



---

**Universidad de Valladolid**

Facultad de Ciencias

## TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

“Producción biotecnológica en *Escherichia coli* de la toxina  
PD-L4 de la planta *Phytolacca dioica*”

**Autor:**

Javier Rodríguez Ruiz

**Tutor/es:**

Antimo Di Maro –Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli", Caserta, Italia

Rosario Iglesias Álvarez – Facultad de Ciencias. Universidad de Valladolid



## **AGRADECIMIENTOS**

*Quisiera expresar mi gratitud a mi tutora María del Rosario Iglesias Álvarez por su inestimable ayuda, sus consejos y preocupación en la realización de este trabajo quien ha sido un ejemplo para mí y de la cual he aprendido enormemente.*

*También quiero agradecer a Antimo Di Maro, Antonella Di Giuseppe, y Sara Ragucci, así como a todo el Departamento de Biología de la Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli" (Caserta) por su acogida y participación en este trabajo durante mi estancia.*

*Sin olvidar a mi familia y amigos por su comprensión, apoyo y cariño durante todos estos años de estudio.*



# Índice

<b>1. Introducción.</b>	<b><i>Página</i></b>	<b><i>12</i></b>
1.1. <i>Las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs).</i>	<i>Página</i>	<i>12</i>
1.2. <i>Clasificación de las RIPs.</i>	<i>Página</i>	<i>14</i>
1.3. <i>Distribución de las RIPs en las plantas.</i>	<i>Página</i>	<i>16</i>
1.4. <i>Actividad enzimática de las RIPs.</i>	<i>Página</i>	<i>17</i>
1.5. <i>RIPs de la <i>Phytolacca dioica</i>.</i>	<i>Página</i>	<i>19</i>
1.6. <i>Aplicaciones terapéuticas de RIPs: Inmunotoxinas.</i>	<i>Página</i>	<i>24</i>
1.7. <i>Expresión de proteínas recombinantes en bacterias.</i>	<i>Página</i>	<i>24</i>
1.7.1. <i>Expresión de RIPs en <i>E. Coli</i>.</i>	<i>Página</i>	<i>28</i>
<b>2. Objetivos y plan de trabajo.</b>	<b><i>Página</i></b>	<b><i>30</i></b>
2.1. <i>Objetivos.</i>	<i>Página</i>	<i>30</i>
2.2. <i>Justificación.</i>	<i>Página</i>	<i>31</i>
2.3. <i>Plan de trabajo.</i>	<i>Página</i>	<i>32</i>
<b>3. Materiales y métodos.</b>	<b><i>Página</i></b>	<b><i>34</i></b>
<b>3.1. <i>Materiales.</i></b>	<b><i>Página</i></b>	<b><i>34</i></b>
3.1.1. <i>Equipamiento.</i>	<i>Página</i>	<i>34</i>
3.1.2. <i>Reactivos químicos.</i>	<i>Página</i>	<i>35</i>
3.1.3. <i>Reactivos biológicos.</i>	<i>Página</i>	<i>37</i>
3.1.3.1. <i>Cepas bacterianas y plásmidos.</i>	<i>Página</i>	<i>37</i>
3.1.3.2. <i>Enzimas.</i>	<i>Página</i>	<i>38</i>
3.1.3.3. <i>Proteínas.</i>	<i>Página</i>	<i>38</i>
3.1.3.4. <i>Kits de purificación de ácidos nucleicos                     y sistemas de traducción</i>	<i>Página</i>	<i>38</i>
3.1.4. <i>Otros materiales.</i>	<i>Página</i>	<i>38</i>
<b>3.2. <i>Métodos.</i></b>	<b><i>Página</i></b>	<b><i>39</i></b>
3.2.1. <i>Esterilización de las disoluciones y del material                 de laboratorio.</i>	<i>Página</i>	<i>39</i>
3.2.2. <i>Obtención del vector de expresión recombinante                 <i>pET-22b (+) / PD-L4</i>.</i>	<i>Página</i>	<i>39</i>

3.2.3.	<i>Medio de cultivo.</i>	Página	40
3.2.4.	<i>Cultivo de bacterias e inducción de la expresión.</i>	Página	41
3.2.5.	<i>Obtención de los cuerpos de inclusión.</i>	Página	41
3.2.5.1.	<i>Lisis bacteriana.</i>	Página	42
3.2.5.2.	<i>Aislamiento y lavado de los cuerpos de inclusión.</i>	Página	42
3.2.5.3.	<i>Resuspensión de los cuerpos de inclusión.</i>	Página	43
3.2.5.4.	<i>Solubilización y plegamiento de la proteína (refolding).</i>	Página	43
3.2.6.	<i>Purificación de la proteína mediante cromatografía de intercambio catiónico (FPLC-AKTA).</i>	Página	44
3.2.7.	<i>Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).</i>	Página	45
3.2.8.	<i>Ensayo de síntesis de proteínas mediante un Sistema de transcripción – traducción in vitro.</i>	Página	46
3.2.9.	<i>Actividad N-Glicosilasa de PD-L4 recombinante en ribosomas de reticulocitos de conejo.</i>	Página	50
3.2.10.	<i>Electroforesis de RNA en geles de poliacrilamida 5% Urea 7M.</i>	Página	51
3.2.11.	<i>Actividad polinucleótido: adenina glicosilasa de PD-L4 sobre el DNA.</i>	Página	52
3.2.12.	<i>Purificación del plásmido pCR2.1.</i>	Página	53
3.2.13.	<i>Determinación de la concentración de las proteínas y de los ácidos nucleicos mediante espectrofotometría uv-visible.</i>	Página	54
3.2.13.1.	<i>Concentración de las proteínas.</i>	Página	54
3.2.13.2.	<i>Concentración de los ácidos nucleicos.</i>	Página	55
3.2.14.	<i>Ensayo de la actividad desoxirribonucleasa de PD-L4 recombinante sobre el plásmido pCR2.1.</i>	Página	56
3.2.15.	<i>Electroforesis de DNA en geles de agarosa.</i>	Página	56

<b>4. Resultados.</b>	<b>Página</b>	<b>60</b>
4.1. <i>Expresión heteróloga de la proteína recombinante PD-L4.</i>	Página	60
4.2. <i>Aislamiento y solubilización de cuerpos de inclusión de E. coli.</i>	Página	62
4.3. <i>Plegamiento de la proteína (“Refolding”).</i>	Página	64
4.4. <i>Purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de intercambio catiónico-FPLC.</i>	Página	65
4.5. <i>Determinación de la actividad inhibidora de la PD-L4 recombinante en la síntesis de proteínas dirigida por un mensajero exógeno.</i>	Página	67
4.6. <i>Actividad N-glicosilasa de PD-L4 sobre los ribosomas de lisados de reticulocitos de conejo.</i>	Página	69
4.7. <i>Actividad polinucleótido: adenina glicosilasa de PD-L4 recombinante sobre DNA genómico eucariótico.</i>	Página	70
4.8. <i>Actividad desoxirribonucleasa (DNasa) de PD-L4 recombinante sobre el plásmido pCR2.1.</i>	Página	71
<b>5. Conclusiones.</b>	<b>Página</b>	<b>76</b>
<b>6. Bibliografía.</b>	<b>Página</b>	<b>78</b>
<b>7. Listados de tablas y figuras.</b>	<b>Página</b>	<b>84</b>
7.1. <i>Tablas.</i>	Página	84
7.2. <i>Figuras.</i>	Página	84
<b>8. Lista de Abreviaturas.</b>	<b>Página</b>	<b>88</b>
<b>9. Anexos.</b>	<b>Página</b>	<b>90</b>
9.1. <i>Anexo I: RIPs de tipo I que hasta la actualidad han sido aisladas y caracterizadas de plantas de la familia Phytolaccaceae.</i>	Página	90
9.2. <i>Anexo II: Lista de inmunotoxinas que se encuentra en fase clínica en el tratamiento del cáncer.</i>	Página	92
9.3. <i>Anexo III: Mapa genético del plásmido pCR2.1.</i>	Página	96





## **Abstract**

Ribosome-inactivating proteins (RIPs) are toxins that are widely distributed in plants, bacteria and fungi that irreversibly inactivate ribosomes, thereby impairing protein synthesis. RIPs exert their toxic effects through binding to the large 60S ribosomal subunit on which they act as N-glycosylase (EC3.2.32.22) by specifically cleaving the adenine base (A4324) in the 28S ribosomal RNA and irreversibly blocking protein translation, leading finally to cell death.

It has been found that leaves of *Phytolacca dioica* L. have two genes encoding the primary sequence of two type 1 ribosome inactivating proteins. During the biosynthetic process, each polypeptide chain undergoes different post-translational modifications giving rise to four proteins, two from each gene sequence, PD-L1 and PD-L2, and PD-L3 and PD-L4, each pair of polypeptides shares the same primary structure.

With the aim of exploiting the cytotoxic properties of these proteins as potential biological drugs in cancer therapy, the gene encoding PD-L4 was expressed in *Escherichia coli*, using the T7 promoter system. The protein produced was insoluble and accumulated in inclusion bodies. Ribosome-inactivating activity was generated by controlled oxidation of the reduced and denatured protein. The recombinant protein was indistinguishable from natural PD-L4 isolated from leaves of *Phytolacca dioica*, in both catalytic activity and primary structure; therefore, recombinant PD-L4 can be used for the production of active immunotoxins.

## **Resumen**

Las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) son toxinas ampliamente distribuidas en las plantas, bacterias y hongos capaces de inactivar irreversiblemente los ribosomas y detener la síntesis de proteínas.

Las RIPs ejercen su efecto tóxico mediante su unión a la subunidad ribosómica 60S, donde actúan con actividad N-glicosilasa (EC.3.2.32.22), provocando la liberación específica de una adenina (A4324) del RNA ribosómico 28S, bloqueando de forma irreversible la traducción de proteínas, lo que finalmente conduce a la muerte celular.

En las hojas de la planta *Phytolacca dioica* L. se han encontrado dos genes que codifican para la secuencia primaria de dos RIPs de tipo 1. Durante el proceso biosintético cada cadena polipeptídica sufre diferentes modificaciones post-traduccionales que dan lugar a cuatro proteínas distintas, dos de cada secuencia génica, denominadas PD-L1 y PD-L2, y PD-L3 y PD-L4, cada par de polipéptidos comparte la misma estructura primaria.

Con el fin de utilizar estas proteínas con propiedades citotóxicas como posibles fármacos biológicos en la terapia del cáncer, el gen que codifica PD-L4 se expresó en la bacteria *Escherichia coli* utilizando el promotor de la RNA polimerasa T7. La proteína producida por la bacteria de este modo, se acumuló en los cuerpos de inclusión formando agregados insolubles. La actividad inactivadora de ribosomas del producto recombinante se regeneró mediante oxidación controlada de la proteína reducida y desnaturalizada durante el proceso de solubilización de los cuerpos de inclusión. La proteína recombinante obtenida en *E. coli* mediante este procedimiento, era indistinguible de la PD-L4 nativa aislada de las hojas de *Phytolacca dioica*, tanto en la actividad catalítica como en la estructura primaria y por lo tanto puede ser utilizada para la producción de inmunotoxinas activas.

---

## ***Introducción***

---

# **1. Introducción**

## **1.1. Las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs)**

Las proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs, acrónimo en inglés “ribosome inactivating proteins”) son un grupo de proteínas mayoritariamente de origen vegetal, que se han encontrado en las plantas angiospermas, tanto mono como dicotiledóneas [1].

Sin embargo, este tipo de proteínas no son exclusivas del reino vegetal y se han aislado varias RIPs de la bacteria *Escherichia coli* [2] e incluso se han detectado genes que codifican RIPs en algas [3] y hongos [4].

La elevada toxicidad de las RIPs se debe a que actúan inhibiendo irreversiblemente la síntesis de proteínas, lo que provoca la muerte de las células. Estas proteínas tienen una actividad enzimática N-glicosilasa (EC.2.3.32.22) y catalizan la hidrólisis del enlace N-glicosídico entre la ribosa y una adenina específica del RNA ribosómico 28S de eucariotas [5] y con menor frecuencia el 23S de procariotas, siendo muy pocas las RIPs que tienen actividad en las bacterias [6].

Los principales hitos históricos en la investigación sobre las RIPs se muestran en la figura 1.1.1 [7]; los primeros estudios se remontan al siglo XIX debido al interés de la comunidad científica en los compuestos tóxicos presentes en algunas plantas medicinales, en particular en las semillas de *Ricinus communis L.* y *Abrus precatorius L.*, cuya toxicidad se conocía desde la antigüedad. Las primeras RIPs conocidas fueron la abrina y la ricina, purificadas por Stilmark en 1888, que atribuyó su toxicidad a su capacidad para aglutinar eritrocitos; muchos años después se descubriría que su toxicidad se debía a su actividad sobre el ribosoma.

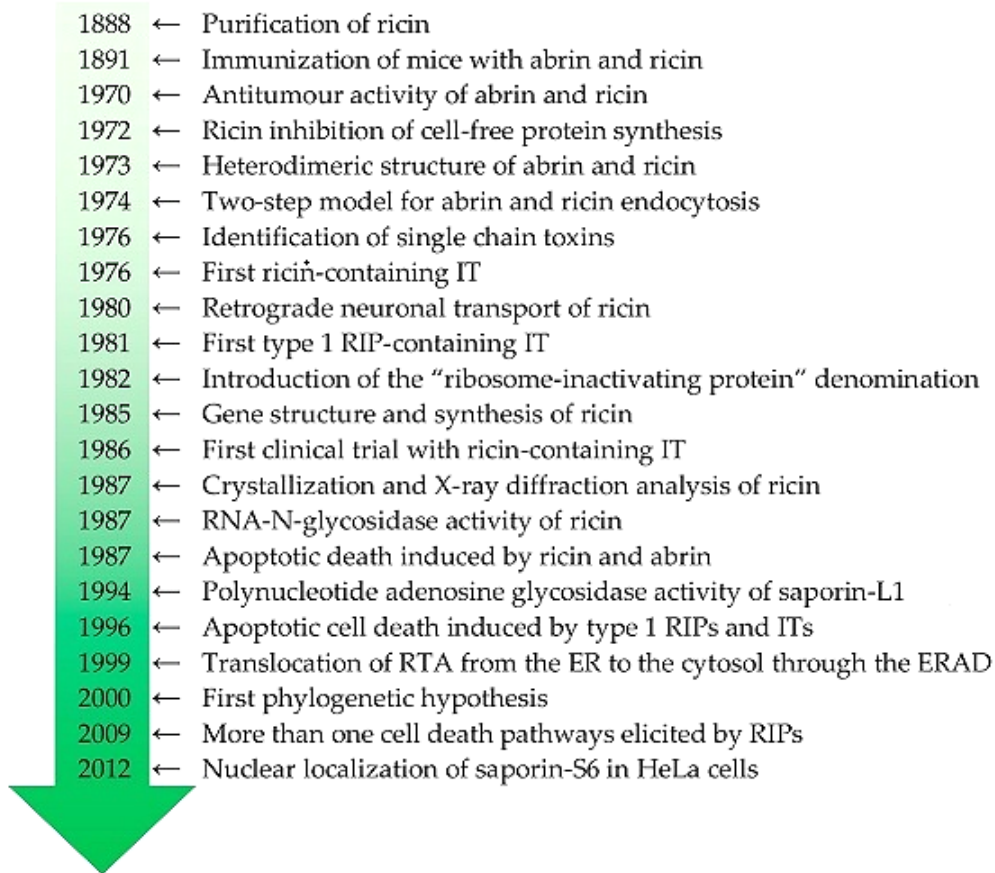
Las investigaciones en el campo de las RIPs se impulsaron enormemente a partir de 1970 con el descubrimiento de la actividad enzimática de la ricina sobre los ribosomas eucariotas, en concreto, su interacción con la subunidad 60S. En base a este descubrimiento, Stirpe introdujo por primera vez el término RIP para definir un grupo de proteínas de origen vegetal que inhibían la síntesis de proteínas en sistemas eucarióticos animales inactivando los ribosomas [8]. En 1987 se produjo un descubrimiento muy importante en este campo, el grupo de Endo determinó que la ricina provocaba la inhibición de la síntesis de proteínas mediante una actividad N-glicosilasa sobre el RNA ribosómico 28S y que era capaz de liberar un residuo de adenina de una secuencia altamente conservada, localizada en un bucle que está implicado en

la unión del factor eEF2, que interviene en la síntesis de proteínas en la etapa de elongación [9].

En los últimos años se han descubierto un gran número de RIPs y se han llevado a cabo gran cantidad de estudios para determinar la estructura y las propiedades de estas proteínas y se han clonado los genes que codifican las RIPs de muchas plantas y algunas bacterias. El conocimiento de las secuencias génicas de un número grande de RIPs ha permitido realizar el análisis filogenético de su historia evolutiva. Los estudios filogenéticos sugieren que los genes que codifican para las RIPs de bacterias, arqueas y eucariotas proceden de un ancestro común y que varios genes de RIPs habrían comenzado a evolucionar antes de la divergencia de los tres reinos de la vida [10].

Otro aspecto que ha suscitado mucho interés en los últimos años y que se ha investigado extensamente es la toxicidad de las RIPs en las células tumorales. Tanto las RIPs de tipo 1 como las RIPs de tipo 2, además de inhibir la síntesis de proteínas mediante su actividad N-glicosilasa, son capaces de inducir la muerte celular por apoptosis [11]. En este campo se están realizando numerosos estudios encaminados a esclarecer los mecanismos que determinan la muerte celular programada de las células tumorales tratadas con RIPs [12].

El interés actual en estas proteínas se centra fundamentalmente en sus aplicaciones, en el campo de la medicina, como parte de conjugados para la terapia del cáncer y en el campo de la agricultura, en la producción de plantas transgénicas aprovechando las propiedades antivirales de algunas RIPs [12]- [13].



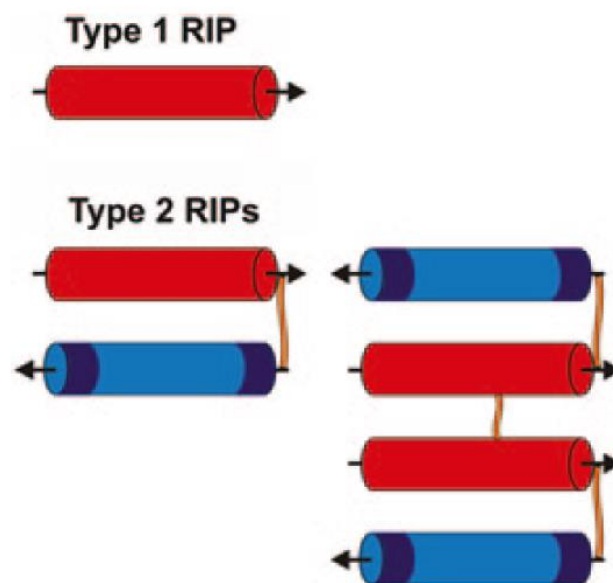
*Figura 1.1.1 Línea de tiempo de los hitos en la investigación de RIPs [7].*

## **1.2. La clasificación de las RIPs**

La clasificación más aceptada es la establecida por Stirpe y Barbieri, que han clasificado las RIPs en base a la estructura en dos grupos: RIPs de tipo 1 y RIPs de tipo 2 [1]- [12] [14].

