

Actividad microbicida de la ribonucleasa y desoxirribonucleasa en cepas de bacterias patógenas *in vitro**

Susana Alcázar Leyva ‡
Elizabeth Guzmán Toledo ‡
Heberto Alcázar Montenegro ‡
Ma. Teresa Benítez Rodríguez ‡

Palabras clave: Nucleasas, desoxirribonucleasa, ribonucleasa, microbicida.

Key words: Nucleases, deoxyribonuclease, ribonuclease, microbicide.

RESUMEN

Las nucleasas son enzimas que por muchos años se han relacionado exclusivamente con la actividad digestiva. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que en condiciones naturales, tienen una función microbicida importante. El presente trabajo se desarrolló con el objeto de demostrar *in vitro* la acción germicida de la ribonucleasa (RNasa) y la desoxirribonucleasa (DNasa) cuando se aplican exógenamente en algunas cepas patógenas. Surge como una necesidad de analizar la acción directa de las nucleasas sobre ciertos microorganismos, debido a que al aplicarse terapéuticamente en pacientes afectados de procesos infecciosos producidos por estos microorganismos, se ha obtenido el control del padecimiento. En cultivos de cepas puras de *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*, se aplicaron directamente al medio de cultivo soluciones al 0.1, 1, 10, 25, 50 y 75% de RNasa

(0.00070 mg/mL) y/o DNasa (0.00035 mg/mL). Se valoró la viabilidad y el crecimiento de las colonias bacterianas conservadas en condiciones óptimas de nutrición, temperatura, pH y osmolaridad, a las 24, 48, 72 y 192 horas de exposición a estas nucleasas. Se observó, que el efecto lítico se manifiesta en la mayor concentración y que las distintas cepas muestran una sensibilidad diferente a las enzimas, ya sea que se apliquen individualmente o en forma simultánea. Se concluye, que las nucleasas tienen actividad antimicrobiana selectiva *in vitro*, que corrobora el efecto que se ha observado *in vivo*, en donde además, de demostrar el efecto microbicida selectivo y lisar directamente a los microorganismos, controlan la infección porque destruyen a las células infectadas e inhiben la replicación de los microorganismos que se mantienen en el interior de algunas células.

ABSTRACT

Nucleases are enzymes that for many years have been related exclusively to the digestive activity. However, several studies have demonstrated that in natural conditions they also have an important microbicidal action. This work was performed with the aim to demonstrate *in vitro* the germicidal action of ribonuclease (RNase) and deoxyribonuclease (DNase) when they are exogenously administered to some pathogenic strains. It was

* Reconocimiento de CONACYT No.256/88, 256/90, 256/95.

‡ Instituto de Investigaciones Científicas Hans Selye, A.C.

Correspondencia:

Ma. Teresa Benítez Rodríguez. Coordinadora de Investigación
Av. San Bernabé 416-100 D. San Jerónimo. México, D.F.
C.P.10200, Tel y Fax: 595-70-03

performed as a need to analyze the direct action of nucleases over certain microorganisms, since therapeutic administration of nucleases to patients affected by infectious processes produced by these microorganisms achieve the control of the ailment. In pure stocks of *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*, we directly administered solutions at 0.1, 1, 10, 25, 50 and 75% RNase (0.00070 mg/mL) and/or DNase (0.00035 mg/mL). The viability and growth were evaluated for the bacterial colonies conserved in optimal conditions of nutrition, temperature, pH and osmolarity at the 24, 48, 72 and 192 hours of exposure to these nucleases. It was observed that the lytic effect was shown at the greatest concentration, and that the different stocks had different sensitivity to the enzymes, administered individually or simultaneously. It is concluded that nucleases have a selective antimicrobial effect *in vitro*, which corroborate the effect observed *in vivo*, where they also control the infectious process by destroying the infected cells and inhibiting the replication of those microorganisms kept inside some cells.

INTRODUCCION

Las infecciones, sin duda alguna, han constituido uno de los principales problemas de salud por la frecuencia que tienen y la diseminación con que se presentan, debido a que los microbios tienen un elevado potencial de variabilidad, pues a menudo se producen cambios mutagenéticos en los organismos infectantes en el curso de una infección, lo que dificulta su control. Esto ocurre porque los mecanismos de cambio genético, entre las bacterias, son básicamente similares a los que tienen lugar en otros organismos, pero como su tiempo de generación es muy breve, permite una selección más rápida de los microorganismos mejor dotados de una población para sobrevivir en un ambiente determinado.

