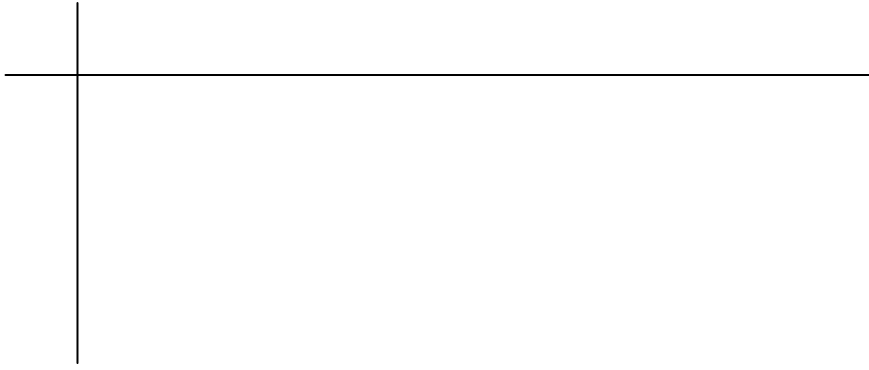
Llegados a este punto, se planteó que una buena forma de completar los resultados relativos a la horquilla amino-terminal de las ribotoxinas sería realizar la aproximación experimental contraria, un estudio por ganancia de función. Es decir, analizar las consecuencias funcionales de esta región tras su incorporación a una estructura inerte. Este planteamiento implicaría la utilización de un modelo no tóxico que no supusiese grandes variaciones con respecto a la  $\alpha$ -sarcina silvestre para poder luego asignar las modificaciones observadas a la zona insertada. De este modo, de la misma manera que las ribonucleasas microbianas del tipo T1 han servido para el diseño de la variante de delección, podrían servir de base estructural para la adición de la horquilla  $\beta$ . Como ya se ha comentado en la Introducción de esta Memoria, la RNasa U2 es el mejor modelo para estudios comparativos con las ribotoxinas y, de hecho, la posibilidad de disponer de la forma recombinante, prácticamente idéntica a la natural, y de purificación relativamente sencilla, debería haber facilitado la consecución de este objetivo. Sin embargo, a pesar de que se han obtenido diversos sistemas de expresión de la variante U2+(7-22) (con la secuencia aminoacídica 7-22 de la  $\alpha$ -sarcina entre las dos Gly que aparecen en su lugar en la RNasa U2) (Figura 9B), su producción y purificación no ha sido satisfactoria hasta la fecha. Una de las principales razones parece ser una exacerbada citotoxicidad en las cepas de *Pichia pastoris* productoras, lo que confirmaría el papel crucial de la horquilla antes apuntado. Desafortunadamente la purificación, además, se complica por la anómala movilidad electroforética de la RNasa U2 lo que dificulta extraordinariamente su seguimiento a través de las distintas etapas de su aislamiento. Ciertamente, se puede registrar su actividad ribonucleolítica pero tampoco se puede predecir cuál debería ser realmente esta actividad en el caso de la quimera planeada [U2+(7-22)], especialmente si se admite, como se prevé, que la inserción de la horquilla  $\beta$  amino-terminal de la  $\alpha$ -sarcina va a tener consecuencias importantes sobre esta actividad enzimática.

Además de la mejora de esta aproximación experimental, todavía pendiente, con los resultados obtenidos en esta Memoria se abren nuevas puertas para continuar avanzando en el conocimiento de las ribotoxinas. En este sentido sería deseable, por ejemplo, la búsqueda de otros residuos esenciales para la funcionalidad de las ribotoxinas en la zona de la horquilla delecionada, pero ahora modificando los residuos que sí se conservan entre las ribotoxinas. Además, la horquilla amino-terminal no es la única región responsable de las características funcionales únicas de las ribotoxinas. Otro de los candidatos es el bucle 3, con un característico agrupamiento de residuos de lisina que parece estar relacionado con la interacción con RNA (Kao y Davies, 1995; Kao y Davies, 1999), y una conformación y longitud diferente a la que presenta en las ribonucleasas microbianas del tipo T1 (Figura 5). Es, además, un lazo flexible y se encuentra conectado estructuralmente con la horquilla

$\beta$ , como se demuestra en la estructura de la variante de delección (Figura 15). Existen evidencias experimentales que implican a este bucle en la funcionalidad de las ribotoxinas. La estructura del complejo de la restrictocina con el SRL localiza esta región en contacto con la G prominente del RNA (Figura 7C), que es la zona principal de reconocimiento por parte de las ribotoxinas cuando se usa este sustrato, y se han desarrollado quimeras con la RNasa T1, adicionándole este bucle 3 y observándose nuevas propiedades relacionadas con su especificidad, siendo capaz, la nueva variante, de hidrolizar sustratos compuestos por doble cadena de RNA (Chen y Lin, 2002). Estas evidencias y nuestros resultados apoyan una vez más la hipótesis de que la horquilla amino-terminal sería la responsable de establecer una primera interacción específica con el ribosoma, mientras que el bucle 3 llevaría a cabo un reconocimiento más local, ya en el propio lazo sarcina/ricina.

Por otro lado, el bucle 2 de las ribotoxinas, supuestamente implicado en la interacción con membranas según las hipótesis previas, cobra importancia también en el exquisito reconocimiento del sustrato catalítico, según el modelo de acoplamiento de la estructura de la  $\alpha$ -sarcina en el ribosoma presentado en esta Memoria (Figura 16). Esta idea abre nuevas perspectivas de trabajo en este campo, apoyadas además por los resultados preliminares obtenidos en nuestro grupo, consistentes en la expresión heteróloga y de forma soluble de la variante de delección en este bucle de la  $\alpha$ -sarcina (Masip, 2003).

Se puede ver, por tanto, como los resultados obtenidos han permitido, por un lado, extraer conclusiones importantes acerca de la funcionalidad de las ribotoxinas, y por otro, abrir nuevas puertas, basadas en hipótesis sólidas, que auguran un futuro prometedor en este campo. En este sentido, hay que tener en cuenta la nueva faceta de esta familia de proteínas que se presenta en esta Tesis Doctoral, de cara a su posible utilización en clínica en el campo de la alergia. El campo de las variantes hipoalérgicas de las ribotoxinas, donde los resultados obtenidos hasta la fecha no son más que una primera aproximación, ofrece grandes posibilidades de éxito. Desde el estudio de la respuesta inmune celular asociada a dichas formas hipoalérgicas, hasta la obtención de modelos de ratón alérgicos a *Aspergillus* para el estudio de estas variantes, son perspectivas de trabajo ahora más próximas y con posibilidad real de llevarse a cabo en nuestro grupo de investigación.



## **Conclusiones**





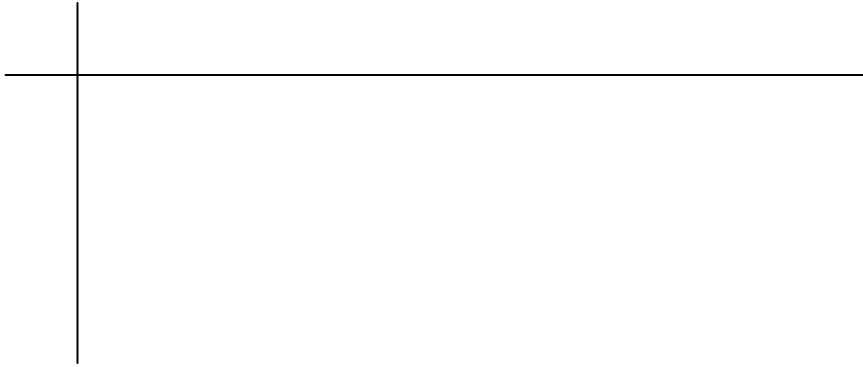
Se han mejorado considerablemente los sistemas de expresión heteróloga y purificación de las ribotoxinas y la RNasa U2. Para el caso de las ribotoxinas, la coexpresión de la tiorredoxina en el citoplasma de *E. coli*, incrementó el rendimiento final entorno a cuatro veces, pasándose a obtener entre 6 y 8 mg de proteína pura por litro de cultivo original. Con la RNasa U2, se introdujeron dos modificaciones importantes. La producción extracelular de la proteína por parte de la levadura *Pichia pastoris* fue mucho mayor utilizando un nuevo vector de expresión, pPICz $\alpha$ A. Además, la introducción de una cromatografía de afinidad en 2'-5'-ADP-Sepharose en el proceso de purificación de la proteína, permitió aislar de forma homogénea la forma que posee idénticas propiedades espectroscópicas y enzimáticas que la natural fúngica.