Las RIPs de tipo 1 son proteínas monoméricas de aproximadamente 30 kDa, que tienen puntos isoeléctricos básicos y que tienen actividad enzimática sobre el RNA ribosómico 28S. Las RIPs de tipo 2 son proteínas constituidas por dos cadenas polipeptídicas; una cadena A, con actividad N-glicosilasa (semejante a las RIPs de tipo 1), unida por un enlace disulfuro a una cadena B, que es una lectina que puede unirse a residuos de azúcar, normalmente galactosa, localizados en los receptores de la membrana plasmática de las células animales (Figura 1.2.1.). La RIP unida al receptor puede entrar en el citosol e inactivar los ribosomas provocando la muerte de la célula. Algunas de estas toxinas son consideradas armas biológicas como ocurre con la ricina [15].

A este grupo pertenecen también varias proteínas no tóxicas, que comparten las mismas características estructurales y la misma actividad N-glicosilasa en el RNA ribosómico que la ricina, pero que tienen baja toxicidad en las células. Esta diferencia de toxicidad, es debido a la cadena B lectina, que se une a distintos receptores de las membranas celulares, afectando a la entrada en el interior de la célula [12]. Las RIPs de tipo 2 no tóxicas se han encontrado en muy pocas especies de plantas. Dentro de este grupo de RIPs de tipo 2 se incluyen también las RIPs tetraméricas, formadas por la unión de dos heterodímeros mediante un enlace disulfuro entre las cadenas B. Estas RIPs son muy poco frecuentes, se han encontrado en el género *Sambucus* y la cadena B es una lectina que se une a residuos de ácido siálico [12]- [16].



*Figura 1.2.1 Clasificación de las RIPs (figura modificada de Citores et al., 2013 [12]).*

Aunque, esta es la clasificación más aceptada, algunos autores establecen un tercer grupo, designado como RIPs de tipo 3, debido a que se han encontrado dos RIPs que no presentan la estructura convencional de las RIPs anteriormente descritas. Las RIPs de tipo 3 se han encontrado en el maíz y en la cebada, se sintetizan como un precursor “pro-RIP” que se escinde proteolíticamente para dar lugar a una RIP activa que contiene una cadena A con actividad enzimática, y un pequeño péptido unido a la cadena A cuya función se desconoce [17].

### **1.3. La distribución de las RIPs en las plantas**

Las RIPs de tipo 1 son las más abundantes en las plantas, se distribuyen entre todas las familias de plantas con flores sin un patrón que permita su ubicación en un taxón en particular y hasta la fecha se han aislado RIPs de 70 especies de plantas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. Sin embargo, el mayor número de RIPs está presente en un pequeño número de familias: *Caryophyllaceae*, *Cucurbitaceae*, *Euphorbiaceae*, *Phytolacaceae*, y *Poaceae* [1]-[18].

Las RIPs de tipo 2 son menos frecuentes y se han aislado de 20 especies de plantas pertenecientes a 9 familias diferentes. Dentro de este grupo, se han encontrado apenas una decena de RIPs de tipo 2 con altísima toxicidad en las células y en los animales (ej. Ricina, abrina, volkensina), que son letales a concentraciones extraordinariamente bajas (dosis letal en ratones 1-2 µg/Kg) [1]- [18].

Además, al menos en cinco especies de plantas (*Sambucus ebulus*, *Sambucus nigra*, *Cinnamomum camphora*, *Momordica charantia* e *Iris hollandica*) se han encontrado RIPs de tipo 1 y tipo 2.

Las RIPs también están presentes en las bacterias, hongos y algas, pero la presencia de estas proteínas parece estar limitada a unas pocas especies.

La mayoría de las RIPs de plantas se sintetizan a partir de genes sin intrones, que codifican precursores inactivos. Los precursores de las RIPs de tipo 1 contienen extensiones N-terminales y C-terminales y los de las RIPs de tipo 2 tienen además, un péptido interno de conexión entre las secuencias de las cadenas A y B, que se elimina para dar lugar a la proteína activa. Se sintetizan en el retículo endoplasmático y luego siguen la vía secretora hasta su destino final para ser liberadas al fluido apoplástico (espacio intercelular) o bien dirigidas a las vacuolas, acumulándose en estos compartimentos que las mantienen alejadas de los ribosomas de la planta [13]- [19].

La cantidad de RIP producida por las plantas varía en función del tipo de tejido, del desarrollo de la planta e incluso de factores ambientales. Algunas especies contienen RIPs en un solo tejido de la planta y otras contienen RIPs en varias partes de la planta (raíces, hojas, frutos y semillas), e incluso en algunos casos, en un mismo tejido se han encontrado distintas RIPs, como ocurre en las especies *Sambucus nigra* y *Sambucus ebulus* [20].



Todos estos hallazgos favorecen la hipótesis de que las RIPs están ampliamente distribuidas y por lo tanto podrían desempeñar un papel biológico importante en el organismo productor.

Los datos experimentales sugieren que no hay una función generalizable a todas ellas y se han propuesto diversas funciones [14]. Numerosos estudios indican que varias RIPs de tipo 1 se sobreexpresan en plantas infectadas con distintos patógenos, o en plantas sometidas a condiciones ambientales adversas, motivo por el cual, se ha propuesto que estas proteínas forman parte de la respuesta defensiva de la planta frente a depredadores, hongos o virus [21]- [22]- [23].

### 1.4. La actividad enzimática de las RIPs

Las RIPs tienen una actividad enzimática N-glicosilasa que cataliza la hidrólisis de un enlace N-glicosídico específico, provocando la eliminación de una adenina (A3424) de una secuencia altamente conservada (GAGA) en todos los organismos estudiados. Esta secuencia se localiza en una estructura en forma de bucle (bucle  $\alpha$ -sarcina/ricina - SRL) en el extremo 3' del rRNA 28S de las células animales (Figura 1.4.1) [5]- [9].

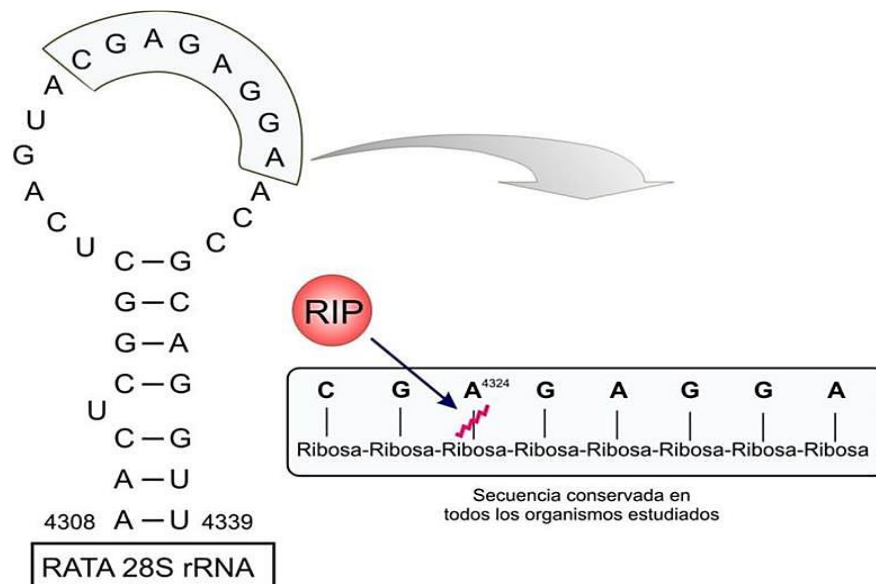


Figura 1.4.1 Secuencia conservada del rRNA 28S que es depurinada por la RIP en la A4324 (figura modificada de Stirpe and Battelli, 2006 [5]).

Este bucle del rRNA 28S sobre el que actúan las RIPs, interviene en la interacción del ribosoma con el factor proteico de elongación eEF2 (EFG en procariotas), de modo que la eliminación de la adenina impide la unión del factor al ribosoma, deteniendo la síntesis de proteínas en la etapa de elongación y provocando la muerte celular (Figura 1.4.2) [24].

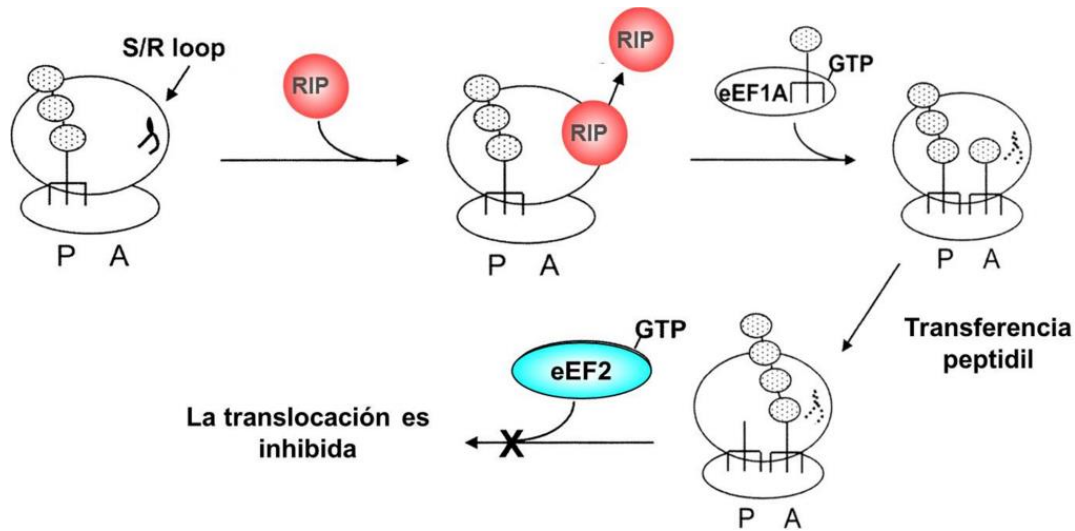


Figura 1.4.2 Inhibición de la síntesis de proteínas por las RIPs en la etapa de elongación (figura modificada de Monsouri et al., 2006 [24]).

Los aminoácidos del centro activo que intervienen en la fijación del sustrato y en la catálisis están conservados en todas las RIPs, tanto de tipo 1 como de tipo 2 y todas depurinan los ribosomas animales (rRNA 28S); sin embargo, muestran diferencias en la actividad en otros ribosomas. La mayoría de las RIPs pueden depurinar ribosomas de las levaduras (rRNA 25S), pero muy pocas actúan en los ribosomas de las plantas (sRNA 26S) y las bacterias (rRNA 23S) [17] (Figura 1.4.3).

Dado que la secuencia en la que actúan las RIPs, localizada en el bucle ( $\alpha$ -sarcina/ricina), contiene 14 nucleótidos altamente conservados desde las bacterias hasta los seres humanos, las diferencias de actividad, sólo pueden explicarse en base a las interacciones que establecen las distintas RIPs con las proteínas ribosómicas, lo que condiciona el acceso al bucle del rRNA y la fijación de la adenina al centro catalítico de la RIP [25].

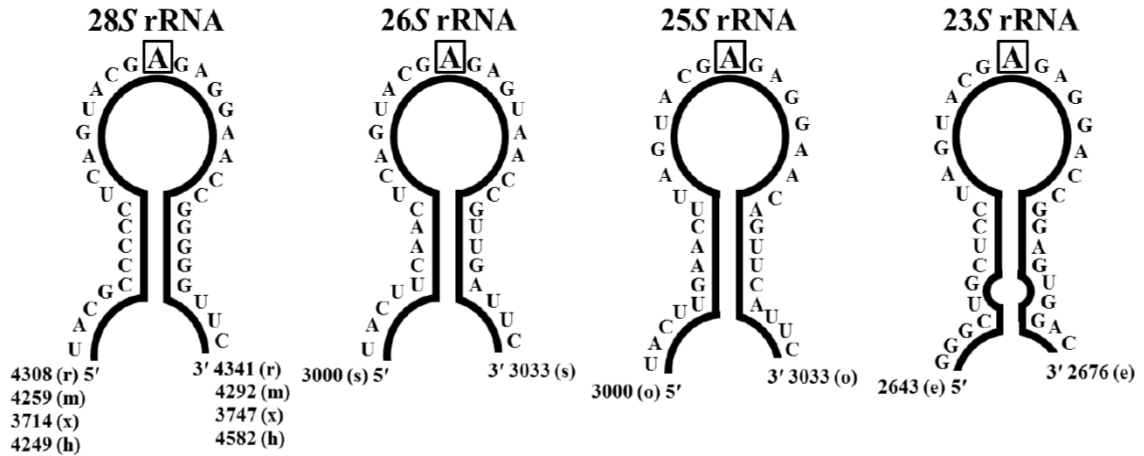


Figura 1.4.3 Estructura del rRNA sustrato para la actividad N-glicosilasa de las RIPs: (e) *E. coli*; (h) *Homo sapiens*; (m) *Mus musculus*; (o) *Oryza sativa*; (r) *Rattus rattus*; (s) *Saccharomyces cerevisiae* [17].

Además de esta actividad específica sobre el RNA ribosómico, se ha visto que muchas RIPs también tienen actividad depurinante sobre otros sustratos, tales como el DNA genómico de esperma de salmón, polinucleótidos sintéticos (poly A) o el RNA del virus mosaico del tabaco (TMV) [6]- [26]- [27]. En estos casos, se ha observado que pueden eliminar gran número de adeninas, por lo que se ha propuesto designar a estas proteínas como “polinucleótido: adenina glicosilasas” [26]. Además, en algunas RIPs se han encontrado otras actividades, como lipasa, superóxido dismutasa y desoxirribonucleasa [6].

## 1.5. Las RIPs de *Phytolacca dioica*

La familia de plantas *Phytolaccaceae* incluye 35 especies de plantas perennes, generalmente leñosas que son originarias del continente americano. El aparato vegetativo está constituido por hojas alternas ovalado-lanceoladas de color verde brillante. Las flores son pequeñas, generalmente blancas y están agrupadas en racimos largos colgados (pueden alcanzar hasta 15 cm). El fruto de estas plantas está formado por bayas de color morado casi negro. A esta familia pertenece el género *Phytolacca* cuyo nombre deriva del griego Phyton = planta y de la raíz árabe Lakk = laca, que se refiere al jugo purpura extraído de las bayas. La especie más conocida y utilizada por los fenicios para teñir telas y colorear el vino es *Phytolacca americana* L. Las propiedades antivirales de los extractos de esta planta se conocen desde

finales del siglo XIX, sin embargo, ha sido más recientemente cuando esta actividad antiviral se ha asociado con la presencia de una RIP de tipo 1, conocida como PAP, que se expresa abundantemente en todos los tejidos de esta especie. Al género *Phytolacca* pertenece la especie *Phytolacca dioica* L., un árbol característico de la Pampa Argentina, cuyo nombre común es Ombú y que actualmente también se puede encontrar en Europa, a partir del cual se han aislado varias RIPs de tipo 1 que se expresan en distintos tejidos de la planta [28]- [29].

Se han aislado y caracterizado ocho RIPs de tipo 1 de *Phytolacca dioica* L:

- PD-S1 y PD-S2, dos RIPs que se han purificado de las semillas.
- Cuatro isoformas presentes en las hojas de la planta madura denominadas: PD-L1, PD-L2, PD-L3 y PD-L4.
- Dos RIPs extraídas de los brotes de las plantas de menos de 1 año denominadas: diocina 1 y diocina 2.

En cuanto a las cuatro RIPs aisladas de las hojas de la planta madura (PD-L1, PD-L2, PD-L3 y PD-L4), tienen un peso molecular de entre 28-32 kDa, un punto isoeléctrico mayor de 8,5 y presentan distintos grados de glicosilación, con la excepción de la PD-L4 que no contiene azúcares [30]. En particular, la PD-L1 contiene tres cadenas de carbohidratos con una estructura conocida [Man2, GlcNAc2, Fuc1, XYL1] enlazados a Asn10, a Asn43 y a Asn255, la PD-L2 esta glicosilada en Asn10 y Asn43, y la PD-L3, sólo está glicosilada en Asn10.

Su expresión en la planta muestra una variabilidad estacional:

- PD-L1, es abundante en el invierno (80% del total de RIP), permaneciendo casi constante durante la primavera y el verano (25% del total de RIP).
- PD-L2, se mantiene constante durante todo el año.
- PD-L3 y PD-L4, son abundantes en primavera y verano (25% y 40% del total de RIP) y disminuyen en el otoño para desaparecer casi por completo durante el invierno [31].

La actividad enzimática de las RIPs de *Phytolacca dioica* ha sido investigada extensamente por el grupo del Dr. A. Parente [29]. Todas estas proteínas tienen una actividad N-glicosilasa muy alta sobre el rRNA ribosómico 28S e inhiben la síntesis de proteínas en lisados de reticulocitos de conejo a concentraciones extraordinariamente bajas, con valores de IC<sub>50</sub> (concentración que inhibe la síntesis de proteínas un 50%) entre 0,5 y 1 ng/ml. Además, pueden depurinar el rRNA 23S de procariontes, inactivando los ribosomas bacterianos que no

son sensibles a la mayoría de las RIPs. Estas proteínas también pueden actuar sobre sustratos no ribosómicos, tales como DNA y RNA genómicos y se ha visto que tienen actividad polinucleótido: adenina glicosilasa en el DNA genómico de espermatozoos de salmón y en el RNA del virus del Mosaico del tabaco (TMV), donde liberan múltiples adeninas [29].

Las RIPs aisladas de las hojas de *Phytolacca dioica* han sido cristalizadas en ausencia y presencia de ligando (Adenina) y se ha determinado su estructura mediante difracción de rayos X [32] (Figura 1.5.1).

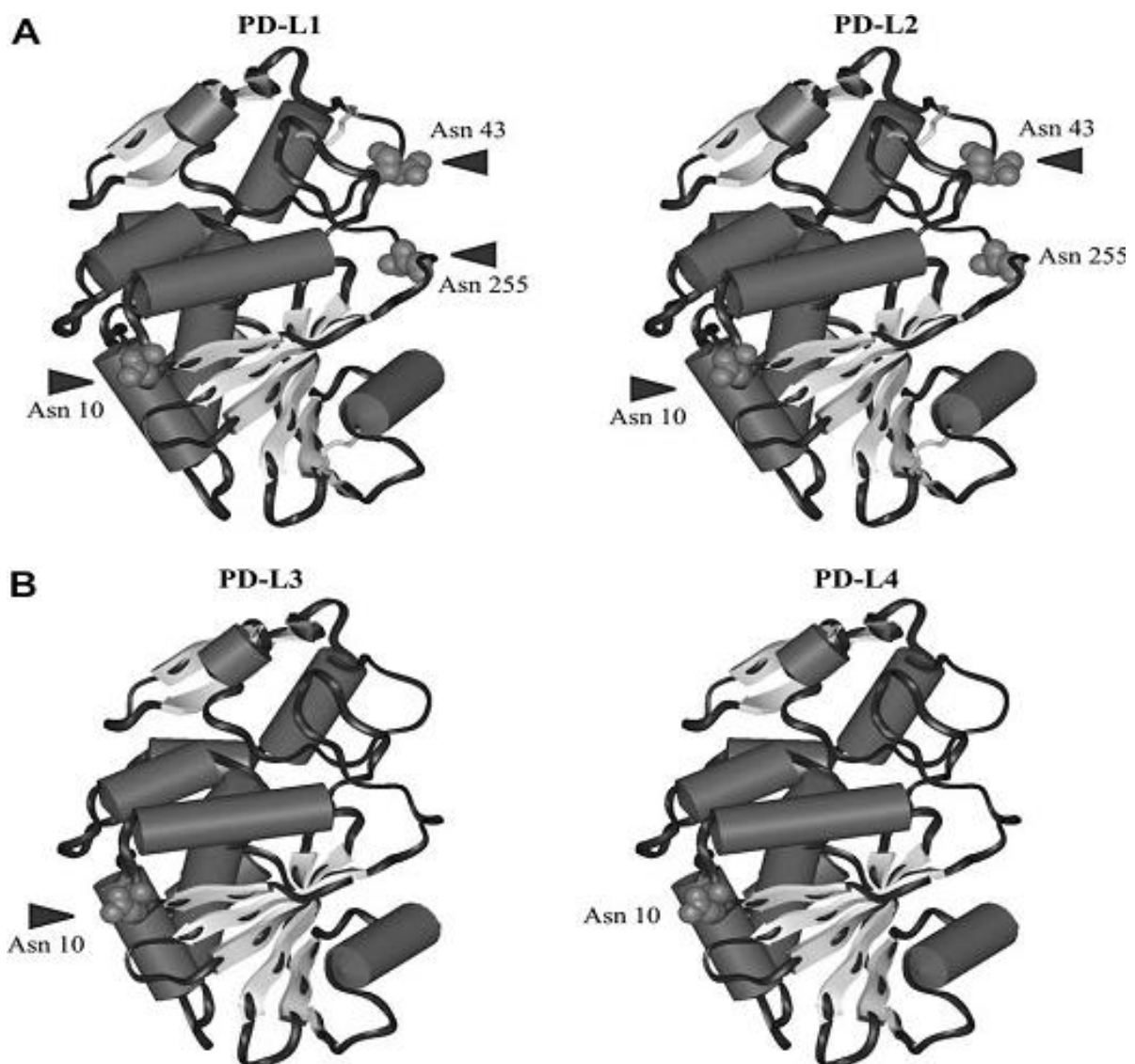


Figura 1.5.1 Representación de la estructura de PD-L1, PD-L2, PD-L3 y PD-L4. Las flechas indican la cadena de carbohidratos [Man<sub>2</sub>, GlcNAc<sub>2</sub>, Fuc<sub>1</sub>, XYL<sub>1</sub>] [30].

