

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



**“Proteína Inactivadora de los Ribosomas de *Streptomyces
coelicolor*”**

TESIS

Para obtener el grado de
Maestro en Biotecnología

PRESENTA

I.B.Q. Ana Gisela Reyes Alvarado

DIRECTOR

Dr. Armando Mejía Alvarez

Febrero 2008

ÍNDICE GENERAL

	Página
1. Introducción	
1.1 Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas	10
1.1.1 Clasificación	10
1.1.2 Estructura	11
1.1.3. Mecanismo de acción	13
1.1.4. Distribución en la naturaleza	18
1.1.5 Toxicidad e interacción con las células	19
1.1.6 Otras actividades enzimáticas de las RIPs	21
1.1.6.1 Actividad polinucleótido adenosin glicosidasa	22
1.1.6.2 Actividad polinucleótido guanosin glicosidasa	22
1.1.7. Actividades biológicas de las RIPs	23
1.1.7.1. Actividad antiviral antifúngica, y antibacterial	23
1.1.7.2 Actividad abortiva.	24
1.1.7.3 Actividad anticáncer	25
1.1.7.4 Efectos Inmunológicos	25
1.1.7.5 Inmunotoxinas y otros conjugados	26
1.1.8. Rol de las RIPs en la naturaleza	27
1.1.9. Posibles Aplicaciones	27
1.2 <i>Streptomicetes</i>	28
1.2.1 <i>Streptomicetes</i> como hospedadores para la producción de proteínas extracelulares.	29
1.2.2 Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas en <i>Streptomicetes</i>	30
2. Hipótesis y Objetivos	32
3. Materiales y Métodos	
3.1 Cepas, medios y condiciones de cultivo	34
3.1.1.1 <i>E. coli</i>	34
3.1.1.2 <i>Streptomicetes</i>	34
3.2 Análisis Bioinformáticos	34
3.3 Plásmidos	35
3.4 Oligonucleótidos	40
3.5 Manipulación de ADN	40
3.5.1 Construcción de vectores para la expresión de RIPSC en <i>E. coli</i>	40
3.5.2 Construcción de vectores para la expresión de RIPSC en <i>S. lividans</i>	41

	Página
3.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	41
3.5.4 Electroforesis de ADN en geles de agarosa	42
3.5.5 Purificación de ADN a partir de un gel de agarosa.	42
3.5.6 Ligación de fragmentos de ADN	42
3.5.7 Defosforilación de extremos cohesivos.	42
3.5.8 Transformación de <i>E. coli</i>	43
3.5.9 Selección de transformantes. Rusconi lisis	43
3.5.10 Aislamiento de plásmidos	43
3.5.11 Inducción de <i>E. coli</i> BL21 DE3 pLysS	44
3.5.12 Transformación de <i>Streptomyces</i>	44
3.6 Manipulación de RNA	44
3.6.1 Aislamiento de ARN de <i>S. coelicolor</i> .	44
3.6.2 RT-PCR	45
3.7 Manipulación de proteína.	45
3.7.1 Separación de fracciones proteínicas solubles e insolubles	45
3.7.2 SDS-PAGE y detección por Westernblot	46
3.7.3 Preparación de anticuerpos anti-RIPSC	46
3.7.4 Purificación de RIPSC recombinante de <i>E. coli</i>	46
3.7.4.1 Purificación de cuerpos de inclusión	46
3.7.4.2 Renaturalización de RIPSC por “ <i>Quick gel filtration refolding</i> ”	47
3.7.5 Purificación de RIPSC recombinante de <i>S. lividans</i>	47
3.7.6 Pruebas de Actividad para RIPSC	47
3.7.6.1 <i>In Vivo</i>	47
3.7.6.2 <i>In Vitro</i>	48
3.8 Caracterización fenotípica de mutantes RIPSC de <i>S. lividans</i>	49
4. Resultados.	
4.1 Caracterización de supuesta RIP de <i>S. coelicolor</i>	51
4.1.1 Análisis de homología entre RIPSC y RIPs conocidas	51
4.1.2 Predicción de la localización de RIP homóloga de <i>Streptomyces</i> .	52
4.1.3 Organización genómica de RIPSC	53
4.1.4 RIPs homólogas en diferentes cepas de <i>Streptomyces</i> .	54
4.2 Aislamiento y expresión de la supuesta RIP de <i>S. coelicolor</i> en <i>E. coli</i>	55
4.3 Purificación de RIP homóloga de <i>S. coelicolor</i> producida en <i>E. coli</i>	57
4.4 Expresión de RIPSC en <i>S. lividans</i>	58

	Página
4.5 Análisis de Actividad de RIPSC	58
4.5.1 Análisis <i>In Vivo</i>	58
4.5.2 Análisis <i>In Vitro</i>	60
4.6 Otros análisis	60
4.6.1 Análisis de Expresión de RIPSC nativa en <i>S. coelicolor</i>	60
4.6.2 Caracterización fenotípica de mutantes RIPSC de <i>S. lividans</i>	60
5. Discusión	63
6. Referencias	66

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema de los tres tipos de RIP (<i>ribosome-inactivating protein</i>) según los dominios o cadenas funcionales que poseen	11
Figura 2. Estructura terciaria de la ricina.	12
Figura 3. El sustrato de las RIPs	13
Figura 4 A. Diagrama del proceso de biosíntesis de proteínas por el ribosoma	16
Figura 4 B. Diagrama del proceso de biosíntesis de proteínas por el ribosoma.	17
Figura 4 C. Mecanismo de acción de las RIPs (Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas).	18
Figura 5. Representación esquemática de los mecanismos de entrada de distintas proteínas citotóxicas en la célula diana.	21
Figura 6. Producción de metabolitos secundarios por colonias de <i>Streptomyces</i> .	29
Figura 7. Mapa del plásmido pGEM-T Easy	36
Figura 8. Mapa del plásmido pET3a	37
Figura 9. Mapa del plásmido pBSDKvsi	38
Figura 10. Mapa del plásmido pIJ486	39
Figura 11. Mapa del plásmido pESC-HIS	40
Figura 12. Alineamiento de secuencias aminoacídicas	52
Figura 13. Predicción del péptido señal presente en la secuencia de RIPSC	53
Figura 14. Mapa genómico del extremo final del cromosoma lineal de <i>S. coelicolor</i>	54
Figura 15. Mapa genómico.	55
Figura 16. Alineamiento entre la secuencia predicha para RIPSC y la secuencia con similitud presente en <i>S. scabies</i>	55
Figura 17. Sistema de expresión pET3a en <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	56
Figura 18. Muestras de células lisadas del cultivo de <i>E. coli</i> (BL21)DE3pLysS en diferentes tiempos de inducción con IPTG para la producción de RIPSC	57
Figura 19. Curva de crecimiento para <i>E. coli</i> (BL21)DE3pLysS durante la inducción con IPTG 1mM durante la producción de RIPSC.	57
Figura 20. Muestra de RIPSC parcialmente purificada y renaturalizada	58
Figura 21. Análisis de Westernblot para la producción de RIPSC extracelular en condiciones nativas en <i>S. lividans</i>	59
Figura 22. Análisis antifúngico y antibacteriano <i>in vivo</i> de RIPSC	60
Figura 23. Test de toxicidad para levaduras	60
Figura 24. Detección por quemiluminiscencia de la inhibición de la traducción de luciferasa	61
Figura 25. Pruebas fenotípicas durante la producción de RIPSC en <i>S. lividans</i>	62

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Distribución en la naturaleza de algunas RIPs	19
Tabla 2. Toxicidad de las RIPs según tipo	20
Tabla 3. Aplicaciones dadas a las inmunotoxinas creadas con RIPs	27
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la expresión de RIPSC	41
Tabla 5. Propiedades físico-químicas predichas para RIPSC	53

Resumen

Las proteínas inactivadoras de los ribosomas (RIPs) son proteínas N-glicosidasas citotóxicas identificadas en plantas, hongos y bacterias. Las RIPs de plantas inhiben la síntesis de proteínas por medio de una escisión en un enlace glicosídico (N-C) específico, entre un residuo de adenina y una ribosa presente en el rRNA 28S de los ribosomas. En éste reporte se describe el aislamiento y caracterización inicial de una RIP del tipo I presente en la bacteria gram-positiva *Streptomyces coelicolor* (RIPSC). El gen *ripsc* fue amplificado por PCR, clonado y expresado en *E. coli* como proteína recombinante de 30kDa. Por otro lado, cuando RIPSC fue sobre-expresada en *E. coli* y en *S. lividans* se observó un fuerte decremento en el crecimiento de ambos organismos. Además la producción intracelular de RIPSC en *Saccharomyces cerevisiae* resultó letal para ésta. Sin embargo, la proteína RIPSC purificada no mostró actividad antifúngica o antibacteriana en contra de las especies probadas sugiriendo que esto es debido a que RIPSC es incapaz de entrar a las células. Lo cual se confirma con el hecho de que la proteína de *S. coelicolor*, RIPSC, purificada mostró una fuerte inhibición sobre la traducción de luciferasa en el sistema libre de células utilizado.

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1 Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas

Las Proteínas Inactivadoras de Ribosomas o mejor conocidas como RIPs (por sus siglas en inglés), son un grupo de proteínas que poseen la capacidad de causar daño irreversible a los ribosomas, inhibiendo así la síntesis proteica. Ribotoxinas es el calificativo que se propuso para una familia de ribonucleasas del grupo de las RIPs (*ribosome-inactivating proteins*) fúngicas y bacterianas 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). 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). La principal actividad conferida a las RIPs es la de N-glicosilasas aunque recientemente se han reportado diversas actividades novedosas tales como DNAsas, antivirales, polinucleótido adenosin glicosidasas, entre otras (Peumans *et al.*, 2001).

1.1.1 Clasificación de las RIPs.

Las RIPs, según su caracterización inicial, son clasificadas de acuerdo con sus propiedades físicas (Mundy *et al.*, 1994) (Fig 1).

- **Tipo I:** Enzimas monoméricas de un peso molecular aproximado de 30,000 Da con actividad N-glicosidasa, son básicamente proteínas que comparten un alto número conservado de residuos activos, y estructura secundaria con el sitio activo en la misma región pero son diferentes en algunas modificaciones postraduccionales. La mayoría de las RIPs que han sido caracterizadas, caen dentro de esta clasificación. También se han descrito RIPs de tipo I con un tamaño menor al esperado, lagenina y calcaelina (20 KDa), e incluso producidas por otros organismos diferentes a las plantas (Wang y Ng, 2000; Ng *et al.*, 2003).
- **Tipo II:** Proteínas altamente tóxicas, heterodiméricas con subunidades polipeptídicas separadas, una con propiedades enzimáticas y la otra con propiedad de lectina, cada subunidad tiene aproximadamente un peso molecular de 30,000 Da. Uno de los polipéptidos con actividad RIP (cadena A) está unido a una lectina (cadena B) a través de un puente disulfuro. La cadena de lectina puede unirse a los fragmentos galactosil de las glicoproteínas y/o los glicolípidos que se encuentran en la superficie de las células eucariontes. Con esto, mediar el transporte retrogrado de la cadena A al citosol, es decir, transportar la

cadena RIP al interior de la célula blanco. Una vez dentro, en el citosol, la cadena RIP tiene acceso a la maquinaria traduccional y puede interrumpir la síntesis proteica (Mundy *et al*, 1994).

- **Tipo III:** Estas enzimas son sintetizadas como precursores inactivos (proRIPs) y requieren procesos proteolíticos que ocurren entre los aminoácidos involucrados en la formación del sitio activo. Este tipo de RIPs son mucho menos frecuentes que los otros dos tipos y poseen dominios adicionales de funcionalidad desconocida. 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, que es una RIP aislada de la cebada (Nielsen y Boston, 2001; Peumans *et al.*, 2001).

Todas las RIPs 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 (Mock *et al.*, 1996; Peumans *et al.*, 2001).

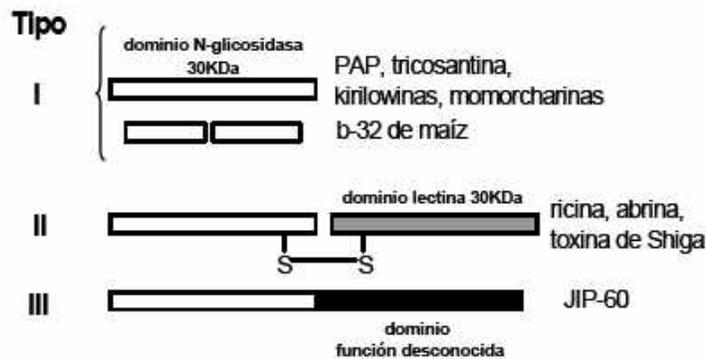


Fig. 1 Esquema de los tres tipos de RIP (*ribosome-inactivating protein*) según los dominios o cadenas funcionales que poseen. Los tres tipos mantienen el dominio N-glicosidasa, aunque en algún caso éste es procesado postraduccionalmente y está formado por más de una cadena polipeptídica (García *et al.*, 2004).

1.1.2 Estructura

Más de 50 RIPs de tipo I, y aproximadamente 15 RIPs del tipo II han sido secuenciadas y/o clonadas. Una comparación entre las secuencias revela fuerte similitud entre las RIPs del tipo I con la cadena A de las RIPs del tipo II y también entre las cadenas B de las RIPs del tipo 2. Un examen profundo indica que la similitud entre los aminoácidos en el extremo amino-terminal y en la región central de las RIPs es mucho mayor que en el extremo carboxilo-terminal. Estas variaciones sugieren el hecho de que la diferencia en el grado de conservación explica porqué algunas actividades, debidas a la región central de la estructura de las RIPs, son altamente

conservadas entre todos los tipos de las mismas, mientras que otras actividades no son tan conservadas, presumiblemente debido a la variación en la región C-terminal (Van Damme *et al.*, 2001).

La estructura cristalizada de la ricina fue la primera estructura terciaria conocida de una RIP (Figura 2). La ricina es una proteína globular, un heterodímero glicosilado unido por un sólo enlace disulfuro. Aproximadamente el 50 % de la cadena A consiste de α -hélices y el otro 50 % de láminas β . Dentro de la estructura se distinguen 3 diferentes dominios. Una hendidura en la interface de los tres dominios forma el sitio activo para la actividad N-glicosidasa. La cadena B de la ricina es una estructura bilobal compuesta de dos dominios homólogos. Cada dominio contiene un sitio de unión de galactosa (Montfort *et al.*, 1987).

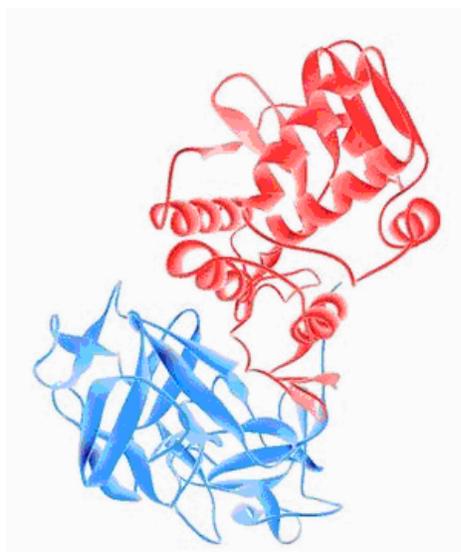


Fig. 2 Estructura terciaria de la ricina. En rojo se muestra la cadena A, correspondiente al dominio N-glicosilasa, en azul se muestra la cadena B, correspondiente al dominio lectina

Han sido reportadas las estructuras cristalizadas de al menos siete RIPs del tipo I y tres del tipo II. En general la estructura terciaria de diferentes RIPs es muy bien conservada, aunque existen algunas diferencias, especialmente en la región carboxilo-terminal y en la superficie estructural de las horquillas. Se cree hasta el momento que estas diferencias son las responsables de las diferentes actividades enzimáticas reportadas para las RIPs, así como de la especificidad que presentan por algunos sustratos. Debido al descubrimiento de nuevas actividades enzimáticas de las RIPs, se están haciendo intensos esfuerzos en el estudio de las diferencias estructurales, con la finalidad de encontrar evidencias de sus múltiples funciones (Peumans *et al.*, 2001).

1.1.3 Mecanismo de acción

La actividad enzimática destacable de todas las RIPs y gracias a la cual se les ha llamado de esa manera, es la de N-glicosilasa que da lugar a una despurinización de la A4324 (numeración del rRNA 28S de rata) en el dominio SRL (Sarcin/ricin loop) de los ribosomas (Figura 3), ocasionando su inactivación. 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. El nombre de esta región del rRNA (SRL, arcin/ricin loop), se explica fácilmente, ya que la ricina y la α -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).

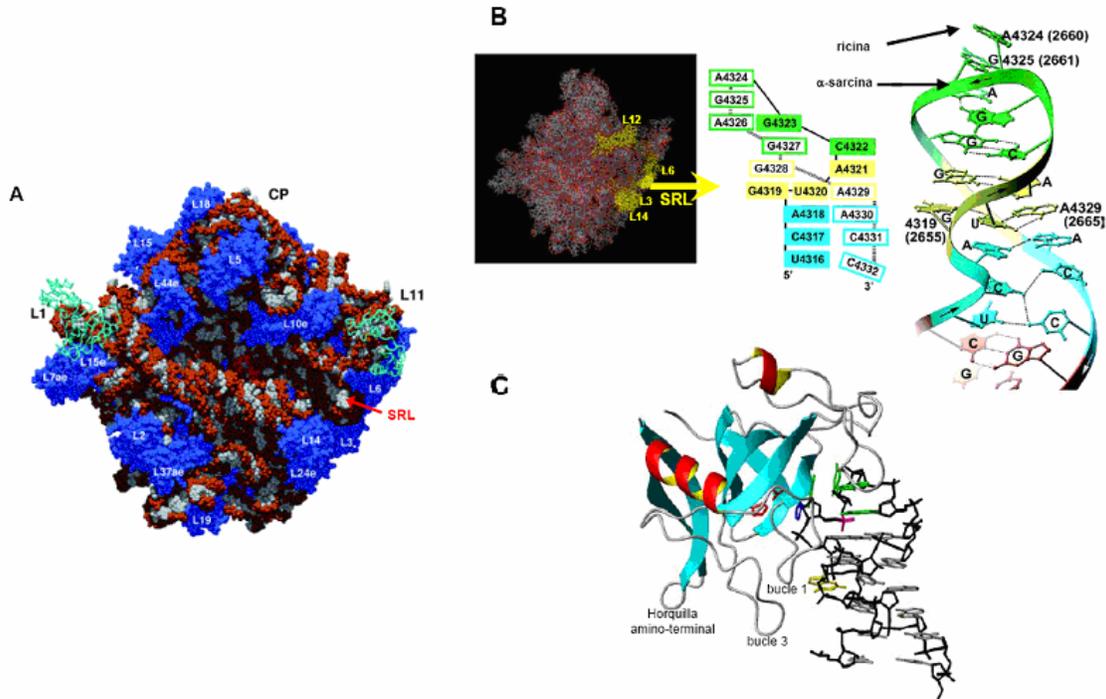


Fig. 3 El sustrato de las RIPs. A. Estructura de la subunidad mayor del ribosoma de *H. marismortui* a 2.4 Å (figura procedente de Steitz y Moore, 2003). Las proteínas (identificadas según la nomenclatura correspondiente) aparecen en azul y el RNA en blanco y rojo. Las proteínas mostradas como cintas verdes corresponden a estructuras obtenidas independientemente y acopladas en el modelo. Se indica la posición del lazo sarcina/ricina (SRL). **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*. 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 α -sarcina. **C. Estructura cristalina del complejo restrictocina-análogo de SRL** (Yang *et al.*, 2001). 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 α -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).

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. La acción de las RIPs 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 EF1:GTP y EF-2:GTP (o EF-Tu y EF-G, respectivamente, si son ribosomas procariotas) (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 RIPs son tan específicas.

La traducción del mRNA pasa por varias etapas clave, que se localizan en la zona de interacción de las dos subunidades del ribosoma (Figura 4A). 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 4) (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 procariotas para todas ellas) (Figuras 4A) (Ban *et al.*, 1999; Uchiumi *et al.*, 1999; Uchiumi *et al.*, 2002; Wilson y Nechifor, 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↓AGGAA/CC-3') (Figura 4B) (Szewczak *et al.*, 1993; Szewczak y Moore, 1995; Seggerson y Moore, 1998). De forma independiente, se ha resuelto la estructura de este lazo, coincidiendo con la estructura que muestra en el ribosoma, y observándose que se encuentra expuesto dentro de la subunidad grande (Figura 4A y B) (Correll *et al.*, 1998 y 1999; Ban *et al.*, 1999). Además, los ensayos bioquímicos han demostrado que, no sólo las RIPs que hidrolizan el segundo enlace GA del tetrabucle o las RIPs 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 RIPs 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 4C) (Macbeth y Wool, 1999; Yang *et al.*, 2001). Una vez “anclada” la RIP, ésta ejercería su acción sobre el enlace situado a 12 Å de esa G prominente, no siendo estrictamente necesario 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, (Correll *et al.*, 1998).

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 4A) (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).

Por otro lado, se han observado ciertas interacciones de proteínas ribosomales, con algunas RIPs, 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 α -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).