La patogenicidad de las bacterias se basa en su capacidad de penetrar en el huésped y multiplicarse, lesionando a los tejidos por la liberación de ciertos factores generadores de la virulencia, y porque pueden ser capaces de expresarse genéticamente. Se incluyen entre éstos, algunos productos secretorios y componentes estructurales. La composición química de la superficie de los gérmenes patógenos impide hasta cierto grado su destrucción por los mecanismos de defensa del huésped incluso, cuando algunas bacterias son fagocitadas, llegan a multiplicarse en el interior de los fagocitos. En el huésped, las bacterias se encuentran perfectamente dotadas para adaptarse a los cambios del ambiente, lo cual explica el reto constante que los microbios representan para éste. Otro aspecto importante que impide su erradicación, es la resistencia que presentan a los agentes físicos y químicos, ya que pueden subsistir ante condiciones desfavorables como temperatu-

ras bajo cero y mayores a 60 °C. Sobreviven en el pus desecado y en el esputo de días o incluso semanas fuera del huésped, desarrollando actividades que garantizan su supervivencia. Por ejemplo, la resistencia a la penicilina en muchas cepas de *S. aureus* depende de su capacidad de producir penicilinas, propiedad transmitida por transducción que implica la presencia de plásmidos del estafilococo, portadores de genes que le confieren resistencia a los antibióticos¹.

Ante los problemas para controlar los procesos infecciosos se deben considerar los mecanismos naturales, para evitar la aplicación de inmunotoxinas, que generan severos efectos adversos². Esto nos remite a las nucleasas, moléculas ampliamente conocidas por su función enzimática, que permiten la degradación de los ácidos nucleicos³, de donde deriva su nombre⁴. A la fecha, se ha reportado que estas proteínas, se encuentran distribuidas normalmente en los distintos compartimentos de todas las células, así como en los líquidos corporales⁵, desempeñando funciones muy distintas a las digestivas⁶, entre las que se mencionan: la actividad antineoplásica⁷⁻⁹ mediante la inducción de la apoptosis¹⁰, regulación de la proliferación celular¹¹, de la reparación del ADN¹², antiinflamatoria¹³ y como microbicidas¹⁴⁻¹⁶. Su concentración varía de acuerdo a los siguientes factores: edad, estado de salud, tipo de padecimiento y a la respuesta que tienen los pacientes a los distintos tratamientos^{17,18}. Sin embargo, se sabe muy poco acerca de cómo realizan esta última función, por lo que la potencialidad terapéutica que tienen como microbicidas, ha sido poco explotada. Nuestra experiencia clínica, nos permite proponerlas para el control de los procesos infecciosos e inflamatorios; y el presente trabajo, muestra los estudios que se desarrollaron *in vitro* al exponer cepas de microorganismos patógenos a la acción directa de dos nucleasas: desoxirribonucleasa y ribonucleasa.

MATERIAL Y METODOS

Se emplearon cepas puras de: *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*.

Staphylococcus aureus: gérmenes anaerobios facultativos, no esporulados, muy resistentes a temperaturas extremas, fagocitosis, cloruro de mercurio y fenol, son productores de forúnculos, ántrax e infecciones generalizadas. Cuando penetran a tejidos profundos, producen necrosis. Su alta patogenicidad estriba en que elaboran coagulasa, sobreviven en el interior de los fagocitos que logran fagocitarlos, elaboran leucocidinas y generan hipersensibilidad retardada, lo cual incrementa las necrosis hísticas y la sensibilidad del huésped a las infecciones. Esta especie se encuentra en la piel y la cavidad orofaríngea del hombre, pero no es altamente infectivo por sí solo, a menos que haya otros factores coadyuvantes o predisponentes como una complicación traumática, quirúrgica, o en pacientes con procesos crónicos, caquetizantes como en la diabetes mellitus, cirrosis hepática y cáncer. Es sensible a los derivados semisintéticos de la penicilina y tópicamente a la lisostafina.

Proteus vulgaris y *P. mirabilis*: residentes normales del intestino humano, a menudo libres en el agua y suelo. Se encuentran normalmente en las heces humanas, especialmente cuando el individuo se está aplicando algún tratamiento microbicida o cuando sufre procesos diarreicos inducidos por otros microorganismos. Producen infecciones en las vías urinarias, particularmente *P. mirabilis*, aunque pueden producir infecciones más severas en otros sistemas. Usualmente, son sensibles a la carbenicilina y gentamicina, pero sólo la *P. mirabilis* es destruida por la penicilina G, cefalotina, ampicilina, kanamicina y cloranfenicol.

