



**“Función y aplicación biotecnológica de una Proteína
Inactivadora de los Ribosomas de *Streptomyces coelicolor*”**

TESIS

Para obtener el grado de
Doctora en Biotecnología

PRESENTA

M. en B. Ana Gisela Reyes Alvarado

DIRECTOR

Dr. Armando Mejía Álvarez

Septiembre 2012

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”

México D.F. a 20 de Septiembre del 2012

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

**“Función y aplicación biotecnológica de una Proteína Inactivadora de los
Ribosomas de *Streptomyces coelicolor*”**

Que presentó

M. en B. Ana Gisela Reyes Alvarado

Comité Tutorial:

Director: Dr. Armando Mejía Álvarez

Asesor: Dr. Jozef Anné

Asesor: Dr. Javier Barrios González

Jurado:

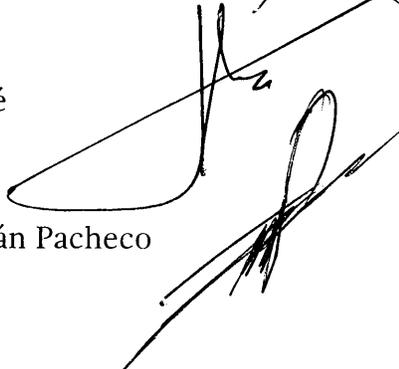
Presidente: Dr. Javier Barrios González



Secretario: Dr. Sergio Sánchez Esquivel



Vocal: Dr. Jozef Anné



Vocal: Dr. Cesar Millán Pacheco



*Qué suerte he tenido de nacer,
para estrechar la mano de un amigo.
y poder asistir como testigo.
al milagro de cada amanecer.*

*Qué suerte he tenido de nacer,
para callar cuando habla el que más sabe.
aprender a escuchar, esa es la clave,
si se tiene intenciones de saber.*

*Qué suerte he tenido de nacer,
para tener acceso a la fortuna.
de ser río en lugar de ser laguna,
de ser lluvia en lugar de ver llover.*

AGRADECIMIENTOS

“Gracias a la vida que me ha dado tanto...”

Violeta Parra

El camino ha sido largo y finalmente hemos llegado a la meta, nada habría sido posible de no ser por la presencia de todas las personas que se cruzaron conmigo, de las personas que permanecen conmigo, de las personas que han pasado de largo dejándome grandes regalos, y de las personas que sin saberlo han participado en este gran logro. Las palabras no alcanzan.

Gracias a mi familia, que jamás me abandona, que me anima, me soporta y ríe y llora conmigo. A mi mamita Dulce, por su ejemplo y sus consejos, por su fortaleza e inteligencia. A mi papi Sergio, por enseñarme que las decisiones forjan el carácter y que la felicidad depende de nuestra actitud. A mis hermanas Dana y Dulce, por ser mis amigas incondicionales. A mis sobrinas Fo y Jo por la inspiración e inocencia que me comparten. A mis cuñados, por integrarse a esta gran familia y compartir nuestras aventuras. A mis abuelos por tanta sabiduría. A todos mis tíos por los momentos, consejos y enseñanzas compartidos en especial a mi tío Oscar por ser nuestro soporte en las temporadas de dificultad y a mi tía Eloísa por apoyarnos siempre. A mis tíos Hugo y Lisi por abrirme las puertas de su casa, por las pláticas filosóficas y los consejos necesarios. A mis tíos Martha y José Luis por su hospitalidad y ayuda. A todos mis primos, por tanta diversión y momentos felices. A mis padrinos Moy y Malena por ser mis segundos padres.

Gracias a Yilmar, por ser mi mejor amigo y gran amor, por enseñarme que el amor es libertad y que trasciende las fronteras, por compartir cada uno de mis logros y fracasos y por caminar conmigo sin rendirse a pesar de todas las adversidades, por ser el hombro que me sostiene y el pañuelo que seca mis lágrimas, por animarme a continuar y por soportar mis peores momentos.

Gracias a mis grandes maestros, a ellos que han puesto en mi el conocimiento e inspiración para seguir en el camino de la ciencia. Al Dr. Armando Mejía por creer en mi, animarme, conducirme, corregirme y motivarme pero sobre todo por ser un excelente amigo. Al Dr. Jozef Anné por recibirme en su laboratorio en Leuven y por ser parte de mi crecimiento profesional. Al Dr. Nick Geukens por su tiempo y dedicación en mi entrenamiento durante la estancia en Leuven. Al Dr.

Javier Barrios por sus atinadas observaciones y enseñanzas y por transmitirme tanta paz y seguridad. Al Dr. Cesar Millán por colaborar de manera tan activa en mi trabajo y mejorarlo. Al Dr. Sergio Sánchez por las correcciones hechas, su tiempo y dedicación. A la Dra. Alejandra Serrato por su paciencia y colaboración. Al Dr. Luis Servín y a la Maestra Gaby González por abrirme las puertas de su laboratorio y colaborar para lograr mejores resultados en mi trabajo. Al Dr. Monroy por ser mi ejemplo, por su apoyo, buenos consejos y motivación. A cada uno de los doctores y maestros que participaron en mi formación, compartiendo conocimiento y experiencia. Gracias a ustedes soy una mujer enamorada de la ciencia.

Gracias a mis amigos y compañeros, por hacer la carga más ligera, por compartir la vida y por estar siempre para mí. A Carla Arteaga por ser mi mejor amiga y dejarme ser quién soy, por estar siempre dispuesta a pasar los mejores momentos, por nuestras largas pláticas filosóficas, por nuestros viajes y por nuestras aventuras. A Rebeca por todos los años compartidos, por ser incondicional y por sus consejos. A Vicky por demostrarme que no es necesario creer las mismas cosas para poder ser grandes amigas y por pasar tanto tiempo conmigo en el laboratorio. A Marisol por enseñarme a aprender. A Omar por su colaboración en mi trabajo, por los argumentos sin sentido tan divertidos compartidos. A Rox y a Olivia por zumbear con tantos ánimos y por ser mis amigas saludables. A Tere por las alegrías que hicieron el tiempo en el laboratorio más placentero. A Hugo por mostrarme que el trabajo constante y la dedicación dan grandes frutos. A todos mis compañeros del laboratorio y de la UAM que estuvieron siempre ahí compartiendo y viviendo las pasiones por la ciencia. A mi equipo de natación por animarme a seguir en los entrenamientos, por nuestros viajes, competencias juntos, y por esas fiestas tan divertidas, a Maggie, Ursula, Marisa, Eddie, George, Fausto, Ordoñez, Zenteno, Martha, Lalo, Capi, las Maya, el Deivid, Lupita, Chistian, Lula y por supuesto a mi coach Gerardo. A mis roomies, Karla Tercero, Mary y Jenny por convivir, por las pláticas y por ser tan buenas amigas.

Gracias a mis compañeros y amigos de Química Agronómica de México, a Miguel Alvarado, al Sr. Amaya, Cristy, Martín, Vivi, Claudia, Laura, Susy, Víctor, Charo, Mayté, Javi, Lalo, Luis, Raúl, a todos los compañeros de las oficinas, por la oportunidad de trabajar con ustedes, por conocerlos, por su hospitalidad, por abrirme las puertas de su ciudad y su empresa, por hacerme parte de su gran equipo. Gracias a mis nuevos amigos chihuahuenses, Ana Karen, Diana, Susy, Claudia, Antonia, Ricky y Carito, Laura y Jorge, por hacer de este desierto un lugar habitable y divertido.

Gracias, infinitas gracias a todas y cada una de las personas que han hecho de mi lo que ahora soy, no existen las palabras adecuadas para expresar las emociones que se anidan en mi por la llegada de este momento, sin ustedes nada de esto sería posible y se los debo, espero pagar aunque sea un poco de todo lo que me han dado, por el momento les digo...

...GRACIAS!!!

INDICE

A. Abreviaturas	X
1. Resumen/Abstract	13
2. Introducción	15
2.1 Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas (RIPs)	16
2.2 Las RIPs y sus diferentes actividades enzimáticas	23
2.3 Distribución de las RIPs en la naturaleza	26
2.4 RIPs de Bacterias	27
2.5 Función de las RIPs en el organismo productor	29
2.6 Aplicación biotecnológica de las RIPs	30
3. Antecedentes	33
3.1 <i>Streptomyces coelicolor</i> y su RIP hipotética	34
3.2 Péptidos bioactivos y su uso en la aplicación biotecnológica de las RIPs	37
3.3 Fusión de péptidos bioactivos	39
4. Justificación	42
5. Hipótesis y objetivos	46
6. Materiales y Métodos	49
6.1 Cepas y condiciones de cultivo	50
6.2 Medios de cultivo	51
6.3 Plásmidos y construcciones	53
6.4 Oligonucleótidos	57
6.5 Análisis <i>in silico</i> de la estructura y actividad de la RIP hipotética de <i>Streptomyces coelicolor</i>	57
6.6 Manipulación de ADN	59
6.7 Manipulación de ARN	61
6.8 Manipulación de Proteínas	64
7. Resultados	66
7.1 Análisis <i>in silico</i> de la estructura y actividad de la RIP hipotética de <i>Streptomyces coelicolor</i>	67
7.2 Determinación de la actividad N-Glicosidasa de RIPsc	76
7.3 Estudio de la expresión del gen <i>ripsc</i>	78

7.3.1 Estudio de la transcripción del gen <i>ripsc</i> por medio de RT-PCR, Northern-blot y qRT-PCR	79
7.3.2 Estudio de la traducción de RIPsc por medio de la fusión del gen reportero <i>egfp</i>	88
7.4 Aplicación biotecnológica de RIPsc en la industria agroquímica	97
7.4.1 Fusión del péptido (PEP32) en el extremo amino terminal de RIPsc	98
7.4.2 Fusión del péptido (PEP32) en el extremo carboxilo terminal de RIPsc	102
8. Discusión	106
9. Conclusiones	114
10. Perspectivas	116
11. Referencias	119
12. Anexos	128
12.1 Artículo 1. <i>Streptomyces coelicolor</i> genome encodes a type 1 Ribosome Inactivating Protein	
12.2 Artículo 2. Ribosome-inactivating proteins with an emphasis on bacterial RIPs and their potential medical applications	
B. Índice de Figuras	CXXVIII
C. Índice de Tablas	CXXX

A. ABREVIATURAS

μg	microgramos	ARN	Ácido Ribonucleico
μl	microlitro	rpm	Revoluciones por minuto
°C	Grados centígrados	Rv	Oligo <i>reverse</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico	RIP	Proteína Inactivadora de los Ribosomas
amp^R	Ampicilina	RIPsc	RIP de <i>Streptomyces coelicolor</i>
AMPs	Péptidos Antimicrobianos	PAP	<i>Pokeewed Antiviral Protein</i>
CM	Cloranfenicol	rARN	ARN ribosomal
dNTPs	desoxirribonucleótidos trifosfato	SRL	Horquilla sarcina/ricina
DO	densidad óptica	EF-1	Factor de elongación 1
Fw	Oligo <i>forward</i>	GTP	Guanosina Trifosfato
H	horas	EF-Tu	Factor de elongación termo inestable
IPTG	Isopropil tio β D Galactosido	EF-G	Factor de Elongación G (translocasa)
kDa	Kilodaltones	qRT-PCR	PCR en tiempo real
L	Litro	RT-PCR	PCR de transcripción reversa
LB	Luria-Bertani	EF-2	Factor de elongación 2
Mg	miligramos	HPLC	Cromatografía Líquida de alta resolución
Min	minutos	PEPRIP	Fusión de péptido 32 con RIPsc
ml	Mililitros	RIPEP	Fusión de RIPsc con péptido 32
mM	Milimolar	Stx	Shiga Toxina
M	Molar	TMV	Mosaico Viral de Tabaco
Ns	Nanosegundos		
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa		

VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana	ADE	Adenina
CPPs	Péptidos de penetración celular	GUA	Guanina
ΔG	Energía Libre de Gibbs	RT	Transcripción reversa
EGFP	Proteína Verde Fluorescente	Sec	Segundos
DEPC	Dietil pirocarbonato	cADN	ADN complementario
rpoA	Sub-unidad Alfa de la ARN polimerasa de <i>S. coelicolor</i>	mARN	ARN mensajero
PDB ID	Identificación de la Base de Datos de Proteínas	P32	Isótopo de Fosforo 32
RMSD	Desviación de la media cuadrática	nm	Nanómetros
PDB	Base de datos de Proteínas	ps	Picosegundos
		DMSO	Dimetilsulfoxido

1

RESUMEN/ABSTRACT

*“Quien no haya experimentado la irresistible
atracción de la ciencia,
no podrá comprender su tiranía.”*

Frankenstein. Mary Shelley

Las Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas (RIPs), son enzimas con actividad N-glicosidasa que actúan removiendo una adenina específica de la subunidad mayor del ribosoma, interrumpiendo la síntesis proteica y causando la muerte celular. El descubrimiento de las RIPs ha sido motivo de múltiples trabajos de investigación que pretenden demostrar la función de este tipo de proteínas en el organismo productor, dicha investigación ha costado hasta ahora más de 100 años sin lograr el esclarecimiento total del rol desempeñado por las RIPs. Por tal circunstancia aun sigue abierta la posibilidad de proponer y demostrar hipótesis de su función. Además, aunque las RIPs son características de las plantas, actualmente existe un incremento constante en el hallazgo de nuevas RIPs en diversos organismos que van desde bacterias hasta tejidos animales. Este hecho hace necesaria la razón de su prevalencia y ubiquidad en la naturaleza. Por otro lado, la actividad enzimática tan específica y letal de las RIPs, las hace ser atractivas en aplicaciones biotecnológicas tanto en medicina como en agricultura pues con ellas pueden diseñarse inmunotoxinas y conjugados en contra de células indeseables.

Por su parte, los actinomicetos son bacterias gram-positivas aisladas del suelo, con alta capacidad en la síntesis de compuestos de interés industrial; su capacidad de producción hace que la búsqueda de nuevos metabolitos en dicha especie sea blanco importante para la investigación. Recientemente, nuestro grupo encontró dentro del genoma de *Streptomyces coelicolor* un gen con similitud a las RIPs de plantas. Este gen ha sido estudiado y caracterizado a lo largo del presente trabajo. Los resultados obtenidos indican que el genoma de *S. coelicolor* codifica una Proteína Inactivadora de los Ribosomas, denominada RIPsc, con actividad N-glicosidasa sobre ribosomas procariontes y eucariontes. De manera adicional, también se ha analizado la posible función de RIPsc para *S. coelicolor* por medio del estudio de su expresión en niveles de transcripción y traducción. Y finalmente, se propone una estrategia novedosa para la aplicación de RIPsc en la agricultura por medio del diseño y producción heteróloga de conjugados específicos contra diversos fitopatógenos.

*"Anyone who has not experienced
the irresistible attraction of science,
cannot understand his tyranny."*

Frankenstein. Mary Shelley

Ribosome Inactivating Proteins are enzymes with N-glycosidase activity. They act by removing a specific adenine from the major subunit of the ribosomes, thus preventing protein synthesis and causing cell death. Their discovery stimulated to initiate many research projects looking for example to identify the importance of these proteins for the producer organism. Despite many efforts, the function of RIPs remains unclear. Due to that, several speculations and assumptions appeared. Most RIPs have been found in plants, but also in various other organisms, from bacteria to animal tissues, new RIPS have been and are still being detected. As such it remains intriguing to find the reason for the prevalence and ubiquity of RIPs in nature. On the other hand, the lethal and specific activity of RIPs is attractive for biotechnological applications in medicine and agriculture. They can be used to develop immunotoxins and conjugates against specific targets as pathogens and cancer cells.

Actinomycetes are Gram-positive soil bacteria. Several species are of major industrial importance as they have the capacity to synthesize industrially interesting compounds such as antibiotics and enzymes. As they have the capacity to produce many metabolites, new metabolites produced by these species are still sought. Recently, our group found in *Streptomyces coelicolor* genome a gene homologous to plant RIPs genes. This gene has been studied and characterized during the present work. The results show that *S. coelicolor* genome encodes a type 1 ribosome inactivating protein, nominated RIPsc, with N-glycosidase activity on both prokaryote and eukaryote ribosomes. Additionally, we looked for the possible function of RIPsc by analyzing its expression at transcription and translation level. Finally, we propose a novel strategy for RIPsc application to agriculture by the design of a heterologous production of specific conjugates against different phytopathogens

2

INTRODUCCIÓN

“Hermoso es lo que vemos.
 Más hermoso es lo que sabemos.
 Pero mucho más hermoso es
 lo que no conocemos”
 Niels Steensen

2.1 PROTEÍNAS INACTIVADORAS DE LOS RIBOSOMAS (RIPs)

Las Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas (RIPs) son proteínas con actividad N-glicosidasa causantes de la liberación de una adenina (A) de la estructura ribosomal, dicha actividad se lleva a cabo, por medio de la escisión de un enlace glicosídico (N-C) específico presente en la región conservada del ARN ribosomal (rARN) denominada horquilla sarcina/ricina (Sarcin-Ricin Loop o SRL), ubicada en la subunidad grande de los ribosomas de todos los organismos (Figura 1). Esta SRL es una estructura muy característica del ribosoma, y resulta clave para su funcionalidad. El nombre de esta región del rARN (SRL, sarcin/ricin loop), se debe a que ya que es el sitio de acción de la ricina y la α -sarcina, dos de las toxinas más potentes, tan potentes que incluso la primera ha sido empleada en el diseño de armas biológicas (DaSilva *et al.*, 2003). La actividad N-glicosidasa de las RIPs sobre los ribosomas provoca su inactivación con la consecuente pérdida de síntesis proteica derivando en la muerte celular.

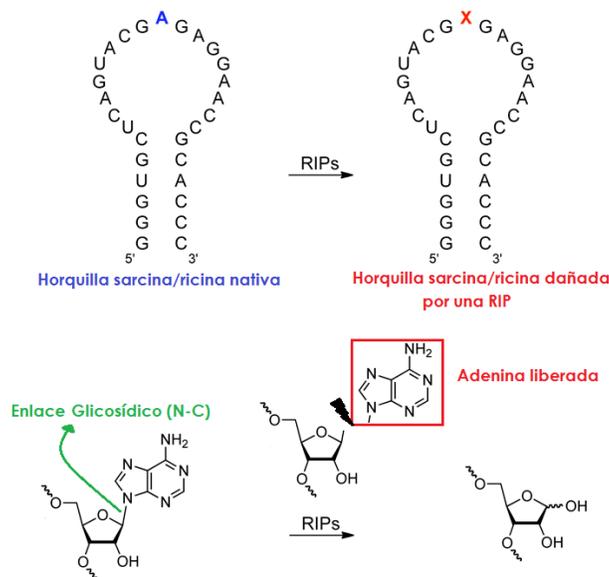


Figura 1. Actividad N-Glicosidasa de las RIPs sobre la horquilla sarcina/ricina de la sub-unidad mayor de los ribosomas. (Figura modificada de Tor y Xie, 2009)

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 es la inhibición de la síntesis de proteínas de la célula sobre la que actúan, al ser este corte suficiente 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.

Actualmente, las RIPs de plantas son las mejor caracterizadas debido a que fueron las primeras en ser descubiertas. Sin embargo, existen reportes que demuestran su presencia en hongos, bacterias y tejidos animales (Barbieri *et al.*, 2001). La prevalencia de las RIPs en la naturaleza sugiere que estas poseen un rol evolutivamente ventajoso para el organismo productor que justifica su conservación (Stirpe, 2004). Originalmente, las RIPs fueron clasificadas en tres grupos en base a sus propiedades físicas, tipo 1, 2 y 3. Las RIPs del tipo 1 son proteínas monoméricas de aproximadamente 30 000 kDa con actividad N-glicosidasa, las RIPs del tipo 2 están constituidas por dos cadenas, la cadena A con actividad N-glicosidasa ligada a la cadena B con propiedades de lectina y las del tipo 3 que son sintetizadas como precursores inactivos (proRIPs) y necesitan procesos proteolíticos entre los aminoácidos que forman el sitio activo antes de tener actividad N-glicosidasa (Hey *et al.*, 1995). Sin embargo, debido a que una vez que son procesadas poseen la misma capacidad enzimática que las RIPs del tipo 1, se sugiere incluirlas en tal grupo, teniendo finalmente dos grandes grupos RIPs del tipo 1 y RIPs del tipo 2 (Peumans *et al.*, 2001). (Figura 2).

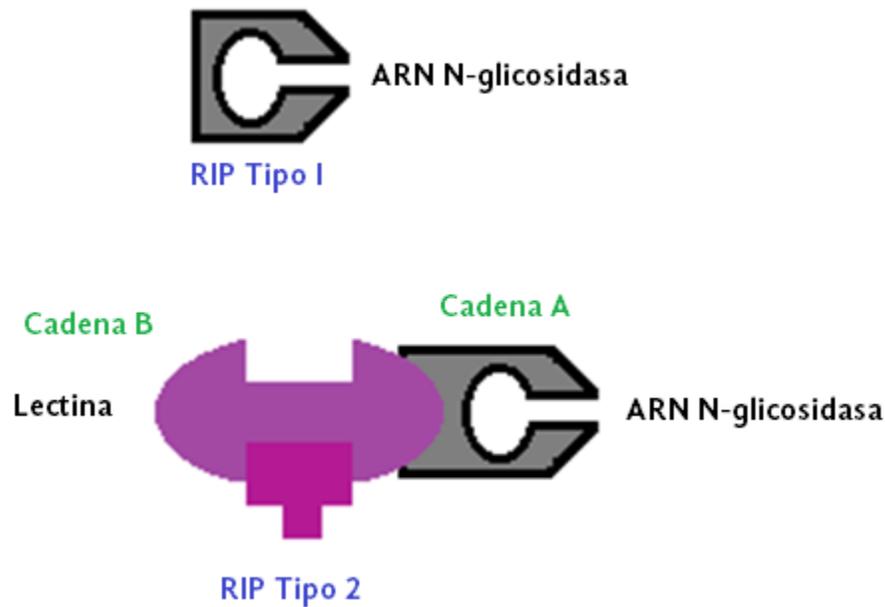


Figura 2. Clasificación de las Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas (RIPs). (Figura modificada de Lu *et al.*, 2004).

Una comparación entre las secuencias de los tipos de RIPs revela fuerte similitud entre las RIPs del tipo 1 con las cadenas A y 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. Lo anterior, sugiere que la preservación de la región central en la estructura de las RIPs es la responsable de la prevalencia de las actividades debidas a esta zona entre todos los tipos de RIPs y presumiblemente las actividades que no se conservan son debidas a la variación en la región C-terminal (Van Damme *et al.*, 2001).

La estructura cristalizada de la ricina fue la primera estructura tridimensional conocida de una RIP (Figura 3). 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).

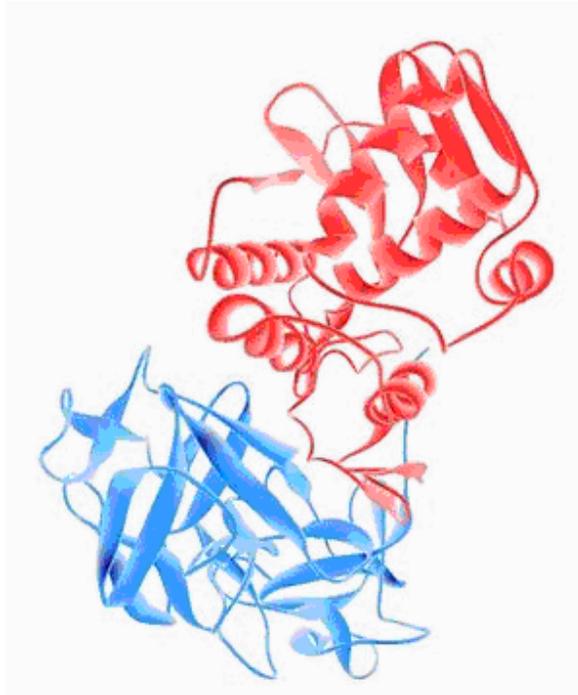


Fig. 3 Estructura terciaria de la ricina. En rojo se muestra la cadena A, correspondiente al dominio N-glicosilasa, en azul se muestra la cadena B, correspondiente al dominio lectina. Figura tomada de Yang *et al.*, 2001

Hasta ahora, han sido reportadas las estructuras cristalizadas de al menos siete RIPs del tipo 1 y tres del tipo 2. En general, la estructura terciaria de diferentes RIPs es muy conservada, aunque existen algunas diferencias, especialmente en la región carboxilo-terminal y en la superficie estructural de las horquillas. Estas diferencias han sido propuestas como las responsables de las distintas 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).

La actividad enzimática de las RIPs las hace ser consideradas como proteínas tóxicas, hecho que ha alentado su investigación. La primera evidencia de la toxicidad de las RIPs fue descubierta con la ricina, que es clasificada como una RIP del tipo 2. El descubrimiento de la ricina fue conducido por el interés que generaba la alta toxicidad y efecto venenoso de las semillas de ricino (*Ricinus communis* L.) así como su ancestral uso en la medicina clásica de culturas como la egipcia y la griega, pues era pre-escrita contra una gran variedad de enfermedades (Sandvig *et al.*, 2000). Fue entonces que durante los últimos años de los 1880's, el alemán Stillmark logró purificar el compuesto tóxico de las semillas de ricino dándole el nombre de ricina (Stillmark, 1888 y 1889).

Más tarde, en 1891, Paul Ehrlich basado en sus experimentos sugirió que existía un mecanismo mediante el cual la ricina se fijaba en las células que atacaba para poder realizar su actividad enzimática pero no logró demostrarlo (Ehrlich, 1891). Finalmente en 1974, Olsnes y colaboradores probaron los argumentos de Ehrlich por medio de la separación de los componentes de la ricina, concluyendo que estaba formada por una cadena A con actividad RIP y una cadena B con propiedades de lectina (Olsnes *et al.*, 1974). Por otro lado y durante el auge de la investigación de las RIPs en 1970, se encontró una proteína aislada de la planta *Phytolacca americana*, que inhibía la transmisión de virus a otras plantas, dicha proteína fue nombrada PAP (*Pokeweed Antiviral Protein*) debido a su origen y actividad. En 1983, Irvin demostró que la proteína PAP tenía el mismo efecto que la ricina sobre los ribosomas pues los inactivaba e inhibía la síntesis proteica. Durante su investigación, Irvin también demostró que PAP estaba constituida por una sola cadena con actividad RIP presentándose entonces la primer evidencia de una RIP tipo 1 (Irvin, 1983).

Respecto a la forma de entrada en la célula diana, la primera interacción con la membrana externa varía entre las RIPs. Por ejemplo, RIPs tipo 2 interactúan de forma específica con restos de galactosa (Agapov *et al.*, 1997), y las de tipo 1 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. La clatrina es una proteína que recubre las vesículas formadas intracelularmente para mediar el transporte, 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 4) (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).

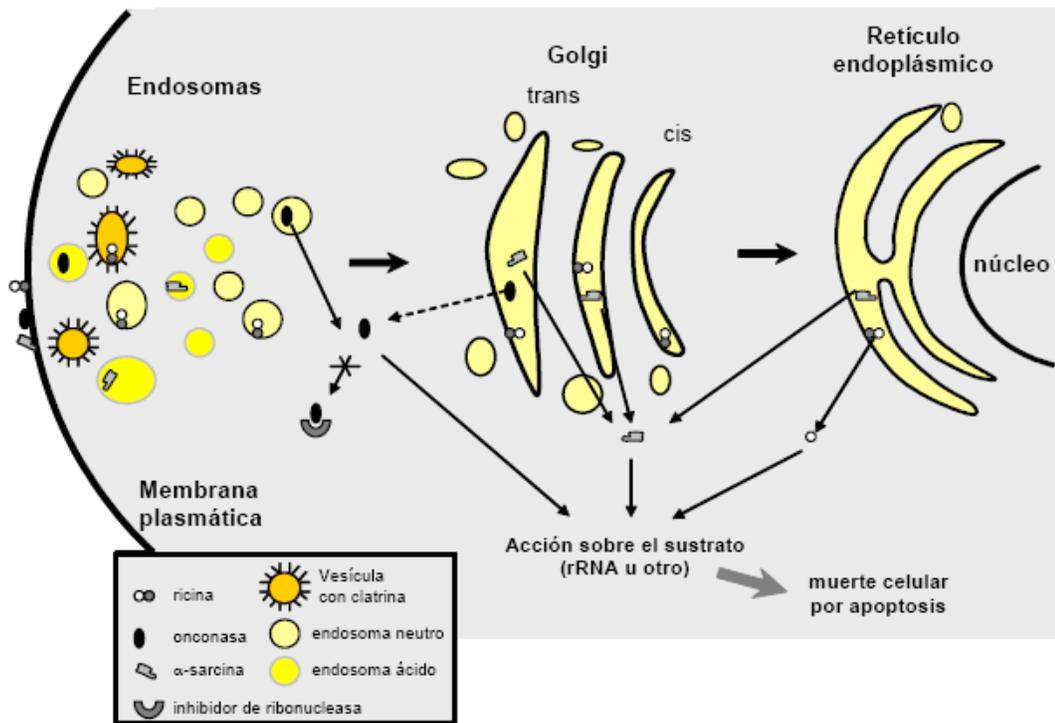


Figura 4. Representación esquemática de los mecanismos de entrada de distintas proteínas citotóxicas en la célula diana. Se muestran la ricina como ejemplo de RIP tipo II (una cadena con actividad N-glicosidasa sobre el ribosoma y otra de reconocimiento del receptor de la membrana), la onconasa como 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. Figura tomada de Simpson *et al.*, 1999.

Desde su descubrimiento se ha demostrado que la toxicidad de las RIPs varía de acuerdo al tipo al que pertenezcan (Tabla 1). Típicamente las RIPs del tipo 2 son altamente tóxicas aunque se ha reportado la existencia de RIPs del tipo 2 no tóxicas (Girbés *et al.*, 1993). La alta toxicidad de las RIPs del tipo 2 se explica por la presencia de la cadena B; la cadena B posee propiedades de lectina que le permiten anclarse a la superficie celular y facilitar la entrada en la célula, permitiendo entonces que la cadena A acceda y lleve a cabo su actividad sobre los ribosomas (Sandvig *et al.*, 2000). El modo de acción de las RIPs del tipo 2 respalda la hipótesis que argumenta su participación en mecanismos de defensa para el organismo productor. En contraste, las RIPs del tipo 1, que son las más abundantes en la naturaleza (Barbieri *et al.*, 1993), no poseen cadena B que facilite su acceso a las células haciendo que el mecanismo sea más complejo. Como consecuencia, la toxicidad de las RIPs del tipo 1 puede considerarse de un nivel bajo en comparación con las RIPs del tipo 2. Sin embargo, este hecho solo puede afirmarse mientras no logren entrar porque una vez dentro de la célula su toxicidad es alta. La complejidad del proceso de penetración de las RIPs del tipo 1 contradice la hipótesis de defensa que se ha argumentado

para la función de las RIPs, sugiriendo que es necesario proponer nuevos argumentos con respecto a la función de este tipo de proteínas en los organismos productores. La apoptosis es el mecanismo propuesto y más aceptado para la presencia de RIPs del tipo 1 en los organismos (Narayanan *et al.*, 2005) esto basado en reportes que respaldan dicha hipótesis, tales como el hallazgo de que la cadena A de la Shiga toxina (RIP bacetrina del tipo 2 encontrada en *Shigella dysenteriae*), induce la apoptosis de las células tratadas (Brigotti *et al.*, 2002). De cualquier manera, resulta evidente que es necesario ampliar la investigación acerca del rol fisiológico de las RIPs para demostrar la importancia de su conservación y amplia distribución en la naturaleza.

Tabla 1. 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 reticulito de conejo.

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

Fuente de la tabla: Stirpe 2004

Además del interés en el rol fisiológico de las RIPs y debido al conocimiento existente en relación a su actividad y mecanismo de acción, se han desarrollado aplicaciones biotecnológicas útiles en diversos campos como la medicina y la agricultura. Un ejemplo del uso práctico que se le ha dado a las RIPs en la medicina es la molécula conjugada de la gelonina, una RIP del tipo 1 aislada de la planta *Gelonium multiflorum*, con la concavalina A, aislada de la planta *Canavalia ensiformis* con el objetivo de hacer que la gelonina sea específica y activa contra células cancerígenas (Stirpe *et al.*, 1980). Además actualmente diversos grupos de investigación se encuentran desarrollando inmunotoxinas y conjugados de RIPs en contra de células infectadas con VIH o cáncer. (Parikh *et al.*, 2004, Pang *et al.*, 2011). Por otro lado, en la agricultura las RIPs han sido usadas en la producción de plantas transgénicas para hacerlas resistentes a algunas plagas, tal es el ejemplo del trigo modificado con una RIP denominada RIP30 proveniente de la cebada (Bieri *et al.*, 2000).

Hoy en día, los procesos tecnológicos tienen como cometido encontrar métodos limpios y amigables con el medio ambiente (Kemp and Volpi, 2008). La biotecnología moderna ofrece

estrategias nuevas y ventajosas para lograrlo además de utilizar procesos industriales más baratos. Dentro de los microorganismos utilizados en los procesos industriales en los que la biotecnología participa, existe un grupo de bacterias gram-positivas denominadas *Streptomyces* responsables de la producción de al menos el 50% de las sustancias comerciales biológicamente activas, tales como antibióticos (Dyson, 2011). Además son consideradas como organismos atractivos en la producción a gran escala de proteínas recombinantes puesto que poseen la gran capacidad de secretar al medio las proteínas que producen aparte de que se cuenta con parámetros bien establecidos para su manipulación genética y fermentación (Anné *et al.*, 2011). Recientemente, nuestro grupo de investigación se ha interesado en el estudio de la presencia de una Proteína Inactivadora de los Ribosomas (RIP) activa en *Streptomyces coelicolor* (Reyes *et al.*, 2010), abriendo así la posibilidad de ampliar la investigación de la función y aplicación biotecnológica de una nueva RIP.

2.2 LAS RIPs Y SUS DIFERENTES ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Oficialmente, la actividad enzimática de las RIPs es la de rARN N-glicosidasa (rARN N-glicohidrolasa, EC 3.2.2.22) desde que Endo y colaboradores demostraron que las RIPs removían selectivamente un residuo de adenina del rARN (Endo *et al.*, 1987). Más tarde y con algunos experimentos, se ha demostrado que algunas RIPs remueven más de un residuo de adenina por ribosoma (Barbieri *et al.*, 1994). Además se ha reportado que todas las RIPs son capaces de remover adeninas no solo del rARN sino de también del ADN (Barbieri *et al.*, 1997), de poliA (Barbieri *et al.*, 1994), de ARN desnudo (Endo *et al.*, 1991), y de mARN encapsulado (Hudak *et al.*, 2000). Debido a la habilidad de remover residuos de adenina de diferentes sustratos algunas veces a las RIPs también se les denomina como polinucleótido adenin glicosidasas (Barbieri *et al.*, 1993).

Gracias al análisis de las RIPs más estudiadas y consideradas como modelo, ricina del tipo 2 y PAP del tipo 1, el mecanismo de acción de ambos tipos de RIPs ha sido caracterizado y entendido. Acerca de las RIPs del tipo 1 se demostró que PAP actúa removiendo una adenina que ocasiona la pérdida de interacción de los factores de elongación EF-1 y EF-2, bloqueando así la síntesis proteica en el paso de la translocación (Gessner *et al.*, 1980). De manera más específica, se cree que PAP inhibe la unión del EF-1 dependiente de amino-acil-tRNA al sitio aceptor (sitio A del ribosoma) y EF-1 mediada por la hidrólisis de GTP. De la misma manera PAP inhibe la formación del complejo EF-2-GDP-ribosoma y estimula la hidrólisis del ribosoma dependiente de GTP (Irvin,

1995). Debido a dichas evidencias se sugiere entonces que PAP causa daños al ribosoma en el sitio en el que se unen los dos factores de elongación, inhibiendo el paso de la elongación de la síntesis proteica. La unión del EF-2 y la hidrólisis del complejo GTP-EF-2 son necesarios para la translocación de los péptidos recién elongados del sitio A del ribosoma al sitio P (Holmberg *et al.*, 1994). Por lo tanto, un efecto importante de PAP en la síntesis de proteínas es la inhibición de la reacción de translocación mediada por EF-2. Por otro lado, Osborn y Harley mostraron que ribosomas tratados con ricina fueron capaces de formar solo un dipéptido N-terminal Met-Val aportando evidencias que sustentan que el paso inhibido por la ricina es el paso de la translocación proteica (Osborn y Hartley, 1990). Además, la inhibición de la translocación por parte de la ricina y PAP fue apoyada por la observación de que el factor de elongación EF-G de *Escherichia coli*, equivalente al factor de elongación EF-2, actuó como protector para los ribosomas expuestos a la acción de una RIP proveniente de semillas de *Croton tiglium*, denominada crotina 2 (Alegre *et al.*, 1996) sugiriendo así que el sitio de unión de EF-G en el ribosoma se superpone con el sitio de acción de las RIPs (Wang *et al.*, 2000). Investigaciones actuales con respecto al mecanismo de acción de las RIPs, señalan que el dominio C-terminal de las proteínas que componen el tallo ribosomal pueden unirse a la cadena A de la ricina en lugar de unirse al factor de elongación EF-2, hecho que favorece que la ricina sea acercada más fácilmente al bucle sarcina-ricina y efectúe así su acción (Xiao-Ping *et al.*, 2009).

Comúnmente, las actividades enzimáticas de las RIPs afectan ADN o ARN, actuando como N-glicosidasas, hecho que fue demostrado por primera vez por Endo y colaboradores, pues localizaron el sitio específico en el ARN ribosomal en el que la adenina es liberada, dicho sitio fue denominado bucle sarcina-ricina. Por otro lado, identificaron el residuo específico de adenina, A₄₃₂₄, liberado por las RIPs en el rARN de hígado de rata. Además constataron que debido a la remoción de la adenina específica en los ribosomas, un fragmento del rARN puede ser liberado debido a la inestabilidad estructural provocada. Aprovechando tal hecho, el mismo grupo de investigación desarrolló una técnica experimental para demostrar el efecto de las RIPs en el ribosoma atacado. Cuando el residuo de adenina es liberado por la acción de una RIP, el sitio de adenilado (o sitio sin base) se vuelve inestable y puede ocurrir una reacción de β eliminación en el extremo 3' del rARN. Al tratar el rARN afectado con anilina ácida, el fragmento de rARN liberado puede fácilmente ser detectado por medio de electroforesis (Figura 5). Al fragmento liberado por la acción de la anilina ácida se le denomina fragmento Endo (Peumans *et al.*, 2001).

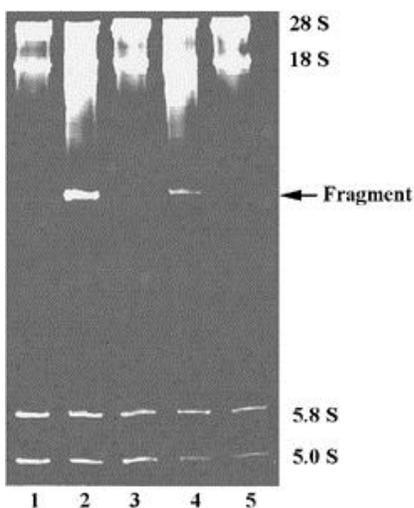


Fig. 5 Fragmentos Endo obtenidos después del tratamiento con anilina ácida del rARN de hígado de rata después de la acción de curcina, una RIP del tipo 1. Los fragmentos endo se encuentran señalados con la flecha (Lin *et al.*, 2003).

Hasta el momento, todas las RIPs probadas han demostrado tener la acción N-glicosidasa en el sitio específico descrito por Endo y colaboradores, aunque se ha demostrado que la toxicidad de las RIPs es dependiente del sustrato. Por ejemplo, la ricina muestra alta toxicidad sobre ribosomas de mamífero pero no tiene efecto sobre ribosomas de plantas ni de *E. coli*. Por otro lado, PAP tiene un espectro de toxicidad más amplio puesto que actúa sobre ribosomas de plantas, bacterias, levaduras y animales (Barbieri *et al.*, 1993).

Por otro lado, aun cuando las RIPs actúan de manera preferente sobre ribosomas, existen evidencias que demuestran que también actúan sobre rARN desnudo con la misma actividad N-glicosidasa (Endo *et al.*, 1991). Además algunas RIPs son capaces de de-adenilar rARN desnudo de manera más eficiente y distinta al sustrato que comúnmente atacan. La cadena A de la ricina es capaz de actuar sobre rARN 23S desnudo de *E. coli* pero incapaz de hacerlo sobre sus ribosomas intactos (Peumans *et al.*, 2001). La acción de las RIPs sobre rARN desnudo condujo a la hipótesis de su acción sobre otros sustratos, por lo que Zamboni y colaboradores desarrollaron un método de detección basado en HPLC y fluorescencia para cuantificar la cantidad de adenina liberada por la acción de una RIP (Zamboni *et al.*, 1989). Por medio de éste método se demostró que algunas RIPs removían más de una adenina de los ribosomas atacados (Barbieri *et al.*, 1997), se probaron 52 RIPs diferentes y se evidenció que todas actúan sobre ADN de esperma de arenque y sobre poly(A) además de rARN, de las RIPs probada solo un tercio mostró actividad contra TMV ARN (ARN del Mosaico Viral de Tabaco, por lo que la acción antiviral no puede ser generalizada),

(Barbieri *et al.*, 1997), todos los descubrimientos acerca de la actividad N-glicosidasa de las RIPs sobre diferentes sustratos apoyan su denominación como polinucleotido adenosin glicosidasas.

Existen evidencias que demuestran que el tratamiento de ribosomas de rata con ricina no solo escinde una adenina sino que además remueve la guanina 4323 (G₄₃₂₃) del bucle sarcina-ricina (Endo *et al.*, 1987). También en 1999, Rajamohan y colaboradores demostraron por medio de una técnica cuantitativa por HPLC que PAP recombinante libera un residuo de guanina del rARN de *E. coli* (Rajamohan *et al.*, 1999). De cualquier manera como esta propiedad solo ha sido demostrada para la ricina y PAP, no puede extrapolarse a todas las RIPs (Peumans *et al.*, 2001). Adicionalmente a las actividades clásicas, también se han demostrado actividades novedosas de algunas RIPs tales como actividad quitinasa (Remi *et al.*, 1997), actividad fosfatasa sobre lípidos (Helmy *et al.*, 1999), y actividad fosfatasa sobre nucleótidos (Chen *et al.*, 1996).

2.3 DISTRIBUCIÓN DE LAS RIPs EN LA NATURALEZA.

A partir del descubrimiento de la ricina en semillas y debido a sus propiedades médicas y agroquímicas, la comunidad científica se enfocó en la búsqueda de nuevas RIPs en diferentes plantas. Por esta razón, las RIPs provenientes de este reino son las mejor estudiadas, caracterizadas y entendidas. Sin embargo, en reportes recientes se ha revelado la amplia distribución de las RIPs no solo entre las plantas sino también entre hongos, bacterias e inclusive en tejido de mamífero (Girbés *et al.*, 2004).

Las RIPs del tipo 1 son las más abundantes en las plantas (Barbieri *et al.*, 1993). En cada planta se han encontrado en diferentes concentraciones y también ha sido demostrada su presencia en plantas consideradas como no tóxicas (Ishizaki *et al.*, 202; Barbieri *et al.*, 2006); además existe una amplia distribución en las diferentes partes de la planta que las produce pues pueden estar presentes en las hojas, en las semillas, en la raíz, en las frutas, en el tallo o en las flores (Girbés *et al.*, 2004). También se han encontrado varios tipos de RIPs co-existiendo en la misma planta, por ejemplo en plantas como *Sambucus spp.*, (Ferrerías *et al.*, 2000), *Cinnamomum camphora* (Ling *et al.*, 1995) *elris hollandica* (Van Damme *et al.*, 1997), se han encontrado RIPs del tipo 1 y RIPs del tipo 2. En cuanto a las RIPs encontradas en hongos y bacterias no existen reportes que demuestren co-existencia de diferentes tipos en un solo organismo. Dentro de las RIPs del tipo 2, solo un pequeño número ha sido purificado y caracterizado (aproximadamente 40) tales RIPs fueron aisladas de un grupo pequeño y limitado de plantas pertenecientes solo a 13 géneros (*Ricinus communis*, *Abrus sp.*, *Adenia sp.*, *Cinnamomum camphora*, *Sambucus sp.*, *Viscum sp.*,

Momordica charantia, *Trichosanthes sp.*, *Bryonia dioica*, *Panax ginseng*, *Ximenia americana*, *Iris hollandica*, y *Polygonatum multiflorum*) por lo que se cree que las RIPs del tipo 2 se encuentran distribuidas entre las plantas con flores (Peumans *et al.*, 2010), a este respecto, Girbés y colaboradores han realizado una lista actualizada de todas las RIPs conocidas (Girbés *et al.*, 2004).

De acuerdo con Peumans y Van Damme (2010), todas las evidencias sugieren que un ancestro de las semillas modernas de plantas fue el responsable de desarrollar el dominio RIP por lo menos hace unos 300 millones de años. Este dominio RIP ancestral dio origen a un linaje directo de RIPs de tipo 1 todavía presentes en varias monocotiledóneas y al menos una dicotiledónea. Más tarde alguna planta fue capaz de fusionar de manera exitosa su dominio RIP con un dominio lectina adquirido de alguna bacteria. El ancestro resultante de las RIPs del tipo 2 ha dado lugar al desarrollo de todas las RIPs del tipo 2 conocidas hasta ahora. Por otra parte se sugiere, que por medio de la eliminación de dominios aparecieron diferentes líneas de RIPs del tipo 1 “secundarias” y los dominios simples tipo lectina y que el origen del dominio RIP bacteriano no fue desarrollado propiamente por las bacterias sino adquirido por medio de una transferencia múltiple de genes desde las plantas (Peumans *et al.*, 2010).

2.4 RIPs DE BACTERIAS

Entre todos los organismos en los que se ha demostrado la presencia de proteínas RIP, las bacterias también están incluidas, aunque resulta ser un campo aún novedoso puesto que solo han sido reportadas 2 RIPs bacterianas, dichas RIPs son producidas por *Escherichia coli* y *Shigella dysenteriae* (Reisbig *et al.*, 1981; Obrig *et al.*, 1997). Las producidas por *E. coli* y *S. dysenteriae* han sido denominadas Shiga toxina y Shiga-tipo toxina respectivamente, ambas pertenecen al tipo 2 de la clasificación de las RIPs (Sandvig *et al.*, 1993; Obrig *et al.*, 1997) y son responsables de enfermedades como síndrome urémico hemolítico, anemia hemolítica microangiopática, falla renal y en algunos casos de síntomas neurológicos (Paton *et al.*, 1998). Las Shiga toxinas atacan a las células provocando su muerte es a través del anclaje a la superficie celular que les permite ser transportadas por endocitosis, una vez dentro del citosol su dominio enzimático activo inhibe la síntesis proteica y mata a la célula (Falnes *et al.*, 2000).

Las Shiga toxinas están formadas por dos componentes, una cadena A con actividad N-glicosidasa y una cadena B con propiedades de lectina. El fragmento A consta de dos sub-unidades unidas por un puente disulfuro y es el responsable de la inhibición de la síntesis proteica por medio de la escisión de una adenina de la sub-unidad mayor del ribosoma, tal como actúan todas las RIPs. El

fragmento B corresponde al dominio que se une a la superficie celular y está construido por medio de cinco sub-unidades idénticas que son capaces de unirse a receptores glicolípidos de la superficie celular (Figura 6) (Sandvig, 2001).

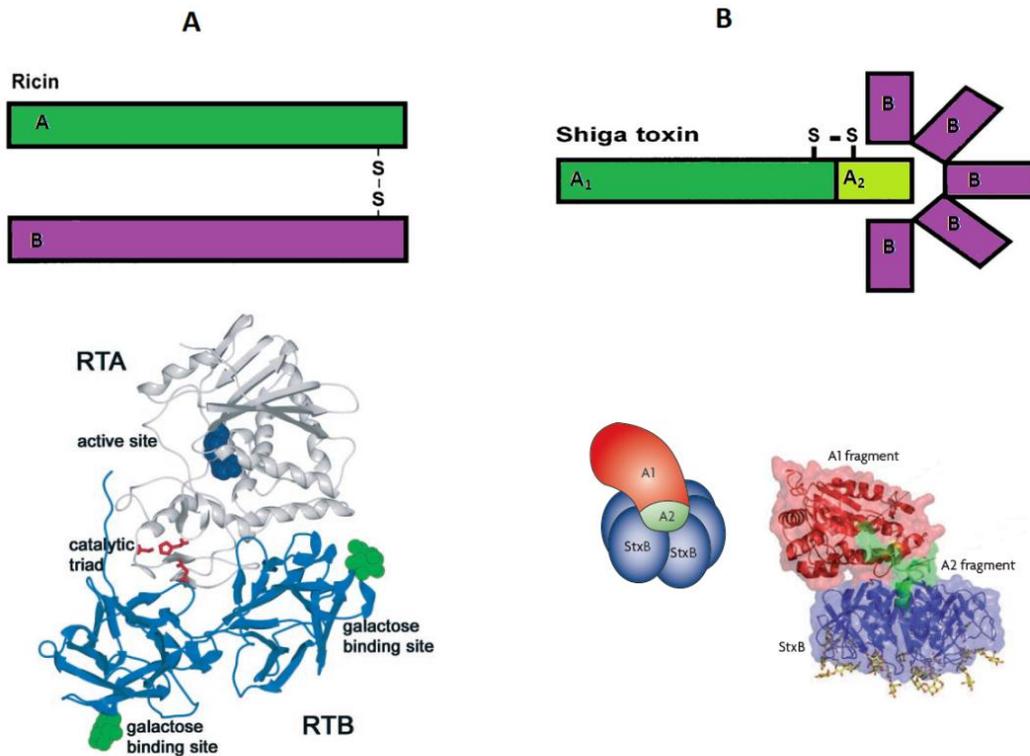


Fig. 6 Diferencias estructurales de dos RIPs del tipo 2. A. Estructura de la ricina, RIP del tipo 2 proveniente de *Ricinus communis*, planta toxica. B. Estructura de *Shiga toxina*, RIP del tipo 2 proveniente de *Escherichia coli*, bacteria patógena. Figura tomada de Reyes *et al.*, 2012

Las Shiga toxinas están clasificadas en dos grandes tipos, las Stx1 y las Stx2. Ambos tipos poseen una estructura similar pero presentan diferencias en la secuencia codificante de la cadena A. Las del tipo 1 o Stx1 contienen 315 aminoácidos mientras que las del tipo 2 o Stx2 contienen 318 aminoácidos, hecho por medio del cual se pretende explicar la diferencia en sus propiedades inmunológicas. Los genes codificantes de las Shiga toxinas (stx) son codificados en bacteriófagos atenuados en el cromosoma de la bacteria por lo que la producción de la toxina es altamente dependiente de la inducción de los fagos (Gyles *et al.*, 2007).