A

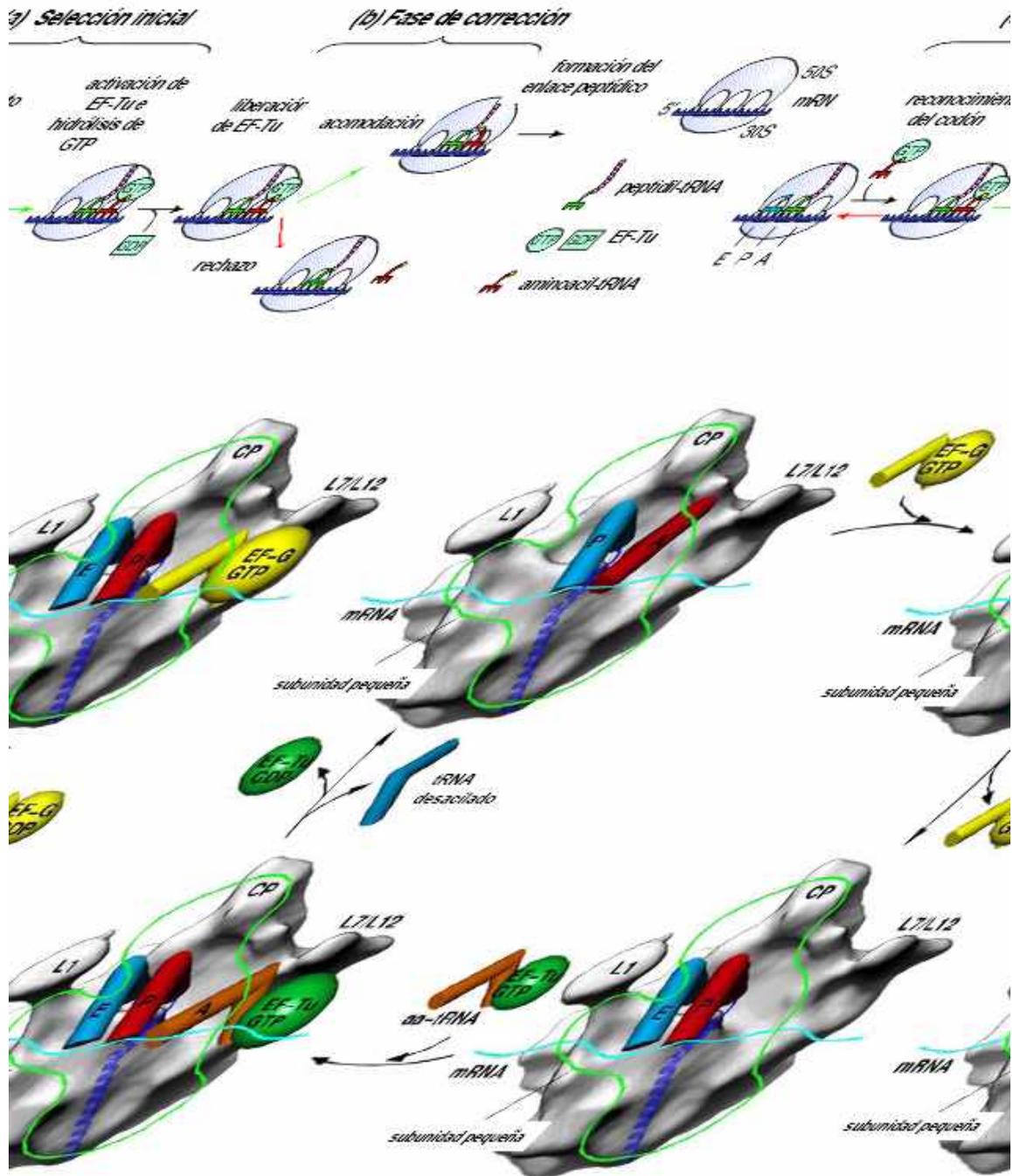


Figura 4: Diagrama del proceso de biosíntesis de proteínas por el ribosoma. A. Dinámica de la formación del enlace peptídico. (Parte superior) Unión del complejo aminoacil-tRNA-EF-Tu al sitio A del ribosoma y etapa de comprobación de la lectura correcta del par codón-anticodón, acontecimientos previos 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)

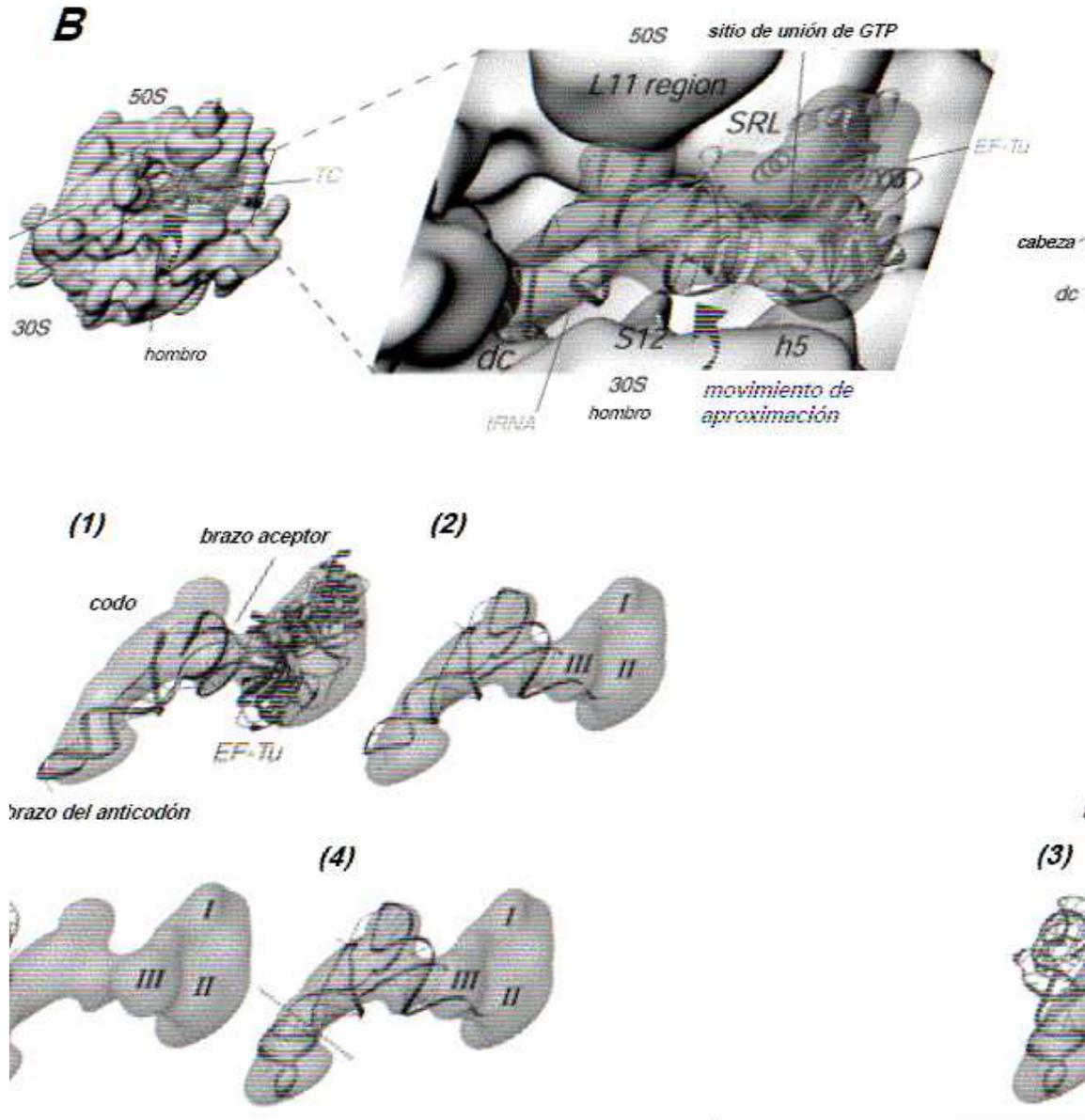
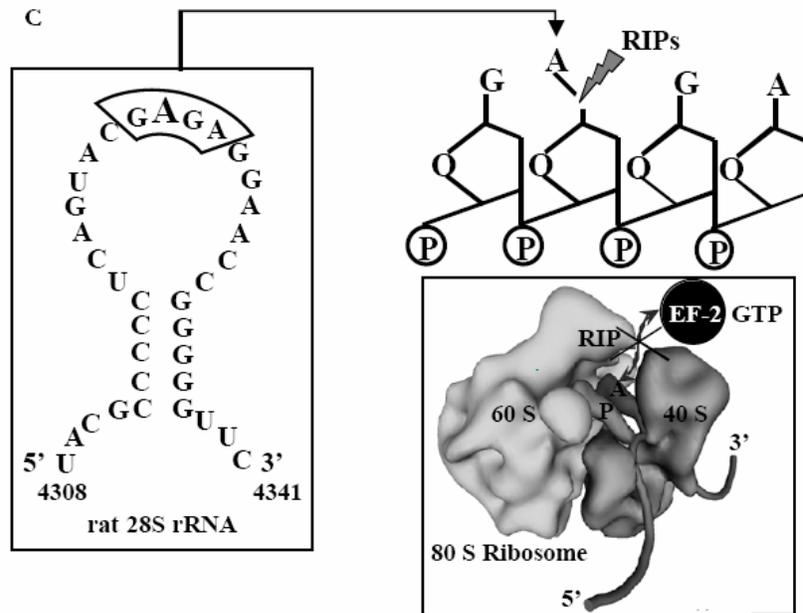


Figura 4: Diagrama del proceso de biosíntesis de proteínas por el ribosoma. (continuación):

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) (Ban, 2004).



C. Mecanismo de acción de las RIPs (Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas). Todas las RIPs escinden una adenina (A4324 in rat) en el rRNA de la subunidad mayor de los ribosomas, imposibilitando la unión del factor 2 de elongación. Algunas RIPs remueven más de un residuo de adenina, y otras una guanina del mismo residuo (GAGA).

1.1.4 Distribución en la naturaleza

Las RIPs son comúnmente encontradas en plantas y ampliamente distribuidas en el mismo reino. Las primeras RIPs reportadas fueron detectadas mayormente en el grupo de las angiospermas dentro de ambas clases, monocotiledoneas y dicotiledóneas, (Yao *et al.*, 1998; Lam and Ng, 2001), aunque ahora se han descubierto en muchas otras especies. En algunas plantas, las RIPs están presentes en más de un tejido examinado (hojas, semillas, tallo, raíz, fruto), mientras que en algunas otras se encuentran solo en uno. Algunas veces se han encontrado isoformas de RIPs en el mismo tejido (Ferrerías *et al.*, 1993).

Las RIPs del tipo I parecen ser más frecuentes que las RIPs del tipo II, además de que las del tipo I se han encontrado distribuidas preferencialmente en algunas familias de plantas (e.g. Caryophyllaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, y otras). En algunas especies han sido descritos ambos tipos a la vez. (de Benito *et al.*, 1995, 1998; Hao *et al.*, 2001). Además en algunas plantas la expresión de las RIPs se ha detectado después de la inducción en condiciones de estrés (Chaudhry *et al.*, 1994; Stirpe *et al.*, 1996; Rippmann *et al.*, 1997), y después de infección viral (Girbés *et al.*, 1996).

El interés en las RIPs, debido a sus aplicaciones y posibles funciones, ha conducido a una amplia búsqueda de la presencia de las mismas en variadas especies de plantas, dentro de las cuales se tiene amplio conocimiento y estudio, de hecho existen reportes con listas de la amplia distribución de las RIPs en las plantas (Stirpe, 2004). Hoy en día se ha descartado su exclusividad en plantas puesto que han sido encontradas también en hongos, bacterias y algas (Girbés *et al.*, 2004), además de que se ha reportado una actividad tipo RIP en células de mamífero (Barbieri, *et al.*, 2001). Consecuentemente puede afirmarse que la presencia de las RIPs se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y resulta interesante su estudio debido a las diversas actividades y posibles aplicaciones, además de su presencia en diferentes organismos. A continuación se detalla en la tabla 1, algunas de las RIPs reportadas en la literatura con el fin de hacer evidente su distribución.

Tabla 1. Distribución en la naturaleza de algunas RIPs

Nombre	Fuente	Tipo	Referencia
Plantas			
Agrostina	<i>Agrostemma githago</i>	1	Brigotti <i>et al.</i> , 1998
Saporina	<i>Saponaria officinalis</i>	1	Ippoliti <i>et al.</i> , 1992
Trichosanquina	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	1	Shaw <i>et al.</i> , 2005
Momordina	<i>Momordica charantia</i>	1	Valbonesi <i>et al.</i> , 1999
Pokeweed antiviral protein (PAP)	<i>Phytolacca americana</i>	1	Hudak <i>et al.</i> , 1999
Ebulina	<i>Sambucus ebulus</i>	2	Citores <i>et al.</i> , 1996
Ricina	<i>Ricinus cominus</i>	2	Olsnels <i>et al.</i> , 1973
Porrectina	<i>Cinnamomum porrectum</i>	2	Li <i>et al.</i> , 1996
JIP60	<i>Hordeum vulgare</i>	3	Chaudhry <i>et al.</i> , 1994
Maize RIP	<i>Zea mays</i>	3	Hey <i>et al.</i> , 1995
Alga			
Lamjapina	<i>Laminaria japonica</i>	1	Ren-shui <i>et al.</i> , 2002
Hongos			
Gigantina	<i>Aspergillus giganteus</i>	1	Salvarelli <i>et al.</i> , 1994
Clavina	<i>Aspergillus clavatus</i>	1	Huang <i>et al.</i> , 1997
Tricholina	<i>Trichoderma viride</i>	1	Liu <i>et al.</i> , 1991
Flammulina	<i>Flammulina velutipes.</i>	1	Wang <i>et al.</i> , 2000
Pleuteregina	<i>Pleurotus tuber-regium</i>	1	Wang <i>et al.</i> , 2001

1.1.5 Toxicidad e Interacción con las células

La capacidad de inactivar ribosomas y provocar la muerte celular conferida a las RIPs ha hecho que puedan clasificarse como sustancias altamente tóxicas. Así, la potencia como toxinas viene dada por su especificidad y rápido recambio a la hora de ejercer su actividad catalítica, siendo capaces 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). Además su mecanismo

de secreción, mediante orgánulos membranosos, permite mantener en compartimentos diferentes las RIPs 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). Sin embargo, para algunas RIPs de origen fúngico, debe darse una compartimentación efectiva durante su secreción porque los precursores son ribonucleolíticamente activos (Martínez-Ruiz *et al.*, 1998).

Se ha encontrado que los niveles de toxicidad varían dentro de los diferentes tipos de RIPs (Tabla 2), las del tipo I carecen de cadena B y presentan mayor dificultad para entrar a las células diana, lo que las hace indudablemente menos tóxicas que las del tipo II, aunque dentro de la clasificación de las RIPs del tipo II existe un número considerable de proteínas no tóxicas, desconociéndose hasta el momento la razón (Stirpe, *et al.*, 2006). En cuanto a la toxicidad de las RIPs del tipo I se puede afirmar que una vez dentro de las células llegan a ser altamente tóxicas, hecho que se demostró por primera vez con la conjugación de la gelonina y la concavalina A, la cual resultó altamente tóxica para las células en comparación a la gelonina libre. La fusión de un acarreador a la gelonina hizo que ésta pudiera tener acción una vez dentro de la célula (Stirpe *et al.*, 1980).

Tabla 2. Toxicidad de las RIPs según tipo

RIPs	Estructura	Peso Molecular	Inhibición en síntesis proteica (IC ₅₀ ^a , nm)		Toxicidad para ratones (LD ₅₀ ^c , mg/Kg)
			Libre de célula ^b	Células HeLa	
Tipo I	Una cadena	26-32	<0.01-4.0	170- >3300	0.95-44
Tipo II Tóxicas	Dos cadenas	60-65	43-88	0.0003-1.7	0.0017-0.008
Tipo II No-Tóxicas	Dos cadenas	56-63	0.6- >100	0.54- >15,000	1,4- >40

a. Concentración causante del 50% de inhibición en la síntesis proteica.

b. Sistema libre de célula de lisado de reticuloso de conejo.

c. Dosis letal causante de la muerte del 50% de los animales usados para el experimento.

Fuente de la tabla: Stirpe 2004

Respecto a la forma de entrada en la célula diana, la primera interacción con la membrana externa varía entre las RIPs. 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, la subunidad catalítica entra al citoplasma y ejerce su actividad tóxica tras escapar

del proteosoma (Figura 5) (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 (moléculas inductoras de apoptosis) (Zhang *et al.*, 2001).

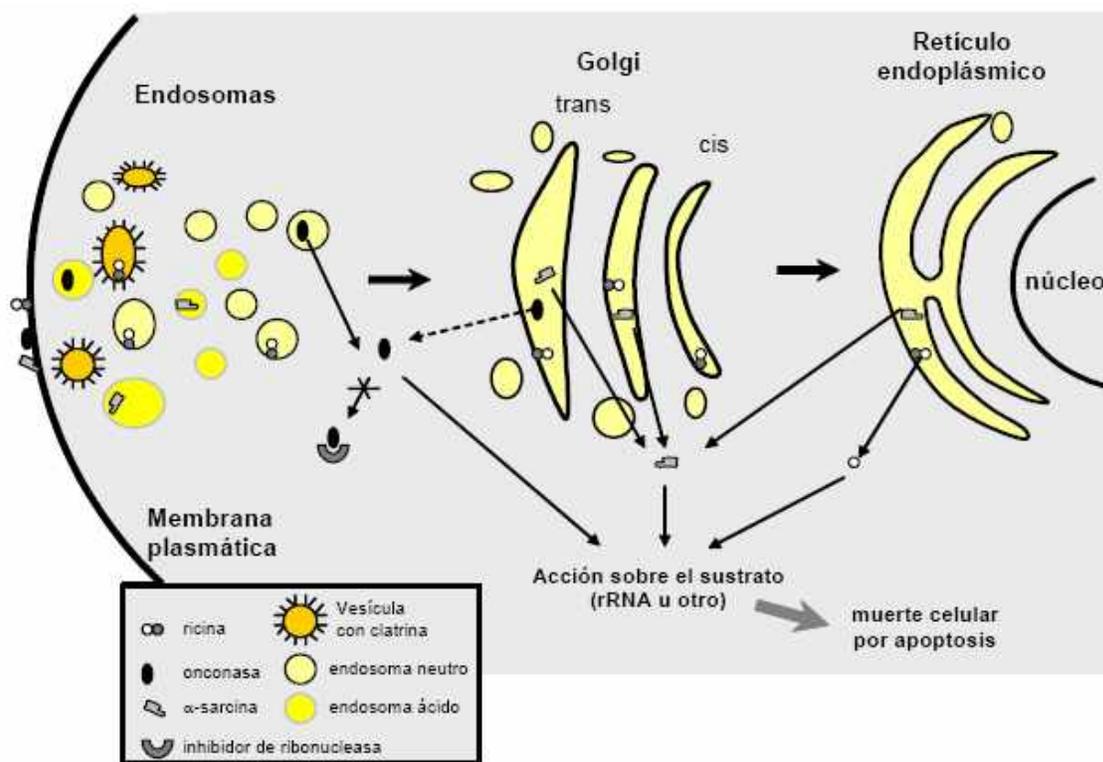


Figura 5: Representación esquemática de los mecanismos de entrada de distintas proteínas citotóxicas en la célula diana. Se muestran la ricina como ejemplo de RIP tipo II (una cadena con actividad N-glicosidasa sobre el ribosoma y otra de reconocimiento del receptor de la membrana), la onconasa como ribonucleasa inespecífica capaz de evadir el inhibidor de ribonucleasas citosólico, y la α -sarcina como RIP fúngica. En los tres casos se da un proceso endocítico aunque de distintas características, especialmente en cuanto a la translocación se refiere.

1.1.6 Otras actividades enzimáticas de las RIPs

Tal como se ha mencionado anteriormente, la primera actividad descrita de las RIPs ha sido la de rRNA N-glicosidasa sobre una base de adenina específica. A través del tiempo y después de la continua investigación para tratar de entender el mecanismo de acción, especificidad y rol en la naturaleza de las mismas, se ha llegado al descubrimiento de nuevas actividades enzimáticas atribuidas a las RIPs, tales como polinucleótido-adenosin-glicosilasa, polinucleótido-guanosin-glicosilasa, ribonucleasa o superóxido dismutasa entre algunas otras (Peumans *et al.*, 2001, Sharma *et al.*, 2004). El hallazgo hace de estas proteínas un blanco cada vez más interesante.

1.1.6.1 Actividad polinucleótido-adenosin-glicosidasa

En un principio se pensó que las RIPs actuaban exclusivamente sobre ribosomas o rRNA aunque no se descartaban otras posibilidades. La búsqueda de nuevos sustratos para las RIPs se vio dificultada debido a la falta de un método sensible en la detección de los productos de reacción, puesto que solo se podían detectar los fragmentos Endo (fragmento de rRNA proveniente de la subunidad mayor del ribosoma, producido después del tratamiento con alguna RIP seguido de la exposición con anilina, detectable por electroforesis), hasta ese momento. El parteaguas en la metodología fue el desarrollo de un método HPLC de cuantificación de adenina libre, escindida por RIPs en varios sustratos, basado en fluorescencia (Zamboni, *et al.*, 1989). Este método novedoso no solo ofreció un procedimiento directo para medir la desadenilación de los ribosomas, sino que también condujo al descubrimiento de actividades enzimáticas inesperadas para las RIPs sobre otros sustratos. A partir de ese momento se encontraron un gran número de RIPs con acción en múltiples sitios de RNA (Barbieri, *et al.*, 1992). Además se demostró que la saporina-L1 una RIP de tipo I proveniente de las hojas de *Saponaria officinalis* es capaz de remover múltiples residuos de adenina provenientes de diversos sustratos de ácidos nucleicos, tales como: DNA de esperma de pez, poli-A, tRNA e inclusive RNA viral (Barbieri, *et al.*, 1994, Barbieri, *et al.*, 1996). Consecuentemente, varios experimentos hechos 52 RIPs revelaron que todas las RIPs probadas actúan frente a DNA de esperma de pez y poli-A y por lo menos un tercio lo hace sobre RNA viral (Barbieri, *et al.*, 1997).

En los primeros experimentos fue utilizado el DNA de esperma de pez para probar la actividad poli-adenosin-glicosidasa de las RIPs. Mas tarde el rango de sustratos se extendió a algunos DNAs mitocondriales y nucleares de mamífero (Barbieri, *et al.*, 2000). Los experimentos realizados expusieron la especificidad por algunos sustratos de diversas RIPs en la actividad poli-adenosin-glicosilasa aunque aún es confusa la manera en que esta especificidad es determinada así como las condiciones necesarias para tener una actividad óptima (Peumans, *et al.*, 2001).

La obvia capacidad de las RIPs de desadenilar diferentes polinucleótidos implica su consideración como poli-adenosin-glicosidasas, dicha actividad resulta aún más amplia que la de inactivadoras de los ribosomas por lo que algunos autores han propuesto reemplazar su nombre (Barbieri, *et al.*, 1997).

1.1.6.2 Actividad polinucleótido-guanosin-glicosidasa

De acuerdo con algunos reportes, las RIPs son capaces también de remover residuos de guanina de rRNA proveniente de procariotas y eucariotas, al respecto se demostró que el tratamiento de ribosomas de rata con ricina causó el removimiento de la G₄₃₂₃ presente en el lazo sarcina/ricina de la subunidad mayor (Endo *et al.*, 1987). La misma actividad ha sido demostrada para la RIP del tipo I denominada PAP (Pokeweed Antiviral

Protein). Con el uso de una técnica cuantitativa basada en HPLC se demostró que PAP recombinante remueve un residuo de guanina del rRNA de *E. coli* (Rajamohan *et al.*, 1999). De manera similar, se ha demostrado por medio de un ensayo de extensión de primer altamente sensible, que PAP nativa es capaz de remover la G₄₃₂₃ de reticulito de conejo, tabaco y ribosomas de levadura (Hudak *et al.*, 2000). Estudios de modelación confirmaron que una base de guanina encaja en el sitio activo de PAP sin modificar la geometría siendo así procesado de la misma manera que una base de adenina. Hasta el momento no existe evidencia de la posible actividad de desguanilación para otras RIPs, lo que implica que dicha actividad no puede ser extrapolada a todas las RIPs. Además de acuerdo a experimentos recientes con proteínas altamente purificadas como la gelonina, momordina, PAP-S (PAP proveniente de semillas), y saponina-S6, ninguna de estas RIPs es capaz de remover alguna base diferente a la característica adenina (Barbieri *et al.*, 2000).