Se han estudiado tres mutantes puntuales de la  $\alpha$ -sarcina en la zona de la horquilla amino-terminal, sustituyendo los residuos en las posiciones 11 y 20 por los correspondientes en la homóloga restrictocina. Así, se compararon las propiedades estructurales y funcionales de las variantes individuales K11L y T20D, y la variante doble K11L/T20D de la  $\alpha$ -sarcina, con esta misma y la restrictocina. Los mutantes se purificaron a homogeneidad y se comprobó que mantenían la estructura de la proteína natural por técnicas espectroscópicas. Del estudio de sus propiedades ribonucleolíticas se concluyó que las variaciones encontradas, sólo a nivel de actividad inespecífica, se debían a sutiles cambios en el entorno del centro activo debido a la conexión de éste con la horquilla amino-terminal a través del bucle 5. A pesar de ello, no presentaron diferencias en cuanto al reconocimiento de los ribosomas con respecto a la proteína nativa. En relación con la interacción con membranas lipídicas, estos residuos juegan un papel más importante, aunque los efectos de ambas mutaciones se compensan en gran medida. Por consiguiente, los efectos en la citotoxicidad se explican con estas variaciones en la interacción con las bicapas lipídicas.

Se analizó el efecto de la eliminación de la horquilla amino-terminal en la funcionalidad de las ribotoxinas. Para ello se expresó y purificó a homogeneidad la variante  $\alpha$ -sarcina  $\Delta(7-22)$  en la que la lámina  $\beta$  más expuesta de la horquilla se sustituyó por dos Gly, tal y como aparece en la RNasa U2. El mutante de delección mantenía el patrón de plegamiento de la proteína completa, a excepción de la zona eliminada. La interacción con membranas lipídicas no se vio afectada significativamente, concluyéndose que la horquilla no es una región esencial para esta función de las ribotoxinas, aunque cuando se encuentra presente sí participa como se demostró en el estudio anterior. La diferencia más importante que se observó con esta variante consistió en su incapacidad para producir el corte específico, típico de las ribotoxinas, cuando se empleaban ribosomas intactos, aunque esta habilidad no desaparecía cuando se utilizaba un análogo del mínimo sustrato específico, el SRL. Debido a este efecto sobre los ribosomas, la citotoxicidad del mutante disminuía del orden de 10 veces con respecto a la proteína natural.

La búsqueda del mejor acoplamiento de las estructuras tridimensionales de la  $\alpha$ -sarcina y su variante de delección  $\alpha$ -sarcina  $\Delta(7-22)$ , a la subunidad mayor del ribosoma de *H. marismortui* a través del lazo sarcina/ricina permitió localizar dos posibles regiones de interacción de las ribotoxinas con proteínas ribosomales, el bucle 2 con la proteína L6 y la horquilla amino-terminal con la proteína L14. Debido a la incapacidad de la variante  $\alpha$ -sarcina  $\Delta(7-22)$  de interactuar con la proteína L14 según este modelo, y a que no es capaz de reconocer específicamente los ribosomas según los datos bioquímicos, se puede concluir que esta interacción con la proteína L14 (u homólogas) parece clave para la correcta funcionalidad de las ribotoxinas frente a su sustrato natural.

Por último, se estudiaron las propiedades inmunogénicas y alérgicas de las ribotoxinas y las variantes de delección  $\Delta(7-22)$  al tener estas proteínas una participación importante en la alergia a hongos. Para ello, se utilizó la  $\alpha$ -sarcina y su mutante de delección, además del alérgeno más importante, la homóloga Asp f 1, y su correspondiente variante. Tras llevar a cabo un estudio idéntico al anterior con estas dos últimas proteínas, observándose resultados similares a los presentados para la  $\alpha$ -sarcina, las cuatro proteínas se ensayaron frente a una batería de sueros de pacientes alérgicos a *Aspergillus*, para analizar su capacidad de interacción con IgE. Los resultados corroboraron la prevalencia de estos alérgenos en los pacientes alérgicos con ABPA y fibrosis quística. Además se observó que la capacidad de unión a IgE disminuía significativamente según el orden siguiente: Asp f1 > Asp f 1 $\Delta(7-22)$  >  $\alpha$ -sarcina >  $\alpha$ -sarcina  $\Delta(7-22)$ , mientras que las cuatro proteínas mantenían la capacidad de interactuar con IgG policlonales de conejo anti-Asp f 1. Estos datos permitieron concluir que las variantes delecionadas, y en concreto la  $\alpha$ -sarcina  $\Delta(7-22)$ , debido a su disminuida alergenidad y citotoxicidad, podrían considerarse buenos candidatos para continuar estos estudios con vistas a encontrar moléculas hipoalérgicas con posibles usos terapéuticos contra este tipo de alergia.



## **Bibliografía**



- Agapov, I.I., Tonevitsky, A.G., Shamshiev, A.T., Pohl, E., Pohl, P., Palmer, R.A. y Kirpichnikov, M.P. (1997) The role of structural domains in RIP II toxin model membrane binding. *FEBS Lett.* **402**, 91-93.
- Andersen, G.R., Nissen, P. y Nyborg, J. (2003) Elongation factors in protein biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 434-441.
- Antignani, A., Naddeo, M., Cubellis, M.V., Russo, A. y D'Alessio, G. (2001) Antitumor action of seminal ribonuclease, its dimeric structure, and its resistance to the cytosolic ribonuclease inhibitor. *Biochemistry* **40**, 3492-3496.
- Aravind, L. y Koonin, E.V. (2001) A natural classification of ribonucleases. *Methods Enzymol.* **341**, 3-28.
- Ardelt, B., Ardelt, W. y Darzynkiewicz, Z. (2003) Cytotoxic ribonucleases and RNA interference (RNAi). *Cell Cycle* **2**, 22-24.
- Arima, T., Uchida, T. y Egami, F. (1968a) Studies on extracellular ribonucleases of *Ustilago sphaerogena*. Purification and properties. *Biochem. J.* **106**, 601-607.
- Arima, T., Uchida, T. y Egami, F. (1968b) Studies on extracellular ribonucleases of *Ustilago sphaerogena*. Characterization of substrate specificity with special reference to purine-specific ribonucleases. *Biochem. J.* **106**, 609-613.
- Arni, R., Heinemann, U., Tokuoka, R. y Saenger, W. (1988) Three-dimensional structure of the ribonuclease T1 2'-GMP complex at 1.9-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **263**, 15358-15368.
- Arni, R.K., Watanabe, L., Ward, R.J., Kreitman, R.J., Kumar, K. y Walz, F.G.Jr. (1999) Three-dimensional structure of ribonuclease T1 complexed with an isosteric phosphonate substrate analogue of GpU: alternate substrate binding modes and catalysis. *Biochemistry* **38**, 2452.
- Ban, N. (2004). [http://129.132.45.141/ban/class/molbiol\\_IIIa\\_2004\\_talk.pdf](http://129.132.45.141/ban/class/molbiol_IIIa_2004_talk.pdf)
- 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.
- Banerjee, B. y Kurup, V.P. (2003) Molecular biology of *Aspergillus allergens*. *Front. Biosci.* **8**, 128-139.
- Banerjee, B., Kurup, V.P., Greenberger, P.A., Kelly, K.J. y Fink, J.N. (2002) C-terminal cysteine residues determine the IgE binding of *Aspergillus fumigatus* allergen Asp f 2. *J. Immunol.* **169**, 5137-5144.
- Beintema, J.J. y Kleinedam, R.G. (1998) The ribonuclease A superfamily: general discussion. *Cell Mol. Life Sci.* **54**, 825-832.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. y Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-366.
- Better, M., Bernhard, S.L., Lei, S.P., Fishwild, D.M. y Carroll SF. (1992) Activity of recombinant mitogillin and mitogillin immunoconjugates. *J. Biol. Chem.* **267**, 16712-16718.
- Blank, A. y Dekker, C.A. (1975) Differential activity staining: its use in characterization of guanylyl-specific ribonuclease in the genus *Ustilago*. *Proc. Natl. Acad. USA* **72**, 4914-4917.
- Bocharov, E.V., Sobol, A.G., Pavlov, K.V., Korzhnev, D.M., Jaravine, V.A., Gudkov, A.T. y Arseniev, A.S. (2004) From structure and dynamics of protein L7/L12 to molecular switching in ribosome. *J. Biol. Chem.* **279**, 17697-17706.
- Bolognesi, A., Tazzari, P.L., Olivieri, F., Polito, L., Falini, B. y Stirpe, F. (1996) Induction of apoptosis by ribosome-inactivating proteins and related immunotoxins. *Int. J. Cancer* **68**, 349-355.
- Bracale, A., Spalletti-Cernia, D., Mastronicola, M., Castaldi, F., Mannucci, R., Nitsch, L. y D'Alessio, G. (2002) Essential stations in the intracellular pathway of cytotoxic bovine seminal ribonuclease. *Biochem. J.* **362**, 553-560.