Además de la inhibición en la síntesis proteica, las Shiga toxinas pueden tener también otros efectos. Como ejemplo, se ha reportado la actividad antiviral de la Stx1 para lo que se requiere

una toxina catalíticamente activa. Debido a este hecho, se sugiere que Stx1 podría ser parte de un mecanismo de defensa (Ferens *et al.*, 2000). Además las Shiga toxinas inducen un tipo de lisis celular característica de la apoptosis (Jones *et al.*, 2000). La toxina induce la degradación del ADN y la liberación del contenido celular, este proceso puede entonces facilitar el ataque proteolítico en células de los alrededores y contribuir al efecto tóxico en organismos completos (Sandvig, 2001).

2.5 FUNCIÓN DE LAS RIPs EN EL ORGANISMO PRODUCTOR.

El fuerte interés que ha existido hasta ahora en las RIPs, es debido a la actividad que han mostrado en contra de patógenos y células tumorales (Ferrerías *et al.*, 2011; Chhikara *et al.*, 2012). Gracias a dichas actividades ha sido posible ahondar en la investigación para su aplicación. Sin embargo, resulta evidente que a pesar de los beneficios que se pueden obtener al aplicarlas, los organismos que las producen no lo hacen solo para satisfacer nuestras necesidades.

A pesar del conocimiento disponible y detallado en cuanto a la actividad, estructura y mecanismo de acción de las RIPs, no existe una respuesta certera acerca del porque los organismos producen y algunas veces acumulan proteínas de este tipo. Ciertamente su distribución es amplia y podría pensarse en primera instancia que juegan un papel importante en el crecimiento y mantenimiento de las células, aunque ha sido demostrado que no todos los organismos las producen, un ejemplo claro es *Arabidopsis thaliana* pues en ésta planta no existen evidencias de la presencia de RIPs (Peumans *et al.*, 2001). Al tener constancia de que no son proteínas esenciales para el mantenimiento celular, se han expuesto dos grandes hipótesis en cuanto a su rol fisiológico en el organismo productor. La primera y mejor sustentada hasta el momento es la que argumenta la participación de las RIPs en mecanismos de defensa, existen numerosos reportes en los que se demuestra la actividad antibacteriana, antifúngica, y antiviral conferida a las plantas que contienen RIPs, tal es el caso de PAP que provee actividad antiviral a la planta productora (*Phytolacca americana*) (Barbieri *et al.*, 1993), el resultado que demuestra este hecho es la resistencia viral obtenida tras expresar PAP de manera heteróloga en plantas de tabaco y papa (Lodge *et al.*, 1993).

Por otro lado y de manera contrastante existen reportes que demuestran la existencia de RIPs carentes de toxicidad en contra de patógenos (Girbés *et al.*, 1993), al no presentar toxicidad hacia organismos antagónicos la hipótesis de su participación en mecanismos de defensa se debilita y da paso a la segunda hipótesis propuesta. En la segunda hipótesis se declara que las RIPs forman

parte de mecanismos de apoptosis, dicha hipótesis se sustenta en el análisis de tejidos envejecidos o sometidos a diferentes tipos de estrés puesto que en ellos se ha encontrado alta expresión de algunas RIPs. Tal es el caso de la RIP denominada RIP1 presente en la planta *Mesembryanthemum crystallium*, donde se demostró que los niveles más altos de expresión se encuentran después de sufrir estrés provocado por altas concentraciones de sal (Rippman *et al.*, 1997). En cuanto al estudio de tejidos envejecidos, la RIP de la planta *Hura crepitans* incrementa su actividad en las hojas de edad más avanzada (Stirpe *et al.*, 1996) quedando de manifiesto la relación directa de la actividad de las RIPs con la edad del tejido. Más pruebas de la participación de las RIPs en apoptosis existen gracias a los estudios *in vitro* que han demostrado que la ricina y la abrina inducen la apoptosis de células de mamífero (Narayanan *et al.*, 2005).

De cualquier manera y pese a los experimentos hasta ahora realizados con el objetivo de demostrar la función de las RIPs en el organismo productor, siguen siendo necesarias más y mejores evidencias que permitan tener conclusiones infalibles de su rol. Y aunque la mayoría de las actividades biológicas de las RIPs, sin duda dependen de su actividad enzimática, algunas otras deben ser debidas a sus interacciones no enzimáticas con los ácidos nucleicos o las proteínas al contacto con sus dominios en los extremos amino o carboxilo terminal (Peumans *et al.*, 2001). De cualquier manera, su amplia distribución debe justificar la importancia de su presencia en todos los reinos. Mientras tanto, las actividades y propiedades de las RIPs han sido utilizadas en aplicaciones biotecnológicas que benefician a campos como la agricultura y la medicina.

2.6 APLICACIÓN BIOTECNOLOGICA DE LAS RIPs

El uso de las Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas en el diseño de estrategias aplicadas se debe en gran medida a la variedad de actividades enzimáticas que las caracterizan.

La actividad antiviral de las RIPs se conoce desde los 90s (Puri *et al.*, 2009), y según los reportes, la mayoría de las tipo 1 y 2 poseen esta propiedad. Una de las principales proteínas antivirales es la denominada PAP (*Pokeeweed Antiviral Protein*) que actúa en contra de virus de plantas, su expresión en tabaco transgénico le confiere a este resistencia a los virus transmitidos por insectos fitopatógenos, tal es el caso del virus de papa y el mosaico viral de pepino (Lodge *et al.*, 1993). Otro ejemplo de capacidad antiviral de las RIPs es la tricosantina que al ser expresada en la misma planta de tabaco le otorga resistencia sobre el mosaico viral del nabo (Lam *et al.*, 1993). Por otro lado, algunas RIPs como las aisladas de melón amargo (*Momordica charantia*) denominadas momorcarinas, han mostrado eficacia en contra de células infectadas con VIH pues inhiben la

replicación viral por lo que resultan prometedoras en la terapia en contra del sida porque su actividad es selectiva y no dañan de ninguna manera a las células sanas (Puri *et al*, 2009).

Además de la actividad antiviral también se ha demostrado que las RIPs pueden ser usadas como agentes antibacterianos, antifúngicos e inclusive como insecticidas. Las RIPs del tipo 1 extraídas de las raíces de la planta denominada *Mirabilis expansa* mostraron actividad antibacteriana en contra de especies de suelo y actividad antifúngica contra hongos como *Fusarium* y *Trichoderma* (Vivanco *et al*; 1999). Otro ejemplo de la actividad antifúngica es la resistencia mostrada por la planta RIP transgénica de trigo en contra del hongo fitopatógeno *Erysiphe graminis* (Bieri *et al*; 2000). En cuanto a su capacidad insecticida también existen reportes que muestran que las RIPs son capaces de atacar algunas plagas, tal es el caso de la cinamomina, una RIP del tipo 2 presente en las semillas de la planta *Cinnammomun camphora* que es toxica para larvas de mosquito (*Culex pipines pallens*) y para el gusano de algodón (*Helicoverpa armigra*), (Zhou *et al*; 2000), por su parte la ricina y la saporina son tóxicas para larvas de dos especies de coleópteros (Gatehouse *et al*; 1990).

Y aunque la mayor parte de las aplicaciones expuestas hasta ahora han sido dirigidas a la agricultura principalmente, la medicina también puede ser beneficiada con la aplicación de las RIPs sobre todo cuando el reto más importante en este campo es el desarrollo de medicamentos más seguros, eficaces y sobre todo específicos (DiMasi *et al*, 2003; Grabowski and Vernon, 2000). Actualmente, la aplicación más prometedora de las RIPs en la medicina, es su uso en el diseño de conjugados, ya sea ligados químicamente o fusionados genéticamente para dar origen a moléculas quiméricas con alta especificidad, el ejemplo más claro es el caso de las inmunotoxinas (Figura 7), creadas utilizando factores de crecimiento, anticuerpos, hormonas y lectinas ligadas a diversas RIPs. La aplicación potencial más importante de las inmunotoxinas de RIPs es su uso como agente antitumoral, dicho interés ha surgido gracias al hallazgo de que actúan de manera selectiva en contra de células cancerígenas (Kumari *et al*; 2011). Además recientemente se ha demostrado la citotoxicidad de la saporina, una RIP del tipo 1 sobre células cancerígenas (Kodama *et al*; 2003).

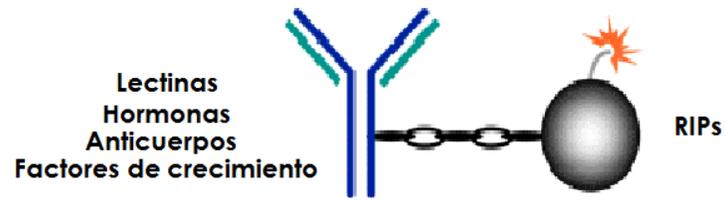


Fig. 7 Representación esquemática de la construcción de inmunotoxinas de RIPs

3

ANTECEDENTES

“Todos somos muy ignorantes.

Lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas”.

Albert Einstein

3.1 *Streptomyces coelicolor* Y SU RIP HIPOTETICA

Los estreptomicetes son bacterias gram-positivas aisladas del suelo, producen una gran variedad de metabolitos secundarios y son considerados los productores de más de la mitad de los compuestos biológicamente activos conocidos en la actualidad, dentro de los cuales se encuentran algunos de alto interés comercial como antibióticos, inmunosupresivos (Sánchez and Demain, 2011), productos de alimentación animal y agroquímicos. La vasta diversidad de productos obtenidos a partir de los estreptomicetes los hace ser el género bacteriano más importante a nivel industrial, consecuentemente hoy en día se cuenta con una batería de herramientas genéticas para la manipulación de estos microorganismos (Vallin *et al.*, 2005). *Streptomyces coelicolor* A 3(2) es la cepa mejor caracterizada por lo que es utilizada como modelo (Bentley *et al.*, 2002). Dicha cepa entró a la era post-genómica en el año 2002 cuando su genoma completo fue publicado y aunque los avances en su investigación son trascendentes, aun existen genes sin función clara.

Por otro lado, además de las herramientas moleculares disponibles en la actualidad, los estreptomicetes también poseen ventajas metabólicas y fisiológicas en la síntesis de metabolitos secundarios de interés industrial, en la producción de aminoácidos por métodos fermentativos y en procesos de bio-conversión, razón por la cual se han desarrollado sistemas con vectores específicos para la sobre-expresión de moléculas utilizando a los estreptomicetes como hospederos en la producción heteróloga (Connell, 2001). También existen reportes que demuestran la eficiencia de secreción con la que se obtienen proteínas en sistemas heterólogos de estreptomicetes debido a la presencia de péptidos señal que facilitan el proceso. Entre los hallazgos más importantes en el uso de los estreptomicetes como sistema heterólogo es la eficiencia de producción de proteínas eucarionticas secretadas de manera nativa (Anné *et al.*, 2011), hecho que los coloca como hospederos potenciales en la producción a gran escala.

En adición a los beneficios que representa el uso de los estreptomicetes como sistemas de producción heteróloga también se ha puesto gran esfuerzo en el aislamiento de nuevos metabolitos provenientes de la especie. Al respecto, recientemente se encontró que en el genoma de *Streptomyces coelicolor* se encontrará un gen denominado SC3A4.18 que posiblemente codifica

para una Proteína Inactivadora de los Ribosomas del tipo 1, nombrada RIPsc (Reyes, 2008). La confirmación del descubrimiento de una proteína de este tipo en un estreptomiceto le abre las puertas a la investigación de la función de las RIPs en este nuevo organismo productor que hasta ahora permanece desconocida, además del desarrollo de moléculas novedosas y con aplicación biotecnológica potencial.

El primer paso en la investigación de RIPsc fue el análisis *in silico* de la secuencia codificante. Por medio del análisis BLAST se determinó la homología con las RIPs del tipo 1 por lo que se realizaron alineamientos con algunas proteínas de este tipo conocidas y ampliamente caracterizadas para obtener datos más precisos, tales RIPs fueron, la cadena A de la ricina, PAP y un grupo de isoformas de la planta *Muscari armeniacum* (MU1, MU2, MU3). Con los alineamientos realizados se determinó que la similitud con la cadena A de la ricina es a penas de 22% con PAP de 23% y con el grupo de las muscarinas del 30%. Sin embargo, a pesar de la baja similitud con las secuencias aminoácidas alineadas se encontró que al alinearse con la cadena A de la ricina, la secuencia codificante para RIPsc conserva 7 de los 13 residuos importantes del sitio activo similares a la secuencia con la que se comparó, los residuos conservados en RIPsc y similares en la ricina son: Tyr80, Tyr123, Ala165, Glu177, Ala178, Arg180, y Trp211.

Las evidencias encontradas tras el análisis *in silico* de la secuencia de *ripsc* fueron soportadas más tarde de manera experimental. En primer lugar se amplificó el gen correspondiente al dominio RIPsc a partir de ADN total de *S. coelicolor* y se construyó el sistema de expresión de *E. coli* *BL21(DE3)pLySs-[pET-ripsc]*, con el sistema construido se indujo la sobre-expresión de RIPsc y se obtuvieron las fracciones proteicas correspondientes. Por medio de la separación en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE de las bandas proteicas obtenidas y con la subsecuente detección de la banda RIPsc en un Western-Blot se determinó que RIPsc se encontraba en cuerpos de inclusión. Tras el seguimiento de la curva de crecimiento de *E. coli* *BL21(DE3)pLySs-[pET-ripsc]* se observó un decremento importante en el crecimiento de la cepa inducida y en comparación a la misma cepa pero sin inducción, lo que sugirió hasta ese momento que RIPsc podría estar afectando a los ribosomas de la cepa productora (Reyes, 2008).

Con la finalidad de medir la actividad enzimática de RIPsc, se aislaron y purificaron los cuerpos de inclusión y se sometieron a métodos de re-naturalización. Con RIPsc re-naturalizada y purificada se desarrollaron distintos ensayos de actividad, el primero fue utilizando un sistema *in vitro* de traducción libre de célula que consta de ribosomas de conejo y todos los elementos necesarios

para efectuar la traducción de la luciferasa, en este ensayo se demostró que al agregar RIPsc al sistema, la traducción de la luciferasa decreció considerablemente, demostrando así el efecto de RIPsc sobre los ribosomas de conejo (Figura 8)(Reyes, 2008).

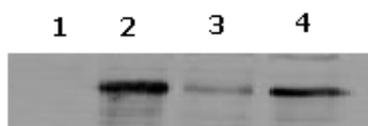


Fig 8. Detección por quimioluminiscencia de la inhibición de la traducción de luciferasa. Línea 1: Control (mezcla de reacción con ARN molde), Línea 2: Control (mezcla de reacción sin ningún cambio), Línea 3: Inhibición de la traducción por el implemento de RIPsc, Línea 4: Control (mezcla de reacción conteniendo buffer RIPsc), (Reyes, 2008).

Con el afán de tener más evidencias de la actividad de RIPsc, se construyó un sistema de expresión inducible para *Saccharomyces cerevisiae*, para lo cual se clonó el gen *ripsc* en el vector pEC-HIS inducible por galactosa. Al inducir la expresión de RIPsc en *S. cerevisiae* se observó un efecto letal sobre las células en las que se indujo la expresión (Figura 9), comprobándose así de manera más clara el efecto de RIPsc (Reyes, 2008).

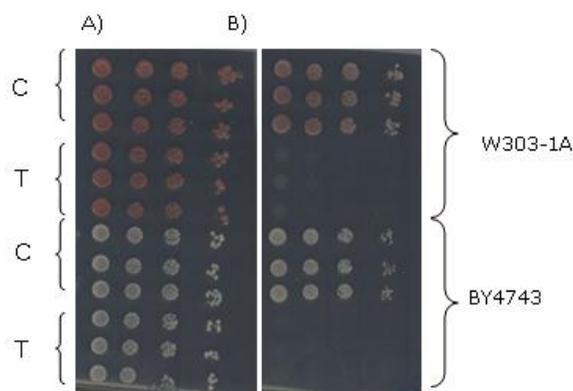


Fig. 9. Test de toxicidad de RIPsc sobre *Saccharomyces cerevisiae*. Después de la transformación de las cepas con el vector de expresión pEC-HIS conteniendo el gen *ripsc*, se inocularon en un pre-cultivo de 5ml durante 24 h, a partir del pre-cultivo las muestras se diluyeron y se sembraron en cajas 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 (Reyes, 2008).

Con evidencias sugerentes de la actividad de RIPsc, se realizaron experimentos de actividad sobre hongos y bacterias para evaluar la posible capacidad antibacteriana y antifúngica de RIPsc, para lo cual se hicieron bio-ensayos con la técnica de sensi-discos y con la técnica de medio envenenado sin tener resultados satisfactorios. Bajo los resultados obtenidos hasta ese momento se concluyó que RIPsc solo era capaz de mostrar actividad cuando podía alcanzar a los ribosomas, una vez dentro de la célula, pero que era incapaz de tener actividad sobre células intactas debido a que no

puede penetrar la membrana de la célula blanco. Por otro lado, aún cuando se demostró la actividad tóxica de RIPsc sobre ribosomas de conejo, se desconocía el mecanismo por medio del cual causaba dicha toxicidad y derivado de esto su total identidad como RIP. Por esta razón, aún resultaba necesario mostrar de manera específica su actividad N-glicosidasa.

3.2 PÉPTIDOS BIOACTIVOS Y SU USO EN LA APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA DE LAS PROTEÍNAS INACTIVADORAS DE LOS RIBOSOMAS.

Los retos más importantes en el diseño de nuevas moléculas derivadas de las RIPs son: la especificidad y la efectividad en su internalización a las células blanco, aunque el reto es grande, el uso correcto de las herramientas biotecnológicas puede desencadenar la obtención de compuestos bio-activos interesantes que aportarían ganancias ambientales, terapéuticas y económicas significativas. El uso de péptidos puede ser la alternativa adecuada en la funcionalidad dirigida de las RIPs (Zorko *et al.*, 2005).

Los péptidos son cadenas cortas de aminoácidos, de entre 2 y 50 aminoácidos, que en algunos casos presentan actividades biológicas, tales como hormonas peptídicas, neuropéptidos, antibióticos, alcaloides y toxinas por lo que han sido denominados péptidos bio-activos. Sus principales aplicaciones son: la producción de anticuerpos y el diseño de moléculas terapéuticas dirigidas a proteínas o receptores de enfermedades como el cáncer (Sandoval *et al.*, 2008). Además poseen propiedades físicoquímicas interesantes como 1) su composición por aminoácidos, 2) carga neta, 3) anfipaticidad y 4) una notable diversidad de estructuras y conformaciones, incluyendo hélices- α , hojas- β , estructuras no convencionales o incluso conformaciones extendidas, tales características los hacen ser considerados como una herramienta molecular importante (Broekaert *et al.*, 1997; García-Olmedo *et al.*, 1998; Van Loon *et al.*, 2006). De acuerdo a éstas características, existen dos tipos trascendentes en la aplicación de las RIPs, los CPPs (*Cellular Penetrating Peptides*) y los AMPs (*Antimicrobial Peptides*).

Los CPPs son péptidos cortos que facilitan la internalización celular de cargos específicos (moléculas acarreadas). Los cargos pueden ser unidos al CPP por medio de unión química covalente o por medio de interacciones no covalentes. Su función principal es la entrega de moléculas en el citoplasma o en cualquier organelo por medio de un proceso de endocitosis. Los CPPs se clasifican por su estructura en dos tipos: poli-catiónicos que contienen un patrón alternado de aminoácidos polares cargados y aminoácidos hidrofóbicos no polares y anfipáticos cargados positivamente. Los CPPs poseen un gran potencial de aplicación en medicina y en

investigación de nuevos compuestos para ser usados como vectores de entrega de diversas moléculas (Okuyama *et al.*, 2007)

Las principales aplicaciones reportadas para los CPPs son la entrega de: ácidos nucleicos tales como ARN de interferencia, oligonucleótidos antisentido, plásmidos o ADN, todos estos con la finalidad de la regulación génica (Morris *et al.*, 2007; Andaloussi *et al.*, 2005) y la entrega de proteínas de un rango de entre 30 kDa y 150 kDa (Wadia *et al.*, 2004). Y aunque hasta ahora existen casos exitosos en la entrega de moléculas de interés, la desventaja más importante en el uso de CPPs es su baja estabilidad metabólica (Renert *et al.*, 2006).

Por otro lado, los AMPs o péptidos antimicrobianos son un grupo único y diverso de moléculas conservadas evolutivamente como parte de la respuesta inmune de todos los organismos, están divididos en subgrupos debido a su composición de aminoácidos y estructura (Yeaman *et al.*, 2003). Normalmente su tamaño es de entre 12 y 50 aminoácidos. Su composición incluye dos o más residuos cargados positivamente como arginina y lisina o en ambientes ácidos histidina, y una gran proporción (generalmente > 50%) de residuos hidrófobos (Papagianni, 2003). La estructura secundaria de los AMPs puede ser de cuatro maneras diferentes: 1) α -helicoidal, 2) hoja β , debido a la presencia de 2 o más enlaces disulfuro, 3) horquilla β o bucle debido a la presencia de un único enlace disulfuro y/o ciclación de la cadena peptídica, y 4) extendida (Brogden, 2005). Muchos de estos péptidos no tienen estructura en solución libre, y adquieren su configuración final sobre la partición en las membranas biológicas. La capacidad de asociarse con membranas es una característica definitiva de péptidos antimicrobianos (Hancock *et al.*, 2002), aunque la permeabilización de membrana no es absolutamente necesaria.

Los modos de acción de los AMPs mediante los cuales ejercen su actividad antimicrobiana son variados, principalmente pueden desestabilizar a las membranas, interferir con el metabolismo, y orientar su acción sobre los componentes citoplasmáticos. De manera general, el contacto inicial entre el péptido y el organismo objetivo es electrostático pues la mayoría de las superficies microbianas son aniónicas o hidrofóbicas, después gracias a características como: su composición de aminoácidos, anfipaticidad, carga catiónica y tamaño pueden anclarse a las membranas para desestabilizarlas o en su defecto penetrarlas para alcanzar moléculas intracelulares cruciales y actuar sobre ellas (Brogden, 2005). Cuando la acción de los AMPs es intracelular los hechos que pueden ocurrir son: inhibición de la síntesis de la pared celular, alteración de la membrana citoplasmática, activación de la autolisina o inhibición de la síntesis de ADN, ARN o proteínas. Sin

embargo y a pesar de los reportes del mecanismo de acción de algunos AMPs aun existen formas de actuar desconocidas (Hirst, *et al.*, 2011).

Los AMPs son considerados como excelentes candidatos para el desarrollo de nuevos compuestos terapéuticos o como complementos en la terapia convencional con cualquier antibiótico pues poseen un amplio rango de acción y no producen resistencia, lo que les da una ventaja sobre los antibióticos comunes además de que son bactericidas y no bacteriostáticos lo que les permite ejercer su acción en un lapso menor aniquilando de manera total a la célula blanco y no solo retardando su crecimiento (Hoskin *et al.*, 2008). Una ventaja importante es que poseen alta selectividad sobre células bacterianas lo que los hace ser seguros y no tóxicos en contra de células humanas (Matsuzaki, 2008). Además del campo médico, los AMPs son considerados también dentro de la agricultura puesto que se ha probado que pueden actuar de manera específica contra fitopatógenos, lo que los hace buenos candidatos en el control biológico de los cultivos (Montesinos, 2007).

Tanto AMPs como CPPs, poseen características complementarias para la acción efectiva y específica de las RIPs pues actúan sobre la membrana que, para algunas proteínas de este tipo, es la barrera principal a vencer, por lo que el diseño y explotación de su aplicación como nuevas moléculas en combinación sinérgica resulta absolutamente interesante y novedosa.

3.3 FUSIÓN DE PEPTIDOS BIOACTIVOS

Tras numerosos experimentos, se ha demostrado la acción de los péptidos bio-activos denominados AMPs o CPPs sobre la membrana, ya sea en su acción desestabilizadora o en su acción penetrante; existen referencias que enlistan a los péptidos con actividad antimicrobiana y a los péptidos acarreadores activos sobre bacterias y hongos (Marcos *et al.*, 2008). Debido a que su actividad resulta atractiva en la aplicación en contra de células indeseables, se requieren grandes cantidades para cubrir la demanda de investigación y aplicación, por lo que se ha tratado diseñar estrategias rentables de su obtención a gran escala, siendo la extracción y la síntesis química los métodos más explotados hasta ahora (Li, 2009). El alto costo y bajo rendimiento de tales procesos son desventajas importantes que han desencadenado la necesidad de implementar nuevas y mejores técnicas de producción. Generalmente, el uso de la tecnología de ADN recombinante provee ventajas como: bajos costos, facilidad en el escalamiento de la producción y precisión en la producción del metabolito deseado que facilita los procesos de purificación. Actualmente, el sistema de expresión para ADN recombinante mejor desarrollado es el que utiliza

a *E. coli* como hospedero pero existen otros sistemas de levaduras que han resultado efectivos en la expresión heteróloga de péptidos bio-activos (Ingham y Moore, 2007; Li *et al.*, 2008). La popularidad del uso de *E. coli* para la expresión heteróloga de péptidos bio-activos es debida a características como, una tasa de crecimiento rápido, bajo costo y el hecho de que los péptidos no requieren modificaciones pos-traduccionales (Li *et al.*, 2009). De cualquier manera, y aunque los beneficios obtenidos de la expresión heteróloga en *E. coli* son interesantes, las propiedades de los péptidos bio-activos hacen que su expresión en este sistema de manera directa sea complicado (Piers *et al.*, 1993). En primer lugar, su naturaleza antimicrobiana los hace potencialmente fatales para el hospedador, además su tamaño pequeño y su alto contenido catiónico los hace altamente susceptibles a la degradación proteolítica (Li *et al.*, 2009). Con el objetivo de evitar ambas dificultades, se ha propuesto como estrategia expresar este tipo de péptidos como fusiones, en las que el péptido de interés se liga genéticamente a proteínas acarreadoras (Piers *et al.*, 1993). La fusión entre el péptido y la proteína acarreadora juega un papel similar a los pro-segmentos en los péptidos como formas precursoras inactivas, lo que ofrece la protección tanto del péptido expresado como al hospedero (Vassilevski *et al.*, 2008). En las fusiones proteína-péptido, varias han sido las proteínas utilizadas (Tabla 2) como acarreadores.

Tabla 2. Proteínas utilizadas como acarreadores en producción de péptidos antimicrobianos

PROTEÍNA	PESO	PUNTO	REFERENCIA
	MOLECULAR	ISOELÉCTRICO	
Proquimosina	38	4.6	Haught <i>et al.</i> , 1998
Proteína Verde Fluorescente (GFP)	26.8	5.7	Skosyrev <i>et al.</i> , 2003
Proteína de Unión a la Maltosa (MBP)	44.4	9.2	Fassina <i>et al.</i> , 1994
Ketosteroide Isomerasa (KSI)	13.7	4.8	Zorko <i>et al.</i> , 2009
Glutation S-transferasa (GST)	15.8	5.3	Moon <i>et al.</i> , 2006
Thioredoxina (Trx)	11.8	4.6	Xu <i>et al.</i> , 2004
Inteina	35.3	5.3	Morassutti <i>et al.</i> , 2007
Baculoviral poliedrina	28.7	5.8	Wei <i>et al.</i> , 2005
Ubiquitina	8.5	6.5	Moon <i>et al.</i> , 2007
Péptido aniónico	2.5	3.1	Kim <i>et al.</i> , 2006

Algunas de estas proteínas facilitan la expresión del conjugado de manera soluble y algunas otras promueven la formación de cuerpos de inclusión. Ambas características son convenientes en el diseño de los conjugados que deben tomarse en cuenta para obtener mejores resultados y rendimientos (Ingham y Moore, 2007). Tras variados experimentos se ha demostrado que la estrategia de fusión es una estrategia eficaz en la producción de péptidos antimicrobianos por vía fermentativa, lo que hace que bajen los costos y los procesos sean más eficientes (Li *et al*, 2009). Sin embargo, el desarrollo de conjugados petido-proteína se vislumbra como un buen método de aplicación para la producción de nuevas moléculas de interés industrial por lo que siguiendo dicha estrategia podrían plantearse nuevos diseños con actividades novedosas.

4

JUSTIFICACIÓN

*“En el fondo, los científicos somos gente con suerte:
podemos jugar a lo que queremos durante toda la vida”.*

Lee Smolin

El descubrimiento de las Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas ha sido motivo de múltiples investigaciones que pretenden demostrar la función de este tipo de proteínas en el organismo productor, dicha investigación ha costado hasta ahora más de 100 años sin lograr el esclarecimiento total de la función de las RIPs, por tal motivo aun sigue abierta la posibilidad de proponer y demostrar hipótesis de su función. Además los reportes de nuevas RIPs en diversos organismos están en incremento lo que hace que la explicación de su papel en la naturaleza sea cada vez más necesaria.

En un principio se mostró interés en las RIPs debido a su actividad toxica y a las propiedades médicas que presentaban, pero más allá del uso y aplicación que puede darse a estas proteínas ha resultado interesante para la comunidad científica ahondar en el papel biológico que estas desempeñan para quien las produce. Debido a las características enzimáticas, bioquímicas y estructurales que han sido conservadas en las RIPs de la mayoría de los organismos, se ha puesto a discusión la manera en que han podido prevalecer en la naturaleza pues su conservación sugiere un papel evolutivo trascendental que ha permitido la transferencia entre organismos, pues se han encontrado tanto en bacterias como hongos, plantas y algunos tejidos animales. La presencia y actividad tan específica en dominios conservados del ribosoma otorga al organismo productor ventajas importantes. Dichas ventajas han sido clasificadas en dos grandes vertientes pues se ha argumentado que podrían ser parte de un mecanismo de defensa o en su defecto parte de mecanismos de apoptosis. Ambos argumentos proveen beneficios a quien las produce puesto que puede defenderse de sus antagonistas o determinar el momento en que ya no resulta rentable continuar con el ciclo biológico de vida y morir de una manera programada para otorgar beneficios a la comunidad y así poder conservarla.

Por otro lado, debido a que las RIPs fueron descubiertas por primera vez en un tejido vegetal, son las presentes en las plantas las que han sido mejor caracterizadas y estudiadas pero la complejidad de tales organismos ha limitado hasta ahora la elucidación de la función. Por otro lado, y debido a los avances en genómica que existen en la actualidad, se han logrado identificar genes similares en diversos organismos. Uno de estos genes fue encontrado en *Streptomyces coelicolor*, dicho gen fue estudiado *in silico* en comparación con los genes de las RIPs mejor caracterizadas y se

determinó que debido a la conservación de dominios del sitio activo podría tratarse de una RIP, más tarde se demostró por medio de variados ensayos que se trataba de una RIP. El hecho de encontrar una proteína de este tipo en un actinomiceto abre las puertas a la posibilidad de encontrar de manera más clara la función de las RIPs en el organismo productor. Dicha posibilidad esta dada principalmente por las herramientas de análisis que se han desarrollado para los actinomicetos, además de que son organismos más simples comparados con las plantas. Por otro lado su hábitat natural les ha permitido estar en comunidad con las plantas que son hasta ahora los organismos en los que más prevalecen las RIPs. Al estar en convivencia constante es muy probable que haya existido transferencia entre plantas y actinomicetos. Ahora el tener un actinomiceto con una RIP, puede ayudar al entendimiento de dicha transferencia. Además, el análisis de la función de una RIP dentro de un actinomiceto resulta de menor complejidad pues las condiciones de cultivo, crecimiento y mantenimiento son simples y fácilmente manipulables. El aprovechamiento de la información y herramientas disponibles para los actinomicetos abre paso al diseño de nuevos experimentos para encontrar la función precisa de una RIP y con el esclarecimiento de su participación y presencia en el metabolismo del productor se entenderá de mejor manera como es que han logrado conservarse a través del tiempo así como su importancia en la naturaleza.

Por otro lado, la principal característica de la RIPs es el efecto letal que ejerce en los organismos atacados, dicha actividad la hace interesante en la aplicación en contra de células indeseables, pues es posible diseñar moléculas con especificidad controlada, lo que le da a la molécula diseñada un valor agregado trascendente pues la inespecificidad es uno de los problemas que enfrentan los compuestos utilizados en campos como la medicina y la agricultura. La presencia de una RIP en *S. coelicolor* nos da la posibilidad de aplicarla de manera racional en el diseño de moléculas específicas. La agricultura es un campo que necesita del constante mejoramiento de sustancias que ayuden en el ataque de los fitopatógenos responsables de la pérdida de millones de hectáreas de cultivos en el mundo, el reto en el campo es encontrar sustancias que tengan como blanco solo a los microorganismos fitopatógenos sin terminar con la diversidad microbiana necesaria para el buen desarrollo de los cultivos. La RIP encontrada en *S. coelicolor* ha sido clasificada como una RIP del tipo 1 y es activa en contra de ribosomas, bacterianos, fúngicos y de mamífero. Su amplio espectro la hace atractiva para utilizarla como sustancia antifúngica y antibacteriana con miras a la aplicación en la agricultura. Su principal limitación es la falta de un mecanismo que le ayude a introducirse en la célula atacada. Su actividad fue demostrada sobre ribosomas expuestos pero no

en contra de células intactas por lo que se cree que si se logra obtener una fusión de RIPsc con algún agente que le ayude a penetrar la membrana celular se obtendrá una molécula específica y letal. Los péptidos bio-activos son una buena alternativa para diseñar la molécula deseada por lo que se plantea obtener una construcción genética que sea sobre-expresada en primer lugar en *E.coli* para probar la efectividad y especificidad de la molécula de fusión. Seguramente la unión de RIPsc con un péptido bio-activo incrementará su actividad haciéndola específica y eficaz.

5

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

“He de hablar aquí sólo en hipótesis,
diciendo no lo que sé,
sino lo que supongo más probable”.

Doctor Jeckill

Las hipótesis planteadas para el presente trabajo se presentan a continuación, cada una de ellas tiene objetivos distintos que serán descritos de manera detallada.

PRIMER HIPÓTESIS

“El producto del gen *SCO7092* de *Streptomyces coelicolor* es una proteína con actividad N-glicosidasa”

PRIMER OBJETIVO GENERAL:

Confirmar de manera concluyente que el producto del gen *SCO7092* es una proteína inactivadora de ribosomas mediante la determinación de la actividad N-glicosidasa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Extraer ARN de cultivos de *E. coli* BL21(DE3)plysS[pET-rips bajo condiciones de inducción y no-inducción.
2. Analizar el daño causado en el ARN ribosomal de *E. coli* BL21(DE3)plysS por la expresión de RIPsc por medio de qRT-PCR con la técnica descrita por Melchior y colaboradores (Melchior *et al.*, 2010).
3. Determinar si RIPsc presenta actividad N-glicosidasa sobre los ribosomas de *E. coli* BL21(DE3)plysS.

SEGUNDA HIPÓTESIS

“RIPsc de *Streptomyces coelicolor* participa en mecanismos de defensa y/o de apoptosis.”

SEGUNDO OBJETIVO GENERAL:

Encontrar las condiciones bajo las cuales existe expresión de RIPsc.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Extraer ARN de diferentes cultivos de *S. coelicolor* en las condiciones a evaluar.
2. Determinar la expresión de *ripsc* por medio de RT-PCR.
3. Evaluar la expresión de *ripsc* por medio de Northern-blot y/o qRT-PCR.
4. Construir la fusión de la región promotora de *ripsc* con el gen reportero *egfp* y clonarla en un vector de expresión.
5. Transformar a *Streptomyces coelicolor* con la construcción clonada en el vector pIJ486.
6. Evaluar diferentes condiciones de cultivo para encontrar fluorescencia de la proteína reportera

TERCERA HIPÓTESIS

“La internalización y especificidad de RIPsc sobre una célula blanco serán alcanzadas por medio de su fusión con un péptido bio-activo.”

TERCER OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la expresión heteróloga de la fusión RIPsc con el péptido bio-activo seleccionado contra hongos y bacterias fitopatógenos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Selección *in silico* del péptido bio-activo a fusionar.
2. Fusión del péptido bio-activo con *ripsc*.
3. Clonación de la fusión obtenida en el vector de expresión pET17b.
4. Transformación de *E. coli* BL21(DE3)pLysS con la construcción obtenida en el vector pET17b.
5. Sobre-expresión de la fusión en *E. coli* BL21(DE3)pLysS por medio de la inducción con IPTG.
6. Evaluación de la proteína de fusión obtenida por medio de electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.
7. Purificación de la proteína de fusión.

6

MATERIALES Y MÉTODOS

*“Recordarás algo de lo que leas,
bastante de lo que oigas,
mucho de lo que veas,
y todo lo que hagas”*

Harrison

6.1 CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

***Escherichia coli* DH5 α**

Cepa de rutina utilizada para sub-clonar y amplificar plásmidos. Su genotipo es F⁻endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ -⁻. Las condiciones de cultivo utilizadas para esta cepa fueron medio LB (suplementado con el antibiótico apropiado), temperatura de incubación 37°C y 300 rpm de agitación. Las transformantes obtenidas con esta cepa pueden seleccionarse en agar suplementado con X-Gal a una concentración final de 50 μ g/ml (Invitrogen® 2004).

***Escherichia coli* BL21 (DE3)pLysS**

Cepa utilizada comúnmente en la sobre-expresión de proteínas tóxicas. Su genotipo es F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3) pLysS(cm^R). Presenta alta eficiencia en la expresión de cualquier gen clonado bajo el control del promotor T7. Es una cepa lisogénica del fago λ pues contiene el elemento DE3 (gen I del bacteriófago T7) que codifica a la T7 ARN polimerasa y se expresa bajo el control del promotor lacUV5 cuando se induce con IPTG. También contiene al plásmido pLysS en el que se encuentra clonado el gen codificante de la lisozima T7 y que a su vez le confiere resistencia a cloranfenicol. La lisozima T7 elimina los niveles basales de expresión del gen clonado bajo el control del promotor T7 pero no interfiere en la sobre-expresión. Otra característica importante de esta cepa es la deficiencia en la proteasa dependiente de la ATPasa Lon, que disminuye la degradación de la proteína recombinante expresada en la bacteria (Novagen® 2003). Las condiciones de cultivo utilizadas para esta cepa fueron, medio LB, suplementado con el antibiótico apropiado, temperatura de incubación 37°C y 300 rpm de agitación.

***Streptomyces lividans* TK24**

Bacteria Gram-positiva perteneciente al grupo de los actinomicetales. Normalmente se utiliza como hospedera en la producción heteróloga debido a que secreta bajas cantidades de proteasas extracelulares que pueden afectar los rendimientos de las proteínas producidas. Es una cepa derivada de *S. lividans* 66, resistente a estreptomicina y deficiente en los plásmidos SPL2 y SPL3 presentes en la cepa parental. Las condiciones de cultivo utilizadas fueron: para su propagación se cultivó en medio Phage o en medio R2 suplementados con el antibiótico correspondiente en caso de ser necesario y se incubó durante 48 h a 27°C y con agitación de 250 rpm, para la obtención de esporas se cultivó en medio SFM sólido suplementado con el antibiótico correspondiente en caso de ser necesario y se incubó durante 48 h a 27°C.

***Streptomyces coelicolor* M145**

Streptomyces coelicolor A 3(2), es la cepa mejor caracterizada genéticamente de los Actinomicetos (Bentley *et al.*, 2002). Se utiliza como modelo y aunque se ha publicado su genoma completo aun se desconoce la función de algunos genes. La cepa M145 se deriva de *Streptomyces coelicolor* A 3(2) y es deficiente en los plásmidos SCP1 y SCP2 presentes en la cepa parental. Las condiciones de cultivo utilizadas para esta cepa fueron: para su propagación se cultivó en medio Phage o en medio R2 suplementados con el antibiótico correspondiente en caso de ser necesario y se incubó durante 48 h a 27°C y con agitación de 250 rpm, para la obtención de esporas se cultivó en medio MS sólido suplementado con el antibiótico correspondiente en caso de ser necesario y se incubó durante 48 h a 27°C.

6.2 MEDIOS DE CULTIVO

Medio LB

Medio rico utilizado para la propagación y conservación de células bacterianas con la siguiente composición: NaCl, 5 g/l; triptona, 10 g/l; extracto de levadura, 5 g/l; pH 7.0 ±0.2. Para preparar medio sólido se adicionó agar bacteriológico a una concentración de 20 g/L.

Medio Phage

Medio rico utilizado en la propagación y conservación de actinomicetos con la siguiente composición: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.74 g/l; Glucosa, 10 g/l; triptona, 5 g/l; Extracto de levadura, 5 g/l; Lab Lemco powder, 5 g/l; pH 7.2

Medio R₂

Medio rico utilizado normalmente en la regeneración de protoplastos con la siguiente composición: sacarosa 103 g/l; K_2SO_4 , 0.25 g/l; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10.12 g/l; Glucosa, 10 g/l; Casaminoácidos, 0.1 g/l; Extracto de levadura, 1 g/l; Lab Lemco powder, 5 g/l. Por cada litro el medio se agregaron 100 ml de TES (0.25 M pH 7.2), 2 ml de solución de elementos traza (ZnCl_2 40 mg/l; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 200 mg/l; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 200 mg/l; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/l; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/l; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/l) y 10 mL de una solución al 0.5% de KH_2PO_4 . Antes de usarse se suplemento con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2mM en una proporción 1/1000 y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 36.8% en una proporción 1/100.

Medio MS

Medio utilizado en la producción de esporas con la siguiente composición: manitol 20 g/l; Harina de soya 20 g/l; 20 g/l de agar Difco. En este medio es muy importante utilizar agua de la llave.

Medio S

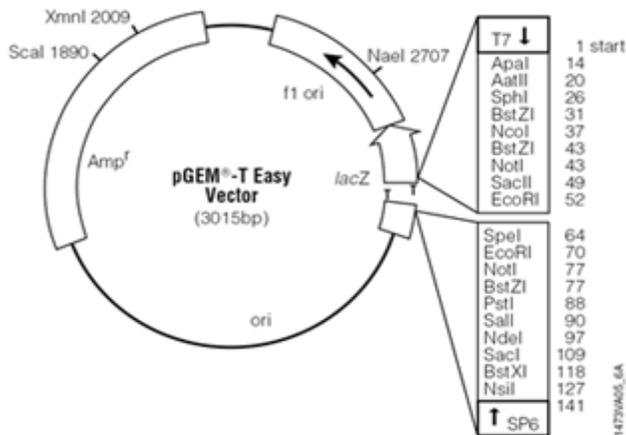
Medio utilizado en la producción de protoplastos con la siguiente composición peptona 4 g/l; Extracto de levadura 4 g/l; $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/l; KH_2PO_4 , 2 g/l y K_2HPO_4 4 g/l. Por cada litro adicionar 50 ml de glucosa al 6.6% y 12.64 ml de glicina al 20%.

Medio SMM

Medio mínimo utilizado para la producción de antibióticos de actinomicetos con la siguiente composición: polyetilenglicol 6000 6.1% (w/v), 81.9 ml; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 24g/l, 2.5ml; TES buffer (0.25M, pH 7.2), 10ml; NaH_2PO_4 + K_2HPO_4 (50 mM cada uno), 1ml; Glucosa 50% (w/v), 2ml; antiespumante 1% (w/v) 1ml; casaminoacidos Difco 20% (w/v) 1ml; Glicina 20%, 25 ml; Solución de elementos traza ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/l; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/l; NaCl 0.1 g/l), 100 μl .

6.3 PLÁSMIDOS Y CONSTRUCCIONES.

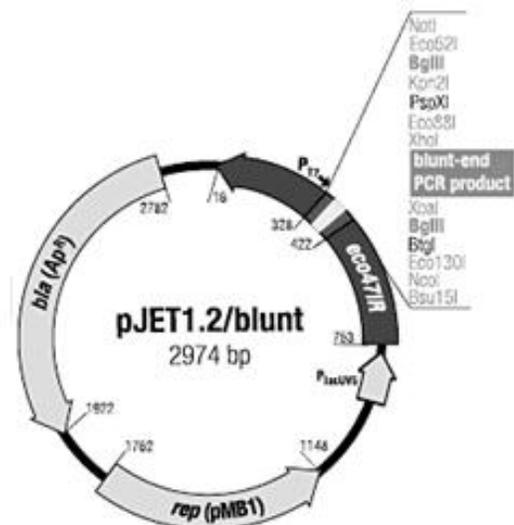
Los plásmidos y construcciones utilizados en el trabajo se describen a continuación.

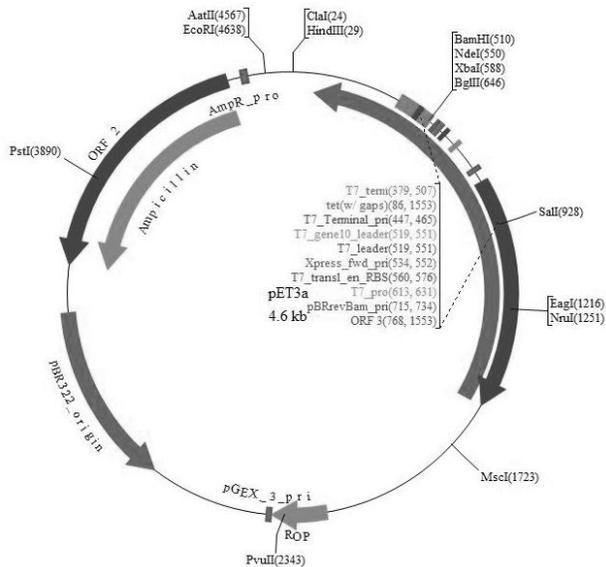


pGEM-T Easy: Plásmido para *E. coli*. Digerido con EcoRV y con un residuo de Timina en el extremo 3'. La incorporación de esta T incrementa la eficiencia de ligación de un producto de PCR en este vector puesto que la mayor parte de las polimerasas incorporan una A en ambos extremos 3' del producto de amplificación. Además, contiene una región de clonación múltiple o "polylinker" (multiple cloning region) flanqueada por los promotores SP6 y T7 de la ARN 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 ADN exógeno que se desea estudiar. También contiene un gen de resistencia a la ampicilina (Apm), pUC ori, un origen de replicación del fago f1, y un fragmento del gen lacZ capaz de complementar la mutación en la subunidad α de la β -galactosidasa presente en algunas cepas de *E. coli*.

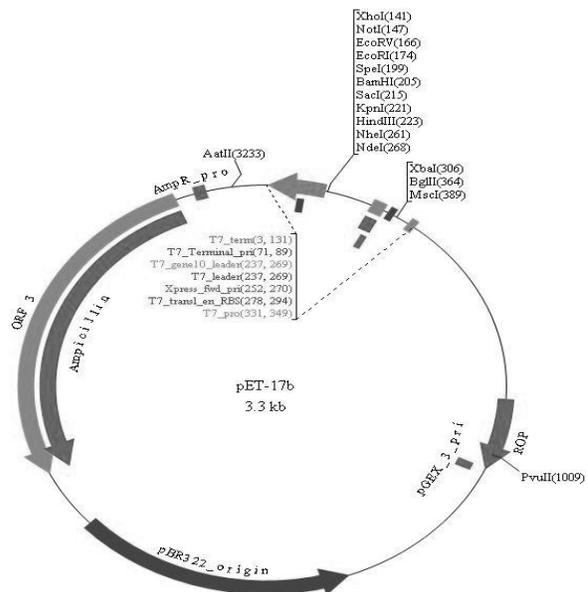
pJET 1.2/blunt: Vector de clonación de *E. coli*. Contiene un gen que codifica para una enzima de restricción letal que se inactiva al clonar un fragmento de ADN en el sitio de clonación por lo que solo las bacterias que contengan el plásmido clonado son capaces de sobrevivir. En caso de haber un plásmido religado la expresión de la proteína letal elimina aquellas colonias que lo contengan y el proceso de *screening* se facilita. Además contiene el promotor T7, el gen de resistencia a ampicilina y dos sitios *Bgl II* que flanquean el sitio de clonación.

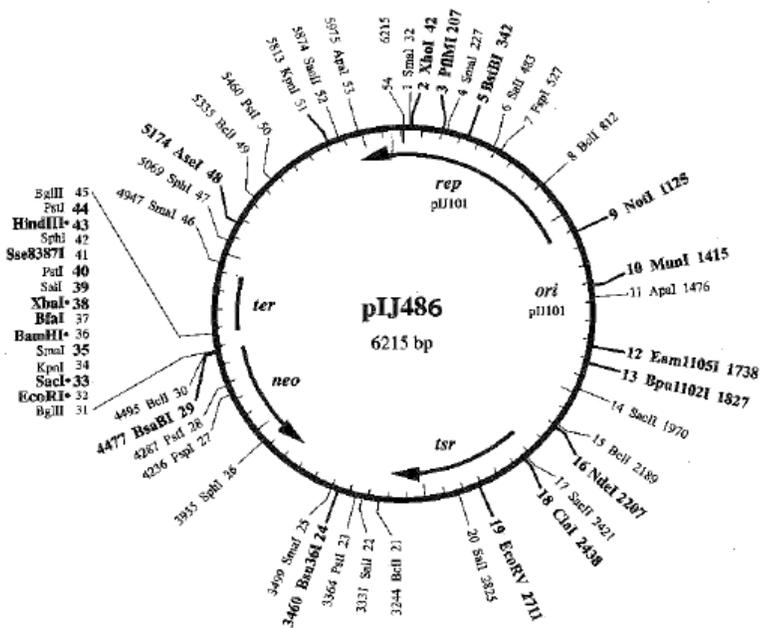




pET3a: Vector de expresión para *E. coli* de alto número de copias. Tiene un tamaño de 4.6 Kb, confiere resistencia frente al antibiótico ampicilina y posee el promotor y terminador de la T7 polimerasa.