1.1.7 Actividades biológicas de las RIPs

La actividad biológica de las RIPs en los organismos encontrados aún no es clara y algunas veces independiente de la inhibición en la síntesis proteica. Existen diferencias en la citotoxicidad de los diferentes tipos de RIPs y consecuentemente en su toxicidad frente a diferentes organismos. Las RIPs hasta el momento se han considerado como proteínas de defensa en plantas puesto que son capaces de inhibir el crecimiento de patógenos para éstas, tales como virus, hongos, bacterias e incluso insectos (Stirpe, 2004). El rango de organismos en los cuales las RIPs han mostrado actividad además de las varias actividades biológicas que se les atribuyen las hace interesantes en cuanto a sus posibles aplicaciones biotecnológicas.

1.1.7.1 Actividad antiviral, antifúngica y antibacteriana

Todas las RIPs del tipo 1 probadas hasta el momento han demostrado tener actividad antiviral en contra de virus de plantas, hongos y animales (Wang *et al.*, 2000, Parikh *et al.*, 2004), mientras que solo pocas RIPs del tipo 2 se encontraron activas sobre virus tales como las pertenecientes a *Eranthis hyemalis* (Kumar *et al.*, 1993), y algunas de *Sambucus nigra* (Chen *et al.*, 2002).

El mecanismo de la actividad antiviral aún no es totalmente claro. Normalmente, en las plantas que las producen, las RIPs, son segregadas desde el citoplasma, siendo localizadas en cuerpos proteínicos (e.g. ricina), en la matriz de la pared celular o en vacuolas (e.g. PAP), o en el espacio intracelular (e.g. saponinas). Se ha pensado que el cuerpo segregado, en cualquiera de las formas mencionadas anteriormente, podría ser roto debido al daño causado por la infección viral, por lo que las RIPs establecerían contacto con los ribosomas de la planta, causando su inactivación y la consecuente muerte celular, impidiendo así la multiplicación viral (Van Dame *et al.*, 2001). De cualquier manera, el descubrimiento de que las RIPs actúan sobre ácidos nucleicos sugiere que éstas podrían dañar directamente ácidos nucleicos virales (Barbieri *et al.*, 1997).

Debido al descubrimiento de la actividad antiviral de las RIPs, investigaciones han sido dirigidas hacia el desarrollo de plantas transgénicas con resistencia viral. De hecho, se ha demostrado que PAP protege a las plantas de papa y tabaco de la infección viral, aunque la sobre-expresión de PAP resulta tóxica para el tabaco (Lodge *et al.*, 1993). En el campo de la medicina se encontró que PAP inhibe la replicación de VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) (Zarling *et al.*, 1990), también se estudio el efecto de la cadena A; de la ricina, en contra del mismo virus aunque no se obtuvieron buenos resultados (Rajamohan *et al.*, 1999). La tricosantina es otra RIP que ha sido investigada para este tipo de aplicaciones (McGrath *et al.*, 1989).

Las RIPs poseen también actividad antifúngica, antibacteriana e insecticida (Nielsen *et al.*, 2001). Dichas actividades han sido utilizadas de la misma manera que la actividad antiviral con fines de resistencia en plantas. Se demostró el incremento de la resistencia al ataque fúngico en plantas transformadas con la RIP b-32 del maíz (Maddaloni *et al.*, 1997) y con PAP (Tumer *et al.*, 1999). También se encontró que la cadena A de la ricina, saponina S6, y la RIP de *Mirabilis expanda*, son activas en contra de ribosomas fúngicos (Park *et al.*, 2002). Se ha demostrado la actividad inhibitoria de las RIPs en contra de bacterias y hongos patógenos, Nielsen y colaboradores (2001) presentan una revisión de todos los organismos patógenos en los que las RIPs han presentado actividad, dichos organismos son los siguientes: *Alternaria solani*, *Alternaria alternata*, *Agrobacterium tumerfaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum*, *Mycosphaerella arachidicola*, *Neurospora crassa*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Pythium irregulare*, *Physalospora piricola*, *Trichoderma reesei*, y *Verticillium dahliae*, *Bacillus subtilis*, *Rhizobium leguminosarum*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, y *Erwinia carotovora*.

1.1.7.2 Actividad Abortiva

En la medicina China tradicional, preparaciones de raíces de tubérculos de *Trichosanthes kirilowii* fueron utilizadas para inducir el aborto, más tarde fue demostrado que el principio activo era la proteína tricosantina (Anónimo, 1976), que pertenece al grupo de las RIPs (Yeung *et al.*, 1988). De la misma manera, la actividad abortiva fue encontrada en la momordina (Yeung *et al.*, 1988) y otras RIPs (Ng *et al.*, 1992). De hecho, la tricosantina se usa actualmente en China para inducir abortos de términos medio y temprano con una efectividad del 95% y con la menor incidencia de efectos secundarios, puesto que la proteína es altamente tóxica para los trofoblastos (Battelli *et al.*, 1992) y cuando es administrada intra-amnióticamente causa la necrosis de células sincitiotrofoblásticas y la fragmentación de la placenta. Grupos de células desintegradas causan la coagulación de sangre y la debilitación de la circulación provocando amplias áreas de necrosis en la placenta y la consiguiente muerte del feto (Anónimo 1976).

1.1.7.3 Actividad anticáncer

Se ha investigado el uso de las RIPs más tóxicas del tipo 2 como agentes anticancerígenos. Extractos de *Viscum album* y *X. americana* han sido utilizados con éste propósito en Europa y África respectivamente, ambos extractos contienen RIPs del tipo 2 (Stirpe *et al.*, 2006). La investigación de la ricina y otras toxinas del mismo tipo fue motivada por la alta toxicidad que presentaron la abrina y la ricina sobre células cancerígenas en comparación con células no cancerígenas (Lin *et al.*, 1970). Es posible que estas y otras RIPs sean más efectivas en contra de células malignas porque éstas presentan una alta velocidad de síntesis proteica y proliferan activamente, y también porque el hecho de estar alteradas las hace más sensibles a las toxinas. La actividad antitumoral conferida a los extractos de *Viscum album* y *X. americana* utilizados en Europa y África, es atribuida a la RIP del tipo 2 llamada riproximina (Voss *et al.*, 2005). Las RIPs antes mencionadas y posiblemente algunas otras podrían tener efectos benéficos para los pacientes con cáncer no solo por el hecho de actuar directamente sobre células tumorales sino también por el estímulo que ejercen sobre el sistema inmune induciendo la producción de citocinas, como se ha visto en células bajo los efectos de algunas RIPs (Yamasaki *et al.*, 2003) y también en voluntarios que han recibido los extractos de *Viscum album* (Huber *et al.*, 2005).

1.1.7.4 Efectos Inmunológicos

El conocimiento de la inmunogenicidad de las RIPs se conoce gracias a Paul Ehrlich, quien obtuvo por primera vez anticuerpos contra la ricina (Stirpe *et al.*, 2004). La ricina (Thorpe *et al.*, 1989) y todas las RIPs son fuertemente inmunogénicas, y su administración en animales provoca la formación de anticuerpos, con reacción cruzada solo entre las RIPs de plantas pertenecientes a la misma familia (Strocchi *et al.*, 1992).

Las RIPs también son alergénicas. La alergenicidad de la semilla de *Ricinus comunis* (castor beans), es bien conocida por los efectos que causa en las personas que la manipulan en la industria del aceite que se produce de la misma (Thorpe *et al.*, 1988). La administración de la ricina induce la respuesta IgE (Inmunoglobulina E), y también realza la respuesta en contra de otros antígenos dados al mismo tiempo (Thorpe *et al.*, 1989). La formación de IgE (Inmunoglobulina E), ha sido observada en ratones después de la administración de RIPs del tipo I (Zheng *et al.*, 1991), en personal de laboratorio trabajando con RIPs (Stirpe *et al.*, 2004), en pacientes infectados con VIH y tratados con tricosantina (Byers *et al.*, 19994) y en pacientes tratados con inmunotoxinas que contienen ricina u otra RIP (Stirpe *et al.*, 2004).

Las RIPs tienen efectos inmunosupresivos, en ambas maneras posibles: humoral y celular, pues cuando son administradas evitan la formación de anticuerpos y retardan el rechazo (Spreafico *et al.*, 1983; Descotes *et al.*, 1985; Benigni *et al.*, 1995). Esto ocurre solo si las RIPs son administradas antes del antígeno, sugiriendo que interfieren en los primeros pasos de la respuesta inmune. Debido a ésta propiedad, las RIPs pueden ser buenas

herramientas experimentales, cuando sea necesario suprimir la respuesta inmune solo en contra de un antígeno dado después de la administración de una RIP sin alterar la inmunidad existente (Stirpe *et al.*, 2004).

1.1.7.5 Inmunotoxinas y otros conjugados

Según se ha hecho énfasis a lo largo de la presente memoria, una de las causas importantes por las que las RIPs resultan interesantes, es por las aplicaciones en la medicina y la agricultura que estas pueden tener. En el desarrollo de la medicina moderna se buscan nuevas y mejores alternativas en contra de enfermedades hasta ahora incurables como el cáncer y el VIH, las inmunotoxinas son una de las alternativas que podrían ser aplicadas. Las RIPs gracias a sus propiedades pueden ser incluidas en esta alternativa. Se ha propuesto que los anticuerpos pueden ser utilizados para actuar selectivamente sobre células particulares y así destruirlas. Esta hipótesis fue hecha posible con el advenimiento de los anticuerpos monoclonales, los cuales pueden ser ligados a toxinas, con el fin de crear “inmunotoxinas” con toxicidad selectiva para las células blanco según el anticuerpo ligado. Las RIPs han sido utilizadas en la preparación de inmunotoxinas y otros conjugados, estas construcciones han sido echas por medio de ligación química y por fusiones recombinantes de proteínas, ambas principalmente con anticuerpos monoclonales aunque también se han usado algunos otros acarreadores como hormonas, neuropéptidos, lectinas o factores de crecimiento. Ambos tipos de RIPs han sido utilizados para estos fines aunque el hecho de que las RIPs del tipo II posean una cadena B dificulta su aplicación. Las aplicaciones dadas a las inmunotoxinas creadas con el uso de RIPs han sido variadas y se presentan de manera resumida en la tabla 3.

Tabla 3. Aplicaciones dadas a las inmunotoxinas creadas con RIPs

Aplicación	RIP	Referencia
Tratamiento de VIH	Diantina 30 PAP-S Ricina Saporina	Legname <i>et al.</i> , 1995 Olson <i>et al.</i> , 1991 Pincus <i>et al.</i> , 1996 Au <i>et al.</i> , 2000
Infarto Leishmania	Diantina 30 PAP-S Saporina	Cenini <i>et al.</i> , 1988, for all RIPs
Tumores CD80/CD86	Gelonina Saporina	Bolognesi <i>et al.</i> , 2000 for both RIPs
Síndrome de Hodgkin	Diantina 30 Gelonina Momordina PAP-S Ricina Saporina	Bolognesi <i>et al.</i> , 1995 Bolognesi <i>et al.</i> , 2000 Terenzi <i>et al.</i> , 1996 Terenzi <i>et al.</i> , 1996 Castelli <i>et al.</i> , 2004 Terenzi <i>et al.</i> , 1996
Leucemia	Diantina 30 Gelonina Momordina PAP-S Ricina	Bolognesi <i>et al.</i> , 1995 Metha <i>et al.</i> , 2004 Kim <i>et al.</i> , 2002 Chu <i>et al.</i> , 1990 Szatrowski <i>et al.</i> , 2003

Continuación de la tabla 3

Melanoma	Gelonina	Rosenblum <i>et al.</i> , 1999
Cancer de mama	Gelonina Ricina Saporina	Rosenblum <i>et al.</i> , 1992 and 1999 Boyer <i>et al.</i> , 1999 Flavel <i>et al.</i> , 2001
Tumor Human bladder	PAP-S Momordina	Batelli <i>et al.</i> , 1996 for all RIPs
Dolor	Ricina Saporina Volkensina	Wiley <i>et al.</i> , 2000 for all RIPs

1.1.8 Rol de las RIPs en la naturaleza

Aun cuando las RIPs han sido estudiadas durante mucho tiempo, y sus actividades enzimáticas y biológicas han sido extensamente investigadas, muy poco se conoce de su rol en la biología de las plantas. Para tratar de elucidar la participación biológica de las RIPs aún existen preguntas que deben ser tomadas en cuenta tales como; ¿Cómo es que son capaces de alcanzar a los ribosomas endógenos que utilizan como sustrato, *In vivo*?, ¿Cómo es que interactúan con la maquinaria de traducción en la célula blanco?, (Park *et al.*, 2004).

Por todo lo que se ha mencionado anteriormente, resulta claro que las RIPs son potencialmente aplicables en agricultura y medicina, debido a que poseen actividad antiviral, antibacteriana y antifúngica. Hasta el momento han sido utilizadas en la preparación de conjugados con anticuerpos (inmunotoxinas) u otros acarreadores, haciéndolas específicamente tóxicas en contra de la célula blanco, lo que puede ser de gran ayuda en terapias médicas específicas o en contra de organismos con intereses en agricultura. La distribución, mecanismo de acción y rol en la naturaleza de las RIPs no es completamente entendido y es prometedor el desarrollo de su uso aplicado, por lo que se necesitan esfuerzos en la investigación de las RIPs. Por otro lado, su amplia distribución en la naturaleza sugiere que su rol podría ser significativo, dando ventajas al organismo que las posee, lo que ha permitido su conservación a través de la evolución. Es posible que las RIPs participen en alguna vía metabólica presente por lo menos en todos los organismos que las producen. La defensa y propiedades relacionadas podrían ser de gran utilidad (Stirpe *et al.*, 2004).

1.1.9 Posibles aplicaciones

Las propiedades enzimáticas de las RIPs las hacen ser consideradas como herramientas aplicables en biotecnología con diferentes propósitos, los principales campos propuestos son la agricultura y la medicina. En la agricultura, las RIPs han sido probadas en plantas para obtener especies resistentes a virus, hongos y bacterias (Lodge *et al.*, 1993). En cuanto a la medicina se refiere, el uso de las RIPs ha sido estudiado en la construcción

de inmunotoxinas, pero sorprendentemente su uso aún es limitado, la aplicación de las RIPs en este campo podría ser fructífero si pudieran encontrarse inmunotoxinas apropiadas (Stirpe *et al.*, 2004).

Por otro lado es importante considerar la presencia de RIPs en distintos organismos además de las plantas, lo que podría muy probablemente traer consigo múltiples y variadas actividades. Las especies de *Streptomyces* son muy bien conocidas debido a su gran capacidad de producir metabolitos secundarios de interés industrial. En el presente trabajo hemos estudiado el marco de lectura abierto, con similitud a las RIPs de plantas, denominado SC3A4.18, presente en *Streptomyces coelicolor*. La presencia de una RIP en *Streptomyces* tendría ventajas significativas pues la expresión y caracterización de una RIP en *Streptomyces* sería presumiblemente más fácil en comparación a una RIP de plantas, debido a los sistemas extracelulares de expresión desarrollados para este género y las condiciones de crecimiento de una bacteria. Estas características hacen a la posible RIP de *Streptomyces* un blanco interesante para la aplicación biotecnológica en la medicina como inmunotoxina y en la agricultura como agente antifúngico o antibacteriano.

1.2 *Streptomicetes*

Los *estreptomicetes* son microorganismos Gram-positivos aislados del suelo y productores de un amplio rango de metabolitos secundarios con actividades biológicas potenciales. Además son productores de más de la mitad de los activos microbianos biológicamente activos, incluyendo antibióticos comercialmente importantes, compuestos inmunosupresivos, productos de salud animal, y agroquímicos. El vasto reservorio de diversos productos hace de los *estreptomicetes* uno de los géneros microbianos más importantes industrialmente y consecuentemente existen herramientas de manipulación genética para este tipo de microorganismos (Vallin *et al.*, 2005).

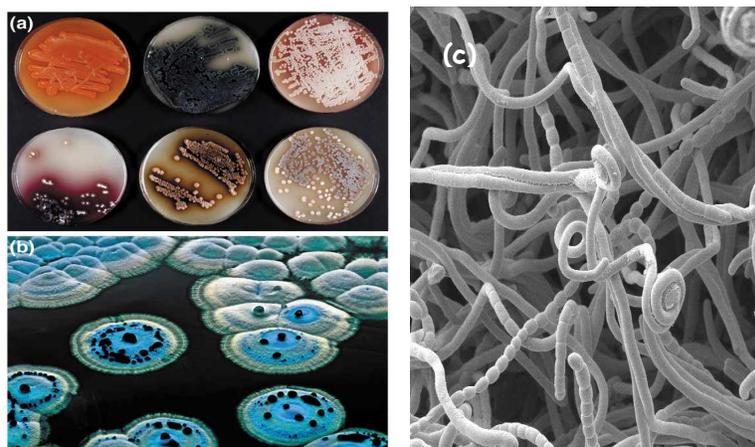


Fig. 6 Producción de metabolitos secundarios por colonias de *Streptomyces*. (a) Morfología típica de colonias de *Streptomyces* aisladas del suelo. (b) Vista panorámica de la morfología colonial de *Streptomyces coelicolor*. (Thompson *et al.*, 2002). (c) Micrografía de escaneo electrónico de las hifas aéreas y las esporas de *S. coelicolor*. (Fotografía tomada de: <http://spider.science.strath.ac.uk/spider/spider/modules/deptWeb/media/1/M600.jpg>)

Streptomyces coelicolor A 3(2), es la cepa mejor caracterizada genéticamente de los *Streptomicetes* (Bentley *et al.* 2002). Esta cepa entró a la era post-genómica en el año 2002 justo cuando la secuencia de su genoma completo fue publicada. Actualmente se están llevando a cabo análisis funcionales de marcos de lectura abierta predichos para la cepa.

1.2.1 *Streptomicetes* como hospedadores para la producción de proteínas extracelulares.

Como resultado de la secuenciación completa de los genomas de más de 100 diferentes organismos, el número de marcos de lectura abiertos con funciones desconocidas, se ha incrementado. Para poder caracterizar estructural y biológicamente dichas proteínas, es importante la obtención de cantidades sustanciales de proteínas recombinantes. *Escherichia coli*, una γ -proteobacteria gram-negativa, es la bacteria hospedadora más comúnmente utilizada en la producción a gran escala de proteínas recombinantes. De cualquier manera, la expresión y aislamiento de algunas proteína producidas por *E. coli* resulta difícil, debido a problemas de insolubilidad, citotoxicidad, modificaciones post traduccionales o traducción ineficiente. Con el propósito de vencer los problemas que se presentan en *E. coli*, han sido desarrollados sistemas de expresión heteróloga en otros microorganismos procariontes y eucariontes (Nobutaka *et al.* 2005).

Los *Streptomicetes* cuentan con ventajas potenciales en la síntesis de metabolitos secundarios de importancia médica e industrial, en la producción de aminoácidos por fermentación, y en procesos de bioconversión, además de que existen sistemas de expresión heteróloga desarrollados para el género (Connell *et al.* 2001).

Dentro del género, *Streptomyces lividans* ha sido extensamente utilizado como hospedador potencial para proteínas intracelulares y extracelulares, ya que además, *S. lividans* cuenta con actividad proteolítica extracelular endógena en bajos niveles (Binnie *et al.* 1997).

Durante los últimos años, se han incrementado los estudios reportados que proponen a los *Streptomicetes* como hospederos ideales en la producción de proteínas extracelulares. Los péptidos señal son un factor importante en la producción extracelular de proteínas, y están siendo extensamente estudiados (Lammertyn *et al.* 1998). Actualmente, existen sistemas de secreción desarrollados para los *Streptomicetes* que han sido utilizados exitosamente en la producción de proteínas eucarionticas (Fornwald *et al.* 1993, Mellaert *et al.*, 1994), lo que hace de los *Streptomicetes* muy buenos hospederos en la producción de proteínas heterólogas.

1.2.2 Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas en *Streptomicetes*

Como ha sido mencionado anteriormente, las Proteínas Inactivadoras de Ribosomas (RIPs) fueron descubiertas en las plantas. Y aunque las RIPs de plantas han sido las mejor estudiadas hasta el momento, existen reportes que demuestran que éstas no son exclusivas en dicho género. Las RIPs han sido encontradas también en algas (*Laminaria japonica*), y hongos (*Sarcina*), (Girbés *et al.*, 2004). Además recientemente se ha descrito actividad tipo RIP en tejidos de mamífero (Barbieri *et al.*, 2001).

La presencia de las RIPs en diversos organismos hace que el descubrimiento de éstas en nuevas especies sea de gran interés por las ya tan mencionadas aplicaciones que estas pueden tener, además de que resulta *in fortuito* su conservación en tantos y variados organismos. En los inicios del presente trabajo, se encontró alta similitud del marco de lectura abierto denominado SC3A4.18 de *Streptomyces coelicolor* con las RIPs, además se detectó la misma similitud en distintos miembros del género como: *S. scabies* y *S. lividans*, por lo que se sugiere la presencia de una RIP activa en el género; sin embargo, a la fecha no existe ningún reporte de su existencia en este tipo de microorganismos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

“El marco de lectura abierta, denominado ORF SC3A4.18 presente en *S. coelicolor* codifica una Proteína Inactivadora de Ribosomas funcional”.

2.2 Objetivos

Objetivo general:

- Determinar si ORF SC3A4.18; de *Streptomyces coelicolor*, codifica una RIP (Proteína Inactivadora de Ribosomas).