## 150 Bibliografía

---

- Brandhorst, T.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.
- Brandi, L., Marzi, S., Fabbretti, A., Fleischer, C., Hill, W.E., Gualerzi, C.O. y Stephen Lodmell, J. (2004) The translation initiation functions of IF2: targets for thiostrepton inhibition. *J. Mol. Biol.* **335**, 881-894.
- Brigotti, M., Rambelli, F., Zamboni, M., Montanaro, L. y Sperti, S. (1989) Effect of  $\alpha$ -sarcin and ribosome inactivating proteins on the interaction of elongation factors with ribosomes. *Biochem. J.* **257**, 723-727.
- Brodersen, D.E., Clemons, W.M.Jr., Carter, A.P., Wimberly, B.T. y Ramakrishnan, V. (2002) Crystal structure of the 30 S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16 S RNA. *J. Mol. Biol.* **316**, 725-768.
- Campos-Olivas, R., Bruix, M., Santoro, J., Martínez del Pozo, A., Lacadena, J., Gavilanes, J.G. y Rico, M. (1996a) Structural basis for the catalytic mechanism and substrate specificity of the ribonuclease alpha-sarcin. *FEBS Lett.* **399**, 163-165.
- Campos-Olivas, R., Bruix, M., Santoro, J., Martínez del Pozo, A., Lacadena, J., Gavilanes, J.G. y Rico, M. (1996b)  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$  nuclear magnetic resonance assignment and secondary structure of the cytotoxic ribonuclease alpha-sarcin. *Protein Sci.* **5**, 969-972.
- Carmell, M.A. y Hannon, G.J. (2004) RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 214-218.
- Chaddock, J.A., Monzingo, A.F., Robertus, J.D., Lord, J.M. y Roberts, L.M. (1996) Major structural differences between pokeweed antiviral protein and ricin A-chain do not account for their differing ribosome specificity. *Eur. J. Biochem.* **235**, 159-166.
- Chan, Y.L., Correll, C.C. y Wool, I.G. (2004) The location and the significance of a cross-link between the sarcin/ricin domain of ribosomal RNA and the elongation factor-G. *J. Mol. Biol.* **337**, 263-272.
- Chan, Y.L., Sitikov, A.S. y Wool, I.G. (2000a) The phenotype of mutations of the base-pair C2658.G2663 that closes the tetraloop in the sarcin/ricin domain of *Escherichia coli* 23 S ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* **298**, 795-805.
- Chan, W.L., Shaw, P.C., Tam, S.C., Jacobsen, C., Gliemann, J. y Nielsen MS. (2000b) Trichosanthin interacts with and enters cells via LDL receptor family members. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270(2)**, 453-457.
- Chapman, M.D., Smith, A.M., Vailes, L.D., Arruda, L.K., Dhanaraj, V. y Pomes, A. (2000) Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **106**, 409-418.
- Chauhan, B., Knutsen, A., Hutcheson, P.S., Slavin, R.G. y Bellone, C.J. (1996) T cell subsets, epitope mapping, and HLA-restriction in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J. Clin. Invest.* **97**, 2324-2331.
- Chen, D.T. y Lin, A. (2002) Domain swapping in ribonuclease T1 allows the acquisition of double-stranded activity. *Protein Eng.* **15**, 997-1003.
- Cochella, L. y Green, R. (2004) Isolation of antibiotic resistance mutations in the rRNA by using an in vitro selection system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **101**, 3786-3791.
- Conde, F.P., Fernández-Puentes, C., Montero, M.T.V. y Vázquez, D. (1978) Protein toxins that catalytically inactivate ribosomes from eukaryotic microorganisms. Studies on the mode of action of alpha-sarcin, mitogillin and restrictocin: response to alpha-sarcin antibodies. *FEMS Microbiol. Lett.* **4**, 349-355.
- Conde, F.P., Orlandi, R., Canevari, S., Mezzanzanica, D., Ripamonti, M., Muñoz, S.M., Jorge, P. y Colnaghi, M.I. (1989) The *Aspergillus* toxin restriction is a suitable cytotoxic agent for generation of

- immunoconjugates with monoclonal antibodies directed against human carcinoma cells. *Eur. J. Biochem.* **178**, 795-802.
- Correll, 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. U. S. A.* **95**, 13436-13441.
- Correll, C.C., Wool, I.G. y Munishkin, A. (1999) The two faces of the *Escherichia coli* 23 S rRNA sarcin/ricin domain: the structure at 1.11 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **292**, 275-287.
- Correll, C.C., Yang, X., Gerczei, T., Beneken, J. y Plantinga, M.J. (2004) RNA recognition and base flipping by the toxin sarcin. *J. Synchrotron Radiat.* **11**, 93-96.
- Cramer, R., Hemmann, S., Ismail, C., Menz, G. y Blaser, K. (1998) Disease-specific recombinant allergens for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Int. Immunol.* **10**, 1211-1216.
- Cramer, R., Lidholm, J., Gronlund, H., Stuber, D., Blaser, K. y Menz, G. (1996) Automated specific IgE assay with recombinant allergens: evaluation of the recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen I in the Pharmacia Cap System. *Clin. Exp. Allergy* **26**, 1411-1419.
- D'Alessio, G. y Riordan, J.F. (eds) (1997) *Ribonucleases: structures and functions*. eds. Academic Press.
- D'Alessio, G., Di Donato, A., Parente, A. y Piccoli, R. (1991) Seminal RNase: a unique member of the ribonuclease superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 104-106.
- DaSilva, L., Cote, D., Roy, C., Martinez, M., Duniho, S., Pitt, M.L., Downey, T. y Dertzbaugh, M. (2003) Pulmonary gene expression profiling of inhaled ricin. *Toxicol.* **41**, 813-822.
- Davies, C., White, S.W. y Ramakrishnan, V. (1996) The crystal structure of ribosomal protein L14 reveals an important organizational component of the translational apparatus. *Structure* **4**, 55-66.
- De Antonio, C., Martínez del Pozo, A., Mancheño, J.M., Oñaderra, M., Lacadena, J., Martínez-Ruiz, A., Pérez-Cañadillas, J.M., Bruix, M. y Gavilanes, J.G. (2000) Assignment of the contribution of the tryptophan residues to the spectroscopic and functional properties of the ribotoxin  $\alpha$ -sarcin. *Proteins* **41**, 350-361.
- Deshpande, R.A. y Shankar, V. (2002) Ribonucleases from T2 family. *Crit. Rev. Microbiol.* **28**, 79-122.
- Di Donato, A., Cafaro, V. y D'Alessio, G. (1994) Ribonuclease A can be transformed into a dimeric ribonuclease with antitumor activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 17394-17396.
- Egami, F., Oshima, T. y Uchida, T. (1980) Specific interaction of base-specific nucleases with nucleosides and nucleotides. En *Molecular biology, biochemistry and biophysics*. Chapeville, F. y Haenni, A.L., eds. Springer Verlag, vol. 32, pp. 250-277.
- Endo, Y. y Wool, I.G. (1982) The site of action of  $\alpha$ -sarcin on eukaryotic ribosomes: the sequence at the  $\alpha$ -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  $\alpha$ -sarcin: The characteristics of the enzymatic activity of  $\alpha$ -sarcin with ribosomes and ribonucleic acids as substrates. *J. Biol. Chem.* **258**, 2662-2667.
- Endo, Y., Chan, Y.L., Lin, A., Tsurugi, K. y Wool, I.G. (1988) The cytotoxins  $\alpha$ -sarcin and ricin retain their specificity when tested on a synthetic oligoribonucleotide (35-mer) that mimics a region of 28 S ribosomal ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **263**, 7917-7920.
- Esch, R.E. (2004) Manufacturing and standardizing fungal allergen products. *J. Allergy Clin. Immunol.* **113**, 210-215.
- 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. Inhibition of brain protein synthesis, cleavage and sequence of the ribosomal RNA fragment. *Eur. J. Biochem.* **149**(1), 29-34.