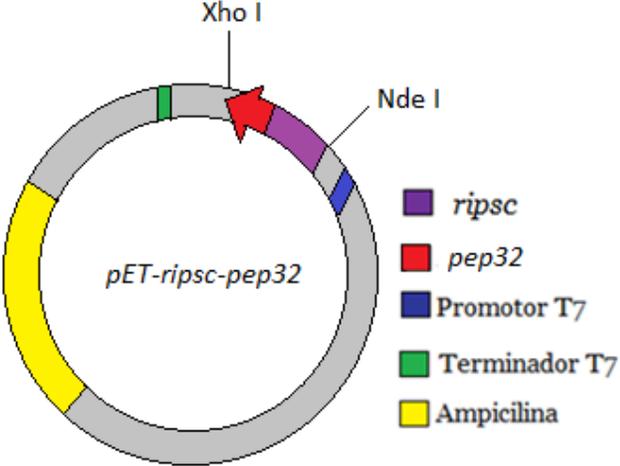
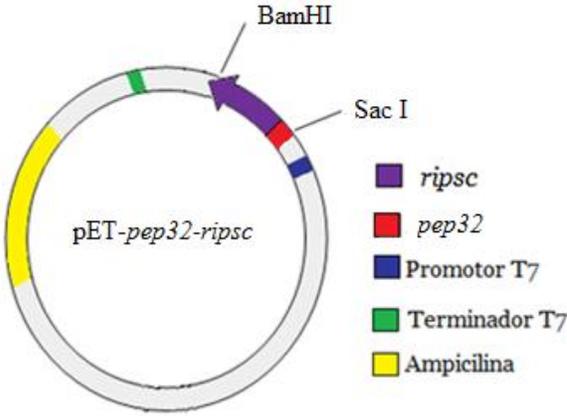
pET17-b: Como vector de expresión para *Escherichia coli* BL21 (DE) pLysS. Este plásmido tiene un tamaño de 3.3 Kb y confiere resistencia frente al antibiótico ampicilina, además de poseer el promotor y terminador de la polimerasa T7 (entre estas últimas secuencias se insertó el gen del péptido interés). Los genes que son clonados en plásmidos pET se encuentran bajo un estricto control de la transcripción del bacteriófago T7. La expresión es inducida por una fuente de la ARN polimerasa T7 en la célula hospedera (Novagen, 2003).





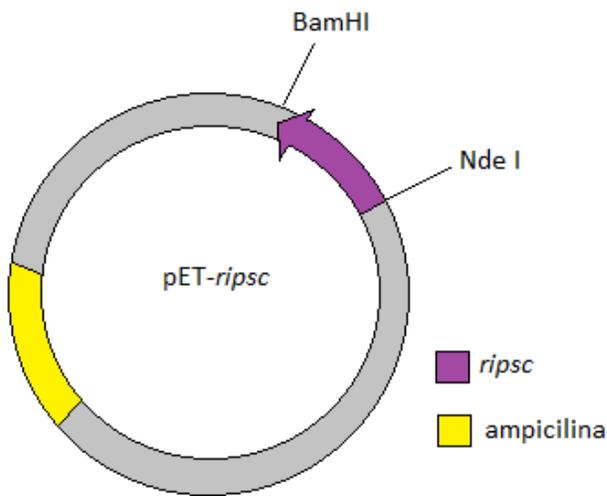
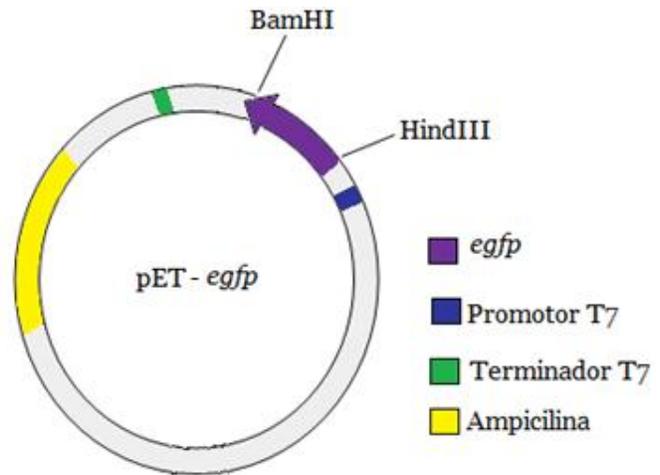
pIJ486 : Es un plásmido de expresión para *Streptomyces* de alto número de copias, que contiene un gen de resistencia al tiostrepton y con un tamaño de 6.2 Kb.

pET-pep32-ripsc: Plásmido derivativo de pET17b clonado con el fragmento *SacI/BamHI* que codifica la fusión PEP32-RIPSC.



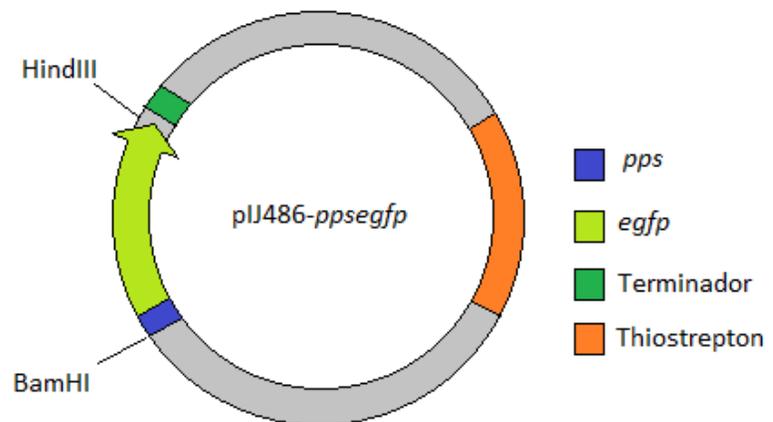
pET-ripsc-pep32: Plásmido derivativo de pET17b clonado con el fragmento *NdeI/XhoI* que codifica la fusión PEP32-RIPSC.

pET-*egfp*: Plásmido derivativo de pET17b clonado con el fragmento *Hind III/BamHI* que codifica a la proteína EGFP.



pET-*ripsc*: plásmido derivativo de pET3a clonado con el inserto *BamHI/NdeI* que codifica a la proteína RIPSC.

pIJ486-ppsegfp: Plásmido derivativo de pIJ486 clonado con el fragmento *BamHI/HindIII* que codifica la fusión PPS-EGFP en donde la fracción *pps* es la correspondiente a la región promotora de *ripsc* con la inclusión del péptido señal de *ripsc*.



6.4 OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos utilizados en el trabajo se resumen a continuación.

OLIGO	SECUENCIA	REFERENCIA
23S-FC	5' atgtcggctcatcacatcctgagg 3'	Reyes <i>et al.</i> , 2010
23S-RC	5' cccagctcgcgtaccactttaaa 3'	Reyes <i>et al.</i> , 2010
23S-FAde	5' actgaggggggctgctcctagta 3'	Reyes <i>et al.</i> , 2010
23S-RAde	5' tgcgtccactccggccaca 3'	Reyes <i>et al.</i> , 2010
RIPSC_FW	5' tactgcagatacgcccaacaggc 3'	Reyes <i>et al.</i> , 2010
RIPSC_RV	5' tacttaag tcacctttgcccgttgatggc 3'	Reyes <i>et al.</i> , 2010
rpoA_FW	5' -gaccggcctcgaggtcggctc-3'	Gust <i>et al.</i> , 2001
rpoA_RV	5' -cagatccgagcaggcggccg-3'	Gust <i>et al.</i> , 2001
RT-ripsc FW	5' tgggttcaccagacgacc3'	Este trabajo
RT-ripsc RV	5' cgtctccgctccggg3'	Este trabajo
PPSN_FW	5' taggatcccgcctcgaggtcgcgttccc3'	Este trabajo
PPSN_RV	5' gcccttgctcaccatggctgcagctctggg3'	Este trabajo
PPSEGFPN_FW	5' cccagagctgcagccatggtgagcaagggc3'	Este trabajo
PPSEGFPN_RV	5' cgcaagcttttactgtacagctcgtccatgcc3'	Este trabajo
EGFP_ColiF	5' taaagcttatggtgagcaagggcgagg 3'	Este trabajo
EGFP_ColiR	5' taggatccttactgtacagctcgtcc 3'	Este trabajo
PEP32RIP_FW	5' tagagctcatgcgtaaattggcattttgggatacgcccaacaggc 3'	Este trabajo
PEP32RIP_RV	5' taggatcctcacctttgcccgttgatggc 3'	Este trabajo
Rip_FW	5' tacatatggatacgcccaacaggcagacaacatacattgatttcc 3'	Este trabajo
RIP-PEP32_RV	5' tactcgagtcaccaaaaatgccattttacgcctttgcccgttgatgg 3'	Este trabajo
pET_FW	5' gctagtattgctcagcgggtgg 3'	Este trabajo
pET_RV	5' ggagctgcatgtgtcagagg 3'	Este trabajo
pIJ486_FW	5' cgcaattcctttagttgttcc 3'	Van Dessel <i>et al.</i> , 2003
pIJ486_RV	5' gcgaacgatcctcatcc 3'	Van Dessel <i>et al.</i> , 2003

6.5 Análisis *in silico* de la estructura y actividad de la RIP hipotética de *Streptomyces coelicolor*.

Con el objetivo de analizar la estructura y actividad de RIPsc de manera teórica en primer lugar se determinó el modelo estructural de la proteína empleando el servidor i-Tasser (Zhang, 2008), (<http://zhanglab.ccmb.med.unich.edu/I-TASSER/>), que es un servidor desarrollado por el centro de bioinformática de la Universidad de Kansas. La predicción que i-Tasser realiza es con base a la comparación de la secuencia secundaria de la proteína a modelar con las secuencias de otras proteínas del mismo tipo que ya cuentan con modelos cristalográficos y que han sido estudiadas previamente. Después de determinar el modelo estructural de RIPsc se comparó con la estructura de RIPs conocidas por medio de alineamientos estructurales realizados con el programa VMD.

Por otro lado, se estudió la estabilidad dinámica del modelo de RIPsc por medio de dinámica molecular con la ayuda del programa NAMD2.7 (Phillips *et al.*, 2005) (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>) con parámetros charmm27 (Mackerell *et al.*, 2000). Los programas de dinámica molecular se han desarrollado para calcular la energía potencial de sistemas que incluyen ADN, ARN y lípidos. Las condiciones utilizadas para la simulación fueron: proteína solvatada con una capa de 10 Å de agua tipo TIP3P formando una caja cúbica de ~88 Å³. Al sistema formado por la proteína y el agua se le agregó el número necesario de iones para obtener un sistema final con 0.15 M de KCl. La corrida de simulación se realizó bajo el ensamble NTP (número de partículas, presión y temperatura constantes). El tamaño del paso de integración fue de 2 fs. La simulación se llevó a cabo con el sistema completo (proteína, en medio acuoso con sal) a una temperatura de 298 K (25°C) y a una atmósfera de presión con condiciones periódicas a la frontera. Las condiciones periódicas a la frontera indican que las partículas se confinan en una caja, y podemos imaginar que ésta caja se replica un número infinito de veces en las tres direcciones cartesianas. Todas esas imágenes de partículas se mueven juntas, y por este hecho solo una de ellas se representa en el programa computacional. Con esto quedan eliminados los efectos de superficie en el sistema y las posiciones de los bordes en la caja ya no representan ningún efecto.

Finalmente se analizó la preferencia de RIPsc por alguna de las bases nitrogenadas implicadas en la actividad de las RIPs típicas, adenina y guanina, para lo que se estimó la energía libre de unión entre proteína y sustrato de manera teórica con los resultados de la dinámica molecular. El cálculo de la energía libre de unión ($G_{\text{unión}}$) se estimó empleando la ecuación:

$$G_{\text{unión}} = G_{\text{proteína/complejo}} - (G_{\text{proteína libre}} + G_{\text{sustrato}})$$

Antes de poder calcular la energía libre de unión es necesario calcular los valores de energía libre para cada componente (la energía libre de la proteína sin sustrato, del complejo proteína-sustrato y de los sustratos en solución). El valor G de cada componente se calculó mediante el método MM/PBSA (Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area), (Kuhn *et al.*, 2005), usando la siguiente ecuación:

$$G = E_{\text{MM}} + \gamma \text{ASA} + G_{\text{Solvatación}} + \text{Entropía}$$

donde E_{MM} es la suma de las energías mecánicas moleculares que incluyen la energía electrostática (E_{es}), la energía de Van der Waals (E_{vdW}) y energías internas (E_{int}) que en este caso fueron

obtenidas utilizando el programa CHARMM27; Δ ASA es el término debido al costo de introducir a la proteína en un medio acuoso (cavitación); $G_{\text{Solvatación}}$ es la energía libre de solvatación que se obtiene al pasar la molécula de un medio vacío a un medio acuoso y por último, la entropía del sistema.

Las simulaciones realizadas con RIPsc se utilizaron dos sustratos, una adenina y una guanina. De la misma manera y con el fin de comparar los resultados obtenidos también se simularon dos sistemas adicionales con RIPs que cuentan con estructuras cristalográficas publicadas. Tales sistemas fueron la RIP de *Phytolacca dioica* (pdb ID:2QES) que se eligió debido a la similitud de su secuencia con RIPsc pero una resolución atómica mayor (1.24 Å) y la RIP de *Shigella dysenteriae* (pdb ID:1R4Q) que fue elegida por tratarse de una RIP bacteriana.

6.6 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 Promega y Fermentas. Se realizaron reacciones estándar de PCR utilizando las enzimas Go-taq (Promega) y pfu (Fermentas). Generalmente, los fragmentos obtenidos de PCR fueron clonados en pGEMT-Easy o en pJET 1.2/blunt y después transferidos al vector escogido. Los oligonucleótidos fueron sintetizados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. La secuenciación del ADN fue llevada a cabo por el laboratorio divisional de Biología Molecular de la UAM-I. El ADN plasmídico fue aislado utilizando el kit de purificación “Wizard Plus SV Miniprep ADN purification System” de Promega Inc. El ADN fue extraído de geles de agarosa 1% usando el kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-up System” de Promega Inc. Los marcadores de peso molecular fueron provistos por Promega y Fermentas. Las ligaciones se llevaron a cabo con el uso de la T4 ligasa provista por Promega.

Transformación de *E. coli*

La transformación de *E. coli* se llevó a cabo por medio de electroporación, para lo cual se prepararon células electro-competentes de la siguiente manera: se aislaron colonias de la cepa de *E. coli* adecuada. Se seleccionó una colonia y se sembró en 5 ml de medio LB suplementado con el antibiótico necesario de acuerdo a la cepa, el cultivo se incubó *overnight* a 37 °C con una agitación de 300 rpm. Inmediatamente se inocularon 50 ml de medio LB suplementado con el

antibiótico adecuado con 1 ml del pre-cultivo y se incubó a 37 °C y a 300 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.6. En ese momento el cultivo se centrifugó a 3600 x g el pellet obtenido se lavó con 5 ml de agua esteril una vez y 2 veces con glicerol al 10%. Las células se re-suspendieron en un volumen adecuado de glicerol, se dividieron en alícuotas de 50 µl en tubos eppendorf y se congelaron con nitrógeno líquido, una vez congeladas se almacenaron a -80°C hasta su uso. Para la transformación se mezclaron 5 µl de la construcción con 50 µl de células electro-competentes y se electro-poraron con el uso de un electro-porador eppendorf 2510, en cubetas de 0.1 cm provistas por BioRad, el voltaje de transformación fue de 1100 V.

Transformación de *Streptomyces*

La transformación de los estreptomicetos se llevo a cabo mediante el uso de protoplastos de las cepas a transformar y con el uso de poli-etilenglicol que actúa como desestabilizador de la membrana y facilita así la captura de ADN exógeno. Los protoplastos se prepararon de la siguiente manera: se colocó un pre-cultivo en medio phage inoculado con 100 µl de una suspensión de esporas (1×10^6) y se incubó 30°C y 220 rpm durante 24 h. Después del tiempo de incubación, se inocularon 45 ml de medio S suplementado con glicina a una concentración final de 0.8% con los 5 ml del pre-cultivo previamente homogenizado y se incubó durante 24 h a 30°C y 220 rpm. La biomasa obtenida se colectó por medio de centrifugación (3600 x g y 5 min.) y se lavó con solución salina. Después se re-suspendió en 5 ml de buffer PTC (Sacarosa, 103 g/l; K₂SO₄, 0.25 g/l; MgCl₂.6H₂O, 2.03 g/l; CaCl₂.2H₂O, 2.94 g/l; TES buffer (pH7.2, 0.25 M), 80 ml/l; Solución de elementos traza (ZnCl₂, 40 mg/l; FeCl₃.6H₂O, 200 mg/l; CuCl₂.2H₂O, 10 mg/l; MnCl₂.4H₂O, 10 mg/l; Na₂B₄O₇.10H₂O, 10 mg/l; (NH₄)₆ MO₇O₂₄.4H₂O, 10 mg, 2 ml/l.), suplementado con lisozima a una concentración de 10 mg/ml y se incubó a 30°C a 120 rpm. La suspensión se monitoreó por medio de la observación al microscopio hasta que se observó la formación de protoplastos (30 min. aproximadamente). Una vez obtenidos los protoplastos se agregaron 10 ml de PTC y se resuspendió por pipeteo, la suspensión se centrifugó a 800 rpm durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se centrifugó nuevamente a 3600 x g durante 5 min. El *pellet* obtenido se lavó con 5 ml de PTC y después se resuspendió en el volumen necesario para tener un valor de densidad óptica de 1. De la suspensión de protoplastos obtenida se hicieron alícuotas de 200 µl que se almacenaron a -80°C hasta su uso. Para transformar se descongeló una alícuota de protoplastos en un baño de agua a 37°C, se agregaron 10 µl de ADN plasmídico y se mezcló cuidadosamente por pipeteo. Se agregaron 500 µl de PEG 6000 al 35%(v/v) y se mezcló por pipeteo La mezcla se incubó durante 5 min. a temperatura ambiente. Después del tiempo de

incubación se inocularon cajas de medio R₂ con 150 µl de mezcla de transformación y se incubaron a 30°C durante 24 h. Después de este tiempo se agregó el antibiótico de selección a las cajas por medio de la técnica de difusión en agar y se incubaron a 30°C hasta obtener transformantes.

Selección de transformantes

Para llevar a cabo la selección de transformantes, en primer lugar se hizo uso de los marcadores moleculares adecuados que confieren resistencia a algún antibiótico pero también en algunos casos fueron seleccionadas por medio de la técnica de PCR de colonia. Para el caso de *E. coli* primero se preparó la mezcla de PCR de manera habitual conteniendo los oligos adecuados que flanquean la zona a comprobar. Después con la ayuda de una punta estéril se picó la colonia en cuestión y se dejó remojando dentro del tubo con la mezcla de PCR durante 2 min. para ser utilizada como ADN molde. Por otro lado en el caso de los *Streptomyces*, primero se liso la colonia a seleccionar en 10 µl de DMSO. Después, 1 µl de la mezcla de lisis se transfirió a un tubo de PCR conteniendo la mezcla habitual para la reacción.

6.7 MANIPULACIÓN DE ARN

El reto principal en la manipulación de ARN es mantener las condiciones adecuadas para poder obtener ARN de calidad, libre de contaminantes y en buena concentración. Las RNAsas son proteínas altamente estables y difíciles de inactivar (Fleige *et al.*, 2006). Por tal razón, todo el trabajo realizado con ARN se llevó a cabo bajo esterilidad y asepsia absoluta, de acuerdo a condiciones estándar (Sambrook *et al.*, 1989). Los métodos utilizados para la extracción de ARN total fueron la técnica del trizol y el sistema del kit de extracción *SV Total RNA isolation system* de Promega. La calidad del ARN obtenido se midió en un espectrofotómetro nanodrop 2000 provisto por *Thermo scientific*. En los casos necesarios, se realizó la electroforesis de ARN bajo condiciones desnaturalizantes con el uso de formaldehído (3 ml por cada 50 ml de agarosa 1%) y con el buffer de corrida MAE (10X, 0.2 M MOPS, 50 mM acetato sódico y 10 mM EDTA, ajustado a pH 7.0 con NaOH.). El agua y todas las soluciones utilizadas para cada experimento de manipulación de ARN fueron tratadas con DEPC y preparadas o almacenadas en recipientes libres de nucleasas.

RT-PCR

La técnica de transcriptasa reversa-PCR (RT-PCR) consiste en el empleo de una transcriptasa reversa para generar un ADN complementario a partir de un ARN mensajero específico, y

posteriormente, amplificar este ADN complementario por medio de la reacción en cadena de la polimerasa clásica. Su aplicación es útil en el estudio de la expresión génica a nivel semi-cuantitativo o cualitativo. Para la realización de esta técnica molecular se usó el kit One step RT-PCR provisto por Quiagen, bajo las indicaciones del fabricante. El ARN total utilizado como molde fue previamente tratado con DNAsas con el fin de eliminar resultados debidos a la contaminación por ADN. Como control negativo se corrió un PCR clásico utilizando ARN como molde, para el control positivo en cuanto a la calidad del ARN se utilizó como *house-keeping gene* la sub-unidad alfa de la ARN polimerasa (*rpoA*).

Northern-blot

La hibridación de ácidos nucleicos es una técnica útil en la detección de moléculas específicas. Northern-blot es el nombre dado a la hibridación a partir de ARN para buscar la señal de un ARN mensajero con el uso de una sonda marcada radiactivamente y determinar la expresión génica. La técnica fue utilizada para obtener resultados cuantitativos de la expresión de *ripsc* para lo cual, se aisló ARN total por medio de la técnica de trizol. Se separaron 10 µg de ARN total por medio de electroforesis en geles desnaturalizantes (3 ml de formaldehído por 50 ml de agarosa 1%). Después de la separación las muestras fueron transferidas a membranas de nylon hybond N provistas por amersham bajo condiciones estándar (Sambrook *et al*; 1989) usando como buffer de transferencia SSC 1X (10x NaCl 1.5 M + Citrato de sodio 0.15 M, ajustado a pH 7 con HCl 0.1 N.). Las muestras de ARN transferidas fueron fijadas por medio de NaOH 0.05 M. Para la hibridación se utilizaron como sonda 50 ng del gen amplificado *ripsc* que se marcó radiactivamente con el isótopo ³²P y con el uso del kit labelling beads provisto por amersham siguiendo las instrucciones del fabricante, como control positivo se fijó a un trozo de membrana la sonda sin marcar, las señales fueron reveladas en una película Hyperfilm™ MP provista por amersham, la medición de las señales se hizo por medio de densitometría con el uso del programa imageJ.

PCR en tiempo real (qRT-PCR)

La técnica de PCR en tiempo real es una técnica que permite detectar, amplificar y cuantificar secuencias específicas de ADN. Además de proporcionar información cuantitativa el hecho de que los datos sean tomados en la fase exponencial del proceso de amplificación, permite detectar pequeñas variaciones en la cantidad de ARN inicial siendo por tanto un método muy sensible. Para la realización de la técnica con la finalidad de estudiar la expresión de *ripsc* en primer lugar se aisló

ARN total con la ayuda del kit de extracción *SV Total RNA isolation system* de Promega, después se cuantificó y evaluó la calidad de las muestras con el uso de un espectrofotómetro nanodrop 2000. Con la finalidad de normalizar las muestras y evitar variaciones en la expresión debidas a concentraciones dispares entre muestras se realizó una corrida de qRT-PCR para amplificar la subunidad alfa de la ARN polimerasa utilizada como gen *house-keeping* y con los valores de CT obtenidos se ajustó la concentración de ARN en todas las muestras. Para obtener de manera cuantitativa los valores de expresión de *ripSc*, se realizó una curva patrón de 5 puntos tomando como molde la construcción pET-*ripSc* y con los oligos que flanquean la región codificante *ripSc*, las concentraciones utilizadas para la curva patrón fueron en el rango de 20 ng y 2×10^{-4} ng con una variación de 10 ordenes de magnitud por punto. La química de detección usada fue SYBRN Green bajo el uso del kit EXPRESS One-Step SYBR® GreenER™ provisto por invitroge y siguiendo las recomendaciones del fabricante. El termociclador utilizado para las corridas de qRT-PCR fue un Rotor-Gene RG-3000 de Corbett Research, los datos fueron analizados con el software provisto por el fabricante del equipo.

Determinación de la actividad N-glicosidasa por qRT-PCR

La característica principal de las RIPs es su capacidad de remover una adenina específica en la subunidad mayor de los ribosomas sobre los cuales actúan por medio de la escisión de un enlace glicosídico. Melchior y colaboradores desarrollaron un método basado en la técnica molecular qRT-PCR por medio de la cual se aprovecha el hecho de que la transcriptasa reversa agrega de manera preferencial una T cuando encuentra un sitio sin base en el ARN durante la amplificación, de tal manera puede detectarse el daño de manera específica sobre ribosomas tratados con una RIP (Melchior *et al.*, 2010). La actividad N-glicosidasa de RIPsc fue medida sobre ribosomas de *E. coli* BL21(DE3)plysS-[*pet-ripSc*]. En primer lugar, se diseñaron dos pares de oligos, el primer par (23S-FC y 23S-RC) que flanquea la secuencia del ARN ribosomal afectada por RIPsc y usados como control y el segundo par (23S-FAde y 23S-RAde) diseñado para detectar de manera específica la secuencia del rARN de *E. coli* alterada por RIPsc con una trasversión A→T. Después se tomaron muestras de cultivos de *E. coli* BL21(DE3)plysS-[*pet-ripSc*] inducida con IPTG 1mM, durante diferentes puntos de la curva de crecimiento y se extrajo ARN total con el uso del kit *SV Total RNA isolation system* de Promega, como control negativo se utilizó un cultivo de la misma cepa sin inducción. Para normalizar las muestras y evitar variaciones en la expresión debidas a concentraciones dispares entre muestras se realizó una corrida de qRT-PCR del control con los oligos (23S-FC y 23S-RC) y con los valores de CT obtenidos se ajustó la concentración de ARN en

todas las muestras. Con las concentraciones de ARN ajustadas en cada muestra, se hizo la corrida de evaluación con los oligos 23S-FAde y 23S-RAde.

6.8 MANIPULACIÓN DE PROTEINAS.

El conocimiento de las secuencias de ADN que integran nuestros genes no tiene un gran valor, si no se identifica cual es la función de dichos genes, en su caso, para que proteínas codifican. En el estudio de la aplicación de RIPsc se construyeron proteínas quiméricas con el objetivo de brindar especificidad. En primer lugar se sobre-expresó la proteína de interés en *E. coli* BL21(DE3)pLysS y después se separó en fracciones solubles e insolubles, dichas fracciones fueron analizadas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

Sobre-expresión proteica por inducción en *E.coli* BL21(DE3)pLysS

La sobre-expresión de las proteínas quiméricas PEP-RIPsc y RIPsc-PEP fue llevada a cabo en el sistema de expresión pET17b con células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS, que es regulado bajo la inducción con IPTG. Para inducir, primero se tomó una colonia transformada, se pre-cultivó en 5 ml de medio LB suplementado con ampicilina a una concentración final de 50 µg/ml y cloranfenicol a una concentración final de 32 µg/ml en condiciones de crecimiento para *E. coli* (37°C, 200 rpm). Los 20 ml del pre-cultivo 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 h. Al terminó de las 4 h 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).

Separación de fracciones proteicas 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, 2 h, 3 h y 4 h. Las muestras fueron centrifugadas (3 min. 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 min. 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 min. 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 min. 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.

Electroforesis SDS-PAGE

Las fracciones proteicas 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.

7

RESULTADOS

“When you make the finding yourself ,
even if you’re the last person on Earth to see the light,
you’ll never forget it”

Carl Sagan

7.1 Análisis *in silico* de la estructura y actividad de la RIP hipotética de *Streptomyces coelicolor*

La secuencia de RIPsc fue analizada con la ayuda de herramientas computacionales como BLAST, DNA man, Signal P y VMD con el objetivo de hallar información predictiva acerca de su estructura y actividad, dentro de los resultados obtenidos en primer lugar se determinó que en contraste a las Shiga toxinas (únicas RIPs bacterianas conocidas), la RIP de *Streptomyces coelicolor* es una RIP del tipo 1, codificada por un solo gen y compuesta además por un péptido señal delante del dominio RIP.

Por otro lado, para poder predecir la estructura terciaria de RIPsc se usó la base de datos PDB en la que se encuentran almacenados las secuencias, modelos y estructuras cristalográficas de las proteínas estudiadas previamente. En el análisis se determinaron las estructuras con similitud significativa. Dicha determinación se lleva a cabo comparando la secuencia en estudio con las secuencias disponibles en la base de datos. Las proteínas encontradas se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. RIPs reportadas por PDB con similitud mayor al 14% con respecto a *S. coelicolor*

PDB ID	Resolución (Å)	Nombre de la proteína	Organismo	Similitud %
1ABR	2.14	abrin-a	<i>Abrus precatorius</i>	15
1AHA	2.2	α -momorcharin	<i>Momordica charantia</i>	16
1AHB	2.2	α -momorcharin	<i>Momordica charantia</i>	16
1AHC	2.2	α -momorcharin	<i>Momordica charantia</i>	16
1BRY	2.1	bryodin I	<i>Bryonia dioica</i>	15
1CE7	2.7	RIP type II	<i>Viscum album</i>	19
1CF5	2.55	β -momorcharin	<i>Momordica charantia</i>	15

1D6A	2.1	pokeweed antiviral protein	<i>Phytolacca americana</i>	16
1F8Q	2.2	α -momorcharin	<i>Momordica charantia</i>	18
1HWM	2.8	ebulin	<i>Sambucus ebulus</i>	15
1HWN	2.8	ebulin	<i>Sambucus ebulus</i>	15
1HWO	2.9	ebulin	<i>Sambucus ebulus</i>	15
1HWP	3.1	ebulin	<i>Sambucus ebulus</i>	15
1M2T	1.89	mistletoe lectin I	<i>Viscum album</i>	15
1MOM	2.16	momordin	<i>Momordica charantia</i>	16
1MRG	1.8	α -momorcharin	<i>Momordica charantia</i>	18
1MRH	2	α -momorcharin	<i>Momordica charantia</i>	18
1MRI	2.2	α -momorcharin	<i>Momordica charantia</i>	18
1NIO	2	β -luffin	<i>Luffa aegyptiaca</i>	17
1ONK	2.1	β -galactoside specific lectin i	<i>Viscum album</i>	15
1OQL	3	mistletoe lectin i	<i>Viscum album</i>	16
1PAF	2.5	pokeweed antiviral protein	<i>Phytolacca americana</i>	16
1PAG	2.8	pokeweed antiviral protein	<i>Phytolacca americana</i>	16
1PC8	3.8	himalayan mistletoe RIP	<i>Viscum album</i>	20
1PUM	2.3	lectin i	<i>Viscum album</i>	16
1PUU	2.3	lectin i	<i>Viscum album</i>	16
1QCG	2.1	pokeweed antiviral protein	<i>Phytolacca americana</i>	16
1QCI	2	pokeweed antiviral protein	<i>Phytolacca americana</i>	16

1QCJ	2.1	pokeweed antiviral protein	<i>Phytolacca americana</i>	16
1SZ6	2.05	rRNA n-glycosidase a	<i>Viscum album</i>	16
1TFM	2.8	himalayan mistletoe RIP	<i>Viscum album</i>	20
1YF8	2.8	β -galactoside-specific lectin 4	<i>Viscum album</i>	20
2G5X	1.7	RIP	<i>Lychnis chalconica</i>	22
2MLL	2.7	RIP type ii	<i>Viscum album</i>	19
2OQA	1.4	luffaculin 1	<i>Luffa acutangula</i>	15
2QN3	3.5	agglutinin-1	<i>Abrus precatorius</i>	16
2R9K	2.7	β -galactoside-specific lectin 1	<i>Viscum album</i>	15
2RG9	1.95	β -galactoside-specific lectin 1	<i>Viscum album</i>	16
2ZR1	2.6	agglutinin-1	<i>Abrus precatorius</i>	17
3BWH	1	cucurmosin	<i>Cucurbita moschata</i>	15
3CTK	1.8	rRNA n-glycosidase	<i>Bougainvillea spectabilis</i>	17
3HIQ	2.19	vacuolar saporin	<i>Saponaria officinalis</i>	16
3KTZ	1.6	RIP gelonin	<i>Gelonium multiflorum</i>	16
3KUO	1.9	RIP gelonin	<i>Gelonium multiflorum</i>	16

La similitud de las estructuras encontradas es baja, apenas mayor a un 14%, pero es interesante resaltar que la secuencia de RIPsc conserva residuos importantes del sitio activo de las RIPs, lo que puede constatarse por medio del alineamiento de la secuencia de RIPsc con la secuencias de proteínas RIP estudiadas y caracterizadas (Figura 10). Bajo este hecho se sugiere que a pesar de que RIPsc presenta baja similitud en la secuencia total, la conservación de los residuos importantes para el sitio activo hacen que tenga actividad N-glicosidasa característica de cualquier RIP.

```

2qes      -----VNTITFDVG--NATINKYATFMESLRNEAKDPTLKCYGIPMLP----DSNLTPK
shiga     -----KEFTLDFSTA--KTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGDNLFAVD
rips      DTPNRQTTYIDFHVDPEIDNVPHYRSVVQQLRRGAGHLIHGNNIYETMGQGQNALVLN
          : * .      : . . :      : . . :
          : * .      : . . :      : . . :

2qes      YVLVKLQDASSKITITMLLRNNLYVMGYSDLYNGKCRYHIFNDISSTESTDVENTLCPNS
shiga     VRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRN--NVFYRFADFS-----HVTFPGT
rips      LYNAD----WVHQTTLYFNASNLYLVGFKSRTG---QAYLFSDASAN----AREEVGREV
          .      : * .. .***: *: . .      : * * *      .

2qes      NSREKKAINYNSQYSTLQNKAGVSSRSQVQLGIQILNSDIGKISGVSTFTDKT-----E
shiga     TAVT---LSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQS-----V
rips      RGAPVTTLPFAGSYTSLVNLTLPGAETEPTTIGIYIQTNMEALARTPNPAAATGAYRGS
          .      : ..*::* .      :      : : : .      :

2qes      AEFLLVAIQMVSEAARFKYIENQVKTNFN----RAFNPNPKVLSEENWGKISLAIHNAK
shiga     ARAMLRFVTVTAEALRFQIQRGFRITLDDLGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLLSSVLP---
rips      ARAMLIMIGAFAEARFPMFRDHFEEAFRRFANPSVVVTPTMQALRTAWGQMSRWVQQLV
          *. :* : : ** ** :. .:: :      : .. * **::* :

2qes      NGALTSPLELKNADDTKWIVLRVDEIKPDMGLLNIVSGTCQTT
shiga     -----DYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILN-CH--
rips      SGPPPTP-AVFGSGVYFFVLASWEDVDKYLRAINGQR-----
          . .      .:. : :

```

Figura 10. Alineamiento de la secuencia de las estructuras estudiadas en este trabajo. Las posiciones subrayadas en negritas se refieren a posiciones semiconservadas (verde), conservadas (azul) e idénticas (rojo) del alineamiento de la RIP de *S. coelicolor* y las estructuras de la Tabla 3.

Por otro lado y de acuerdo a las secuencias similares encontradas, se estableció el modelo estructural teórico de RIPsc con la ayuda del programa i-Tasser. Dicho programa analiza las estructuras disponibles y las compara con la secuencia de la proteína estudiada para encontrar el mejor modelo probable. El programa i-Tasser determinó cinco modelos con base a las estructuras mostradas en la tabla 4. De los cinco modelos obtenidos, el elegido fue el que presentó un valor de C-score de 0.83 que es el más cercano a 2 (Figura 11 Modelo de RIPsc elegido). El C-score es una función de medida desarrollada para el servidor i-Tasser que correlaciona la densidad relativa de agrupamiento estructural, tomando en cuenta los modelos existentes de proteínas estudiadas, con la puntuación de importancia en el consenso de varias plantillas de plegamiento. Dicho valor estima la exactitud del modelo predicho y entre más cercano a 2 es más confiable.

Tabla 4. Estructuras cristalográficas usadas por i-Tasser para determinar el modelo de RIPsc

PDB ID	Resolución (Å)	Proteína	Organismo	Score vs. RIPsc
3KU0	1.90	Gelonina	<i>Gelonium multiflorum</i>	16
2VLC	2.95	Cinamomina III	<i>Cinnamomun camphora</i>	15
1IFT	1.8	Ricina	<i>Ricinus communis</i>	14
1ABR	2.14	Abrina	<i>Abrus precatorius</i>	15
1BR6	2.30	Ricina	<i>Ricinus communis</i>	14
1HWM	2.80	Ebulina	<i>Sambucus ebulus</i>	15
1FMP/3RTI	2.80	Ricina	<i>Ricinus communis</i>	14

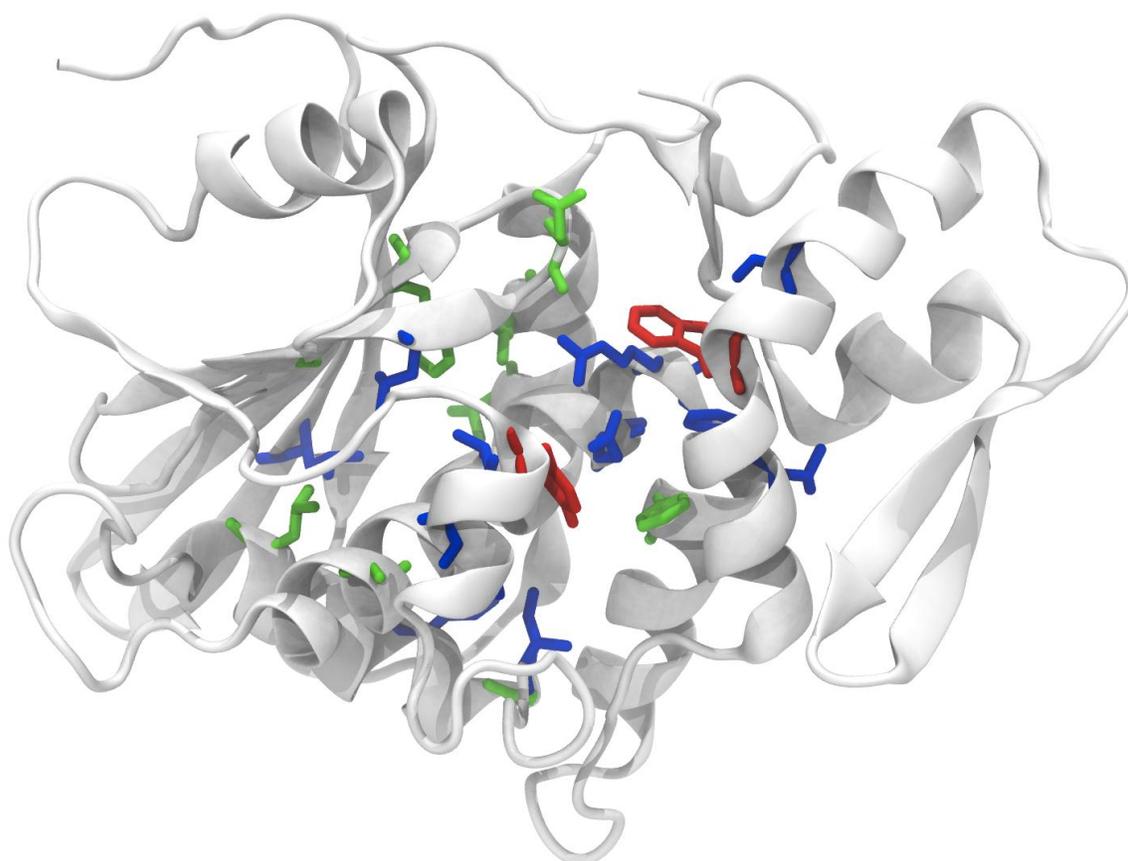


Figura 11. Residuos semiconservados (verde), conservados (azul) e idénticos (rojo) obtenidos del alineamiento de la RIPsc y las secuencias de la Tabla 4 mapeados en el modelo obtenido por i-Tasser.

Después, el modelo teórico obtenido de RIPsc se comparó con el modelo cristalizado de *Phytholaca dioica*, para lo cual se acoplaron ambas estructuras con el programa VMD (Figura 12). Con el acoplamiento se observa claramente la similitud del plegamiento final de RIPsc con las RIPs y se demuestra que el modelo obtenido cuenta con las características estructurales importantes para llevar a cabo la actividad N-glicosidasa a pesar de presentar baja similitud.

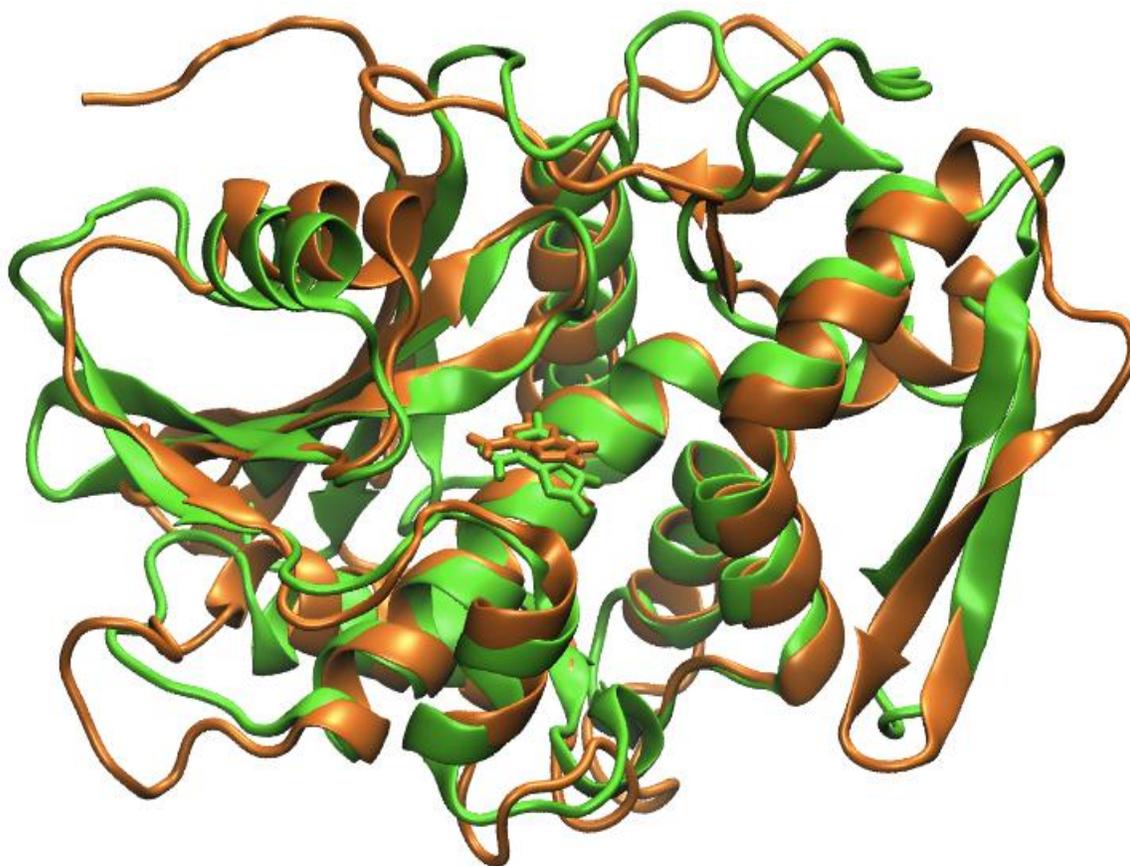


Figura12. Acoplamiento estructural de RIPsc (naranja) y RIP de *P. dioica* realizado con el programa VMD.

Además de la predicción de la estructura de RIPsc y de su similitud con las estructuras de RIPs conocidas, un punto no menos importante es el análisis de la estabilidad del modelo obtenido, que en este caso, se estudió por medio de dinámica molecular. De acuerdo con los resultados, la estructura predicha para RIPsc es estable a través del tiempo. La estabilidad se demuestra con las gráficas de la RMSD (Figura 13, RIPsc, línea roja) que indica la superposición de los conjuntos de

coordenadas atómicas de los átomos pesados, así como una distancia media cuadrática mínima (o RMSD, de *Root Mean Square Deviation*, o desviación de la media cuadrática) de la estructura simulada en medio acuoso a través del tiempo. En la gráfica puede observarse la fluctuación de la estructura en un sistema acuoso, dicha fluctuación es debida a la variación en la conformación de la estructura debida al sistema en el que se encuentra. La observación más importante del resultado es que la estructura se estabiliza y deja de fluctuar, demostrándose así que el modelo es confiable. Además en la gráfica se muestra la RMSD de la RIP de *Phytolacca dioica* (línea negra) en las mismas condiciones para RIPsc y se observa que el comportamiento es similar. La estructura de *P. dioica* es una estructura cristalográfica por lo que el hecho de contar con la comparación de su RMSD con la RMSD de RIPsc sustenta la estabilidad del modelo obtenido para RIPsc.

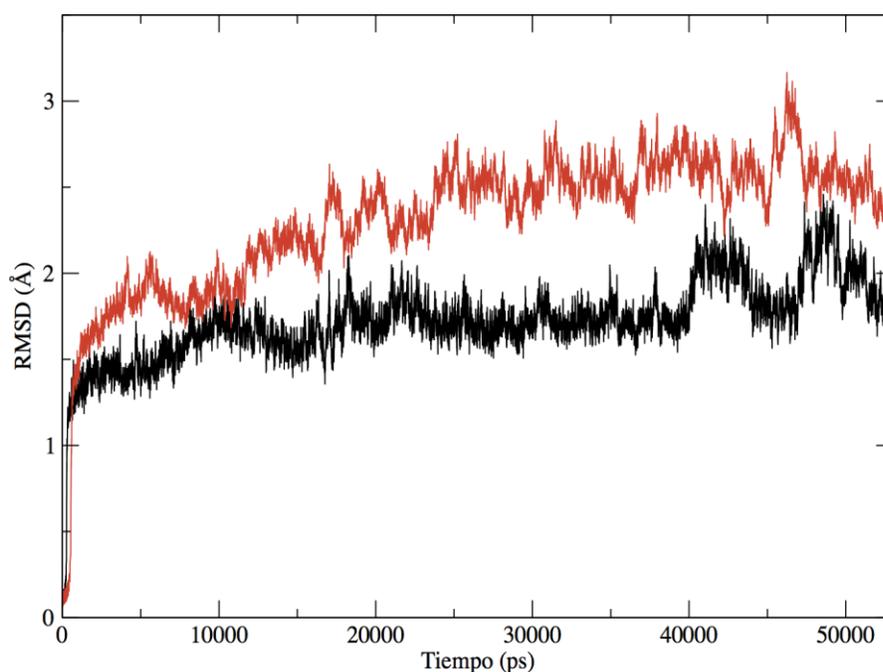


Figura13. RMSD con respecto al tiempo de RIPsc de *S. coelicolor* (en rojo) y de la RIP de *P. dioica* (negro) obtenida por medio de dinámica molecular.

Luego de analizar la estabilidad del modelo obtenido para RIPsc y demostrar de manera teorica su confiabilidad también se examinaron características importantes en la estructura de RIPsc para el desarrollo de la actividad N-glicosidasa típica de las proteínas Inactivadoras de los ribosomas, en

primer lugar se delimitó el sitio activo y se comparó gráficamente con el sitio activo de la RIP de *P. dioica* (Figura 14), observándose alta similitud en la configuración espacial de ambos. Por otro lado se llevó a cabo la simulación de la preferencia de RIPsc por dos sustratos distintos, adenina y guanina, esto en base a los reportes que demuestran que algunas RIPs como PAP además de remover la típica adenina remueven también guanina (Kurinov *et al.*, 1999) dándole a la proteína características distintas en actividad tales como un espectro más amplio de acción. La determinación se realizó con el análisis de las energías libres de unión de ambos sustratos (Tabla 5), obtenidas por dinámica molecular y simulaciones tal como se detalla en la sección de materiales y métodos. La preferencia de RIPsc por alguno de los sustratos estudiados resulta importante para establecer el tipo de actividad específica que esta realiza pues en caso de determinarse su preferencia por guanina en lugar de adenina los ensayos experimentales tendrían que ser modificados y ajustados para demostrar dicha actividad.

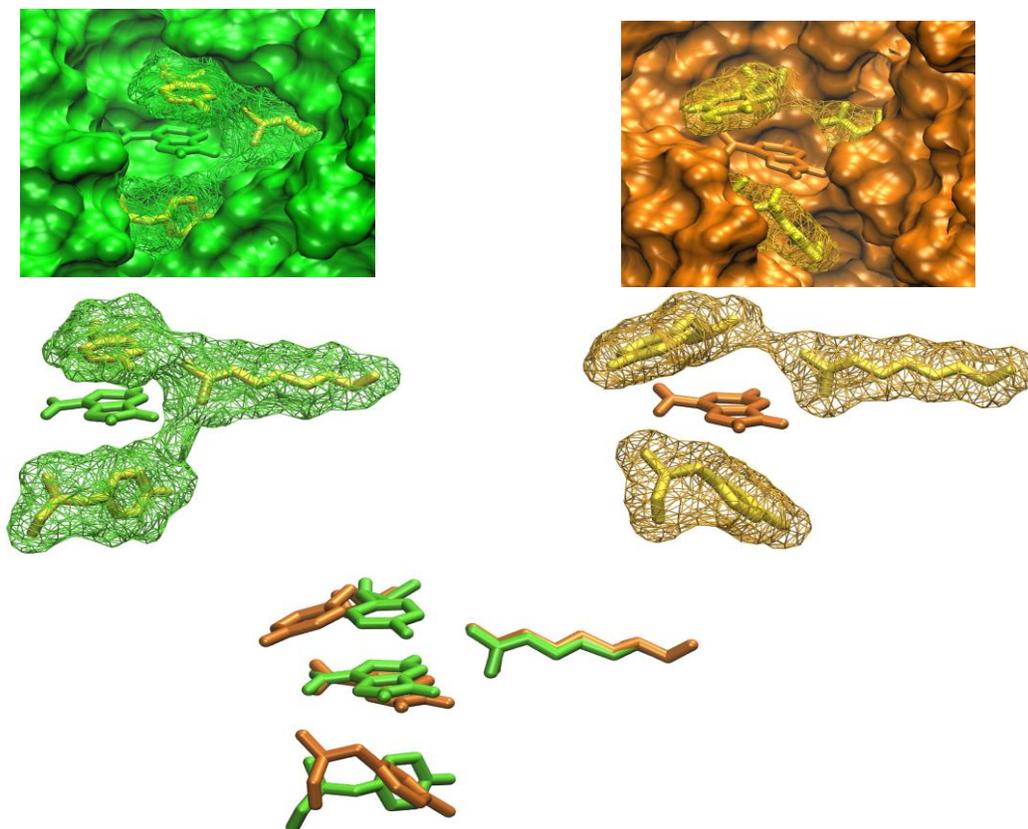


Figura14. Modelo estructural teórico del sitio activo de RIPsc (naranja) y la RIP de *P. dioica* obtenido con el programa VMD.