Hasta la actualidad, se han aislado y caracterizado 21 RIPs de tipo 1 de distintas especies de plantas de la familia *Phytolaccaceae* (Anexo 8.1); la mayoría de los genes que codifican para estas RIPs han sido clonados y se conocen sus secuencias. El análisis de las secuencias de aminoácidos disponibles en el “Protein data bank”, muestra porcentajes de identidad del 35%, lo que sugiere una elevada conservatividad a nivel estructural y funcional.

A partir de estos datos se ha podido establecer una secuencia consenso de 280 aminoácidos. La comparación de las secuencias revela que los aminoácidos del sitio catalítico están completamente conservados (numerados según secuencia consenso): Glu 168, Arg 192, Trp 223, así como los aminoácidos del sitio de unión Tyr 78 y Tyr 132 (Figura 1.5.2). Además, hay cuatro residuos de cisteína (Cys 36, Cys 91, Cys 113 y Cys 177) implicados en la formación de dos enlaces disulfuro intramoleculares [29].

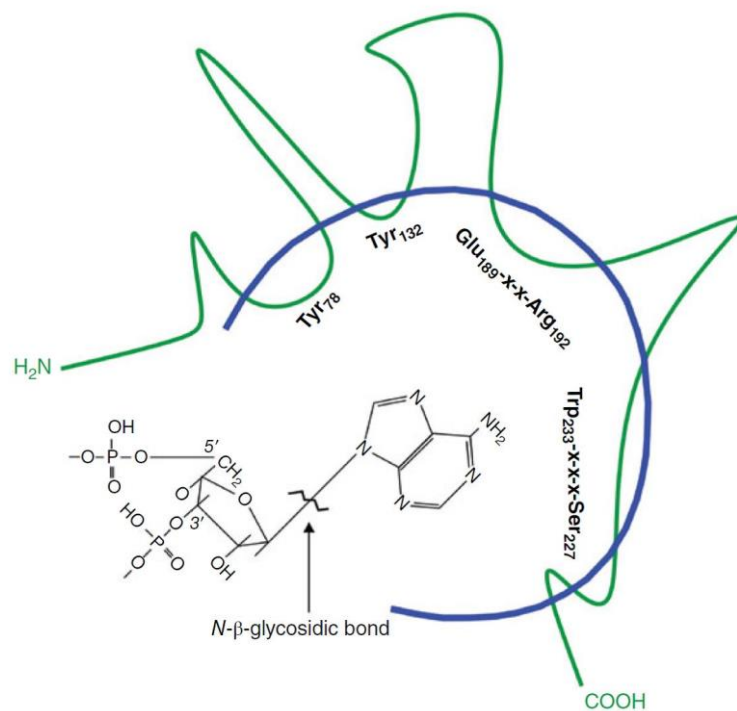


Figura 1.5.2 Representación del sitio activo de las RIPs de la familia *Phytolaccaceae*. Aminoácidos conservados del sitio activo (numeración según la secuencia consenso) [29].

El análisis estructural de las RIPs de la familia *Phytolaccaceae* indica que tiene una estructura similar a la descrita para otras RIPs de tipo 1 que han sido cristalizadas, como tricosantina o saporina o la cadena A de la ricina, que es una RIP de tipo 2.

En la figura 1.5.3 se puede observar que:

- a) Las estructuras 3D se superponen y que los aminoácidos del centro activo, altamente conservados, tienen la misma posición espacial.
- b) En la estructura de la PAP-I (una RIP representativa de esta familia que ha sido cristalizada) hay dos dominios distintos que se denominan “RIP fold”. El dominio N-terminal consiste en hebras  $\beta$  y hélices  $\alpha$ , mientras que el C-terminal contiene predominantemente hélices  $\alpha$  [29].

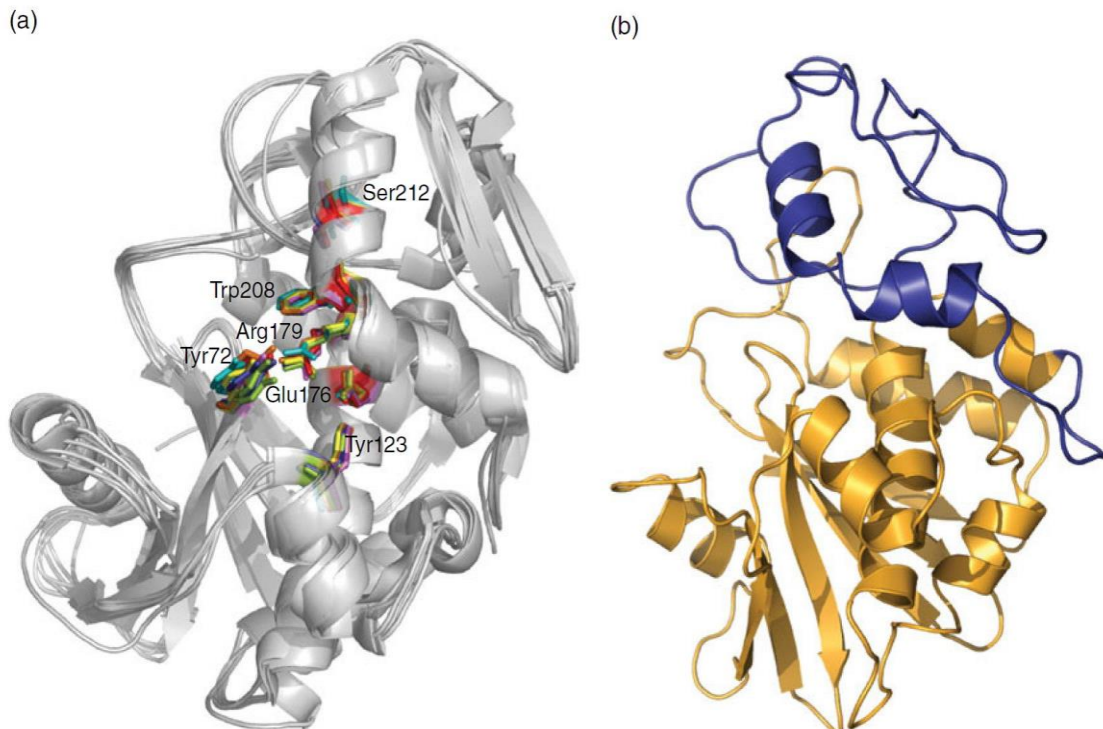


Figura 1.5.3 Estructura tridimensional de las secuencias de las RIPs de la familia *Phytolaccaceae*, disponibles en el Protein data bank (PDB). (a) Superposición de las estructuras: PD-L1-2 (PDB code 3H5K), PD-L3-4 (PDB code 2ZAU), PAP-Slaci (PDB code 2Q8W), PAP-S (PDB code 1G1K), PAP-I (PDB code, 1PAF), PAP-II (PDB code, 1LLN), y PAP-alpha (PDB code, 1APA). (b) Estructura representativa de PAP-I. Los dominios N-terminal y C-terminal de la proteína se representan en color amarillo y azul respectivamente [29].

## **1.6. Las aplicaciones terapéuticas de las RIPs**

La elevada toxicidad de las RIPs en las células ha llevado a los científicos a investigar acerca de sus posibles aplicaciones terapéuticas como agentes antivirales y antitumorales [12]. En la terapia contra el cáncer, las RIPs se están utilizando como componentes de conjugados que se obtienen mediante la unión de la RIP a una molécula que reconoce específicamente las células tumorales y que puede ser un anticuerpo monoclonal, un factor de crecimiento, citoquinas u hormonas peptídicas. Muchos de los conjugados sintetizados se han obtenido ligando la RIP a anticuerpos monoclonales (o con fragmentos de ellos), estos conjugados reciben el nombre de inmunotoxinas [13]- [33]. El anticuerpo se une específicamente a un antígeno en la superficie de la célula tumoral y la inmunotoxina entra en el citosol mediante endocitosis, siguiendo la ruta intracelular del antígeno y mata la célula inhibiendo la síntesis de proteínas o induciendo apoptosis.

Actualmente, las inmunotoxinas que contienen RIPs se han incluido en la terapia experimental contra diversos tumores malignos. La mayoría de los ensayos clínicos se han realizado con inmunotoxinas que contienen ricina ligada a distintos anticuerpos, tanto para el tratamiento de tumores hematológicos (distintos tipos de linfomas y leucemias,) como de tumores sólidos (melanomas, cáncer de colon, cáncer de pulmón y cáncer de mama) (Anexo 8.2).

Las inmunotoxinas con RIPs de tipo 1 (PAP, saporina o gelonina) también se han utilizado en ensayos clínicos realizados en pacientes con leucemia linfoblástica aguda, enfermedad de Hodgkin y tumores malignos mieloides [12] (Anexo 8.2)

## **1.7. La expresión de proteínas recombinantes en bacterias**

Para la producción de una proteína recombinante es necesario seleccionar un sistema de expresión adecuado, para ello, hay que tener en consideración las características de la proteína que se desea expresar (origen, estructura y función) y su posible toxicidad sobre el hospedador. Un sistema de expresión está constituido por un vector que permita insertar el gen de interés y una célula hospedadora capaz de aceptar el vector y de producir la proteína recombinante.



La bacteria *E. coli* es el hospedador más utilizado y ha permitido expresar con éxito proteínas eucarióticas relativamente complejas. Las principales ventajas de *E. coli* como hospedador son: I) cultivo sencillo y elevada velocidad de crecimiento, II) fácil manipulación genética y alta eficiencia en la incorporación de material genético foráneo y III) gran variedad de vectores de expresión [34]- [35].

Un vector de expresión para *E. coli* debe contener, además del gen de interés, un origen de replicación, un gen que confiera resistencia a antibióticos (marcador de selección), un promotor y un terminador transcripcional.

El promotor constituye el punto principal de regulación de la expresión de la proteína, de forma que es posible activar la expresión del gen foráneo en condiciones controladas, normalmente añadiendo algún compuesto inductor al medio de cultivo. Uno de los promotores más utilizados para regular la expresión de genes recombinantes en bacterias es el promotor *lac*, que procede del operón de la lactosa de *E. coli* y que se ha incorporado en muchos vectores de expresión mediante técnicas de ingeniería genética [36].

El inductor del operón *lac* más utilizado es IPTG, *isopropil-β-D-tiogalactopiranosido*, ya que es capaz de unirse al represor *lacI* e inactivarlo, pero no es sustrato para la enzima β-galactosidasa.

Otro factor que hay que tener en consideración para la producción de la proteína recombinante es el modo de operación mediante el cual se desarrolla el cultivo bacteriano [34]. El cultivo en “batch” es la forma más simple de producir proteínas recombinantes a pequeña escala y normalmente es la primera etapa para optimizar el proceso de producción antes de escalarlo a grandes cantidades. Los cultivos en “batch” se realizan normalmente en matraces de Erlenmeyer y todos los nutrientes requeridos para el crecimiento celular son suministrados desde el comienzo.

La última etapa del proceso es la purificación de la proteína recombinante. La proteína expresada puede acumularse en distintos compartimentos en la célula hospedadora; en forma soluble, en el citoplasma o en el periplasma, o bien en forma insoluble en el citoplasma. En la mayoría de los casos, cuando una proteína se sobreexpresa forma agregados citoplasmáticos insolubles, que originan partículas esféricas con un diámetro que oscila entre 0,5-1μm, denominados cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión pueden recuperarse fácilmente

lisando las bacterias y purificarse del resto de componentes celulares. Las proteínas se extraen luego por desnaturalización y se repliegan para adquirir la conformación nativa.

Durante el proceso de plegamiento la proteína adquiere estructuras intermedias, inestables y menos solubles, como consecuencia rápidamente, forman agregados insolubles con plegamientos erróneos, que generalmente no tienen actividad enzimática [37].

El proceso de plegamiento es una de las etapas que genera más problemas para obtener la proteína activa. La proteína comienza a plegarse cuando la concentración del compuesto desnaturalizante utilizado durante la solubilización disminuye lo suficiente. Los procedimientos más utilizados para la eliminación del desnaturalizante son la diálisis y la dilución, en ambos casos se ha observado que la disminución rápida de la concentración del agente desnaturalizante favorece la formación de agregados inactivos, mientras que la eliminación gradual incrementa la eficiencia de plegamiento de la proteína, tal como se observa en la figura 1.7.1 donde se ilustra el procedimiento de la diálisis [37].

En el método de dilución la eficiencia del proceso aumenta cuando la dilución se realiza lentamente (gota a gota) hasta que la concentración de la proteína es muy baja. Tanto durante el proceso de diálisis como de dilución se forman agregados proteicos en mayor o menor medida, para evitar esto se añaden compuestos químicos que previenen la agregación, tales como urea, guanidina, y arginina.

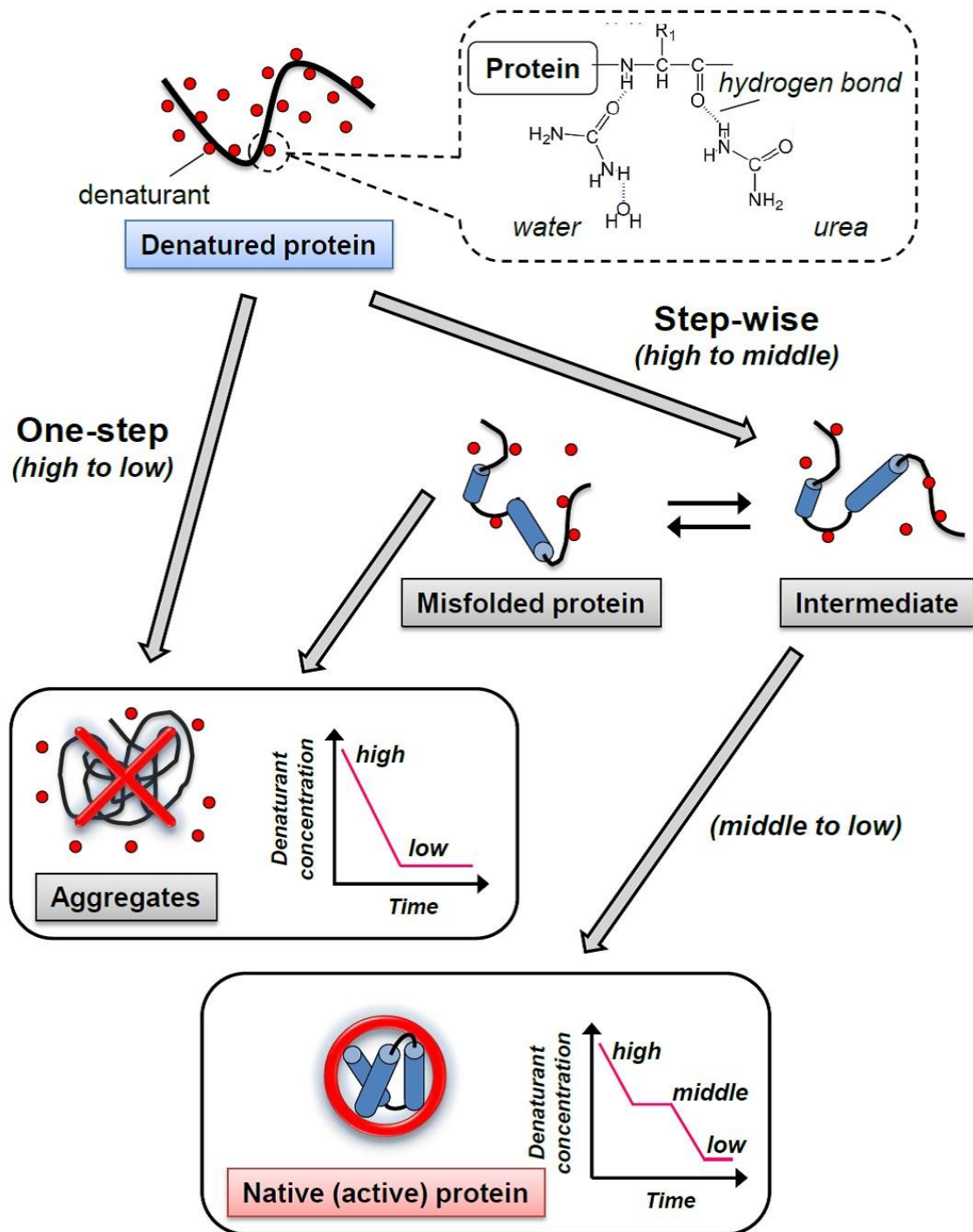


Figura 1.7.1 Ilustración esquemática del método de diálisis para eliminar el desnaturante de la proteína solubilizada. Diálisis en una etapa: el desnaturante que rodea la proteína disminuye rápidamente mediante difusión, dando lugar a la formación de agregados. Diálisis paso a paso: se produce la eliminación gradual del desnaturante, favoreciendo el plegamiento de la proteína nativa [37].

### **1.7.1 La expresión de RIPs en *E. coli***

La preparación de inmunocombinados para ensayos preclínicos y clínicos en la terapia de cáncer requiere disponer de preparaciones homogéneas de RIP. La principal limitación de las proteínas purificadas de plantas es que se trata de preparaciones heterogéneas que contienen varias isoformas de toxinas, que son inmunológicamente distintas y que también pueden variar significativamente en su actividad catalítica. Por este motivo, es aconsejable la expresión recombinante de isoformas individuales para la síntesis de combinados [13].

La bacteria *E. coli* ha sido el hospedador más utilizado para producir RIPs recombinantes, aunque con resultados variables. En *E. coli* se ha producido con éxito la cadena A de la ricina (RTA) [38] ya que no es tóxica para los ribosomas procarióticos, sin embargo, varias RIPs de tipo 1 (diantina 32, saporina S, PAP) han planteado muchos problemas para su expresión debido a que tienen actividad depurinante sobre los ribosomas de las bacterias y levaduras y provocan la muerte celular a concentraciones muy bajas. La producción de estas RIPs tóxicas en *E. coli* requiere una regulación estricta mediante un sistema de expresión inducible huésped / vector [39].