Objetivos específicos:

- Aislamiento y clonación del marco de lectura abierta, ORF SC3A4.18.
- Sobre-expresión del gen *rip* de *S. coelicolor* en *E. coli*.
- Purificación de RIP de *S. coelicolor*.
- Análisis *in vivo* e *in vitro* de actividad para RIP de *S. coelicolor*.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y Métodos

3.1 Cepas, medios y condiciones de cultivo

3.1.1 *E. coli*

Las cepas de *E. coli* utilizadas fueron, *E. coli* TG1 (Sambrook *et al.*, 1989) que sirvió como hospedero para propósitos de clonación y *E. coli* BLD21(DE3)pLysS (Studier & Moffat, 1986) que fue utilizada para la sobre-producción de RIPSC. Ambas cepas fueron cultivadas a una temperatura de 37°C con una agitación de 300 rpm en medio Luria Bertani (Miller, 1972). Ambos cultivos fueron suplementados con ampicilina (50 µg/ml) cuando esto fue requerido.

3.1.2 *Streptomicetes*

Las cepas de *Streptomyces* utilizadas fueron, *S. coelicolor* M145 y *S. lividans* TK24. Las cepas y sus derivadas fueron cultivadas a una temperatura de 27°C con agitación continua a 300 rpm durante 48 h. Para los cultivos, las cepas fueron precultivadas en 5 ml de medio phage (Korn *et al.*, 1978) y suplementadas con el antibiótico apropiado. Después del pre-cultivo el micelio fue colectado y homogeneizado para ser inoculado en medio líquido NM (Van Mellaert *et al.*, 1994). Cuando el cultivo en medio sólido fue requerido se utilizó medio MRYE (Anné *et al.*, 1990) suplementado con thiostrepton (50 µg/ml) en caso de ser necesario. La formación de protoplastos y la subsecuente transformación de *S. lividans* fueron llevadas a cabo según describe Kieser *et al.* (2000).

3.2 Análisis Bioinformáticos

La secuencia SC3A4.18 de *S. coelicolor* fue analizada con programas computacionales mencionados a lo largo del trabajo, con la finalidad de determinar propiedades importantes tales como peso molecular, punto isoeléctrico, composición de aminoácidos, similitud con otras RIPs, entre otras. Los programas usados fueron: VectorNTI 10 (Invitrogen), SignalP 3.0 (CBS, Center for Biological sequence analysis), Blast (NCBI, National Center for Biotechnology Information), y ExPASy tools (SIB, Swiss institute of Bioinformatics). Dichos programas son mencionados en cada uno de los experimentos en los que fueron usados.

3.3 Plásmidos

Los plásmidos utilizados en el presente trabajo se presentan a continuación:

pGEM-T Easy (Fig.7) : Plásmido para *E. coli*. Digerido con EcoRV con una terminal T 3'. La incorporación de esta T incrementa la eficiencia de ligación de un producto de PCR en este vector puesto que la mayor parte de las polimerasas incorporan una A en ambos extremos 3' del producto de amplificación.

El plásmido, presenta una zona “polylinker” (*multiple cloning region*) flanqueada por los promotores SP6 y T7 de la RNA polimerasa. Esta región contiene una secuencia que puede ser reconocida por diferentes enzimas de restricción lo que permite cortarla en puntos determinados e insertar el fragmento de DNA exógeno que se desea estudiar.

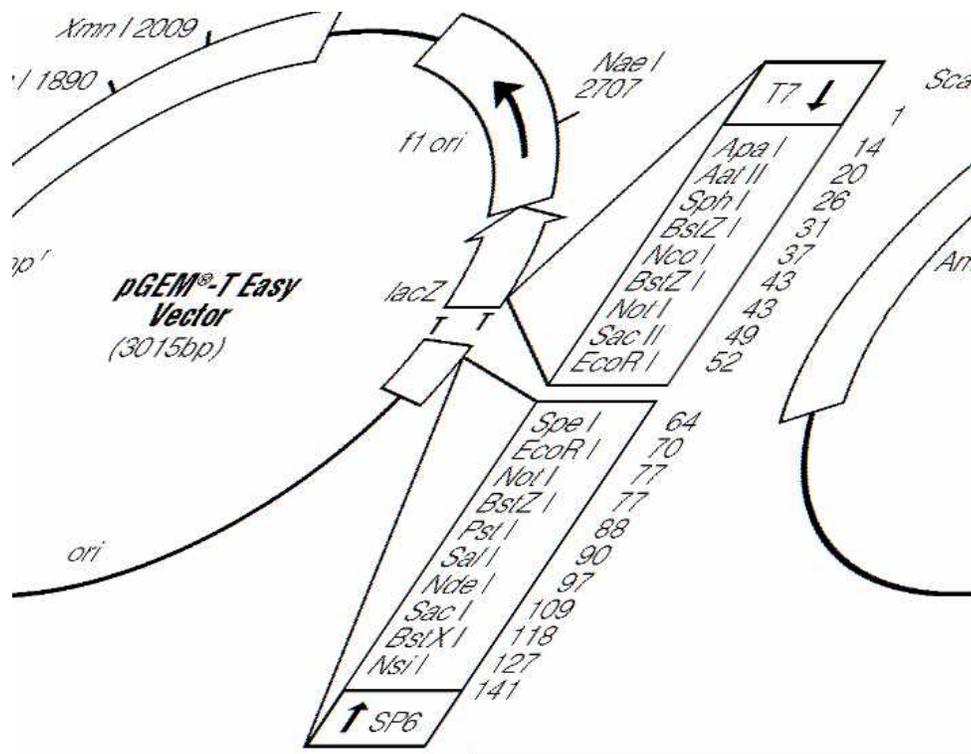


Fig. 7. Mapa del plásmido pGEM-T Easy

pET3a (Fig. 8): Vector de expresión para *E. coli*. Tiene un tamaño de 4.6 Kb, confiere resistencia frente al antibiótico ampicilina y posee el promotor y terminador de la T7 polimerasa. Entre estas últimas secuencias se inserta el gen que se desea expresar.

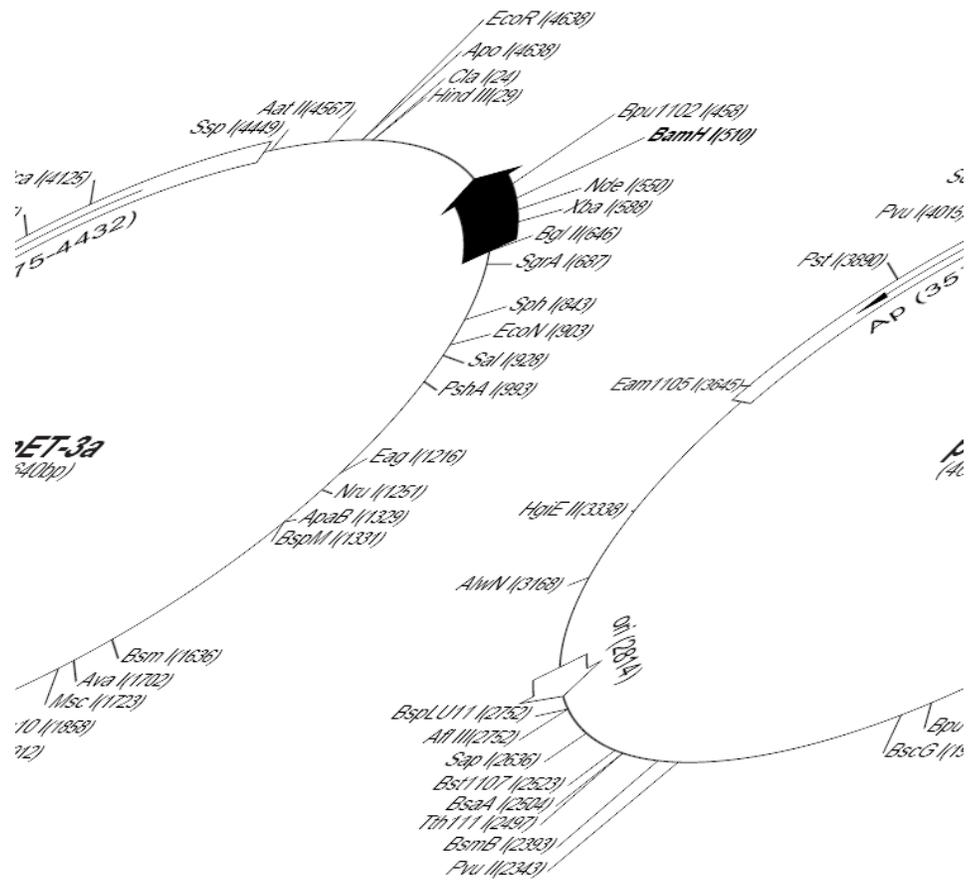


Fig. 8 Mapa del plásmido pET3a

pBSvsi (Fig. 9): Es un plásmido de *Streptomyces* derivado del plásmido de expresión pBluescript KS (+), contiene el cassette de expresión para el péptido señal aislado de *S. venezuelae*, lo que lo hace un sistema útil para la fusión de genes que se requieren expresar extracelularmente, una vez fusionado el péptido señal, se digiere el fragmento de interés para ser clonado en el plásmido de expresión.

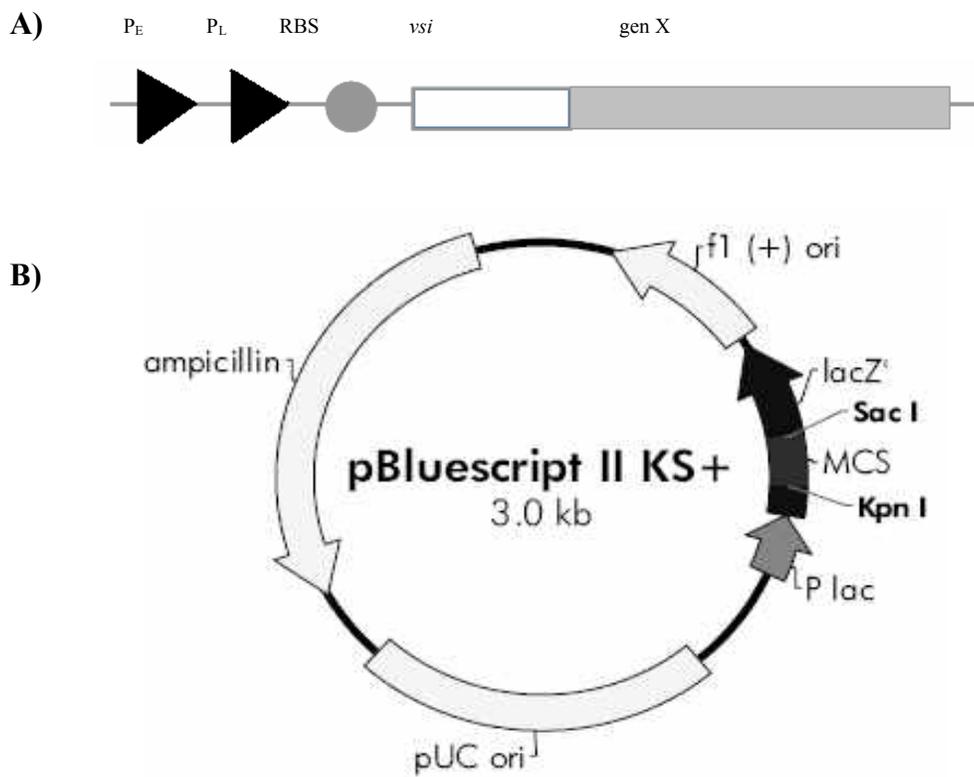


Fig. 9 Composición del vector pBSDKvsi. A Cassette de expresión de la fusión del gen con el péptido señal, *vsi*, P_E y P_L (Promotores), RBS (sitio de reconocimiento ribosomal), *vsi* (péptido señal de *S. venezuelae*),

pESC-HIS (Fig. 11): Plásmido de expresión de *Saccharomyces cerevisiae*, alto número de copias, controlado por inducción de galactosa, promotor GAL.

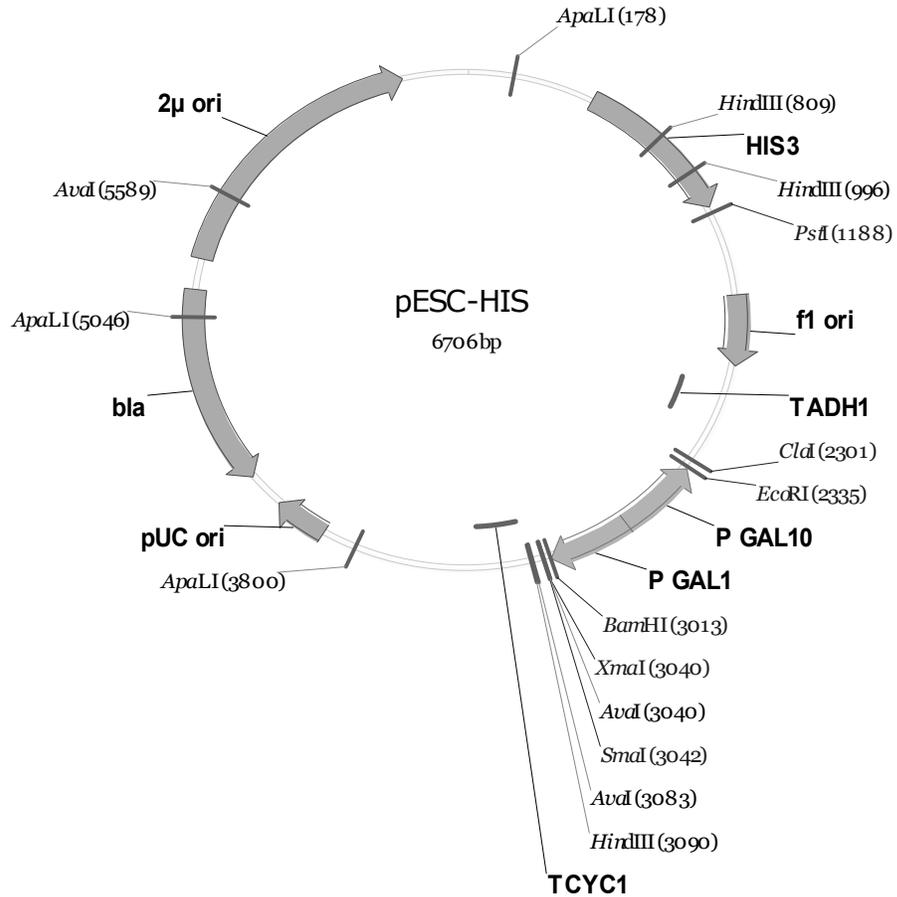


Fig. 11 Mapa del plásmido pESC-HIS

3.4 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en el trabajo fueron diseñados con la ayuda del programa Vector NTI 10 provisto por Invitrogen. La síntesis fue llevada a cabo por la compañía Eurogentec. En la tabla 4, se muestran las secuencias de los oligonucleótidos así como los sitios de restricción utilizados.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la expresión de RIPSC

Nombre	Secuencia	Sitio de restricción
RIPSC FW	5' ta ctg cag ata cgc cca aca ggc 3'	Nde I
RIPSC RV	5' ta ctt aag tca cct ttg ccc gtt gat gg c 3'	BamHI
RIPY FW	5' ta gga tcc gat acg ccc aac agg c 3'	BamHI
RIPY RV	5' ta cct agg tca cct ttg ccc gtt gat ggc 3'	ApaI

3.5 Manipulación de ADN

La manipulación de ADN en todos los casos fue llevada a cabo bajo técnicas estándar (Sambrook *et al.*, 1989; Kieser *et al.*, 2000). Los plásmidos y oligonucleótidos usados en el trabajo son listados en apartados anteriores. Las endonucleasas de restricción y las enzimas de modificación de ADN fueron provistas por Invitrogen y Roche Diagnostics. Se realizaron reacciones estándar de PCR utilizando SuperTaq (HTBiotechnology). Generalmente los fragmentos obtenidos de PCR fueron clonados en pGEMT-Easy y después transferidos al vector escogido. Los oligonucleótidos fueron obtenidos de Eurogentec. La secuenciación del ADN fue llevada a cabo por medio del método de los terminadores de cadena con el kit “Termo Sequenace Primer Cycle Sequencing” con 7-deaza-dGTP (GE Healthcare) en una máquina ALFexpress (GE Healthcare). Los primers usados M13F y M13R estaban marcados fluorescentemente. El DNA plasmídico fue aislado utilizando el kit de purificación “Wizard Plus SV Miniprep DNA purification System” de Promega Inc. El DNA fue extraído de geles de agarosa 1% usando el kit “Wizard SV Gel and PCR Clen-up System” de Promega Inc. El marcador de peso molecular para la electroforesis de ADN en agarosa fue “Smart ladder” provisto por Eurogentec.

3.5.1 Construcción de vectores para la expresión de RIPSC en *E. coli*

El fragmento codificante para RIPSC madura (265 a.a.) fue amplificado por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, usando el ADN total aislado de *S. coelicolor* como molde y con los primers RIPSC-FW y RIPSC-RV, las condiciones de la reacción se describen más adelante. Después de la amplificación el gen *ripsc* fue clonado en pGEMT-Easy. EL plásmido resultante pGEMT-Easy-*ripsc* fue primeramente verificado por medio de la secuenciación y después digerido y tratado tal como se especifica anteriormente y utilizando las

endonucleasas correspondientes. El fragmento *NdeI/BamHI* obtenido fue insertado en los sitios específicos del vector de expresión pET3a. Más tarde se sobre-expresó RIPSC en *E. coli BL21(DE)pLySs*.

3.5.2 Construcción de vectores para la expresión de RIPSC en *S. lividans*

Para la sobre-expresión de RIPSC en *S. lividans*, el gen *ripsc* fue amplificado por medio de PCR con los primers RIPSC-FW y RIPSC-RV usando como molde el ADN cromosomal de *S. coelicolor*. El fragmento obtenido fue clonado en pGEMT-Easy. Después de la verificación de la secuencia el vector pGEMT-Easy-*ripsc* fue digerido con *EcoRI*. El fragmento *EcoRI* fue clonado debajo del promotor *vsj* en el sitio correspondiente de pBSvsj (Lammertyn, 2000), resultando pBSvsj-*ripsc*. Finalmente, el cassette completo conteniendo el promotor *vsj* y la secuencia codificante para RIPSC fue digerido con las enzimas *XbaI/EcoRI* y clonado en el sitio correspondiente del plásmido de expresión para *Streptomicetes*, pIJ486 (Ward *et al.*, 1986). El vector resultante pIJ486-*ripsc*, fue usado para la sobre-expresión de RIPSC en *S. lividans*.

3.5.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación de ADN por medio de PCR se utilizó la siguiente mezcla de reacción (45 µl):

Buffer 10x	5 µl
dNTPs	2.5 µl
Primer FW (5mM)	5 µl
Primer RV (5mM)	5 µl
SuperTaq	0.2 µl
H ₂ O	26.3 µl
ADN (10 ng/µl)	1 µl

El programa aplicado fue el siguiente:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	
1	95	5	} 30 ciclos
2	95	1	
3	55	1	
4	72	1	
5	4	60	

3.5.4 Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Los fragmentos obtenidos por PCR fueron analizados en electroforesis en agarosa, las moléculas de ADN se mezclaron con una cantidad de tampón de carga apropiada, se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa preparados en tampón TBE, a los que se añadió bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml. La concentración de agarosa utilizada para la preparación de los geles fue de 1% (p/v) dependiendo del tamaño de los fragmentos de ADN a separar (Sambrook *et al.*, 1989).

Tampón TBE: Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM pH8.

Tampón de carga para ADN (5X): azul bromofenol 0,25%, sacarosa 40%, Tris-HCl 10 mM pH8, EDTA 10 mM.

Bromuro de Etidio: solución 10 mg/ml en agua. Se conserva a 4°C, protegido de la luz.

3.5.5 Purificación de ADN a partir de un gel de agarosa

Después de la separación del ADN en el gel de agarosa, se seleccionó y corto la banda apropiada. Se siguió el protocolo señalado para del kit utilizado “Wizard SV Gel and PCR Clen-up System” de Promega Inc. Las muestras obtenidas fueron checadas nuevamente en un gel de agarosa. Los fragmentos obtenidos fueron utilizados para las ligaciones pertinentes.

3.5.6 Ligación de fragmentos de ADN

Para las ligaciones llevadas a cabo durante el trabajo, se utilizó la ADN ligasa del bacteriofago T4 y se tuvieron en cuenta las recomendaciones de Sambrook *et al.*, (1989), poniendo siempre un exceso molar del fragmento de ADN a clonar del orden de cuatro veces respecto al vector. Las reacciones fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas para extremos protuberantes. En el caso de ligación de extremos romos, la reacción fue llevada a cabo a 4°C durante toda la noche. Para el caso de la ligación en pGEMT-Easy se siguieron las especificaciones del fabricante.

3.5.7 Defosforilación de extremos cohesivos

Este procedimiento se realizó cuando fue preciso evitar la recircularización de aquellos vectores digeridos con endonucleasas de restricción y que iban a ser utilizados para posteriores ligaciones. Para la defosforilación, se trataron dichos vectores con fosfatasa alcalina, enzima que hidroliza los grupos fosfato del extremo 5' del ADN impidiendo la formación de los enlaces fosfodiéster en la misma molécula, y así favorecer la incorporación de fragmentos de ADN que contengan los extremos 5' intactos. La reacción de defosforilación se

llevó a cabo añadiendo 0.5 µl de fosfatasa alcalina (AP) (Roche) por cada 50 µl de mezcla de restricción e incubando a 37°C durante una hora (Maniatis *et al.*, 1982). Finalmente, la fosfatasa alcalina se inactivó por calor a 65°C durante 10 minutos.

3.5.8 Transformación de *E. coli*

La transformación de *E. coli* se llevó a cabo utilizando células competentes de las cepas TG1 y BL21(DE3) pLyS según el caso. El método utilizado fue el del choque térmico. Se mezclaron en un tubo eppendorf 100 µl de células competentes con 20 µl de mezcla de ligación. La mezcla se incubó durante 15 minutos en hielo. Las células se sometieron a un choque térmico por 3 minutos a 37 °C en un termoblock. Después se incubaron por 2 minutos en hielo. Se agregaron 900 µl de medio LB al tubo y se incubó durante 45 minutos a 37 °C. Se sembraron 100 µl en una caja Petri con el antibiótico correspondiente. Por último se incubaron las cajas a una temperatura de 37°C “overnight”.