Los resultados obtenidos de la simulación hecha para demostrar la preferencia de RIPsc por adenina y guanina se resumen en la tabla 5. De manera adicional se realizó la misma simulación para sistemas conocidos, por un lado la RIP de una planta (*P.dioica*) y por otro una RIP bacteriana (Shiga Toxina).

Tabla 5. Energías libres obtenidas en este trabajo (kcal/mol) para la simulación de la actividad de RIPsc con dos sustratos distintos.

Sistema	ΔG de Unión	ΔG de Interacción	ΔG de Def. proteína	ΔG de Def. Nucleótido
Planta/ADE	2.51 (0.22)	2.64 (0.18)	0.00 (0.03)	-0.13 (0.28)
Planta/GUA	10.33 (0.23)	10.36 (0.16)	0.02 (0.03)	-0.05 (0.28)
Shiga/ADE	2.52 (0.22)	2.63 (0.17)	0.01 (0.03)	-0.12 (0.28)
Shiga/GUA	10.35 (0.23)	10.41 (0.18)	0.04 (0.03)	-0.10 (0.29)
<i>S. coelicolor</i> /ADE	2.46 (0.22)	2.64 (0.18)	-0.05 (0.03)	-0.13 (0.29)
<i>S. coelicolor</i> /GUA	10.22 (0.23)	11.07 (0.19)	-0.09 (0.03)	-0.76 (0.30)

En la tabla 5 se muestran los valores de las energías libres obtenidas tras la simulación de la actividad de las RIPs estudiadas con dos sustratos distintos, adenina y guanina. Las energías libres que se muestran son las correspondientes a la unión de cada una de las RIPs con cada uno de los sustratos, además también se muestran las energías libres de interacción de cada una de las RIPs con cada uno de los sustratos y las energías libres generadas por la deformación tanto de la proteína como de los sustratos al interactuar. Resulta importante señalar que la energía libre de unión se obtiene de la suma de las energías de interacción y deformación, por lo que de los datos obtenidos puede concluirse en cada uno de los casos que la unión de todas las proteínas simuladas es más favorable con adenina que con guanina, hecho que puede soportarse con datos experimentales obtenidos para *P. dioica* y Shiga toxina (Maro *et al.*, 1999; Sandvig *et al.*, 1993). Por su parte, el resultado obtenido para RIPsc predice que de manera experimental, RIPsc mostrará actividad N-glicosidasa sobre adenina de la misma manera que ha sido demostrada para las RIPs que se tomaron como referencia en este trabajo.

7.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD N-GLICOSIDASA DE RIPsc.

La actividad N-Glicosidasa de RIPsc recombinante fue demostrada por medio de un ensayo novedoso descrito por Mellchior y Tolleson (Mellchior *et al.*, 2010), detallado en la sección de materiales y métodos. Este ensayo está basado en el hecho de que la transcriptasa reversa normalmente incorpora un opuesto de adenosina cuando encuentra un sitio lesionado en la hebra molde que esta amplificando (Figura 15).

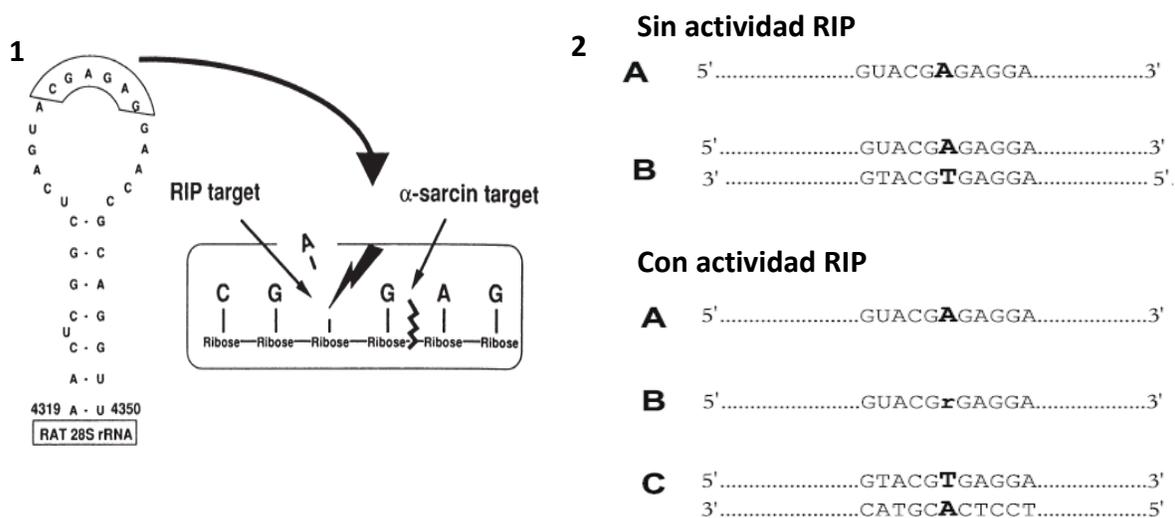
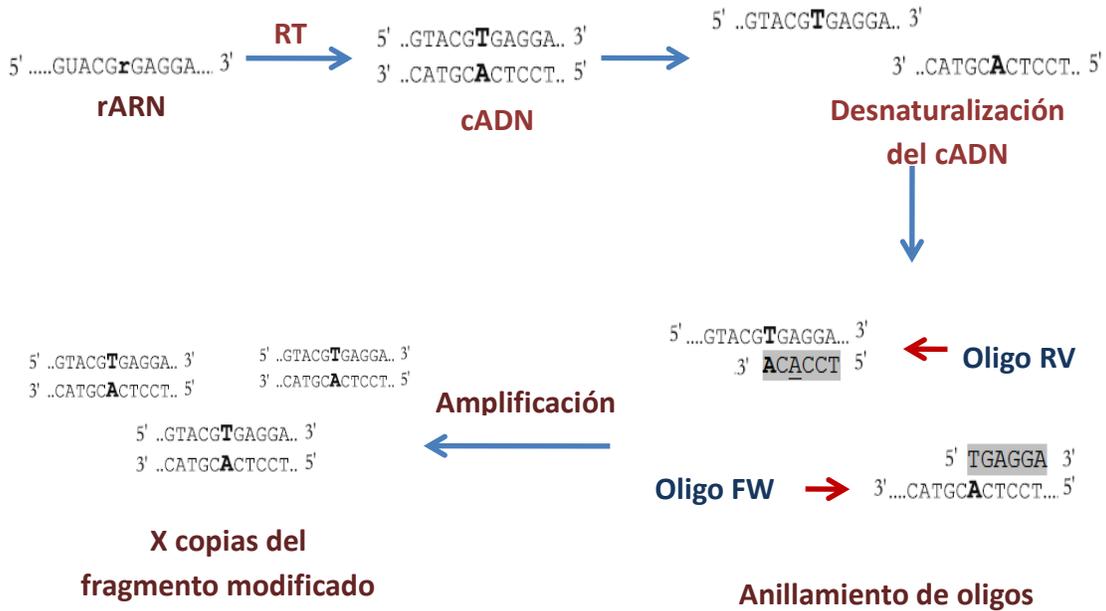


Figura 15. Representación gráfica de la transcripción reversa de una hebra de ARN dañada por una RIP. 1. Actividad de las RIPs en el sitio GAGA de la subunidad mayor de los ribosomas. 2. Representación de la transcripción reversa en ARN sin el daño por RIP (superior) y con daño por RIP (inferior).

Por lo que, la actividad de RIPsc se monitoreó sobre muestras de ARN tomadas de cultivos inducidos y no inducidos de *E. coli* BL21(DE3)pLysS, transformada con pET-RIPsc. Si la proteína producida RIPsc, le causa algún daño al rARN, la transcriptasa reversa insertará una adenosina en el ADN complementario durante la amplificación por qRT-PCR (Figura 16). Y debido a que se diseñó un oligo que anilla en el sitio específico en el que se causa el daño, la amplificación se incrementará si es que RIPsc ha tenido actividad sobre el rARN alterando la secuencia.

CUANDO HAY ACTIVIDAD N-GLICOSIDASA DE UNA RIP



CUANDO NO HAY ACTIVIDAD N-GLICOSIDASA DE UNA RIP

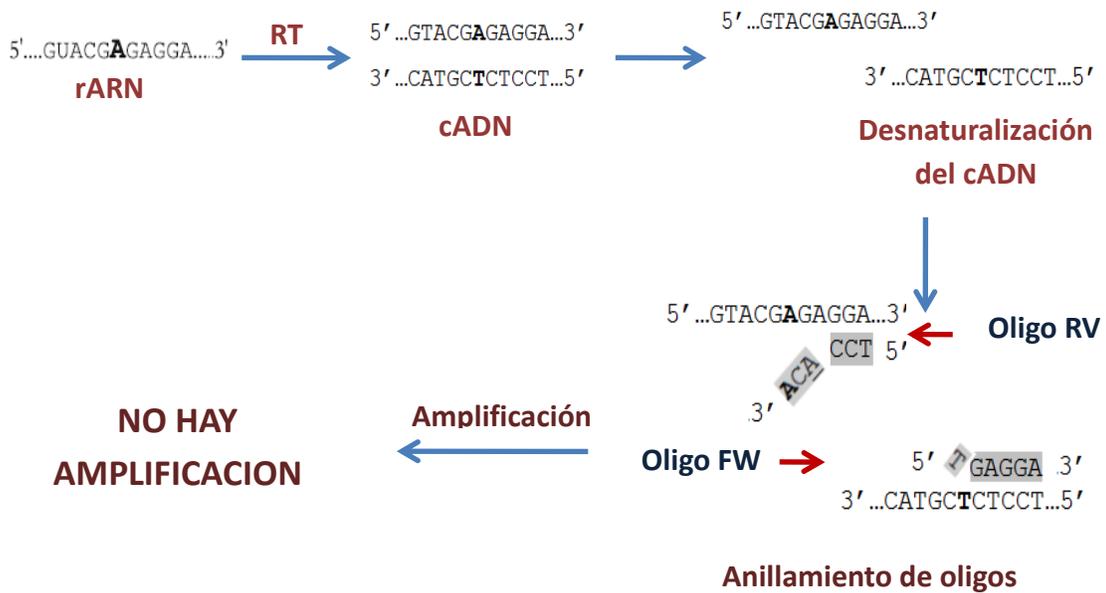


Figura 16. Proceso de amplificación de rARN dañado por una RIP. Parte superior, representación de la amplificación cuando hay daño en el rARN. Parte inferior, representación de la amplificación cuando no hay daño en el rARN.

Los resultados obtenidos en el ensayo de la actividad se muestran en la figura 17, en donde se puede observar que existe un aumento importante en la transcripción del amplicon blanco después de la inducción de RIPsc en comparación con el control que consta de ARN molde de un cultivo sin inducción. Con este resultado se muestra de manera clara que RIPsc actúa sobre el rARN removiendo una adenina en el sitio conservado GAGA de la subunidad mayor de los ribosomas de *E. coli*, específicamente la adenina A₂₆₆₀ en la subunidad 23S. Por lo que se le puede considerar como una RIP clásica con actividad N-glicosidasa.

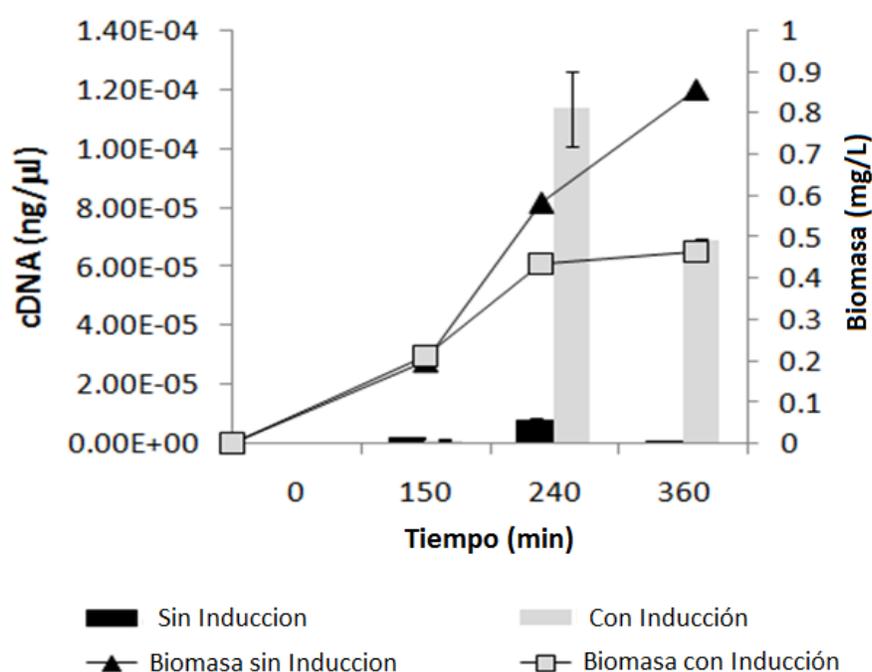


Figura 17. Actividad rARN N-glicosidasa de RIPsc expresada en *E. coli*. ARN total de *E. coli* fue usado como molde para el análisis de la actividad de RIPsc por medio de qRT-PCR. Las muestras se tomaron a los 150 min, 240 min y 360 min, como control se utilizó un cultivo sin inducción del que se tomaron muestras en los mismos puntos que el cultivo de prueba.

7.3 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *ripsc*

La expresión de un gen es el proceso mediante el cual a partir de un fragmento de ADN puede generarse una proteína. En las bacterias, el mecanismo de expresión ocurre en dos niveles. El primer nivel es la **transcripción**, mediante el cual a partir de un gen se produce un mensaje denominado ARN mensajero (mARN). El segundo nivel es la **traducción** del mARN en una proteína, en este proceso la secuencia del mARN generado es leído en tripletes para ser traducidos en aminoácidos para generar la proteína que codifica el mensaje. En algunas ocasiones, existen

genes que son transcritos eficientemente pero por alguna razón no llegan a completar el proceso de expresión y no son traducidos nunca en proteínas funcionales, éstos genes son denominados “genes no codificantes (ncARN)”. Actualmente se ha demostrado que los genes no codificantes son moléculas funcionales de ARN que podrían ser parte de mecanismos de regulación de funciones celulares vitales, aunque en algunos otros casos no se ha podido demostrar función aparente de este tipo de ARNs pudiendo sugerirse que podrían ser solo material genético sin función (Hüttenhofer *et al.*, 2005).

Recientemente se demostró que en el genoma de *Streptomyces coelicolor* se encuentra un gen que codifica para una proteína inactivadora de los ribosomas, dicho gen ha sido denominado *ripsc* (Reyes *et al.*, 2010). Para RIPsc se demostró que la expresión heteróloga del gen *ripsc* codifica de manera eficiente una proteína con actividad inactivadora de los ribosomas aunque cabe señalar que al haber estudiado la función del gen de manera heteróloga no demuestra la existencia de regulación en el organismo productor.

Al tratarse de una proteína con características tóxicas se sugiere la existencia de mecanismos de regulación que solo pueden ser develados con el estudio de la expresión por lo que se han diseñado dos experimentos para dicho estudio.

Como se mencionó con anterioridad la expresión de un gen consta de dos niveles que en el caso de estudio se experimentó con dos estrategias distintas:

- a) Estudio de la transcripción del gen *ripsc* por medio de RT-PCR, northern-blot y qRT-PCR
- b) Estudio de la traducción de la proteína RIPsc por medio de la fusión del gen reportero que codifica para la proteína verde fluorescente (EGFP).

7.3.1 ESTUDIO DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN *ripsc* POR MEDIO DE RT-PCR, NORTHERN-BLOT Y qRT-PCR

Para evaluar la transcripción del gen *ripsc* el primer experimento realizado fue la amplificación del gen por medio de transcripción reversa, partiendo de ARN total como molde, el objetivo de dicho experimento es evaluar la presencia de ARN mensajero correspondiente a la transcripción del gen

en cuestión; para dicho experimento se siguió la metodología descrita en la Figura 18. Para la reacción de transcripción reversa se utilizó el kit “One Step RT-PCR” de Quiagen.

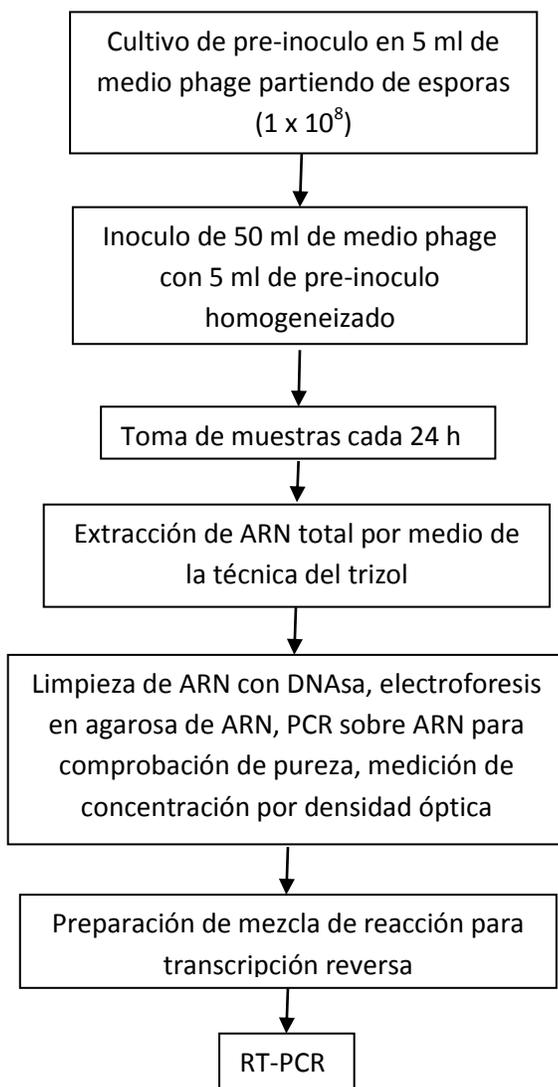


Fig. 18 Metodología usada para realizar transcripción reversa del gen *ripsc*.

Los oligos utilizados para la reacción se describen en la siguiente tabla (Tabla 6)

Tabla 6. Oligos utilizados para la amplificación de *ripsc* por RT-PCR

RIPSC_FW	5´ tactgcagatagcccaacaggc 3´
RIPSC_RV	5´ tacttaag tcaccttgcccgttgatggc 3´

Las condiciones de la mezcla de reacción son las siguientes (Tabla 7) para un volumen de reacción de 50 μ l:

Tabla 7. Condiciones utilizados para la reacción de RT-PCR

Componente	Concentración	Volumen
Buffer de reacción	5x	10 μ l
ARN molde	100 ng	1 μ l
Mezcla de dNTPs	10 mM c/u	2 μ l
Oligo FW	10 mM	1.5 μ l
Oligo RV	10 mM	1.5 μ l
Mezcla enzimática	1 u/ μ l de cada enzima	2 μ l
Agua libre de RNAsas	-----	32 μ l

El programa usado para la amplificación fue como sigue (Tabla 8):

Tabla 8. Programa utilizado para la reacción de RT-PCR

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	
1	50	30	
2	95	15	} 40 ciclos
3	55	1	
4	72	3	
5	72	10	
6	4	∞	

Los controles utilizados en el experimento fueron, la amplificación por transcripción reversa de la subunidad alfa de la ARN polimerasa (*rpoA*) que es un gen constitutivo o *house-keeping gene* como control positivo para evaluar la integridad y pureza del ARN extraído y la amplificación de *ripSC* a partir de ARN total sin transcriptasa reversa como control negativo y descartar la presencia de ADN que podría ser factor de un falso positivo.

Los oligos utilizados para la amplificación del *house-keeping gene* se describen en la tabla 9.

Tabla 9. Oligos utilizados para la amplificación de *rpoA* por RT-PCR

<i>rpoA_FW</i>	5'-gaccggcctcgaggctcggtc-3'
<i>rpoA_RV</i>	5'-cagtatccgagcagcggccg-3'

Las condiciones de reacción fueron las descritas en la tabla 2, con la diferencia de los oligos, el programa usado fue el descrito en la tabla 3 con una temperatura de anillamiento de 60°C.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura (Figura 19):

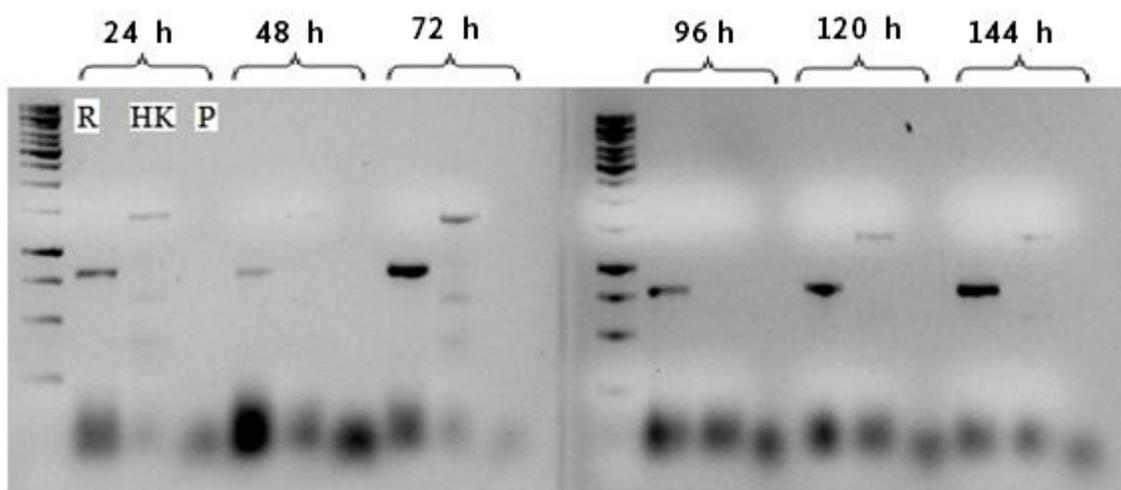


Fig. 19. Gel de agarosa 1% donde se observan las bandas correspondientes al gen *ripsc* (R), *rpoA* (HK) amplificados por RT-PCR y la ausencia de banda (P) usada como control negativo para demostrar la ausencia de ADN.

De acuerdo a los resultados se puede concluir que el gen *ripsc* es transcrito desde las 24 h por lo que se esperaría poder detectar a la proteína RIPsc de manera nativa en los cultivos de *S. coelicolor* a partir de este momento.

Debido a las características de la técnica usada para medir la expresión no es posible saber si la transcripción del gen *ripsc* puede considerarse significativa para las células o simplemente se trata de niveles basales de expresión, habiendo realizado el experimento de una manera cualitativa lo único que podemos concluir es que existen transcritos de *ripsc* desde estados tardíos de la trofofase de la curva de crecimiento de *S. coelicolor*. La naturaleza tóxica del gen en estudio sugiere mecanismos de regulación en alguno de los niveles de expresión por lo que es necesario

implementar un método más sensible y cuantitativo en el que se pueda observar si la transcripción está en su máximo posible o es inducida por alguna condición ambiental, nutricional o de estrés.

Con el objetivo de tener resultados preliminares en la expresión del gen *ripSC* y observar el comportamiento de la expresión a través del tiempo, se realizó densitometría de las bandas obtenidas por medio de RT-PCR, comparando la expresión del gen constitutivo con la expresión de *ripSC*, los resultados obtenidos se muestran a continuación (Figura 20)

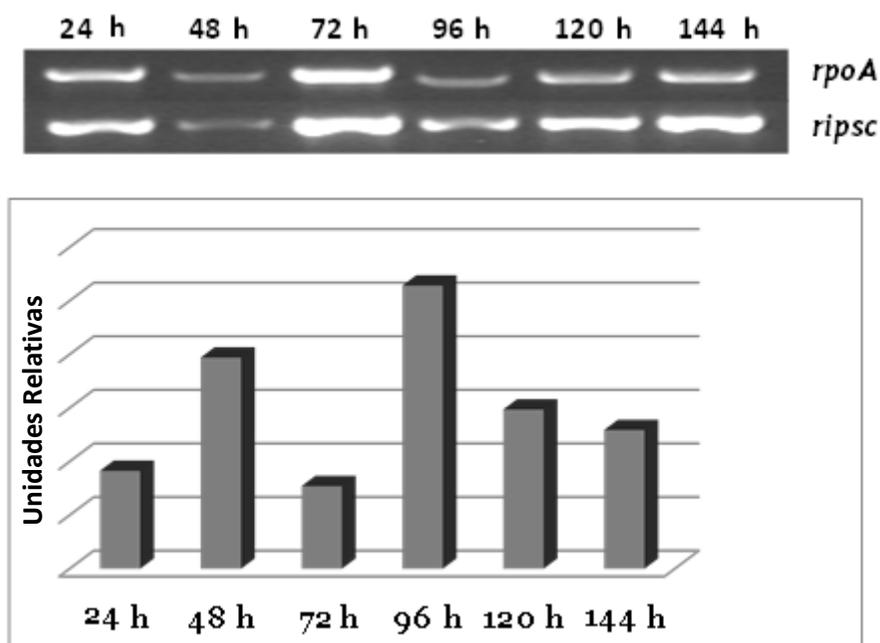


Figura 20. Densitometría de la expresión de *ripSC* obtenida por RT-PCR. Para la densitometría se tomó como referencia la expresión del gen *rpoA* (*house-keeping gene*)

Para evaluar de manera cuantitativa los niveles de transcripción del gen *ripSC* se desarrollaron 2 métodos diferentes, el primero es el método denominado Northern-Blot y el segundo la técnica denominada transcripción reversa en tiempo real o qRT-PCR. Para buscar la expresión de *ripSC* se evaluaron 2 condiciones distintas. La primera condición evaluada fue en base a los resultados obtenidos en el experimento con RT-PCR, por lo que se buscó la expresión en un cultivo semilla durante las primeras 48 h. La segunda condición se basó en las predicciones obtenidas *in silico* pues al analizar la secuencia del gen *ripSC*, se encontró que al principio de la secuencia está contenido un codón TTA que es reconocido por el único ARN de transferencia existente para dicho codón, éste ARN de transferencia es mejor conocido como *bldA*. La traducción de las proteínas que contienen en su secuencia nucleotídica un codón TTA es dependiente de la

presencia de *bldA*. Al encontrar un codón TTA en la secuencia de *ripSc*, se propuso el estudio de la expresión bajo condiciones en las que se expresara alguno de los metabolitos regulados por *bldA*, por lo que se optó por tomar como metabolito indicador a la actinorodina que es regulada de esta manera.

Además resulta interesante el estudio de la expresión de *ripSc* bajo condiciones de regulación *bldA* pues se ha propuesto que los genes regulados de esta manera pueden tener cualquiera de las funciones representadas en la figura 21, y según las predicciones e hipótesis acerca de la función de RIPsc en *S. coelicolor* esta podría participar en mecanismos de defensa o apoptosis y dichas funciones son parte de las propuestas para los genes regulados por *bldA*.

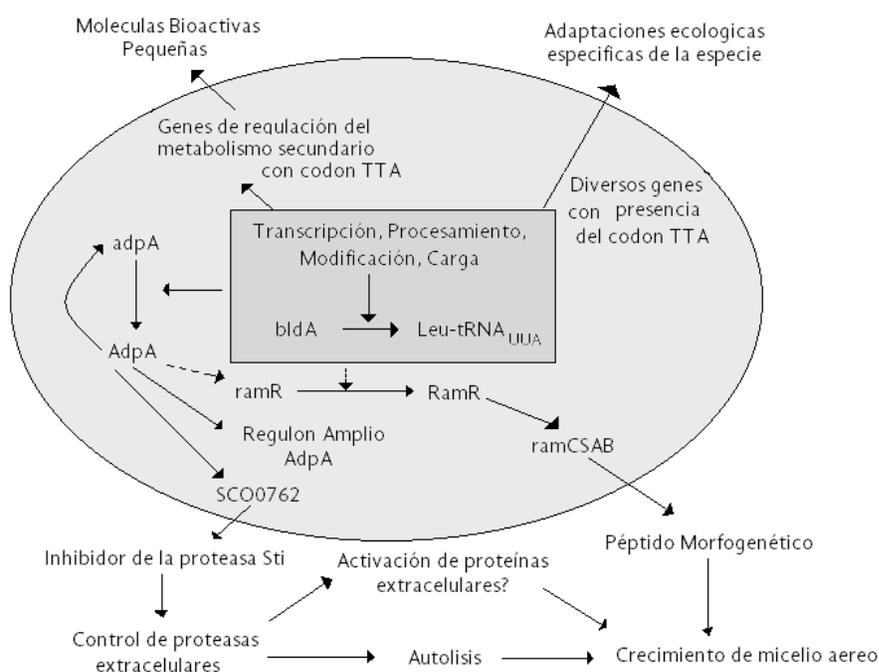


Figura 21. Representación esquemática de las funciones propuestas para los genes regulados por *bldA*. Adaptada de Chater *et al.*, 2008

Con el objetivo del estudio de la regulación *bldA* se tomaron muestras en cultivos fermentativos provenientes de un medio de producción de actinorodina en las primeras h de producción para evaluar si la expresión de *ripSc* coincide con la expresión de los genes *bldA*, las muestras se tomaron a las 0.5, 1, 2, 2.5, 3 y 4 h. De manera general el método se describe gráficamente a continuación (Figura 22).

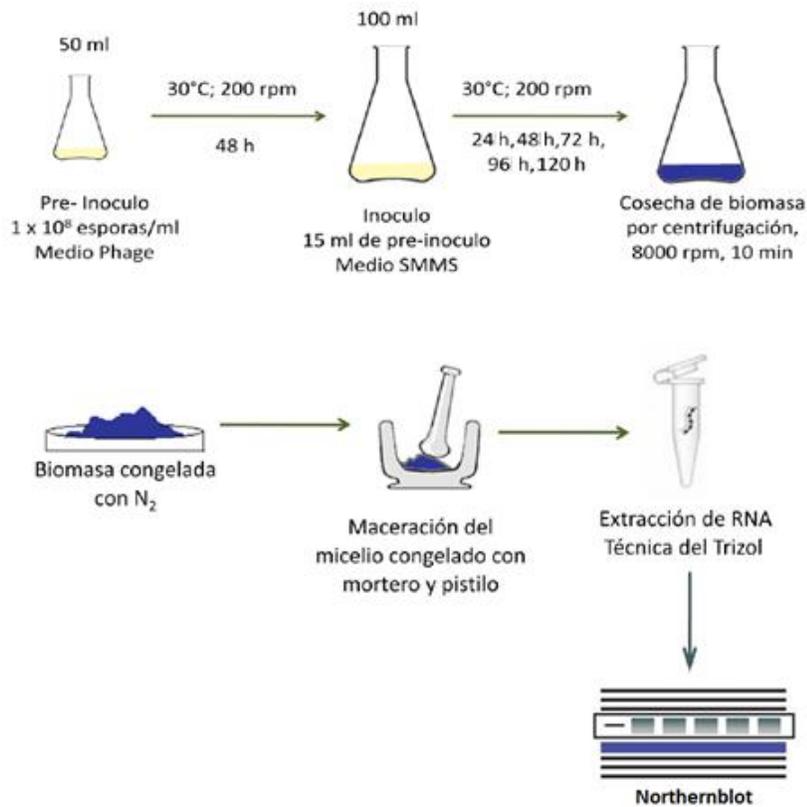


Figura 22. Representación gráfica de la metodología seguida para el estudio de la expresión de *rip*sc por Northern-blot.

Los resultados obtenidos tras el análisis de la expresión de *rip*sc con el método de Northern-Blot muestran la ausencia de señal (Fig. 23). Sin embargo, no es posible tener una conclusión certera, por lo que se sugiere que la expresión encontrada por RT-PCR es de un nivel bajo no pudiendo ser detectada con esta técnica. La alternativa a este método es utilizar uno más sensible como qRT-PCR.

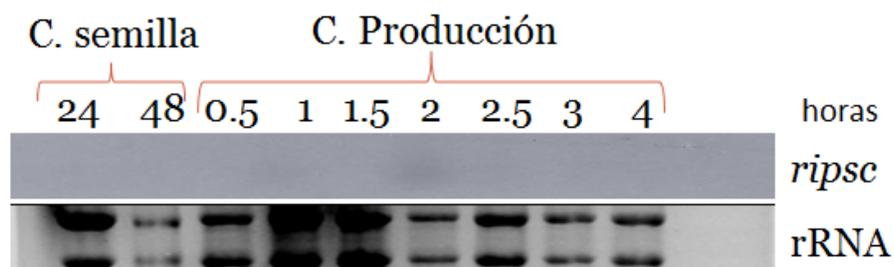


Figura 23. Estudio de la expresión de *rip*sc por Northern-blot en un cultivo semilla y en un cultivo de producción, tomando como referencia la producción de actinorodina.

Para mejorar el estudio de la expresión de *ripSC* se realizó qRT-PCR bajo la consideración de que es un método con mayor sensibilidad que el Northern-blot, se siguió la siguiente metodología (figura 24).

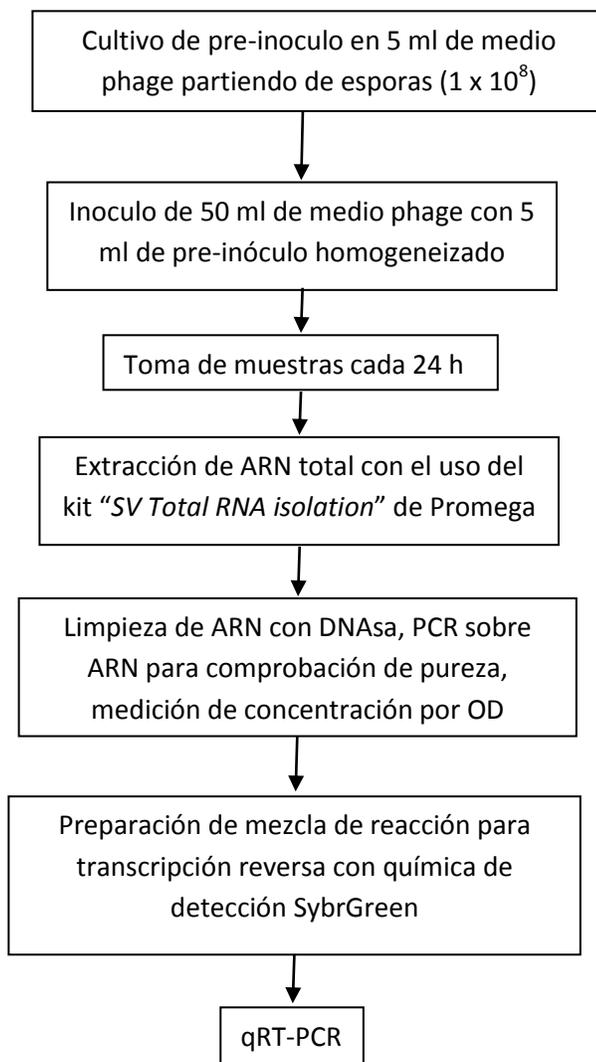


Fig. 24 Metodología usada para realizar transcripción reversa en tiempo real del gen *ripSC*

Los oligos usados en la amplificación del gen *ripSC* por medio de la técnica PCR en tiempo real fueron los descritos en la tabla 10, que amplifican un fragmento de 210 pares de bases del dominio RIP del gen *ripSC*

Tabla 10. Oligos utilizados para la amplificación de *ripSC* por qRT-PCR

RT- <i>ripSC</i> FW	5' tgg gtt cac cag acg acc 3'
RT- <i>ripSC</i> RV	5' cgt ctc cgc tcc ggg 3'

Las condiciones de la mezcla de reacción son las siguientes (Tabla 11) para un volumen de reacción de 20 μ l:

Tabla 11. Condiciones utilizados para la reacción de qRT-PCR

Componente	Concentración	Volumen
Express SybrGreenER qPCR Super Mix Universal	-----	10 μ l
Oligo FW	10 mM	0.4 μ l
Oligo RV	10 mM	0.4 μ l
<i>Express SuperScript Mix for One-Step SYBR GreenER</i>	-----	0.5 μ l
ARN molde (Cantidad final)	20 ng	5 μ l
Agua libre de RNAsas	-----	3.7 μ l

El programa de amplificación fue como sigue:

Tabla 12. Programa utilizado para la reacción de qRT-PCR

Temperatura °C	Tiempo
50	30 min
95	2 min
40 ciclos de	
95	15 sec
55	1 min

Para conocer la concentración de las moléculas transcritas de *rip*sc se realizó una curva estándar usando las mismas condiciones de reacción y programa descritos anteriormente y variando las concentraciones de ARN molde desde 0.002 ng/ μ l hasta 20 ng/ μ l, los puntos fijados en la curva estándar fueron 5.

Los resultados obtenidos de la amplificación del gen *rip*sc por medio de transcripción reversa en tiempo real se muestran en la siguiente gráfica (figura 25).

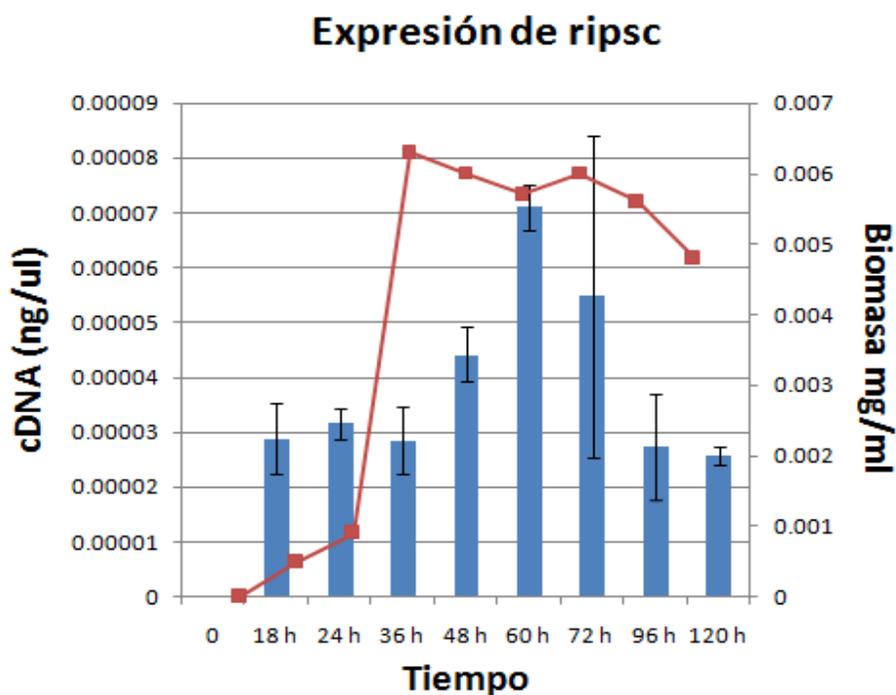


Fig.25 Gráfica de expresión de *ripsc* evaluada por qRT-PCR combinada con la curva de crecimiento de *S. coelicolor* (línea en rojo)

Las conclusiones derivadas del experimento de la amplificación en tiempo real son que la expresión del gen *ripsc* es detectable desde el inicio de la trofofase y aparentemente en niveles bajos en comparación con los niveles de expresión detectables para el *house-keeping gene* (del orden de 10^{-2} , datos no mostrados). Además existe contundencia con los resultados obtenidos en la densitometría realizada para el RT-PCR que se mostró con anterioridad. La expresión es inestable pero los niveles de expresión más altos, hasta ahora detectados coinciden con el momento en el que *S. coelicolor* sufre un decremento en el crecimiento.

7.3.2 ESTUDIO DE LA TRADUCCIÓN DE RIPsc POR MEDIO DE LA FUSIÓN DEL GEN REPORTERO *egfp*.

Habiendo detectado transcritos del gen *ripsc* resulta coherente suponer que estos serán traducidos en la proteína RIPsc y que ésta será detectada en cultivos nativos de *S. coelicolor*. Dentro de la codificación de los genes se encuentran secuencias reguladoras, una de las más importantes es el promotor pues sin este la ARN polimerasa no tiene señal del inicio de un gen. De

la secuencia promotora depende que el gen sea detectable por la maquinaria de transcripción y exista mensaje o ARN mensajero que irá al ribosoma para ser traducido.

De acuerdo con los resultados obtenidos, en la primera parte del estudio de la expresión del gen *ripsc* se demostró que su secuencia promotora es funcional y que no existe regulación aparente en el primer nivel de la expresión. El siguiente nivel es la traducción del mensaje que en el caso será estudiada mediante la fusión de la región promotora de *ripsc* con el gen reportero *egfp* que codifica para la proteína verde fluorescente y que puede detectarse de manera sencilla por medio de microscopia de fluorescencia. En teoría, al contar con un promotor funcional cualquier secuencia clonada debajo de este será transcrita y después traducida de manera eficiente, dicha fusión fue realizada por medio de PCR recombinante y después clonada en el plásmido de replicación autónoma para *S. coelicolor* pIJ486. La metodología realizada se muestra en la figura 26.

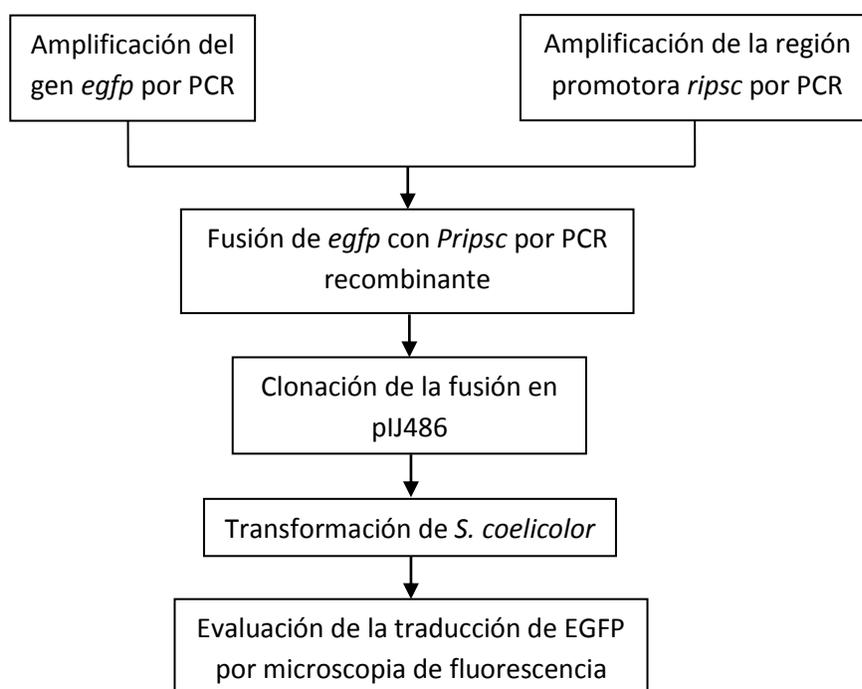


Figura 26. Metodología utilizada para evaluar la traducción de RIPSC

La técnica realizada para la fusión del gen *egfp* con la región promotora del gen *ripsc* denominada PCR recombinante se llevó a cabo como se describe gráficamente en la figura 27.

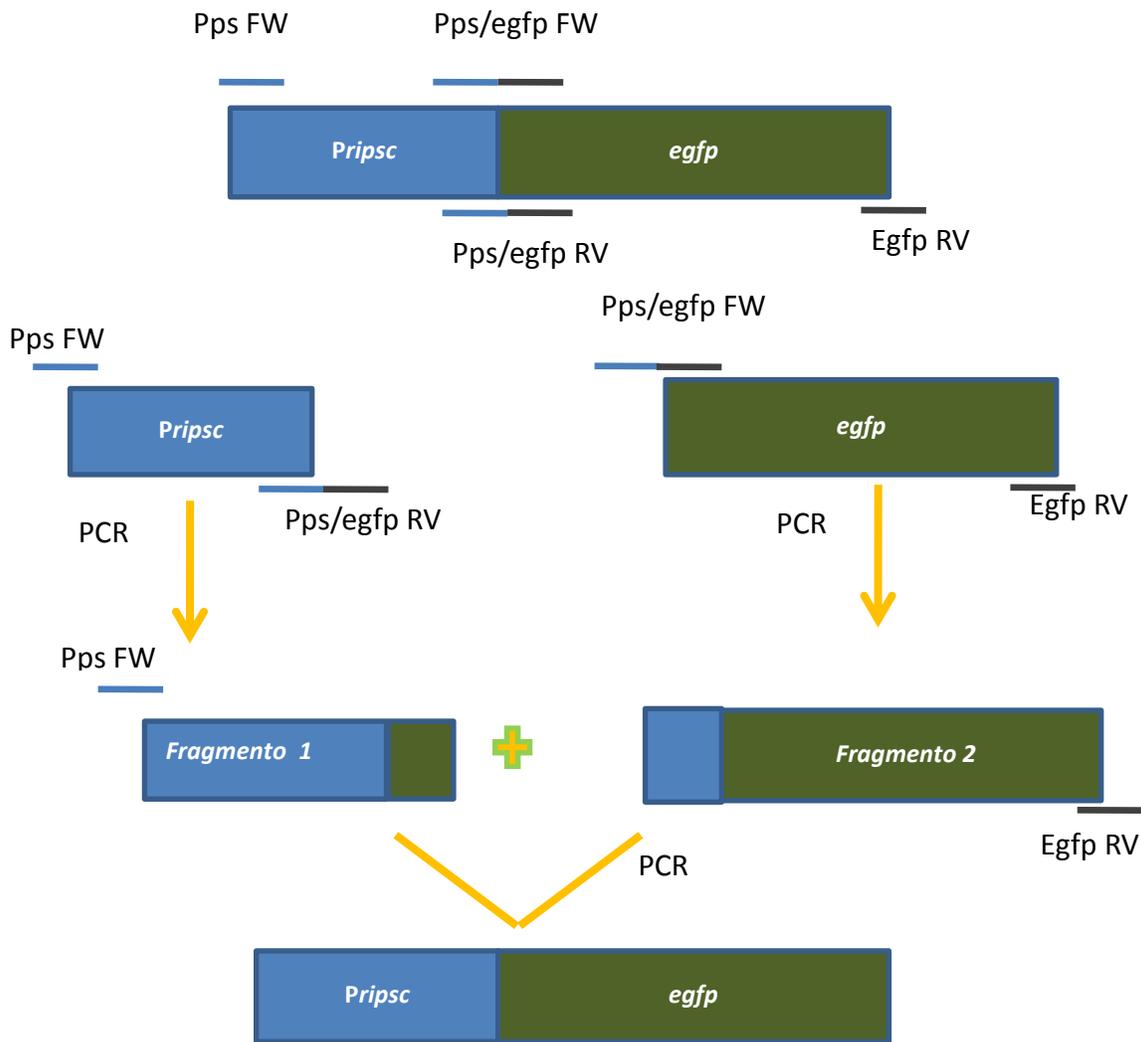


Figura 27. Representación gráfica de la fusión de genes por medio de la técnica PCR recombinante.

La estrategia de fusión por PCR recombinante puede considerarse novedosa puesto que la fusión se realiza tomando como molde dos fragmentos distintos correspondientes a los genes en cuestión amplificados por PCR de manera independiente. Para poder llevarla a cabo se utilizaron dos pares de oligos como se describe en la figura 27. Un par para la amplificación de *PripSC*, el otro para la amplificación de *egfp* y finalmente la combinación del oligo *forward* de la primera amplificación con el oligo *reverse* de la segunda amplificación. Las secuencias de los oligos se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Oligos utilizados para fusionar *Pripisc* y *egfp* por PCR recombinante

PPSN_FW	5' tag gat ccc gcc tcg agg tcg cgt tcc c 3'
PPSN_RV	5' gcc ctt gct cac cat ggc tgc agc tct ggg 3'
PPSEGFPN_FW	5' ccc aga gct gca gcc atg gtg agc aag ggc 3'
PPSEGFPN_RV	5' cgc aag ctt tta ctt gta cag ctc gtc cat gcc 3'

Las mezclas de reacción usadas para la amplificación se hicieron bajo las mismas condiciones con la única variación del ADN molde, las condiciones de la mezcla se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Mezcla de reacción montada para la amplificación de la fusión *prip-egfp*

Componente	Concentración	<i>Pripisc</i>	<i>Egfp</i>	Fusión
Buffer	10x	5 µl	5 µl	5 µl
dNTP's	20 µM	1 µl	1 µl	1 µl
Oligo FW	10 µM	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
Oligo RV	10 µM	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
ADN	100 ng	1 µl	1 µl	1 µl (0.5 µl de cada fragmento)
Pfu ADN polimerasa	1 u/µl	0.25 µl	0.25 µl	0.25 µl
Agua	-----	37.75 µl	37.75 µl	37.75 µl

Los programas para cada una de las reacciones se muestran en la tabla 15:

Tabla 15. Programas realizados para la fusión de *pripisc-egfp*

Programa <i>Pripisc</i>	Programa <i>egfp</i>	Programa fusión
1. 95°C – 2 min	1. 95°C – 2 min	1. 95°C – 2 min
2. 95°C – 1 min	2. 95°C – 1 min	2. 95°C – 1 min
3. 65°C – 30 sec	3. 67°C – 30 sec	3. 64°C – 1.30 min
4. 72°C – 2 min	4. 72°C – 2 min	4. 72°C – 2 min
Repertir desde 2, 30 veces	Repertir desde 2, 30 veces	Repertir desde 2, 30 veces
5. 72°C – 5 min	5. 72°C – 5 min	5. 72°C – 5 min
6. Mantener a 22°C	6. Mantener a 22°C	6. Mantener a 22°C

Los fragmentos amplificados fueron separados en un gel de agarosa 1% después de la amplificación por PCR, las bandas se limpiaron y se procedió a la ligación de la fusión en el plásmido de expresión autónoma de *S. coelicor* pIJ486. Las bandas obtenidas se muestran en la figura 28.

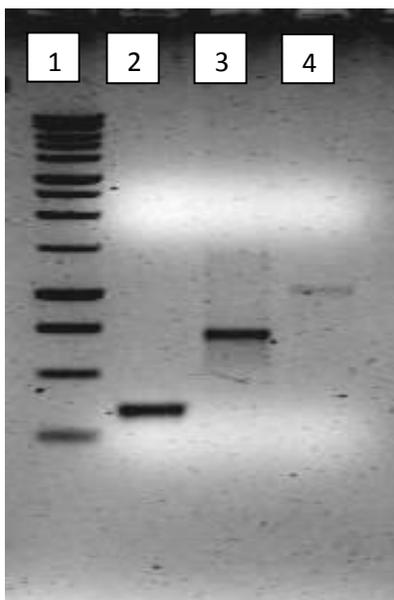


Fig. 28. Gel de agarosa 1% de separación del fragmento *fusion*. Carril 1, marcador de peso molecular de 1Kb provisto por promega. Carril 2, fragmento *PripSC*. Carril 3, fragmento *egfp*. Carril 4, fragmento *fusion*.