Los vectores plasmídicos pET se han utilizado para la expresión de varias isoformas de las RIPs de tipo 1, diantina y saporina [39] y para la expresión de las RIPs de *Phytolacca dioica* PD-L1 y PD-L4 [40]- [41]. Estos vectores contienen el promotor T7 precediendo el sitio de inserción del gen de la proteína recombinante y se usan para transformar cepas de *E. coli* BL21 (DE3), que contienen el gen de la RNA polimerasa T7 en el cromosoma bacteriano, bajo el control estricto del promotor lacUV5. De manera que, el Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) induce la expresión de RNA polimerasa T7 y por tanto de la toxina recombinante. La proteína recombinante se puede recuperar como material soluble, liberándola al espacio periplasmático o bien se puede acumular dentro de la bacteria en los cuerpos de inclusión [39].

En la mayoría de las expresiones de RIPs de tipo 1 que se han realizado, el rendimiento de proteína soluble es muy bajo y la mayor parte de la proteína expresada se acumula en cuerpos de inclusión. En este caso, los cuerpos de inclusión deben aislarse, purificarse y solubilizarse. Las proteínas se extraen luego por desnaturalización y se repliegan para adquirir la conformación nativa en presencia de un tampón redox adecuado [37].

---

***Objetivos y plan de trabajo***

---

## **2. Objetivos y plan de trabajo**

### **2.1. Objetivos**

- Objetivo general:

Producir mediante técnicas biotecnológicas la proteína inactivadora de ribosomas PD-L4 en un sistema de expresión heterólogo de *E. coli*.

- Objetivos específicos:

1. Transformar la bacteria *E. coli* BL21 (DE3) con el vector pET-22b(+)-PD-L4 e inducir la expresión de la proteína PD-L4 recombinante en cuerpos de inclusión.
2. Aislar la proteína PD-L4 recombinante de los cuerpos de inclusión y optimizar un procedimiento de solubilización y renaturalización de la proteína.
3. Purificar la proteína recombinante mediante una cromatografía de intercambio catiónico (FPLC-AKTA).
4. Caracterizar la actividad inhibidora de la proteína PD-L4 recombinante en un sistema acelular de síntesis de proteínas eucariótico y la actividad N-glicosilasa en el RNA ribosómico y en el DNA.

## **2.2. Justificación**

Una de las principales aplicaciones biomédicas de las RIPs es la producción de inmunoconjugados para la terapia antitumoral. La mayoría de los conjugados construidos con RIPs se han realizado ligando la toxina a un anticuerpo monoclonal, que reconoce marcadores de la superficie celular que se sobreexpresan en un tipo tumoral concreto. Estos conjugados reciben el nombre de inmunotoxinas. La proteína inactivadora de ribosomas PD-L4 es una toxina muy potente capaz de inhibir la síntesis proteica “*in vitro*”, en sistemas acelulares eucarióticos, a concentraciones extraordinariamente bajas ( $IC_{50} = 1 \text{ ng/ml}$ ), pero tiene muy poca toxicidad en las células porque no puede atravesar la membrana celular mediante la unión a receptores glucoproteicos. Por este motivo, PD-L4 es un buen candidato para la síntesis de inmunotoxinas que permitan dirigir la RIP específicamente a las células tumorales, ligándola a un anticuerpo monoclonal que favorezca la endocitosis de la RIP al citosol, donde actuaría inhibiendo la síntesis de proteínas, lo que provocaría la muerte de la célula tumoral.

Muchas de las inmunotoxinas sintetizadas hasta la fecha se han obtenido mediante conjugación química, utilizando agentes derivatizantes que introducen grupos  $-SH$  que permiten ligar la RIP y el anticuerpo mediante enlaces disulfuro. Estos procedimientos requieren preparaciones de toxina homogénea. El principal problema de las preparaciones de proteína nativa que se obtienen en las purificaciones a partir de la planta es que contienen distintas isoformas que varían en su actividad y también en la inmunogenicidad.

En base a estas consideraciones, se propone como objetivo general de este trabajo experimental, la producción biotecnológica y la purificación de la proteína inactivadora de ribosomas PD-L4 en un sistema de expresión heterólogo de *E.coli*.

## 2.3. Plan de trabajo

### ESQUEMA GENERAL DEL PROCESO

#### Clonación del gen de PD-L4 en el plásmido pET-22b(+)



- Transformación de *E. coli* BL21

#### Inducción de la expresión de PD-L4 (+/-IPTG)



- Electroforesis SDS-PAGE

#### Aislamiento de los cuerpos de inclusión



#### Solubilización y renaturalización de la proteína recombinante



- Electroforesis SDS-PAGE
- Dializar

#### Purificación: Cromatografía de intercambio catiónico (FPLC-AKTA)



- Electroforesis SDS-PAGE
- Dializar
- Concentrar la proteína

#### Caracterización de la actividad de PD-L4 recombinante

- Actividad sobre la síntesis de proteínas en un sistema acoplado de transcripción-traducción *in vitro*.
- Depurinación del RNA ribosómico 28S.
- Actividad polinucleótido: adenina glicosilasa en el DNA genómico.
- Actividad desoxirribonucleasa sobre el DNA plasmídico.



---

***Materiales y métodos***

---

## **3. Materiales y métodos**

### **3.1. Materiales**

#### **3.1.1. Equipamiento**

- Agitador de tubos, MS1 Minishaker (IKA).
- Autoclave modelo Auster 427-G, JP (Selecta S.A.).
- Balanza digital (Scaltec).
- Baño termostatzado (Selecta).
- Campana de flujo laminar (Telstar).
- Centrifuga de mesa para microtubos, Biofuge 13 (Heraeus Instrument).
- Centrifuga de mesa, modelo 5415C (Eppendorf).
- Centrifuga, Mod. Allegra 64R Benchtop, rotores, Mod. F0650, y Mod.F1202 (Beckman Coulter TM).
- Centrifuga, Mod.J-26XP series, rotor Mod. JA-25.50 (Beckman Coulter TM).
- Columna Source TM 15S 4.6/100 PE, para FPLC (GE Healthcare Bio-Sciences).
- Concentrador al vacío: Speed vacuum Mod. Centrivac (Heraeus Instrument).
- Equipo de cromatografía FPLC, modelo AKTA Purifier. (Amercham Pharmacia Biotech).
- Equipo de electroforesis horizontal para DNA. (Sigma-Aldrich S.R.L).
- Equipo de electroforesis para proteínas: “Mini-Protean II” (Bio-Rad).
- Equipo de electroforesis vertical para RNA: “MiniVE vertical electrophoresis system” (GE Healthcare Bio-Sciences).
- Espectrofotómetro, modelo UV-1601 (Shimadzu Corporation).
- Incubador para cultivo de bacterias con agitación orbital: Innova 4000 (New Brunswick Scientific).
- Luminómetro Junior LB 9509 (Berthold Technologies).
- Micropipetas “Finnpipette digital” (Thermo).
- pH-metro, modelo PHM92 (Radiometer Copenhagen).

- Sonicador: UP200S, Ultraschallprozessor (Dr. Hielscher GmbH.).
- Transiluminador de luz ultravioleta (254 - 312 nm) – Equipo de imagen. (BioRad).

### **3.1.2. Reactivos químicos**

Los reactivos químicos y bioquímicos que se han utilizado durante la realización de este trabajo han sido los de mayor pureza disponible en el mercado y se indican en la tabla 3.1.2.1.

*Tabla 3.1.2.1 Tabla de reactivos utilizados.*

<b>Reactivo</b>	<b>Origen</b>
Acetato sódico	Sigma
Ácido acético	Merck
Ácido bórico	Merck
Ácido clorhídrico	Merck
Ácido etilendiaminotetraacético	Sigma
Acrilamida	Roche
Agarosa	BRL Thermo Fisher
Ampicilina	Sigma
Anilina	Sigma
Azul de bromofenol	Sigma
Bis-acrilamida	Roche
Bromuro de etidio	Amresco
Cloruro de magnesio	Merck
Cloruro de potasio	Merck
Cloruro de sodio	Merck
Coomasie Brilliant-blue R-250	Sigma
Dodecilsulfato sódico	Merck
Etanol	Merck
Éter	Sigma
Extracto de levadura	Difco

Continuación Tabla 3.1.2.1

<b>Reactivo</b>	<b>Origen</b>
<b>Fenol</b>	USB
<b>Fosfato monosódico</b>	Merck
<b>GelRed stain</b>	Biotium
<b>Glicerol</b>	Merck
<b>Glicina</b>	Roche
<b>Glutación</b>	Sigma
<b>Guanidina</b>	Sigma
<b>Hidróxido sódico</b>	Panreac
<b>IPTG</b>	USB
<b>L-Arginina</b>	Sigma
<b>2-Mercaptoetanol</b>	Merck
<b>Metanol</b>	Merck
<b>Persulfato amónico</b>	Sigma
<b>Peróxido de hidrogeno</b>	Panreac
<b>Reactivo de Luciferasa</b>	Promega
<b>Sacarosa</b>	Sigma
<b>TEMED</b>	Sigma
<b>Triptona</b>	Pronadisa
<b>Tris</b>	Roche
<b>Triton x100</b>	Sigma
<b>Urea</b>	Sigma

### 3.1.3. Reactivos Biológicos

#### 3.1.3.1. Cepas bacterianas y plásmidos

- La cepa *E. coli* InvαF<sup>+</sup> y el plásmido pCR2.1 (Invitrogen) (Anexo 8.3).
- La cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) y el vector de expresión pET-22b(+) (Figura 3.1.3.1.1.), obtenidos de AMS Biotecnología, Lugano, (Suiza).

La cepa bacteriana utilizada en este trabajo para la expresión de la proteína recombinante fue *Escherichia coli* BL21 (DE3). Es una cepa para la expresión lisógena del fago λ (DE3), el cual contiene el gen de la RNA polimerasa T7 bajo el control del promotor *lacUV*, que es inducible por Isopropil-β-D-tiogalacto-piranosido (IPTG).

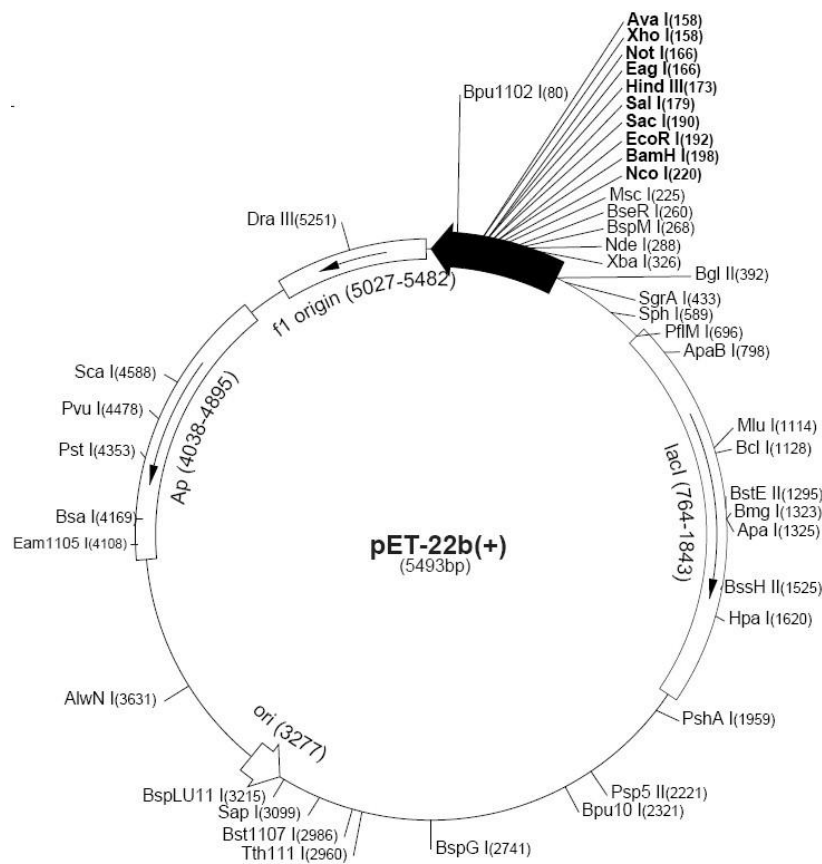


Figura 3.1.3.1.1 Mapa genético del plásmido pET-22b(+). El sitio de clonación del material genético foráneo está representado por una flecha negra.

### **3.1.3.2. Enzimas**

- Inhibidor de RNAsas, (TaKara).
- RNA polimerasa T7 (TaKara).
- Lisozima (Roche).

### **3.1.3.3. Proteínas**

Los marcadores proteicos para SDS-PAGE: Dalton Mark VII-L (Sigma-Aldrich).

### **3.1.3.4. Kits de purificación de ácidos nucleicos y sistemas de traducción**

- El kit “Miniprep plasmid purification kit” (Machery-Nagel).
- El sistema de transcripción-traducción “Luciferase T7 control DNA” (Promega).

### **3.1.4. Otros materiales**

- Membranas de diálisis: Spectra / 6000-8000 MWCO (Spectrum Laboratories Inc.).
- Membrana para concentrar las muestras proteicas mediante centrifugación: Ultrafree-centrifugal filter / Biomax 10K NMWL (Millipore).
- Material de plástico desechable estéril: placas de Petri, tubos cónicos de 1,5 ml (“Eppendorf”), tubos cónicos de 50 ml (“Falcon”), puntas de micropipeta, asas de siembra... etc.

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Esterilización de las disoluciones y del material de laboratorio**

Todas las disoluciones se prepararon con agua tipo I-Milli Q (Millipore) y se esterilizaron en autoclave (Auster 427-G) a 120°C y 1 atmósfera de sobrepresión durante 20 minutos. El material de vidrio de uso general en el laboratorio se esterilizó en una estufa de aire a 140°C durante 12 horas. El resto del material de laboratorio utilizado en los ensayos enzimáticos y en los ensayos con DNA y RNA (puntas de micropipeta, microtubos, tubos cónicos, filtros, jeringas, placas de cultivo, etc.) se adquirió estéril o se esterilizó en autoclave como se ha indicado anteriormente.

### **3.2.2. Obtención del vector de expresión recombinante pET-22b(+) /PD-L4**

La proteína nativa PD-L4 se purificó a partir de las hojas de *Phytolacca dioica L.*, obtenidas en el Jardín botánico de la Universidad Federico II de Nápoles, según el protocolo descrito por Di Maro et al. [42]. La secuencia génica de la proteína PD-L4 se obtuvo en el laboratorio de Bioquímica del Dr. E. Pizzo, del departamento de Biología de la Universidad Federico II (Nápoles). El cDNA codificador obtenido mediante RT-PCR a partir del RNA de las hojas de la planta, se clonó en el vector de expresión pET-22b(+) bajo el control del promotor T7, utilizando las enzimas de restricción NdeI y HindIII. El gen se amplificó mediante transformación utilizando como cepa hospedadora la cepa bacteriana *E. coli* BL21 (DE3), que expresa la enzima RNA polimerasa T7. Este vector de expresión contiene un centro regulador correspondiente al operador lac que puede ser activado por IPTG, lo que conlleva la expresión del gen que codifica para la proteína clonada (Figura 3.2.2.1).

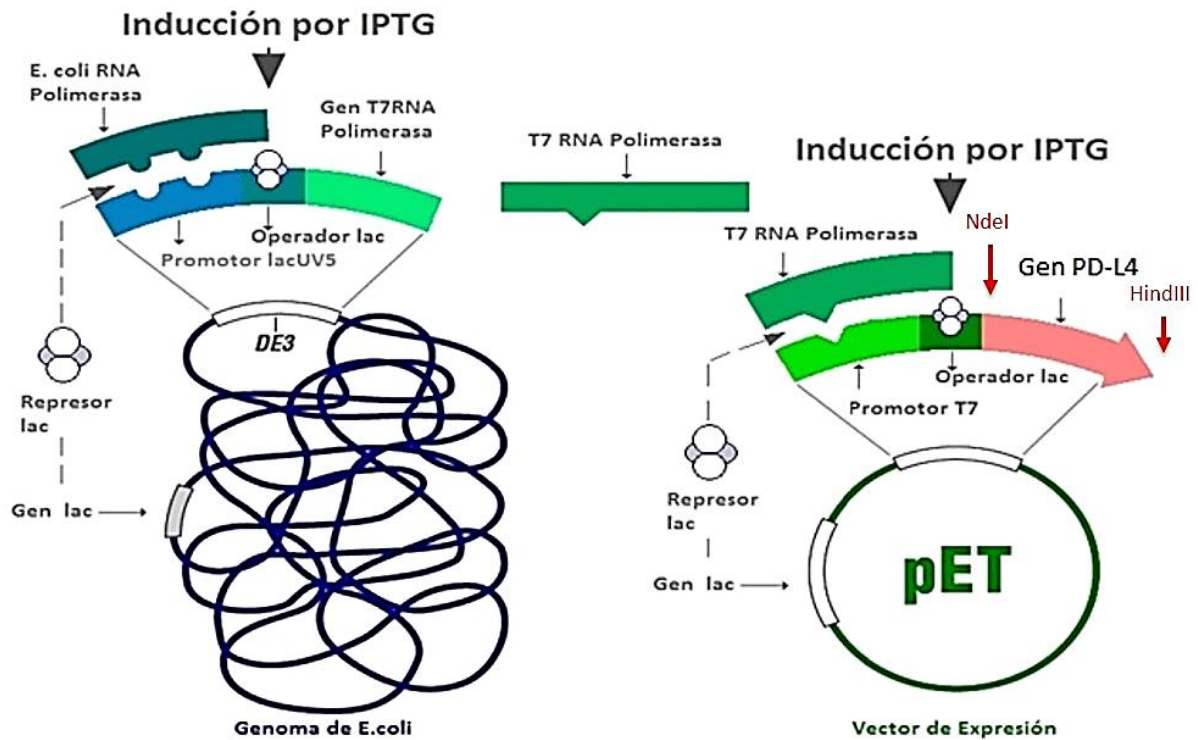


Figura 3.2.2.1 Genoma de la cepa bacteriana *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el vector de expresión recombinante pET-PD-L4.

### 3.2.3. Medio de Cultivo

Para el cultivo de las cepas *E. coli* Inv $\alpha$ F' y *E. coli* BL21 (DE3) se utilizó el medio de cultivo Luria-Bertani (LB), cuya composición para un litro de solución es:

*Cloruro de sodio (NaCl)* 10g  
*Triptona* 10 g  
*Extracto de levadura* 5g

El medio de cultivo se esterilizó por tratamiento en autoclave durante 20 minutos a 120°C. Tras la esterilización se añadió el antibiótico ampicilina (100  $\mu$ g/ml), utilizando una campana de flujo laminar para evitar la contaminación del medio.