3.5.9 Selección de transformantes de *E. coli*. “Rusconi lisis”

La selección de las células transformadas de *E. coli* fue llevada a cabo por medio de Rusconi lisis, que es un método rápido de selección. Una vez crecidas las transformantes es necesario escoger aquellas que contengan el plásmido ligado con el inserto, y debido al rendimiento del proceso algunas veces las transformantes solo contienen el plásmido sin inserto. En el caso de la transformación con pGEMT-Easy existen controles precisos por lo que no se presenta con facilidad una transformación con el plásmido sin inserto pues es detectada por la coloración azul de las colonias. La lisis por el método de rusconi se lleva a cabo con las colonias obtenidas después de la transformación. Se recoge la mitad de la colonia con un palillo y se siembra en una caja nueva, la otra mitad se mezcla con 12 µl de solución rusconi (5 mg de lisozima, 1ml de EDTA (250mM, pH 8), 250 µl de TrisHCl (1 M pH 7.5), 100 µl de RNasa A (10 mg/ml), 1 ml de glicerol 100%, 5 mg de azul de bromofenol (0.05%), Aforado a 10 ml), en un tubo eppendorf, se agregan 2 µl de una solución saturada de fenol/cloroformo, se mezcla por agitación en vortex, la mezcla se centrifuga durante 5 minutos a 13000 rpm. Se corren 8 µl de la mezcla en un gel de agarosa, sin bromuro de etidio. Se agrega el bromuro de etidio después de correr el gel. Como control se utiliza 1 µl de plásmido puro. Las bandas por encima del control son las colonias que deben de escogerse.

3.5.10 Aislamiento de plásmidos

El ADN plásmidico fue aislado por medio de minipreps. Las minipreps se llevaron a cabo con el kit “Wizard Plus SV Miniprep DNA purification System” de Promega Inc. Siguiendo las especificaciones del

fabricante. Después del aislamiento, las muestras fueron chequeadas en un gel de agarosa al 1%. Se almacenaron a una temperatura de -20 °C.

3.5.11 Inducción de *E. coli* BL21(DE3)pLysS.

La sobre-expresión de RIPSC fue llevada a cabo en el sistema de expresión pET3a con células de *E. coli* BL21 DE3 pLysS, dicho sistema es inducible por medio de IPTG. La inducción fue llevada a cabo sobre células transformadas con [pET3a-ripsc]. Las células transformadas se precultivaron en 20 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente a 37°C, “overnight”. Los 20 ml del precultivo fueron utilizados para inocular 600 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente. Después de la inoculación se incubó a 37°C y se monitoreo la densidad óptica hasta alcanzar un valor de 0.8. Una vez alcanzada la densidad óptica necesaria, se agregaron 6 ml de una solución stock de IPTG 100 mM (0.0238 g/ ml) para tener una concentración final de 1 mM de IPTG. El cultivo se incubó durante 4 horas. Al terminó de las 4 horas se recogió el *pellet* por medio de centrifugación. El *pellet* se almacenó a una temperatura de -20°C hasta su uso (no más de 5 días).

3.5.12 Transformación de *Streptomyces*

Las transformaciones hechas para *Streptomyces* se realizaron por medio de la fusión de protoplastos. Los protoplastos conservados a una temperatura de -80°C se descongelan en un baño de agua a temperatura ambiente. Se pipetea 200 µl de la suspensión de protoplastos en un tubo eppendorf. Se adicionan 10 µl de ADN plasmídico y se mezcla por medio de pipeteo. Inmediatamente se agrega 500 µl de una solución de polietilenglicol 600 al 35% esterilizada previamente por filtración, se mezcla nuevamente por pipeteo. La mezcla se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se inoculan cajas con agar R2. Las cajas se incuban a una temperatura de 27°C durante 24 horas para la regeneración de los protoplastos. Después de las 24 horas se agrega 1 ml de solución de antibiótico a las cajas y se dejan crecer.

3.6 Manipulación de ARN

3.6.1 Aislamiento de ARN de *S. coelicolor*

Con la finalidad de estudiar la expresión de RIPSC nativa, se aisló ARN de *S. coelicolor*. El aislamiento de ARN se llevó a cabo en diferentes tiempos de cultivo tal como se describe en la sección de resultados. El *pellet* celular obtenido después de la centrifugación (10 min., 8000 x g, 4°C) de 50 ml de cultivo fue tratado con 2 ml de RNAprotect (Qiagen) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después las células fueron lisadas de acuerdo con el proceso de aislamiento de ARN descrito por Kieser *et al.* (2000) usando perlas de vidrio para la homogeneización de la masa celular en la presencia de mezcla modificante Kirby (6% N-lauroyl sarcosine, 6% sodium 4-aminosalicylate, 6% fenol pH 8, todo hecho en 50mM de Tris.HCl pH 8.3). Después de la extracción

fenol/cloroformo (1:1, pH 8), los ácidos nucleicos fueron precipitados con 1 volumen de isopropanol y 1/10 volúmenes de NaOAc, pH 6 y 3M por un tiempo de 10 minutos a una temperatura de -20 °C. Las muestras fueron centrifugadas (10 min., 12 000 x g, 4°C), los *pellets* resultantes fueron lavados con etanol al 80% y secados en un termoblock. Para una mejor purificación se llevo a cabo el proceso descrito por el kit provisto por Qiagen “RNeasy mini kit”. Para asegurar la ausencia completa de ADN en las muestras, se incluyó un tratamiento con DNasas (Qiagen). Finalmente, el ARN total fue eluido dos veces con 50 µl de agua tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC). La calidad de las muestras de ARN obtenidas fue analizada por medio de separación en un gel de agarosa- formaldehído al 1.3%. La concentración y pureza del ARN fueron determinadas por medio de la medición de la densidad óptica (OD₂₆₀) y el promedio OD₂₆₀/OD₂₈₀, respectivamente.

3.6.2 PCR de transcriptasa reversa (RT-PCR)

La reacción RT-PCR fue llevada a cabo utilizando el sistema RT-PCR de Promega tal como lo especifica el proveedor. El programa utilizado para la reacción fue: 45 minutos a 48°C para la transcripción reversa; 2 minutos a 94°C para la desnaturalización; (30 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C, 2 minutos a 72 °C) x 40 ciclos para la extensión; y 5 minutos a 72°C para la extensión final. Se agregó 1 µg de ARN a la mezcla de PCR (50 µl), dicha mezcla contenía la concentración final siguiente: 1 x AMV/Tfl buffer de reacción, 0.2 mM mezcla de dNTPs, 0.5 µM de cada uno de los primers (forward y reverse), 1mM de MgSO₄, 10% DMSO, 0.1 U/ µl AMV transcriptasa reversa y 0.1 U/ µl Tfl ADN polimerasa.

3.7 Manipulación de Proteína

3.7.1 Separación de fracciones proteínicas solubles e insolubles

Para la separación de las fracciones soluble e insoluble de las proteínas totales obtenidas durante la inducción de RIPSC, se tomaron muestras de 1 ml del cultivo bacteriano resultante de la sobre-expresión bajo inducción con IPTG, en diferentes tiempos, 2h, 3h y 4h. Las muestras fueron centrifugadas (3 minutos 10 000 x g). Los pellets obtenidos fueron resuspendidos en 57 µl ATRIT (10 % sucrosa, 50 mM Tris-HCl, pH 8), con la adición de 19 µl de solución de lisozima (20 mg/ml), la mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación se agregó a la mezcla 76 µl of CTRIT (0.2 % Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8). Las muestras fueron mezcladas con un vortex e incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después las células se lisaron por medio de congelamiento (N₂ líquido) y descongelamiento (H₂O a temperatura ambiente), las muestras obtenidas se centrifugaron durante 5 minutos a 10 000 x g. El sobrenadante, correspondiente a la fracción soluble, fue mezclado con 25 µl de buffer de carga para proteína y analizado por electroforesis SDS-PAGE. El pellet restante, *i.e* fracción insoluble, fue lavado con 150 µl of BTRIT (25 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8), resuspendido en 167 µl de TRIT (3 vol. ATRIT, 1 vol.

ATRIT and 4 vol. CTRIT) y mezclado con 33 µl de buffer de carga para proteína para el subsecuente análisis con electroforesis SDS-PAGE.

3.7.2 Electroforesis SDS-PAGE y detección por *Westernblot*

Las fracciones proteínicas obtenidas de los extractos bacterianos fueron separadas por medio de electroforesis SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12.5% y teñidas con azul brillante de Coomassie (CBB por sus siglas en inglés), para poder ser visualizadas. Para confirmar la identidad de las bandas resultantes, se corrió un gel de poliacrilamida con las muestras y después se transfirieron a una membrana PVDF (polivinilideno difluoruro) que más tarde se inmunodetectaron con anticuerpos anti-RIPSC. El proceso de inmunodetección fue llevado a cabo con anti-conejo IgG marcado con fosfatasa alcalina utilizando el método colorimétrico con NBT/BCIP como sustratos (Roche diagnostics).

3.7.3 Preparación de anticuerpos anti-RIPSC

RIPSC anti-suero fue obtenido con el crecimiento de conejos pfd:Hollander en contra de RIPSC obtenida por electroelución de la banda resultante de la purificación de RIPSC. La muestra de la proteína obtenida después de la electroelución fue inyectada a los conejos, dos veces, con un intervalo de dos semanas. Dos semanas tarde, la sangre de los conejos fue obtenida en una muestra. Después de la incubación “overnight” a 4°C, el suero obtenido fue clareado por centrifugación (5 minutos, 150 x g, 21°C).

3.7.4 Purificación de RIPSC recombinante de *E. coli*

3.7.4.1 Purificación de cuerpos de inclusión

El cultivo de 600 ml obtenido después de 4 horas de inducción fue centrifugado por 10 minutos a 10 000 rpm y a una temperatura de 4°C. El pellet obtenido fue resuspendido en 10 ml de buffer de sonicación de cuerpos de inclusión (25 mM Hepes, 100mM KCl, 12.5 mM MgCl₂, 20% glycerol, 0.1% Nonidet P-40, 1mM DTT, pH 7.7), además se agregó una tableta de inhibidor de proteasas libre de EDTA (Roche) y 500 µl de solución de lisozima (10 mg/ml). La mezcla fue incubada por 30 minutos en hielo. La suspensión fue incubada nuevamente durante 1 hora a una temperatura de -80°C. Después la muestra fue descongelada en un baño de agua a temperatura ambiente y sonicada 8 veces durante 15 segundos. Los cuerpos de inclusión fueron colectados de la mezcla por medio de centrifugación durante 10 minutos a 10 000 rpm a una temperatura de 4°C. El pellet obtenido fue lavado con buffer RIPA (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate in TBS, 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) y almacenado a na temperatura de -20°C hasta su uso.

3.7.4.2 Renaturalización de RIPSC por “*Quick gel filtration refolding*”

Los cuerpos de inclusión obtenidos fueron disueltos en 10 ml de buffer de lisis (8M Urea, 20mM Tris-HCl, 0.3M NaCl, 1mM 2-mercaptoethanol, pH8) e incubados por 2 horas a temperatura ambiente y en agitación constante. La suspensión fue centrifugada a 10 000 rpm y 4°C por 10 min para eliminar posibles contaminantes. El sobrenadante obtenido fue pasado a través de una columna de filtración en gel PD-10 (GE Health care) pre-equilibrada con buffer RIPSC (10 mM Tris-HCl, pH 7, en agua tratada con DEPC). La proteína RIPSC fue eluida con el mismo buffer. Las muestras renaturalizadas fueron almacenadas a una temperatura de -20°C.

3.7.5 Purificación de RIPSC recombinante de *S. lividans*

La purificación de RIPSC extracelular obtenida después de la sobre-expresión en *S. lividans* fue purificada por medio de cromatografía de afinidad con anticuerpos anti-RIPSC, 1 ml de cada muestra (24 h y 48h) fue mezclado con 250 µl de anticuerpos anti-RIPSC. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos y con agitación constante. Después de la incubación se agregaron a la mezcla 500 µl de protein A-agarosa (GE Health care). La mezcla obtenida fue transferida a una columna de polipropileno y agitada durante 30 minutos en una mesa de agitación. Después de la incubación se obtuvo el primer flujo (flow-through) y se lavó el resto con 5 ml de buffer RIPSC (10 mM TrisHCl pH 7.5). La proteína RIPSC fue eluida con 5 ml del buffer de elusión A (50mM Glicina pH 2) en fracciones de 1 ml en tubos eppendorf conteniendo 50 µl de buffer de elusión B (1 M TrisHCl pH 8). Después de la elusión las muestras obtenidas fueron analizadas por medio de electroforesis SDS-PAGE y detectadas por medio de *Westernblot* tal y como se describe en apartados anteriores.

3.7.6 Pruebas de Actividad para RIPSC

3.7.6.1 *In Vitro*

Producción de luciferasa en un sistema libre de células: RIPSC purificada fue probada con un ensayo de inhibición de la síntesis proteica. Para tal fin se utilizó el sistema de expresión libre de célula de reticuloso de conejo (Promega). El experimento de inhibición de la traducción fue llevado a cabo tal como se describe en los protocolos provistos por el comerciante. Para el ensayo se usó mRNA de luciferasa. Los productos de la traducción fueron detectados con el sistema no radiactivo de detección de Promega (Transcend non-radioactive translation system) por medio de quimioluminiscencia. 35 µl de reticuloso de conejo fueron incubados durante 30 minutos a una temperatura de 30°C en la presencia de diferentes concentraciones de RIPSC purificada (500, 250 and 125 ng). Como control se utilizaron las mismas cantidades de buffer libre de RNasas (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl) o de agua libre de RNasas. Además a la mezcla se agregaron los siguientes componentes: 1 µl de mezcla completa de aminoácidos, inhibidor de ribonucleasas RNasin (40 U, Promega), 100 ng de mRNA de luciferasa, 1.5 µl de Transcend tRNA y todo ajustado a un volumen de 50 µl con agua libre de RNasas. Después de la iniciación de la traducción (30 minutos), las muestras fueron incubadas por 1 hora más a una temperatura de 30°C. Después de la incubación las muestras fueron puestas en hielo para parar la reacción. Para

detectar los productos de la traducción, se mezclaron 15 μ l de buffer de carga para proteínas con 5 μ l de la mezcla de reacción obtenida. Las muestra fueron cargadas en un gel SDS-PAGE 12.5% y después transferidas a una membrana PVDF para poder ser tratadas según el protocolo del sistema de detección provisto por Promega. Las bandas obtenidas fueron visualizadas en films de rayos X.

3.7.6.2 *In Vivo*

Ensayo de actividad antifúngica: La actividad antifúngica de RIPSC purificada fue determinada con un ensayo denominado “Inhibición de crecimiento radial” con una adaptación del método de Schlumbaum *et al.* (1986). Tres diferentes hongos patógenos para plantas fueron sembrados en el centro de cajas con agar de cultivo YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa, 2% agar). Discos de papel, esterilizados previamente fueron colocados cerca del centro en el que se sembraron los hongos. Sobre los discos de papel se agregaron 50 μ g de RIPSC previamente esterilizada por filtración con un filtro millipore (0.22- μ m, Millipore). Las cajas fueron incubadas inmediatamente en la oscuridad y a temperatura ambiente hasta que se observó un crecimiento considerable para poder apreciar la inhibición del crecimiento radial debida a los discos colocados.

Ensayo de actividad antibacteriana: La actividad antibacteriana fue probada con una caja de inhibición total de crecimiento. Para el ensayo, las bacterias probadas fueron previamente cultivadas por 12 horas a una temperatura de 37°C en medio LB líquido. Después, se tomo una muestra de cada cultivo con un asa de acero estéril y se incubó por medio de una línea en una caja de inhibición total de crecimiento, preparada con RIPSC. Para preparar la caja, se mezclaron 20 ml de agar LB con 100 μ g de RIPSC purificada previamente esterilizada por filtración con un filtro millipore (0.22- μ m, Millipore). La caja inoculada con todas las bacterias fue incubada a una temperatura de 37°C durante 12 horas. La actividad antibacteriana fue medida de acuerdo a la inhibición del crecimiento producida en las bacterias sembradas en la caja.

Ensayo de toxicidad en levaduras: Para probar la toxicidad de RIPSC sobre hongos, se construyo un sistema de expresión inducible por galactosa en *Saccharomyces cerevisiae*. El sistema fue probado en dos cepas diferentes W303-1A y BY4743. Para construir el sistema, se amplifico el gen *ripsc* de *S. coelicolor* por medio de PCR utilizando los primers correspondientes (RIPY-FW y RIPY-RV), el fragmento obtenido se clono en pGEMT-Easy, se verificó la secuencia. Después el plásmido obtenido pGEMT-Easy se digirió con las endonucleasas correspondientes y se clonó debajo del promotor inducible por galactosa (GAL) en el vector de expresión de *S. cerevisiae*, pESC-His, el plásmido resultante pESC-His-*ripsc* fue utilizado para transformar a las dos diferentes cepas de la levadura. La transformación se llevó a cabo por medio del método de Gietz (2002). Después de la transformación las cepas fueron inoculadas en cajas con medio selectivo (SD-His 2% Glu) durante 3 días. Después las colonias seleccionadas de entre las totales obtenidas se inocularon en medio líquido (Rafinosa,-His) y se incubaron durante 2 días. Los cultivos obtenidos fueron utilizados para el “spot test”. El

mismo número de colonias transformadas y nativas fueron inoculadas en puntos en cajas de agar con galactosa para inducir la expresión de RIPSC y así medir la toxicidad sobre hongos.

3.8 Caracterización fenotípica de mutantes RIPSC de *S. lividans*

Con la finalidad de estudiar el efecto de la producción RIPSC sobre *S. lividans*, se llevó a cabo la comparación fenotípica de las transformantes con la cepa nativa. *S. lividans* TK24 pIJ486vsirip y la cepa nativa fueron precultivadas en 5 ml de medio phage por 48 horas. Después 100 µl del micelio homogeneizado fueron usados para inocular cajas de agar MS y NB suplementadas con tiostreptona. Las cajas inoculadas fueron incubadas a 27°C.

RESULTADOS



4. RESULTADOS

4.1 Caracterización de supuesta RIP de *S. coelicolor*

4.1.1 Análisis de similitud entre RIPSC y RIPs conocidas

Análisis iniciales de BLAST mostraron que la secuencia aminoácida deducida del gen SC3A4.18 (RIP de *S. coelicolor*) presentaba similitud sustancial con RIPs conocidas del tipo I. Consecuentemente, se realizaron alineamientos de la secuencia aminoácida de RIPSC con algunas RIPs conocidas y bien caracterizadas, con el objetivo de establecer comparación (Fig. 12). Los datos arrojados en los alineamientos fueron similitudes de 22% con la cadena A de ricina, 23% con PAP (Pokeweed Antiviral Protein) y 30% con un grupo de isoformas de RIPs tipo I provenientes de *Muscari armeniacum* (MU1, MU2, MU3). El alineamiento realizado con la cadena A de la ricina revela que 7 de los 13 aminoácidos involucrados en el sitio activo (Tyr80, Tyr123, Ala 165, Glu177, Ala 178, Arg180, Trp211, en la cadena A de la ricina) son conservados en RIPSC. Además la similitud de la secuencia completa de RIPSC así como la conservación de los residuos típicos implicados con un amplio rango de RIPs del tipo I, sugirió fuertemente que RIPSC (RIP de *S. coelicolor*) podría poseer actividad funcional.

```

Musarmin 1 (1) -----MAANIRM HRF IFMLTVAAGQGF TVEPTKELNAVLTLS TYT
Musarmin 3 (1) -----MAASTG HRL IFMLI AAAAGQGF TV PTEPLDAVTLNR TYT
Musarmin 2 (1) -----MAANTS HRL IFMLI AAAAGQ GF TV PTEPLNTVTLNR TYN
PAP (1) -----VNT I NVGSTI SKYATPLN
Ricin (1) -----MVPKQ PI INETTAGATVQSYTNFIR
RIPSC (1) MLSINGERSFALRSA ATLAA MIE GLN PRAAADTFRQTTYIDFVDPEDIVPHYR

Musarmin 1 (47) TFERELR RLQTYVAGV-PN PVLVYVNOQPQGFDIVL AGA-DRTI FRFRDITLYL
Musarmin 3 (46) AFEGKIR RLEDENVAGVRPN PVLVYVNO RPPQGFDIVL AGA-HTTARFRRDNIYL
Musarmin 2 (46) ATETLRNRLQTYVPSV-PN PVLVYVNOQPQGFDIVLI DLGHTTFRFRDNIYL
PAP (22) DLRNEADPSLKCYGIPVLPNTNTNPKYVLI-----ELQSNKKIITMLLRNMIYL
Ricin (27) AARGLTGADVREIPV PNRVGLP NDRF-----ILVELNHAEI VLDALDVNAYV
RIPSC (61) SVVQQLRRGACHLIHNNIYETMGQQNAGLVALN-----LYNADVVHGTIHYENASNIYL
*

Musarmin 1 (105) VGYQMQG-----AWLEFGRAGNE-----QFIRGSEFLGF GSVT IERLAGPV
Musarmin 3 (105) VGYEMKD-----TWLEFGRRR E-----QLIRGSEFLGFGSVT IERHAGSV
Musarmin 2 (105) VGYNQSN-----TWLEFGRAG E-----QFIRGSEFLGFGSVT IERL GSV
PAP (74) VGYSDPFETNKCRYHIFNDISGTERQDVETTLCPNANSRVSKN NEDSRKPTESKAGVK
Ricin (82) VGYFRAGNS-----A FPHDNQDAEAITHLFTD QNRYTF E GNVDREIQLAGLN
RIPSC (117) VGYKSRIG-----QAYLESASANAREEVGREGVAVPTLPE GSVT IERVNTLPGA
*

Musarmin 1 (149) TS--M IINAKL T VRDLDVSTNS-----VVRALALVV IQMICEATREIPIISDHF
Musarmin 3 (149) TK--M IINRAIL T VQDLTESITTT-----SVRALALVV IQMICEAAREIPISENHF
Musarmin 2 (148) TG--M IIDARL TVVQQLARPTN-----AVRARALVV IQMFSEATREIPIISDFE
PAP (134) SRSQQLGIQLDNGKIGVMFT--E-----KTEAEFLVATQMFSEAREPKYIENQV
Ricin (134) RENIEIGNPLEEATISALYYY TGGTQL----PTLARPIIQMISEAREPKYIEGEM
RIPSC (169) ETEPTTIGIYATQINMEALARPNPAAATGAYRGSIRARMLINIGAFI EAREPKMFRDHF
** *

Musarmin 1 (199) ASNLATDYAK--LPPMMSDLEKNW RISRREVLK---WDADTSYKIQPQ IINGQITITVE
Musarmin 3 (199) ASNLATQRAK--LPLMMEDLQKNW RISRREVLK---WAADPTYRIQPQ IINKRITITVA
Musarmin 2 (198) ASNLATPNTK--LPAWMMEDLQKNW RISRREVLK---WCVRPSYNIQI IININGRPITIVA
PAP (188) K I NFRAFN---PNPK I LNQETW H I STAIHDAKNGVLPKLEI V DARGAKW I LRVLD
Ricin (189) R I R YNRRS--ADPS I TLENSW H R STAIQESNQGAFAP I Q IQRNGS I F S YDMS
RIPSC (229) EAFRRFANPSV VTPTMQALRTAQ I QSRWQQLVSGPPP I EAVFG--G VYFVLA WE
*

Musarmin 1 (254) GLRPYLGLYRA VNEFSTSLY EMK GLEFAARRFGFVVMVA---
Musarmin 3 (254) GLRPYLGLYRA VTFPSTSLY EMK GLEFAARRFGFVVMVAQA
Musarmin 2 (253) QLRPYLGLYQA ADFSTGLY EMK GLEFAARRFGFVVMVA---
PAP (244) E I P DVA I L N Y V G S C Q T-----
Ricin (247) I I I P I A I M V Y R C A P P S Q F-----
RIPSC (288) D V D K Y L R A I N G Q R-----

```

Fig.12 Alineamiento de secuencias aminoácidas de RIPSC con musarmin 1, musarmin 2, musarmin 3, PAP (Pokeweed antiviral protein) y ricina. Los alineamientos fueron llevado a cabo con Vector NTI. Los residuos idénticos son mostrados con letras blancas remarcadas con

fondo negro. Los aminoácidos de RIPSC con homología en el sitio activo de la ricina están indicados con estrellas. Todas las secuencias fueron obtenidas de la base de datos del NCBI.