Klebsiella pneumoniae: también conocido como bacilo de Friedländer, Gram negativo. Normalmente se encuentra en el aparato respiratorio y en las heces de sujetos sanos. De igual modo, es frecuente en pacientes con diversos estados patológicos de la nariz, senos nasales y en algunos casos de neumonía, aunque no se le considera que sea la causa. Sus propiedades invasoras se deben a la actividad antifagocítica que tiene su cápsula, por lo que provocan abscesos pulmonares crónicos que a veces obligan a la extirpación mediante la cirugía. Es sensible a la kanamicina, gentamicina, polimixinas, cefalotina, cloranfenicol y estreptomicina.

Pseudomonas aeruginosa: se encuentran normalmente en el agua y suelo. También forman parte de la flora del intestino humano, saliva y piel. Es, además, parásito facultativo humano ya que actúa como oportunista, de preferencia en el medio hospitalario, en donde causa infecciones muy difíciles de tratar y a menudo mortales en pacientes altamente susceptibles como son ancianos y sujetos con las siguientes enfermedades subyacentes: procesos malignos, uremia crónica, fibrosis quística y hepatopatías. De la misma manera, es causante de infecciones en las vías urinarias, otitis media, meningitis, endocarditis, neumonía necrosante y lesiones caracterizadas por necrosis en la piel y ojos. Igualmente, se ha observado incremento de infecciones mortales por este microorganismo con el uso de dispositivos como catéteres y otros semejantes, ya que a través de ellos tienen rápido acceso a los órganos vitales, así como por transfusión de sangre o de líquidos contaminados. Se incrementa el riesgo por la resistencia que muestran estas bacterias a los desinfectantes ya que aún cuando son sensibles a la mayoría de los antibióticos (particularmente a la carbenicilina, colistina y gentamicina) desarrollan resistencia a éstos rápidamente.

Salmonella typhi: se encuentra libre como consecuencia de la contaminación fecal. Persiste poco tiempo en forma libre, pero es en esta forma como ingresa al tracto digestivo por alimentos o agua contaminada que la contienen o la adquieren al ser manipulados por portadores crónicos. Después de que se adquiere, se manifiesta alrededor de una semana de incubación produciendo la salmonelosis la cual puede manifestarse de tres formas: fiebres entéricas, septicemias y gastroenteritis aguda. Su erradicación se dificulta por la capacidad que tienen para sobrevivir en el interior de los fagocitos, por lo que hay un gran número de portadores. Es sensible al cloranfenicol y ampicilina.

Escherichia coli: se encuentra normalmente en el tracto digestivo. Es la especie predominante en el intestino grueso por lo que se le conoce como colibacilo. Es comensal, pero bajo ciertas condiciones se torna patógena, pasa a la sangre y a la linfa e invade los riñones, vesícula y conductos biliares. También produce infecciones en las vías urinarias al desplazarse desde la uretra. Asimismo, algunas cepas patógenas son parte del cuadro productor de la apendicitis, peritonitis, y tienen un papel muy importante en cuadros diarreicos agudos en niños pequeños, en la diarrea del viajero y en las intoxicaciones por alimentos. La mayoría de las cepas son sensibles a las sulfas, ampicilina, cefalosporina, tetraciclina y carbenicilina.

Las cepas puras de estos patógenos se cultivaron en placas de agar y por siembras sucesivas se multiplicaron. Las que se conservaron como control, se incubaron con suero de ternera fetal a una concentración del 10%, mientras que las experimentales, se trataron con RNasa y/o DNasa a concentraciones al 0.1, 1, 10, 25, 50 y 75% de soluciones que contienen 0.00070 y 0.00035 mg/mL respectivamente, por periodos de 24, 48, 72 y 192 horas. Se analizó el crecimiento de las colonias cada 24 horas por un periodo de ocho días y se calculó la curva de crecimiento, que se define como la velocidad de crecimiento de las colonias bacterianas en medio fresco a través de una serie de fases representada logarítmicamente. Se hicieron cuatro repeticiones de cada experimento.