## 152 Bibliografía

---

- 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. (1983) Permeability to  $\alpha$ -sarcin in virus-infected cells. *Mol. Cell Biochem.* **50**, 185-191.
- Fernández-Puentes, C. y Carrasco, L. (1980) Viral infection permeabilizes mammalian cells to protein toxins. *Cell* **20**, 769-775.
- Flicker, S. y Valenta, R. (2003) Renaissance of the blocking antibody concept in type I allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **132**, 13-24.
- Frigerio, L., Vitale, A., Lord, J.M., Ceriotti, A. y Roberts, L.M. (1998) Free ricin A chain, proricin, and native toxin have different cellular fates when expressed in tobacco protoplasts. *J. Biol. Chem.* **273**, 14194-14199.
- Furutani, M., Kashiwagi, K., Ito, K., Endo, Y. y Igarashi, K. (1992) Comparison of the modes of action of a Vero toxin (a Shiga-like toxin) from *Escherichia coli*, of ricin, and of  $\alpha$ -sarcin. *Arch. Biochem. Biophys.* **293**, 140-146.
- Gao, W., Ling, J., Zhong, X., Liu, W., Zhang, R., Yang, H., Cao, H. y Zhang, Z. (1994) Luffin-S: a small novel ribosome-inactivating protein from *Luffa cylindrica*. Characterization and mechanism studies. *FEBS Lett.* **347**, 257-260.
- García-Mayoral, M.F., García-Ortega, L., Lillo, M.P., Santoro, J., Martínez del Pozo, A., Gavilanes, J.G., Rico, M. y Bruix, M. (2004) NMR structure of the noncytotoxic  $\alpha$ -sarcin mutant  $\Delta(7-22)$ : the importance of the native conformation of peripheral loops for activity. *Protein Sci.* **13**, 1000-1011.
- Gasset, M., Martínez del Pozo, Á., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1989) Study of the interaction between the antitumour protein  $\alpha$ -sarcin and phospholipid vesicles. *Biochem. J.* **258**, 569-575.
- Gasset, M., Oñaderra, M., Goormaghtigh, E. y Gavilanes, J.G. (1991a) Acid phospholipid vesicles produce conformational changes on the antitumor protein  $\alpha$ -sarcin. *Biochim. Biophys. Acta* **1080**, 51-58.
- Gasset, M., Oñaderra, M., Martínez del Pozo, A., Schiavo, G.P., Laynez, J., Usobiaga, P. y Gavilanes, J.G. (1991b) Effect of the antitumour protein  $\alpha$ -sarcin on the thermotropic behaviour of acid phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1068**, 9-16.
- 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)  $\alpha$ -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) Spectroscopical characterization of the alkylated  $\alpha$ -sarcin cytotoxin. Analysis of the structural requirements for the protein-lipid bilayer hydrophobic interaction. *Biochim. Biophys. Acta* **1252**, 43-52.
- Gasset, M., Mancheño, J.M., Laynez, J., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1995b) Thermal unfolding of the cytotoxin  $\alpha$ -sarcin. Phospholipid binding induces destabilization of the protein structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1252**, 126-134.
- Gilbert, R.J., Fucini, P., Connell, S., Fuller, S.D., Nierhaus, K.H., Robinson, C.V., Dobson, C.M. y Stuart, D.I. (2004) Three-dimensional structures of translating ribosomes by Cryo-EM. *Mol. Cell* **14**, 57-66.
- Glitz, D.G. y Dekker, C.A. (1964) Studies on a ribonuclease from *Ustilago sphaerogena*. I. Purification and properties of the enzyme. *Biochemistry* **20**, 1391-1399.
- Glück, A. y Wool, I.G. (1996) Determination of the 28 S ribosomal RNA identity element (G4319) for  $\alpha$ -sarcin and the relationship of recognition to the selection of the catalytic site. *J. Mol. Biol.* **256**, 838-848.
- Glück, A. y Wool, I.G. (2002) Analysis by systematic deletion of amino acids of the action of the ribotoxin restrictocin. *Biochim. Biophys. Acta* **1594**, 115-126.
- Glück, A., Endo, Y. y Wool, I.G. (1994) The ribosomal RNA identity elements for ricin and for  $\alpha$ -sarcin: mutations in the putative CG pair that closes a GAGA tetraloop. *Nucl. Acids Res.* **22**, 321-324.

- Gohda, K., Oka, K., Tomita, K. y Hakoshima, T. (1994) Crystal structure of RNase T1 complexed with the product nucleotide 3'-GMP. Structural evidence for direct interaction of histidine 40 and glutamic acid 58 with the 2'-hydroxyl group of the ribose. *J. Biol. Chem.* **269**, 17531-17356.
- Golden, B.L., Ramakrishnan, V. y White, S.W. (1993) Ribosomal protein L6: structural evidence of gene duplication from a primitive RNA binding protein. *EMBO J.* **12**, 4901-4908.
- Goldin, A., Serpick, A.A. y Mantel, N. (1966) Experimental screening procedures and clinical predictability value. *Cancer Chemotherapy Reports* **50**, 173-218.
- Goyal, A. y Batra, J.K. (2000) Inclusion of a furin-sensitive spacer enhances the cytotoxicity of ribotoxin restrictocin containing recombinant single-chain immunotoxins. *Biochem. J.* **345**, 247-254.
- Goyal, A., Seth, D. y Batra, J.K. (2002) Role of cis prolines 112 and 126 in the functional activity of ribonucleolytic toxin restrictocin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**, 812-817.
- Greenberger, P.A. (2002) Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **110**, 685-692.
- Gromadski, K.B. y Rodnina, M.V. (2004) Streptomycin interferes with conformational coupling between codon recognition and GTPase activation on the ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 316-322.
- Haigis, M.C. y Raines, R.T. (2003) Secretory ribonucleases are internalized by a dynamin-independent endocytic pathway. *J. Cell Sci.* **116**, 313-324.
- Haigis, M.C., Kurten, E.L. y Raines, R.T. (2003) Ribonuclease inhibitor as an intracellular sentry. *Nucleic Acids Res.* **31**, 1024-1032.
- Hartley, R.W. (1997) Barnase and barstar. En *Ribonucleases: structures and functions*. D'Alessio, G. y Riordan, J.F., eds. Academic Press, pp. 51-100.
- 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.
- Hemann, S., Nikolaizik, W.H., Schoni, M.H., Blaser, K. y Cramer, R. (1998) Differential IgE recognition of recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens by cystic fibrosis patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis or Aspergillus allergy. *Eur. J. Immunol.* **28**, 1155-1160.
- Hertler, A.A. y Frankel, A.E. (1989) Immunotoxins: a clinical review of their use in the treatment of malignancies. *J. Clin. Oncol.* **7**, 1932-1942.
- Hiller, R., Laffer, S., Harwanegg, C., Huber, M., Schmidt, W.M., Twardosz, A., Barletta, B., Becker, W.M., Blaser, K., Breiteneder, H., Chapman, M., Cramer, R., Duchene, M., Ferreira, F., Fiebig, H., Hoffmann-Sommergruber, K., King, T.P., Kleber-Janke, T., Kurup, V.P., Lehrer, S.B., Lidholm, J., Muller, U., Pini, C., Reese, G., Scheiner, O., Scheynius, A., Shen, H.D., Spitzauer, S., Suck, R., Swoboda, I., Thomas, W., Tinghino, R., Van Hage-Hamsten, M., Virtanen, T., Kraft, D., Muller, M.W. y Valenta, R. (2002) Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *FASEB J.* **16**, 414-416.
- Hofsteenge, J. (1997) Ribonuclease inhibitor. En *Ribonucleases: structures and functions*. D'Alessio, G. y Riordan, J.F., eds. Academic Press, pp. 621-658.
- Holmberg, L. y Nygard, O. (1996) Depurination of A4256 in 28 S rRNA by the ribosome-inactivating proteins from barley and ricin results in different ribosome conformations. *J. Mol Biol.* **259**, 81-94.
- Hooper, L.V., Stappenbeck, T.S., Hong, C.V. y Gordon, J.I. (2003) Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat. Immunol.* **4**, 269-273.
- Huhn, M., Sasse, S., Tur, M.K., Matthey, B., Schinkothe, T., Rybak, S.M., Barth, S. y Engert, A. (2001) Human angiogenin fused to human CD30 ligand (Ang-CD30L) exhibits specific cytotoxicity against CD30-positive lymphoma. *Cancer Res.* **61**, 8737-8742.
- Ilinkaya, O.N., Dreyer, F., Mitkevich, V.A., Shaw, K.L., Pace, C.N. y Makarov, A.A. (2002) Changing the net charge from negative to positive makes ribonuclease Sa cytotoxic. *Protein Sci.* **11**, 2522-2525.