Después de la amplificación con la polimerasa de alta fidelidad pfu, los 3 fragmentos se ligaron en el vector pJET 1.2 y se comprobaron por medio de la secuenciación. A partir de la ligación pJET 1.2-fusión se digirió la fusión con las endonucleasas *Bam HI* y *Hind III*, lo mismo se hizo con el vector pIJ486 y se preparó la mezcla de ligación como se describe a continuación (tabla 16).

Tabla 16. Mezcla de ligación para clonación de *pripSC-egfp* en pIJ486

Componente	Concentración	Volumen
Fragmento	60 ng	6
pIJ486	20 ng	1
Buffer de ligación	10 x	2
Ligasa	1 u/ μ l	1.5
Agua	----	9.5

La mezcla de ligación se incubó *overnight* a 4°C y se procedió a la transformación de las cepas M145 de *S. coelicolor* por medio de protoplastos con Polietilenglicol. Las transformantes obtenidas se seleccionaron y comprobaron por medio de PCR de colonia. En la figura 29 se muestra la fotografía de una de las transformantes obtenidas y el gel de la comprobación de la transformante por medio de PCR.

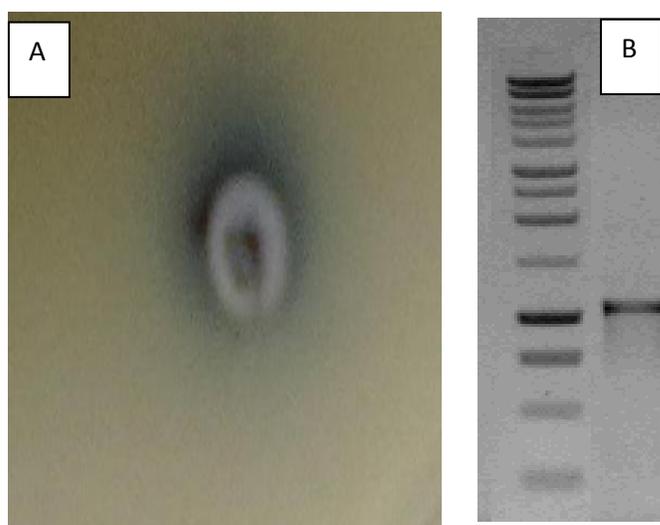


Fig. 29. A. Transformante pJ486-Fusión de *S. coelicolor* M145. B. Gel de agarosa 1% en el que se amplificó el fragmento fusión a partir de la lisis de la colonia con DMSO. El marcador de peso molecular es de 1Kb provisto por promega.

Una vez obtenida la transformante pJ486-Fusión el siguiente paso es la evaluación de la traducción de EGFP por medio de microscopia de fluorescencia bajo diferentes condiciones de cultivo para analizar posibles mecanismos de regulación que podrían ser ambientales, nutricionales o de estrés.

Para la observación de fluorescencia de la proteína verde, se obtuvo un control positivo en *E. coli* BL21 DE3 plysS. Dicho control fue obtenido mediante la clonación del gen *egfp* debajo del promotor T7 inducible por IPTG en el plásmido de expresión de *E. coli* pET17b. La construcción fue obtenida como se detalla en la sección de materiales y métodos.

La metodología aplicada para obtener la construcción pET17b-*egfp* se muestra en la figura 30.

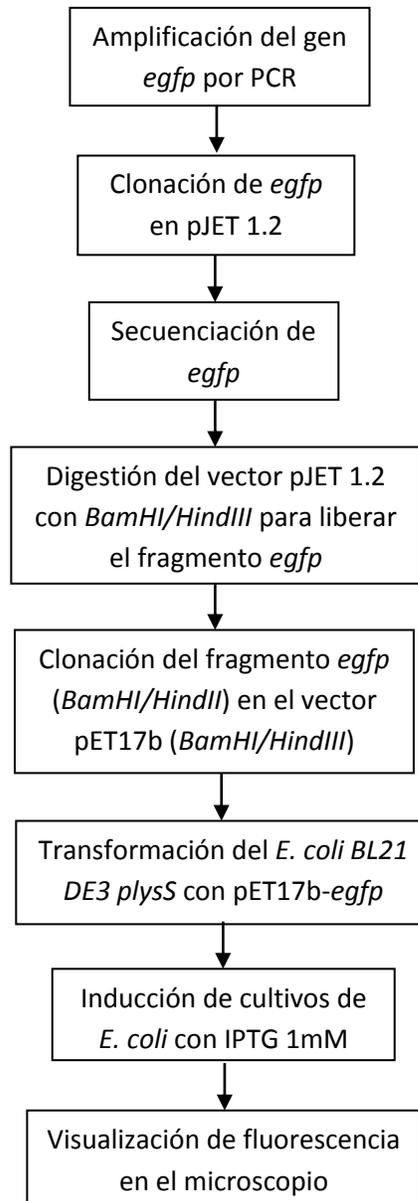


Fig. 30. Metodología seguida para la obtención de *E. coli* BL21DE3plysS-[pET17b-*egfp*] para ser usada como control positivo en la detección de la traducción de EGFP

Los oligos utilizados para la amplificación por PCR del gen *egfp* fueron los descritos en la tabla 17.

Tabla 17. Oligos utilizados para amplificar *egfp*

EGFP_ColiF 5' ta aagctt atg gtg agc aag ggc gag g 3'
EGFP_ColiR 5' ta ggatcc tta ctt gta cag ctc gtc c 3'

El programa de amplificación fué como sigue (tabla 18):

Tabla 18. Programa utilizado para la amplificación por PCR de *egfp*

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
95	5
95	1
59	1
72	1
Repetir 30 veces desde el paso 2	
72	5
4	∞

Los resultados obtenidos después de la inducción y visualización de la traducción de EGFP en el control positivo construido en *E. coli* se muestran en la figura 31.

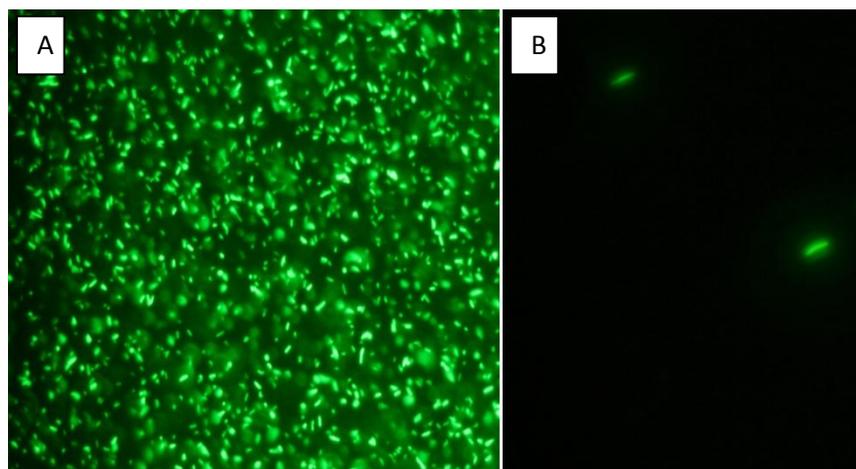


Fig. 31. Fotografía obtenida en el microscopio de fluorescencia de las células de *E. coli* expresando de manera eficiente a la proteína verde fluorescente. A) Cultivo concentrado, B) Cultivo diluido 1/100.

El control positivo construido en *E. coli* nos demuestra que si la proteína verde fluorescente es expresada de manera eficiente puede observarse bajo el filtro azul con lámpara UV en el microscopio de fluorescencia. Para la transformante de *S. coelicolor M145*, se probaron distintas

condiciones de cultivo para buscar la expresión. Siguiendo los argumentos anteriores y tomando como antecedente los resultados obtenidos en el análisis a nivel de transcripción se diseñaron 2 experimentos distintos. El primero en el que se enfrentó un cultivo líquido crecido durante 48 h en medio phage de *S. coelicolor* M145 contra 4 hongos, *Alternaria*, *Bauveria curvularia* y *Paecilomyces*, crecidos también durante 48 h en caldo PD, dicho experimento tiene la finalidad de buscar la expresión de RIPsc como componente de mecanismos de defensa, una vez puestos en contacto la mutante de *S. coelicolor* y los hongos, se monitoreó la fluorescencia de manera periódica cada 24 h. Bajo condiciones de enfrentamiento a antagonistas no fue posible detectar señal de la proteína verde fluorescente, la razón puede ser que la señal es baja o simplemente que no hay expresión en las condiciones probadas.

El segundo experimento realizado se relacionó con la hipótesis de que RIPsc participa en mecanismos de apoptosis por lo que se dejó envejecer un cultivo de la mutante *egfp* de *S. coelicolor* en medio líquido phage durante 30 días. La fluorescencia fue monitoreada de manera periódica cada 24 h, de igual manera que en el experimento anterior, fue imposible detectar la señal de EGFP. La alternativa a estos resultados es diseñar experimentos con nuevas condiciones. Como ejemplo ilustrativo de los ensayos de fluorescencia se muestra en la figura 32 el campo bajo el cual se observó la mutante *egfp* de *S. coelicolor* enfrentada al hongo *Paecilomyces*.

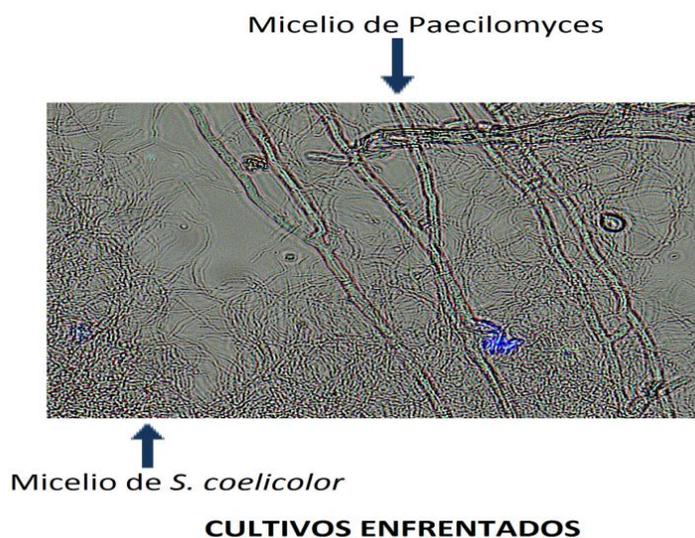


Figura 32. Fotografía tomada vista en el microscopio de fluorescencia (100 X) de cultivos enfrentados de *S. coelicolor* y *Paecilomyces*.

7.4 APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA DE RIPsc EN LA INDUSTRIA AGROQUÍMICA

En base a los resultados obtenidos en cuanto a la incapacidad de RIPsc de introducirse a las células y con el interés puesto en la aplicación de ésta en el combate a fitopatógenos se diseñó una estrategia experimental que consiste en la construcción de una proteína quimérica que consta de la cadena con dominio RIP más un péptido que le ayude a penetrar la membrana de hongos y bacterias fitopatógenos.

En la naturaleza, existe un grupo de péptidos denominados péptidos de penetración celular o “cell penetrating peptides (CPP’s)”, estos han sido descritos de manera detallada en la sección de antecedentes. Recientemente han sido estudiados y utilizados con el fin de servir como acarreadores de moléculas a través de la membrana celular (Trabulo *et al.*, 2010). La habilidad de los CPP’s de translocarse a través de la membrana los hace la opción adecuada para lograr el objetivo de introducir RIPsc a los fitopatógenos de interés. La elección del péptido acarreador debe llevarse bajo características específicas para su uso posterior en la industria agroquímica, entre las características principales requeridas se encuentran la especificidad del péptido por membranas fúngicas y bacterianas además de la inocuidad al ambiente. El péptido denominado PEP32 (RKWHFW), ha sido estudiado sobre diferentes fitopatógenos y ha mostrado actividad acarreadora (Marcos JF *et al.*, 2008), además de no ser tóxico para plantas o animales, estas características lo hacen un péptido óptimo para el fin perseguido. La estrategia general para el desarrollo experimental de la proteína quimérica se muestra en la siguiente figura (figura 33):

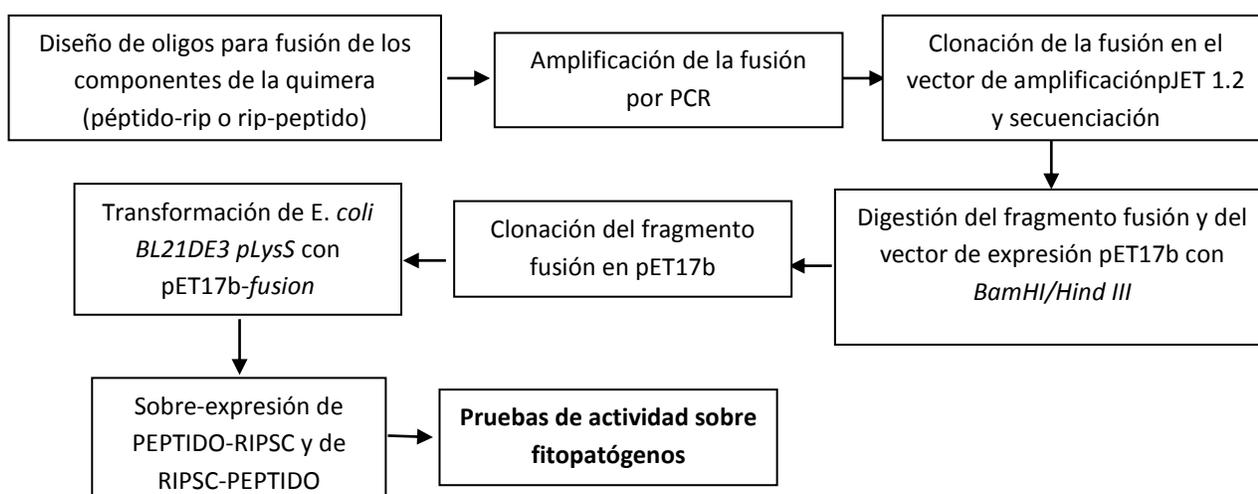


Figura 33. Estrategia general para la obtención de la proteína quimérica rip-péptido o péptido-rip

En la estrategia planteada se contemplan dos posibilidades:

- a) Fusión del péptido en el extremo amino terminal de RIPsc
- b) Fusión del péptido en el extremo carboxilo terminal de RIPsc

El objetivo de fusionar el péptido en ambos extremos de RIPsc es comparar en que caso el péptido es capaz de cumplir la función de acarrear a RIPsc dentro de las células sin alterar la función del dominio RIP. Debido a que no existe estructura cristalográfica para RIPsc no es posible predecir un modelo muy acertado y existe la posibilidad de que la fusión interfiera en la actividad de RIPsc por impedimento estérico.

7.4.1 FUSIÓN DEL PÉPTIDO (PEP32) EN EL EXTREMO AMINO TERMINAL DE RIPsc

Para obtener la fusión del péptido en el extremo N-terminal de RIPsc se diseñaron los oligos siguientes, en donde en el oligo *forward* se incluye la secuencia del péptido a fusionar con codones preferenciales para *E. coli* (Tabla 19):

Tabla 19. Diseño de oligos para la amplificación de la fusión *péptido-ripsc*.

PEPRIP_FW	5' TAGAGCTCATGCGTAAATGGCATT TTTGGGATACGCCCAACAGGC 3'
PEPRIP_RV	5' TAGGATCC TCACCT TTGCCCGTTGATGGC 3'

El programa de amplificación para la fusión *péptido-ripsc* fue como sigue:

Tabla 20. Programa de amplificación para la fusión *péptido-ripsc*

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
95	5
95	1
66	1
72	1
Repetir 30 veces desde el paso 2	
72	5
4	∞

El fragmento fusión fue verificado por medio de la separación en un gel de agarosa 1%, figura 34.

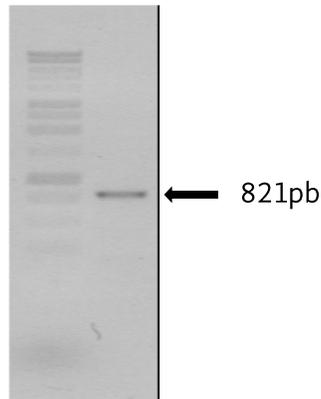


Fig 34. Fragmento fusión *péptido-ripsc* obtenido por medio de PCR. Marcador de peso molecular 1Kb de promega

Una vez obtenidos los genes fusionados con la polimerasa de alta fidelidad pfu, el fragmento fusión fue clonado en el vector de amplificación pJET 1.2. A partir de la construcción pJET1.2-*péptidoripsc*, se obtuvo el fragmento fusión por digestión con las enzimas *BamHI* y *SacI*, de la misma manera el vector de expresión pET17b fue digerido con las mismas enzimas y tratado con fosfatasa alcalina. La clonación del fragmento fusión *péptido-ripsc* en pET17b resulta en la construcción pET17b-*péptidoripsc*, que se usó para la sobre-expresión de PEP-RIPSC en *E. coli*. La construcción pET17b-*péptidoripsc* fue comprobada por linearización con la enzima de restricción *BamHI* (Fig 35).

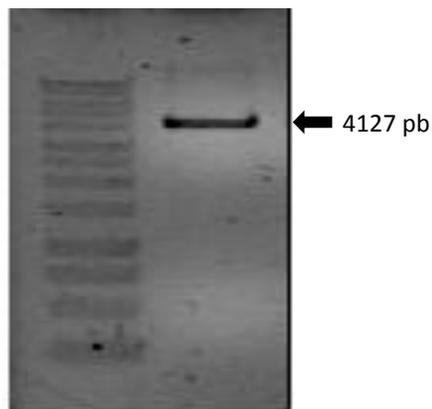


Fig 35. Construcción pET17b-*peprisp* linearizada con *BamHI*. Marcador de peso molecular de 1Kb de promega

Una vez comprobada la construcción, se transformó a *E. coli* BL21(DE3)*plysS* por electroporación obteniéndose la cepa *E. coli* BL21(DE3)*plysS*-[*pET17b-peprip*], con esta cepa se montaron cultivos y se indujo la sobre-expresión de PEPRIP, como control se cultivó la misma cepa pero sin inducción.

Para llevar a cabo la inducción se hizo un pre-cultivo de 5 ml de LB suplementado con ampicilina y cloranfenicol durante una noche (*overnight*) a 37°C. Al día siguiente se inocularon 20 ml de medio LB con 1 ml del pre-cultivo y se suplementó con ampicilina y cloranfenicol. Se incubó a 37°C y se monitoreo la densidad óptica. Una vez que el cultivo alcanzó 0.8 de DO, se agregaron 200 µl de una solución de IPTG 100 mM para obtener una concentración final de 1mM. Se siguió la curva de crecimiento y se obtuvo la siguiente gráfica (fig 36).

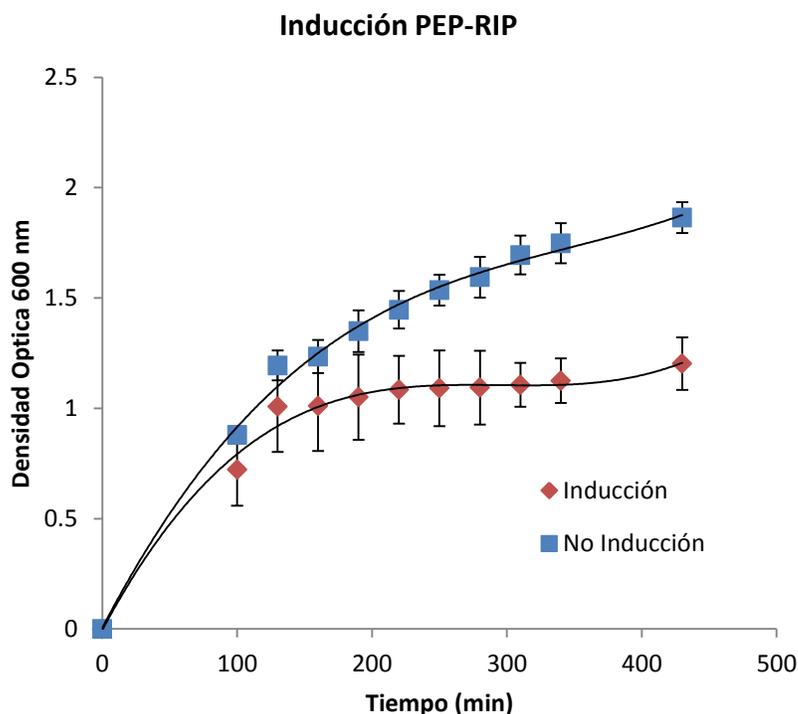


Fig. 36 Cinética de inducción de PEPRIP en *E. coli* BL21(DE3)*plysS*-[*pET17b-peprip*]. El cultivo se realizó en medio LB a una temperatura de 37°C y con agitación de 250 rpm, las muestras se tomaron cada 30 min. y al alcanzar una densidad óptica de 0.8 se agregó IPTG a una concentración final de 0.1 mM para inducir la expresión de RIPsc, como control se utilizó un cultivo sin inducir.

De acuerdo con la gráfica se puede observar que el cultivo inducido sufre disminución notable en crecimiento a partir del momento de la inducción, lo que puede ser debido al efecto de la sobre-

expresión de PEPRIP puesto que se trata de una proteína de naturaleza tóxica, resulta importante resaltar que el efecto es notable aún con los controles que posee la cepa hospedera, lo que sugiere que la proteína de fusión presenta la actividad deseada al menos sobre *E. coli*.

Durante el progreso de la curva de crecimiento del cultivo inducido, se tomaron muestras a las 0 h, 2 h y 4 h de la inducción para realizar fraccionamiento proteico. La finalidad de la separación de la fracciones fue analizar la naturaleza de la proteína heteróloga PEPRIP y verificar si se encuentra en el cultivo de manera nativa o en cuerpos de inclusión. En caso de encontrarse en cuerpos de inclusión tendría que llevarse a cabo un proceso de renaturalización proteica para obtenerla en su forma activa. El proceso de fraccionamiento proteico se llevó a cabo lisando a las células con lizosima y separando fracciones con buffers conteniendo detergentes y sales, tal como se describe en la sección de materiales y métodos.

Las fracciones proteicas obtenidas fueron separadas en un gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12.5%, y teñidas con azul de Coomasie (Fig. 37).

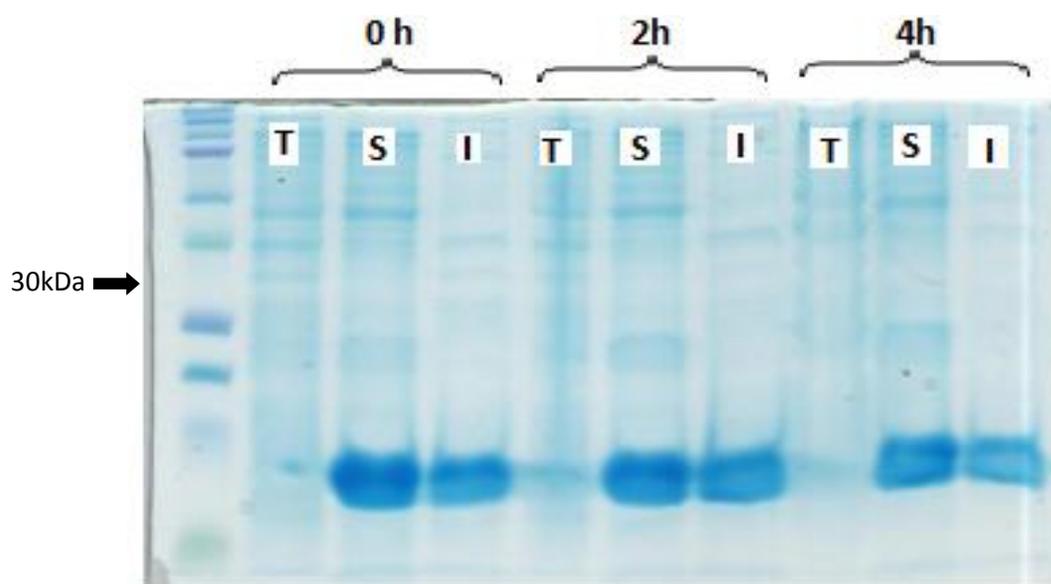


Fig. 37. Gel de poliacrilamida, SDS-PAGE al 12.5% para la separación de PEP-RIP. teñido con azul de coomasie. Las muestras separadas en el gel corresponden a las fracciones, T=Proteínas totales, S=Proteínas solubles, I=Proteínas insolubles, dichas fracciones fueron separadas de muestras tomadas a las 0 h, 2 h y 4 h de la inducción. En cada carril se cargaron 20 μ l de muestra. Marcador de peso molecular All blue de Biorad.

En la figura 37 se observan las bandas correspondientes a las proteínas obtenidas en las fracciones total, soluble e insoluble, la banda esperada correspondiente a la fusión PEPRIP es una banda de 30 kDa, de acuerdo con lo observado, no fue posible detectar la expresión de PEPRIP, lo cual podría deberse a que al tratarse de una proteína tóxica, la expresión sea baja y no se detecte con azul de coomasie.

Con el fin de encontrar la banda correspondiente a la proteína fusión se probaron diferentes condiciones de cultivo dentro de las cuales está la variación en la concentración de IPTG, se probaron concentraciones de 0.1 mM, 0.5 mM y 100 mM, de la misma manera se varió la temperatura de incubación, las temperaturas probadas fueron 20°C, 25°C y 37°C. En ninguna de las condiciones probadas se obtuvieron buenos resultados, se sugiere que la concentración de la proteína quimérica obtenida tras la inducción es baja y no puede ser detectada por este método.

7.4.2 FUSIÓN DEL PÉPTIDO (PEP32) EN EL EXTREMO CARBOXILO TERMINAL DE RIPsc

Para fusionar el péptido en el extremo carboxilo terminal de RIPsc se ha seguido la metodología descrita en la figura 33, la amplificación de los genes fusionados se llevó a cabo por PCR utilizando los oligos descritos en la tabla 21, dentro del oligo *reverse* se encuentra codificado el péptido a fusionar con codones preferenciales para *E. coli*.

Tabla 21. Diseño de oligos para la amplificación de la fusión *ripsc*-péptido.

RIPEP_FW 5' TA CATATG GATACGCCCAACAGGCAGACAACATACATTGATTTCC 3'
 RIPEP_RV 5' TA CTCGAG TCACCAAAAATGCCATTTACGCCTTTGCCCGTTGATGG 3'

La reacción de amplificación se llevó a cabo con la enzima de alta fidelidad VENT, bajo las siguientes condiciones (Tabla 22):

Tabla 22. Programa de amplificación para la fusión *ripsc*-péptido

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
95	5
95	1
55	1
72	1
Repetir 30 veces desde el paso 2	
72	5
4	∞

El fragmento fusión fue verificado por medio de la separación en un gel de agarosa al 1%, figura 38.

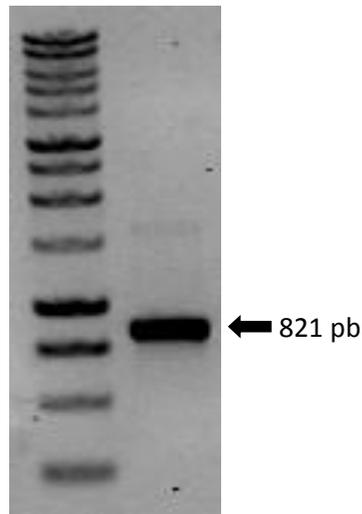


Fig.38. Fragmento fusión *ripsc-péptido* obtenido por medio de PCR. Marcador de peso molecular de 1 Kb de promega

El gen fusión obtenido *ripsc-péptido* fue clonado en el vector de expresión pJET 1.2 y verificado por secuenciación. A partir de la construcción pJET 1.2-*ripsc-péptido*, se liberó por digestión el fragmento *ripsc-péptido* con las enzimas *NdeI* y *XhoI*, a su vez el vector de expresión pET17b fue digerido con las mismas enzimas y tratado con fosfatasa alcalina. Ambos fragmentos fueron ligados y con la construcción obtenida se transformó *E. coli BL21(DE3)pLysS* obteniéndose la transformante *E. coli BL21(DE3)pLysS-ripsc-péptido*. La transformante obtenida se cultivó e indujo para sobre expresar a la proteína de fusión RIPsc-PEP. Con el objetivo de evaluar el efecto de la expresión de RIPsc-PEP sobre *E. coli*, se siguió una curva de crecimiento que se muestra en la figura 39.

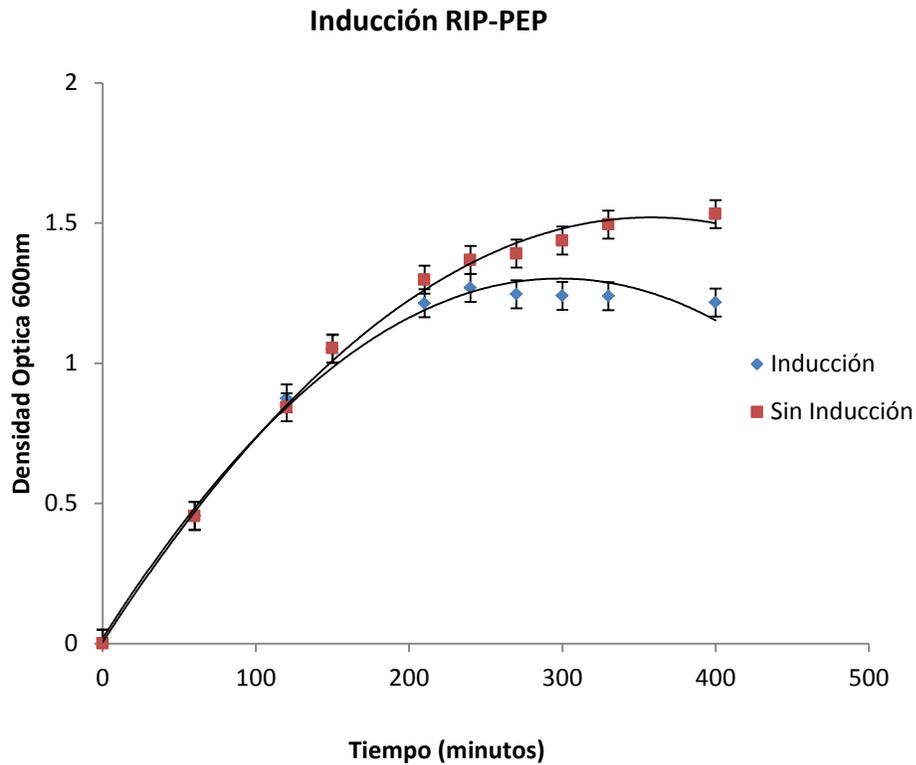


Fig. 39 Cinética de inducción de RIP-PEP en *E. coli* BL21(DE3)*plysS*-[*pET17b-riep*]. El cultivo se realizó en medio LB a una temperatura de 37°C y con agitación de 250 rpm, las muestras se tomaron cada 30 min. y al alcanzar una densidad óptica de 0.8 se agregó IPTG a una concentración final de 0.1 mM para inducir la expresión de RIPsc, como control se utilizó un cultivo sin inducir.

Como se observa, la sobre-expresión de la proteína de fusión muestra efecto sobre el crecimiento de *E. coli* después de la inducción pues este decrece de manera significativa pasadas cuatro h, esto puede deberse a la toxicidad de la proteína obtenida. Durante el progreso de la curva de crecimiento del cultivo inducido se tomaron muestras a las 0 h, 2 h y 4 h de la inducción para realizar fraccionamiento proteico.

Las fracciones proteicas obtenidas fueron separadas en un gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12.5%, y teñidas con azul de Coomassie (Fig. 40).

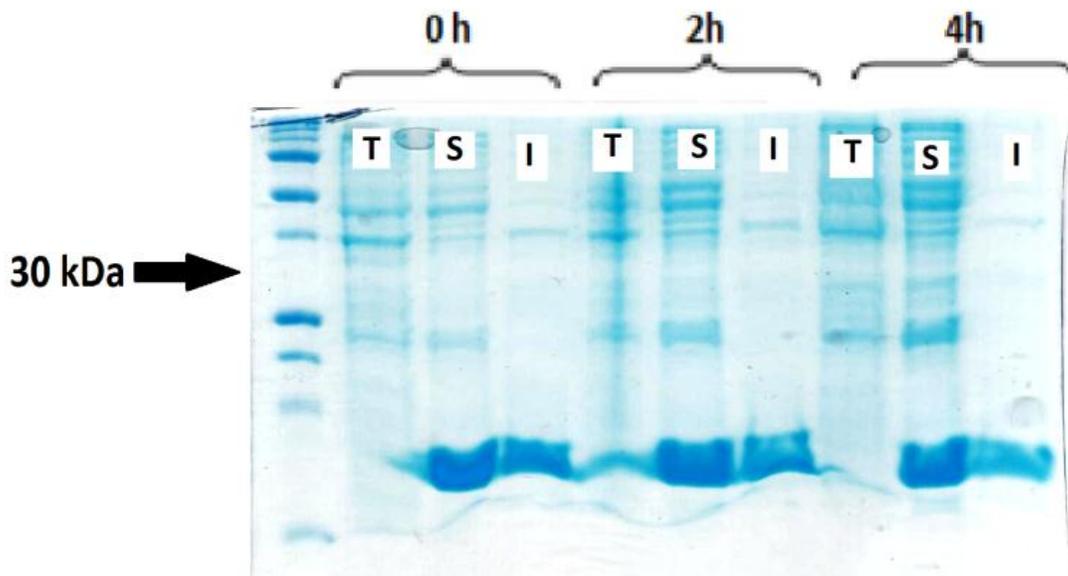


Fig. 40. Gel de poliacrilamida, SDS-PAGE al 12.5% para la separación de RIP-PEP, teñido con azul de coomasie. Las muestras separadas en el gel corresponden a las fracciones, T=Proteínas totales, S=Proteínas solubles, I=Proteínas insolubles, dichas fracciones fueron separadas de muestras tomadas a las 0 h, 2 h y 4 h de la inducción. En cada carril se corrieron 20 μ l de muestra. Marcador de peso molecular All blue de Biorad

De la misma manera que con la construcción de la fusión PEPRIP, no fue posible detectar la banda correspondiente a RIPPEP. Con la finalidad de encontrar la fracción correspondiente a RIPPEP, se probaron distintas condiciones de sobre-expresión variando concentraciones de IPTG y temperaturas sin ser posible obtener mejores resultados. Se sugiere que la falta de detección en la expresión puede ser debida a los niveles bajos de proteína fusión o a que la acumulación de proteína tóxica interfiere con la sobre-expresión. Se propone buscar métodos alternativos de producción heteróloga y métodos más sensibles de detección proteica de la misma manera la búsqueda por medio de Western-blot.

8

DISCUSIÓN

*“Daría todo lo que sé,
por la mitad de lo que ignoro”*

R. Descartes

La investigación sobre las Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas ha recibido atención especial en los últimos años debido a su participación como componente de mecanismos biológicos desconocidos y como parte interesante en la construcción de compuestos e inmunotoxinas con miras en la aplicación médica en contra de padecimientos hasta ahora incurables como el cáncer o el VIH o en la agricultura para vencer a plagas cada vez más resistentes. Sin embargo, aun hay muchas preguntas abiertas en cuanto al rol que desempeñan para el organismo productor y acerca de su uso aplicado en medicina o agricultura.

El descubrimiento creciente de nuevas RIPs en diversos organismos que va desde los más simples como bacterias hasta los más complejos como tejidos animales, fortalece el argumento que sostiene que su presencia debe conferir ventajas al organismo productor y que su prevalencia es un indicio de la transferencia evolutiva debida a la importancia de su rol. Las plantas fueron los primeros organismos en los cuales se notó la presencia de RIPs y desde ese momento su descubrimiento en dicho reino ha ido en aumento, incluso existen algunas especies que contienen más de una RIP en diversos tejidos. La característica más notable de estas proteínas es su toxicidad, en algunos casos selectiva, por lo que en primera instancia fue su aplicación lo que resultó novedoso y explotable, pero con el aumento de reportes (entre los más actuales, Puri *et al.*, 2012) de su presencia en diversos organismos, la pregunta se extiende a la razón de su función para quien la produce.

Por su parte, los actinomicetos son bacterias gram-positivas aisladas del suelo y al ser su hábitat natural tan complejo han desarrollado mecanismos de defensa importantes lo que les ha permitido producir metabolitos que atacan a microorganismos indeseables, además de estar en contacto directo con una amplia diversidad de organismos como plantas, hongos y otras bacterias que los hace ser capaces de sobrevivir en ambientes difíciles. Con esta base, encontramos evidencia (Reyes, 2008) de la presencia de un gen con similitud a las RIPs de plantas, dicha similitud es tan solo de 22% con la cadena A de la ricina, la RIP mas estudiada y de 23% con PAP, la RIP del tipo 1 mejor caracterizada. Los valores de similitud mostrados hasta ese entonces con las secuencias tomadas como referencia debilitaban la hipótesis de que el gen en estudio codificara para una RIP, sin embargo los alineamientos realizados con las mismas secuencias puso de manifiesto que dicha

similitud involucraba la conservación de los residuos presentes en el sitio activo tanto de la ricina como de la PAP en la estructura primaria predicha para RIPsc de *S. coelicolor*, por lo que a pesar de la baja similitud se continuó con el estudio experimental para demostrar que el gen en cuestión codifica para una RIP. El punto más interesante de esta parte del trabajo y que vale la pena resaltar es que por medio de un análisis asistido por herramientas computacionales (i-Tasser y VMD) se logró modelar la estructura proteica codificada por el gen de *S. coelicolor* y al realizar un acoplamiento estructural del modelo terciario de RIPsc de *S. coelicolor* con el modelo cristalografico de la RIP de la planta *Phytolacca dioica* obtenido por rayos X, se obtuvo alta correspondencia (Figura 12), con lo que se fortaleció la hipótesis de la clasificación de RIPsc dentro de las proteínas Inactivadoras de los ribosomas. Adicionalmente, dentro de los datos obtenidos tras el análisis *in silico* del gen *ripsc*, se determinó que la secuencia de RIPsc está conformada por 300 residuos de aminoácidos, con el programa SignalP 3.0 se encontró que los primeros 35 residuos de la secuencia forman parte de un péptido señal ubicado en el extremo N-terminal con lo que se sugiere que RIPsc es una proteína secretada. Además se buscaron genes homólogos en la especie y solo se encontró la presencia de un gen *rip* en *Streptomyces scabies*, la observación más importante con respecto al gen homólogo de *S. scabies* es que de igual manera que el gen *ripsc* de *S. coelicolor* se conservan los residuos del sitio activo. De manera adicional, se analizó la ubicación del gen *ripsc* en el genoma de *S. coelicolor* y se encontró que este se ubica cerca del final de su cromosoma lineal. De acuerdo a lo reportado por Bentley y colaboradores los genes esenciales se sitúan en la región central del cromosoma por lo que puede sugerirse que el gen *ripsc* no es un gen esencial necesario para el crecimiento del organismo. Por otro lado, se ha determinado que el final del cromosoma lineal de los estreptomicetos es altamente variable lo que puede explicar la presencia de un gen *rip* solo en dos integrantes de la especie (Bentley *et al.*, 2002). Otro elemento interesante es que al inicio del gen *ripsc* se encuentra un codón TTA por lo que se presume que RIPsc puede estar regulada a nivel de traducción por *bldA* y formar parte del metabolismo secundario.

En un inicio, de manera experimental se demostró que RIPsc tiene efecto sobre ribosomas de conejo al tener un sistema de expresión libre de células, por lo que se concluyó su actividad sobre ribosomas desnudos, también se demostró su efecto letal sobre *Saccaromyces cerevisiae* al expresar el gen *ripsc* en un sistema diseñado para esta levadura. De la misma manera se trató de demostrar la actividad de RIPsc sobre hongos y bacterias antagonistas tal como se ha probado para otras RIPsc (Reyes, 2008), sin obtener resultados satisfactorios, hecho que puede ser

sustentado por la premisa de que RIPsc pertenece al tipo 1 de las RIPs por lo que no es capaz de translocarse a través de la membrana celular. Hasta aquel momento de la investigación de RIPsc, se sabía que su efecto es correspondiente al de cualquier RIP, aunque se desconocía la manera en que lo ejercía. Con el afán de probar la actividad N-Glicosidasa de RIPsc y poderla incluir dentro de las RIPs, en primer lugar se investigaron las técnicas disponibles para lograrlo presentándose inconvenientes importantes pues por una parte el ensayo descrito por Endo y colaboradores requiere de sustancias con limitaciones de adquisición debido a su toxicidad (Endo *et al.*, 1987) y por otro lado el protocolo descrito por Barbieri y colaboradores está basado en la medición de la adenina liberada por medio de HPLC/MS/ESI, un equipo inaccesible para nuestro grupo (Barbieri *et al.*, 2006). Entonces, no pudo determinarse la actividad N-Glicosidasa de RIPsc de manera inmediata sino hasta que Mellchior y Tolleson publicaron el desarrollo de un método novedoso basado en la transcripción reversa en tiempo real (qRT-PCR). Por medio de dicho ensayo y tomando como ventaja el sistema de expresión de RIPsc en *E. coli* construido en este trabajo, se determinó el daño causado por RIPsc a los ribosomas del organismo productor (*E. coli* en este caso) concluyendo finalmente que RIPsc posee la capacidad de remover la adenina específica del sitio GAGA en la subunidad mayor del ribosoma, al igual que todas las RIPs (Figura 17). Con la prueba de que RIPsc posee actividad N-Glicosidasa y retomando las predicciones hechas por el análisis *in silico* realizado al inicio del trabajo, resulta interesante remarcar que al momento de establecer los criterios de comparación entre proteínas es indispensable determinar los dominios importantes para la actividad. De manera particular nuestro caso de estudio es la prueba de que a pesar de la baja similitud mostrada en el totalidad de la secuencia de RIPsc con otras RIPs, la prevalencia del sitio activo es determinante para poder incluir a RIPsc dentro de las proteínas Inactivadoras de los ribosomas.

Una vez demostrada la actividad N-Glicosidasa de RIPsc, la siguiente pregunta en la investigación de las RIPs fue el rol que desempeñan en el organismo productor, en este caso *S. coelicolor*. Como ya se ha mencionado, el trabajo más extenso de este tipo de proteínas se ha llevado a cabo en plantas, y al ser *S. coelicolor* un organismo de menor complejidad, se plantea la posibilidad de obtener claves más claras que dirijan la investigación a conclusiones más certeras de la función de las RIPs. Por otro lado, es importante tomar en cuenta que al existir herramientas de manipulación de *S. coelicolor* ampliamente desarrolladas se poseen ventajas significativas.

Con el fin de analizar la función de RIPsc se plantean 2 hipótesis importantes, la primera sostiene que forma parte de mecanismos de defensa y en la segunda se argumenta su participación en

mecanismos de apoptosis. Con base a las hipótesis planteadas en el trabajo se diseñaron experimentos y metodologías que nos han dado claves importantes. En primer lugar y siguiendo los niveles de regulación se estudió la transcripción del gen *ripsc* por medio de tres métodos diferentes, RT-PCR, Northern-blot y qRT-PCR. En primera instancia y por medio de RT-PCR se encontró que desde las primeras 24 h en un cultivo con condiciones estándar de crecimiento, existe expresión del gen *ripsc*. Al ser este método considerado como cualitativo se procedió al estudio por medio de Northern-blot, con la finalidad de obtener de manera cuantitativa los niveles de transcripción y así poder determinar el momento en el que la expresión llega a su punto máximo. Por medio de Northern-blot, además de probar condiciones normales de crecimiento también se incluyeron condiciones de cultivo de producción de metabolitos secundarios, específicamente tomando como referencia a la actinorrodina, debido a la predicción de que RIPsc podría estar regulada por *bldA* y tomando en cuenta el conocimiento de que la producción de actinorrodina está regulada de esta manera. Desafortunadamente, con el experimento realizado de actinorrodina no fue posible tener una conclusión pues bajo diversos intentos no se logró tener una señal significativa. La conclusión tras los resultados obtenidos en esta etapa es que el método no es lo suficientemente sensible como para detectar la expresión del gen *ripsc* por lo que finalmente se recurrió a una técnica más sensible en el estudio de la expresión de genes que es el qRT-PCR. Las condiciones utilizadas para este ensayo fueron cultivos estándar de crecimiento, de los que se tomaron muestras cada 24 h durante 120 h, además del análisis de la expresión también se siguió la curva de crecimiento de *S. coelicolor* para correlacionar la expresión con el estado de desarrollo de la cepa. La primera observación obtenida de los resultados en qRT-PCR es la inestabilidad en los niveles de expresión de *ripsc* pues estos se incrementan y disminuyen sin motivo aparente. Sin embargo, al correlacionar la expresión de *ripsc* con el estado de desarrollo del organismo se observa que a medida que la expresión de *ripsc* se incrementa, el crecimiento de *S. coelicolor* es menor, y cuando el crecimiento de *S. coelicolor* se incrementa, la expresión de *ripsc* decrece (Figura 25). Este hecho sustenta de manera parcial el argumento que declara que RIPsc forma parte de un mecanismo de apoptosis mostrándose así el primer indicio de la posible función de RIPsc, pero es importante resaltar que dicha conclusión requiere de evidencias más claras.

Adicionalmente y siguiendo los niveles de síntesis proteica, también se estudió a RIPsc a nivel de traducción, para lo cual se fusionó la región promotora de *ripsc* con el gen *egfp* correspondiente a la proteína verde fluorescente, tras una técnica denominada PCR recombinante, para ser usado como reportero en el estudio de la traducción de RIPsc. Dicha fusión se clonó en el vector de

expresión pIJ486 y con la construcción se transformó a *S. coelicolor*. Para la evaluación de la traducción se utilizó un microscopio de fluorescencia pues se esperaba que en el momento en que el promotor de RIPsc fuera activo, la fluorescencia de la proteína verde sería detectada, como control se construyó un sistema de expresión de EGFP en *E. coli* bajo la regulación del promotor inducible T7, con dicho control positivo fue posible ajustar las condiciones adecuadas del microscopio de fluorescencia para observar la señal de EGFP. Con la cepa de *S. coelicolor* transformada con la fusión *promotor-egfp*, se montaron diversos experimentos en los que se buscó evaluar las condiciones que cubren con las hipótesis propuestas, en primer lugar se buscó la señal de EGFP bajo las mismas condiciones en las que se encontraron transcritos de *ripsc* por qRT-PCR, bajo estas condiciones no fue posible detectar la señal de EGFP. Después se diseñó un experimento en el que se enfrentó a la cepa transformada de *S. coelicolor* con diversos hongos antagonistas para evaluar la posibilidad de que RIPsc forme parte de mecanismos de defensa. Los cultivos enfrentados se monitorearon cada 24 h pero no fue posible detectar señal de EGFP. Sin embargo, en este caso cabe señalar que esta construcción no es la adecuada para este tipo de experimento, ya que la proteína verde fluorescente es una proteína que necesita plegarse en el citoplasma para poder ser secretada, su secreción se lleva a través de la vía TAT. Dicha situación queda impedida pues al inicio del gen *ripsc* se encuentra un péptido señal, que de acuerdo al análisis *in silico*, sería dependiente de la vía de secreción Sec. Dentro del diseño de la construcción se consideró la fusión de la región promotora hasta el inicio del gen que incluye al péptido señal por lo que existiría oposición en la construcción y debido a la inclusión del péptido señal no es posible buscar fluorescencia fuera de la célula como se planteó en los experimentos realizados, ya que si se tratase de una proteína de defensa, esta tendría que actuar fuera de la célula donde además no existe poder reductor mediando por NADH+H para fluorescer a la proteína EGFP. El último experimento realizado bajo esta estrategia fue el monitoreo de un cultivo envejecido con el objetivo de probar la existencia de RIPsc en el momento en el que el cultivo empieza a morir y así demostrar que forma parte de mecanismos de apoptosis, dicho cultivo se monitoreó durante 28 días tomando muestras cada 24 h, bajo dicha condición y de la misma manera que en los experimentos anteriores no fue posible detectar señal de EGFP. Variados y exhaustivos esfuerzos fueron puestos en la búsqueda de traducción de RIPsc sin tener buenos resultados. La estrategia utilizada fue revisada de manera detallada, razón por la cual se verificaron todas las construcciones por medio de análisis de restricción y secuenciación, se verificó la transformante obtenida por medio de PCR de colonia sin encontrar errores. Sin embargo y aunque de manera experimental no se encontró ningún error, tras el análisis del diseño de la estrategia se

encontraron errores significativos debidos a la inclusión del péptido señal de RIPsc, que pueden ser la razón por la cual no fue posible detectar la señal de EGFP. Otra posibilidad es que los niveles de traducción de RIPsc sean bajos y la proteína verde fluorescente no es un buen reportero en estos casos. Las alternativas propuestas para lograr mejores resultados bajo la estrategia del uso de reporteros en el análisis de la traducción es el uso de la proteína monomérica roja fluorescente que es un mejor reportero para la secreción dependiente de Sec en *S. coelicolor*, además la estrategia del uso de la proteína verde fluorescente podría ser retomada siempre y cuando en la construcción de fusión no se incluya el péptido señal, aunque dicha alternativa aún puede presentar problemas debido a la ineficiencia de EGFP con niveles bajos de traducción. De acuerdo al conjunto de resultados obtenidos tras la extensa investigación desarrollada y con base a las hipótesis planteadas acerca de la función de RIPsc en *S. coelicolor* no pueden tenerse más que conclusiones parciales que abren la puerta a nuevas alternativas de estudio. Dichas conclusiones incluyen el hecho de que el gen *rip*sc es un gen que codifica para una proteína RIP tipo 1 con actividad N-Glicosidasa, clásica de todas las RIPs, además se transcribe a través del tiempo durante el crecimiento del microorganismo en niveles considerados hasta ahora bajos y que podrían ser basales. De cualquier manera y de forma imprecisa puede sugerirse que la relación que existe entre la transcripción y la curva de crecimiento fortalece la hipótesis que declara que RIPsc forma parte de mecanismos de apoptosis, además de que el hecho de ser una proteína RIP del tipo 1 y mostrar incapacidad de translocarse a través de la membrana celular debilita la hipótesis de su participación en mecanismos de defensa, a menos de que se trate de un mecanismo de defensa contra de fagos que aun está pendiente de estudio.