Las nucleasas, DNasa y RNasa, son extraídas de tejidos animales, páncreas y bazo de bovino respectivamente, purificadas y liofilizadas (Merck) y posteriormente tratadas químicamente para que se conserven activas estando en solución (Hypatia), pues siendo proteínas con carácter enzimático, son muy lábiles a múltiples factores que deben conservarse constantes para evitar su desnaturalización e inactivación. Este tratamiento se hace también con el fin de que aún cuando se encuentren en solución, mantengan sus características lo más parecido a las que se encuentran en el organismo, de tal manera que cuando se administran a los pacientes, no generen efectos negativos y en cambio, desarrollen las funciones que realizan en condiciones naturales. Deben administrarse en dosis suprafisiológicas, que garanticen su ingreso a los tejidos infectados, inflamados o lesionados a pesar de que puedan disminuir su concentración o su actividad al ingresar al organismo.

RESULTADOS

Los resultados son el promedio de cuatro experimentos y se observan en las figuras 1-7. Los valores representan el porcentaje del crecimiento de las colonias bacterianas (inversa de la actividad lítica de las nucleasas), por lo que se debe interpretar que a mayor desarrollo de las colonias, menor actividad de las nucleasas y viceversa. De acuerdo a los resultados, se puede interpretar en forma general, que los microorganismos sensibles a ambas nucleasas fueron los pertenecientes a las cepas de *Proteus mirabilis* y *Klebsiella pneumoniae*. Las cepas que mostraron mayor sensibilidad a la DNasa fueron *Pseudomonas aeruginosa*, y *Salmonella typhi* y a la RNasa *Staphylococcus aureus*,

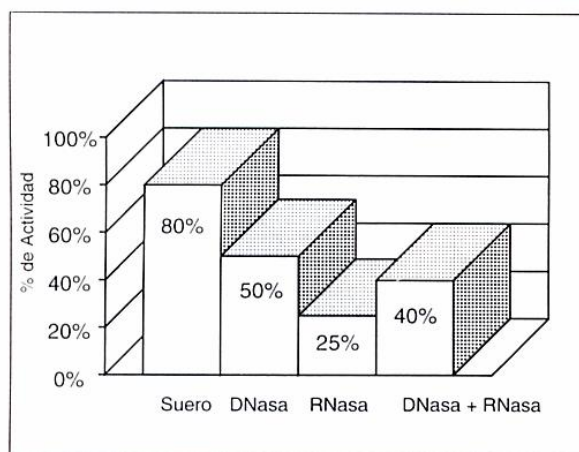


Figura 1. Colonias de *Staphylococcus aureus* tratadas con DNasa, RNasa y ambas. Se observa mayor sensibilidad a la RNasa.

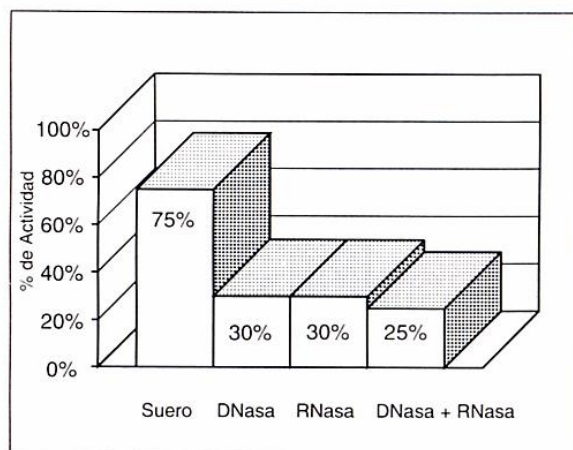


Figura 3. Se observa que *Proteus mirabilis*, es sensible a ambas nucleasas, sin embargo el efecto no es aditivo cuando se aplican simultáneamente.

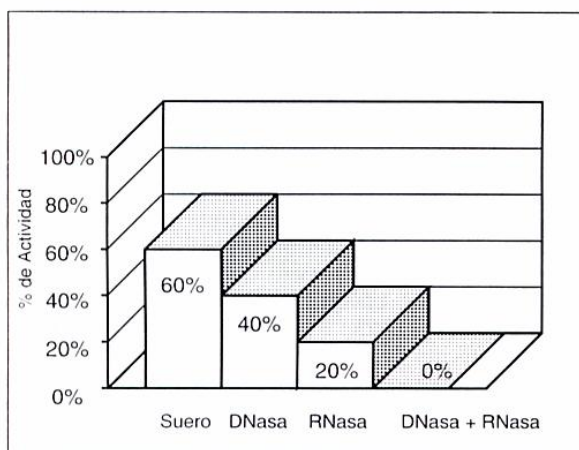


Figura 2. Las colonias de *Proteus vulgaris* muestran sensibilidad a las dos nucleasas. Además, se observa que hay un efecto aditivo cuando actúan juntas.