### **3.2.4. Cultivo de bacterias e inducción de la expresión**

El cultivo de la bacteria *E. coli* se realizó en un matraz de Erlenmeyer con un reparto medio/volumen de 1:5 (matraz de 5l para 1l de medio), garantizando así una adecuada distribución de los nutrientes y el oxígeno necesarios para el crecimiento de la bacteria, que se realizó con agitación orbital. Las curvas de crecimiento de las cepas bacterianas y los experimentos de expresión de la proteína recombinante se realizaron en 1l de medio LB suplementado con ampicilina 100 µg/ml, que se inoculó con 10 ml de bacterias recombinantes *E. coli* BL21 (DE3)//pET-22b(+)-PDL4 cultivadas previamente durante toda la noche. El inóculo se preparó en 10 ml de LB/ampicilina en un tubo estéril de 50 ml (Falcon), al que se transfirió una colonia bacteriana transformada con el vector recombinante, utilizando un asa de siembra estéril. Tras la adición del inóculo, el cultivo bacteriano se incubó en un agitador orbital a una velocidad de 375 rpm y a una temperatura óptima de 37°C. El crecimiento de las bacterias se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm cada 1 hora. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,6 se indujo la expresión de la proteína recombinante añadiendo IPTG a una concentración final 1 mM. El cultivo se incubó durante tres horas más en las condiciones indicadas anteriormente. Con el objeto de determinar si se había expresado la proteína recombinante se tomaron alícuotas de 1ml antes de inducir y tras tres horas de incubación en presencia de IPTG y se analizaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Para ello, las alícuotas (inducida y no inducida) se centrifugaron durante 15 minutos a 6000 rpm a temperatura ambiente (Centrifuga Eppendorf, Mod. 5415C). El sobrenadante se descartó y el pellet de cada muestra se resuspendió en 100 µl de un tampón desnaturizante (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), 2-ME 5% (v/v) y azul de bromofenol 0,025% (p/v). A continuación, se analizaron 20 µl de cada muestra mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida 12% (Métodos, apartado 3.2.7)

### **3.2.5. Obtención de los cuerpos de inclusión**

Para la obtención de los cuerpos de inclusión se utilizó el protocolo descrito por Chambery et al. [41]. Las bacterias *E. coli*, BL21 (DE3) transformadas con el plásmido recombinante pET-22b(+)-PDL4 e inducidas con IPTG durante 3 horas en las condiciones indicadas en el

apartado 3.2.4, se centrifugaron a 3750 rpm a 4 °C durante 40 minutos (Centrífuga Beckman Allegra 64R, rotor F0650). El sobrenadante se descartó y el pellet se sometió a un lavado con medio LB para eliminar los restos de IPTG, para ello se resuspendió en 20 ml de medio LB y se centrifugó a 6000 rpm a 4 °C durante 15 minutos (Centrífuga Beckman J-26XP series, rotor JA 25); el sobrenadante se desechó y se recuperó el pellet bacteriano.

### **3.2.5.1. Lisis bacteriana**

La lisis de las bacterias se realizó a 0°C utilizando un tratamiento enzimático con lisozima que actúa rompiendo la pared bacteriana. Para ello, el pellet bacteriano se resuspendió en 10 ml de tampón TE (Tris-Cl 50 mM, EDTA 1mM, pH 8,0) con 20 % sacarosa y se incubó durante 15 minutos en hielo. Posteriormente se añadieron 10 ml de agua desionizada fría (0°C), se mezcló mediante agitación vigorosa (vortex) y a continuación se realizó una segunda incubación en hielo durante 15 minutos. Tras la incubación, la suspensión se centrifugó a 17400 xg a 4°C durante 10 minutos (Centrífuga Beckman Allegra 64R, rotor F0650), se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 10 ml de una solución de lisis que contenía 0,25 mg/ml de lisozima en tampón TE y se incubó en hielo durante 30 minutos. Durante este periodo de incubación la lisozima actuó degradando la pared bacteriana. La lisis bacteriana se completó mediante sonicación, aplicando 20 ciclos de 15 segundos durante 10 minutos. Mediante el tratamiento con ultrasonidos se rompe la membrana celular y se libera el contenido intracelular donde se localiza la proteína recombinante.

### **3.2.5.2. Aislamiento y lavado de los cuerpos de inclusión**

El lisado bacteriano se centrifugó a 17400 xg a 4°C durante 20 minutos (Centrífuga Beckman Allegra 64R, rotor F0650), el sobrenadante se eliminó y el pellet que contenía los cuerpos de inclusión se sometió a dos lavados con 20 ml de tampón TE/2% Triton X-100 /urea 2M y posteriormente otros dos con 20 ml de tampón TE (sin Tritón ni urea). En cada lavado las muestras se resuspendieron en el tampón correspondiente, se sometieron a sonicación (en hielo) durante 20 ciclos de 15 segundos durante 5 minutos (300 s) y posteriormente a

centrifugación a 17400 xg a 4°C durante 10 minutos (Centrífuga Beckman Allegra 64R, rotor F0650).

### **3.2.5.3. Resuspensión de los cuerpos de inclusión**

El pellet obtenido en el apartado anterior se resuspendió en 2,5 ml de tampón desnaturizante (Tris-Cl 0,1M, EDTA 20 mM, pH 8,0) mediante agitación fuerte (vortex) y se sometió a sonicación aplicando 20 ciclos de 15 segundos durante 5 minutos (300 s). A continuación, se añadió guanidina 6M (2,5g) y la mezcla se sometió a agitación durante toda la noche a 4°C. La solución se sometió a centrifugación a 17400 xg durante 15 minutos a 4°C (Centrífuga Beckman Allegra 64R, rotor F0650) y se recuperó el sobrenadante (4 ml) que se recogió en un tubo estéril. Para determinar si el proceso de resuspensión se había producido completamente y estimar la concentración de proteína presente en las dos fracciones, se tomaron muestras de sobrenadante y de pellet, se realizó una precipitación con etanol para eliminar la guanidina y posteriormente se analizaron mediante SDS-PAGE. Se prepararon dos muestras, una de sobrenadante de 10 µl y otra de pellet que se preparó disolviéndola en 100 µl de H<sub>2</sub>O Milli Q. Para eliminar la guanidina, las muestras se precipitaron añadiendo 9 volúmenes de etanol 100% (p/v) y se incubaron a -20°C durante 15 minutos. A continuación, se centrifugaron a 14000 rpm durante 30 minutos a 4°C (Centrífuga Eppendorf, Mod. 5415C). El sobrenadante se desechó y el pellet se secó mediante una centrifugación durante 30 minutos en un concentrador al vacío (Speed vacuum Mod. Centrivac, Heraeus). Finalmente, las muestras se disolvieron añadiendo 20 µl del tampón desnaturizante (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), 2-ME 5% (v/v) y azul de bromofenol 0,025% (p/v)) y se analizaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida 12% (Métodos, apartado 3.2.7).

### **3.2.5.4. Solubilización y plegamiento de la proteína (refolding)**

El sobrenadante obtenido en el apartado 3.2.5.3 (4 ml) se trató con glutatión reducido (GSH sólido 2,5 g) a una concentración final de 0,1 M. El pH se llevó hasta 8,0 mediante la adición de NaOH 5 M, después la solución se incubó durante dos horas y media a temperatura

ambiente bajo atmosfera de nitrógeno. La renaturalización se efectuó mediante dilución gota a gota (con agitación continua) de la mezcla con el tampón Na/P / L-Arg 0,4 M / glutatión oxidado 0,6 mM / glutatión reducido 3 mM, pH 8,4 hasta una concentración final de 0,07 mg/ml, que se alcanzó añadiendo aproximadamente 10 ml del tampón de renaturalización y a continuación se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente bajo atmosfera de nitrógeno.

### **3.2.6. Purificación de la proteína mediante cromatografía de intercambio catiónico (FPLC-AKTA)**

Después de la renaturalización, el glutatión y la arginina se eliminaron de la muestra de proteína mediante un procedimiento de diálisis utilizando una membrana (Spectra – MWCO: 6000-8000), en el interior de la cual se colocaron los 10 ml de la disolución proteica. La diálisis se llevó a cabo en dos etapas: en la primera etapa la proteína se dializó en 2 l de agua desionizada durante 2 horas a 4°C con agitación constante; en la segunda etapa la diálisis se realizó en 2 l de tampón A (Fosfato de sodio 5 mM pH 7,2) durante 2 horas a 4 ° C con agitación constante. Tras la diálisis se recuperó la proteína en un tubo estéril, obteniéndose un volumen de 30 ml de la disolución proteica que se sometió a una cromatografía de intercambio catiónico utilizando una Columna Source TM 15S 4.6/100 PE para FPLC-AKTA (GE Healthcare Bio-Sciences) previamente equilibrada. Se realizaron 3 cromatografías consecutivas, en cada una de ellas se aplicaron en la columna 10 ml de la muestra proteica y a continuación se realizó un lavado con el tampón A. La elución se realizó usando un gradiente lineal de tampón B (Na / P 5 mM – NaCl 0,3 M, pH 7,2) a una velocidad de flujo de 1 ml / min. Se recogieron fracciones de 0,5 ml y los picos de proteína se determinaron midiendo la absorbancia a 280 nm; se recogieron muestras de cada pico y se analizaron mediante SDS-PAGE. Tras el análisis electroforético, las fracciones de interés (pico B) de las tres cromatografías (9 ml) se dializaron en agua utilizando una membrana Spectra (MWCO: 6000-8000) y a continuación se concentraron mediante centrifugación hasta un volumen de 1,5 ml. (centrifugal filter - BioMax 10K, 10000 MWCO, Millipore). La concentración final de proteína se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm, se hicieron alícuotas de 100 µl y se conservaron a -20°C hasta su utilización en los ensayos de actividad.

### **3.2.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)**

SDS-PAGE es el acrónimo en inglés de *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*. La electroforesis en geles de poliacrilamida es una técnica ampliamente utilizada en bioquímica y biología molecular para separar las proteínas en función de su movilidad electroforética. Se trata de un método analítico que permite realizar una estimación rápida del número de proteínas presentes en una mezcla, analizar las separaciones cromatográficas durante un proceso de purificación de una proteína y determinar la masa molecular relativa de una proteína utilizando patrones proteicos. El SDS es un detergente aniónico que desnatura las proteínas, que pierden su conformación tridimensional y adquieren carga negativa. De este modo se obtiene un fraccionamiento que obedece a: la diferencia de peso; la longitud de la cadena (tamaño) y la forma de la proteína. La electroforesis de proteínas se lleva a cabo en geles formados por el polímero entrecruzado de poliacrilamida y en condiciones desnaturizantes. En este trabajo se utilizó un equipo de electroforesis vertical “Mini-Protean II” (Bio-Rad) y los geles se prepararon siguiendo el protocolo descrito por Laemmli en 1970 [43] con algunas modificaciones. Los geles constan de dos fases con distinta concentración de poliacrilamida denominadas gel compactador y gel separador, que además tienen distinta concentración de sales y distinto pH. En este trabajo los geles utilizados fueron del 12% en el caso del separador y del 4% el compactador, que se prepararon con las cantidades de reactivos indicadas a continuación:

	<u><b>GEL SEPARADOR (12%)</b></u>	<u><b>GEL COMPACTADOR (4%)</b></u>
<i>Acrilamida 40%</i>	<i>6 ml</i>	<i>1 ml</i>
<i>Tris 1,5 M, pH=8.8</i>	<i>5 ml</i>	-
<i>Tris 0,5 M, pH=6.8</i>	-	<i>2,5 ml</i>
<i>Agua Milli Q</i>	<i>8,5 ml</i>	<i>6 ml</i>
<i>SDS 20%</i>	<i>200 µl</i>	<i>100 µl</i>
<i>Persulfato amónico 20 %</i>	<i>100 µl</i>	<i>50 µl</i>
<i>TEMED</i>	<i>40 µl</i>	<i>25 µl</i>

Las muestras proteicas se prepararon en un tampón Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), 2-ME 5% (v/v) y azul de bromofenol 0,025% (p/v) y se incubaron durante 3 minutos a 100°C para desnaturalizar completamente las proteínas. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se colocaron en los pocillos del gel utilizando una micropipeta.

La electroforesis se desarrolló utilizando en la cubeta de electroforesis un tampón Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y SDS 0,1% (p/v). La separación de las proteínas se realizó con una intensidad de corriente constante de 30 mA por gel durante 1 hora y 30 minutos. A continuación, el gel se tiñó durante 1 hora con agitación, con una solución acuosa compuesta por Coomassie Brilliant blue R-250 al 0,125% (p/v), metanol 50% (v/v) y ácido acético 10% (v/v). Posteriormente, el colorante fijado inespecíficamente se eliminó mediante un proceso de desteñido utilizando una solución acuosa de ácido acético 10% y metanol 40%. Este proceso se realizó durante 12 horas, cambiando varias veces esta solución. El peso molecular relativo de las proteínas purificadas se determinó utilizando marcadores de masa molecular conocida.

### **3.2.8. Ensayo de síntesis de proteínas mediante un sistema de transcripción – traducción *in vitro***

La actividad de las RIPs sobre la síntesis de proteínas se determinó utilizando un sistema de transcripción-traducción (“Luciferase T7 control DNA”- Promega) del cDNA que codifica la proteína luciferasa de la luciérnaga americana (*Photinus pyralis*). El cDNA que codifica la luciferasa está clonado en un plásmido, bajo el control del promotor de la RNA polimerasa T7 (Figura 3.2.8.1.).

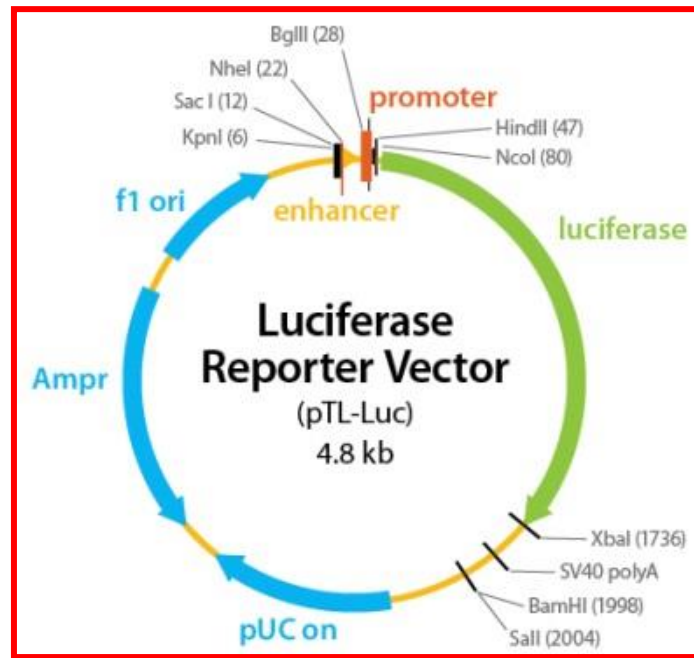
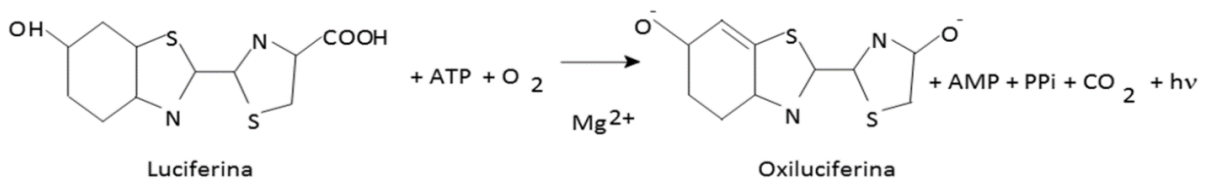


Fig.3.2.8.1. Vector de expresión que contiene el gen de la luciferasa

La luciferasa es una proteína monomérica de 61 kDa que cataliza la reacción de oxidación de la luciferina, la cual va acompañada de la emisión de una ráfaga de luz que decae rápidamente.



La intensidad de la luz emitida es proporcional a la concentración de luciferasa. Esta luz se detecta mediante luminometría, utilizando un luminómetro (Junior LB 9509 - Berthold Technologies) sensible al rango de espectro de 185 a 680 nm. La intensidad lumínica es máxima y constante tan solo durante el primer minuto de reacción.

El grado de inhibición de la síntesis proteica provocada por las RIPs, se obtuvo determinando la síntesis de luciferasa utilizando como sistema de traducción de lisados de reticulocitos de

conejo que proporciona los ribosomas y tRNAs necesarios para llevar a cabo la síntesis proteica (Promega).

El experimento de transcripción - traducción *in vitro* es muy complejo y consta de 3 etapas:

- 1) La transcripción del mRNA que codifica para la luciferasa: esto se consigue añadiendo a la mezcla de reacción la enzima RNA polimerasa T7 que se une a la secuencia promotora en el plásmido.
- 2) La traducción del mRNA que codifica para la luciferasa: se lleva a cabo utilizando un sistema biosintético de lisados de reticulocitos de conejo, que da lugar a la proteína luciferasa activa.
- 3) Medida de la actividad de la luciferasa: una vez que la síntesis de proteínas ha tenido lugar, se añade “el reactivo de luciferina” (Promega) que contiene luciferina de escarabajo en el medio adecuado para que se lleve a cabo la reacción de su oxidación mediante la luciferasa. La medida se realiza durante 10 segundos y el resultado se obtiene en “unidades relativas de luz” (intensidad de luz emitida por una muestra durante un período de medida determinado).

➤ ***Preparación de las muestras***

El experimento se inicia preparando una mezcla (Mix) que contiene el plásmido, la RNA polimerasa T7, los ribonucleótidos para la síntesis del mRNA, los lisados de reticulocitos de conejo y las condiciones de sales óptimas para la actividad de las enzimas que intervienen en la síntesis del RNA y de la proteína.

La mezcla de reacción “Mix” se preparó en un tubo estéril, utilizando un tampón (x20): NTPs 8 mM cada uno; espermidina 4 mM; Tris-HCl 200 mM, pH 7,8; KCl 560 mM; MgCl<sub>2</sub> 20 mM; aminoácidos 40 μM cada uno.



Los componentes de la Mix son los siguientes:

**Mezcla de reacción (Mix)**

<i>H<sub>2</sub>O Milli Q</i>	<i>63 <math>\mu</math>l</i>
<i>KCl 0,46 M</i>	<i>22,5 <math>\mu</math>l</i>
<i>Tampón x 20 (*)</i>	<i>9 <math>\mu</math>l</i>
<i>DNA luciferasa 0,6 mg/ml</i>	<i>9 <math>\mu</math>l</i>
<i>T7 polimerasa</i>	<i>3 <math>\mu</math>l</i>
<i>Inhibidor RNasa</i>	<i>3 <math>\mu</math>l</i>
<i>Lisado de reticulocito de conejo</i>	<i>55 <math>\mu</math>l</i>

La mezcla de reacción “Mix”, se incubó durante 10 minutos a 30°C para que se lleve a cabo la transcripción del mRNA de la luciferasa mediante la RNA polimerasa T7. Una vez transcurridos los 10 minutos de incubación, la mezcla se colocó en hielo y se prepararon los tubos en los que se realizó la traducción para determinar la actividad inhibidora de las RIPs.

Para determinar la concentración de RIP que inhibe la síntesis de proteínas un 50% (IC<sub>50</sub>) se prepararon diluciones seriadas de la proteína PD-L4 nativa y PD-L4 recombinante abarcando el siguiente rango de concentraciones: 0,1, 1, 10 y 100 ng/ml.

La reacción de síntesis de proteínas se realizó en tubos cónicos de 1,5 ml (Eppendorf), en un volumen total de 8  $\mu$ l, añadiendo 6,4  $\mu$ l de Mix y 1,6  $\mu$ l de la dilución de toxina que corresponda, excepto en el control que se añadió agua. Los tubos con diferentes concentraciones de PD-L4 nativa o recombinante se prepararon por duplicado. En cada ensayo se incluyeron cuatro controles en los que no se añadió toxina, de forma que los resultados obtenidos en estos tubos correspondían al 100% de síntesis proteica.