Por otro lado resulta interesante el hallazgo de una RIP en un actinomiceto pues a diferencia de las RIPs encontradas en bacterias como *E. coli* y *Shigella* se trata de una RIP del tipo 1 que está mejor relacionada con las RIPs encontradas en plantas y que podría ser parte de una transferencia vertical entre plantas y actinomicetos debido a que en su hábitat natural se encuentran relacionados.

Además del estudio de la función de RIPsc en *S. coelicolor* en el trabajo se plantea el uso de RIPsc de forma aplicada, específicamente el interés esta puesto en el diseño de nuevas moléculas para su uso en la agricultura. La creciente aparición de plagas resistentes a las sustancias de uso común invita a la creación de compuestos efectivos y que puedan usarse de manera alternativa. Dentro de este apartado, en el trabajo se diseñó la fusión del dominio RIPsc activo en ribosomas fúngicos y bacterianos con un péptido capaz de penetrar la membrana celular, característica que

complementa a RIPsc puesto que una vez dentro de la célula su efecto es letal. Para tal diseño se seleccionó de manera racional un péptido acarreador, que además posee actividad antifúngica y que es seguro para plantas, animales y humanos. La fusión diseñada tendrá especificidad y efectividad en contra de microorganismos fitopatógenos. Para cubrir el diseño se fusionó de manera molecular el minigen que codifica al péptido seleccionado con el gen *ripsc*, la fusión se llevó a cabo en el extremo N-terminal y en el extremo C-terminal pues se desconoce de que manera la estructura puede interactuar y podría existir impedimento estérico que pretende probarse con la fusión del péptido en ambos extremos, dicha fusión fue clonada en un plásmido de expresión para *E. coli* bajo el control del promotor inducible T7. Con ambas cepas construidas se realizaron inducciones para sobre-expresar ambas proteínas de fusión, se colectaron muestras proteicas que fueron separadas en un gel de poliacrilamida para analizar los niveles de sobre expresión. En ninguno de los casos fue posible detectar la expresión de la proteína fusión a pesar de probar variadas condiciones. La conclusión que puede argumentarse tras el resultado negativo es que la fusión de ambas moléculas tóxicas afecta los niveles proteicos sobre-expresados por lo que no es posible detectar a la proteína bajo métodos estándar, por tal razón se propone evaluar diversos métodos más sensibles que permitan detectar a las proteínas expresadas, tales como la tinción de los geles de electroforesis con plata en lugar de azul de *comassie*, western-blot o inmuno-blot, también pueden probarse nuevos sistemas de expresión como los desarrollados para *Streptomyces lividans*. La naturaleza tóxica de las moléculas fusionadas hace que el proceso de obtención sea complicado pero se sugiere que la estrategia es novedosa y de resultar exitosa en un futuro será totalmente rentable. En el trabajo se ha dado el antecedente que permitirá mejorar el diseño de la estrategia para obtener un compuesto funcional que permita explotar las características de RIPsc.

CONCLUSIONES

*“La ausencia de prueba,
No es prueba de ausencia”*

Carl Sagan

Las conclusiones obtenidas al final del trabajo se resumen a continuación.

- El gen *SCO7092* de *Streptomyces coelicolor* codifica una Proteína Inactivadora de los Ribosomas del tipo 1 con actividad N-Glicosidasa sobre ribosomas de *E. coli BL21 (DE3)pLysS*, removiendo de manera específica la adenina A₂₆₆₀.
- Con el hallazgo de RIPsc, se muestra la primera evidencia de una Proteína Inactivadora de los Ribosomas en un actinomiceto y se abre un nuevo campo de investigación.
- Los resultados obtenidos en el análisis de la expresión del gen *ripsc* nos permiten sugerir que es más probable que RIPsc participa en mecanismos de apoptosis que en mecanismos de defensa.
- La aplicación de RIPsc en la agricultura por medio del diseño de conjugados con péptidos bioactivos es prometedora, aunque es necesario encontrar sistemas de expresión eficientes pues la efectividad sobre el organismo hospedero, de los conjugados obtenidos, no permite tener niveles de expresión suficientes para ser detectados por técnicas clásicas como la electroforesis usada en el trabajo.

10

PERSPECTIVAS

*“Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas,
de pronto, cambiaron todas las preguntas.”*

Mario Benedetti.

- Analizar la expresión de RIPsc a nivel de traducción, por medio de la fusión de su región promotora con el gen reportero de la proteína mono-mérica roja fluorescente, siguiendo la misma estrategia planteada en el trabajo con la proteína verde fluorescente.
- Analizar la expresión de las fusiones *rip-pep* y *pep-rip* a nivel de transcripción para evaluar la efectividad del sistema, así como evaluar la traducción mediante Western-blot.
- Buscar y probar diferentes sistemas de expresión, variando vectores y cepas, para lograr la sobre-expresión eficiente de las proteínas de fusión PEP-RIP y RIP-PEP.

REFERENCIAS

- 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.
- Alegre, C, Iglesias, R., Ferreras, J. M., Citores, L., and Girbes, T. (1996). Sensitivity of ribosomes from *Agrobacterium tumefaciens* to the ribosome-inactivating protein crotin 2 depending on the translocational state. *Cell. Mol. Biol.* 42, 151-158.
- Anné J, Maldonado B, Van Impe J, Van Mellaert L, Bernaerts K. (2011). Recombinant protein production and streptomycetes. *J Biotechnol.*
- Barbieri, L., Battelli, M.G., Stirpe, F., (1993). Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1154, 237–282.
- Barbieri, L., Gorini, P., Valbonesi, P., Castiglioni, P., Stirpe, F., (1994). Unexpected activity of saporins. *Nature* 372, 624.
- Barbieri, L., Polito, L., Bolognesi, A., Ciani, M., Pelosi, E., Farini, V., Jha, A., Sharma, N., Vivanco, J. M., Chambery, A., Parente, A. and Stirpe, F. (2006) Ribosome-inactivating proteins in edible plants and purification and characterization of a new ribosome-inactivating protein from *Cucurbita moschata*. *Biochim. Biophys. Acta* 1760, 783–792
- 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.
- Barbieri, L., Valbonesi, P., Bonora, E., Gorini, P., Bolognesi, A., Stirpe, F., (1997). Polynucleotide:adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A). *Nucleic Acids Res.* 25, 518–522.
- Bertolt Gust, Kerstin Spatz, Alexander Spychaj, and Matthias Redenbach (2001). Region-Specific Transcriptional Activity in the Genome of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Appl Environ Microbiol.* 67(8): 3598–3602.
- Bieri, S.; Potrykus, I. and Fütterer, J. (2000). Expression of active barley seed ribosome-inactivating protein in transgenic wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 100:755-763.
- 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.
- Brigotti, M., Alfieri, R., Sestili, P., Bonelli, M., Petronini, P., Guidarelli, A., Barbieri, L., Stirpe, F., Sperti, S., (2002). Damage to nuclear DNA induced by Shiga toxin 1 and by ricin in human endothelial cells. *FASEB J.* 16, 365–372.
- 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.
- Broekaert WF, Cammue BPA, De Bolle MF, Thevissen K, De Samblanx GW, Osborn RW (1997). Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16: 297–323.

- Brogden, K.A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?, *Nature Reviews Microbiology* 3 (3): 238–250.
- Chan, W.L., Shaw, P.C., Tam, S.C., Jacobsen, C., Gliemann, J. y Nielsen MS. (2000) Trichosanthin interacts with and enters cells via LDL receptor family members. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270(2), 453–457.
- Chater FK and Chandra G. (2008). The use of the rare UUA codon to define “expression space” for genes involved in secondary metabolism, development and environmental adaptation in *Streptomyces*. *J. Microbiol.* Vol. 46, No. 1.
- Chen, H., Wang, Y., Yan, M. G., Yu, M. K., and Yao, Q. Z. (1996). The phosphatase activity of five ribosome-inactivating proteins. *Chin. Biochem. J.* 12, 125–129
- Connell, N. D. (2001). Expression systems for use in actinomycetes and related organisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:446–449.
- Daniel J Hirst, Tzong-Hsien Lee, Marcus J Swann, Sharon Unabia, Yoonkyung Park, Kyung-Soo Hahm and Marie Isabel Aguilar. (2011). Effect of acyl chain structure and bilayer phase state on the binding and insertion of HPA3 onto a supported lipid bilayer. *European Biophysics Journal.* 40 (4) 503-4
- 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. *Toxicon* 41, 813-822.
- Di Maro, A., Valbonesi, P., Bolognesi, A., Stirpe, F., De Luca, P., Siniscalco Gigliano, G., Gaudio, L., Delli Bovi, P., Ferranti, P., Malorni, A. and Parente, A. (1999) Isolation and characterization of four type-1 ribosome-inactivating proteins, with polynucleotide: adenosine glycosidase activity, from leaves of *Phytolacca dioica* L. *Planta* 208, 125-131
- DiMasi, Joseph A., Hansen, Ronald W., and Grabowski, Henry G. (2003). The price of innovation: new estimates of drug development costs. *Journal of Health Economics*, 22, 151-185.
- Dyson P. (2011). *Streptomyces: Molecular Biology and Biotechnology*. Caister Academic Press. ISBN: 978-1-904455-77-6
- Ehrlich, P., (1891). Experimentelle Untersuchungen über Immunität I. Ueber Ricin. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 17, 976–979.
- El-Andaloussi S., T. Holm, Ü. Langel,. (2005). Cell-penetrating peptides: mechanism and applications, *Curr. Pharma. Design* 11 3597–3611.
- Endo, Y., Gluck, A., Wool, I.G., (1991). Ribosomal RNA identity elements for ricin A-chain recognition and catalysis. *J. Mol. Biol.* 221, 193–207.
- Endo, Y., Mitsui, K., Motizuki, K., Tsurugi, K., (1987). The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. *J. Biol. Chem.* 262, 5908–5912.
- Falnes, P.O., Sandvig, K., (2000). Penetration of protein toxins into cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 407-413
- Fassina, G., Merli, S., Germani, S., Ciliberto, G., and Cassani, G. (1994) Highyield expression and purification of human endothelin-1. *Protein Expr. Purif.* 5, 559–568.
- Ferens, W.A., Hovde, C.J., (2000). Antiviral activity of Shiga toxin 1: suppression of bovine leukemia virus-related spontaneous lymphocyte proliferation. *Infect. Immun.* 68, 4462-4469.

- Ferreras JM, Citores L, Iglesias R, Jiménez P, Girbés T. (2011). Use of Ribosome-Inactivating Proteins from Sambucus for the Construction of Immunotoxins and Conjugates for Cancer Therapy. *Toxins (Basel)*; 3(5):420-41.
- Ferreras, J. M., Citores, L., de Benito, F. M., Arias, F. J., Rojo, M. A., Muñoz, R., Iglesias, R. and Girbés, T. (2000) Ribosome-inactivating proteins and lectins from Sambucus. *Curr. Topics Phytochem.* 3, 113–128.
- Fleige, S., Pfaffl, M.W., (2006). Impact of RNA integrity on the quantitative real-time RT-PCR performance and relative mRNA quantification models.
- García-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM, Rodríguez-Palenzuela P (1998). Plant defense peptides. *Biopolymers* 47:479–91.
- Gatehouse, A.M.R., Barbieri, L., Stirpe, F., and Croy, R.R.D.(1990). Effects of ribosome inactivating proteins on insect development-differences between Lepidoptera and Coleoptera. *Entomol. Exp. Appl.* 54, 43-51.
- Gessner, S. L., and Irvin, J. D. (1980). Inhibition of elongation factor 2-dependent translocation by the pokeweed antiviral protein and ricin. *J. Biol. Chem.* 255, 3251-3253.
- Girbés T, Ferreras JM, Arias FJ, 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
- Girbés, T., Citores, L., Ferreras, J.M., Rojo, M.A., Iglesias, R., Muñoz, R., Arias, F.J., Calonge, M., García, J.R., Méndez, E., (1993). Isolation and partial characterization of nigrin b, a non-toxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from the bark of *Sambucus nigra* L. *Plant Mol. Biol.* 22, 1181–1186.
- Grabowski, H.G., and Vernon, J. (2000). The Distribution of Sales Revenues from Pharmaceutical Innovation. *Pharmaco Economics, Supplement 1*, 18(3), 21-23.
- Gyles, C.L., (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci.* ;85 (13 Suppl):E45-62.
- Hancock, Robert E.W.; Rozek, A. (2002), "Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides.", *FEMS Microbiology Letters* 206 (2): 143–149.
- Haight, C., Davis, G. D., Subramanian, R., Jackson, K. W., and Harrison, R. G. (1998) Recombinant production and purification of novel antisense antimicrobial peptide in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 57, 55–61.
- Helmy, M., Lombard, S., and Pieroni, G. (1999) Ricin RCA60: evidence of its phospholipase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 252–255
- Hey TD, Hartley M and Walsh TA (1995) Maize ribosome inactivating protein (b-32). *Plant Physiol* 107: 1323–1332
- Holmberg, L., and Nygard, O. (1994). Interaction sites of ribosome-bound eukaryotic elongation factor 2 in 18S and 28S rRNA. *Biochemistry* 33, 15159-15167.
- Hoskin, D.W.; Ramamoorthy, A. (2008), "Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides", *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* 1778 (2): 357–375.
- 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
- Hüttenhofer A, Schattner P, Polacek N. (2005). Noncoding RNAs: Hope or hype? *Trends Genet* 21: 289–297.

- Ingham, A. B. and Moore, R. J. (2007). Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 47, 1–9.
- Irvin, J. D. (1995). Antiviral proteins from *Phytolacca*. In "Antiviral Proteins from Higher Plants" (M. Chessin DeBorde, D., Zipf, A., eds.) pp. 65-69 CRC Press, Boca Raton, FL.
- Irvin, J.D., (1983). Pokeweed antiviral protein. *Pharmacol. Ther.* 21, 371–387.
- Ishizaki, T., Megumi, C., Komai, F., Masuda, K. and Oosawa, K. (2002). Accumulation of a 31-kDa glycoprotein in association with the expression of embryogenic potential by spinach callus in culture. *Physiol. Plant.* 114, 109–115.
- James C. Phillips, Rosemary Braun, Wei Wang, James Gumbart, Emad Tajkhorshid, Elizabeth Villa, Christophe Chipot, Robert D. Skeel, Laxmikant Kalé, Klaus Schulten. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry* Volume 26, Issue 16, pages 1781–1802.
- Jones, N.L., Islur, A., Haq, R., Mascarenhas, M., Karmali, M.A., Perdue, M.H., Zanke, B. W., Sherman, P.M., (2000). *Escherichia coli* Shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells that is regulated by the Bcl-2 family. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278, G811-G819.
- Kemp R. and Volpi M. (2008). The diffusion of clean technologies: a review with suggestions for future diffusion analysis. *Journal of Cleaner Production.* Vol 16, Issue 1. Pag. S14-S21
- Kiesser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F. and Hopwood D.A. (2000) *Practical Streptomyces genetics.* John Innes Foundation, Norwich.
- Kim, H. K., Chun, D. S., Kim, J. S., Yun, C. H., Lee, J. H., Hong, S. K., and Kang, D. K. (2006) Expression of the cationic antimicrobial peptide lactoferricin fused with the anionic peptide in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 330–338.
- Kodama, T., A. G. Doukas, and M. R. Hamblin. (2003). Delivery of ribosome-inactivating protein toxin into cancer cells with shock waves. *Cancer Lett* 189:69-75.
- Kuhn, B., Gerber, P., Schulz-Gasch, T., and Stahl, M. (2005). Validation and use of the MM-PBSA approach for drug discovery. *J Med Chem* 48, 4040–4048.
- Lam YH, Wong YS, Wang B, Wong RNS, Yeung HW, Shaw PC. (1996). Use of trichosanthin to reduce infection by turnip mosaic virus. *Plant Sci* 1996, 114:111-117.
- Li Y, Chen Z. (2008). RAPD: a database of recombinantly-produced antimicrobial peptides. *FEMS Microbiol. Lett.*;289:126–129
- Li Y. (2009). Carrier proteins for fusion expression of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 54, 1–9
- Ling, J., Liu, W.-y. and Wang, T. P. (1995) Simultaneous existence of two types of ribosome inactivating proteins in the seeds of *Cinnamomum camphora*: characterization of the enzymatic activities of these cytotoxic proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1252, 15–22.
- 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.
- 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.

- 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.
- Lu TL, Chen CS, Yang FL, Fung JM, Chen MY, Tsay SS, Li J, Zou W, Wu SH. (2004). Structure of a major glycolipid from *Thermus oshimai* NTU-063. *Carbohydr Res* 339:2593
- MacKerell, A. D., Banavali, N. and Foloppe, N. (2000). Development and current status of the CHARMM force field for nucleic acids. *Biopolymers*, Volume 56, Issue 4, pages 257–265.
- Marcos JF, Muñoz A, Pérez-Payá E, Misra S, López -García Belén (2008). Identification and Rational Design of Novel Antimicrobial Peptides for Plant Protection. *Annu. Rev. Phytopathol* 46:273–301
- Matsuzaki, Katsumi (2008). Control of cell selectivity of antimicrobial peptides, *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* 1788 (8): 1687–92.
- 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.
- Melchior, W. B., Jr & Tolleson, W. H. (2010). A functional quantitative polymerase chain reaction assay for ricin, Shiga toxin, and related ribosome-inactivating proteins. *Anal Biochem* 396, 204–211.
- Montesinos E. (2007). Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiology Letters*. Volume 270, Issue 1, pages
- 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
- Moon, J. Y., Henzler-Wildman, K. A., and Ramamoorthy, A. (2006) Expression and purification of a recombinant LL-37 from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758, 1351–1358.
- Moon, W. J., Hwang, D. K., Park, E. J., Kim, Y. M., and Chae, Y. K. (2007) Recombinant expression, isotope labeling, refolding, and purification of an antimicrobial peptide, piscidin. *Protein Expr. Purif.* 51, 141–146.
- Morassutti, C., De Amicis, F., Bandiera, A., and Marchetti, S. (2005). Expression of SMAP-29 cathelicidin-like peptide in bacterial cells by intein-mediated system. *Protein Expr. Purif.* 39, 160–168.
- Morris M.C., S. Deshayes, F. Simeoni, G. Aldrian-Herrada, F. Heitz, G. Divita,. (2007). A noncovalent peptide-based strategy for peptide and short interfering RNA delivery, in: Ü. Langel (Ed.), *Cell-penetrating peptides*, pp. 387–408
- Narayanan Sriram, Kalpana Surendranath, Namrata Bora, Avadhesh Surolia, Anjali A. Karande. (2005). Ribosome Inactivating Proteins and apoptosis. *FEBS Lett.* 579, 1324-1331
- Nielsen, K. and Boston, R. S. (2001) Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 785–816.
- Obrig, T.G., (1997). Shiga toxin mode of action in *E. coli* O157:H7 disease. *Front. Biosci.* 15, d635 -d642.
- Okuyama, M. and Laman, H. and Kingsbury, S.R. and Visintin, C. and Leo, E. and Eward, K.L. and Stoeber, K. and Boshoff, C. and Williams, G.H. and Selwood, D.L. (2007) Small-molecule mimics of an α -helix for efficient transport of proteins into cells. *Nature Methods*, 4 (2). pp. 153-159

- Olsnes, S., Refsnes, K., Pihl, A., (1974). Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. *Nature* 249, 627–631.
- Osborn, R. W., and Hartley, M. R. (1990). Dual effects of the ricin A-chain on protein synthesis in rabbit reticulocyte lysate. Inhibition of initiation and translocation. *Eur: J. Biochem.* 193, 401-407.
- Pang Y-P, Park JG, Wang S, Vummenthala A, Mishra RK,. (2011) Small-Molecule Inhibitor Leads of Ribosome-Inactivating Proteins Developed Using the Doorstop Approach. *PLoS ONE* 6(3): e17883.
- Papagianni, M. (2003), Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications, *Biotechnol Adv* 21 (6): 465–499
- Parikh, B. A. and Tumer, N. E. (2004) Antiviral activity of ribosome inactivating proteins in medicine. *Mini Rev. Med. Chem.* 4, 523–543.
- Paton, J.C., Paton, A. W., (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 450-479
- Peumans, W.; Van Damme, E. (2010). Evolution of plant ribosome inactivating proteins. In: Lord, J.M.; Hartley, M.R. (Ed.) *Toxic Plant Proteins*. Heidelberg: Springer Verlag, p. 1-26.
- Peumans, W.J., Hao, Q., Van Damme, E.J.M., (2001). Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *FASEB J.* 15, 1493–1506.
- Peumans, W.J., Hao, Q., Van Damme, E.J.M., (2001). Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *FASEB J.* 15, 1493–1506.
- Piers KL, Brown MH & Hancock RE (1993). Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria. *Gene* 134: 7–13
- Puri M. Kaur I. Kanwar R.K. Gupta R.C. Chauhan A. Kanwar J.R. (2009). Ribosome inactivating proteins (RIPs) from *Momordica charantia* for anti viral therapy. *Curr. Mol. Med.* 9(9), 1080-1094
- Rajamohan, F., C. R. Engstrom, T. J. Denton, L. A. Engen, I. Kourinov, and F. M. Uckun. (1999). High level expression and purification of biologically active recombinant pokeweed antiviral protein. *Protein Expression Purif.* 16:359–368.
- Reisbig, R., Olsnes, S., Eiklid, K., (1981). The cytotoxic activity of *Shigella* toxin. Evidence for catalytic inactivation of the 60S ribosomal subunit. *J. Biol. Chem.* 256, 8739–8744.
- Remi Shih, N. R., McDonald, K. A., Jackman, A. P., Girbes, T., and Iglesias, R. (1997) Bifunctional plant defense enzymes with chitinase and ribosome-inactivating activities from *Trichosanthes kirilowii* cell cultures. *Plant Sci.* 130, 145–150
- Rennert R, Wespe C, Beck-Sickinger AG, and Neundorf I. (2006) Developing novel hCT derived cell-penetrating peptides with improved metabolic stability. *Biochim Biophys Acta* 1758:347–354
- Reyes A. G., Geukens N., Gutschoven P., De Graeve S., De Mot R., Mejía A. and Anné J. (2010). The *Streptomyces coelicolor* genome encodes a type I ribosome-inactivating protein. *Microbiol.* 156, 3021-3030
- Reyes AG (2008). Proteína Inactivadora de los Ribosomas de *Streptomyces coelicolor*. Tesis de la maestría en biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana.

- Reyes, AG., Anné J., and Mejía. (2012). Ribosome-Inactivating Proteins with an emphasis in bacterial RIPs and their potential medical applications. *Future Microbiology*. 7(6), 705-717.
- 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.
- 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.
- Sánchez, S. and Demain, A.L. (2011) Secondary metabolites. In: Murray Moo-Young (ed.), *Comprehensive Biotechnology*, Elsevier, Ltd., Oxford. Second Edition, volume 1, pp. 154–168.
- Sandoval G., Olguín A. y Paniagua J. (2008). Péptidos: aplicaciones en investigación y desarrollo. *Biología Farmacéutica*, Laboratorios Silanes S. A. de C. V. Lecturas, 3463.
- Sandvig, K. (2001) Shiga toxin. *Toxicon* 39, 1629–1635.
- Sandvig, K. and Van Deurs, B. (1996) Endocytosis, intracellular transport and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol. Rev.*, 76, 949-966.
- 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.
- Sandvig, K. and B. van Deurs (2000). Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives (Review). *EMBO-J*, 19:5943-5950.
- 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.
- Skosyrev, V. S., Rudenko, N. V., Yakhnin, A. V., Zagranichny, V. E., Popova, L. I., Zakharov, M. V., Gorokhovatsky, A. Y., and Vinokurov, L. M. (2003) EGFP as a fusion partner for the expression and organic extraction of small polypeptides. *Protein Expr. Purif.* 27, 55–62.
- Stillmark, H., (1888). Ueber Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus comm. L und einigen anderen Euphorbiaceen. MD Thesis, Kaiserliche Universität zu Dorpat.
- Stillmark, H., (1889). Ueber ricin. In: Kobert, R., (Ed.), *Arbeiten des Pharmakologischen Instituts zu Dorpat*, Enke, Stuttgart, pp. 59–151.
- Stirpe, F. (2004). Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon* 44, 371–383.
- 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.
- Stirpe, F.; Battelli, M.G. (2006). Ribosome-inactivating proteins: Progress and problems. *Cell. Mol. Life Sci.* , 44, 1850–1866.
- Sudesh Chhikara, Darshna Chaudhury, Om Parkash Dhankher, Pawan K. Jaiwal. (2012). Combined expression of a barley class II chitinase and type I ribosome inactivating protein in transgenic Brassica juncea provides protection against Alternaria brassicae. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. Volume 108, Issue 1, pp 83-89.

- Tor Yitzhak y Xie Yun. (2009). New fluorescent nucleosides for real-time exploration of nucleic acids. SPIE Newsroom: Biomedical Optics & Medical Imaging. In Press.
- Trabulo, S.; Cardoso, AL; Mano, M.; de Lima, MCP (2010). Cell-penetrating peptides—Mechanisms of cellular uptake and generation of delivery systems. *Pharmaceuticals*, 3, 961-993.
- Vallin C., E. Pimienta, A. Ramos, C. Rodríguez, L. V. Mellaert, J. Anné, (2005). *Streptomyces* as a host for the secretion of heterologous protein for the production of biopharmaceuticals, *J. Business Chemistry*. 107-110
- Van Damme, E. J. M., Barre, A., Barbieri, L., Valbonesi, P., Rougé, P., Van Leuven, F., Stirpe, F. and Peumans, W. J. (1997). Type 1 ribosome-inactivating proteins are the most abundant proteins in iris (*Iris hollandica* var. Professor Blaauw) bulbs: characterization and molecular cloning. *Biochem. J.* 324, 963–970
- Van Damme, E.J.M., Hao, Q., Barre, A., Vandebussche, 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.
- Van Dessel, W., L. Van Mellaert, N. Geukens, and J. Anne. (2003). Improved PCR-based method for the direct screening of *Streptomyces* transformants. *J. Microbiol. Methods* 53:401–403.
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:135–162.
- Vassilevski AA, Kozlov SA & Grishin EV (2008). Antimicrobial peptide precursor structures suggest effective production strategies. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2, 58–63.
- Vivanco JM, Savary BJ, Flores HE (1999). Characterization of two novel type I ribosome-inactivating proteins from the storage roots of the Andean crop *Mirabilis expansa*. *Plant Physiol* 119: 1447–1456.
- Wadia JS, Stan RV, Dowdy SF (2004). Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med*, 10:310-315.
- Wang, P., Tumer, N.E., (2000). Virus resistance mediated by ribosome inactivating proteins. *Adv. Virus Res.* 55, 325–355.
- Wei, Q. D., Kim, Y. S., Seo, J. H., and Cha, H. J. (2005). Facilitation of expression and purification of antimicrobial peptide by fusion with baculoviral polyhedrin in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5038–5043.
- Xiao-Ping Li, Jia-Chi Chiou, Miguel Remacha, Juan P. G. Ballesta and Nilgun E. Tumer. (2009). A Two-Step Binding Model Proposed for the Electrostatic Interactions of Ricin A Chain with Ribosomes. *Biochemistry*, 48 (18), 3853-3863.
- Xu, X. X., Jin, F. L., Yu, X. Q., Ji, S. X., Wang, J., Cheng, H. X., Wang, C., and Zhang, W. Q. (2007) Expression and purification of a recombinant antibacterial peptide, cecropin, from *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 53, 293–301.
- Yang Zhang. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, vol 9, 40.
- 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.

Yeaman, M.R.; Yount, N.Y. (2003), Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, *Pharmacological reviews* 55 (1): 27–55.

Zamboni, M.C., Brigotti, M., Rambelli, F., Montanaro, L., Sperti, S. (1989). High-pressure-liquid chromatographic and fluorimetric methods for the determination of adenine release from ribosomes by ricin and gelonin. *Biochem. J.* 259, 639-643

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.

Zhou, X. (2000). Toxicity of cinammomin a new type II ribosome-inactivating protein to bollworm and mosquito. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 259-264.

Zorko M. and U. Langel,. (2005). Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 57, no. 4, pp. 529–545.

Zorko, M., Japelj, B., Hafner-Bratkovic, I., and Jerala, R. (2009) Expression, purification and structural studies of a short antimicrobial peptide. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 314–323.

11

ANEXOS

The *Streptomyces coelicolor* genome encodes a type I ribosome-inactivating protein

Ana G. Reyes,^{1,2†} Nick Geukens,^{1††} Philip Gutschoven,¹ Stijn De Graeve,^{3,4} René De Mot,⁵ Armando Mejía² and Jozef Anné¹

Correspondence

Jozef Anné

Jozef.anne@rega.kuleuven.be

¹Laboratory of Bacteriology, Rega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit Leuven, Minderbroedersstraat 10, B-3000 Leuven, Belgium

²Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico

³VIB Department of Molecular Microbiology, Kasteelpark Arenberg 31, B-3001 Heverlee-Leuven, Belgium

⁴Laboratory of Molecular Cell Biology, Institute of Botany and Microbiology, Katholieke Universiteit Leuven, B-3001 Heverlee-Leuven, Belgium

⁵Centre of Microbial and Plant Genetics, Department of Microbial and Molecular Systems, Faculty of Bioscience Engineering, Katholieke Universiteit Leuven, B-3001 Heverlee-Leuven, Belgium

Ribosome-inactivating proteins (RIPs) are cytotoxic *N*-glycosidases identified in numerous plants, but also constitute a subunit of the bacterial Shiga toxin. Classification of plant RIPs is based on the absence (type I) or presence (type II) of an additional lectin module. In Shiga toxin, sugar binding is mediated by a distinct RIP-associated homopentamer. In the genome of two actinomycetes, we identified RIP-like proteins that resemble plant type I RIPs rather than the RIP subunit (StxA) of Shiga toxin. Some representatives of β - and γ -proteobacteria also contain genes encoding RIP-like proteins, but these are homologous to StxA. Here, we describe the isolation and initial characterization of the RIP-like gene product SCO7092 (RIPsc) from the Gram-positive soil bacterium *Streptomyces coelicolor*. The *ripsc* gene was expressed in *Escherichia coli* as a recombinant protein of about 30 kDa, and displayed the characteristic *N*-glycosidase activity causing specific rRNA depurination. In *Streptomyces lividans* and *E. coli*, RIPsc overproduction resulted in a dramatic decrease in the growth rate. In addition, intracellular production was deleterious for *Saccharomyces cerevisiae*. However, when applied externally to microbial cells, purified RIPsc did not display antibacterial or antifungal activity, suggesting that it cannot enter these cells. In a cell-free system, however, purified *S. coelicolor* RIPsc protein displayed strong inhibitory activity towards protein translation.

Received 15 February 2010

Revised 22 June 2010

Accepted 28 June 2010

INTRODUCTION

Ribosome-inactivating proteins (RIPs) are cytotoxic *N*-glycosidases that inhibit protein synthesis by virtue of their enzymic activity, selectively cleaving a specific adenine residue from a highly conserved, surface-exposed stem-loop (sarcin–ricin loop) structure in 28S rRNA (Park *et al.*,

2006). RIPs show depurination activity against eukaryotic and prokaryotic rRNA in the presence and absence of ribosomal proteins (Endo *et al.*, 1991). Depurination of the sarcin–ricin loop prevents binding of elongation factor 2 to the ribosome, thereby resulting in protein synthesis inhibition (Stirpe *et al.*, 1992; Stirpe, 2004).

Currently, RIPs isolated from plants are divided into two major groups based on the presence or absence of a lectin-like chain, which makes a significant functional difference. Type I RIPs consist of a single polypeptide chain of about 30 kDa, whereas type II RIPs consist of an enzymically active A chain similar to type I RIPs, linked by a disulphide bond to a slightly larger (approximately 35 kDa) B chain, which has the properties of a lectin with specificity for galactose-containing carbohydrates (Barbieri *et al.*, 1993; Stirpe, 2004). The best-known type II RIP is ricin (Lord *et al.*, 1994).

†These authors contributed equally to this work.

††Present address: PharmAbs, The K.U.Leuven Antibody Center, Herestraat 49 box 824, B-3000 Leuven, Belgium.

Abbreviations: qRT-PCR, quantitative RT-PCR; RIP, ribosome-inactivating protein.

Two supplementary figures, showing a multiple sequence alignment of representative RIPs from plants, A subunits of Shiga toxins and RIP-like proteins from bacteria, and a dendrogram constructed from the alignment, are available with the online version of this paper.

Only the presence of type II RIPs has been confirmed in bacteria (Suh *et al.*, 1998; Sandvig, 2001). These potent type II RIPs that contain a glycosphingolipid-binding moiety are produced by *Shigella dysenteriae* (Shiga toxin) and several other pathogenic bacteria, including certain strains of *Escherichia coli* (Shiga-like toxins or verotoxins) (Sandvig, 2006). In this toxin the enzymically active monomeric subunit (StxA) is non-covalently associated with a homopentameric sugar-binding module (Johannes & Römer, 2010).

Although the enzymic and biological activities of RIPs have been extensively investigated, and for several the crystal structure has been elucidated (Stirpe & Battelli, 2006; Ng *et al.*, 2010), their precise physiological role is still subject to debate. Plant RIPs are generally suggested to be defence-related proteins, as they are able to inhibit the multiplication and growth of several pathogenic viruses, fungi and bacteria either alone or in conjunction with other defence-related proteins. On the other hand, their wide distribution in plants suggests that they have an important role, giving an evolutionary advantage that justifies their conservation (Girbés *et al.*, 2004).

In this manuscript, we describe the analysis of a gene (designated *ripsc*) from *Streptomyces coelicolor*, genetically the best-characterized *Streptomyces* species (Bentley *et al.*, 2002), with an orthologue in *Streptomyces lividans* that encodes a protein with significant homology to previously described type I RIPs. We studied the biological properties and antimicrobial activities of this putative RIP homologue encoded by *SCO7092*.

METHODS

Strains, media and growth conditions. *E. coli* strain TG1 was used as host for cloning purposes (Sambrook *et al.*, 1989). Cultures were grown at 37 °C (with shaking at 300 r.p.m.) in Luria–Bertani medium, supplemented with the appropriate antibiotics. *S. coelicolor* M145 and *S. lividans* TK24 and their derivatives were precultured in 5 ml phage medium (Korn *et al.*, 1978) supplemented with the appropriate antibiotics, when needed, and grown at 27 °C with continuous shaking at 250 r.p.m. for 48 h. After homogenizing the mycelium, the strains were inoculated in liquid Nutrient broth-MOPS medium (NM) (Van Mellaert *et al.*, 1994). For solid media, mannitol soya flour (MS) (Kieser *et al.*, 2000) or MRYE medium was used (Anné *et al.*, 1990) supplemented with thioestrepton (10 µg ml⁻¹), where applicable. Protoplast formation and subsequent transformation of *S. lividans* were carried out as described previously (Kieser *et al.*, 2000). For the yeast toxicity test, *Saccharomyces cerevisiae* strains W303-1A and BY4743 were grown on selective plates [synthetic dextrose (SD)-His] and in liquid [synthetic complete (SC)-His 2% raffinose] medium at 30 °C. *Saccharomyces cerevisiae* cells were transformed using the Gietz method (Gietz *et al.*, 1995). For evaluation of RIPsc antifungal activity, fungi were grown on YPD agar plates (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 2% agar) at 27 °C for 48 h.

DNA manipulation and vector construction. For all DNA manipulations standard techniques were used (Sambrook *et al.*, 1989; Kieser *et al.*, 2000). Restriction endonucleases and DNA-modifying enzymes were obtained from Invitrogen and Roche Diagnostics.

For overexpression of *ripsc* in *S. lividans*, the gene encoding the predicted mature RIPsc protein was amplified by PCR with the primers 5'-TACTGCAGATACGCCCAACAGGC-3' and 5'-TACTTAAGTCACCTTTGCCCGTTGATGGC-3' using chromosomal DNA of *S. coelicolor* M145 as a template. After verification of the DNA sequence, the *ripsc* gene was cloned as a *Pst*I-T4 DNA polymerase-treated/*Eco*RI fragment downstream of the *vs*i promoter and signal sequence into pBSDK0.6Sma (Lammertyn, 2000), treated with *Dra*II-Klenow polymerase/*Eco*RI, resulting in pBSvsirip. Finally, the complete expression cassette containing the *vs*i promoter, *vs*i signal sequence and the *ripsc* sequence encoding the mature protein was transferred as an *Xba*I/*Eco*RI fragment from pBSvsirip to the corresponding sites of the *Streptomyces* plasmid pIJ486 (Ward *et al.*, 1986). The resulting vector pIJ486vsirip was used for overexpression of *ripsc* in *S. lividans*.

pET-RIPsc used for the overproduction and subsequent purification of N-terminally 6His-tagged RIPsc from *E. coli* was constructed by inserting an *Nde*I/*Bam*HI fragment encoding the mature RIPsc protein into the corresponding sites of pET3a. This latter fragment encoding mature RIPsc was amplified by PCR using *S. coelicolor* M145 chromosomal DNA as template with the primers MatRIPscF (5'-TACATATGCACCATCATCACCATCACGATACGCCCAACAGGC-3') and RIPscR (5'-TAGGATCCTCACCTTTGCCCGTTGATGGC-3'). The MatRIPscF primer also contained a 6His-encoding sequence to allow subsequent affinity purification.

To test the toxicity of RIPsc in *Saccharomyces cerevisiae*, a galactose-inducible expression system available in *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A and BY4743 strains (Thomas & Rothstein, 1989; Brachmann *et al.*, 1998) was used. For this purpose, the *S. coelicolor* putative *rip* gene was amplified by PCR with the primers 5'-TAGGATCCGATACGCCCAACAGGC-3' and 5'-TACCTAGGTACCTTTGCCCGTTGATGGC-3' using chromosomal DNA of *S. coelicolor* M145 as a template. The amplified sequence was cloned in pGEM-T Easy (Promega). After DNA sequence verification and determination of the orientation of the cloned *ripsc* fragment, the *ripsc* gene was obtained as a *Bam*HI (restriction site present in the 5' primer)/*Apa*I (restriction site present in the pGEM-T Easy vector) fragment and cloned in the corresponding sites of the pESC-His vector (Stratagene), downstream of the *Saccharomyces cerevisiae* GAL1 promoter for galactose-inducible expression in yeast, resulting in plasmid pESCripsc.

RNA isolation. Total RNA from samples was isolated using the SV Total RNA isolation System from Promega according to the manufacturer's protocol. Samples were stored at -80 °C. Yields and RNA integrity were determined on an Eppendorf biophotometer.

RIPsc overproduction in *E. coli* and purification. For the overproduction of 6His-tagged mature RIPsc, *E. coli* BL21(DE3)pLysS cells were transformed with the expression plasmid pET-RIPsc, grown at 37 °C and induced with 1 mM IPTG as described by Studier *et al.* (1990). Subsequently, the cultures were grown at 37 °C for an additional 4 h. *E. coli* cells producing 6His-tagged mature RIPsc were harvested by centrifugation (10 min, 5000 g, 4 °C). The obtained pellet was resuspended in 10 ml inclusion bodies sonication buffer [25 mM HEPES, 100 mM KCl, 12.5 mM MgCl₂, 20% (v/v) glycerol, 0.1% (v/v) Nonidet P-40, 1 mM DTT, pH 7.7], with the addition of one EDTA-free protease inhibitor tablet (Roche) and 500 µl lysozyme (10 mg ml⁻¹), and then incubated for 30 min on ice. Next, the suspension was incubated for 1 h at -80 °C, after which the suspension was thawed in water at room temperature and sonicated eight times for 15 s. The inclusion bodies were pelleted by centrifugation at 10 000 r.p.m. at 4 °C for 10 min. The pellet was washed 10 times with RIPA buffer [0.1% (w/v) SDS, 1% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) sodium deoxycholate in Tris-buffered saline (TBS; 25 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl)] and stored at -20 °C until use.

The isolated inclusion bodies were resuspended in 8 M urea, pH 8.0. After incubation for 1 h at room temperature, the sample was cleared by centrifugation (10 min, 10 000 g), and 6His-tagged RIPsc was purified from the sample by affinity chromatography under denaturing conditions (8 M urea) on a Ni²⁺-nitriloacetate (NTA) column (IBA) as recommended by the manufacturer. The obtained fractions were screened for the presence of RIPsc using SDS-PAGE and fractions containing the desired protein were pooled. Finally, urea in the protein samples was removed by gel filtration on a PD-10 column (GE Healthcare), which had been previously equilibrated with 10 mM Tris/HCl, pH 7.5. Using this procedure, typically 250 µg pure RIPsc could be obtained. Anti-RIPsc antibodies were raised against purified RIPsc samples in rabbits, as described by Geukens *et al.* (2001).

Separation of soluble and insoluble protein fractions. For separating soluble and insoluble fractions from the bacterial cell lysates, cells from a 1 ml RIPsc-producing *E. coli* culture were harvested after 2, 3 and 4 h induction with IPTG by centrifugation (3 min, 10 000 g). The cell pellets were resuspended in 57 µl ATRIT [10% (w/v) sucrose, 50 mM Tris/HCl, pH 8] with the addition of 19 µl lysozyme solution (20 mg ml⁻¹) and incubated for 15 min at room temperature. After incubation, 76 µl CTRIT [0.2% (v/v) Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl, pH 8] was added. The samples were vortexed and next incubated for 5 min at room temperature. The cells were lysed by freeze-thawing, after which the samples were centrifuged for 5 min at 10 000 g. The supernatant, corresponding to the soluble protein fraction, was mixed with 25 µl protein loading dye and analysed by SDS-PAGE. The remaining pellet, i.e. the insoluble protein fraction, was washed with 150 µl BTRIT (25 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl, pH 8), resuspended in 167 µl TRIT (3 vols ATRIT, 1 vol. BTRIT and 4 vols CTRIT) and mixed with 33 µl protein loading dye for subsequent analysis by SDS-PAGE.

SDS-PAGE and Western blotting. The protein fractions from the bacterial extracts were resolved on 12.5% SDS-PAGE and stained with Coomassie brilliant blue. To confirm the identity of the resulting bands, the bacterial protein samples were transferred onto a PVDF membrane and probed with anti-RIPsc antibodies. Immunodetection was performed using anti-rabbit IgG labelled with alkaline phosphatase using a colorimetric method with nitroblue tetrazolium chloride (NBT)/5-bromo-4-chloro-3'-indolyl phosphate *p*-toluidine salt (BCIP) as substrates.

In vitro protein translation inhibition assay. Purified RIPsc was tested for *in vitro* protein synthesis inhibition activity using the rabbit reticulocyte lysate system (Promega). The translation was performed according to the manufacturer's protocol using luciferase mRNA. The translation products were detected using the Transcend non-radioactive translation system (Promega) by chemiluminescence. Rabbit reticulocyte lysate (35 µl) was incubated for 30 min at 30 °C in the presence of purified RIPsc protein (500, 250 and 125 ng). Similar amounts of RNase-free buffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl) or RNase-free water were used as controls. To these mixtures, 1 µl amino acid complete mixture, RNasin RNase inhibitor (40 U, Promega), 100 ng luciferase mRNA and 1.5 µl Transcend tRNA were added, and next RNase-free water was added to a final volume of 50 µl. After the initiation of translation, the samples were further incubated at 30 °C for 1 h, after which the samples were placed on ice to stop the reaction. In order to detect the translation products, 15 µl protein loading dye was added to 5 µl reaction mixture and heated to 90 °C for 2 min. The denatured samples were separated by 12.5% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane and subsequently treated according to the manufacturer's protocol for chemiluminescence detection (Promega). The bands were visualized using X-ray films.

Determination of N-glycosidase activity. Adenine released from ribosomes by RIPsc-overproducing *E. coli* was determined using quantitative RT-PCR (qRT-PCR), as described by Melchior & Tolleson (2010). In brief, two pairs of primers were designed. One pair, which anneals upstream from the RIPsc-affected site of the 23S ribosome subunit, was used as a control. The other pair was designed to specifically detect the alternate sequence, with the A→T transversion, in the 23S ribosome subunit. The 3' end base of the reverse primer (in bold type) matches the base in the altered sequence but does not match the base of the native sequence. The third base counting from the 3' end (underlined) is a mismatch with both sequences. In this way, the last codon 3'-terminal from the reverse primer totally mismatches the native sequence. Consequently, qRT-PCR amplification of the native 23S ribosome sequence is much lower than that of the altered sequence. The following primers were used: control forward primer, 5'-ATGTCGGCTCATCACATCCTGGGG-3'; control reverse primer, 5'-CCCAGCTCGGTACCACCTTTAAA-3'; test forward primer, 5'-ACTGAGGGGGCTGCTCCTAGTA-3'; test reverse primer, 5'-TGGCTCCACTCCGGTCCA-3'.

Real-time PCR was performed in a Rotor-Gene RG-3000 thermal cycler (Corbett Research) using One-Step SYBR GreenER chemistry from Invitrogen. Reactions with a 20 µl total volume were prepared, containing 5 ng total *E. coli* RNA µl⁻¹ and 0.2 µM of each appropriate pair of primers. Each RNA sample was run in triplicate with both pairs of primers. Corbett Research software was used to obtain threshold cycle (C_T) numbers. Total amplicon concentration was determined from *rip*sc cDNA obtained by RT-PCR.

Yeast toxicity assay. RIPsc toxicity was tested by intracellular production in yeast cells. Therefore, a galactose-inducible expression system in *Saccharomyces cerevisiae* strains W303-1A and BY4743 was used (Thomas & Rothstein, 1989; Brachmann *et al.*, 1998). These strains, transformed with pESCrip and the empty pESC-His plasmid, were subsequently inoculated on selective plates (SD-His) and incubated for 3 days. In order to test RIPsc toxicity to yeast, a spot test was performed with these transformants. Three independent colonies were picked up to inoculate liquid medium (SC-His 2% raffinose), and after 2 days incubation at 30 °C, cell densities were measured. The cell suspensions were diluted to the same density with sugar-free SC-His medium. Samples (5 µl) of different dilutions (OD₆₀₀ 1, 0.1 and 0.001) of *Saccharomyces cerevisiae* pESC and *Saccharomyces cerevisiae* cells harbouring pESC-rip were spotted on selective plates with glucose to block RIPsc expression or with galactose to induce RIPsc production.

Assay for antifungal activity. The antifungal activity of purified RIPsc was determined by a radial growth inhibition assay adapted from the method of Schlumbaum *et al.* (1986). Various fungal plugs were placed in the centre of YPD agar plates and sterile paper discs were placed next to the fungal plugs. The fungal plugs were inoculated with 5 µl of cultures of *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma reesei*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger*, and grown at 27 °C for 48 h in YPD medium. Purified RIPsc protein (50 µg), which was sterilized using a 0.22 µm pore-size filter (Millipore), was pipetted onto the discs. The plates were then incubated in the dark at room temperature. Antifungal activity was scored as a crescent-shaped zone of inhibition at the mycelial front.

Assay for antibacterial activity. Antibacterial activity of RIPsc was tested using a growth inhibition plate assay. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Micrococcus luteus* and *Bacillus subtilis* strains were inoculated in liquid Luria-Bertani medium and incubated at 37 °C for 12 h. These cultures were used to inoculate inhibition plates with an inoculation loop. The inhibition plates were made by mixing 10 ml LB agar with 100 µg purified RIP solution (10 µg ml⁻¹ final concentration)

sterilized by filtration (0.22 μm pore-size, Millipore). The plates were incubated at 37 °C for 12 h and antibacterial activity was measured.

RESULTS

Computer-assisted analysis of the *S. coelicolor* RIP homologue SCO7092

BLASTP analyses (<http://www.expasy.ch/tools/blast/>) indicated that the deduced amino acid sequence of *S. coelicolor* SCO7092 (RIPsc) has substantial similarity to known RIPs from plants. This is consistent with the presence of the Pfam motif for RIP proteins (PF00161, $E=1.2 \times 10^{-7}$; <http://pfam.sanger.ac.uk/>). The PSORTb software (<http://www.psорт.org/psортb/>) was used to predict the subcellular localization of RIPsc. The RIPsc protein is predicted to be secreted by *S. coelicolor*. The SignalP3.0 software identified an N-terminal signal peptide of 35 amino acids with high probability. This predicted signal peptide has the characteristic N-, H- and C-domains and contains a typical

type I signal peptidase cleavage site in the C-domain. The mature RIPsc protein is predicted to have a molecular mass of 29 kDa, a pI of 8.1 and potential *N*-glycosidase activity (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

Sequence alignment of the *S. coelicolor* RIP-like protein SCO7092 and its *S. lividans* orthologue shows that the RIP active site residues are conserved in these actinomycete proteins (Fig. 1 and Supplementary Fig. S1). This is also the case for a number of other bacterial hypothetical proteins revealed by genome sequence analysis, each containing a putative amino-terminal signal peptide for secretion (Supplementary Fig. S1). Comparative sequence analysis indicated that the genomes of *Burkholderia* sp. CCGE1002 (a β -proteobacterial soil isolate) and *Rickettsiella grylli* (a γ -proteobacterial pathogen of arthropods; Leclercq, 2008) encode RIPs clustering with Shiga toxin A subunits, although a homologue of the toxin B subunit appears to be absent (Fig. 1 and Supplementary Fig. S2). Remarkably, SCO7092 shows only a low level of sequence homology with the RIP domain in the hypothetical proteins from two

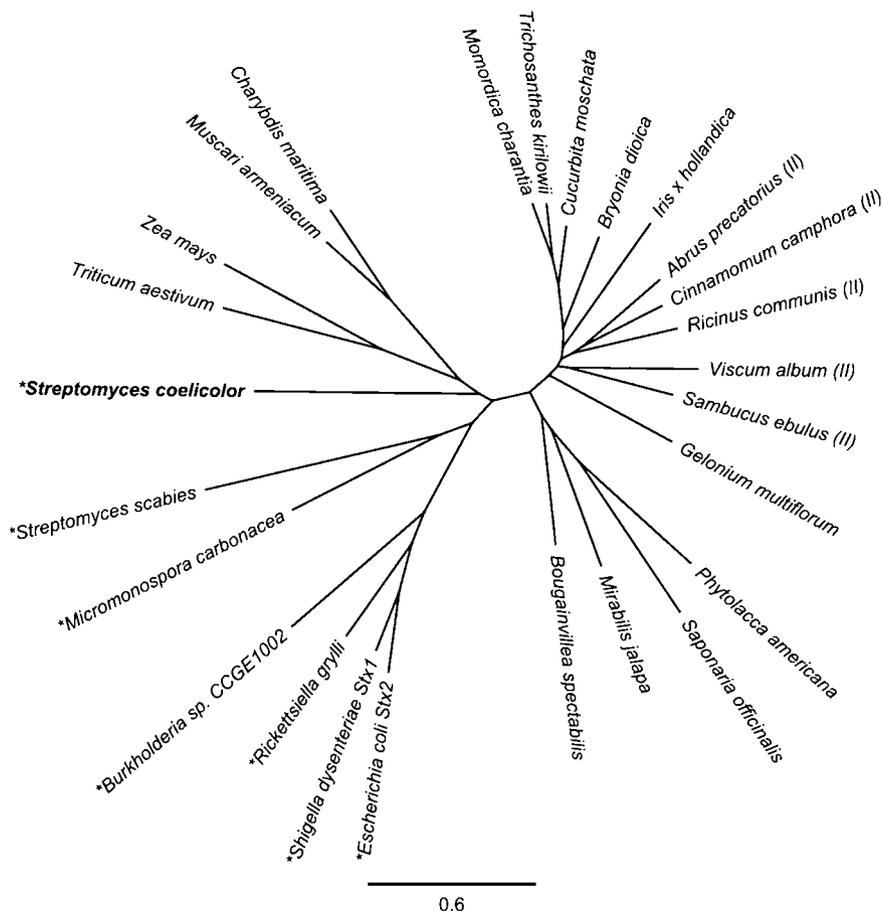


Fig. 1. Molecular phylogeny of plant RIPs and bacterial RIP-like proteins. Multiple alignment of the respective RIP domains (Supplementary Fig. S1) was used to construct the phylogenetic tree (for details see Supplementary Fig. S2). The scale bar represents 0.6 substitutions per site. Type II plant RIPs and bacterial RIP-like proteins are labelled with (II) and asterisks, respectively. Stx refers to subunit A of Shiga toxins.

other actinomycetes, namely the antibiotic producer *Micromonospora carbonacea* (Hosted *et al.*, 2001) and *Streptomyces scabies*, a phytopathogen causing scab on potatoes (Lerat *et al.*, 2009). Notably, the predicted *M. carbonacea* gene product carries a unique carboxy-terminal extension of about 280 amino acids. Our analysis suggests that the SCO7092 gene has evolved from a different ancestor, possibly of plant origin (Fig. 1).