Además del análisis de alineamiento realizado para la secuencia predicha, se determinaron propiedades físicas y químicas con la ayuda de programas computacionales disponibles en la red (Protparam, <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>), los datos obtenidos son los expuestos en la tabla 5.

Tabla 5. Propiedades fisico-químicas predichas para RIPSC

Número de aminoácidos	300
Peso Molecular (kDa)	32.67
Punto Isoeléctrico	9.22
Fórmula	C ₁₄₆₀ H ₂₂₅₈ N ₄₁₂ O ₄₂₁ S ₉
Coefficiente de extinción (M ⁻¹ cm ⁻¹ , medido en agua a 280 nm)	39880
Índice de Inestabilidad	Tipo II, con valor 29.89, lo que la clasifica como estable
Índice Alifático	83.26

4.1.2 Predicción de la localización de la supuesta RIP de *Streptomyces*

Con la finalidad de predecir la localización subcelular de RIPSC, se echó mano de análisis bioinformáticos, utilizando el programa SignalP 3.0 disponible en la red. Según los datos obtenidos, la secuencia de RIPSC contiene un péptido señal en el extremo N-terminal que consta de 35 aminoácidos (fig. 13), la presencia de dicho péptido sugiere que RIPSC es una proteína excretada naturalmente por *S. coelicolor*. El péptido señal predicho contiene los dominios característicos en este tipo de secuencias (Dominios N, H y C), además contiene un sitio típico A-X-A de reconocimiento de la peptidasa señal. El hecho de que RIPSC sea una proteína excretada de manera natural, propone que la relevancia fisiológica de la proteína podría dar ventajas nutricionales a *S. coelicolor* para protegerse de la competencia presente en su hábitat.

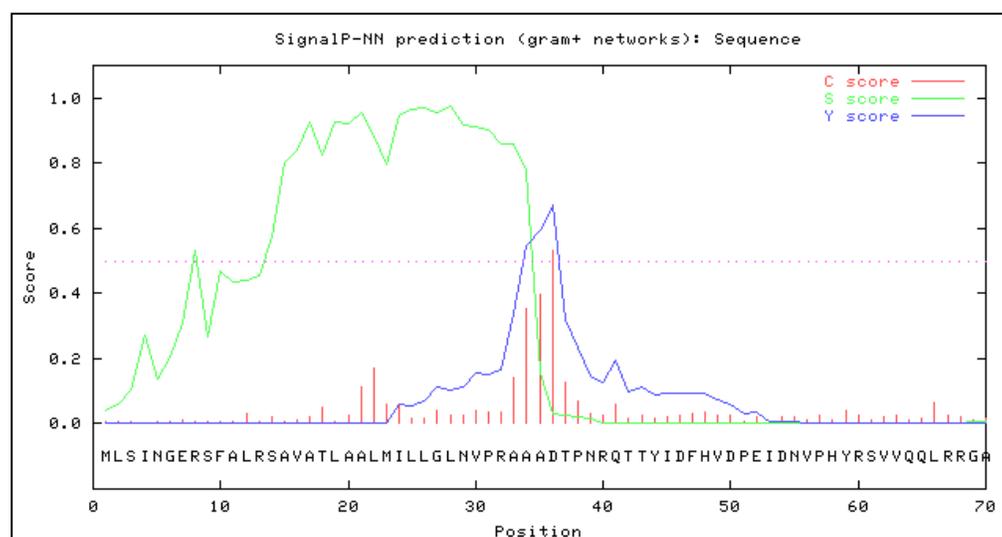


Fig13. Predicción del péptido señal presente en la secuencia de RIPSC, (SignalP 3.0). (Bendtsen *et al.*, 2004; Olof *et al.*, 2007)

En la Figura 13 , se muestra explícitamente la composición del péptido señal presente en la secuencia predicha para RIPSC, los parámetros medidos son: C (“cleavage site”), que representa la ubicación del sitio de reconocimiento de la peptidasa señal, este parámetro resulta significativo solo si se obtienen valores altos en el score; S (“signal peptide”), indica a los aminoácidos presentes en el péptido señal; Y es el parámetro que correlaciona C y S, dando como resultado una mejor predicción del sitio de reconocimiento de la peptidasa señal. Con los datos obtenidos, puede mostrarse claramente la presencia de un péptido señal en la secuencia predicha para RIPSC.

4.1.3 Organización genómica de RIPSC

El gen que codifica a la supuesta RIPSC fue localizado en el cósmido 3A4, cerca del final del cromosoma lineal de *S. coelicolor* (Fig. 14). Como ha sido estudiado para el género *Streptomyces*, los genes más esenciales se encuentran situados en la región cromosómica central por lo que se puede suponer que el gen que codifica a la supuesta RIPSC podría no ser constitutivo. El final del cromosoma lineal entre el género *Streptomyces* ha sido reportado como altamente variable lo que nos lleva a concluir que la presencia del gen *ripsc* podría no ser detectable en algunos miembros del género.

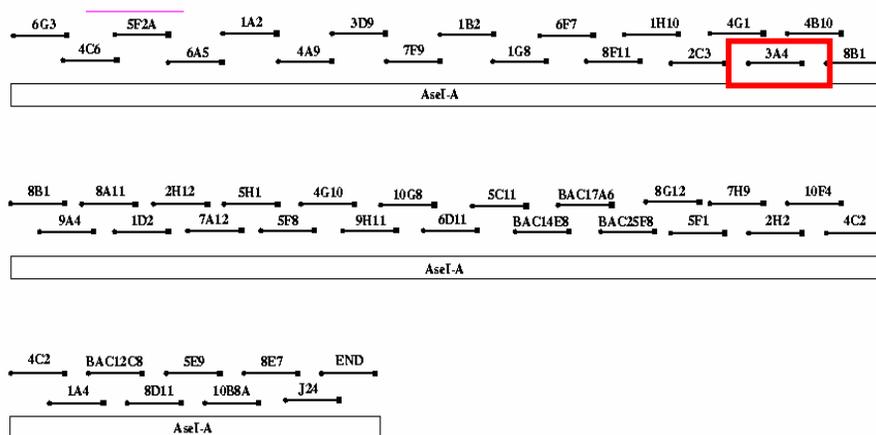


Fig. 14 Mapa genómico del extremo final del cromosoma lineal de *S. coelicolor*

Además de la ubicación del gen *ripsc* en el cromosoma de *S. coelicolor*, se determinó la composición y naturaleza de los genes presentes alrededor, con la finalidad de determinar si podría tratarse de algún operón. Como se muestra en la figura 15, aparentemente y debido a la orientación y posibles actividades, ninguno de

estos genes se encuentran ligados entre sí, por lo que se puede suponer que la presencia de RIPSC en *S. coelicolor* no se encuentra en un operon.

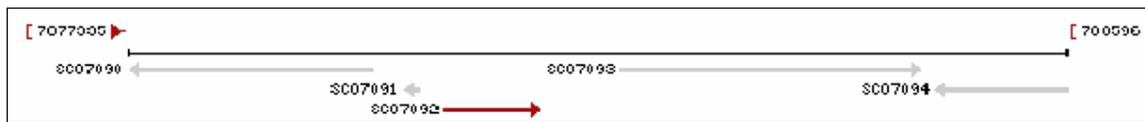


Fig. 15 Mapa genómico. En rojo se muestra el gen *ripsy* y en gris los genes vecinos. El mapa fue obtenido de la base de datos de la NCBI. SC07091: Proteína hipotética (Proteína implicada en el reconocimiento de carbohidratos), SC07090: Proteína de membrana, SC07093: Regulador transcripcional, SC07094: Flavohemoproteína.

4.1.4 RIPs similares en diferentes cepas de *Streptomyces*

Como se ha mencionado anteriormente y tomando como referencia lo expuesto en cuanto a la localización del gen *ripsc* en *S. coelicolor*, se podría sugerir que no todas las especies del género son productoras de RIPs. De entre las especies de *Streptomicetes*, *S. scabies* cuenta con la presencia de una secuencia con similitud a la secuencia de las RIPs del tipo I de la misma manera que *S. coelicolor*. En la figura 16 se muestra el alineamiento de las secuencias pertenecientes a *S. scabies* y *S. coelicolor*. Este alineamiento muestra que los residuos más importantes para el sitio activo, en referencia a la cadena A de la ricina mostrada en la figura 16, son conservados en ambas secuencias. De cualquier manera el porcentaje de similitud es bajo (30%).

<i>S. coelicolor</i>	(1)	--ML[SINGERSFALRS]AVATL[AALMILLGLNV]PRA[ADT]PNR[QTYIDFH]
<i>S. scabies</i>	(1)	MLP[LKFLARAGQRAVGA]LVAL[ALSIGLVGLSAP]AASADP-DRILLTVHDWV
<i>S. coelicolor</i>	(49)	VDPETDN--VPHYR--SVVQQLRRGAGHLIHGNNIYETMG[G]NAGLVAL
<i>S. scabies</i>	(50)	LDLVLNNGGQDPHQQYWNMVAAMHRVTVGHDFFRDTLDETTTNGN[ALFQVSV]
<i>S. coelicolor</i>	(95)	NLYNADWVHQTTLYFNASNLYLVGFKSR--TGQAYLFS[ASANAREE]VGR
<i>S. scabies</i>	(100)	HRV[G]---TYV[GALYEW]TNDLYLAGFYQAGEGGGHYAFNEP----RRARFN
		*
<i>S. coelicolor</i>	(143)	EVRGAPVTTLPFAGSYTSLVNTLPGAETEPTTIGIYQTNMEALARTPNPA
<i>S. scabies</i>	(143)	EILRIQSTALPWN[GSYTD]FSGNAGDQGSRSNLQINGPRLDNLQQLGRAG
		*
<i>S. coelicolor</i>	(193)	AATGAYRG--SIA[RAMLIMIGAF]EAARFPMFRDHFEAAFRRFANPSV[VV]
<i>S. scabies</i>	(193)	SHLQSQNGRAVLSQALVMI[QATSE]EAARFGRIEDNIRTNIRDVHTGGAQM
		* * *
<i>S. coelicolor</i>	(241)	TPTMQALRTAWGQ[SRWV]QQLVSGPPPTPAVEGSGVYFFVLASWEDVDKY
<i>S. scabies</i>	(243)	GAENVNLQONWGT[ISNWI]YRVIQNAGTPEPLTIGIRDLQRTFA[PFQQLIAY]
		*
<i>S. coelicolor</i>	(291)	LRATNGQR-----
<i>S. scabies</i>	(293)	VFYME[ELASGSR]PR

Fig. 16 Alineamiento entre la secuencia predicha para RIPSC y la secuencia con similitud presente en *S. scabies*. Los residuos importantes para el sitio activo están señalados con estrellas. La referencia es la cadena A de la ricina. El alineamiento fue realizado con el programa Vector NTI

4.2 Aislamiento y sobre-expresión de la supuesta RIP de *S. coelicolor* en *E. coli*

La sobre-expresión del gen *ripsc* fue llevada a cabo en *E. coli* BL21(DE3)pLysS bajo el sistema pET (Novagen), para lo cual el gen *ripsc* codificante para RIPSC madura (i.e. secuencia sin péptido señal) fue amplificado por PCR con los primers correspondientes (RIPSC-FW y RIPSC-RV) y conteniendo una cola de 6 histidinas en el extremo N-terminal, con la finalidad de facilitar la subsecuente purificación. Después de la amplificación (pGEMT-Easy) y correspondiente digestión, el gen *ripsc* fue clonado en el plásmido de expresión pET3a detrás del promotor inducible T7 (pRIPSC).

El sistema de expresión utilizado (Fig 17) resulta factible para una proteína de naturaleza tóxica como RIP puesto que existe un buen control en la expresión. Las características importantes del sistema son que la cepa utilizada, *E. coli* BL21(DE3)pLysS, contiene el lisógeno del fago λ DE3 que expresa el gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor lacUV5, cuando se induce con IPTG. El plásmido pLysS expresa constitutivamente niveles bajos de lisozima T7 que inhibe los niveles basales de la RNA polimerasa de T7 y, de este modo, reduce el nivel basal de expresión del gen clonado. Otras particularidades importantes de esta cepa es la deficiencia en la proteasa dependiente de la ATPasa, que disminuye la degradación de la proteína recombinante expresada en la bacteria, y la ausencia del elemento lacZ Δ M15, requerido para el test de complementación α .

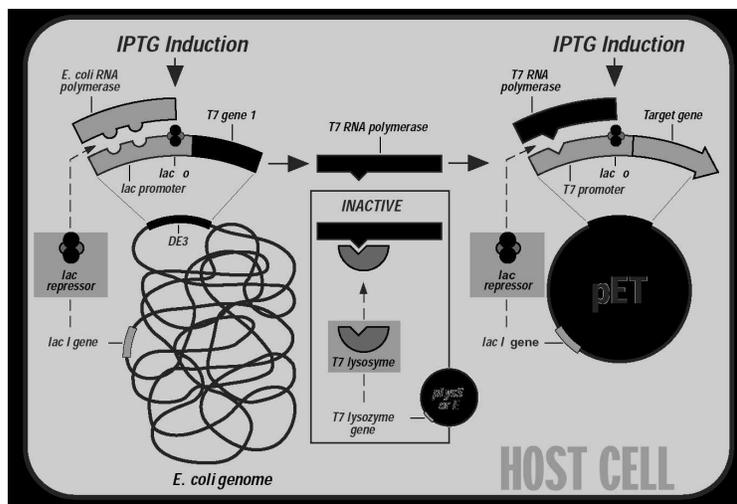


Fig 17. Sistema de expresión pET3a en *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Utilizando el sistema de expresión antes descrito, se llevó a cabo la inducción con IPTG a una concentración de 1mM. Después de la inducción se tomaron muestras a los tiempos 0h, 2h y 4h. Las muestras fueron fraccionadas, corridas en un gel de poliacrilamida 12.5% (SDS-PAGE) y analizadas en un Western-blot con anti-His. Como se muestra en la figura 18, la expresión de RIPS es eficiente, aunque solo esta presente en la

fracción insoluble. La producción insoluble de RIPSC mostró el hecho de que ésta se localizaba en cuerpos de inclusión, lo que a primera instancia resulta indeseable para los fines perseguidos, pues la formación de cuerpos de inclusión dificulta la purificación, además de que imposibilita el uso de la proteína producida para los ensayos de actividad pues ésta se encuentra desnaturalizada.

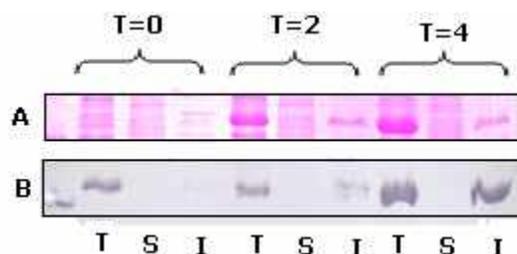


Fig.18 A Muestras de células lisadas del cultivo de *E. coli* (BL21)DE3pLysS en diferentes tiempos de inducción con IPTG para la producción de RIPSC corridas en un gel SDS-PAGE 12 % tenido con colorante azul brillante de Coomassie. T=Total de células lisadas, S=Fracción proteica soluble, I=Fracción proteica insoluble. Fig. 18B Análisis de *Westernblot* para las mismas muestras, detectadas coloriméricamente con NBT/BCIP.

Debido a la necesidad de obtener RIPSC nativa y pura, se llevaron a cabo variaciones en los experimentos con el objetivo de dirigir la obtención de RIPSC en forma soluble. Las variaciones realizadas fueron: el cambio de la cepa huésped (*E. coli* BL21(DE3)star, *E. coli* JM109(DE3), *E. coli* C43(DE3) and *E. coli* DH5 α), el decremento en la concentración de IPTG en un rango 1mM-0.1mM, y el decremento en la temperatura de incubación (27°C y 12°C). Los resultados obtenidos en cada experimento fueron negativos, la producción total fue obtenida en cuerpos de inclusión (fracción insoluble), lo que indicó la posible toxicidad de RIPSC para *E. coli* considerando la naturaleza de las RIPs, para comprobar la hipótesis, un nuevo experimento de inducción fue llevado a cabo, dicho experimento consistió en el monitoreo en la curva de crecimiento durante la inducción y la comparación de ésta con el crecimiento de un cultivo sin inducción (Fig 19).

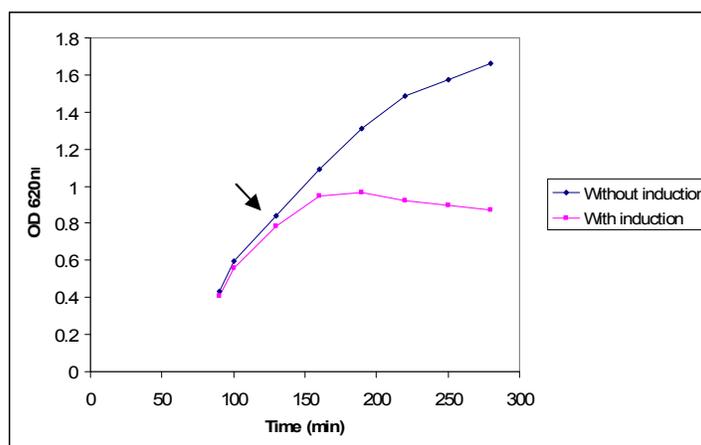


Fig. 19 Curva de crecimiento para *E. coli* (BL21)DE3pLysS durante la inducción con IPTG 1mM durante la producción de RIPSC. La inducción fue realizada cuando se alcanzó una densidad óptica de 0.8 medida a 620 nm solo en uno de los cultivos (curva color rosa). El momento de la inducción está señalado con una flecha. Las muestras fueron tomadas cada 30 min.

El crecimiento de los cultivos fue medido por medio de espectrofotometría a 620 nm. La inducción fue llevada a cabo cuando los cultivos alcanzaron una D.O. de 0.8. Como se observa en la figura 19, el cultivo inducido muestra un abrupto decremento en el crecimiento a partir del momento de la inducción.

4.3 Purificación de la supuesta RIP de *S. coelicolor* producida en *E. coli*

La formación de cuerpos de inclusión representa una barrera para la eficiente y pronta purificación, además de que las proteínas obtenidas en esta forma son total o parcialmente inactivas pues se encuentran en su mayoría desnaturalizadas, por lo que para efectos de estudios de actividad representa un obstáculo inminente. Arduos esfuerzos fueron hechos en la obtención y purificación de RIPSC en forma nativa, sin resultado positivo.

Diversos protocolos de renaturalización de proteínas han sido descritos en la literatura como alternativa a la formación de cuerpos de inclusión y aunque no es la mejor alternativa; debido a la dificultad en la purificación de RIPSC, se optó por la renaturalización con el método “Quick gel filtration refolding”, descrito en la sección correspondiente (ver materiales y métodos). La mezcla parcialmente purificada (Fig. 20), se utilizó para los ensayos de actividad *in vitro*.

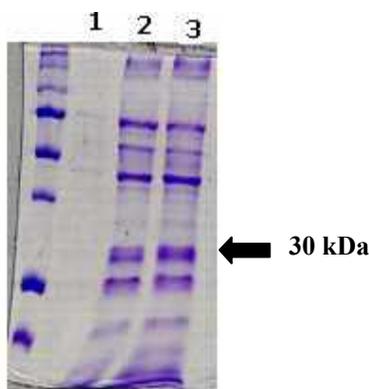


Fig. 20. Muestra de RIPSC parcialmente purificada y renaturalizada. Las muestras fueron renaturalizadas por medio del método “Quick refolding gel filtration”. Para su detección fueron separadas en un gel de electroforesis para proteínas SDS-PAGE al 12% y teñidas con azul brillante coomassie. Carril 1: Buffer de lavado, Carril 2: primera elusión, Carril 3: segunda elusión.

4.4 Expresión de RIPSC en *S. lividans*

La purificación limitada de RIPSC producida por el sistema de expresión en *E. coli* condujo a la búsqueda de nuevas alternativas en la obtención de RIPSC nativa. El problema principal con la expresión en *E. coli* fue la formación de cuerpos de inclusión debido a la naturaleza tóxica de RIPSC. El sistema de expresión en *S. lividans* posee la ventaja de la producción extracelular de las proteínas sobre-expresadas, por tal razón se implementó el uso de dicho sistema como alternativa a la obtención de RIPSC bajo condiciones nativas para así lograr la purificación eficiente.

Tal y como se observa en la figura 21, la expresión de RIPSC en el sistema de expresión de *S. lividans* es detectable después de 48h, sin embargo es obtenida en muy bajas concentraciones, insuficientes para una purificación eficiente.

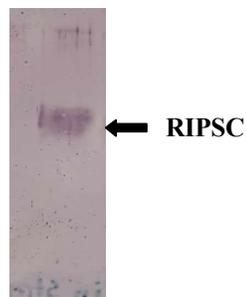


Fig. 21. Análisis de Westernblot para la producción de RIPSC extracelular en condiciones nativas en *S. lividans*. Las muestras fueron tomadas después de 24 horas de producción. Las proteínas del sobrenadante fueron precipitadas con TCA, corridas en un gel SDS-PAGE gel y transferidas a una membrana de PVDF y detectadas con anti-RIPSC. Con una flecha se muestra la banda correspondiente a RIPSC.