Los tubos se prepararon como se especifica a continuación:

	<i>Control</i>	<i>+ RIP</i>
<i>Mix</i>	6,4 $\mu$ l	6,4 $\mu$ l
<i>H<sub>2</sub>O Milli Q</i>	1,6 $\mu$ l	-
<i>RIP</i>	-	1,6 $\mu$ l

La reacción se incubó durante 30 minutos a 30°C para que se produzca la biosíntesis de la luciferasa. Pasado este tiempo, la reacción se detuvo añadiendo 20  $\mu$ l de agua y 28  $\mu$ l de reactivo de luciferina, y se midió la intensidad lumínica en el luminómetro. La medida se realizó rápidamente, pues como se ha indicado la intensidad lumínica es máxima y constante tan solo durante el primer minuto de reacción. Cualquier señal que no proceda de la reacción de la luciferasa sobre la luciferina es obviada haciendo un blanco previo, que se preparó utilizando 8  $\mu$ l de la mezcla de reacción, sin toxina y sin haber sido incubada durante los 30 minutos, y que se procesó de la misma forma que las muestras. El valor obtenido en esta medida se restó de los valores de las demás medidas. A partir de estos resultados se determinó la IC<sub>50</sub> de nuestra RIP, es decir, la concentración de RIP que provoca una disminución del 50% en la síntesis proteica.

### **3.2.9. Actividad N-glicosilasa de PD-L4 recombinante en ribosomas de reticulocitos de conejo**

La actividad N-glicosilasa de las RIPs en el bucle  $\alpha$ -sarcina/ricina del rRNA 28S se determinó en ribosomas de reticulocitos de conejo, que es sistema eucariótico modelo muy sensible a la actividad de las RIPs que se utiliza habitualmente (Promega). La actividad depurinante de la proteína nativa y PD-L4 recombinante se determinó analizando la liberación de un fragmento del rRNA 28S denominado “fragmento de Endo”, que se obtuvo tratando con anilina ácida el rRNA procedente de los ribosomas tras su incubación con la RIP. La depuración hace que el esqueleto fosfodiéster sea en ese punto susceptible a la acción de la

anilina, provocando la liberación de un fragmento de RNA de 480 n que se pudo detectar mediante una electroforesis en un gel desnaturizante de poliacrilamida 5% / urea 7M.

Se utilizó el protocolo descrito por Iglesias et al. [44]. Para ello, se incubaron 80 µl de lisado de reticulocitos de conejo con 3 µg de RIP durante 1 hora a 37°C. Seguidamente se añadieron 2 µl EDTA 0,5 M, pH 8 y 550 µl de Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 / SDS 0,5% (p/v) y la mezcla se agitó vigorosamente durante 30 segundos para disociar las proteínas ribosómicas. A continuación, se realizó una extracción con fenol (500 µl) para eliminar las proteínas. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 13000 rpm (centrífuga Biofuge 13, Heraeus), se recuperó la fase acuosa y el RNA se precipitó a -80°C toda la noche, añadiendo 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 3 volúmenes de etanol absoluto. El RNA se recuperó centrifugando durante 15 minutos a 13000 rpm a 4°C (Biofuge 13, Heraeus). El sedimento obtenido se lavó con etanol al 70% (v/v), se dejó secar a temperatura ambiente y se disolvió en 20 µl de H<sub>2</sub>O Milli Q estéril. El tratamiento con anilina ácida se realizó añadiendo al RNA 20 µl de anilina 2 M pH 4,5 e incubando a 0°C durante 10 minutos en oscuridad. A continuación, se realizaron dos extracciones con un volumen de éter saturado con agua. La fase acuosa se precipitó con 0,1 vol. de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 3 vol. de etanol absoluto, a -80°C durante 4 horas. El RNA se recuperó centrifugando como se ha explicado anteriormente. El pellet obtenido se resuspendió en 20 µl de H<sub>2</sub>O Milli-Q estéril y se determinó su concentración espectrofotométricamente como se indica en Métodos, apartado 3.2.13. Finalmente, el RNA se analizó mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida 5% / urea 7M, como se indica en Métodos, apartado 3.2.10.

### **3.2.10. Electroforesis de RNA en geles de poliacrilamida 5% / urea 7M**

El RNA ribosómico obtenido tras la incubación con las RIPs se analizó mediante una electroforesis en un gel de poliacrilamida 5% (p/v) en condiciones desnaturizantes con urea 7M [44]. Se utilizó un equipo de electroforesis vertical “MiniVE electrophoresis system-GE”. Para evitar la degradación de las muestras de RNA, todo el material utilizado en la preparación del gel y la cubeta de electroforesis se trató con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. El peróxido de hidrógeno al 30% es un inhibidor de las ribonucleasas, que son enzimas presentes en los tejidos biológicos muy difíciles de inactivar y que pueden degradar muy fácilmente las muestras de RNA.

Los geles de poliacrilamida 5% (p/v) se prepararon en un tubo estéril, como se indica a continuación:

<i>H<sub>2</sub>O tipo I Milli Q</i>	<i>12,6 ml</i>
<i>Urea</i>	<i>10,08 g</i>
<i>TBEx1</i>	<i>2,5 ml</i>
<i>Acrilamida 40%</i>	<i>3,2 ml</i>
<i>APS 100 mg/ml</i>	<i>200 µl</i>
<i>TEMED</i>	<i>60 µl</i>

Las muestras de RNA se prepararon en un tampón que contenía 130 mg/ml de sacarosa, urea 7 M, Tris-HCl 45 mM, pH 8, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8, azul de bromofenol 0,4 µg/ml. Para desnaturalizar el RNA las muestras se hirvieron durante 30 segundos y posteriormente se colocaron en los pocillos del gel utilizando una micropipeta y puntas estériles. La electroforesis se desarrolló durante 2 horas aproximadamente, a una intensidad de corriente fija de 15 mA., utilizando en la cubeta, tampón TBE (Tris-HCl 45 mM, pH 8, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8).

El gel se tiñó con Bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 20-30 minutos con agitación. El Bromuro de etidio se intercala entre las bases nitrogenadas del RNA y absorbe luz ultravioleta en el rango 254-312 nm. Las bandas correspondientes a las moléculas de RNA se visualizaron a través de un transiluminador de luz ultravioleta que está incorporado en un equipo de imagen (BioRad).

### **3.2.11. Actividad polinucleótido: adenina glicosilasa de PD-L4 recombinante sobre el DNA**

La actividad polinucleótido: adenina glicosilasa de las proteínas PD-L4 nativa y recombinante en el DNA genómico, se determinó midiendo las adeninas liberadas a partir del DNA de esperma de salmón (SIGMA). El ensayo se realizó incubando 10 µg de DNA con 3 µg de RIP durante 1 hora a 30 °C.

La mezcla de reacción se preparó en un tubo cónico de 1,5 ml (Eppendorf) como se indica a continuación:

<i>DNA esperma de salmón (1 mg/ml)</i>	<i>10 µl</i>
<i>KCl 1M</i>	<i>30 µl</i>
<i>AcNa 0,5 M</i>	<i>30 µl</i>
<i>H<sub>2</sub>O Milli-Q</i>	<i>227µl</i>
<i>RIP (1 mg/ml)</i>	<i>3µl (3µg)</i>

Una vez concluido el período de incubación, el DNA se precipito añadiendo a las muestras 35 µl de AcNa 3 M, pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Las muestras se mezclaron y se precipitaron durante 12 horas a -80°C. A continuación, se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C (Centrífuga Biofuge, 13 Heraeus) y las adeninas liberadas se determinaron midiendo la absorbancia a 260 nm de los sobrenadantes obtenidos.

### **3.2.12. Purificación del plásmido pCR2.1**

El plásmido pCR2.1 se purificó a partir de un cultivo bacteriano en medio líquido, que se preparó en condiciones estériles en 10 ml de medio LB/Ampicilina 100 µg/ml, inoculado con la bacteria *E. coli* InvαF'-pCR2.1. El cultivo se dejó crecer durante toda la noche a 37°C con agitación orbital a 375 rpm.

La purificación del plásmido se realizó con un “kit” comercial “Miniprep plasmid purification kit” (Machery-Nagel). El procedimiento consiste en la lisis de la bacteria en un medio alcalino, seguido de un tratamiento con Ribonucleasa A para degradar el RNA bacteriano. El lisado obtenido se neutralizó a pH 7,8 y se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm (centrífuga Biofuge 13, Heraeus) para eliminar restos celulares y el DNA genómico. Se recogió el sobrenadante y se aisló el plásmido utilizando una minicolumna que contenía una membrana de sílice, que fija el DNA en condiciones de elevada fuerza iónica. El DNA fijado se eluyó utilizando una solución con baja concentración de sal (Tris-HCl 10 mM pH 7,8). La

concentración del plásmido se determinó espectrofotométricamente como se indican en Métodos, apartado 3.2.13.

### **3.2.13. Determinación de la concentración de las proteínas y de los ácidos nucleicos mediante espectrofotometría UV-visible**

La espectrofotometría es un método de análisis óptico que se utiliza para medir la cantidad de luz absorbida por las moléculas de una disolución en función de las longitudes de onda del espectro ultravioleta /visible. Cada compuesto químico absorbe, transmite o refleja la luz a lo largo de un cierto rango de longitud de onda.

El espectrofotómetro es un aparato que permite detectar la cantidad de luz transmitida y/o absorbida a través de una disolución de una muestra depositada en una cubeta (celda) y la compara con la que se transmite o absorbe a través de una solución de referencia o blanco.

A partir de los valores de absorbancia se puede determinar la concentración de la muestra aplicando la Ley de Lambert-Beer. La Ley de Lambert-Beer establece que la fracción de luz incidente que es absorbida por una solución, es proporcional a la concentración de soluto y al espesor de la sustancia atravesada por la luz.

$$A = \epsilon \times C \times l$$

*(A) es la absorbancia, ( $\epsilon$ ) es el coeficiente de extinción molar, (l) es la longitud de la cubeta y (c) la concentración de la muestra.*

#### **3.2.13.1. Concentración de las proteínas**

Las proteínas poseen un pico de absorción máxima a 280 nm. Los grupos responsables de tal característica son los aminoácidos aromáticos (Tirosina y Triptófano). Las proteínas poseen coeficientes de extinción molar ( $\epsilon_{280\text{nm}}$ ) que puede variar ligeramente en función de su composición de aminoácidos, como aproximación se puede considerar  $\epsilon_{280\text{nm}} = 1$ ; de modo

que una unidad de absorbancia se corresponde con una concentración (C) de 1 mg/ml de proteínas.

$$A_{280 \text{ nm}} = 1 \text{ mg/ml}$$

- ✓ *Si la disolución de proteínas contiene DNA y/o RNA se introduce un error en la medición, dado que estos absorben a 280 nm.*

Las muestras proteicas se diluyeron utilizando agua Milli Q y se midió la absorbancia a 280 en un espectrofotómetro (UV-1601 – Shimadzu).

### **3.2.13.2. Concentración de los ácidos nucleicos**

Los ácidos nucleicos absorben la luz ultravioleta a 260 nm debido a la presencia de los anillos aromáticos de las bases nitrogenadas. Esta característica permite determinar su concentración espectrofotométricamente aplicando la Ley de Lambert-Beer.

De forma que, para el DNA, 1 unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a una concentración de 50 µg/ml y para el RNA de 40 µg/ml.

Las muestras se diluyeron utilizando agua Milli Q y se midió la absorbancia a 260 y 320 nm (absorbancia debida a la turbidez de la muestra) en un espectrofotómetro (UV-1601 – Shimadzu).

La concentración se calculó aplicando las siguientes fórmulas:

$$[DNA] = (A_{260} - A_{320}) \times 50 \times 10^{-3} \times N = [ ] \text{ mg/ml}$$

$$[RNA] = (A_{260} - A_{320}) \times 40 \times 10^{-3} \times N = [ ] \text{ mg/ml}$$

- ✓ *Siendo N, el factor de dilución aplicado a la muestra*

### **3.2.14. Ensayo de la actividad desoxirribonucleasa de PD-L4 recombinante sobre el plásmido pCR2.1**

Para la detección de actividad desoxirribonucleasa de PD-L4 recombinante sobre el DNA circular se utilizó el plásmido pCR2.1. El plásmido se obtuvo previamente en el laboratorio (Métodos, apartados 3.2.12.). El ensayo se realizó en tubos cónicos estériles de 1,5 ml (Eppendorf); se añadieron 200 ng de plásmido pCR2.1 con 3 µg de las RIPs en un tampón 10 mM Tris-HCl, 5 mM Mg<sup>2+</sup>, 50 mM NaCl, en un volumen final de reacción de 10 µl, y la mezcla se incubó a 37° C durante 1 hora. Pasado este período, las muestras de DNA se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa 0.8% / TAE como se describe en Métodos, apartado 3.2.15.

### **3.2.15. Electroforesis de DNA en geles de agarosa**

La electroforesis en geles de agarosa es una técnica que se utiliza para separar, identificar y purificar fragmentos de DNA. Las moléculas de DNA, en presencia de un campo eléctrico, migran a través de la matriz de un gel de agarosa desde el polo negativo al polo positivo, separándose en función de su movilidad electroforética (Rf').

La agarosa es un polímero lineal de D-galactosa / 3-6 anhidro L-galactosa que se utiliza para la formación de geles cuyo rango de separación oscila entre 100 pb y 60 kb. El tamaño de poro del gel viene determinado por el porcentaje de agarosa, que se selecciona según el tamaño del fragmento del DNA que interesa separar. Los geles de agarosa se prepararon al 0,8% (p/v) en tampón TAE (40 mM Tris (pH 7.6), 20 mM ácido acético, 1mM EDTA); para ello, se utilizó un matraz Erlenmeyer y la mezcla se calentó en el microondas hasta que se disolvió la agarosa. La agarosa disuelta se dejó enfriar hasta aproximadamente 50°C y se depositó en un formador de geles que permitió generar unos orificios (pocillos) donde se colocaron las muestras. La electroforesis se desarrolló utilizando tampón TAE a un voltaje fijo de 80 voltios. Las muestras se prepararon añadiendo 0,3 vol. de tampón (45% glicerol (v/v), 10% TAE<sub>x10</sub>, 0,025% azul de bromofenol (p/v)) y se colocaron en los pocillos del gel. La electroforesis se desarrolló hasta que el azul de bromofenol alcanzó el final del gel (aproximadamente 1 hora 30 minutos). El gel se tiñó utilizando una solución de un colorante



*Producción biotecnológica en E. coli de la toxina PD-L4 de la planta Phytolacca dioica*

fluorescente, que contenía 10 µl GelRed 10000x en 100 ml de tampón TAE, con agitación durante 20-30 minutos. Las bandas de DNA se visualizaron a través de un transiluminador de luz ultravioleta (254-312 nm) incorporado en un equipo de imagen BioRad que permitió realizar una foto del resultado.



---

## ***Resultados***

---

## **4. Resultados**

### **4.1. Expresión heteróloga de la proteína recombinante PD-L4**

La expresión de la proteína recombinante se realizó en las condiciones experimentales descritas en Métodos, apartado 3.2.4.

Con el objeto de establecer las condiciones de crecimiento óptimo para llevar a cabo la inducción de la expresión de la toxina recombinante, se realizaron las curvas de crecimiento de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) y la cepa transformada con el plásmido recombinante *E. coli* BL21 (DE3)//pET-22b(+)-PD-L4 y se determinó la duración de las fases del crecimiento microbiano: latencia, exponencial y estacionaria.

Como se puede observar en la figura 4.1.1.A, donde se representa la absorbancia a 600 nm frente al tiempo de cultivo, se puede definir una fase de latencia de 1 hora, la fase exponencial comprendida entre 1-5 horas y la fase estacionaria a partir de las 5 horas. La transformación con el vector de expresión pET-22b(+)-PDL4 no afecta al crecimiento de la bacteria, lo que indica que en ausencia del inductor no se está produciendo expresión basal de la toxina.

En base a estas curvas de crecimiento, las bacterias transformadas con el vector recombinante *E. coli* BL21 (DE3)//pET-22b(+)-PD-L4 se indujeron con IPTG 1 mM cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,6 a 600 nm. Esta absorbancia corresponde a la fase exponencial temprana del cultivo, periodo en el que las células tienen la actividad metabólica más alta y se están duplicando activamente. Tras la inducción con IPTG el crecimiento bacteriano se siguió durante 6 horas para determinar si la expresión de la proteína PD-L4 era tóxica para las bacterias. Como se observa en la figura. 4.1.1.A el cultivo inducido apenas modifica el crecimiento cuando se compara con la cepa sin inducir, lo que indica que las bacterias son capaces de expresar la toxina PD-L4 recombinante sin que se afecten los ribosomas, dado que no se observa muerte celular.

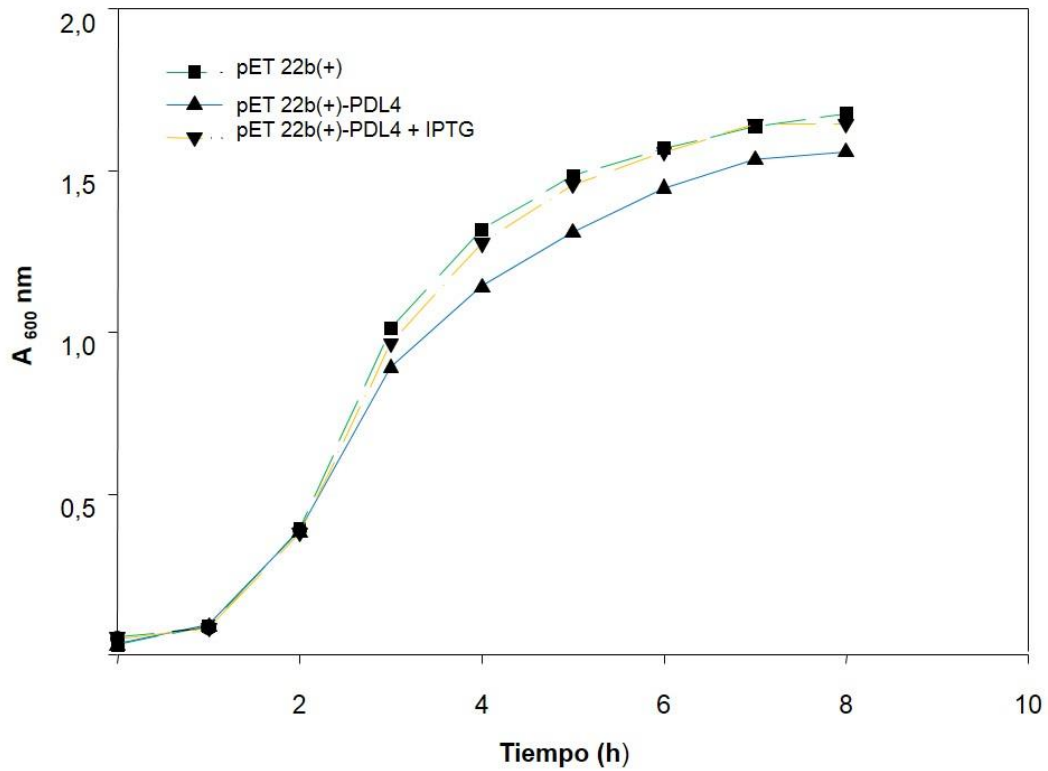


Figura 4.1.1. A. Curva de crecimiento de la cepa *E. coli* BL21(DE3) y de la cepa recombinante *E. coli* BL21(DE3)// pET-22b(+)-PD-L4 en ausencia y presencia del inductor (IPTG).

Para determinar la expresión de la proteína recombinante se tomaron muestras del cultivo antes de la inducción y tras la inducción con IPTG. Se utilizó una concentración de IPTG 1mM y un tiempo de inducción de 3 horas porque son las condiciones óptimas para la expresión de proteínas en esta cepa de *E. coli* [41]. Las proteínas bacterianas se extrajeron utilizando un tampón desnaturante y se analizaron mediante electroforesis como se indica en Métodos, apartado 3.2.7.