Overexpression of SCO7092 in *S. lividans*

To study the biological properties of RIPsc, the purified protein was needed. Since we preferred purification of RIPsc from its natural source, we analysed the levels of SCO7092 expression in wild-type *S. lividans* at different stages of growth by RT-PCR. However, SCO7092 expression was not detectable when *S. lividans* was grown in liquid NM medium at 27 °C with continuous shaking at 300 r.p.m. (results not shown), while under other growth conditions, SCO7092 expression could be detected (results not shown).

Since RIPsc could not be purified from wild-type *S. coelicolor* or *S. lividans*, overexpression of *ripsc* in *S. lividans* was performed. To this end, we used the *vsj*-based expression system, which has been shown to be successful for the secretory production of several homologous and heterologous proteins in *Streptomyces* (Van Mellaert & Anné, 2001; Sianidis *et al.*, 2006). Consequently, the *ripsc* gene encoding the predicted mature protein was cloned into the *Streptomyces* multicopy plasmid pIJ486 downstream of the strong *vsj* promoter and signal sequence. However, introduction of the resulting pIJ486*vsirip* plasmid into *S. lividans* induced dramatic phenotypic effects. In particular, *S. lividans* cells harbouring pIJ486*vsirip* grew significantly slower than the wild-type and showed delayed sporulation in comparison with the wild-type (results not shown). Western blot analyses of culture filtrates obtained from *S. lividans* [pIJ486*vsirip*] after 24 and 48 h of growth showed production and secretion of RIPsc into the culture medium (Fig. 2), although the levels obtained were too low for purification purposes, most likely because RIPsc overproduction is toxic to *S. lividans*.

Expression of SCO7092 in *E. coli*

For overexpression of the *S. coelicolor* *ripsc* gene in *E. coli* BL21(DE3)pLysS, a PCR-amplified DNA fragment bearing the gene encoding mature RIPsc (i.e. without the signal sequence) was inserted in pET3a downstream of the T7 promoter (resulting in pET-RIPsc). We chose the *E. coli* BL21(DE3)pLysS strain, since it expresses endogenous T7 lysozyme, which reduces basal expression of toxic proteins. The strain has been used successfully for overproduction of a type I plant RIP before (Antolín *et al.*, 2004). From IPTG-induced cultures, samples were taken 0, 2, and 4 h after induction, and total cell lysates were analysed by SDS-PAGE analysis. At the same time, soluble and insoluble

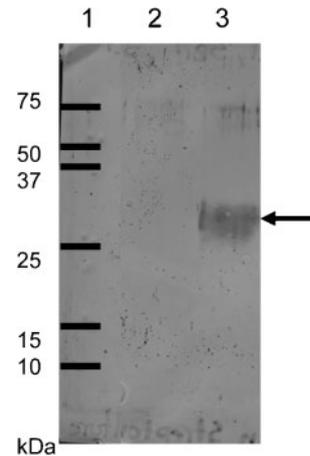


Fig. 2. Western blotting analysis (12.5 % SDS-polyacrylamide gel) of extracellular proteins from wild-type *S. coelicolor* (lane 2) and *S. coelicolor* cells harbouring pIJ486RIPsc (lane 3) cultured in NM medium for 24 h. The proteins were visualized using immunodetection with anti-RIPsc antibodies. The Precision Plus protein marker (Bio-Rad) was loaded in lane 1.

protein fractions were separated to determine whether the expression product was present as a soluble protein in the cytoplasm or as an insoluble aggregate in inclusion bodies. As seen in Fig. 3(a), RIPsc was efficiently produced in *E. coli*, although the RIPsc protein was only detectable in the insoluble protein fraction.

Several attempts were made to obtain soluble RIPsc protein, i.e. testing different *E. coli* host strains [*E. coli* BL21(DE3)star, *E. coli* JM109BL21(DE3), *E. coli* C43BL21(DE3)] and *E. coli* DH5 α), lowering the growth temperature to 27 °C and decreasing the IPTG concentration to 0.1 mM. However, in none of these cases was a significant amount of RIPsc observed in the soluble protein fraction. Nevertheless, the dramatic decrease of the growth rate and finally growth arrest of the culture after IPTG induction (Fig. 3b) suggested that although we could not detect it by Western blotting, some RIPsc was produced as a functional protein, exerting a cytotoxic effect.

Purification of the SCO7092 protein from *E. coli*

Because the amounts of secreted RIPsc in *S. lividans* [pIJ486*vsirip*] were too low for purification purposes, the *S. coelicolor* RIPsc protein was purified after overproduction in *E. coli* from inclusion bodies as described in Methods. In brief, inclusion bodies were isolated from RIPsc-producing *E. coli* cells and extensively washed. The resulting proteins were then denatured in 8 M urea and the RIPsc protein was purified from the sample by affinity chromatography on a Ni²⁺-NTA column under denaturing conditions. Evaluation of different refolding procedures demonstrated that for RIPsc, quick removal of urea using gel filtration chromatography was the optimal method to obtain

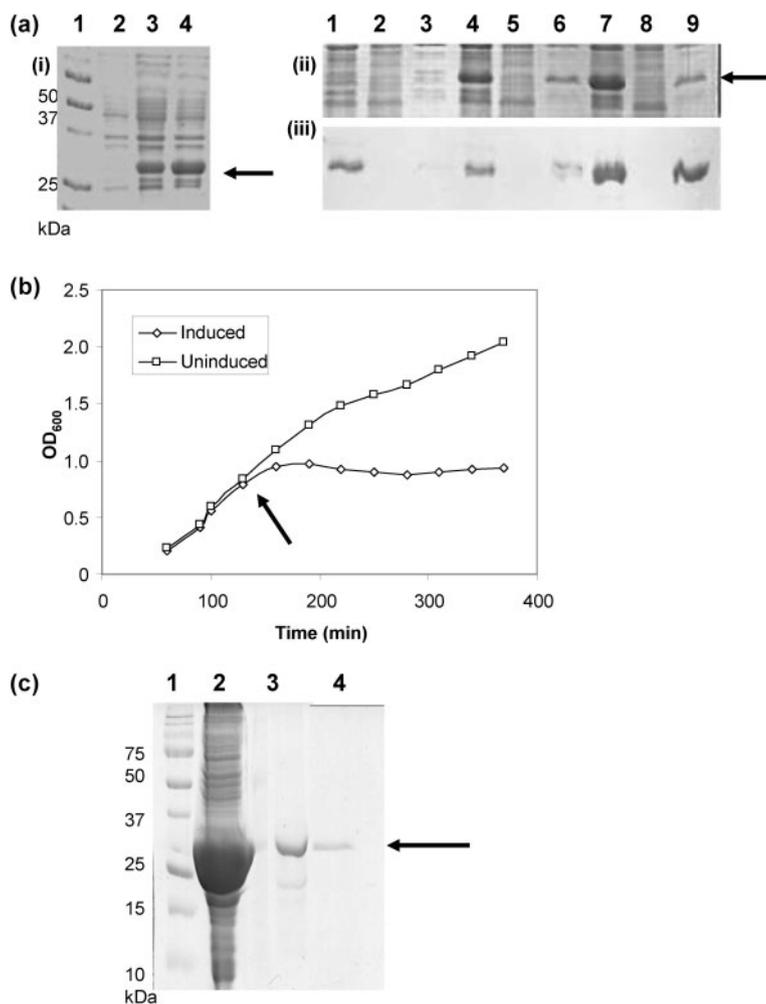


Fig. 3. (a) (i) Coomassie brilliant blue-stained 12.5% SDS-polyacrylamide gel showing *S. coelicolor* ripsc overexpression in *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Lanes: 1, Precision Plus protein marker (Bio-Rad); 2, cell lysate of non-induced *E. coli* BL21(DE3)pLysS [pETRIPsc]; 3 and 4, cell lysates of *E. coli* BL21(DE3)pLysS [pETRIPsc] 2 and 4 h after IPTG induction. (ii, iii) Coomassie brilliant blue-stained 12.5% SDS-polyacrylamide gel (ii) and Western blotting analysis (iii) of soluble and insoluble protein extracts from *E. coli* BL21(DE3)pLysS harbouring pETRIPsc, showing the localization of RIPsc in *E. coli* BL21(DE3)pLysS. The proteins were visualized using immunodetection with anti-RIPsc antibodies. Lanes: 1, 4 and 7, total cell lysates from non-induced *E. coli* BL21(DE3)pLysS [pETRIPsc] and cells at 2 and 4 h after IPTG induction; 2, 5 and 8, soluble proteins extracted from non-induced *E. coli* BL21(DE3)pLysS [pETRIPsc] and cells at 2 and 4 h after IPTG induction; 3, 6 and 9, insoluble proteins extracted from non-induced *E. coli* BL21(DE3)pLysS [pETRIPsc] and cells at 2 and 4 h after IPTG induction. Arrows indicate the RIPsc protein. (b) Growth of *E. coli* BL21(DE3)pLysS harbouring pETRIPsc. Two cultures were grown at 37 °C and the OD₆₀₀ was monitored as a function of time. When the OD₆₀₀ reached 0.8, 1 mM IPTG was added to one of the cultures to induce RIPsc production (arrow). Both cultures were further incubated at 37 °C for 4 h. (c) Overview of the purification of RIPsc visualized using a Coomassie brilliant blue-stained 12.5% SDS-polyacrylamide gel. Lanes: 1, size marker; 2, inclusion bodies isolated from *E. coli* BL21(DE3)pLysS harbouring pETRIPsc; 3, elution fraction from the Ni²⁺-NTA column containing RIPsc; 4, RIPsc after refolding by gel filtration.

sufficient amounts of soluble protein. Samples showing the purity of the RIPsc protein during the different stages of purification are shown in Fig. 3(c). From inclusion bodies isolated from a 600 ml IPTG-induced culture, approximately 50–100 µg >85% pure denatured RIPsc protein was retrieved. After the refolding step, about 5–10 µg refolded RIPsc protein could be obtained.

Translation inhibition in rabbit reticulocyte lysates by SCO7092

The best-known activity of RIPs is translational inhibition, which is caused by depurination of A₄₃₂₄ (or removal of an equivalent base in other ribosomes) in the 28S rRNA of the eukaryotic ribosome, which is essential for translation. Here, we evaluated the effect of RIPsc on ribosomes by assaying its inhibitory activity on protein synthesis by a

rabbit reticulocyte lysate. All RIPs described so far have been shown to inhibit protein synthesis, although with very different potencies.

In particular, we tested whether purified recombinant RIPsc was able to inhibit luciferase translation in a rabbit reticulocyte translation system. Rabbit reticulocytes were incubated with increasing concentrations of these protein preparations (125, 250, 500 ng each) for 30 min at 30 °C before translation was initiated. Untreated rabbit reticulocytes served as negative control. Fig. 4 shows that when purified RIPsc was added to the reaction mixture, the amount of luciferase produced *in vitro* was strongly reduced. The inhibitory effect was found to increase with rising RIPsc concentration. These experiments show that RIPsc specifically inhibits protein translation of rabbit ribosomes.

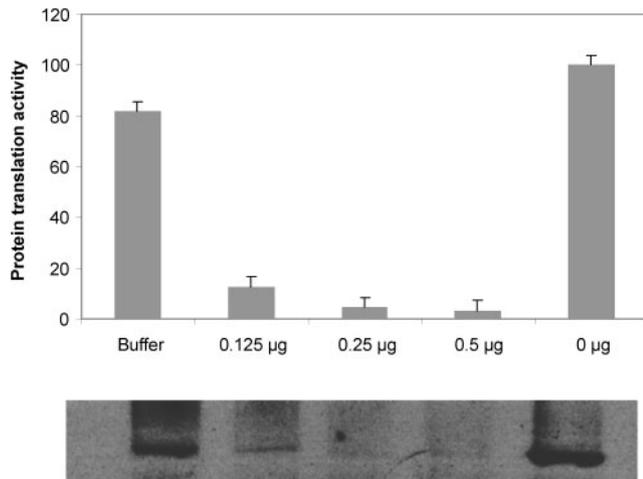


Fig. 4. Inhibition of *in vitro* protein synthesis by RIPsc as a percentage of the untreated control. Rabbit reticulocytes were incubated with 0.5, 0.25 or 0.125 µg purified RIPsc at 30 °C for 30 min. The treated rabbit reticulocytes were then incubated for 1 h with luciferase mRNA. In order to detect the translation products, the denatured samples were separated by 12.5% SDS-PAGE and then transferred to a PVDF membrane for chemiluminescence detection of newly synthesized protein (Promega). Lanes: 1, buffer control; 2, 0.125 µg RIPsc; 3, 0.25 µg RIPsc; 4, 0.5 µg RIPsc; 5, 0 µg RIPsc. Bars represent the average of two independent experiments. The lower part of the figure shows the visualized bands on X-ray films, which were used to calculate the percentage chemiluminescence for the different samples.

N-Glycosidase activity of SCO7092

N-Glycosidase activity of recombinant RIPsc was demonstrated by a novel RIP assay (Melchior & Tolleson, 2010). This assay is based on the fact that reverse transcriptase usually incorporates an adenosine when it encounters a site with a lesion on the template strand. RIP activity was monitored for RNA samples taken from uninduced and induced cells of *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformed with pET-RIPsc. If the produced protein has damaged the rRNA, reverse transcriptase will insert an adenosine into complementary DNA during qRT-PCR. Provided that a site-specific PCR primer is used, a higher amplification of the altered sequence results. Fig. 5 shows a strong increase in the target amplicon following induction of RIPsc expression, in comparison with the control (template from culture without induction). This shows that RIPsc is removing the specific adenine from rRNA within a universally conserved GAGA sequence (A₂₆₆₀ in the case of *E. coli* 23S rRNA).

Antifungal activity of SCO7092

Most RIPs have been shown to be able to inactivate fungal ribosomes. Recent studies also suggest that some RIPs can directly inhibit certain fungi by inactivating their ribosomes and causing cell death. For the latter, internalization

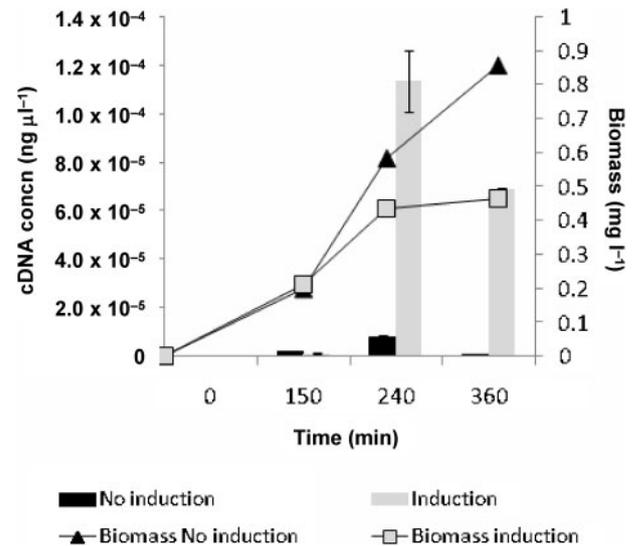


Fig. 5. rRNA N-deglycosylation activity of RIPsc expressed in *E. coli*. Total *E. coli* RNA, for use as template in a qRT-PCR assay of RIP activity, was isolated at different time points from two different cultures. The cultures consisted of 48 ml LB medium inoculated with 2 ml overnight preculture of *E. coli* (pET-RIPsc) and incubated at 37 °C. After reaching OD₆₀₀ 0.8, one culture was induced by the addition of 1 mM IPTG. The second culture was used as a control, without induction. The amount of cDNA produced is proportional to the enzymic activity of RIP towards target rRNA.

of the RIP protein is necessary to exert fungicidal activity (Park *et al.* 2002a). Firstly, to analyse whether *S. coelicolor* RIPsc can inactivate fungal ribosomes and has potent *in vivo* antifungal activity, we evaluated the effect of intracellular expression of SCO7092 in *Saccharomyces cerevisiae*. The SCO7092 gene encoding the predicted mature protein was cloned under the control of a galactose-inducible promoter and the effect of SCO7092 expression on yeast was evaluated with a spot test. Fig. 6 shows that SCO7092 expression results in strong inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth.

Secondly, the effect of exogenously supplied purified RIPsc on the growth of various fungi was investigated. Of these, *Fusarium oxysporum* and *Trichoderma reesei* have been shown to be inhibited by certain RIPs (Sharma *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2002a, b; Vivanco *et al.*, 1999; Roberts & Selitrennikoff, 1986). However, using a radial growth inhibition assay with *Saccharomyces cerevisiae* and three other fungi, *F. oxysporum*, *T. reesei* and *A. niger*, no significant antifungal activity could be observed for RIPsc (data not shown). Hence, RIPsc does not belong to the small group of type I RIPs that are able to inhibit fungal growth (Sharma *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2002a, b; Vivanco *et al.*, 1999; Roberts & Selitrennikoff, 1986). The absence of a lectin-type chain most likely hampers the ability of the protein to enter the cell.

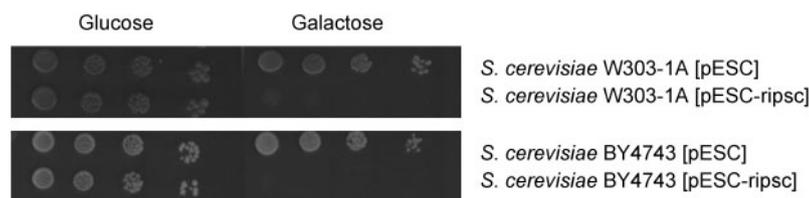


Fig. 6. Spot test to analyse RIPsc toxicity to yeast. Equal numbers of *Saccharomyces cerevisiae* [pESC] or *Saccharomyces cerevisiae* cells harbouring pESC-ripsc were spotted on media with glucose or galactose to induce RIPsc production. The cells were incubated for 15 h at 30 °C.

Antibacterial activity of SCO7092 Intracellular expression of *SCO7092* in *E. coli* (see above) already suggested that *SCO7092* expression is toxic for *E. coli* cells. Consequently, the potential antibacterial activity of exogenously applied RIPsc was evaluated using representative Gram-positive and Gram-negative bacteria, i.e. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* and *E. coli*. No antibacterial activity against the tested bacteria was detected (results not shown), most likely because of the inability of RIPsc to enter the bacterial cell.

DISCUSSION

In this manuscript, we describe the identification and characterization of a new RIP-like protein from the Gram-positive soil bacterium *S. coelicolor*. Several pathogenic γ -proteobacteria (*Shigella dysenteriae*, *E. coli* STEC strains and species of *Aeromonas*, *Citrobacter* and *Enterobacter*) have been shown to produce potent cytotoxic type II RIPs involved in human and animal disease (Sandvig, 2006). However, following our phylogenetic analyses, the *S. coelicolor* protein appears to be more related to plant type I RIPs than to these Shiga and Shiga-like toxins.

The efficiency of *rip* expression in bacterial systems has been shown to be highly variable. The cDNA of some type I plant RIPs has been expressed successfully at high levels (Rajamohan *et al.*, 1999; Chi *et al.*, 2001). In some cases, the recombinant RIP is inactive or far less active than the native protein (Wu *et al.*, 1998). Conversely, some other RIPs heterologously expressed strongly promote bacterial ribosome inactivation, causing cell growth arrest (Cho *et al.*, 2000). Finally, some recombinant RIPs are produced as inclusion bodies (Antolín *et al.*, 2004). The dramatic decrease in growth rate of *E. coli* upon induction of *ripsc* expression strongly suggests that RIPsc overproduction is highly toxic to *E. coli*. Similar results have also been obtained in the case of expression of type I RIPs from *Mirabilis jalapa* (Kataoka *et al.*, 1991), *Phytolacca americana*, *Dianthus sinensis* (Cho *et al.*, 2000), *Amaranthus viridis* (Kwon *et al.*, 2000) and *Beta vulgaris* (Iglesias *et al.*, 2005) in *E. coli* cells under inducing conditions. In *E. coli*, accumulation of RIPsc to high levels could only be observed when the protein was produced as inactive protein in inclusion bodies, most likely because of its inherent toxicity. In this respect, it is also interesting to mention that RIPsc overproduction resulted in a decreased growth rate of its natural host, *Streptomyces*.

The translational inhibitory activity of purified RIPsc in a rabbit reticulocyte system was of the same order of magnitude as those of other type I RIPs, such as musarmin 1 from *Muscari armeniacum* (Antolín *et al.*, 2004) and TRIP from tobacco (Sharma *et al.*, 2004). This suggests that solubilization of the protein from inclusion bodies and refolding of RIPsc yielded fully active protein.

A novel RT-PCR assay for the *N*-glycosidase activity of RIPs (Melchior & Tolleson, 2010) was used to analyse directly the predicted enzymic activity towards rRNA of the *ripsc* gene product. The amplification of the damaged fragment of *E. coli* 23S rRNA which contains the specific adenine (A₂₆₆₀) target of RIPs confirmed the identity of the protein as a novel prokaryotic RIP.

The potential antimicrobial activity of RIPsc *in vivo* was examined by testing its effect on the growth of different fungi and bacteria. When produced in the cytosol of *E. coli* and *Saccharomyces cerevisiae*, the RIPsc protein was found to efficiently inhibit cell growth. However, when added to bacterial cells or fungi extracellularly, we could not observe any antimicrobial activity. Consequently, a direct role of RIPsc in antagonism of bacterial and fungal competitors is very unlikely. We assume that the observed lack of antibacterial and antifungal activity of RIPsc is related to the absence of a lectin-type chain, which is present in the more toxic type II RIPs, and which is thought to assist the protein in entering target cells (Stirpe, 2004; Stirpe & Battelli, 2006). Given the high toxicity of the protein when produced in the cytosol of *E. coli* and *Saccharomyces cerevisiae*, it is therefore envisioned that fusion of the RIPsc protein to a lectin could make this protein an efficient antimicrobial compound.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the América Latina – Formación Académica (ALFA) grant ALFA II-0313-FA-FCB.

REFERENCES

- Anné, J., Van Mellaert, L. & Eysen, H. (1990). Optimum conditions for efficient transformation of *Streptomyces venezuelae* protoplasts. *Appl Microbiol Biotechnol* **32**, 431–435.
- Antolín, P., Girotti, A., Arias, F. J., Barriuso, B., Jiménez, P., Rojo, M. A. & Gírbés, T. (2004). Bacterial expression of biologically active recombinant musarmin 1 from bulbs of *Muscari armeniacum* L. and Miller. *J Biotechnol* **112**, 313–322.

- Barbieri, L., Battelli, M. G. & Stirpe, F. (1993). Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim Biophys Acta* **1154**, 237–282.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H. & other authors (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141–147.
- Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. & Boeke, J. D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**, 115–132.
- Chi, P. V., Truong, H. Q., Ha, N. T., Chung, W. I. & Binh, L. T. (2001). Characterisation of trichobaklin, a type I ribosome-inactivating protein from *Trichosanthes* sp. Bac Kan 8-98. *Biotechnol Appl Biochem* **34**, 85–92.
- Cho, H. J., Lee, S. J., Kim, S. & Kim, B. D. (2000). Isolation and characterisation of cDNAs encoding ribosome-inactivating protein from *Dianthus sinensis* L. *Mol Cells* **10**, 135–141.
- Endo, Y., Gluck, A. & Wool, I. G. (1991). Ribosomal RNA identity elements for ricin A-chain recognition and catalysis. *J Mol Biol* **221**, 193–207.
- Geukens, N., Lammertyn, E., Van Mellaert, L., Schacht, S., Schaerlaekens, K., Parro, V., Bron, S., Engelborghs, Y., Mellado, R. P. & Anné, J. (2001). Membrane topology of the *Streptomyces lividans* type I signal peptidases. *J Bacteriol* **183**, 4752–4760.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R. & Woods, R. A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**, 355–360.
- Girbés, T., Ferreras, J. M., Arias, F. J. & 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.
- Hosted, T. J., Wang, T. X., Alexander, D. C. & Horan, A. C. (2001). Characterization of the biosynthetic gene cluster for the oligosaccharide antibiotic, Evernimicin, in *Micromonospora carbonacea* var. *africana* ATCC 39149. *J Ind Microbiol Biotechnol* **27**, 386–392.
- Iglesias, R., Pérez, Y., de Torre, C., Ferreras, J. M., Antolín, P., Jiménez, P., Rojo, M. A., Méndez, E. & Girbés, T. (2005). Molecular characterization and systemic induction of single-chain ribosome-inactivating proteins (RIPs) in sugar beet (*Beta vulgaris*) leaves. *J Exp Bot* **56**, 1675–1684.
- Johannes, L. & Römer, W. (2010). Shiga toxins – from cell biology to biomedical applications. *Nat Rev Microbiol* **8**, 105–116.
- Kataoka, J., Habuka, N., Miyano, M., Takanami, Y. & Koiwa, A. (1991). DNA sequence of *Mirabilis* antiviral protein (MAP), a ribosome-inactivating protein with antiviral property, from *Mirabilis jalapa* L. and its expression in *E. coli*. *J Biol Chem* **266**, 8426–8430.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. & Hopwood, D. A. (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: John Innes Foundation.
- Korn, F., Weingärtner, B. & Kutzner, H. J. (1978). A study of twenty actinophages: morphology, serological relationship and host range. In *Genetics of the Actinomycetales*, pp. 251–270. Edited by E. Freechsen, I. Tarnak & J. H. Thumin. Stuttgart: G. Fischer Verlag.
- Kwon, S. Y., An, C. S., Liu, J. R., Kwak, S.-S., Lee, H. S., Lim, J. K. & Paek, K. H. (2000). Molecular cloning of a cDNA encoding ribosome-inactivating protein from *Amaranthus viridis* and its expression in *E. coli*. *Mol Cells* **10**, 8–12.
- 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*. PhD thesis, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium.
- Leclerque, A. (2008). Whole genome-based assessment of the taxonomic position of the arthropod pathogenic bacterium *Rickettsiella grylli*. *FEMS Microbiol Lett* **283**, 117–127.
- Lerat, S., Simao-Beauvoir, A. M. & Beaulieu, C. (2009). Genetic and physiological determinants of *Streptomyces scabies* pathogenicity. *Mol Plant Pathol* **10**, 579–585.
- Lord, J. M., Roberts, L. M. & Robertus, J. D. (1994). Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB J* **8**, 201–208.
- Melchior, W. B., Jr & Tolleson, W. H. (2010). A functional quantitative polymerase chain reaction assay for ricin, Shiga toxin, and related ribosome-inactivating proteins. *Anal Biochem* **396**, 204–211.
- Ng, T. B., Wong, J. H. & Wang, H. (2010). Recent progress in research on ribosome inactivating proteins. *Curr Protein Pept Sci* **11**, 37–53.
- Park, S. W., Stevens, N. M. & Vivanco, J. M. (2002a). Enzymatic specificity of three ribosome-inactivating proteins against fungal ribosomes, and correlation with antifungal activity. *Planta* **216**, 227–234.
- Park, S. W., Lawrence, C. B., Linden, J. C. & Vivanco, J. M. (2002b). Isolation and characterization of a novel ribosome-inactivating protein from root cultures of pokeweed and its mechanism of secretion from roots. *Plant Physiol* **130**, 164–178.
- Park, S. W., Prithiviraj, B., Vepachedu, R. & Vivanco, J. M. (2006). Isolation and purification of ribosome-inactivating proteins. *Methods Mol Biol* **318**, 335–347.
- Rajamohan, F., Engstrom, C. R., Denton, T. J., Engen, L. A., Kourinov, I. & Uckun, F. M. (1999). High-level expression and purification of biologically active recombinant pokeweed antiviral protein. *Protein Expr Purif* **16**, 359–368.
- Roberts, W. K. & Selitrennikoff, C. P. (1986). Isolation and partial characterization of two antifungal proteins from barley. *Biochim Biophys Acta* **880**, 161–170.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sandvig, K. (2001). Shiga toxins. *Toxicon* **39**, 1629–1635.
- Sandvig, K. (2006). The Shiga toxins: properties and actions on cells. In *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Toxins*, 3rd edn, pp. 310–322. Edited by J. E. Alouf & M. R. Popoff. San Diego, CA: Academic Press.
- Schlumbaum, A., Mauch, F., Vogeli, U. & Boller, T. (1986). Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* **324**, 365–367.
- Sharma, N., Park, S. W., Vepachedu, R., Barbieri, L., Ciani, M., Stirpe, F., Savary, B. J. & Vivanco, J. M. (2004). Isolation and characterisation of a RIP-like protein from tobacco with dual enzymatic activity. *Plant Physiol* **134**, 171–181.
- Sianidis, G., Pozidis, C., Becker, F., Vrancken, K., Sjoeholm, C., Karamanou, S., Takano-Wik, M., Van Mellaert, L., Schaeffer, Th. & other authors (2006). Functional large-scale production of a novel *Jonesia* sp. xyloglucanase by heterologous secretion from *Streptomyces lividans*. *J Biotechnol* **121**, 498–507.
- Stirpe, F. (2004). Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon* **44**, 371–383.
- Stirpe, F. & Battelli, M. G. (2006). Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cell Mol Life Sci* **63**, 1850–1866.
- Stirpe, F., Barbieri, L., Battelli, M. G., Soria, M. & Lappi, D. A. (1992). Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology (N Y)* **10**, 405–412.

Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**, 60–89.

Suh, J. K., Hovde, C. J. & Robertus, J. D. (1998). Shiga toxin attacks bacterial ribosomes as effectively as eukaryotic ribosomes. *Biochemistry* **37**, 9394–9398.

Thomas, B. J. & Rothstein, R. (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* **56**, 619–630.

Van Mellaert, L. & Anné, J. (2001) Gram-positive bacteria for the heterologous production of biopharmaceutical compounds. In *Focus on Biotechnology*, vol. I, pp. 277–300, *Novel Frontiers in the Production of Compounds for Biomedical Use*. Edited by A. Van Broekhoven, F. Shapiro & J. Anné. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Van Mellaert, L., Dillen, C., Proost, P., Sablon, E., Deleys, R., Van Broekhoven, A., Heremans, H., Van Damme, J., Eyssen, H. & Anné, J.

(1994). Efficient secretion of biologically active mouse tumor necrosis factor α by *Streptomyces lividans*. *Gene* **150**, 153–158.

Vivanco, J. M., Savary, B. J. & Flores, H. E. (1999). Characterization of two novel type I ribosome-inactivating proteins from the storage roots of the andean crop *Mirabilis expansa*. *Plant Physiol* **119**, 1447–1456.

Ward, J. M., Janssen, G. R., Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J. & 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.

Wu, T. H., Chow, L. P. & Lin, J. Y. (1998). Sechiumin, a ribosome-inactivating protein from the edible gourd, characterisation, molecular cloning and expression. *Eur J Biochem* **255**, 400–408.

Edited by: T. J. Mitchell

Ribosome-inactivating proteins with an emphasis on bacterial RIPs and their potential medical applications

Ana G Reyes^{1,2}, Jozef Anné³ & Armando Mejía^{*1}

¹Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas & de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico

²Química Agronómica de México, Calle 18 No. 20501, Parque Industrial Impulso C.P. 31109, Chihuahua, Chihuahua, México

³Laboratory of Bacteriology, Rega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit Leuven, Minderbroedersstraat 10, B-3000 Leuven, Belgium

*Author for correspondence: Tel.: +52 55 58 04 47 11 ■ Fax: +52 55 58 04 47 12 ■ ama@xanum.uam.mx

Ribosome-inactivating proteins (RIPs) are toxic due to their *N*-glycosidase activity catalyzing depurination at the universally conserved α -sarcin loop of the 60S ribosomal subunit. In addition, RIPs have been shown to also have other enzymatic activities, including polynucleotide:adenosine glycosidase activity. RIPs are mainly produced by different plant species, but are additionally found in a number of bacteria, fungi, algae and some mammalian tissues. This review describes the occurrence of RIPs, with special emphasis on bacterial RIPs, including the Shiga toxin and RIP in *Streptomyces coelicolor* recently identified in *S. coelicolor*. The properties of RIPs, such as enzymatic activity and targeting specificity, and how their unique biological activity could be potentially turned into medical or agricultural tools to combat tumors, viruses and fungi, are highlighted.

Ribosome-inactivating proteins (RIPs) are a family of enzymes with *N*-glycosidase activity causing the release of a specific adenine from the 60S ribosomal subunit in the sarcin/ricin loop, a highly conserved sequence found in the RNA of the large ribosomal subunit. This activity prevents the formation of a critical stem-loop configuration to which the elongation factor (EF) is known to bind during the translocation step of translation and, as such, prevents further translation.

RIPs are best characterized in plants, in which they were initially discovered. More recently, fungal and bacterial RIPs were described, and adenine glycosidase activity was also found in animal tissues [1]. The generalized nature of RIPs is considered to play a role in conferring an evolutionary advantage that underlies their conservation [2]. Classification of RIPs is somewhat controversial; originally, plant RIPs were classified into two groups based on their primary structure (FIGURE 1). Type 1 RIPs are monomeric enzymes of approximately 30 kDa with an *N*-glycosidase activity. Type 2 RIPs, like ricin and abrin, consist of two different domains: an active A-chain of 30 kDa similar to type 1 with rRNA *N*-glycosidase activity, covalently linked by a disulfide bond to a slightly larger (~35 kDa) B-chain with lectin properties and

with specificity for sugars with the galactose structure, facilitating the uptake of the enzymatically active A-chain into the host cell [3]. A third type of RIP, type 3 RIPs, was also proposed. This type 3 RIP originally described a 60 kDa jasmonate-induced protein from barley leaves that comprises an N-terminal RIP domain fused to an unrelated C-terminal domain without a known function [4]. The same term was later used for a maize type 1 RIP, which requires the removal of a short internal peptide segment for activation [5]. Type 3 RIPs are also considered atypical type 1 RIPs [6], and therefore classified as type 1 RIPs. Also proposed were holo-RIPs for those with a single chain or two smaller polypeptide chains (type 1 RIPs), and chimero-RIPs for two-chain proteins (type 2 and the single type 3 RIPs) [7]. The division into type 1 and type 2 RIP classes is now favored.

Ricin was the first RIP described. This compound gives the castor oil plant (*Ricinus communis* L.), belonging to the plant family of *Euphorbiaceae*, its high toxicity. Ricin, a water-soluble glycoprotein concentrated in the seed endosperm, is notorious for its highly poisonous activity, with one of the highest toxicities among natural compounds. It belongs to the type 2 group of RIPs, entering the cell using the galactose-binding lectin (B-chain). Following

Keywords

- α -sarcin loop
- *N*-glycosidase ■ ribosome-inactivating protein ■ ricin
- Shiga toxin ■ *Streptomyces*
- toxin

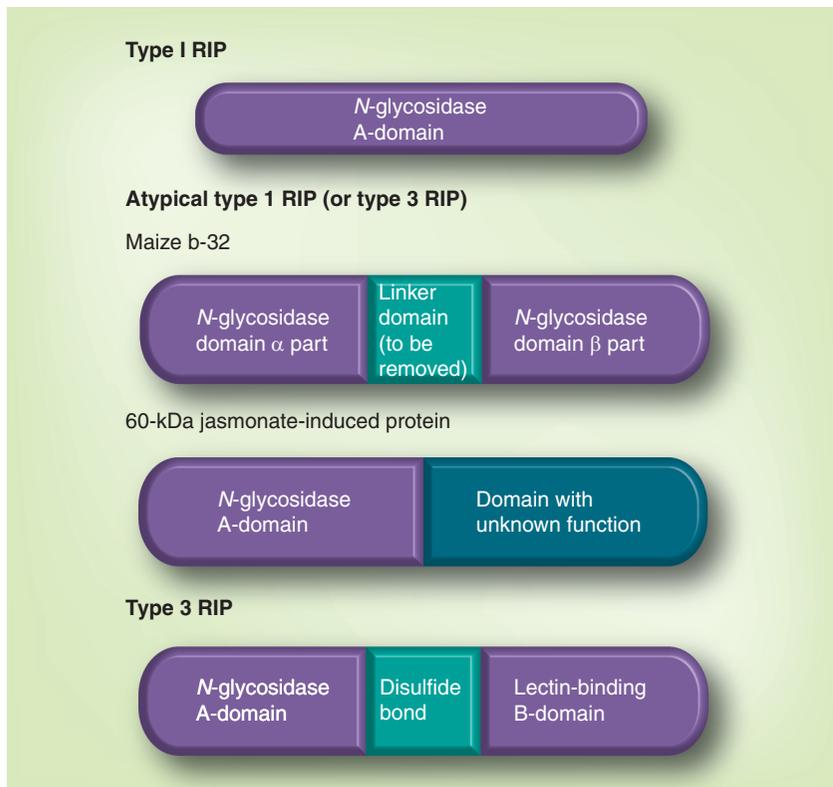


Figure 1. Comparison of primary structures of ribosome-inactivating proteins.

RIP: Ribosome-inactivating protein.

cell uptake, ricin causes acute cell death by inactivation of the ribosomal RNA.

Typically, type 2 RIPs are highly toxic, although nontoxic type 2 RIPs have also been reported [8]. The high toxicity of type 2 RIPs can for the most part be explained by the B-chain component that, owing to its lectin properties, allows the cell surface binding and subsequent entry of the A-chain into the cell, where it exerts its activity on the ribosomes [9]. By contrast, type 1 RIPs, the most abundantly present type in nature [10], are devoid of the lectin chain, making their entry into cells more difficult. As a consequence, type 1 RIPs are less toxic, but once in the cell they become highly toxic. The difficulty that type 1 RIPs have in entering cells contradicts the defense hypothesis, suggesting that new explanations for RIP functions are necessary. Thus far, the role and function of RIPs and their distribution in nature remain elusive. Several suggestions have been made for plant RIPs, such as antimicrobial activity [11], or as a mechanism of cell death induction that is triggered during cellular stress responses such as protein synthesis inhibition. RIPs may activate this pathway to trigger cell death upon translational inhibition [12]. Alternatively or

in addition, the induction of apoptosis can be a consequence of damage to the nuclear DNA due to the release of adenine from multiple sites resulting in apurinic/apyrimidinic sites, causing weakening of the DNA sugar–phosphate backbone, as demonstrated for Shiga toxin 1 (Stx1) and ricin in human endothelial cells [13].

There is now abundant evidence that Shiga toxins and ricin induce apoptosis *in vitro* in epithelial, endothelial, lymphoid and myeloid cells, and in multiple organs in animals, when these toxins are administered, and that protein synthesis inhibition and apoptosis induction mediated by Shiga toxins and ricin may be dissociated [14].

Research has recently provided the necessary information to design the first conjugate of gelonin, a type 1 RIP that cannot enter into cells in significant concentrations unless it is coupled to a targeting moiety. When conjugated with concanavalin A, gelonin becomes more toxic to cells than free gelonin [15]. Immunotoxins and fusion constructs containing recombinant gelonin have subsequently been made that were able to specifically kill tumor cells *in vitro* and *in vivo* [16]. This demonstrates that the ability to design RIPs with novel targets has enormous potential. Certainly the field of medicine has a great deal to gain from this emergent research. To date, the specificity and lethal action of RIPs have allowed the design of immunotoxins and conjugates active against cancer and HIV-infected cells [17–20].

In this review, we summarize and discuss the recent research concerning RIPs, in particular RIPs of bacterial origin, their activity and potential medical applications.

RIPs have different enzymatic activities

RIPs were classified as rRNA *N*-glycosidases in the enzyme nomenclature (EC 3.2.2.22) after Endo and colleagues demonstrated that RIPs selectively remove a specific adenine residue from rRNA [21]. Further studies showed that some RIPs remove more than one adenine per ribosome [22] and, later on, it was found that RIPs do not only remove adenine from RNA, but also from DNA [23], poly A [22], naked RNA [24] and capped mRNA [25]. The ability of RIPs to remove adenine residues from different substrates led to naming them polynucleotide adenine glycosylases [1].

Through the study of PAP and ricin, the mode of action of RIPs became understood. PAP site-specific deadenylation interrupts the interaction of elongation factors EF-1 and EF-2 and blocks protein synthesis at the translocation step [26]. It is generally believed that PAP inhibits the

EF-1-dependent binding of aminoacyl tRNA to the acceptor site (A-site of ribosome) and EF-1-mediated GTP hydrolysis. PAP also inhibits formation of the EF-2–GDP–ribosome complex and stimulates the ribosome-dependent hydrolysis of GTP [27]. These results suggest that PAP damages the ribosome at a site where both EFs bind, inhibiting the elongation step of protein synthesis. EF-2 binding and hydrolysis of the GTP–EF-2 complex are necessary for translocation of the newly elongated peptides from the A- to the P-ribosomal site [28]. Thus, a major effect of PAP on protein synthesis is the inhibition of the translocation reaction mediated by EF-2. This inhibition was further supported by the observation that EF-G, the EF-2 equivalent in *Escherichia coli*, protected the ribosome against the depurinating action of the RIP crotin 2 from the seeds of *Croton tiglium* [29], suggesting that the EF-G binding site on the ribosome overlaps with the site of action of the RIP [30].

More recently, it was proposed that the C-terminal domain of the stalk proteins of ribosomes may bind a ricin A-chain instead of binding the eEF-2, thereby delivering the ricin A-chain to the α -sarcin/ricin loop via their flexible hinge region [31]. Furthermore, it was demonstrated that treatment of rat ribosomes with ricin caused the removal of G₄₃₂₃ from the sarcin/ricin loop [21].

On the other hand, even when RIPs act preferentially on ribosomes, there is evidence that supports the site-specific RNA *N*-glycosidase activity toward naked rRNA [24]. Interestingly, some RIPs are capable of deadenylating naked rRNA differently from their common substrate. For example, the ricin A-chain is able to act on naked *E. coli* 23S rRNA but not on the intact *E. coli* ribosomes [7]. The activity on naked rRNA motivated researchers to test new substrates along with rRNA. In addition, high-performance liquid chromatography fluorescence-based methods were developed to quantify the amount of free adenine released by RIPs from various substrates [32]. Using a quantitative high-performance liquid chromatography technique, it was demonstrated that recombinant PAP released a guanine residue from *E. coli* rRNA [33]. However, since ricin and PAP are the only RIPs that have demonstrated deguanylated activity, such activity cannot be extrapolated to all RIPs [7].

In addition to the classical polynucleotide: glycosylase activities of RIPs on RNA or DNA, novel activities have also been investigated. Chitinase activity [34], phosphatase activity on

lipids [35] and phosphatase activity on nucleotides [36] have been demonstrated for individual RIPs. However, it is important to note that there is controversy about these novel activities attributed to RIPs, owing to the possible presence of contaminants in the protein preparations [37]. Although it is now known that an efficient purification method is enough to separate possible contaminants, Wang and coworkers demonstrated that the ribonuclease contamination can largely be removed by affinity chromatography using red sepharose [38]. Regardless, it is important to establish an efficient purification protocol for RIPs before announcing a novel activity.

Scientists have attempted to clarify the function of RIPs in nature for at least 20 years. Currently, only the enzymatic activity and mechanism of action of RIPs have been elucidated. Nevertheless, additional biological activities for RIPs have been proposed, as will be discussed in the next section. Although most biological activities of RIPs undoubtedly rely on their enzymatic properties, others may be due to nonenzymatic interactions of the amino- or carboxy-terminal domains with nucleic acids or proteins [7]. Nevertheless, the widespread nature of RIPs likely emphasizes their importance.

The ubiquity of RIPs in plants

Since the discovery of ricin, the first RIP, in plant seeds, interest in its medical properties has led the scientific community to search for new RIPs in plants. For this reason, plant RIPs are currently the best characterized and understood. Different RIPs have been reported from approximately 50 plant species covering 17 families. Some families include many RIP-producing species, particularly *Cucurbitaceae*, *Euphorbiaceae*, *Poaceae* and families belonging to the superorder *Caryophyllales* [11]. In addition to plants, there is also a wide distribution of RIPs in fungi, bacteria, algae and also in mammalian tissue [39]. Antiviral, antifungal and insecticidal activities have been discussed as part of the defense mechanism for RIP producers [2]. Apoptotic activity is suggested owing to the high expression of RIPs in senescent, wounded or stressed tissues [40]. Unfortunately, there are only hypotheses about their role; in this sense, the current belief is that RIPs could play a significant role in antimicrobial responses, stress and senescence, or could be important as antifeedants, storage proteins and apoptotic components [7,40,41]. Potentially, the biological role of RIP remains an intriguing area of research because of the ubiquity and conservation of these proteins in nature.

Type 1 RIPs are the most abundant RIPs among plants [10] and are found at different concentrations in different plants, including nontoxic plants [42,43]. The distribution of RIPs in the producing plant is widespread; they can be present in seeds, leaves, roots, fruits, stems, flowers or bulbs [39]. In addition, different types of RIPs can coexist in the same plant. Type 1 and type 2 RIPs have been found in *Sambucus* spp. [44], *Cinnamomum camphora* [45] and *Iris hollandica* [46]. We are unaware of other producers such as fungi or bacteria that contain more than one RIP within the same organism. Only a relatively small set (<40) of type 2 RIPs have been purified and characterized. Moreover, since all proteins currently characterized were isolated from a rather limited number of seed plants (*Ricinus communis*, *Abrus* sp., *Adenia* sp., *Cinnamomum camphora*, *Sambucus* sp., *Viscum* sp., *Momordica charantia*, *Trichosanthes* sp., *Bryonia dioica*, *Panax ginseng*, *Ximenia americana*, *Iris hollandica* and *Polygonatum multiflorum*) belonging to only 13 genera, it is generally believed that type 2 RIPs are scarcely distributed among flowering plants [39,47]. Girbés *et al.* provided an updated list of all known RIPs [39].

According to Peumans and Van Damme, evidence suggests that an ancestor of modern seed plants developed the RIP domain at least 300 million years ago [47]. This ancestral RIP domain gave rise to a direct lineage of type 1 RIPs (i.e., primary type 1 RIPs), still present today in many monocots and at least one dicot. Later on, a plant succeeded in fusing the RIP domain to a duplicated ricin-B-domain acquired from a bacterium. The resulting ancestral type 2 RIP gave rise to all modern type 2 RIPs and, by domain deletion, to different lines of 'secondary' type 1 RIPs and ricin-B type lectins. Finally, the origin of the bacterial RIP domain probably did not develop their own RIP domain but acquired it through (multiple) lateral plant gene transfers (see FIGURE 2).

Bacterial RIPs & their applications

RIPs are present in only a limited number of bacteria, including *E. coli*, *Shigella dysenteriae* and *Streptomyces coelicolor* [48–50]. Some fungi produce type 1 RIPs with a molecular mass close to or under 10 kDa [51], while others vary between 13.8 kDa (such as velutin) [52] and up to 42 kDa (such as flammulin) [53]. These RIPs act exactly as their plant counterparts. All these findings favor the generally accepted hypothesis that RIPs are enzymes that are widely

distributed among many organisms and, therefore, they must play an important, but as yet undefined, biological role.

Shiga and Shiga-like toxins (SLT) are the best studied bacterial RIPs. They are produced by *S. dysenteriae* and *E. coli*, respectively. Also, *Citrobacter freundii*, *Aeromonas hydrophyla*, *Aeromonas caviae* and *Enterobacter cloacae* have been found to produce these toxins.

Shiga toxins belong to type 2 RIPs [49,54] consisting of two components, an A-chain with *N*-glycosidase activity and a B-chain with lectin properties. The A-fragment (32 kDa) consists of two subunits (A1 and A2) linked by a disulfide bond, and is responsible for protein synthesis inhibition by removing an adenine from the major ribosome subunit. The B-fragment consists of five identical subunits of 7.7 kDa ordered in a ring-shaped pentamer (see FIGURE 3) [55]. Shiga toxins are classified into two major types, Stx1 and Shiga toxin 2, both with similar structures but with different A-chain sequences. The Stx1 type consists of 315 amino acids, while the Shiga toxin 2 type has 318 amino acids, explaining why they differ in immunological properties. The *stx* genes are encoded on temperate bacteriophages, and production and release of the toxin is primarily dependent on prophage induction [56].