4.5 Análisis de Actividad de RIPSC

4.5.1 Análisis *In Vivo*

Ensayos antibacterianos y antifúngicos: Las actividades antibacterianas y antifúngicas fueron probadas sobre hongos y bacterias patógenos para plantas y humanos (*Fusarium oxysporum*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Sarcinia lutea* and *Bacillus subtilis*). La técnica utilizada para medir la actividad sobre hongos fue la inhibición de crecimiento radial y para bacterias la inhibición de crecimiento total. En el ensayo con hongos fueron agregados 50 μ l y 25 μ l en diferentes discos, como control se utilizo el buffer de RIPSC, para las bacterias se suplementó el agar de cultivo con 1 ml de RIPSC. En ninguno de los ensayos se obtuvo inhibición alguna, como se observa en la figura 22, el crecimiento de todas las bacterias probadas es normal al igual con *Aspergillus niger* que se tomó como muestra representativa.

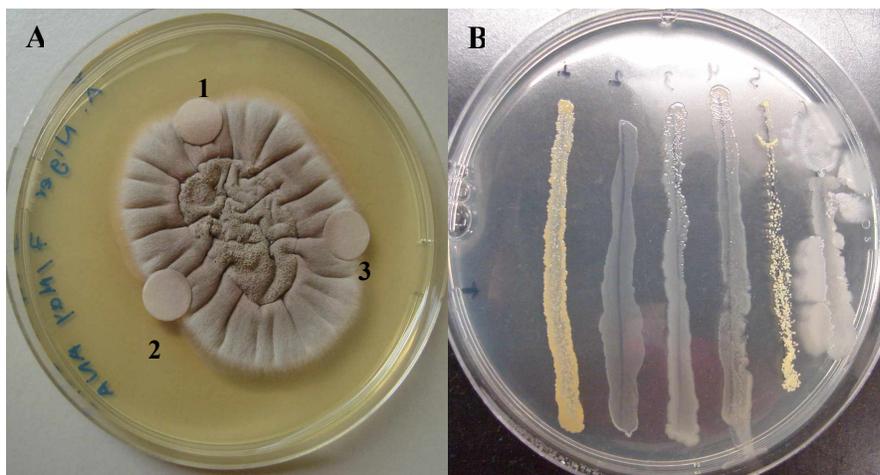


Fig. 22 . Análisis antifúngico y antibacteriano *in vivo* de RIPSC. A) Inhibición de crecimiento radial en *Aspergillus Níger* (Disco 1: Buffer de RIPSC, Discos 2 y 3: 50 µg de RIPSC). B) Inhibición de crecimiento total bacteriano. El análisis fue llevado a cabo en 6 diferentes bacterias, el orden de izquierda a derecha es: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas*, *E. coli*, *S. lutea*, *B. subtilis*.

Toxicidad de RIPSC sobre levaduras: La toxicidad de RIPSC fue probada sobre *Sacaromyces cereviciae* en dos cepas distintas W303-1A and BY4743 después de la inducción por galactosa en un test de puntos. Para el ensayo RIPSC fue clonada en el vector de expresión pESC-His para levaduras detrás del promotor inducible por galactosa. Como control se utilizó glucosa por ser el represor del promotor. Según se observa en la fig 23., después de la inducción de la producción de RIPSC con galactosa no se detecta crecimiento alguno en ninguna de las cepas probadas, por lo que podemos concluir de este experimento que RIPSC está siendo altamente activa en levaduras.

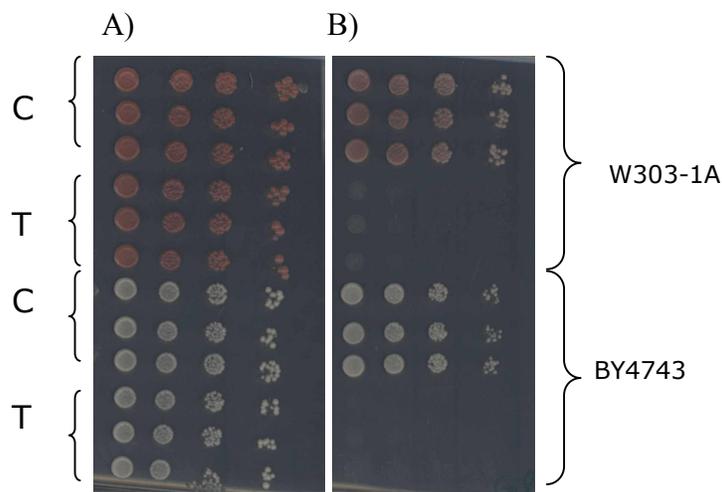


Fig. 23 . Test de toxicidad para levaduras. Después de la transformación de las cepas con el vector de expresión conteniendo RIPSC, se inocularon en un precultivo de 5ml durante 24 h, a partir del precultivo las muestras se diluyeron y se sembraron en cajas en pequeños puntos, cada punto es una dilución distinta. A) Muestras sembradas en agar con glucosa (represor). B) Muestras sembradas en agar con galactosa (Inductor). C=Control (transformante con el vector de expresión sin inserto). T= Transformantes.

4.5.2 Análisis *In Vitro*

Producción de luciferasa en un sistema libre de célula: La actividad enzimática de RIPSC recombinante fue en primer lugar medida *in Vitro* por la inhibición en la traducción de luciferasa en el sistema de expresión de lisado de reticuloso de conejo (Promega), dicho sistema contiene todos los componentes necesarios para llevar a cabo la traducción (RNA template, ribosomas, tRNA, mezcla de a.a). Para medir la capacidad inhibitoria de RIPSC en la traducción de luciferasa fueron adheridos 10 µl de la muestra parcialmente purificada a la mezcla de reacción, como control se utilizó la misma mezcla de reacción con buffer de RIPSC (10 mM Tris-HCl, pH 7.5), con el fin de descartar efectos por el buffer en el ensayo. Además todas las soluciones usadas fueron preparadas en condiciones libres de RNAsas.



Fig 24. Detección por quemiluminiscencia de la inhibición de la traducción de luciferasa. Línea 1: Control (mezcla de reacción con RNA template), Línea 2: Control (mezcla de reacción sin ningún cambio), Línea 3: Inhibición de la traducción por el implemento de RIPSC (mezcla de reacción conteniendo 10 µl de RIPSC parcialmente purificada), Línea 4: Control (mezcla de reacción conteniendo RIPSC buffer)

Como se observa en la figura 24, la producción de luciferasa es disminuida significativamente cuando RIPSC es agregada, de el experimento *in Vitro* se puede concluir que RIPSC tiene efecto sobre los ribosomas de conejo.

4.6 Otros análisis

4.6.1 Análisis de Expresión de RIPSC nativa en *S. coelicolor*

La expresión de RIPSC nativa fue monitoreada a diferentes tiempos de crecimiento bajo la técnica de RT-PCR. RNA total fue aislado bajo condiciones estándar a tres diferentes tiempos de crecimiento, 12 h 24 h y 48 h analizados por PCR de transcriptasa reversa, las muestras fueron posteriormente separadas en un gel de agarosa-formaldehído al 1.3 %. La expresión de RIPSC bajo condiciones normales de crecimiento no fue detectable..

4.6.2 Caracterización fenotípica de mutantes RIPSC de *S. lividans*

La caracterización fenotípica de las mutantes de *S. lividans* fue llevada a cabo tal como se describe en materiales y métodos. En la figura 25, se muestran los efectos fenotípicos dramáticos presentes en *S. lividans* durante la expresión de RIPSC. En las figuras 25 A y B, se muestra la esporulación retardada de la mutante en

comparación con la cepa control. Además, las mutantes RIPSC presentan crecimiento lento en comparación con la cepa parental.

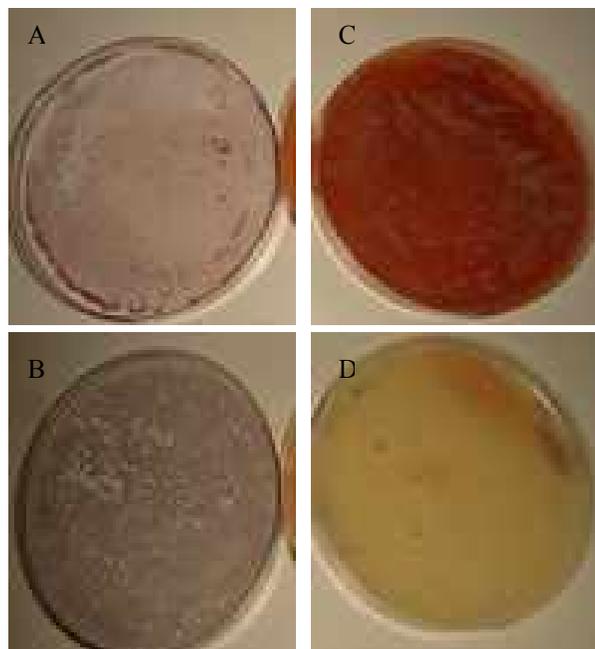


Fig.25. Pruebas fenotípicas durante la producción de RIPSC en *S. lividans*. A Pigmentación de la cepa nativa de *S. coelicolor* crecida en medio R2. B Esporulación de la cepa nativa de *S. coelicolor* crecida en medio MS. C Pigmentación de la mutante de *S. coelicolor* (pIJ486RIPsc) crecida en medio R2. D Esporulación de la mutante de *S. coelicolor* (pIJ486RIPsc) crecida en medio MS.

DISCUSIÓN



5. Discusión

Como es bien sabido, los *Streptromycetos* son bacterias filamentosas Gram-positivas, responsables de la producción de un gran número de metabolitos secundarios con interés industrial, y con sistemas de expresión muy bien desarrollados (Vallin *et al.*, 2005). Dentro del género el mejor caracterizado genéticamente es *Streptomyces coelicolor* A 3(2), dicha cepa entro a la era post-genómica en el año 2002 cuando la secuencia de su genoma completo fue dado a conocer (Bentley *et al.* 2002), sin embargo actualmente se están llevando a cabo análisis funcionales de ORFS predichos. En nuestro caso, los experimentos llevados a cabo durante el presente trabajo fueron realizados con la finalidad de estudiar un gen posiblemente ortólogo de RIPs presente en *S. coelicolor* particularmente, aunque se den evidencias de la presencia de posibles homólogos en algunos otros miembros del género.

Los análisis bioinformáticos, BLAST, del ORF SC3A4.18 de *S. coelicolor*, mostraron la presencia del dominio RIP, consecuentes alineamientos realizados arrojaron similitud con RIPs conocidas del tipo I (Fig 12), las similitudes obtenidas resultaron aparentemente bajas por lo que es necesario enfatizar la conservación de 7 de los residuos implicados en el sitio activo de la ricina (Munishkin *et al.*, 1995). El grado de similitud con el sitio activo de la ricina (RIP mejor conocida y caracterizada) en conjunto con la similitud en el dominio RIP condujeron nuestro interés por el estudio de la actividad enzimática. Para esto era necesario su producción y purificación; sin embargo, la formación de cuerpos de inclusión en la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli*, representó un problema adicional por resolver. Y si bien esto es reflejado en el decremento del crecimiento de las células transformadas, no lo es la caída abrupta como se muestra en la curva de crecimiento de *E. coli* BL21(DE3)pLysS[pRIPSC] realizada (fig 19), lo que sugiere fuertemente la toxicidad de RIPSC para *E. coli*, sin embargo la falta de un experimento directo que demuestre la inhibición de los ribosomas de *E. coli*, en este momento no nos permite asegurarlo.

Por otro lado, debido a la formación de cuerpos de inclusión, la purificación de RIPSC representó un reto, por lo que arduos esfuerzos fueron hechos así como innumerables estrategias probadas sin éxito alguno, tales como, cromatografía de afinidad con anticuerpos específicos anti-RIP, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de filtración en gel y purificación nativa con las colas de histidina. De esta manera, y para lograr la obtención de RIPSC en forma nativa y una purificación eficiente se implementó el sistema de expresión heteróloga extracelular de *S. lividans* que es un sistema diseñado para la excreción de proteínas, pues cuenta con un plásmido construido con un péptido señal constitutivo, (pBSDK_{vsi}), lo que hace que al fusionar RIPSC a este péptido señal, ésta fácilmente excretada al medio. El uso del sistema de expresión de *S. lividans* nos permitió argumentar que al ser RIPSC excretada al medio, el aislamiento sería llevado a cabo fácilmente, pero tal como se muestra en los resultados (Fig 21) RIPSC fue detectada en muy baja concentración, cantidad

insuficiente para realizar una purificación adecuada. El hecho de obtener una concentración tan baja sugiere la toxicidad de RIPSC para el hospedero, por lo que dentro de esta conclusión resulta importante mencionar que los cultivos de las transformantes en *S. lividans* presentaron un crecimiento menor a la cepa nativa, hecho que refuerza la creencia de la toxicidad para el hospedero, aunque resultaría necesario un estudio más detallado para poder afirmar la propuesta.

Los fallidos intentos en la purificación de RIPSC fueron la razón por la que se implementó la técnica de renaturalización de proteínas descrita anteriormente. Las muestras obtenidas de la renaturalización (Fig. 20) fueron utilizadas para llevar a cabo las pruebas de actividad. Los ensayos *in Vivo* llevados a cabo para probar las actividades antifúngicas y antibacteriana resultaron totalmente negativos, hecho que se puede sostener debido a que la proteína en cuestión, RIPSC, según los análisis bioinformáticos pertenece al tipo I de la clasificación, lo que imposibilita su absorción por los hongos y bacterias. La toxicidad de RIPSC después de los experimentos realizados y discutidos hasta este momento, no se encontraba dilucidada en su totalidad por los muchos inconvenientes en la purificación, por lo que se optó por la implementación de un experimento de toxicidad en levaduras, el experimento consistió en clonar el gen *ripsc* bajo un promotor inducible por galactosa, tal como se observa en el reporte (Fig. 23.) la toxicidad de RIPSC determinada para levaduras es alta y detectable en dos diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Con este último experimento se demostró que la incapacidad de RIPSC en la inhibición del crecimiento de hongos y bacterias es debido, como se argumentaba en un principio, a la inhabilidad de la proteína para introducirse en los microorganismos probados, hecho que se podría resolver con la fusión de alguna lectina específica para la célula blanco que quiera ser tratada. Por otro lado, las muestras parcialmente purificadas obtenidas después de la renaturalización (Fig 20), fueron utilizadas en el análisis de actividad *in vitro* en el sistema de expresión libre de células de luciferasa con lisado de reticulito de conejo, dicho experimento ha sido utilizado como instrumento para determinar la actividad RIP (Barbieri *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2004), los resultados muestran una clara inhibición en la traducción de luciferasa cuando se agrega RIPSC (Fig 24), hecho que indica la clara inhibición en los ribosomas directamente. Este experimento nos ayuda a sugerir fuertemente que el decremento en el crecimiento sobre *E. coli* (Fig 19) es debido a la inhibición de los ribosomas por medio de la expresión de RIPSC. Nuestros resultados de actividad son comparables y de hecho similares a los obtenidos por Sang y colaboradores (2002), puesto que para la saponina se observa actividad en contra de los ribosomas aislados pero no así sobre los hongos crecidos en cajas.

La expresión de RIPSC nativa en *S. coelicolor* fue probada con la reacción transcriptasa reversa, RT-PCR bajo las condiciones descritas en la sección de materiales y métodos y bajo ninguna de las condiciones estudiadas fue detectada la expresión nativa de RIPSC por lo que se sugiere que la expresión de RIPSC podría ser llevada a cabo por medio de mecanismos de inducción, tal como sucede para algunas RIPs del tipo I (Iglesias *et al.*, 2005). Tomando en cuenta la naturaleza de RIPSC y los reportes existentes hasta el momento podría sugerirse que ésta es probablemente inducible por estrés biótico, específicamente por algún patógeno, hecho que

comprobaría la función de defensa de las RIPs propuesta hasta este momento. Por otro lado, resultaría interesante la evaluación de las condiciones bajo las cuales RIPSC es expresada pues hasta el momento, la función de este tipo de proteínas no ha sido elucidada en ninguno de los organismos en los que se encuentran, y el hallazgo de las condiciones para la expresión de RIPSC podría dar claves de su función en *S. coelicolor*. Además las condiciones bajo las cuales se estudio la expresión solo incluyen la fase de crecimiento y no así la idiofase, por lo que es necesario desarrollar un experimento con nuevas condiciones para el estudio de la expresión nativa.

Las evidencias mostradas hasta el momento nos hacen concluir que la secuencia en el ORF SC3A4.18 de *S. coelicolor* codifica para una Proteína Inactivadora de Ribosomas con actividad presumible sobre ribosomas procariontes y eucariontes. Es importante dejar claro que es necesario implementar nuevos experimentos para estudiar el mecanismo de acción de RIPSC así como su actividad en un amplio rango de organismos, además de la continuidad en la búsqueda por mejores técnicas de purificación con la finalidad de realizar estudios estructurales y poder entender así de una mejor manera su comportamiento, para ser capaces de proponer su uso en aplicaciones en medicina o agricultura.

Hasta el momento las pruebas presentadas en el trabajo, corresponden a las propuestas en los reportes existentes como imprescindibles para la demostración de la presencia de una RIP en cualquier organismo. Los ensayos *in Vivo* usados han sido útiles para estudiar la actividad antifúngica y antibacteriana de RIPs como la saponina y la ricina (Sang *et al.* 2002; Sharma *et al.*, 2004) y el ensayo *In Vitro* con el sistema de traducción libre de célula es, en todos los reportes de estudios de actividad, el más concurrido (Sharma *et al.*, 2004; Vandebussche *et al.*, 2004; Van Damme *et al.*, 2000; Barbieri *et al.*, 2006). De tal manera, ante todas las evidencias mostradas en el trabajo, se puede concluir que el gen SC3A4.18 (RIPSC) codifica una toxina del tipo RIP en un *Actinomiceto*, lo que se traduce en un nuevo campo de investigación para la especie más importante, hasta este momento, como modelo en la producción de metabolitos secundarios.

CONCLUSIONES

- El marco de lectura abierto SC3A4.18 de *S. coelicolor* codifica para una proteína tipo RIP activa; *In vitro* sobre ribosomas de conejo e *In vivo* sobre *Saccharomyces cerevisiae*.
- RIPSC pertenece al Tipo 1 de las RIPs debido a su incapacidad de introducirse en la célula

6. REFERENCIAS

1. 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.
2. Andersen, G.R., Nissen, P. y Nyborg, J. (2003) Elongation factors in protein biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 28, 434-441.
3. Anné J., Van Mellaert L. and Eysen H. (1990) Optimum conditions for efficient transformation of *Streptomyces venezuelae* protoplasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 431-435.
4. Anonymous, 1976. The Second Laboratory, Shanghai Inst. Exp. Biol., 1976. Studies on the mechanisms of abortion induction by Trichosanthin. *Scientia Sin.* 19, 811-827.
5. Au TK, Collins RA, Lam TL, Ng TB, Fong WP, Wan DC. The plant ribosome inactivating proteins luffin and saporin are potent inhibitors of HIV-1 integrase. *FEBS Lett* 2000; 471:169-72.
6. 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.
7. Barbieri, L., Battelli, M. G. and Stirpe, F. (1993) Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1154, 237-282.
8. Barbieri, L., Ferreras, J. M., Barraco, A., Ricci, P., and Stirpe, F. (1992) Some ribosome-inactivating proteins depurinate ribosomal RNA at multiple sites. *Biochem. J.* 286, 1-4
9. Barbieri, L., Gorini, P., Valbonesi, P., Castiglioni, P., and Stirpe, F. (1994) Unexpected activity of saporins. *Nature (London)* 372, 624
10. Barbieri, L., Valbonesi, P., Bondioli, M., Lugo Alvarez, M., Dal Monte, P., Landini, M.P., Stirpe, F., 2001. Adenine glycosylase activity in mammalian tissues: an equivalent of ribosome-inactivating proteins. *FEBS Lett.* 505, 196-197.

11. Barbieri, L., Valbonesi, P., Bonora, E., Gorini, P., Bolognesi, A., and Stirpe, F. (1997) Polynucleotide:adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A). *Nucleic Acids Res.* 25, 518–522
12. Barbieri, L., Valbonesi, P., Gorini, P., Pession, A., and Stirpe, F. (1996) Polynucleotide:adenosine glycosidase activity of saporin-L1: effect on DNA, RNA and poly(A). *Biochem. J.* 319, 507–513
13. Barbieri, L., Valbonesi, P., Govoni, M., Pession, A., and Stirpe, F. (2000) Polynucleotide:adenosine glycosidase activity of saporin L1: effect on various forms of mammalian DNA. *Biochim. Biophys. Acta* 1480, 258–266
14. Battelli MG, Polito L, Bolognesi A, Lafleur L, Fradet Y, Stirpe F. Toxicity of ribosome-inactivating proteins-containing immunotoxins to a human bladder carcinoma cell line. *Int. J. Cancer* 1996; 65:485–90.
15. Benigni, F., Canevari, S., Gadina, M., Adobati, E., Ferreri, A.J.M., Ferraris di Celle, E., Comolli, R., Colnaghi, M.I., 1995. Preclinical evaluation of the ribosome-inactivating proteins PAP-1, PAP-S and RTA in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* 17, 829–839.
16. Binnie C, Cossar JD, Stewart DIH: Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*. *Trends Biotechnol* 1997, 15:315-320.
17. Bolognesi A, Polito L, Tazzari PL *et al.*. In vitro anti-tumour activity of anti-CD80 and anti-CD86 immunotoxins containing type 1 ribosome-inactivating proteins. *Br J Haematol* 2000; 110:351–61.
18. Bolognesi A, Tazzari PL, Legname G *et al.*. Anti-CD30 immunotoxins with native and recombinant dianthin 30. *Cancer Immunol Immunother* 1995; 40:109–14.
19. 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.
20. Brigotti, M., Rambelli, F., Zamboni, M., Montanaro, L. y Sperti, S. (1989) Effect of α -sarcin and ribosome inactivating proteins on the interaction of elongation factors with ribosomes. *Biochem. J.* 257, 723-727.

