

### PRIMER EVIDENCIA DE UNA PROTEÍNA CON FUNCIÓN INACTIVADORA DE RIBOSOMAS EN UN ACTINOMICETO.

Ana G. Reyes, Nick Geukens, Philip Gutschoven, Javier Barrios, Jozef Anné y Armando Mejía.  
Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Av. San Rafael Atlixco 186. Col. Vicentina. 09340 México DF. AP 55-535. Tels. +52 (55) 5804-6453, Fax. +52 (55) 5804-4712. E-mail: ama@xanum.uam.mx

Palabras clave: *Streptomyces coelicolor*, Proteína Inactivadora de Ribosomas, Actinomicetos.

**Introducción.** Los actinomicetos son bacterias productoras de un amplio rango de metabolitos de interés industrial. *Streptomyces coelicolor* es la cepa mejor caracterizada genéticamente (1), sin embargo aún se desconoce la función de la mayoría de sus genes. Tal es el caso del gen *ripsc* (SCO7092) de *S. coelicolor* cuyo producto presenta similitud con las Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas (RIP) (2). Estas proteínas son N-glicosidasas, capaces de inhibir de manera específica la síntesis proteica, algunas veces causando la muerte celular. Las RIPs están clasificadas en dos, las del tipo 1, con actividad N-glicosidasa y las del tipo 2, con N-glicosidasa pero también con actividad de lectina, lo que les facilita su entrada a la célula. La citotoxicidad de las RIPs las hace atractivas biotecnológicamente debido a que pueden ser aplicadas de manera eficaz contra blancos específicos (ej. En agricultura contra patógenos, en medicina contra células tumorales y como antiviral, entre otros).

El objetivo fue demostrar que el gen *ripsc* codifica para una RIP activa, y evidenciar por primera vez la existencia de una proteína de éste tipo en un actinomiceto, lo que abre las posibilidades a la aplicación biotecnológica.

**Metodología:** Obtención del gen *ripsc* por PCR. Clonación del gen *ripsc* en pET3a. Sobre-expresión de RIPsc en *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Purificación de RIPsc (3). Transformación de *S. lividans* con pBSDK-*ripsc*. Sobre-expresión de RIPsc en *S. lividans*. Análisis de actividad de RIPsc *in vivo* e *in vitro*. Análisis *Westernblot*. Transformación de *S. cerevisiae* W303-1A con pESC-*ripsc*. Aislamiento de RNA de *S. coelicolor*. Amplificación del gen *ripsc* por medio de RT-PCR. Obtención del gen *ripsc* interrumpido con el transposon Tn5062 para la construcción de una mutante  $\Delta$ *ripsc*.

**Resultados y discusión.** La concentración de RIPsc obtenida por sobre-expresión en *S. lividans* no fue cuantificable. En *E. coli* resultó en cuerpos de inclusión por lo que para su purificación se emplearon técnicas de renaturalización, cromatografía de afinidad en una columna Ni<sup>2+</sup>-NTA y detección por *Westernblot* (Fig. 1). Para la actividad se realizó traducción *in vitro* de luciferasa, observándose una clara disminución de la traducción cuando RIPsc fue incluida en el sistema.

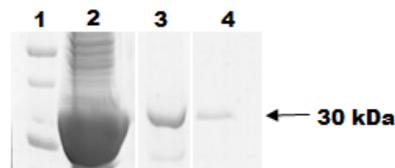


Fig. 1. SDS-PAGE (12.5%) Coomassie. Carril 2: Cuerpos de inclusión por sobreexpresión en *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Carril 3: Elución en columna Ni<sup>2+</sup>-NTA. Carril 4: RIPsc después de Quick gel filtration refolding.

La actividad *in vivo* de RIPsc pura sobre hongos y bacterias intactas, no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento. Por otro lado se clonó *ripsc* en el vector de expresión para *S. cerevisiae* pESC inducible por galactosa; cuando la expresión de RIPsc fue inducida se detecta la muerte de la levadura, lo que demuestra que dentro de la células RIPsc inhibe el crecimiento (Fig.2).



Fig. 2. Transformante de *S. cerevisiae* W303-1<sup>a</sup>. A. Sin inducción de la expresión del gen. B. Con inducción.

Por RT-PCR se encontró que el gen *ripsc* se expresa en condiciones de cultivo para la producción de actinorodina, no así en medios en los que no se produce el antibiótico. Por lo cual, considerando que la actinorodina es regulada por el gen *bldA*, se sugiere que la expresión de *ripsc* también está regulada por este gen, el cual requiere la presencia de un codón TTA al inicio de la secuencia, misma que se encuentra en el gen *ripsc*.

**Conclusiones.** Se demostró la presencia de una RIP de tipo I con actividad N-glicosidasa en *S. coelicolor*. La expresión del gen *ripsc* podría ser regulado por el gen *bldA*.

**Agradecimiento.** CONACyT 202351, Unión Europea (II-0313-FA-FCD)

#### Bibliografía.

- Bentley S, Chater K, Cerdeño-Tárraga A et al. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417: 141-147.
- Stirpe F. (2004) Ribosome-inactivating proteins. *Toxicol.* 44: 371-383.
- Park S, Prithviraj B, Vepachedu R y Vivanco J. (2006) Isolation and purification of ribosome-inactivating proteins. *Methods Mol. Biol.* 318:335-347.