- Ilinskaya, O.N., Koschinski, A., Mitkevich, V.A., Repp, H., Dreyer, F., Pace, C.N. y Makarov, A.A. (2004) Cytotoxicity of RNases is increased by cationization and counteracted by K(Ca) channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **314**, 550-554.
- Irie, M. (1997) RNase T<sub>1</sub>/RNase T<sub>2</sub> family RNases. En *Ribonucleases: structures and functions*. D'Alessio, G. y Riordan, J.F., eds. Academic Press, pp. 101-130.
- Johnstone, S.A., Gelmon, K., Mayer, L.D., Hancock, R.E. y Bally, M.B. (2000) In vitro characterization of the anticancer activity of membrane-active cationic peptides. I. Peptide-mediated cytotoxicity and peptide-enhanced cytotoxic activity of doxorubicin against wild-type and p-glycoprotein over-expressing tumor cell lines. *Anticancer Drug Des.* **15**, 151-160.
- Kanaya, S. y Uchida, T. (1986) Comparison of the primary structures of ribonuclease U2 isoforms. *Biochem. J.* **240**, 163-170.
- 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.
- Kao, R. y Davies, J. (2000) Single amino acid substitutions affecting the specificity of the fungal ribotoxin mitogillin. *FEBS Lett.* **466**, 87-90.
- Kao, R., Shea, J.E., Davies, J. y Holden, D.W. (1998) Probing the active site of mitogillin, a fungal ribotoxin. *Mol. Microbiol.* **29**, 1019-1027.
- Kao, R., Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, A., Cramer, R. y Davies, J. (2001) Mitogillin and related fungal ribotoxins. *Methods Enzymol.* **341**, 324-335.
- Kim, J.S., Soucek, J., Matousek, J. y Raines, R.T. (1995) Mechanism of ribonuclease cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **270**, 31097-31102.
- Klein, D.J., Moore, P.B. y Steitz, T.A. (2004) The roles of ribosomal proteins in the structure assembly, and evolution of the large ribosomal subunit. *J. Mol. Biol.* **340**, 141-177.
- Knutsen, A.P., Mueller, K.R., Levine, A.D., Chouhan, B., Hutcheson, P.S. y Slavin, R.G. (1994) Asp f I CD4+ TH2-like T-cell lines in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **94**, 215-221.
- Knutsen, A.P., Hutcheson, P.S., Slavin, R.G. y Kurup, V.P. (2004) IgE antibody to *Aspergillus fumigatus* recombinant allergens in cystic fibrosis patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy* **59**, 198-203.
- Koike, T., Uchida, T. y Egami, F. (1971) Synthesis of adenylyl-(3',5')-nucleosides, adenylyl-(3',5')-guanosine 2',3'-cyclic phosphate, and oligoadenylyc acids by ribonuclease U<sub>2</sub>. *Biochemistry* **69**, 111-117.
- Kreitman, R.J. (2001) Toxin-labeled monoclonal antibodies. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2**, 313-325.
- Kurup, V.P. (2003) Fungal allergens. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **3**, 416-423.
- Kurup, V.P., Hari, V., Guo, J., Murali, P.S., Resnick, A., Krishnan, M., Fink, J.N. (1996) *Aspergillus fumigatus* peptides differentially express Th1 and Th2 cytokines. *Peptides* **17**, 183-190.
- Kurup, V.P., Banerjee, B., Murali, P.S., Greenberger, P.A., Krishnan, M., Hari, V. y Fink, J.N. (1998) Immunodominant peptide epitopes of allergen, Asp f 1 from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Peptides* **19**, 1469-1477.
- Kurup, V.P., Banerjee, B., Hemmann, S., Greenberger, P.A., Blaser, K. y Cramer, R. (2000) Selected recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens bind specifically to IgE in ABPA. *Clin. Exp. Allergy* **30**, 988-993.

- Kurup, V.P., Xia, J.Q., Cramer, R., Rickaby, D.A., Choi, H.Y., Fluckiger, S., Blaser, K., Dawson, C.A. y Kelly, K.J. (2001) Purified recombinant *A. fumigatus* allergens induce different responses in mice. *Clin. Immunol.* **98**, 327-336.
- Kurup, V.P., Shen, H.D. y Vijay, H. (2002) Immunobiology of fungal allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **129**, 181-188.
- 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  $\alpha$ -sarcin in *Escherichia coli*. *Gene* **142**, 147-151.
- Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Lacadena, V., Martínez-Ruiz, A., Mancheño, J.M., Oñaderra, 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  $\alpha$ -sarcin. *Proteins* **37**, 474-484.
- 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) En *Genetically engineered toxins*, Frankel, A.E., ed. Marcel Dekker, pp. 237-258.
- Langedijk, J.P. (2002) Translocation activity of C-terminal domain of pestivirus E<sub>ms</sub> and ribotoxin L3 loop. *J. Biol. Chem.* **277**, 5308-5314.
- Larsson, S.L., Sloma, M.S. y Nygard, O. (2002) Conformational changes in the structure of domains II and V of 28S rRNA in ribosomes treated with the translational inhibitors ricin or  $\alpha$ -sarcin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1577**, 53-62.
- Lehmann, K.A. y Bass, B.L. (2000) Double-stranded RNA adenosine deaminases ADAR1 and ADAR2 have overlapping specificities. *Biochemistry* **39**, 12875-12884.
- Leland, P.A. y Raines, R.T. (2001) Cancer chemotherapy-ribonucleases to the rescue. *Chem. Biol.* **8**, 405-413.
- Lin, A., Chen, C.K. y Chen, Y.J. (1991) Molecular action of tricholin, a ribosome-inactivating protein isolated from *Trichoderma viride*. *Mol. Microbiol.* **5**, 3007-3013.
- Liprandi, F., Moros, Z., Gerder, M., Ludert, J.E., Pujol, F.H., Ruiz, M.C., Michelangeli, F., Charpilienne, A., Cohen, J. (1997) Productive penetration of rotavirus in cultured cells induces coentry of the translation inhibitor  $\alpha$ -sarcin. *Virology* **237**, 430-438.
- Liu, G., Hao, Q., Zhang, Y., Gao, G., Yan, G., Yao, Q. y Li, Q. (1997) Fusion of phospholipid vesicles induced by the ribosome inactivating protein saporin. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **42**, 873-880.
- 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.
- 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, M.J., Jolliffe, N.A., Marsden, C.J., Pateman, C.S., Smith, D.C., Spooner, R.A., Watson, P.D. y Roberts, L.M. (2003) Ricin. Mechanisms of cytotoxicity. *Toxicol. Rev.* **22**, 53-64.
- Loverix, S. y Steyaert, J. (2001) Deciphering the mechanism of RNase T1. *Methods Enzymol.* **341**, 305-323.
- Loverix, S., Doumen, J. y Steyaert, J. (1997) Additivity of protein-guanine interactions in ribonuclease T1. *J. Biol. Chem.* **272**, 9635-9639.

- Macbeth, M.R. y Wool, I.G. (1999) The phenotype of mutations of G2655 in the sarcin/ricin domain of 23 S ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* **285**, 965-975.
- MacIntosh, G.C., Bariola, P.A., Newbiggin, E. y Green, P.J. (2001) Characterization of Rny1, the *Saccharomyces cerevisiae* member of the T2 RNase family of RNases: unexpected functions for ancient enzymes?. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **98**, 1018-1023.
- Madan, T., Priyadarsiny, P., Vaid, M., Kamal, N., Shah, A., Haq, W., Katti, S.B. y Sarma, P.U. (2004) Use of a synthetic peptide epitope of Asp f 1, a major allergen or antigen of *Aspergillus fumigatus*, for improved immunodiagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11**, 552-558.
- Mahler, V., Vrtala, S., Kuss, O., Diepgen, T.L., Suck, R., Cromwell, O., Fiebig, H., Hartl, A., Thalhamer, J., Schuler, G., Kraft, D. y Valenta, R. (2004) Vaccines for birch pollen allergy based on genetically engineered hypoallergenic derivatives of the major birch pollen allergen, Bet v 1. *Clin. Exp. Allergy* **34**, 115-122.
- Makarov, A.A. e Ilinskaya, O.N. (2003) Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets. *FEBS Lett.* **540**, 15-20.
- Mancheño, J.M., Gasset, M., Lacadena, J., Ramón, F., Martínez del Pozo, Á., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1994) Kinetic study of the aggregation and lipid-mixing produced by  $\alpha$ -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., Albar, J.P., Lacadena, J., Martínez del Pozo, A., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1995) Membrane interaction of a  $\beta$ -structure-forming synthetic peptide comprising the 116-139<sup>th</sup> sequence of the cytotoxic protein  $\alpha$ -sarcin. *Biophys. J.* **68**, 2387-2395.
- Mancheño, J.M., Martínez del Pozo, A., Albar, J.P., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1998) A peptide of nine amino acid residues from  $\alpha$ -sarcin cytotoxin is a membrane-perturbing structure. *J. Peptide Res.* **51**, 142-148.
- Marchant, A. y Hartley, M.R. (1995) The action of pokeweed antiviral protein and ricin A-chain on mutants in the alpha-sarcin loop of Escherichia coli 23S ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* **254**, 848-855.
- Marr, K.A., Patterson, T. y Denning, D. (2002) Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **16**, 875-894.
- Martínez-Oyanedel, J., Choe, H.W., Heinemann, U. y Saenger, W. (1991) Ribonuclease T1 with free recognition and catalytic site: crystal structure analysis at 1.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **222**, 335-352.
- Martínez Ruiz, A. (2000) Estudio de las relaciones estructura-función en toxinas proteicas de *Aspergillus*: secreción y actividad ribonucleolítica. *Tesis Doctoral*.
- Martínez-Ruiz A, Martínez del Pozo, A., Lacadena, J., Mancheño, J.M., Oñaderra, M., López-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. (2004) Estudio de las relaciones estructura-función de la citotoxina  $\alpha$ -sarcina. *Tesis Doctoral*.
- Masip, M., Lacadena, J., Mancheño, 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  $\alpha$ -sarcin. *Eur. J. Biochem.* **268**, 6190-6196.