21. Byers, V. S., Levin, A. S., Malvino, A., Waites, L. A., Robins, R. A. and Baldwin, R. W. (1994) A phase II study of effect of addition of trichosanthin to zidovudine in patients with HIV disease and failing antiretroviral agents. *AIDS Res. Human Retroviruses* 10: 413–420.
22. C. Vallin, E. Pimienta, A. Ramos, C. Rodríguez, L. V. Mellaert, J. Anné, Streptomyces as a host for the secretion of heterologous protein for the production of biopharmaceuticals, *J. Bussines Chemistry*, (2005), 107-110
23. Castelletti D, Fracasso G, Righetti S *et al.*. A dominant linear B-cell epitope of ricin A-chain is the target of a neutralizing antibody response in Hodgkin's lymphoma patients treated with an anti- CD25 immunotoxin. *Clin. Exp. Immunol.* 2004: 136:365–72.
24. Cenini P, Bolognesi A, Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins from plants inhibit ribosome activity of Trypanosoma and Leishmania. *J Protozool* 1988; 35:384–7.
25. 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.
26. 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.
27. Chaudhry, B., Muller-Uri, F., Cameron-Mills, V., Gough, S., Simpson, D., Skriver, K., Mundy, J., 1994. The barley 60 kDa jasmonate-induced protein (JIP60) is a novel ribosomeinactivating protein. *Plant J.* 6, 815–824.
28. Chen, Y., Peumans, W. J. and Van Damme, E. J. (2002) The *Sambucus nigra* type-2 ribosome-inactivating protein SNAI' exhibits in planta antiviral activity in transgenic tobacco. *FEBS Lett.* 516, 27–30.
29. Chu JY, Yang AD, Wang BM *et al.*. Monoclonal anti-human T cell antibody and PAP-s conjugate preparation and selective cytotoxic properties on leukemic cell. *J. Tongji Med. Univ.* 1990; 10:15–8.

30. Citores, L., Muñoz, R., De Benito, F. M., Iglesias, R., Ferreras, J. M. and Girbés, T. (1996) Differential sensitivity of HeLa cells to the type 2 ribosome-inactivating proteins ebulin 1, nigrin b and nigrin f as compared with ricin. *Cell. Mol. Biochem.* 42, 473–476.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. de Benito, F.M., Citores, L., Iglesias, R., Ferreras, J.M., Soriano, F., Arias, F.J., Méndez, E., Girbe's, T., 1995. Ebulitins: a new family of type 1 ribosome-inactivating proteins (rRNA N-glycosidases) from leaves of *Sambucus ebulus* L. that coexist with the type 2 ribosome-inactivating protein ebulin 1. *FEBS Lett.* 360, 299–302.
35. de Benito, F.M., Iglesias, R., Ferreras, J.M., Citores, L., Camafeita, E., Méndez, E., Girbe's, T., 1998. Constitutive and inducible type 1 ribosome-inactivating proteins (RIPs) in elderberry (*Sambucus nigra* L.). *FEBS Lett.* 428, 75–79.
36. Descotes, G., Romano, M., Stirpe, F., Spreafico, F., 1985. The immunological activity of plant toxins used in the preparation of immunotoxins II. The immunodepressive activity of gelonin. *Int. J. Immunopharmacol.* 7, 455–463
37. Endo, Y., Mitsui, K., Motizuki, M., and Tsurugi, K. (1987) The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28S ribosomal RNA caused by the toxins. *J. Biol. Chem.* 262, 5908–5912
38. Ferreras, J.M., Barbieri, L., Girbe's, T., Battelli, M.G., Rojo, M.A., Arias, F.J., Rocher, M.A., Soriano, F., Mende'z, E., Stirpe, F., 1993. Distribution and properties of major ribosome-inactivating proteins (28 S rRNA N-glycosidases) of the plant *Saponaria officinalis* L. (Caryophyllaceae). *Biochim. Biophys. Acta* 1216, 31–42.

39. Fornwald JA, Donovan MJ, Geber R, Keller J, Taylor DP, Arcuri EJ, Brawner ME: Soluble forms of the human T cell receptor CD4 are efficiently expressed by *Streptomyces lividans*. *Bio/Technology* 1993, 11:1031-1036
40. 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 α -sarcin. *Arch. Biochem. Biophys.* 293, 140-146.
41. Gietz R.D and Woods R.A. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* 350: 87-96.
42. Girbés, T., de Torre, C., Iglesias, R., Ferreras, J.M., Me´ndez, E., 1996. RIP for viruses. *Nature* 379, 777–778.
43. Girbés, T., Ferreras, J. M., Arias, F. J. and Stirpe, F. (2004) Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. *Mini Rev. Med. Chem.* 4, 461–476.
44. Glück, A. y Wool, I.G. (1996) Determination of the 28 S ribosomal RNA identity element (G4319) for α -sarcin and the relationship of recognition to the selection of the catalytic site. *J. Mol. Biol.* 256, 838-848.
45. Hao, Q., Van Damme, E.J., Hause, B., Barre, A., Chen, Y., Rouge´, P., Peumans, W.J., 2001. Iris bulbs express type 1 and type 2 ribosome-inactivating proteins with unusual properties. *Plant Physiol.* 125, 866–876.
46. Huang KC, Huang YY, Hwu L, Lin A. Characterization of a new ribotoxin gene (c-Sar) from *Aspergillus clavatus*. *Toxicon* 1997;350:383–92.
47. Huber, R., Rostock, M., Goedl, R., Ludtke, R., Urech, K., Buck, S. and Klein, R. (2005) Mistletoe treatment induces GM-CSF and IL-5 production by PBMC and increases blood granulocyte and eosinophil counts: a placebo controlled randomized study in healthy subjects. *Eur. J. Med. Res.* 10, 411–418.
48. Hudak, K. A., Dinman, J. D. and Tumer, N. E. (1999) Pokeweed antiviral protein accesses ribosomes by binding to L3. *J. Biol. Chem.* 274, 3859–3864.

49. Hudak, K. A., Wang, P., and Tumer, N. E. (2000) A novel mechanism for inhibition of translation by pokeweed antiviral protein: depurination of the capped RNA template. *RNA* 6, 369–380
50. Ippoliti, R., Lendaro, E., Belelli, A. and Brunori, M. (1992) A ribosomal protein is specifically recognized by saporin, a plant toxin which inhibits protein synthesis. *FEBS Lett.* 298, 145–148.
51. Kao, R. y Davies, J. (1995) Fungal ribotoxins: a family of naturally engineered targeted toxins? *Biochem. Cell Biol.* 73, 1151-1159.
52. Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F. and Hopwood D.A. (2000) Practical *Streptomyces* genetics. John Innes Foundation, Norwich.
53. Kim JH, Ju EM, Lee DK, Hwang HJ. Induction of apoptosis by momordin I in promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Anticancer Res* 2002; 22:1885–9.
54. Kumar, M. A., Timms, D. E., Neet, K. E., Owen, W. G., Peumans, W. J. and Rao, A. G. (1993) Characterization of the lectin from the bulbs of *Eranthis hyemalis* (winter aconite) as an inhibitor of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 268, 25176–25183.
55. Lam, S.K., Ng, T.B., 2001. First simultaneous isolation of a ribosome inactivating protein and an antifungal protein from a mushroom (*Lyophyllum shimeji*) together with evidence for synergism of their antifungal effects. *Arch. Biochem. Biophys.* 393, 271–280.
56. Lammertyn E, Anné J: Modifications of *Streptomyces* signal peptides and their effects on prior production and secretion. *FEMS Microbiol Lett* 1998, 160:1-10.
57. Lammertyn E. (2000) Isolation and characterisation of a novel subtilisin inhibitor gene from *Streptomyces venezuelae* and evaluation of its regulatory sequences for heterologous protein secretion by *Streptomyces lividans*. K.U.Leuven, Belgium. PhD thesis. pp 148.
58. 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
59. Lamy, B., Davies, J., and Schindler, D. (1992) *Genetically Engineered Toxins*, pp. 237–257, Marcel Dekker, New York.

60. 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 α -sarcin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1577, 53-62.
61. Legname G, Fossati G, Monzini N *et al.*. Heterologous expression, purification, activity and conformational studies of different forms of dianthin 30. *Biomed Pept Proteins Nucleic Acids* 1995; 1:61-8.
62. Li, X. D., Liu, W. Y. and Niu, C. I. (1996) Purification of a new ribosome-inactivating protein from the seeds of *Cinnamum porrectum* and characterization of the RNA N-glycosidase activity of the toxic protein. *Biol. Chem.* 377, 825–831.
63. Lin, J.-Y., Liu, K., Chen, C.-C., Tung, T.-C., 1971. Effect of crystalline ricin on the biosynthesis of protein, RNA, and DNA in experimental tumor cells. *Cancer Res.* 31, 921–924.
64. Liu A, Chen CK, d Chen YJ. Molecular action of tricholin, a ribosome-inactivating protein isolated from *Trichoderma viride*. *Mol Microbiol* 1991;5:3007–13.
65. 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.
66. Lodge, J. K., Kaniewski, W. K. and Tumer, N. E. (1993) Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7089–7093.
67. 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.
68. 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.
69. Maddaloni, M., Forlani, F., Balmas, V., Donini, G., Stasse, L., Corazzo, L., Motto, M., 1997. Tolerance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* AG4 of transgenic tobacco expressing the maize ribosome-inactivating protein b-32. *Transgenic Res.* 6, 393–401.

70. McGrath, M.S., Hwang, K.M., Caldwell, S.E., Gaston, I., Luk, K.-C., Wu, P., Mg, V.L., Crowe, S., Daniels, J., Marsh, J., Deinhart, T., Lekas, P.V., Vennari, J.C., Yeung, H.-W., Lifson, J.D., 1989. GLQ223: an inhibitor of human immunodeficiency virus replication in acutely and chronically infected cells of lymphocyte and mononuclear phagocyte lineage. *Proc. Natl Acad. Sci., USA* 86, 2844–2848.
71. 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.
72. Mehta K, Ocanas L, Malavasi F, Marks JW, Rosenblum MG. Retinoic acid-induced CD38 antigen as a target for immunotoxinmediated killing of leukemia cells. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 345–52.
73. Mellaert LV, Dillen C, Proost P, Sablon E, DeLeys R, Van Broekhoven A, Heremans H, Van Damme J, Eyssen H, Anné J: Efficient secretion of bioactive mouse tumor necrosis factor α by *Streptomyces lividans*. *Gene* 1994, 150:153-158.
74. 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.
75. 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.
76. 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
77. Montfort, W., Villafranca, J. E., Monzingo, A. F., Ernst, S. R., Katzin, B., Rutenber, E., Xuong, N. H., Hamlin, R., and Robertus, J. D. (1987) Three-dimensional structure of ricin at 2.8 Å. *J. Biol. Chem.* 262, 5398–5403
78. Mundy J, Leah R, Boston R, Endo Y, Stirpe F. (1994). Genes encoding ribosome-inactivating proteins. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12:S60–62
79. Munishkin, A. and Wool, I.G. 1995. Systematic deletion analysis of ricin A chain function. *J Biol Chem*, 270 (51), 30581-30587.

80. Ng, T.B., Chan, W.Y., Yeung, H.W., 1992. Proteins with abortifacient, ribosome inactivating, immunomodulatory, antitumor and anti-AIDS activities from Cucurbitaceae plants. *Gen. Pharmacol.* 23, 575–590.
81. Nielsen, K. and Boston, R. S. (2001) Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 785–816.
82. 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.
83. Olsnes, S. and Pihl, A. (1973) Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. *Biochemistry* 12, 3121–3126.
84. Olson MC, Ramakrishnan S, Anand R. Ribosomal inhibitory proteins from plants inhibit HIV-1 replication in acutely infected peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1991; 7:1025–30.
85. Parikh, B. A. and Tumer, N. E. (2004) Antiviral activity of ribosome inactivating proteins in medicine. *Mini Rev. Med. Chem.* 4, 523–543.
86. Park, S.W., Stevens, N.M., Vivanco, J.M., 2002. Enzymatic specificity of three ribosome-inactivating proteins against fungal ribosomes, and correlation with antifungal activity. *Planta* 216, 227–234.
87. 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.
88. Pincus SH, Wehrly K, Cole R *et al.*. In vitro effects of anti-HIV immunotoxins directed against multiple epitopes on HIV type 1 envelope glycoprotein 160. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12:1041–51.
89. Poccia F, Piselli P, Di Cesare S *et al.*. Recognition and killing of tumour cells expressing heat shock protein 65 kD with immunotoxins containing saporin. *Br J Cancer* 1992; 66:427–32.
90. Rajamohan, F., Kurinov, I. V., Venkatachalam, T. K., and Uckun, F. M. (1999) Deguanlylation of human immunodeficiency virus (HIV)-1 RNA by recombinant pokeweed antiviral protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263, 419–424
91. Ramakrishnan, V. (2002) Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* 108, 557-572.

92. Rippmann, J.F., Michalowski, C.B., Nelson, D.E., Bohnert, H.J., 1997. Induction of a ribosome-inactivating protein upon environmental stress. *Plant Mol. Biol.* 35, 701–709.
93. Rodnina, M.V. y Wintermeyer, W. (2003) Peptide bond formation on the ribosome: structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 334-340.
94. 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.
95. Rosenblum MG, Marks JW, Cheung LH. Comparative cytotoxicity and pharmacokinetics of antimelanoma immunotoxins containing either natural or recombinant gelonin. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 44:343–8.
96. S. D. Bentley, K. F. Chater, A.-M. Cerden˜ o-Ta' rraga, G. L. Challis, N. R. Thomson, K. D. James, D. E. Harris, M. A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C. W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C.-H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabinowitsch, M.-A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B. G. Barrell, J. Parkhill y D. A. Hopwood. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) *Nature*. 417: 141-147.
97. Salvarelli S, Munoz S, Conde FP. Purification and characterization of a ribosome inactivating protein from *Aspergillus giganteus* IF 5818, the gigantins. Immunological and enzymic comparison with α -sarcin. *Eur J Biochem* 1994;225:243–51.
98. Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
99. 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.
100. 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.

101. Sharma, N., Park, S.-W., Vepachedu, R., Barbieri, L., Ciani, M., Stirpe, F., Savary, B. J. and Vivanco, J. M. (2004) Isolation and characterization of an RIP (ribosome-inactivating protein)-like protein from tobacco with dual enzymatic activity. *Plant Physiol.* 134, 171–181.
102. Shaw, P. C., Lee, K. M. and Wong, K.-B. (2005) Recent advances in trichosanthin, a ribosome-inactivating protein with multiple pharmacological properties. *Toxicon* 45, 683–689.
103. 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.
104. Spreafico, F., Malfiore, C., Moras, M.L., Marmonti, L., Filippeschi, S., Barbieri, L., Perocco, P., Stirpe, F., 1983. The immunomodulatory activity of the plant proteins *Momordica charantia* inhibitor and pokeweed antiviral protein. *Int. J. Immunopharmacol.* 5, 335–344.
105. Steitz, T.A. y Moore, P.B. (2003) RNA, the first macromolecular catalyst: the ribosome is a ribozyme. *Trends Biochem. Sci.* 28, 411-418.
106. Stirpe, F. (2004) Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon* 44, 371–383.
107. Stirpe, F. y Battelli, M.G., (2006). Ribosome-inactivating proteins :progress and problems. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 1850–1866.
108. Stirpe, F., Barbieri, L., Gorini, P., Valbonesi, P., Bolognesi, A., Polito, L., 1996. Activities associated with the presence of ribosome-inactivating proteins increase in senescent and stressed leaves. *FEBS Lett.* 382, 309–312.
109. Stirpe, F., Olsnes, S., Pihl, A., 1980. Gelonin, a new inhibitor of protein synthesis, nontoxic to intact cells. Isolation, characterization, and preparation of cytotoxic complexes with concanavalin A. *J. Biol. Chem.* 255, 6947–6953.
110. Strocchi, P., Barbieri, L., Stirpe, F., 1992. Immunological properties of ribosome-inactivating proteins and of a saporin-IgG conjugate. *J. Immunol. Methods* 155, 57–63.
111. Studier F., Rosenberg A., Dunn J. and Dubendorff J. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185: 60-99.

112. Szatrowski TP, Dodge RK, Reynolds C *et al.*. Lineage specific treatment of adult patients with acute lymphoblastic leukemia in first remission with anti-B4-blocked ricin or high-dose cytarabine: Cancer and Leukemia Group B Study 9311. *Cancer* 2003; 97: 1471–80.
113. Szewczak, A.A. y Moore, P.B. (1995) The sarcin/ricin loop, a modular RNA. *J. Mol. Biol.* 247, 81-98.
114. 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.
115. Terao, K., Uchiumi, T., Endo, Y., Ogata, K. (1988) Ricin and α -sarcin alter the conformation of 60S ribosomal subunits at neighboring but different sites. *Eur. J. Biochem.* 174, 459-463.
116. Terenzi A, Bolognesi A, Pasqualucci L *et al.*. Anti-CD30 (BER5H2) immunotoxins containing the type-1 ribosome-inactivating proteins momordin and PAP-S (pokeweed antiviral protein from seeds) display powerful antitumour activity against CD30⁺ tumour cells in vitro and in SCID mice. *Br J Haematol* 1996; 92:872–9.
117. Thorpe, S. C., Kemeny, D. M., Panzani, R. and Lessof, M. H. (1988) Allergy to castor bean. I. Its relationship to sensitization to common inhalant allergens (atopy). *J. Allergy Clin. Immunol.* 82, 62–66.
118. Thorpe, S. C., Murdoch, R. D. and Kemeny, D. M. (1989) The effect of castor bean toxin, ricin, on rat IgE and IgG responses. *Immunology* 68, 307–311.
119. Tumer, N.E., Hudak, K., Di, R., Coetzer, C., Wang, P., Zoubenko, O., 1999. Pokeweed antiviral protein and its applications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240, 139–158.
120. 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.
121. 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.
122. 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.

123. 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 cryoelectron microscopy. *Nat. Struct. Biol.* 10, 899-906.
124. Van Damme, E.J.M., Hao, Q., Barre, A., Vandenbussche, F., Desmyter, S., Rouge', P., Peumans, W.J., 2001. Ribosome-inactivating proteins: a family of plant proteins that do more than inactivate ribosomes. *Crit. Rev. Plant Sci.* 20, 395–465.
125. Van Mellaert L., Dillen C., Proost P., Sablon E., Deleys R., Van Broekhoven A., Heremans H., Van Damme J., Eysen H and Anné J. (1994) Efficient secretion of biologically active mouse tumor necrosis factor alpha by *Streptomyces lividans*. *Gene* 150: 153-158.
126. Voss, C., Eyol, E. and Berger, M. R. (2005) Identification of potent anticancer activity in *Ximenia americana* aqueous extracts used by African traditional medicine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211, 177–187.
127. Wang HX, Ng TB. 2000. Flammulin: a novel ribosome-inactivating protein from fruiting bodies of the winter mushroom *Flammulina velutipes*. *Biochem Cell Biol*;78:1–4.
128. Wang HX, Ng TB. Isolation of pleuturegin, a novel ribosome-inactivating protein from fresh sclerotia of the edible mushroom *Pleurotus tuber-regium*. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:718–21.
129. Ward J., Janssen G., Kieser T., Bibb M., Buttner M. and Hopwood D.A. (1986). Construction and characterisation of a series of multi-copy promoter-probe plasmid vectors for *Streptomyces* using aminoglycoside phosphotransferase gene from Tn5 as indicator. *Mol. Gen. Genet.* 203: 468-478.
130. Wiley RG, Kline IR. Neuronal lesioning with axonally transported toxins. *J Neurosci Methods* 2000; 103:73–82.
131. 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.
132. Yamasaki, C., Nishikawa, K., Zeng, X. T., Katayama, Y., Natori, Y., Komatsu, N., Oda, T. and Natori, Y. (2004) Induction of cytokines by toxins that have an identical RNA N-glycosidase activity: Shiga toxin, ricin, and modeccin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1671, 44–50.

133. 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.
134. Yao, Q.-Z., Yu, M.M., Ooi, L.S.M., Ng, T.B., Chang, S.T., Sun, S.S.M., Ooi, V.E.C., 1998. Isolation and characterization of a type 1 ribosome-inactivating protein from fruiting bodies of the edible mushroom (*Volvariella volvacea*). *J. Agric. Food Chem* 46, 788–792.
135. Yeung, H.W., Li, W.W., Feng, Z., Barbieri, L., Stirpe, F., 1988. Trichosanthin, a-momorcharin and b-momorcharin: identity of abortifacient and ribosome-inactivating proteins. *Int. J. Pept. Protein Res.* 31, 265–268.
136. Zamboni, M., Brigotti, M., Rambelli, F., Montanaro, L., and Sperti, S. (1989) High-pressure-liquid-chromatographic and fluorometric methods for the determination of adenine released from ribosomes by ricin and gelonin. *Biochem. J.* 259, 639–643
137. Zarling, J.M., Moran, P.A., Haffar, O., Sias, J., Richman, D., Spina, C.A., Myers, D.E., Kubelbeck, V., Ledbetter, J.A., Uckun, F.M., 1990. Inhibition of HIV replication by pokeweed antiviral protein targeted to CD4 β cells by monoclonal antibodies. *Nature* 347, 92–95.
138. 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.
139. Zheng, S.S., Wai, W.L., Hin, W.Y., Wu, A.R., 1991. Kinetics of IgE antibody response to trichosanthin, a-momorcharin and bmomorcharin in mice. *Chin. Med. J.* 104, 292–299.

Iztapalapa, D.F. a 06 de febrero de 2008

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

“Proteína Inactivadora de los Ribosomas de *Streptomyces coelicolor*”

Que presentó

I.B.Q. Ana Gisela Reyes Alvarado

Comité Tutorial:

Dr. Armando Mejía Alvarez (Director)

Prof. Jozef Anné (Asesor)

Dr. Nick Geukens (Asesor)

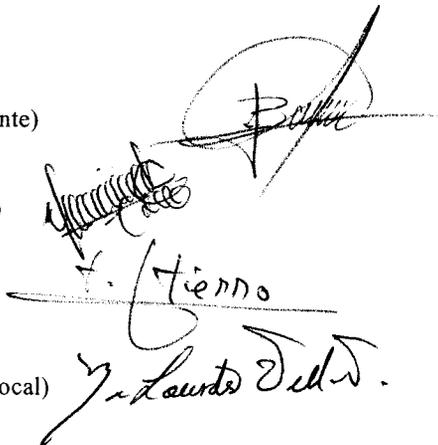
Jurado:

Dr. Javier Barrios González (Presidente)

Dr. Octavio Loera Corral (Secretario)

Dr. Francisco Fierro Fierro (Vocal)

Dra. Ma. De Lourdes Villa Tanaca (Vocal)



The image shows four handwritten signatures in black ink, each written over a horizontal line. From top to bottom, the signatures correspond to the names listed in the text: Javier Barrios González, Octavio Loera Corral, Francisco Fierro Fierro, and Ma. De Lourdes Villa Tanaca. The signatures are stylized and cursive.