El análisis electroforético en SDS-PAGE (Figura 4.1.1.B) de las fracciones en ausencia (calle 2) y presencia de inductor (calle 3) mostró una banda intensa correspondiente a una proteína, que no está presente en la muestra sin inducir y cuya masa molecular relativa es de 29 kDa, igual a la de la proteína PD-L4 nativa (calle 4). La proteína recombinante expresada se localiza en la fracción proteica insoluble, en cuerpos de inclusión en el citoplasma de la bacteria.

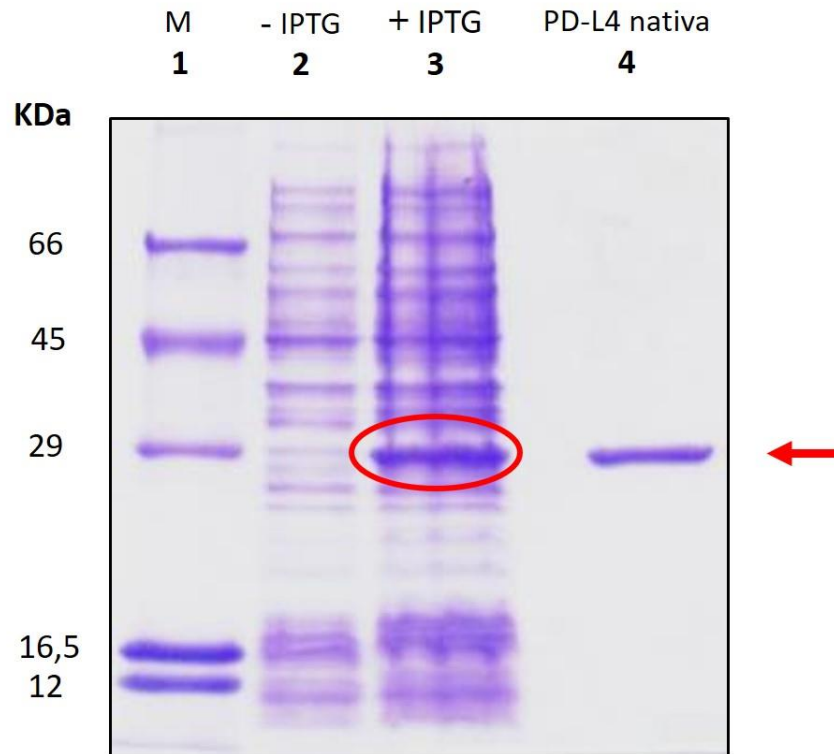


Figura 4.1.1.B. Análisis electroforético (SDS-PAGE) de la fracción proteica del clon *E. Coli* BL21 (DE3)/pET 22b(+)-PD-L4: 1, Marcadores de PM; 2, Clon no inducido; 3, Clon inducido con IPTG 1 mM; 5, Proteína PD-L4 nativa.

## 4.2. Aislamiento y solubilización de cuerpos de inclusión de *E. coli*

La producción de proteínas recombinantes en *E. coli*, con un alto nivel de expresión, conduce en la mayoría de los casos a la acumulación de una cantidad alta de proteína en el citoplasma, dando lugar a la formación de agregados de proteínas llamados cuerpos de inclusión, que se pueden observar bajo un microscopio de contraste de fases como agregados densos, generalmente localizados en los extremos polares de la célula. Las proteínas en los cuerpos de inclusión, aunque poseen una estructura primaria correcta, son biológicamente inactivas debido a las diferencias conformacionales en comparación con la forma nativa correspondiente. Las proteínas confinadas en los cuerpos de inclusión a menudo tienen la ventaja de ser fácilmente purificables, realizando tratamientos para romper la membrana bacteriana que permiten liberar el contenido citoplasmático, recuperar los cuerpos de inclusión mediante centrifugación a baja velocidad y posteriormente purificar la proteína.

En este trabajo se utilizó una estrategia de purificación de la proteína recombinante a partir de cuerpos de inclusión basada en la realización de varios lavados del sedimento que permiten eliminar cualquier contaminante y posteriormente la solubilización utilizando altas concentraciones de un agente desnaturizante (guanidina-HCl 6M), tal como se describe en Métodos, sección 3.2.5.3.

La primera fase del proceso tiene por objeto romper las células bacterianas, para ello se utilizó un tampón de resuspensión Tris HCl que contenía EDTA como inhibidor de proteasas y sacarosa para aumentar la solubilidad; posteriormente, se llevó a cabo la lisis utilizando tratamientos enzimáticos (lisozima) y mecánicos (ultrasonidos). Durante la segunda fase se realizó una pre-extracción para eliminar los contaminantes de la membrana y la pared celular de *E. coli* mediante dos lavados con un tampón que contenía un detergente no desnaturizante (Triton-X100) y urea 2 M. Finalmente, se realizaron dos lavados sólo con tampón TE que se llevaron a cabo para eliminar el exceso de detergente.

Los cuerpos de inclusión se resuspendieron finalmente en guanidina-HCl 6 M, que rompe las interacciones proteína-proteína y disuelve los agregados formados durante la expresión. Tras la incubación con guanidina-HCl, la proteína recombinante extraída de los cuerpos de inclusión se evaluó mediante análisis electroforético del sobrenadante y el pellet obtenidos mediante centrifugación.

Como se observa en la figura 4.2.1 la mayor parte de la proteína expresada, aproximadamente el 90%, se ha solubilizado y se encuentra en la fracción del sobrenadante (calle S). Conseguir una tasa de solubilización alta es imprescindible para poder purificar la proteína y obtener un buen rendimiento de proteína activa.

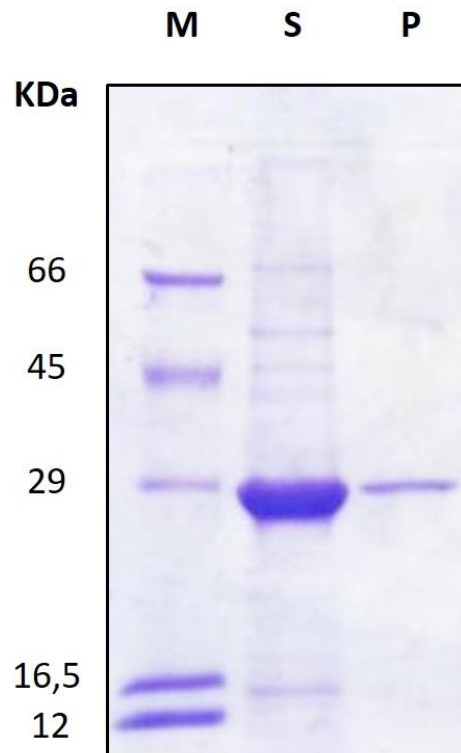


Figura 4.2.1 Análisis electroforético (SDS-PAGE) de las fracciones obtenidas después del tratamiento de solubilización de los cuerpos de inclusión: M, Marcadores de PM; S, Sobrenadante; P, Pellet.

### 4.3. Plegamiento de la proteína (“Refolding”)

El protocolo descrito anteriormente permite obtener la proteína recombinante en la forma desnaturalizada. En la fase inicial del proceso de renaturalización la cadena polipeptídica asume una serie de conformaciones casuales antes de replegarse en la estructura tridimensional correcta. *In vivo* este proceso es llevado a cabo por las enzimas que catalizan la formación de los puentes disulfuro (disulfuro isomerasas), la isomerización de la prolina (prolina isomerasa) y las que están limitando la agregación del estado intermediario (chaperoninas). *In vitro*, para sustituir esta mezcla de enzimas, se utilizan condiciones experimentales basadas en la retirada controlada del agente desnaturalizante; para lograr este propósito los principales métodos utilizados son la dilución y la diálisis. El plegado de la proteína PD-L4 recombinante se realizó mediante dilución y se utilizó el protocolo de Chambery et al. [41]. Inicialmente, se llevó a cabo la reducción total de las proteínas

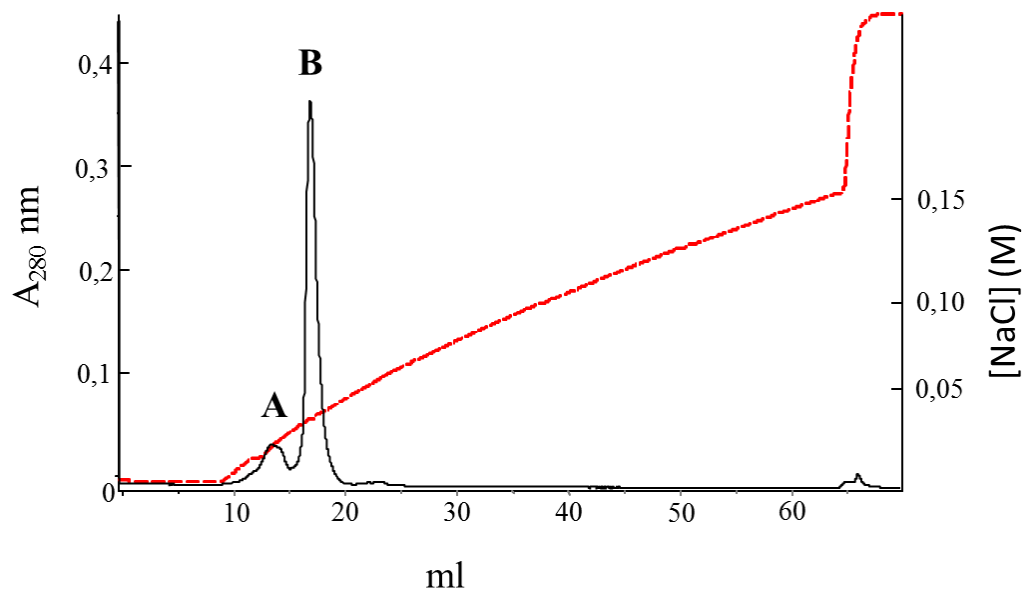


presentes en la mezcla obtenida tras la lisis bacteriana, utilizando glutatión reducido (GSH) a una concentración final 0,1 M. Posteriormente, la mezcla se diluyó lentamente y con agitación constante, hasta una concentración final de proteína muy baja (0,07 mg/ml). Para ello, se utilizó un tampón que contenía el par glutatión reducido / glutatión oxidado y L-arginina como co-disolvente; el proceso se realizó bajo una atmósfera de nitrógeno [41]. Después de la incubación en el tampón de renaturalización, la fracción soluble se dializó frente a tampón Na / P 5 mM, pH 7,2 como se describe en Métodos, sección 3.2.5.4. El plegamiento de la proteína (refolding) constituye una de las etapas más críticas y en general la de mayor dificultad en la producción de proteínas recombinantes activas. El protocolo necesita ser optimizado para cada proteína concreta y el éxito del proceso es muy variable y depende mucho de la estructura primaria de la proteína. Durante este proceso la proteína debe de plegarse para adquirir la conformación nativa y evitar otros plegamientos. La estructura primaria de la proteína PD-L4 contiene 4 residuos de cisteína que dan lugar a 2 enlaces disulfuro intracatenarios; durante el proceso de plegamiento, cuando la concentración de proteína es muy alta, se generan agregados proteicos inactivos, que en este caso además se ven favorecidos como consecuencia de formación de enlaces disulfuro intercatenarios entre distintas moléculas de proteína. La concentración del par GSH / GSSG juega un papel fundamental en la formación correcta de los enlaces disulfuro para adquirir la conformación nativa. Sólo la proteína correctamente plegada adquiere la actividad enzimática que permitirá su posterior utilización como parte de inmunoconjugados.

#### **4.4. Purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de intercambio catiónico-FPLC**

La purificación de la proteína se llevó a cabo utilizando una cromatografía de intercambio catiónico (Source TM 15S 4.6/100 PE) para FPLC-AKTA. El sobrenadante obtenido después de la renaturalización se dializó frente a Na / P 5 mM, pH 7,2 (tampón A) y se cargó en la columna previamente equilibrada con tampón A. La elución después de la carga se realizó con un segundo tampón con la misma concentración de Na / P, pero con la adición de NaCl 0,3 M (tampón B), usando un gradiente lineal de tampón B. Se realizaron 3 cromatografías consecutivas, en cada una de ellas se cargó en la columna 10 ml de la disolución proteica renaturalizada. El resultado que se obtuvo fue el mismo en los 3 casos (la figura 4.4.1.A

corresponde a un perfil representativo). El perfil cromatográfico obtenido para la proteína recombinante muestra la presencia de dos componentes de la proteína (Figura 4.4.1.A): un pico A, muy pequeño (elución a los 12 minutos aplicando un flujo de 1 ml/min) y un pico B, que contiene la mayor parte de la proteína (elución a los 16 minutos). El primer pico (A) corresponde a agregados proteicos inactivos. El segundo pico (B) de mayor amplitud, contiene la proteína recombinante correctamente plegada, las fracciones de este pico se recogieron y se analizaron mediante electroforesis (SDS-PAGE) utilizando un gel de poliacrilamida del 12% en presencia del reductor 2-Mercaptoetanol, como se indica en Métodos, sección 3.2.7. La tinción del gel con el colorante Azul Coomassie revela que en el pico B hay una sola proteína homogénea con un peso molecular aparente de 29 kDa, que coincide con el de la proteína PD-L4 nativa y que corresponde al del producto recombinante esperado (Figura 4.4.1.B). Tras el análisis electroforético se juntaron las fracciones correspondientes al pico B de las tres cromatografías, se dializaron frente agua, se concentraron y se determinó la concentración midiendo la absorbancia a  $A_{280}$ . El rendimiento final del proceso fue de 1,26 mg de proteína PD-L4 recombinante por 1l de cultivo.



*Figura 4.4.1.A. Purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de intercambio catiónico (Source 15S). El producto recombinante obtenido tras el proceso de renaturalización, se purificó como se detalla en Métodos, apartado 3.2.6. La elución se realizó con un flujo de 1 ml/min.*

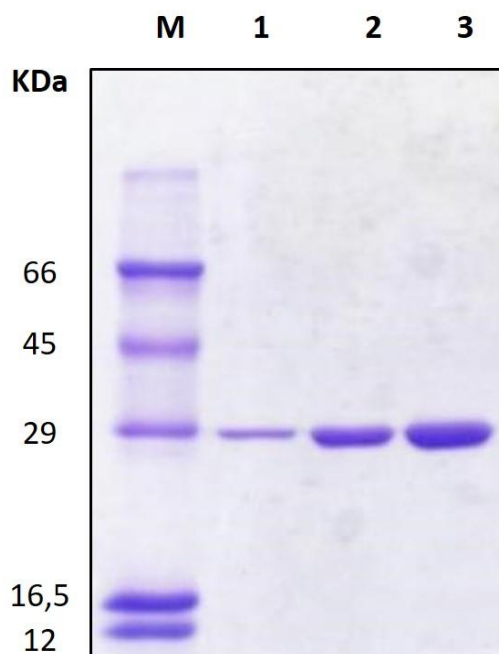
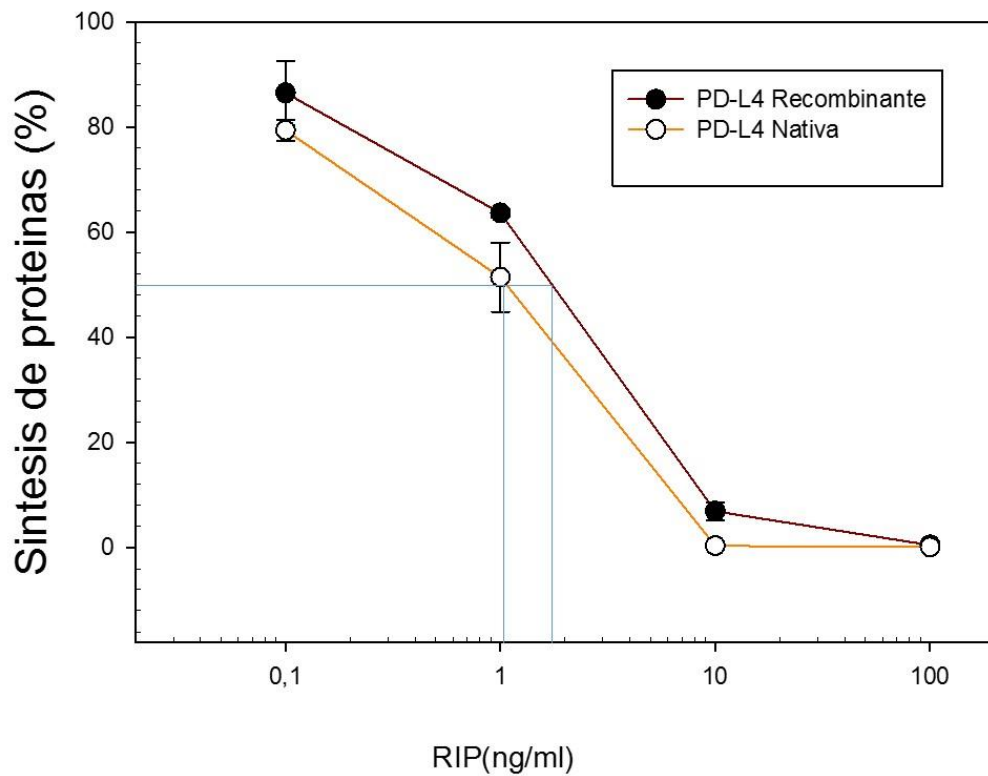


Figura 4.4.1.B. Análisis electroforético del pico B de la cromatografía de intercambio catiónico. Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida 12% en presencia de 2-mercaptoetanol (2ME). Calle 1, proteína nativa (1,5µg). Calles 2 y 3, corresponden a 3 y 5 µg de proteína del pico B respectivamente. Los números de la derecha indican kDa de los marcadores utilizados.

#### 4.5. Determinación de la actividad inhibidora de la PD-L4 recombinante en la síntesis de proteínas dirigida por un mensajero exógeno

El efecto de PD-L4 recombinante sobre la síntesis de proteínas se determinó en un sistema acelular de síntesis proteica de lisados de reticulocitos de conejo (Promega), mediante el cual se tradujo el mensajero que codifica para la proteína luciferasa, cuya síntesis se llevó a cabo utilizando un sistema de transcripción-traducción *in vitro*, tal y como se describe en Métodos, apartado 3.2.8. La actividad inhibidora de la PD-L4 recombinante se determinó utilizando un rango de concentraciones de RIP comprendido entre 0,1 y 100 ng/ml. Como se puede observar en la figura 4.5.1, a medida que aumenta la concentración de RIP, la síntesis de proteínas se inhibe progresivamente hasta llegar a una inhibición completa a una concentración de RIP de 10 ng/ml, obteniéndose un valor de  $IC_{50}$  (concentración de toxina

que inhibe la síntesis de proteínas un 50%) de 1.7 ng/ml. Este valor es ligeramente mayor que el obtenido para para la proteína PD-L4 nativa que fue de 1,1 ng/ml. La diferencia de toxicidad es muy pequeña, lo que indica que la preparación de proteína recombinante se ha plegado correctamente y tiene una actividad catalítica prácticamente idéntica a la proteína nativa.