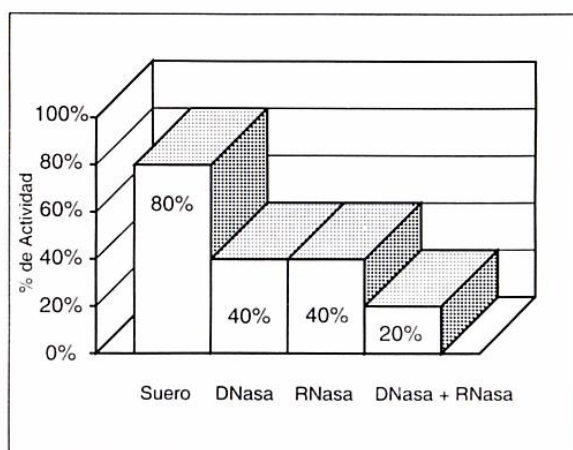


Figura 4. Las colonias de *Klebsiella pneumoniae*, son sensibles a ambas nucleasas y el efecto aumenta parcialmente cuando se agregan simultáneamente.

Proteus vulgaris, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Como puede observarse, *Proteus vulgaris* y *Salmonella typhi* mostraron alta sensibilidad a la mezcla de las dos nucleasas a corto o largo plazo. También se observó, que los cultivos que se conservaron con suero de ternera fetal (controles) mostraron disminución en su tasa de crecimiento, incluso en algunos sí se obtuvo un resultado significativo estadísticamente ($p < 0.05$) con respecto al 100% que se espera del crecimiento de las colonias, lo cual no se logró con ninguna de las cepas.

DISCUSION

Existen múltiples factores que determinan serias dificultades para el control bacteriano tanto por las características de los

microorganismos como por las que presenta el paciente. Dentro de las primeras se incluyen: las distintas velocidades de multiplicación máxima, las cuales varían considerablemente entre los diferentes tipos de bacterias, aunque las bacterias no mantienen indefinidamente el crecimiento exponencial debido a factores como: limitaciones nutricionales, acumulación de metabolitos tóxicos, o ambas. Incluso, en condiciones ideales *in vitro*, las poblaciones totales máximas rara vez exceden el número de 10^{10} /mL. Sin embargo, al encontrarse dentro de un huésped, las condiciones de crecimiento son óptimas, por lo que su desarrollo a corto plazo es muy notable, creando los problemas inherentes al huésped. Los mecanismos que actualmente se emplean terapéuticamente, en muchas ocasiones aún cuan-

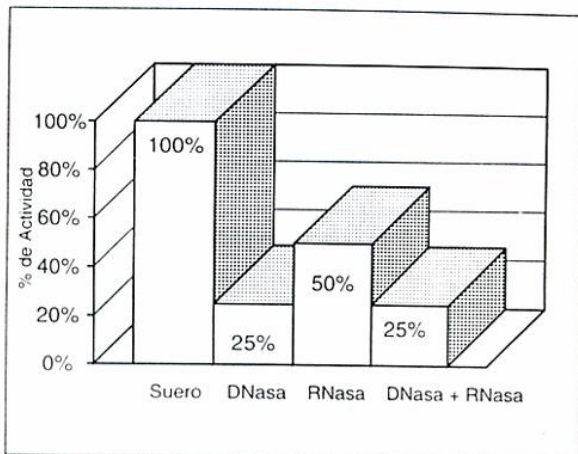


Figura 5. Se observa que las colonias de *Pseudomonas aeruginosa* tienen una mayor sensibilidad al efecto lítico de la DNasa.

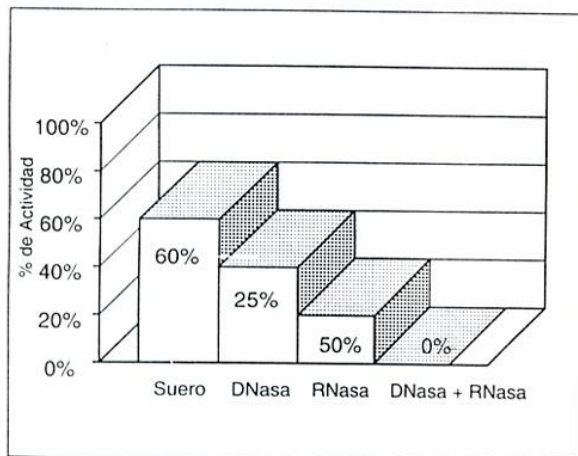


Figura 6. Las colonias de *Salmonella typhi*, muestran alta sensibilidad a la combinación de DNasa y RNasa.