- Masip, M., García-Ortega, L., Olmo, N., García-Mayoral, M.F., Pérez-Cañadillas, J.M., Bruix, M., Oñaderra, M., Martínez del Pozo, A. y Gavilanes, J.G. (2003) Leucine 145 of the ribotoxin  $\alpha$ -sarcin plays a key role for determining the specificity of the ribosome-inactivating activity of the protein. *Protein Sci.* **12**, 161-169.
- Matousek, J. (2001) Ribonucleases and their antitumor activity. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **129**, 175-191.
- Matousek, J., Soucek, J., Slavik, T., Tomanek, M., Lee, J.E. y Raines, R.T. (2003) Comprehensive comparison of the cytotoxic activities of onconase and bovine seminal ribonuclease. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **136**, 343-356.
- Mauguen, Y., Hartley, R.W., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Bricogne, G., Chothia, C. y Jack, A. (1982) Molecular structure of a new family of ribonucleases. *Nature* **297**, 162-164.
- Mears, J.A., Cannone, J.J., Stagg, S.M., Gutell, R.R., Agrawal, R.K. y Harvey, S.C. (2002) Modeling a minimal ribosome based on comparative sequence analysis. *J. Mol. Biol.* **321**, 215-234.
- Miescher, S.M. y Vogel, M. (2002) Molecular aspects of allergy. *Mol. Aspects Med.* **23**, 413-462.
- Miller, S.P. y Bodley, J.W. (1988)  $\alpha$ -Sarcin cleaves ribosomal RNA at the  $\alpha$ -sarcin site in the absence of ribosomal proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**, 404-410.
- Miller, S.P. y Bodley, J.W. (1991) Alpha-sarcin cleavage of ribosomal RNA is inhibited by the binding of elongation factor G or thiostrepton to the ribosome. *Nucleic Acids Res.* **19**, 1657-1660.
- 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.
- Mock, J.W., Ng, T.B., Wong, R.N., Yao, Q.Z., Yeung, H.W. y Fong, W.P. (1996) Demonstration of ribonuclease activity in the plant ribosome-inactivating proteins alpha- and beta-momorcharins. *Life Sci.* **59**, 1853-1859.
- Moore, P.B. y Steitz, T.A., (2003) The structural basis of large ribosomal subunit function. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 813-850.
- 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. Immunology* **149**, 454-460.
- Nayak, S.K. y Batra, J.K. (1997) A single amino acid substitution in ribonucleolytic toxin restrictocin abolishes its specific substrate recognition activity. *Biochemistry* **36**, 13693-13699.
- Nayak, S.K., Rathore D. y Batra, J.K. (1999) Role of individual cysteine residues and disulfide bonds in the structure and function of *Aspergillus* ribonucleolytic toxin restrictocin. *Biochemistry* **38**, 10052-10058.
- Nayak, S.K., Shveta y Batra, J.K. (2000) Localization of the catalytic activity in restrictocin molecule by deletion mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1777-1783.
- Nayak, S.K., Bagga, S., Gaur, D., Nair, D.T., Salunke, D.M. y Batra, J.K. (2001) Mechanism of specific target recognition and RNA hydrolysis by ribonucleolytic toxin restrictocin. *Biochemistry* **40**, 9115-9124.
- Nelson, P., Kiriakidou, M., Sharma, A., Maniatakis, E. y Mourelatos, Z. (2003) The microRNA world: small is mighty. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 534-540.
- Newton, D.L. y Rybak, S.M. (2001) Preparation and preclinical characterization of RNase-based immunofusion proteins. *Methods Mol. Biol.* **160**, 387-406.
- Newton, D.L., Hansen, H.J., Mikulski, S.M., Goldenberg, D.M. y Rybak, S.M. (2001) Potent and specific antitumor effects of an anti-CD22-targeted cytotoxic ribonuclease: potential for the treatment of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **97**, 528-535.

- Ng, T.B., Lam, Y.W. y Wang, H. (2003) Calcaelin, a new protein with translation-inhibiting, antiproliferative and antimitogenic activities from the mosaic puffball mushroom *Calvatia caelata*. *Planta Med.* **69**, 212-217.
- Nielsen, K. y Boston, R.S. (2001) Ribosome-inactivating proteins: A Plant Perspective. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 785-816.
- Nikolaizik, W.H., Cramer, R., Blaser, K. y Schoni, M.H. (1996) Skin test reactivity to recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen I/a in patients with cystic fibrosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **111**, 403-408.
- Nishikawa, S., Morioka, H., Kim, H.J., Fuchimura, K., Tanaka, T., Uesugi, S., Hakoshima, T., Tomita, K.I., Ohtsuka, E. y Ikehara, M. (1987) Two histidine residues are essential for ribonuclease T1 activity as is the case of ribonuclease A. *Biochemistry* **26**, 8620-8624.
- Noda, N., Noguchi, S. y Satow, Y. (1997) Crystal structures of nucleic acid complexes of ribonuclease U2. *Nucl. Acids Symp. Series* **37**, 285-286.
- 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.
- Noller, H.F., Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Lancaster, L., Dallas, A., Fredrick, K., Earnest, T.N. y Cate, J.H. (2001) Structure of the ribosome at 5.5 Å resolution and its interactions with functional ligands. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **66**, 57-66.
- Ogle, J.M., Brodersen, D.E., Clemons, W.M.Jr., Tarry, M.J., Carter, A.P. y Ramakrishnan V. (2001) Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science* **292**, 897-902.
- Ogle, J.M., Carter, A.P. y Ramakrishnan, V. (2003) Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 259-266.
- 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  $\alpha$ -sarcin. Induction of cell death via apoptosis. *Eur. J. Biochem.* **268**, 2113-2123.
- Olsnes, S., Fernández-Puentes, C., Carrasco, L. y Vázquez, D. (1975) Ribosome inactivation by the toxic lectins abrin and ricin. Kinetics of the enzymic activity of the toxin A-chains. *Eur. J. Biochem.* **60**, 281-288.
- 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 Schuurmans, D.M. (1965)  $\alpha$ -sarcin, a new antitumor agent. II. Fermentation and antitumor spectrum. *Applied Microbiol.* **13**, 322-326.
- Onda, M., Wang, Q.C., Guo, H.F., Cheung, N.K. y Pastan, I. (2004) In vitro and in vivo cytotoxic activities of recombinant immunotoxin 8H9(Fv)-PE38 against breast cancer, osteosarcoma, and neuroblastoma. *Cancer Res.* **64**, 1419-1424.
- Oñaderra, M., Mancheño, J.M., Gasset, M., Lacadena, J., Schiavo, G., Martínez del Pozo, Á. y Gavilanes, J.G. (1993) Translocation of  $\alpha$ -sarcin across the lipid bilayer of asolectin vesicles. *Biochemistry* **295**, 221-225.
- Orlandi, R., Canevari, S., Conde, F.P., Leoni, F., Mezzanzanica, 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.
- Orlandi, A., Grasso, F., Corinti, S., Marinaro, M., Bonura, A., Boirivant, M., Colombo, P. y Di Felice, G. (2004) The recombinant major allergen of *Parietaria judaica* and its hypoallergenic variant: in vivo evaluation in a murine model of allergic sensitization. *Clin. Exp. Allergy* **34**, 470-477.
- 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.