These toxins are responsible for important diseases such as hemolytic uremic syndrome, microangiopathic hemolytic anemia, renal failure and, in some cases, neurological symptoms [57]. To exert their activity, Shiga toxins first bind with the help of the B-fragment to the glycolipid receptor Gb3 (sometimes Gb4) on the cell surface. They are then transported by endocytosis and, subsequently, the A-chain enters the cytosol where it exerts its enzymatic activity, leading to the inhibition of protein biosynthesis and cell death [58]. To reach the cytosol, the following model was proposed to explain the Shiga toxin traffic: Shiga toxin binds to the plasma membrane, where it induces local spontaneous curvature and the formation of endocytic invaginations. Retrograde tubules are then formed in a clathrin-dependent manner, and Shiga toxins preferentially localize to this tubular environment. Retrograde tubules are processed by scission in a retromer-dependent manner. Shiga toxins bypass the late endocytic pathway and are transferred directly from the early endosome to the trans-Golgi network and, from there on, to the endoplasmic reticulum (ER). Finally, Shiga toxins use the ER-associated degradation machinery to facilitate retrotranslocation into the host cell cytosol [59].

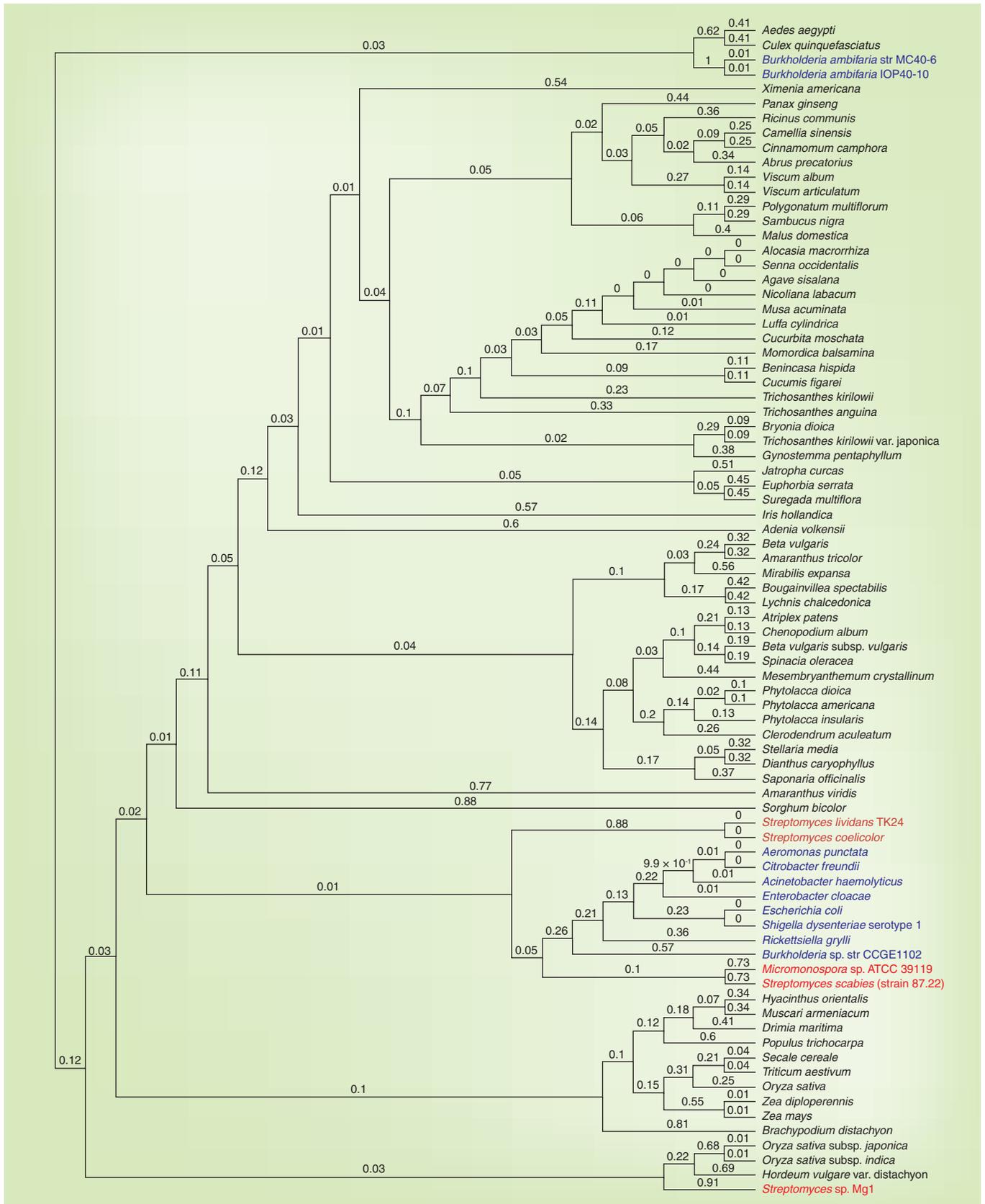


Figure 2. Dendrogram constructed using Geneious Tree Builder. Protein sequences were obtained for the ribosome-inactivating protein family from the PFAM database (family code: PF00161 [101]) and constructed into a dendrogram using Geneious Tree Builder [102]. Names of bacterial species are colored according to taxonomic affiliation: actinobacteria (red); proteobacteria (blue).

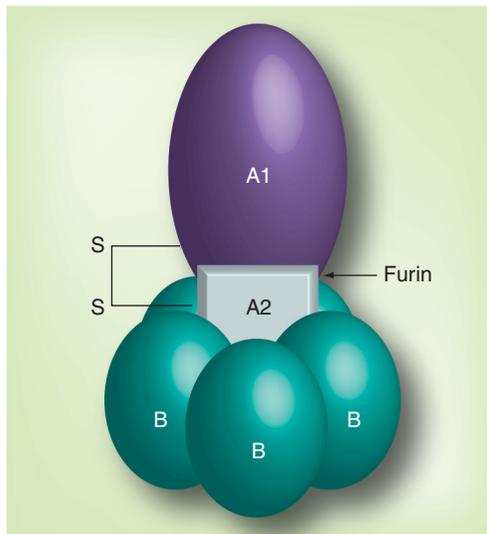


Figure 3. Shiga toxin. Based on Shiga toxin PDM protein data bank: 1DM0 [103].

The principal characteristics of Shiga toxins that make them useful as medical tools are: first, the specific binding and retrograde transport to the ER conferred by the B-chain; and second, the toxic effect of *N*-glycosidase activity from the A-chain.

Apart from protein biosynthesis inhibition, Shiga toxins can also have other effects. For instance, Stx1 has been reported to have an antiviral activity that requires a catalytically active toxin. Therefore, it is suggested that Stx1 could be part of a defense mechanism [60]. Moreover, Shiga toxins could induce a series of signal transduction events linked to eventual apoptosis [61]. The toxin induces DNA degradation and the release of cellular content. This process can thereby facilitate proteolytic attack on neighboring cells and contribute to the toxic effect in whole organisms [55].

The proposed mechanism to explain the apoptosis begins with the activation of one or more members of the MAPK family in response to Shiga toxin or ricin treatment, which has been demonstrated in several different cell lines. This signaling cascade is termed the ribotoxic stress response (RSR). Activation of MAPKs results in changes in gene regulation at both transcriptional and post-transcriptional levels. In this way, Shiga toxin and ricin not only provoke inhibition of protein synthesis, the MAPK kinase signaling cascade is also activated [62]. The ability of Shiga toxin and ricin to activate the RSR and induce proinflammatory and proapoptotic signaling has been demonstrated *in vitro* in several cells (HCT-8, Vero cells, THP-1 cells, human primary airway cells, RAW 264.7 cells

and murine primary macrophages) and *in vivo* in tissues (murine kidney, lung and intestine). As was correctly mentioned by Jandhyala *et al.*, owing to the ability of ribotoxic stressors to activate proinflammatory and proapoptotic pathways, blockade of the RSR may constitute a therapeutic strategy to treat illnesses associated with ribotoxic stressors such as hemolytic uremic syndrome or ricin-induced acute respiratory distress syndrome [62]. On the other hand, Das *et al.* present an interesting discussion about induction mechanism of apoptosis [63].

The understanding of toxicity and interaction with cells from Shiga toxins allowed the design of useful drugs, immunotoxins and other conjugates that combine the use of A- or B-subunits from Shiga toxins with several ligands [64,65]. Immunotoxins are agents designed to target and kill cancer cells and consist of a tumor-targeting ligand or antibody that is linked to the catalytic moiety of a bacterial or plant protein toxin. The targeted toxin induces apoptosis by reaching the cytosol and inactivating vital cell processes or by modifying the tumor cell surface membrane. Various toxins have been used, including plant RIPs such as ricin, saporin, PAP and gelonin, among others, some of which have been tested against various malignancies, often achieving promising results [66]. The bacterial toxins most frequently used for cancer treatments are diphtheria toxin and *Pseudomonas* exotoxin-derived proteins, which also block protein biosynthesis, but in a different way than RIPs. Once in the cytosol, diphtheria toxin and *Pseudomonas* exotoxin will prevent further protein synthesis by catalyzing the **adenosine diphosphate ribosylation** and subsequent inactivation of EF-2, which leads to the inhibition of protein synthesis and cell death. Several clinical trials have been carried out, with encouraging results. In addition, Shiga-toxin-linked molecules are being investigated to treat solid tumors and hematological malignancies. Specifically, the SLT-1 A-subunit encodes all functions necessary to route itself out of cellular organelles in order to reach and inactivate ribosomes present in the cytoplasm of eukaryotic cells. This event subsequently leads to apoptosis.

Focusing on the Shiga toxin B-subunit, this protein shows exclusive binding to the glycolipid Gb3 cellular receptor [65,67] with a markedly restricted expression pattern that allows the design of compositions that specifically target certain cells types, such as antigen-presenting cells (exploitation for immunotherapy) or tumor cells (exploitation for tumor targeting).

The targeting and trafficking characteristics of the Shiga toxin B-subunit are currently being exploited for the development of new immunotherapy and cancer cell targeting approaches. Hotz *et al.* conducted *in vitro* and *in vivo* experiments to evaluate the effects of the SLT-1-VEGF fusion protein, composed of VEGF and the catalytically active A-subunit of SLT-1 produced by *E. coli* O157:H7, in a clinically relevant orthotopic nude mouse model of pancreatic cancer [64]. VEGF induces endothelial cell proliferation and enhances vascular permeability. Selectively damaging endothelial cells at sites of angiogenesis with SLT-VEGF was intended as a novel antiangiogenic treatment strategy. VEGF can direct toxins to tumor vessels through VEGF receptor 2 for antiangiogenic therapy. In animal tumor models, SLT-VEGF selectively depleted endothelial cells in tumor vasculature as judged by immunohistochemical analysis. It could be concluded that SLT-VEGF is toxic for tumor vasculature rather than for normal endothelial or pancreatic cancer cells.

Since the SLT-1 A-subunit lacks the ability to target cancer cells, Cheung *et al.* developed a single chain RIP by insertion of a random seven-amino-acid peptide motif into the structure of the SLT-1 A-domain to create a combinatorial library of this protein template expressing toxic SLT-1 A mutants harboring a putative peptide ligand that may specifically recognize, enter and kill cancer cells [68]. A search through the library yielded a variant named SLT-1AIYSNKLM that selectively targets human melanoma cell lines. This novel single chain RIP variant of the cytotoxic A-subunit of STL-1 was able to target and specifically kill human melanoma cells, suggesting that RIP A-subunit libraries may represent a useful discovery tool for targeted protein-based therapeutics.

In addition, the use of the A-domain of Shiga toxin in cancer therapy harbors several advantageous properties compared with conventional chemotherapeutic drugs. It encodes the necessary functions to route itself out of cellular organelles in order to reach and inactivate ribosomes present in the cytoplasm of eukaryotic cells. It kills cells in an extremely effective manner (theoretically, one toxin molecule is enough to kill one cell) and, thus, the StxA-chain could potentially have therapeutic effects at low doses and with only one or a few rounds of treatment [69]. Examples of the efficient anti-tumoral activity of Shiga toxin have been shown in several murine cancer models. These reports demonstrate that intratumoral or intraperitoneal

injections of the Stx1 A-chain inhibited tumor growth in a murine metastatic fibrosarcoma model [70], as well as in mouse xenograft models of human malignant meningiomas [71], atypical human bladder carcinoma with endothelial characteristics [72], human renal carcinoma [73] and human astrocytoma [74]. Another advantage of the StxA chain compared with conventional chemotherapeutic drugs is the fact that the StxA chain kills cells by a different mechanism, and as such is being potentially efficient for most drug-resistant cancer cell phenotypes. Therefore, the StxA chain may be able to kill cancer cells that would otherwise escape chemotherapeutic treatment and lead to a relapse [69]. Nevertheless, the medical applications of the Shiga toxin remain limited so far. More research is needed in order to clarify issues such as the inefficient delivery into some cancer cells by the use of the Shiga toxin B-chain [75] and side effects associated with Shiga toxin A-chain treatment [76]. Apart from targeting and trafficking, the Shiga toxin B-subunit also has other characteristics that may be of importance in an immunotoxin-directed approach, such as small size, resistance to the intestinal milieu (pH and proteases), transport across the mucosa of the intestines and distribution in the body [77]. An example of the useful efficiency of membrane translocation from the Shiga toxin B chain has been shown through the delivery of antigenic peptides into T cells [78].

Streptomyces coelicolor* & RIP in *S. coelicolor

In contrast to Shiga toxin, the RIP in *S. coelicolor* (RIP_{sc}) is a type 1 RIP. It was shown to depurinate mammalian, fungal and bacterial ribosomes, but was not able to cause damage to intact cells [50]. *Streptomyces* are Gram-positive soil bacteria that produce a wide variety of secondary metabolites, many of which have potent biological activities. They produce more than half of the known biologically active microbial products, including many commercially important antibiotics, immunosuppressants, animal health and agrochemical products. This vast reservoir of diverse compounds makes *Streptomyces* one of the most industrially important microbial genera and, consequently, a battery of tools for genetic manipulation of these microorganisms is available. *S. coelicolor* A3(2) is genetically the best-characterized *Streptomyces* strain. Its genome sequence became available in 2002 [79].

Moreover, an increasing number of studies over the past years have reported *Streptomyces* as a potentially interesting host for the heterologous

production of secreted proteins (for a recent review, see [80]). Apart from the benefits of using *Streptomyces* as a host for heterologous protein production, much effort is carried out to explore the isolation of new secondary metabolites, for example by identifying and expressing silent genes clusters [81].

Recently, the presence of an active type 1 RIPsc encoded by ORF SCO7092 was reported [50]. *In silico* analysis of SCO7092 showed that the amino acid sequence is similar to known type 1 RIPs. Alignment of RIPsc amino acid sequence with some well-characterized RIPs, including ricin, PAP and a group of type 1 RIPs, isoforms of *Muscari armeniacum* (MU1, MU2 and MU3) showed only a surprisingly low similarity, ranging between 22% for the ricin A-chain, 23% for PAP and 30% for the MU group. Despite this low similarity, the sequence segments where RIPsc was similar to the RIPs tested were localized. Moreover, seven amino acids involved in the active site of ricin (Tyr80, Tyr123, Ala 165, Glu177, Ala 178, Arg180 and Trp211 in the A-chain of ricin) were conserved in RIPsc. Although similarity with known RIPs was low, the conservation of the important active site residues assumed the presence of RIP enzymatic activity [50]. More recent evidence further demonstrated that structural protein alignments made [MILLAN ET AL. UNPUBLISHED DATA] from protein sequences of ricin and RIPsc were completely coupled.

The RIPsc sequence consists of 300 amino acid residues. It has a 35 amino acid-long N-terminal signal peptide as revealed by *in silico* analysis with SignalP 3.0, suggesting that RIPsc is a secreted protein. Gene databases search for similar genes in other *Streptomyces* species only showed the presence of a RIPsc sequence homolog in *Streptomyces scabies*, in which the active site residues were also present. Interestingly, for *S. coelicolor*, the genome location of the *ripsc* gene was found near the end of the linear chromosome, a highly variable region of several *Streptomyces* species. Since most essential genes are located in the core region of the chromosome, the RIPsc-encoding gene is most likely not essential for growth. This may explain why a *rip* homolog is absent in most *Streptomyces* species.

The RIP activity of RIPsc was confirmed by several experiments [50]. Induction of overexpression of the mature RIPsc protein in *E. coli* gave rise to a substantial growth decrease at the moment of induction, suggesting a toxic effect of RIPsc for *E. coli* ribosomes. RIPsc could be

purified from inclusion bodies, and following refolding the activity of RIPsc was tested in a series of experiments.

In an *in vitro* luciferase translation system using rabbit ribosomes, luciferase production was strongly reduced when RIPsc was added, compared with the control without RIPsc, suggesting that RIPsc specifically inhibits protein translation of rabbit ribosomes. In another experiment, expression of *ripsc* under the control of a galactose-inducible promoter was shown to be deleterious for *Saccharomyces cerevisiae*, providing further support that RIPsc is active on eukaryotic ribosomes. RIPsc N-glycosidase activity could be confirmed with a recently described adenine glycosylase activity assay. This assay is based on the fact that reverse transcriptase typically incorporates an adenosine when it encounters a site with a lesion on the template strand [82]. RIP activity was monitored for RNA samples taken from noninduced and induced cells of *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformed with pET-RIPsc. If the produced protein had damaged the rRNA, reverse transcriptase would insert an adenosine into the complementary DNA during quantitative reverse transcriptase PCR. Provided that a site-specific PCR primer was used, a higher amplification of the altered sequence results. A strong increase in the target amplicon was observed following induction of *ripsc* expression in comparison with the control (template from culture without induction) [50]. This showed that RIPsc removes the specific adenine from rRNA within a universally conserved GAGA sequence (A2660 in the case of *E. coli* 23S rRNA).

Furthermore, the possible antifungal and antibacterial activity of RIPsc was assessed on a series of selected fungal and bacterial strains, but growth inhibition was not observed. A possible explanation is that as RIPsc belongs to type 1 RIPs, it could not enter the cells. Consequently, a direct role of RIPsc in the antagonism of bacterial and fungal competitors is very unlikely.

Reverse transcription expression analysis showed that *ripsc* expression was constant during growth. On the other hand, under standard fermentation conditions using different media it was not possible to detect RIPsc in the culture supernatants. It is suggested that the observed *ripsc* expression occurring under the basal state is necessary to induce or is part of an apoptosis process. Further experiments are needed to investigate this hypothesis.

Potential applications for bacterial RIPs

The pharmaceutical industry globally is facing high development costs coupled with declining success rates in drug discovery programs. The decrease in the success of traditionally generated new chemically based small molecules calls for new approaches to discover successful molecules, which may be based on the advancements in biotechnology. In fact, the acquired knowledge on the background of pathologies, physiology and mechanisms of action may be useful to develop new approaches. For example, since the mechanism of action for bacterial RIPs is known, there is greater potential for their use in the biomedical field. Nevertheless, after many reports [64,83–85], the most promising applications of RIPs in experimental medicine to date are their use as chemically conjugated targeted chimeric molecules. In particular, their use as recombinantly expressed genetic fusions to different ligands, such as growth factors or antibody fragments, capable of delivering them to cells and being selectively eliminated are promising [11,68].

A potential advantage has arisen from the recent discovery of RIPsc. Advantages of RIPsc over Shiga toxins as a safe RIP producer organism allows for safe production processes. Currently, we are investigating the ability to produce RIPsc conjugations for application as an agrochemical. Besides this, there is certainly room in the biomedical field to explore applications using RIPsc. However, using RIPsc as a partner in fusion/conjugates still requires cytosolic access by the RIP. Directing an immunotoxin, fusion or conjugate to the site of cytosolic entry normally used by the RIP would probably be of benefit. For example, ricin A-chain and StxA chain immunotoxins/fusions/conjugates should be directed to the ER, and the targeting compound should be engineered to allow the release of the toxin component at this site. In the case of RIPsc, trafficking studies may therefore have benefit – although for some RIPs they have not necessarily been definitive and different RIPs may have different intracellular routes to enter the cytosol of intoxicated cells [86].

A potential application of RIPsc in medicine is its use as an antitumor agent via two different mechanisms. As proposed, RIPsc could be introduced into tumor cells by induction with shock waves [87]. RIPsc may also be used as an anticancer substance by designing it to be a specific immunotoxin against particular cancers.

In spite of several trials, the only clinically approved product thus far is a diphtheria toxin

conjugate where IL-2 serves as the binding moiety. However, as methodology is improving and more becomes known about the role of different parts of the toxin molecules, new improved drugs can be produced and clinical trials can be carried out more intensively.

On the other hand, although antiviral activity of RIPsc has not yet been demonstrated, *in silico* analysis of structure and amino acid composition suggest that antiviral activity of RIPsc cannot be excluded, as shown for a plant RIP reported to be active as an anti-HIV agent [88]. Furthermore, antibacterial or antifungal activity of RIPsc might be achieved by the fusion of a lectin or a ligand able to specify RIPsc in addition to facilitating its entry into a target microorganism for treatment.

The possibilities for RIPsc's medical applications are extensive, necessitating further research efforts. Researchers aim to find new RIPs in bacteria, enabling greater understanding of their function. Furthermore, investigation to design better, safer and less expensive drugs using natural and noninvasive molecules is of primary interest.

Conclusion

This overview shows that RIPs are widespread in nature, in particular in plants, but they have also been detected in other organisms, including some bacteria, fungi and algae. Although RIPs have been extensively investigated for many years, a real answer about their physiological role cannot be given as yet, and only possible suggestions have been made. Further research is needed to answer this question. The observation that RIPs show antimicrobial activity stimulated researchers to test them as antimicrobial agents. However, these tests were unsuccessful against a number of viruses causing disease in man, but potential applications in the protection in plants against viral infections and fungal attacks are more promising.

Both type 1 and type 2 RIPs have been tested for these purposes. Since RIPs give rise to cell death as a consequence of protein synthesis arrest following *N*-glycosidase action causing adenine release from the sarcin/ricin loop of the large ribosomal subunit, they have been tested for cell killing activity against different types of cells, including tumor cells and immunoreactive cells. To specifically target the RIPs to these cells, appropriate molecules such as antibodies, growth factors, lectins, hormones, neuropeptides and cytokines have been tested with varying success. Alternatively, the B-chain

could also be used for specific delivery, such as the Stx B-chain, which specifically binds to the Gb3 receptor and has a restricted tissue expression pattern. It is present on cancer cells and dendritic cells, two cell types of particular interest in biomedical research. When the B-subunit is coupled to cytotoxic compounds, the tumor cells can be preferentially targeted, and hopefully killed.

The previously mentioned examples show that RIPs or their components can potentially be applied in biomedical research and in plant protection, but far more experiments have to be carried out to develop them from proof-of-concept to valuable and applicable tools.

Future perspective

Since the discovery of the first RIPs, ricin from the seeds of *Ricinus communis*, and abrin from the seeds of *Abrus precatorius* more than a century ago, many different RIPs have been identified, and their mechanism of action has become known. They inhibit protein synthesis by virtue of their selective cleavage of a specific residue from the highly conserved stem-loop structure in the 28S rRNA of ribosomes. This unique property make RIPs an interesting molecule to

combat different diseases in plants and animals, including man. Examples of applications have already been given in the literature and in practice, for example, it has been involved in antiviral (including HIV), antifungal, anti-insect and antitumor aspects.

Since the mechanism of action is now well understood, future directions in research will be to find new active RIPs from different sources and, more importantly, to develop methods for efficient and specific cell targeting. It is obvious that most attention will go to type 2 RIPs, because their B-chain can be used for cell specificity, but type 1 RIPs can also be developed into specific cell targeting molecules. In any case, fine tuning for cell specificity is needed, since RIPs can, in theory, inhibit any kind of cell, and collateral damage should be avoided as much as possible. Since tumor cells are, in many cases, the target cells, precise pinpointing is needed. Therefore, molecules ought to be designed in which the toxic domains of RIPs are linked to selective tumor targeting domains or directly delivered as suicide genes for cancer gene therapy, as illustrated with the single-chain RIP variant coupled to the Shiga-like A1-chain [68]. In such a manner, type 1

Executive summary

- Ribosome-inactivating proteins (RIPs) are proteins with *N*-glycosidase activity that causes the release of a specific adenine from the sarcin/ricin loop of the 60S ribosomal subunit. As a consequence, polypeptide chain translocation is hindered and protein synthesis is arrested. Some RIPs also inactivate ribosomes from fungi and certain plants and bacteria.
- A number of RIPs also display *N*-glycosidase activity on other adenines from rRNA, on viral RNA and on genomic DNA. In addition, for some RIPs chitinase activity, topological activity on DNA, HIV integrase inhibitory activity, superoxide dismutase, DNase and lipase activity have been reported.
- RIPs are currently divided into two classes based on the number of subunits:
 - Type 1 RIPs are single-chain proteins with enzymatic activity;
 - Type 2 RIPs have an active A-chain linked to a B-chain with lectin properties, which facilitates the entry of the A-chain into the target cell;
 - A type 3 RIP has previously also been proposed for RIPs whose A-chain is attached to peptidic segments without known function, but is now classified as type 1 RIP.
- RIPs are primarily distributed in plants, but they are also present in some fungi, bacteria, algae and in mammalian tissues.
 - However, their biological role and function remains enigmatic. It has been postulated that they could have a role in the defense of plants against predators, fungi and viruses, or that they could play a role in plant senescence.
- Bacterial RIPs have been demonstrated in *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* and *Streptomyces coelicolor*.
 - *stx* genes are encoded on temperate bacteriophages in the chromosome of the bacteria, while the *S. coelicolor* RIP (~30 kDa) is encoded in the chromosome;
 - Shiga toxin is the best-characterized bacterial RIP. It is an AB toxin with the A-fragment (~27 kDa) consisting of two subunits linked by a disulfide bond, and noncovalently bound to a homopentameric B-subunit (5 × 7.7 kDa), the latter of which allows binding to glycolipid receptors at the cell surface. In a number of cell types, Shiga toxin is transported from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum via early endosomes and the Golgi apparatus;
 - Shiga toxins are responsible for diseases such as hemolytic uremic syndrome, microangiopathic hemolytic anemia and renal failure, and in some cases neurological symptoms.
- Research on RIPs is expanding because of their possible applications.
 - They can potentially be applied in medicine for the treatment of cancer, HIV and autoimmune diseases;
 - There are also applications in agriculture for the treatment of viruses and fungi.

RIPs can also be developed as interesting tools to precisely target and combat specific cells, including cancer cells but also microbially infected cells. In addition, structure–activity relation studies can help to increase the enzymatic activity of RIPs in order to develop a more efficient ‘killer’ enzyme. In conclusion, applications of RIPs in different therapeutic domains remain an exciting research domain that will eventually result in valuable applications for the profit of man.

Financial & competing interests disclosure

Part of the work on this article was carried out in the framework of an ALFA project II-0313-FA-FCD and CONACYT-Mexico, for which financial support is acknowledged. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

References

Papers of special note have been highlighted as:

▪ of interest

▪▪ of considerable interest

- Barbieri L, Valbonesi P, Bondioli M *et al.* Adenine glycosylase activity in mammalian tissues: an equivalent of ribosome-inactivating proteins. *FEBS Lett.* 505(1), 196–197 (2001).
- Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon* 44(4), 371–383 (2004).
- Interesting overview of the state of the art regarding ribosome-inactivating proteins (RIPs).**
- Olsnes S, Pihl A. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. *Biochemistry* 12(16), 3121–3126 (1973).
- Reinbothe S, Reinbothe C, Lehmann J, Becker W, Apel K, Parthier B. JIP60, a methyl jasmonate-induced ribosome-inactivating protein involved in plant stress reactions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91(15), 7012–7016 (1994).
- Walsh TA, Morgan AE, Hey TD. Characterization and molecular cloning of a proenzyme form of a ribosome-inactivating protein from maize. Novel mechanism of proenzyme activation by proteolytic removal of a 2.8-kilodalton internal peptide segment. *J. Biol. Chem.* 266(34), 23422–23427 (1991).
- Motto M, Lupotto E. The genetics and properties of cereal ribosome-inactivating proteins. *Mini Rev. Med. Chem.* 4(5), 493–503 (2004).
- Peumans WJ, Hao Q, Van Damme EJ. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA *N*-glycosidases? *FASEB J.* 15(9), 1493–1506 (2001).
- Girbes T, Citores L, Ferreras JM *et al.* Isolation and partial characterization of nigrin b, a non-toxic novel type 2 ribosome-inactivating protein from the bark of *Sambucus nigra* L. *Plant Mol. Biol.* 22(6), 1181–1186 (1993).
- Sandvig K, Olsnes S, Pihl A. Kinetics of binding of the toxic lectins abrin and ricin to surface receptors of human cells. *J. Biol. Chem.* 251(13), 3977–3984 (1976).
- Barbieri L, Battelli MG, Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1154(3–4), 237–282 (1993).
- de Virgilio M, Lombardi A, Caliendo R, Fabbrini MS. Ribosome-inactivating proteins: from plant defense to tumor attack. *Toxins* 2, 2699–2737 (2010).
- Interesting discussion on successful designs and features of chimeric molecules having therapeutic potential.**
- Park SW, Vepachedu R, Sharma N, Vivanco JM. Ribosome-inactivating proteins in plant biology. *Planta* 219(6), 1093–1096 (2004).
- Brigotti M, Alfieri R, Sestili P *et al.* Damage to nuclear DNA induced by Shiga toxin 1 and ricin in human endothelial cells. *FASEB J.* 16(3), 365–372 (2002).
- Tesh VL. The induction of apoptosis by shiga toxins and ricin. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 357, 137–178 (2012).
- Overview of studies describing Shiga toxin- and ricin-induced apoptosis, and evidence that signaling through the ribotoxic stress response and the unfolded protein response may be involved in apoptosis induction in some cell types.**
- Stirpe F, Olsnes S, Pihl A. 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(14), 6947–6953 (1980).
- Thorpe PE. Vascular targeting agents as cancer therapeutics. *Clin. Cancer Res.* 10(2), 415–427 (2004).
- Thiesen HJ, Juhl H, Arndt R. Selective killing of human bladder cancer cells by combined treatment with A and B chain ricin antibody conjugates. *Cancer Res.* 47(2), 419–423 (1987).
- Parikh BA, Tumer NE. Antiviral activity of ribosome inactivating proteins in medicine. *Mini Rev. Med. Chem.* 4(5), 523–543 (2004).
- Puri M, Kaur I, Kanwar RK, Gupta RC, Chauhan A, Kanwar JR. Ribosome inactivating proteins (RIPs) from *Momordica charantia* for anti viral therapy. *Curr. Mol. Med.* 9(9), 1080–1094 (2009).
- Pang YP, Park JG, Wang S *et al.* Small-molecule inhibitor leads of ribosome-inactivating proteins developed using the doorstep approach. *PLoS One* 6(3), e17883 (2011).
- Endo Y, Mitsui K, Motizuki M, Tsurugi K. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. *J. Biol. Chem.* 262(12), 5908–5912 (1987).
- Barbieri L, Gorini P, Valbonesi P, Castiglioni P, Stirpe F. Unexpected activity of saporins. *Nature* 372(6507), 624 (1994).
- Barbieri L, Valbonesi P, Bonora E, Gorini P, Bolognesi A, Stirpe F. Polynucleotide:adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A). *Nucleic Acids Res.* 25(3), 518–522 (1997).
- Endo Y, Gluck A, Wool IG. Ribosomal RNA identity elements for ricin A-chain recognition and catalysis. *J. Mol. Biol.* 221(1), 193–207 (1991).
- Hudak KA, Wang P, Tumer NE. A novel mechanism for inhibition of translation by pokeweed antiviral protein: depurination of the capped RNA template. *RNA* 6(3), 369–380 (2000).
- Gessner SL, Irvin JD. Inhibition of elongation factor 2-dependent translocation by the pokeweed antiviral protein and ricin. *J. Biol. Chem.* 255(8), 3251–3253 (1980).
- Irvin JD. Pokeweed antiviral protein. *Pharmacol. Ther.* 21(3), 371–387 (1983).
- Holmberg L, Nygard O. Interaction sites of ribosome-bound eukaryotic elongation factor 2 in 18S and 28S rRNA. *Biochemistry* 33(50), 15159–15167 (1994).
- Alegre C, Iglesias R, Ferreras JM, Citores L, Girbes T. Sensitivity of ribosomes from

- Agrobacterium tumefaciens* to the ribosome-inactivating protein crotin 2 depending on the translational state. *Cell Mol. Biol.* 42(2), 151–158 (1996).
30. Wang P, Tumer NE. Virus resistance mediated by ribosome inactivating proteins. *Adv. Virus Res.* 55, 325–355 (2000).
 31. Li XP, Chiou JC, Remacha M, Ballesta JP, Tumer NE. A two-step binding model proposed for the electrostatic interactions of ricin A chain with ribosomes. *Biochemistry* 48(18), 3853–3863 (2009).
 32. Zamboni M, Brigotti M, Rambelli F, Montanaro L, Sperti S. High-pressure-liquid-chromatographic and fluorimetric methods for the determination of adenine released from ribosomes by ricin and gelonin. *Biochem. J.* 259(3), 639–643 (1989).
 33. Rajamohan F, Kurinov IV, Venkatachalam TK, Uckun FM. Deguanlylation of human immunodeficiency virus (HIV-1) RNA by recombinant pokeweed antiviral protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263(2), 419–424 (1999).
 34. Shih NR, McDonald KA, Jackman AP, Girbés T, Iglesias R. Bifunctional plant defence enzymes with chitinase and ribosome inactivating activities from *Trichosanthes kirilowii* cell cultures. *Plant Sci.* 130(2), 145–150 (1997).
 35. Helmy M, Lombard S, Pieroni G. Ricin RCA60: evidence of its phospholipase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258(2), 252–255 (1999).
 36. Chen H, Wang Y, Yan MG, Yu MK, Yao QZ. The phosphatase activity of five ribosome-inactivating proteins. *Chin. Biochem. J.* 12, 125–129 (1996).
 37. Day PJ, Lord JM, Roberts LM. The deoxyribonuclease activity attributed to ribosome-inactivating proteins is due to contamination. *Eur. J. Biochem.* 258(2), 540–545 (1998).
 38. Wang HX, Ng TB, Cheng CH *et al.* Contamination of ribosome inactivating proteins with ribonucleases, separated by affinity chromatography on red sepharose. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 33(2) 101–111 (2003).
 39. Girbés T, Ferreras JM, Arias FJ, Stirpe F. Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. *Mini Rev. Med. Chem.* 4(5), 461–476 (2004).
 40. Narayanan S, Surendranath K, Bora N, Surolia A, Karande AA. Ribosome inactivating proteins and apoptosis. *FEBS Lett.* 579(6), 1324–1331 (2005).
 41. Stirpe F, Battelli MG. Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cell. Mol. Life Sci.* 63(16), 1850–1866 (2006).
 42. Ishizaki T, Megumi C, Komai F, Masuda K, Oosawa K. Accumulation of a 31-kDa glycoprotein in association with the expression of embryogenic potential by spinach callus in culture. *Physiol. Plant* 114(1), 109–115(2002).
 43. Barbieri L, Polito L, Bolognesi A *et al.* Ribosome-inactivating proteins in edible plants and purification and characterization of a new ribosome-inactivating protein from *Cucurbita moschata*. *Biochim. Biophys. Acta* 1760(5), 783–792 (2006).
 44. Ferreras JM, Citores L, de Benito FM *et al.* Ribosome-inactivating proteins and lectins from Sambucus. *Curr. Top. Phytochem.* 3, 113–128 (2000).
 45. Ling J, Liu WY, Wang TP. Simultaneous existence of two types of ribosome-inactivating proteins in the seeds of *Cinnamomum camphora* – characterization of the enzymatic activities of these cytotoxic proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1252(1), 15–22 (1995).
 46. Van Damme EJ, Barre A, Barbieri L *et al.* Type 1 ribosome-inactivating proteins are the most abundant proteins in iris (*Iris hollandica* var. Professor Blaauw) bulbs: characterization and molecular cloning. *Biochem. J.* 324 (3), 963–970 (1997).
 47. Peumans WJ, Van Damme EJM. Evolution of plant ribosome-inactivating proteins. In: *Toxic Plant Proteins. Plant Cell Monographs 18.* Lord JM, Hartley MR (Eds). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, 1–26 (2010).
- **Interesting analysis of the evolution of RIPs in plants from the ancestral type 1 RIP to modern type 2 RIPs.**
48. Reisbig R, Olsnes S, Eiklid K. The cytotoxic activity of Shigella toxin. Evidence for catalytic inactivation of the 60 S ribosomal subunit. *J. Biol. Chem.* 256(16), 8739–8744 (1981).
 49. Obrig TG. Shiga toxin mode of action in *E. coli* O157:H7 disease. *Front. Biosci.* 2, d635–d642 (1997).
 50. Reyes AG, Geukens N, Gutschoven P *et al.* The *Streptomyces coelicolor* genome encodes a type I ribosome-inactivating protein. *Microbiology* 156(10), 3021–3030 (2010).
 51. Ng TB, Parkash A. Hispin, a novel ribosome inactivating protein with antifungal activity from hairy melon seeds. *Protein Expr. Purif.* 26(2), 211–217 (2002).
 52. Wang H, Ng TB. Isolation and characterization of velutin, a novel low-molecular-weight ribosome-inactivating protein from winter mushroom (*Flammulina velutipes*) fruiting bodies. *Life Sci.* 68(18), 2151–2158 (2001).
 53. Wang HX, Ng TB. Flammulin: a novel ribosome-inactivating protein from fruiting bodies of the winter mushroom *Flammulina velutipes*. *Biochem. Cell Biol.* 78(6), 699–702 (2000).
 54. Sandvig K, van Deurs B. Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol. Rev.* 76(4), 949–966 (1996).
 55. Sandvig K. Shiga toxins. *Toxicol.* 39(11), 1629–1635 (2001).
 56. Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci.* 85(13 Suppl.), E45–E62 (2007).
 57. Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11(3), 450–479 (1998).
 58. Falnes PO, Sandvig K. Penetration of protein toxins into cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12(4), 407–413 (2000).
 59. Johannes L, Romer W. Shiga toxins – from cell biology to biomedical applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(2), 105–116 (2010).
- **Reviews the Shiga toxin family members and their structures, receptors, trafficking pathways and cellular targets, and how Shiga toxin affects cells and might be exploited in cancer therapy and immunotherapy.**
60. Ferens WA, Hovde CJ. Antiviral activity of shiga toxin I: suppression of bovine leukemia virus-related spontaneous lymphocyte proliferation. *Infect. Immun.* 68(8), 4462–4469 (2000).
 61. Jones NL, Islur A, Haq R *et al.* *Escherichia coli* Shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells that is regulated by the Bcl-2 family. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278(5), G811–G819 (2000).
 62. Jandhyala DM, Thorpe CM, Magun B. Ricin and shiga toxins: effects on host cell signal transduction. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 357, 1–65 (2012).
 63. Das MK, Sharma RS, Mishra V. Induction of apoptosis by ribosome inactivating proteins: importance of *N*-glycosidase activity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166(6), 1552–1561 (2012).
- **Reviews various experimental outcomes on the importance of *N*-glycosidase activity of RIPs in the induction of apoptosis.**
64. Hotz B, Backer MV, Backer JM, Buhr HJ, Hotz HG. Specific targeting of tumor endothelial cells by a shiga-like toxin-vascular endothelial growth factor fusion protein as a

- novel treatment strategy for pancreatic cancer. *Neoplasia* 12(10), 797–806 (2010).
- **Results show that Shiga-like toxin–VEGF fusion protein treatment in combination with gemcitabine may provide a novel approach for pancreatic cancer.**
65. Falguieres T, Mallard F, Baron C *et al.* Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. *Mol. Biol. Cell* 12(8), 2453–2468 (2001).
66. Polito L, Bortolotti M, Pedrazzi M, Bolognesi A. Immunotoxins and other conjugates containing saporin-s6 for cancer therapy. *Toxins (Basel)* 3(6), 697–720 (2011).
67. Lingwood CA. Shiga toxin receptor glycolipid binding. Pathology and utility. *Methods Mol. Med.* 73, 165–186 (2003).
68. Cheung MC, Revers L, Perampalam S *et al.* An evolved ribosome-inactivating protein targets and kills human melanoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cancer* 9, 28 (2010).
- **Interesting report on the discovery and properties of a single chain RIP derived from the cytotoxic A-subunit of SLT-1 demonstrating that evolution of a single chain RIP template can lead to the discovery of novel cancer cell-targeted compounds.**
69. Engedal N, Skotland T, Torgersen ML, Sandvig K. Shiga toxin and its use in targeted cancer therapy and imaging. *Microb. Biotechnol.* 4(1), 32–46 (2011).
- **Gives an introduction to Shiga toxin and its intracellular transport. Furthermore, an updated overview of the published reports on Gb3 overexpression in human cancers is provided. The possibility of utilizing therapeutic compounds or contrast agents in targeted cancer therapy is discussed.**
70. Farkas-Himsley H, Hill R, Rosen B, Arab S, Lingwood CA. The bacterial colicin active against tumor cells *in vitro* and *in vivo* is verotoxin 1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92(15), 6996–7000 (1995).
71. Salhia B, Rutka JT, Lingwood C, Nutikka A, Van Furth WR. The treatment of malignant meningioma with verotoxin. *Neoplasia* 4(4), 304–311 (2002).
72. Heath-Engel HM, Lingwood CA. Verotoxin sensitivity of ECV304 cells *in vitro* and *in vivo* in a xenograft tumour model: VT1 as a tumour neovascular marker. *Angiogenesis* 6(2), 129–141 (2003).
73. Ishitoya S, Kurazono H, Nishiyama H *et al.* Verotoxin induces rapid elimination of human renal tumor xenografts in SCID mice. *J. Urol.* 171(3), 1309–1313 (2004).
74. Arab S, Rutka J, Lingwood C. Verotoxin induces apoptosis and the complete, rapid, long-term elimination of human astrocytoma xenografts in nude mice. *Oncol. Res.* 11(1), 33–39 (1999).
75. Berg K, Folini M, Prasmickaite L *et al.* Photochemical internalization: a new tool for drug delivery. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 8(6), 362–372 (2007).
76. Palermo MS, Exeni RA, Fernandez GC. Hemolytic uremic syndrome: pathogenesis and update of interventions. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 7(6), 697–707 (2009).
77. Johannes L, Decaudin D. Protein toxins: intracellular trafficking for targeted therapy. *Gene Ther.* 12(18), 1360–1368 (2005).
78. Noakes KL, Teisserenc HT, Lord JM, Dunbar PR, Cerundolo V, Roberts LM. Exploiting retrograde transport of Shiga-like toxin 1 for the delivery of exogenous antigens into the MHC class I presentation pathway. *FEBS Lett.* 453(1–2), 95–99 (1999).
79. Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD *et al.* Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417(6885), 141–147 (2002).
80. Anné J, Maldonado B, Van Impe J, Vanmellaert L, Bernaerts K. Recombinant protein production and streptomycetes. *J. Biotechnol.* 158(4), 159–167 (2011).
81. Laureti L, Song L, Huang S *et al.* Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108(15), 6258–6263 (2011).
82. Melchior WB Jr, Tolleson WH. A functional quantitative polymerase chain reaction assay for ricin, Shiga toxin, and related ribosome-inactivating proteins. *Anal. Biochem.* 396(2), 204–211 (2010).
83. Risberg K, Fodstad O, Andersson Y. Immunotoxins: a promising treatment modality for metastatic melanoma? *Ochsner. J.* 10(3), 193–199 (2010).
84. Oloomi M, Bouzari S, Shariati E. *In vivo* characterization of fusion protein comprising of A1 subunit of Shiga toxin and human GM-CSF: Assessment of its immunogenicity and toxicity. *Iran Biomed. J.* 14(4), 136–141 (2010).
85. Stepanov AV, Belogurov AA Jr, Ponomarenko NA *et al.* Design of targeted B cell killing agents. *PLoS One* 6(6), e20991 (2011).
86. Vago R, Marsden CJ, Lord JM *et al.* Saporin and ricin A chain follow different intracellular routes to enter the cytosol of intoxicated cells. *FEBS J.* 272(19), 4983–4995 (2005).
87. Delius M, Adams G. Shock wave permeabilization with ribosome inactivating proteins: a new approach to tumor therapy. *Cancer Res.* 59(20), 5227–5232 (1999).
88. 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.* 471(2–3), 169–172 (2000).

Websites

101. Wellcome Trust Sanger Institute. Family: RIP (PF00161). <http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF00161?acc=PF00161#tabview=tab7>
102. Geneious. www.geneious.com
103. RSCB Protein Data Bank. Shiga toxin. www.pdb.org/pdb/files/1dm0.pdb

B. INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Actividad N-Glicosidasa de las RIPs sobre la horquilla sarcina/ricina de la sub-unidad mayor de los ribosomas	16
2	Estructura terciaria de la ricina	18
3	Representación esquemática de los mecanismos de entrada de distintas proteínas citotóxicas en la célula diana.	19
4	Fragmentos Endo obtenidos después del tratamiento con anilina ácida del rARN de hígado de rata después de la acción de curcina, una RIP del tipo 1.	21
5	Diferencias estructurales de dos RIPs del tipo 2	25
6	Representación esquemática de la construcción de inmunotoxinas de RIPs	28
7	Detección por quimioluminiscencia de la inhibición de la traducción de luciferasa	32
8	Estructura terciaria de la ricina	36
9	Test de toxicidad de RIPsc sobre <i>Saccaromyces cerevisiae</i> .	36
10	Alineamiento de la secuencia de las estructuras estudiadas en este trabajo.	70
11	Residuos semiconservados, conservados e idénticos, obtenidos del alineamiento de la RIPsc y las secuencias de la Tabla 4.	71
12	Acoplamiento estructural de RIPsc y RIP de <i>P. dioica</i> realizado con el programa VMD	72
13	RMSD con respecto al tiempo de RIPsc de <i>S. coelicolor</i> y de la RIP de <i>P. dioica</i> obtenida por medio de dinámica molecular	73
14	Modelo estructural teórico del sitio activo de RIPsc y la RIP de <i>P. dioica</i> obtenido con el programa VMD.	74
15	Representación gráfica de la transcripción reversa de una hebra de ARN dañada por una RIP.	76
16	Proceso de amplificación de rARN dañado por una RIP.	77
17	Actividad rARN N-glicosidasa de RIPsc expresada en <i>E. coli</i> .	78
18	Metodología usada para realizar transcripción reversa del gen <i>rip</i> sc	80
19	Gel de agarosa 1% donde se observan las bandas correspondientes al gen <i>rip</i> sc, <i>rpoA</i> amplificados por RT-PCR.	82
20	Densitometría de la expresión de <i>rip</i> sc obtenida por RT-PCR	83

21	Representación esquemática de las funciones propuestas para los genes regulados por <i>bldA</i> .	84
22	Representación grafica de la metodología seguida para el estudio de la expresión de <i>ripsc</i> por Northern-blot	85
23	Estudio de la expresión de <i>ripsc</i> por Northern-blot en un cultivo semilla y en un cultivo de producción.	85
24	Metodología usada para realizar transcripción reversa en tiempo real del gen <i>ripsc</i>	86
25	Gráfica de expresión de <i>ripsc</i> evaluada por qRT-PCR combinada con la curva de crecimiento de <i>S. coelicolor</i>	88
26	Metodología utilizada para evaluar la traducción de RIPSC	89
27	Representación gráfica de la fusión de genes por medio de la técnica PCR recombinante	90
28	Gel de agarosa 1% de separación del fragmento <i>fusión</i>	92
29	A. Transformante pIJ486-Fusión de <i>S. coelicolor</i> M145. B. Gel de agarosa 1% en el que se amplifico el fragmento fusión a partir de la lisis de la colonia con DMSO	93
30	Metodología seguida para la obtención de <i>E. coli</i> BL21DE3plysS-[pET17b- <i>egfp</i>].	94
31	Fotografía obtenida en el microscopio de fluorescencia de las células de <i>E. coli</i> expresando de manera eficiente a la proteína verde fluorescente	95
32	Fotografía tomada vista en el microscopio de fluorescencia (100 X) de cultivos enfrentados de <i>S. coelicolor</i> y <i>Paecilomyces</i>	96
33	Estrategia general para la obtención de la proteína quimérica rip-péptido o péptido-rip	97
34	Fragmento fusión <i>péptido-ripsc</i> obtenido por medio de PCR.	99
35	Construcción pET17b- <i>peprrip</i> linearizada con <i>BamHI</i> .	99
36	Cinética de inducción de PEPRIP en <i>E. coli</i> BL21(DE3)plysS-[pET17b- <i>peprrip</i>].	100
37	Gel de poliacrilamida, SDS-PAGE al 12.5% para la separación de PEP-RIP.	101
38	Fragmento fusión <i>ripsc-péptido</i> obtenido por medio de PCR.	103

39	Cinética de inducción de RIP-PEP en <i>E. coli BL21(DE3)plysS-[pET17b-ripep]</i> .	104
40	Gel de poliacrilamida, SDS-PAGE al 12.5% para la separación de RIP-PEP,	105

B. INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Toxicidad de las RIPs según tipo	22
2	Proteínas utilizadas como acarreadores en producción de péptidos antimicrobianos	40
3	RIPs reportadas por PDB con similitud mayor al 14% con respecto a <i>S. coelicolor</i>	67
4	Estructuras cristalográficas usadas por i-Tasser para determinar el modelo de RIPsc	71
5	Energías libres obtenidas en este trabajo (kcal/mol) para la simulación de la actividad de RIPsc con dos sustratos distintos.	75
6	Oligos utilizados para la amplificación de <i>ripsc</i> por RT-PCR	80
7	Condiciones utilizados para la reacción de RT-PCR	81
8	Programa utilizado para la reacción de RT-PCR	81
9	Oligos utilizados para la amplificación de <i>rpoA</i> por RT-PCR	82
10	Oligos utilizados para la amplificación de <i>ripsc</i> por qRT-PCR	86
11	Condiciones utilizados para la reacción de qRT-PCR	87
12	Programa utilizado para la reacción de qRT-PCR	87
13	Oligos utilizados para fusionar <i>Pripsc</i> y <i>egfp</i> por PCR recombinante	91
14	Mezcla de reacción montada para la amplificación de la fusión <i>prip-egfp</i>	91
15	Programas realizados para la fusión de <i>pripsc-egfp</i>	91
16	Mezcla de ligación para clonación de <i>pripsc-egfp</i> en pIJ486	92
17	Oligos utilizados para amplificar <i>egfp</i>	95
18	Programa utilizado para la amplificación por PCR de <i>egfp</i>	95
19	Diseño de oligos para la amplificación de la fusión <i>péptido-ripsc</i> .	98
20	Programa de amplificación para la fusión <i>péptido-ripsc</i>	98
21	Diseño de oligos para la amplificación de la fusión <i>ripsc-péptido</i> .	102
22	Programa de amplificación para la fusión <i>ripsc-péptido</i>	102