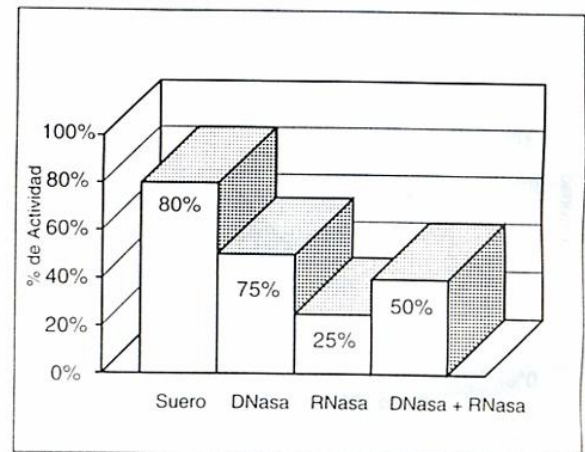


Figura 7. Se observa que *Escherichia coli*, es más sensible a la RNasa.

vo, conservado a través de la escala filogenética, puesto que es un proceso de reconocimiento y destrucción de estructuras ajenas al organismo que se encuentra ampliamente distribuido en el reino animal. Como las nucleasas se encuentran distribuidas en todos los compartimentos extra e intracelulares, se pueden mantener en contacto con cualquier componente del organismo. Una vez que las nucleasas establecen contacto con los microorganismos invasores, células envejecidas, lesionadas, infectadas o transformadas penetran a su interior, probablemente porque el aumento de la permeabilidad de la membrana o pared celular lesionada o bien alterada así lo permite debido a la conformación que adquieren cuando se encuentran en solución, forma en que se manejan en nuestro laboratorio y que parece ser determinante²⁰ en el efecto que tienen sobre el control de los procesos infecciosos, inflamatorios *in vivo* e *in vitro*, o bien, penetrando a través de moléculas transportadoras que favorecen su incorporación²¹, desencadenando la apoptosis¹⁰. Otros mecanismos propuestos que explican la función microbicida de las nucleasas, es la capacidad que tienen para reconocer pares de bases mal ensambladas y eliminarlas¹², lo que podría ser el caso de los ácidos nucleicos de virus que se integran al ADN de las células del huésped o, bien, que son producto de alguna alteración durante los procesos de transcripción y/o traducción producto de la infección misma²² o a través del mecanismo de síntesis del interferón²³. Sin duda, faltan muchos estudios por realizar que permitan demostrar estas hipótesis, sin embargo, no debe descartarse el empleo terapéutico de las nucleasas para el control de los procesos infecciosos e inflamatorios, que generalmente están asociados, como método único o asociado a otras terapias, puesto que no producen efectos negativos por ser éste un mecanismo natural y que no se contraponen con ningún otro tratamiento.

do logran controlar el problema infeccioso, generan severos efectos secundarios. Se han empleado terapéuticamente las nucleasas con la finalidad de diluir las secreciones mucosas, como en la fibrosis quística¹⁹. Esto se debe a que por su función enzimática degradan las proteínas que se encuentran en las secreciones. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que las nucleasas tienen igualmente funciones antiinflamatorias, antitumorales y microbicidas, pero su uso terapéutico para el control de estas enfermedades no se ha generalizado, probablemente por falta de información. En la actualidad, no se ha esclarecido cómo realizan estas funciones, no obstante, se tienen algunos datos que permiten interpretar estas funciones. Por ejemplo, la función microbicida pudiera ser un mecanismo de defensa primiti-

CONCLUSIONES

Las nucleasas desarrollan actividades microbicidas específicas, por lo que deben considerarse como un método terapéutico único o complementario para el control de las infecciones bacterianas y quizá virales, considerando que el tratamiento será tanto más efectivo cuanto más precozmente sea instaurado.