- Pace, C.N., Heinemann, U., Hahn, U. y Saenger, W. (1991) Ribonuclease T1: structure, function and stability. *Angw. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**, 343-360.
- Paris, S., Monod, M., Diaquin, M., Lamy, B., Srruda, L.K., Punt, P.J. y Latgé, J.P. (1993) A transformant of *Aspergillus fumigatus* deficient in the antigenic cytotoxin ASPFI. *FEMS Microbiol. Lett.* **111**, 31-36.
- Perentesis, J.P., Miller, S.P. y Bodley, J.W. (1992) Protein toxin inhibitors of protein synthesis. *Biofactors* **3**, 173-184.
- Pérez Cañadillas, J.M. (1999) Estructura, dinámica y caracterización electrostática de la proteína  $\alpha$ -sarcina por resonancia magnética nuclear. *Tesis Doctoral*.
- 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 alpha-sarcin by NMR. Relationship between electrostatic interactions, structure, and catalytic function. *Biochemistry* **37**, 15865-15876.
- Pérez-Cañadillas, J.M., Guennegues, M., Campos-Olivas, R., Santoro, J., Martínez del Pozo, A., Gavilanes, J.G., Rico, M. y Bruix, M. (2002) Backbone dynamics of the cytotoxic ribonuclease alpha-sarcin by 15N NMR relaxation methods. *J. Biomol. NMR* **24**, 301-316.
- Pérez-Cañadillas, J.M., Santoro J, Campos-Olivas R, Lacadena J, Martínez del Pozo A, Gavilanes JG, Rico M y Bruix M. (2000) The highly refined solution structure of the cytotoxic ribonuclease  $\alpha$ -sarcin reveals the structural requirements for substrate recognition and ribonucleolytic activity. *J. Mol. Biol.* **299**, 1061-1073.
- Peumans, W.J., Hao, Q., Van Damme, E.J. (2001) Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *FASEB J.* **15**, 1493-1506.
- Raines, R.T. (1998) Ribonuclease A. *Chem. Rev.* **98**, 1045-1066.
- Rajamohan, F., Ozer, Z., Mao, C. y Uckun, F.M. (2001) Active center cleft residues of pokeweed antiviral protein mediate its high-affinity binding to the ribosomal protein L3. *Biochemistry* **40**, 9104-9114.
- Ramachandran, H., Jayaraman, V., Banerjee, B., Greenberger, P.A., Kelly, K.J., Fink, J.N. y Kurup, V.P. (2002) IgE binding conformational epitopes of Asp f 3, a major allergen of *Aspergillus fumigatus*. *Clin. Immunol.* **103**, 324-333.
- Ramachandran, H., Banerjee, B., Greenberger, P.A., Kelly, K.J., Fink, J.N. y Kurup, V.P. (2004) Role of C-terminal cysteine residues of *Aspergillus fumigatus* allergen Asp f 4 in immunoglobulin E binding. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11**, 261-265.
- Ramakrishnan, V. (2002) Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* **108**, 557-572.
- Rathore, D. y Batra, J.K. (1996) Generation of active immunotoxins containing recombinant restrictocin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **222**, 58-63.
- Rathore, D. y Batra, J.K. (1997) Construction, expression and characterization of chimaeric toxins containing the ribonucleolytic toxin restrictocin. *Biochem. J.* **324**, 815-822.
- Rathore, D., Nayak, S.K. y Batra, J.K. (1996) Expression of ribonucleolytic toxin restrictocin in *Escherichia coli*: purification and characterization. *FEBS Lett.* **392**, 259-262.
- 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.
- Riordan, J.F. (2001) Angiogenin. *Methods Enzymol.* **341**, 263-273.
- Rodnina, M. V. y Wintermeyer, W. (2001) Fidelity of aminoacyl-tRNA selection on the ribosome: kinetic and structural mechanisms. *Ann. Rev. Biochem.* **70**, 415-435.
- Rodnina, M.V. y Wintermeyer, W. (2003) Peptide bond formation on the ribosome: structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 334-340.



## 160 Bibliografía

---

- Rodnina, M.V., Fricke, R., Kuhn, L. y Wintermeyer, W. (1995) Codon-dependent conformational change of elongation factor Tu preceding GTP hydrolysis on the ribosome. *EMBO J.* **14**, 2613-2619.
- Rodríguez, R., López-Otín, Barber, D., Fernández-Luna, J.L., González, G. y Méndez, E. (1982) Amino acid sequence homologies in  $\alpha$ -sarcin, restrictocin and mitogillin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **108**, 315-321.
- Rodríguez-Fonseca, C., Phan, H., Long, K.S., Porse, B.T., Kirillov, S.V., Amils, R. y Garrett, R.A. (2000) Puromycin-rRNA interaction sites at the peptidyl transferase center. *RNA* **6**, 744-754.
- Rosenberg, H.F. y Domachowske, J. B. (1999) Eosinophils, ribonucleases and host defense: solving the puzzle. *Immunol. Res.* **20**, 261-274.
- Rushizky, G.W., Mozejko, J.H., Rogerson, D.J.Jr. y Sober, H. (1970) Characterization of enzymatic specificity of a ribonuclease from *Ustilago sphaerogena*. *Biochemistry* **9**, 4966-4971.
- Sacco, G., Drickamer, K. y Wool, I.G. (1983) The primary structure of the cytotoxin  $\alpha$ -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.
- Sánchez-Martínez, C. y Pérez-Martín, J. (2001) Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*-similar inputs, different outputs. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 214-221.
- Sandvig, K. y van Deurs, B. (2000) Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. *EMBO J.* **19**, 5943-5950.
- Sandvig, K. y van Deurs, B. (2002) Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett.* **529**, 49-53.
- Sato, S. y Uchida, T. (1975a) The amino acid sequence of ribonuclease U2 from *Ustilago sphaerogena*. *Biochem. J.* **145**, 353-360.
- Sato, S. y Uchida, T. (1975b) Ethoxyformylation of ribonuclease U2 from *Ustilago sphaerogena*. *J. Biochem.* **77**, 795-800.
- Sato, S. y Uchida, T. (1975c) The disulfide bridges of ribonuclease U2 from *Ustilago sphaerogena*. *J. Biochem.* **77**, 1171-1176.
- Savelsbergh, A., Matassova, N.B., Rodnina, M.V. y Wintermeyer W. (2000) Role of domains 4 and 5 in elongation factor G functions on the ribosome. *J. Mol. Biol.* **300**, 951-961.
- Schindler, D.G. y Davies, J.E. (1977) Specific cleavage of ribosomal RNA caused by  $\alpha$ -sarcin. *Nucleic Acid Res.* **4**, 1097-1100.
- Seggerson, K. y Moore, P.B. (1998) Structure and stability of variants of the sarcin-ricin loop of 28S rRNA: NMR studies of the prokaryotic SRL and a functional mutant. *RNA* **4**, 1203-1215.
- Sevcik, J., Urbanikova, L., Leland, P.A. y Raines, R.T. (2002) X-ray structure of two crystalline forms of a streptomycete ribonuclease with cytotoxic activity. *J. Biol. Chem.* **277**, 47325-47330.
- Simpson, J.C., Roberts, L.M., Romisch, K., Davey, J., Wolf, D.H. y Lord, J.M. (1999) Ricin A chain utilises the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter the cytosol of yeast. *FEBS Lett.* **459**, 80-84.
- Smith, J.M., Davies, J.E. y Holden, D.W. (1993) Construction and pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* mutants that do not produce the ribotoxin restrictocin. *Mol. Microbiol.* **9**, 1071-1077.
- Smith, J.M., Tang, C.M., Van Noorden, S. y Holden, D.W. (1994) Virulence of *Aspergillus fumigatus* double mutants lacking restrictocin and an alkaline protease in a low-dose model of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect. Immun.* **62**, 5247-5254.