REFERENCIAS

1. Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS, Wood WB, McCarty M. *Tratado de microbiología*. 2a ed. Barcelona, España: Salvat, 1979: 1559.
2. Vittetta ES, Thorpe PE, Uhr J. *Immunotoxins: Magic Bullets or Misguided Missiles*. Immunol Today 1993; 14: 253-259.
3. Miyauchi K, Ogawa M, Shibata T, Matsuda K, Mori T, Ito K, et al. *Development of a Radioimmunoassay for Human Deoxyribonuclease I*. Clin Chim Acta 1986; 154: 115-123.
4. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Principles of Biochemistry*. 3a ed. USA: Worth, 1993.
5. Alberghina M, Stella AMG. *Age-related Changes of Ribonuclease Activities in Various Regions of the Rat Central Nervous System*. J Neurochem 1988; 51: 21-24.
6. Dake E, Hofmann TJ, McIntire S, Hudson A, Zassenhaus HP. *Purification and Properties of the Major Nuclease from Mitochondria of *Sacharomyces Cerevisiae**. J Biol Chem 1988; 263: 7961-7702.
7. Alcázar MH, Alcázar LS, Rivera LRM, Benítez RMT. *Therapeutic Perspectives of Nucleases in Cancer*. Inv Med Int 1995; 22: 9-13.
8. Deonarain MP, Epenetos AA. *Targeting Phosphodiesterases as a Strategy for Killing Tumor Cells*. Cell Biophys 1994; 24/25: 249-257.
9. Alvarado VN, Alcázar S, Benítez RMT, Zamudio P, Rosas P. *Decrease in Viability and Proliferation Ability of Tumor Cell Lines by Effect of a Deoxyribonuclease*. Rev Inst Nal Enf Resp Méx 1996; 9: 93-99.
10. Peitsch MC, Polzar B, Stephan H, Crompton T, MacDonald HR, Mannherz HG, et al. *Characterization of the Endogenous Deoxyribonuclease Involved in Nuclear DNA Degradation During Apoptosis (Programmed Cell Death)*. EMBO J 1993; 12: 371-377.
11. Eder PS, Walder JA. *Ribonuclease H from K 562 Human Erythroleukemia Cells*. J Biol Chem 1991; 266: 6472-6479.
12. Eder PS, Walder RY, Walder JA. *Substrate Specificity of Human RNase H1 and its Role in Excision Repair of Ribose Residues Misincorporated in DNA*. Biochemie 1993; 75: 123-126.
13. Gibb JW. *Enzymes*. In: *Pharmaceutical Sciences*. Pensilvania: Marck Pub 1970: 1050-1053.
14. Laskowski M. *Deoxyribonuclease I*. In: Boyer PD, editor. *The Enzymes*. New York USA: Acad Press, 1971: 289-311.
15. Jayasena SD, Johnston DH. *Site Specific Cleavage of the Transactivation Response Site of Human Immunodeficiency Virus RNA with a tat Band Chemical Nuclease*. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 9: 3526-3530.
16. Youle JR, Wu YN, Mikulski MS. *RNase Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Infection of H9 Cells*. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 6012-6016.
17. Economidou KA, Lans M, Taper HS, Michaux JL, Roberfroid M. *Variations in Serum Alkaline DNase Activity. A New Means for Therapeutic Monitoring of Malignant Lymphomas*. J Am Can Soc Cancer 1988; 61: 1838-1843.
18. Endakova CA, Novgorodetzova TP. *A Study of Acid Nuclease Activity*. Lab Del 1991; 8: 16-19.
19. Hubbard R, McElvaney C, Birrer P. *DNase I for the Cystic Fibrosis Treatment*. N Engl J Med 1992; 326: 812-815.
20. Santoro J, González C, Bruix M, Neira JL, Nieto JL, Herranz J, et al. *Highresolution Three-dimensional Structure of Ribonuclease A in Solution by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. J Mol Biol 1993; 229: 120-125.
21. Linardou H, Deonarain MP, Spooner RA, Epenetos AA. *Deoxyribonuclease I (DNase I). A Novel Approach for Targeted Cancer Therapy*. Cell Biophys 1994; 24: 243-248.
22. Walder RY, Walder JA. *Role of RNase H in Hybrid-arrested Translation by Antisense Oligonucleotides*. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 5011-5015.
23. Zhou A, Hassel BA, Silverman RH. *Expression Cloning of 2'-5A Dependent RNase: A Uniquely Regulated Mediator of Interferon Action*. Cell 1993; 72: 753-765.