- Sorrentino, S. (1998) Human extracellular ribonucleases: multiplicity, molecular diversity and catalytic properties of the major RNase types. *Cell Mol. Life Sci.* **54**, 785-794.
- Steitz, T.A. y Moore, P.B. (2003) RNA, the first macromolecular catalyst: the ribosome is a ribozyme. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 411-418.
- Steyaert, J. (1997) A decade of protein engineering on ribonuclease T1. Atomic dissection of the enzyme-substrate interactions. *Eur. J. Biochem.* **247**, 1-11.
- Steyaert, J. y Wyns, L. (1993) Functional interaction among the His40, Glu58, and His92. Catalysis of ribonuclease T1 as studied by double and triple mutants. *J. Mol. Biol.* **229**, 770-781.
- Steyaert, J., Haikal, A.F., Stanssens, P. y Wyns, L. (1992) Dissection of the ribonuclease T1 subsite. The transesterification kinetics of Asn36Ala and Asn98Ala ribonuclease T1 for minimal dinucleoside phosphates. *Eur. J. Biochem.* **203**, 551-555.
- Stirpe, F., Barbieri, L., Batelli, M.G., Soria, M. y Lappi, D.A. (1992) Ribosome-inactivating proteins from plants: Present studies and future prospects. *Biotechnology* **10**, 405-412.
- Svirshchevskaya, E., Frolova, E., Alekseeva, L., Kotzareva, O. y Kurup, V.P. (2000) Intravenous injection of major and cryptic peptide epitopes of ribotoxin, Asp f 1 inhibits T cell response induced by crude *Aspergillus fumigatus* antigens in mice. *Peptides* **21**, 1-8.
- Szewczak, A.A. y Moore, P.B. (1995) The sarcin/ricin loop, a modular RNA. *J. Mol. Biol.* **247**, 81-98.
- Szewczak, A.A., Moore, P.B., Chang, Y.L. y Wool, I.G. (1993) The conformation of the sarcin/ricin loop from 28S ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **90**, 9581-9585.
- Takahashi, K. y Hashimoto J. (1988) The amino acid sequence of ribonuclease U1, a guanine-specific ribonuclease from the fungus *Ustilago sphaerogena*. *J. Biochem (Tokyo)*. **103**, 313-320.
- Tama, F., Valle, M., Frank, J. y Brooks, C.L. 3<sup>rd</sup>. (2003) Dynamic reorganization of the functionally active ribosome explored by normal mode analysis and cryo-electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**, 9319-9323.
- Tenson, T., Lovmar, M. y Ehrenberg, M. (2003) The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J. Mol. Biol.* **330**, 1005-1014.
- Terao, K., Uchiumi, T., Endo, Y., Ogata, K. (1988) Ricin and  $\alpha$ -sarcin alter the conformation of 60S ribosomal subunits at neighboring but different sites. *Eur. J. Biochem.* **174**, 459-463.
- Turnay, J., Olmo, N., Jiménez, J., Lizarbe, M.A. y Gavilanes, J.G. (1993) Kinetic study of the cytotoxic effect of  $\alpha$ -sarcin, a ribosome inactivating protein from *A. giganteus*, on tumor cell lines: protein biosynthesis inhibition and cell binding. *Mol. Cell. Biochem.* **122**, 39-47.
- Uchida, T. y Egami, F. (1971) Microbial ribonucleases with special reference to RNases T1, T2, N1, and U2. En *The enzymes*. Boyer, P.D., ed. Academic Press, Nueva York y Londres, vol. 4, pp. 205-250.
- Uchida, T. y Shibata, Y. (1981) An affinity adsorbent, 5'-adenylate-aminohexyl-Sepharose. I. Purification and properties of two forms of RNase U2. *J. Biochem.* **90**, 463-471.
- Uchida, T., Arima, T. y Egami, F. (1970) Specificity of RNase U2. *J. Biochem.* **67**, 91-102.
- Uchiumi, T., Sato, N., Wada, A. y Hachimori, A. (1999) Interaction of the sarcin/ricin domain of 23 S ribosomal RNA with proteins L3 and L6. *J. Biol. Chem.* **274**, 681-686.
- Uchiumi, T., Honma, S., Endo, Y. y Hachimori, A. (2002) Ribosomal proteins at the stalk region modulate functional rRNA structures in the GTPase center. *J. Biol. Chem.* **277**, 41401-41409.
- Valenta, R. (2002) The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 446-453.
- Valenta, R. y Kraft, D. (2002) From allergen structure to new forms of allergen-specific immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 718-727.

## 162 Bibliografía

---

- Valle, M., Sengupta, J., Swami, N.K., Grassucci, R.A., Burkhardt, N., Nierhaus, K.H., Agrawal, R.K. y Frank, J. (2002) Cryo-EM reveals an active role for aminoacyl-tRNA in the accommodation process. *EMBO J.* **21**, 3557-3567.
- Valle, M., Zavialov, A., Li, W., Stagg, S.M., Sengupta, J., Nielsen, R.C., Nissen, P., Harvey, S.C., Ehrenberg, M. y Frank, J. (2003a) Incorporation of aminoacyl-tRNA into the ribosome as seen by cryo-electron microscopy. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 899-906.
- Valle, M., Zavialov, A., Sengupta, J., Rawat, U., Ehrenberg, M. y Frank, J. (2003b) Locking and unlocking of ribosomal motions. *Cell* **114**, 123-134.
- Vater, C.A., Bartle, L.M., Leszyk, J.D., Lambert, J.M. y Goldmacher, V.S. (1995) Ricin A chain can be chemically cross-linked to the mammalian ribosomal proteins L9 and L10e. *J. Biol. Chem.* **270**, 12933-12940.
- Vatzaki, E.H., Allen, S.C., Leonidas, D.D., Trautwein-Fritz, K., Stackhouse, J., Benner, S.A. y Acharya, K.R. (1999) Crystal structure of a hybrid between ribonuclease A and bovine seminal ribonuclease-the basic surface, at 2.0 Å resolution. *Eur. J. Biochem.* **260**, 176-182.
- Verweij, P.E., Meis, J.F., van den Hurk, P., Zoll, J., Samson, R.A. y Melchers, W.J. (1995) Phylogenetic relationships of five species of *Aspergillus* and related taxa as deduced by comparison of sequences of small subunit ribosomal RNA. *J. Med. Vet. Mycol.* **33**, 185-190.
- Vrtala, S., Focke-Tejkl, M., Swoboda, I., Kraft, D. y Valenta, R. (2004) Strategies for converting allergens into hypoallergenic vaccine candidates. *Methods* **32**, 313-320.
- Wang, H.X. y Ng, T.B. (2000) Lagenin, a novel ribosome-inactivating protein with ribonucleolytic activity from bottle gourd (*Lagenaria siceraria*) seeds. *Life Sci.* **67**, 2631-2638.
- 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.
- Weig, M., Frosch, M., Tintelnot, K., Haas, A., Gross, U., Linsmeier, B. y Heesemann, J. (2001) Use of recombinant mitogillin for improved serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus*-associated diseases. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 1721-1730.
- Weston, S.A., Tucker, A.D., Thatcher, D.R., Derbyshire, D.J. y Pauptit, R.A. (1994) X-ray structure of recombinant ricin A-chain at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **244**, 410-422.
- Wilson, K.S. y Nechifor, R. (2004) Interactions of translational factor EF-G with the bacterial ribosome before and after mRNA translocation. *J. Mol. Biol.* **337**, 15-30.
- Wool, I.G. (1997) Structure and mechanism of action of the cytotoxic ribonuclease  $\alpha$ -sarcin. En *Ribonucleases: structures and functions*. D'Alessio, G. y Riordan, J.F., eds. Academic Press, pp. 131-162.
- Xu, H., He, W.J. y Liu, W.Y. (2004) A novel ribotoxin with ribonuclease activity that specifically cleaves a single phosphodiester bond in rat 28S ribosomal RNA and inactivates ribosome. *Arch. Biochem. Biophys.* **427**, 30-40.
- Yang, X.J. 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., Gerczei, T., Glover, L.T. y Correll, C.C. (2001) Crystal structures of restrictocin-inhibitor complexes with implications for RNA recognition and base flipping. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 968-973.
- Yasuda, T. e Inoue, Y. (1982) Studies of catalysis by ribonuclease U2. Steady-state kinetics for transphosphorylation of oligonucleotide and synthetic substrates. *Biochemistry* **21**, 364-369.

Yasukawa, T., Kanei-Ishii, C., Maekawa, T., Fujimoto, J., Yamamoto, T. y Ishii, S. (1995) Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **270**, 25328-25331.

Yoshida, H. (2001) The ribonuclease T1 family. *Methods Enzymol.* **341**, 28-41.

Zegers, I., Loris, R., Dehollander, G., Fattah Haikal, A., Poortmans, F., Steyaert, J. y Wyns, L. (1998) Hydrolysis of a slow cyclic thiophosphate substrate of RNase T1 analyzed by time-resolved crystallography. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 280-283.

Zhang, C., Gong, Y., Ma, H., An, C., Chen, D. y Chen, Z.L. (2001) Reactive oxygen species involved in trichosanthin-induced apoptosis of human choriocarcinoma cells. *Biochem. J.* **355**, 653-661.