*Figura 4.5.1 Actividad inhibidora de PD-L4 sobre la síntesis de proteínas en lisados de reticulocitos de conejo. La síntesis se realizó en las condiciones que se especifican en el apartado 3.2.8. Los datos corresponden a la media de dos experimentos que se han realizado por duplicado para las muestras tratadas con RIP y por cuadruplicado los controles. Las barras indican el error estándar de la media.*

#### **4.6. Actividad N-glicosilasa de PD-L4 sobre los ribosomas de reticulocitos de conejo**

La actividad N-glicosilasa de la RIP recombinante en el bucle  $\alpha$ -sarcina / ricina del rRNA 28S se determinó en ribosomas de reticulocitos de conejo, que es un sistema eucariótico modelo, muy sensible a la actividad de las RIPs. El experimento se realizó como se indica en Métodos, apartado 3.2.9, los ribosomas se incubaron con 3  $\mu$ g de PD-L4 nativa o recombinante, posteriormente se extrajo el RNA ribosómico y se trató con anilina ácida para romper el RNA en el sitioapurínico. El RNA tratado se analizó mediante una electroforesis en un gel desnaturalizante de poliacrilamida 5% – urea 7 M. Como se observa en la figura 4.6.1, el tratamiento con anilina provocó la liberación de un fragmento de RNA de 480 bases en los ribosomas incubados con las RIPs, tanto la proteína nativa como la PD-L4 recombinante. Este fragmento que se libera del extremo 3' del rRNA 28S, es característico del modo de acción de las RIPs y se denomina “fragmento de Endo”. El resultado obtenido en este experimento indica claramente que el efecto inhibitorio de la proteína recombinante sobre la síntesis de proteínas es debido a la actividad N-glicosilasa, que depurina el RNA ribosómico eucariótico impidiendo la interacción del factor de elongación EF-2 con el ribosoma, deteniendo la síntesis proteica en la etapa de elongación.

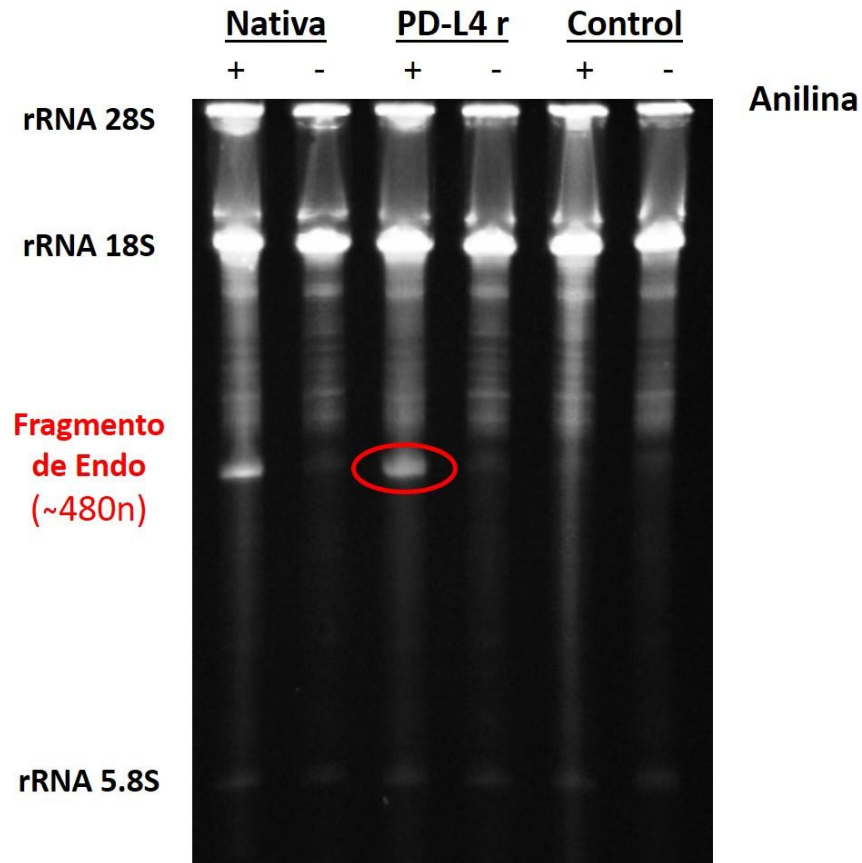
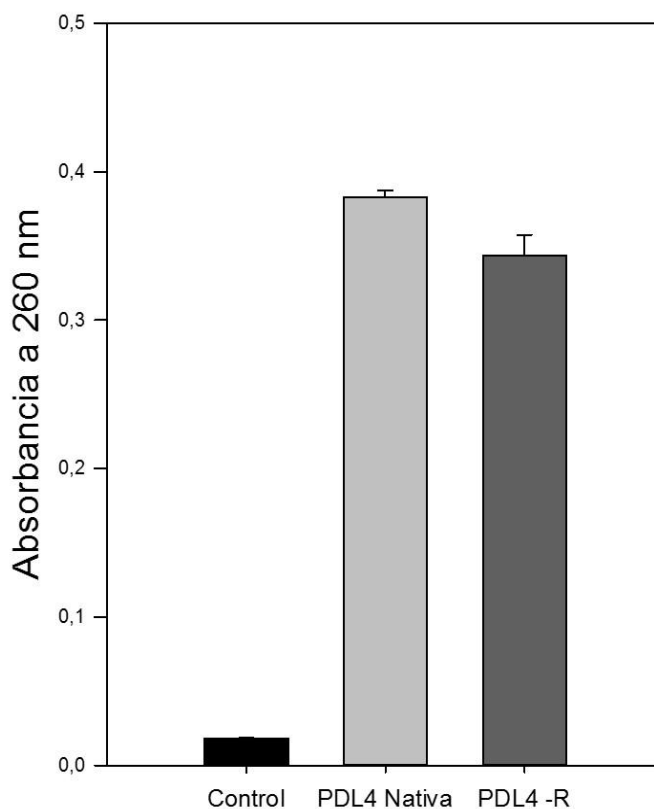


Figura 4.6.1 Actividad N-glicosilasa de las RIPs sobre el rRNA 28S de reticulocitos de conejo. Las calles 1-4 comenzando por la izquierda, corresponden a RNA obtenido de ribosomas tratados con 3 $\mu$ g de RIP: (1-2) PD-L4 nativa, (3-4) PD-L4 recombinante, en ambos casos +/- anilina. Las calles 5-6, corresponden al RNA de ribosomas control. El fragmento liberado como consecuencia de la acción de la RIP aparece marcado con un círculo rojo.

#### 4.7. Actividad polinucleótido: adenina glicosilasa de PD-L4 recombinante sobre DNA genómico eucariótico

Dado que la RIP nativa tiene actividad polinucleótido: adenina glicosilasa sobre el DNA genómico [41], se investigó si la proteína recombinante mantenía esta actividad tras la expresión en las bacterias. El experimento se llevó a cabo utilizando DNA genómico de esperma de salmón en las condiciones indicadas en Métodos, apartado 3.2.11. La actividad de la proteína recombinante se comparó con la RIP nativa purificada de las hojas de *Phytolacca dioica*, la cantidad de adeninas liberadas del DNA se determinó midiendo la absorbancia a

260 nm. Como se puede observar en la figura 4.7.1, la RIP recombinante tiene una actividad extraordinariamente alta, prácticamente idéntica a la de la proteína nativa.



*Figura 4.7.1 Actividad polinucleótido: adenina glicosilasa de las RIPs sobre DNA de esperma de salmón. La primera columna corresponde al DNA control, sin tratar con RIP. Las columnas 2 y 3 corresponden al DNA tratado con la RIP nativa y recombinante respectivamente. Los datos corresponden a la medida de dos experimentos que se han realizado por duplicado para las muestras tratadas con RIP, y por cuadruplicado para los controles. Las barras indican el error estándar de la media.*

#### **4.8. Actividad desoxirribonucleasa (DNasa) de PD-L4 recombinante sobre el plásmido pCR2.1**

Se investigó si la RIP recombinante tenía actividad sobre el DNA plasmídico, dado que la proteína nativa es capaz de actuar sobre el DNA circular y catalizar en mayor o menor medida, en algunos plásmidos, la conversión de DNA superenrollado a formas relajadas o lineales cortando en sitios específicos el DNA circular, mostrando actividad

desoxirribonucleasa [32]. El experimento se realizó en el plásmido pCR2.1 que tiene un tamaño de 3,9 kb (Anexo III) como se ha descrito en Métodos, apartado 3.2.14

En la figura 4.8.1 se muestra el resultado que se obtuvo cuando se analizó el DNA plasmídico tratado con la RIP, mediante una electroforesis en un gel de agarosa del 0,8%. La calle 1 de esta electroforesis corresponde al DNA del bacteriófago lambda tratado con las endonucleasas de restricción EcoRI y HindIII, para generar un patrón de fragmentos de DNA característico, que se utilizan habitualmente como marcadores de peso molecular. En la calle 2, que corresponde al plásmido pCR2.1 (control), aparecen en el gel varias bandas correspondientes a moléculas de DNA con distinta movilidad electroforética; una banda inferior con un mayor desplazamiento que corresponde a la forma del DNA superenrollado (S), que es la predominante en la preparación del plásmido, y dos bandas de menor intensidad, más retrasadas por su menor movilidad, que corresponde al DNA relajado (R). Estas bandas (R) contiene moléculas de DNA menos empaquetadas debido fundamentalmente a que durante el proceso de purificación del plásmido se rompe una de las hebras provocando el desenrollamiento parcial de la molécula. La calle 3 corresponde al plásmido pCR2.1 tratado con la proteína recombinante; el resultado obtenido indica que tiene actividad desoxirribonucleasa sobre el plásmido; la forma superenrollada (S) ha disminuido de intensidad cuando se compara con el control y aproximadamente el 50% del DNA está en la forma relajada (R). La actividad de la proteína es dependiente de iones magnesio, observándose un aumento de la actividad nucleasa a 5 mM, a esta concentración el 90% del DNA superenrollado (S) se ha convertido en la forma relajada (R), observándose además la aparición de formas lineales (L) que indican que esta RIP puede cortar las dos hebras de DNA (calle 4).

La actividad desoxirribonucleasa observada para la proteína recombinante es idéntica a la descrita para la proteína nativa. El incremento de la actividad desoxirribonucleasa en presencia de cationes divalentes ha sido citado para varias RIPs de tipo 1 [6].



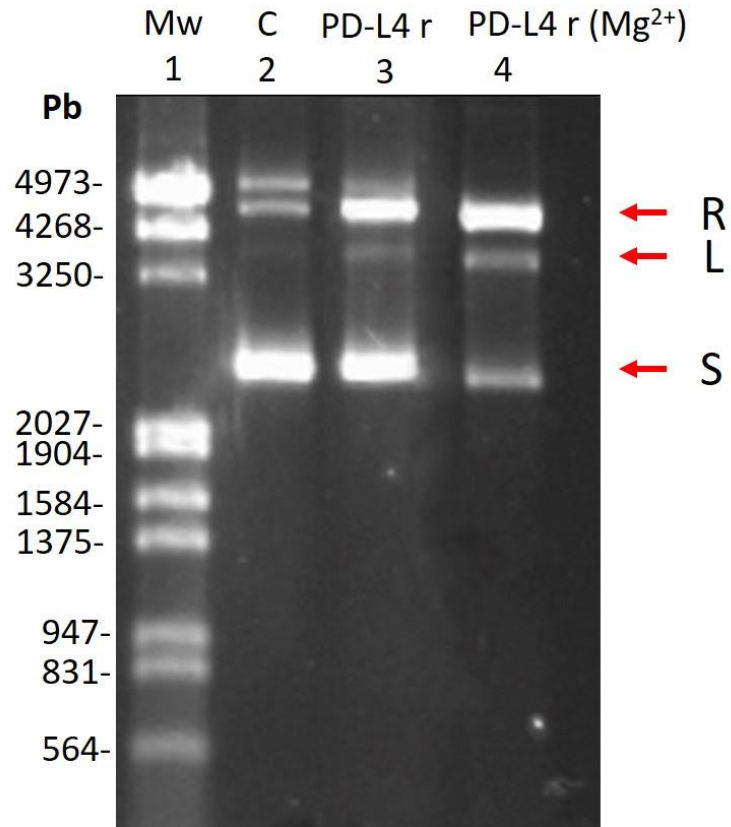


Figura 4.8.1 Actividad desoxirribonucleasa de PD-L4 recombinante sobre el plásmido pCR2.1. El tratamiento del plásmido con la RIP y la electroforesis en geles de agarosa 0,8% se realizó como se indica en el apartado 3.2.14. La cantidad de muestra utilizada fue 100 ng/calle. Calle 1,  $\lambda$ EcoRI/HindIII los tamaños en pb de los fragmentos; Calle 2, pCR2.1; Calle 3, pCR2.1 tratado con PD-L4 recombinante en ausencia de iones magnesio; Calle 4 pCR2.1 tratado con PD-L4 recombinante en presencia de 5mM de magnesio. Las flechas indican la posición de las bandas correspondientes a las tres conformaciones de DNA: R, DNA circular relajado; S, DNA circular superenrollado, y L, DNA lineal.



---

## ***Conclusiones***

---

## **5. Conclusiones**

- Las bacterias *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido recombinante pET-22b(+)-PD-L4 expresaron la proteína PD-L4 en cuerpos de inclusión.
- El procedimiento de solubilización de los cuerpos de inclusión y de renaturalización de la proteína, que se ha desarrollado en este trabajo, permitió recuperar aproximadamente un 90% de la proteína expresada en la bacteria.
- La purificación mediante una cromatografía de intercambio catiónico (Source TM 15 S) dio lugar a un pico mayoritario de proteína homogénea de 29 kDa.
- La proteína PD-L4 recombinante purificada inhibió la síntesis de proteínas con una  $IC_{50}$  de 1,7 ng/ml, prácticamente idéntica a la nativa, lo que indica que se ha renaturalizado correctamente y ha adquirido la estructura 3<sup>a</sup> activa.
- La proteína recombinante tiene actividad N-glicosilasa específica en el RNAr eucariótico 28S, donde se ha observado que el tratamiento con anilina provoca la liberación de un fragmento de 480 n, así como las actividades polinucleótido: adenina glicosilasa y desoxirribonucleasa en el DNA, características de la proteína PD-L4 nativa.
- El rendimiento del proceso de expresión y purificación ha sido de 1,26 mg de proteína recombinante por litro de cultivo bacteriano, lo que permite disponer de cantidad suficiente de proteína homogénea para la síntesis de inmunoconjugados.

---

## ***Bibliografía***

---

## 6. Bibliografía

- [1] T. Girbes, J. M. Ferreras, F. J. Arias y F. Stirpe, «Description, Distribution, Activity and Phylogenetic Relationship of Ribosome-Inactivating Proteins in Plants, Fungi and Bacteria,» *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 4, nº Issue 5, pp. 461-476, 2004.
- [2] T. G. Obrig, «Shiga toxin mode of action in *E. coli* O157:H7 disease.,» *Frontiers in Bioscience*, pp. 635-642, 1997.
- [3] R.-s. Liu, J.-h. Yang y W.-Y. Liu, «Isolation and enzymatic characterization of lamjapin, the first ribosome-inactivating protein from cryptogamic algal plant (*Laminaria japonica* A),» *The FEBS Journal*, vol. 269, nº Issue 19, pp. 4746-4752, 2002.
- [4] S. Lam y T. Ng, «First Simultaneous Isolation of a Ribosome Inactivating Protein and an Antifungal Protein from a Mushroom (*Lyophyllum shimeji*) Together with Evidence for Synergism of their Antifungal Effects,» *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 393, nº Issue 2, pp. 271-280, 2001.
- [5] F. Stirpe y M. G. Battelli, «Ribosome-inactivating proteins: progress and problems,» *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, vol. 63, nº Issue 16, pp. 1850-1866, 2006.
- [6] R. Iglesias, L. Citores, S. Ragucci, R. Russo, A. Di Maro y J. M. Ferreras, «Biological and antipathogenic activities of ribosome-inactivating proteins from *Phytolacca dioica* L.,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1860, nº Issue 6, pp. 1256-1264, 2016.
- [7] A. Bolognesi, M. Bortolotti, S. Maiello, M. G. Battelli y L. Polito, «Ribosome-Inactivating Proteins from Plants: A Historical Overview,» *molecules*, vol. 21, nº Issue 12, 2016.
- [8] L. Barbieri y F. Stirpe, «Ribosome-inactivating proteins from plant: properties and possible uses,» *Cancer Surveys*, vol. 1, pp. 489-520, 1982.
- [9] Y. Endo y K. Tsurugi, «RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes.,» *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 262, nº Issue 17, pp. 8128-8130, 1987.

- [10] A. Di Maro, L. Citores, R. Russo, R. Iglesias y J. M. Ferreras, «Sequence comparison and phylogenetic analysis by the Maximum Likelihood method of ribosome-inactivating proteins from angiosperms,» *Plant Molecular Biology*, vol. 85, nº Issue 6, pp. 575-588, 2014.
- [11] S. Narayanan, K. Surendranath, N. Bora, A. Surolia y A. A. Karande, «Ribosome inactivating proteins and apoptosis,» *FEBS Letters*, vol. 579, nº Issue 6, p. 1324–1331, 2005.
- [12] L. Citores, R. Iglesias y J. M. Ferreras, «Ribosome Inactivating Proteins from Plants: Biological Properties and their Use in Experimental Therapy,» *Antitumor Potential and other Emerging Medicinal Properties of Natural Compounds*, vol. Part 3, pp. 127-143, 2013.
- [13] M. De Virgilio, A. Lombardi, R. Caliandro y M. S. Fabbrini, «Ribosome-Inactivating Proteins: From Plant Defense to Tumor Attack,» *Toxins*, vol. 2, nº Issue 11, pp. 2699-2737, 2010.
- [14] F. Stirpe, «Ribosome-inactivating proteins: From toxins to useful proteins.,» *Toxins*, vol. 67, pp. 12-16, 2013.
- [15] S. Olsnes, «Ricin and ricinus agglutinin, toxic lectins from castor bean,» *Methods in Enzymology*, vol. 50, pp. 330-335, 1978.
- [16] R. Iglesias, L. Citores, J. M. Ferreras, Y. Pérez, P. Jiménez, M. J. Gayoso, S. Olsnes, R. Tamburino, A. Di Maro, A. Parente y T. Girbés, «Sialic acid-binding dwarf elder four-chain lectin displays nucleic acid N-glycosidase activity,» *Biochimie*, vol. 92, nº Issue 1, pp. 71-80, 2010.
- [17] A. V. Domashevskiy y D. J. Goss, «Pokeweed Antiviral Protein, a Ribosome Inactivating Protein: Activity, Inhibition and Prospects,» *Toxins (Review)*, vol. 7, nº Issue 2, pp. 274-298, 2015.
- [18] J. Schrot, A. Weng y M. F. Melzig, «Ribosome-Inactivating and Related Proteins.,» *Toxins (Basel)*, vol. 7, nº Issue 5, pp. 1556-1615, 2015.
- [19] L. Frigerio, N. A. Jolliffe, A. Di Cola, D. H. Felipe, N. Paris, J.-M. Neuhaus, J. M. Lord, A.

- Ceriotti y L. M. Roberts, «The Internal Propeptide of the Ricin Precursor Carries a Sequence-Specific Determinant for Vacuolar Sorting,» *Plant Physiology*, vol. 126, nº 1, pp. 167-175, 2001.
- [20] T. Girbés, J. Ferreras, F. Arias, R. Muñoz, R. Iglesias, P. Jimenez, M. Rojo, Y. Arias, Y. Perez, J. Benitez, D. Sanchez y M. Gayoso, «Non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins (RIPs) from Sambucus: occurrence, cellular and molecular activities and potential uses.,» *Cellular and molecular biology*, vol. 49, pp. 537-545, 2003.
- [21] R. Iglesias, Y. Pérez, L. Citores, J. M. Ferreras, E. Méndez y T. Girbés, «Elicitor-dependent expression of the ribosome-inactivating protein beetin is developmentally regulated,» *Journal of Experimental Botany*, vol. 59, nº Issue 6, pp. 1215-1223, 2008.
- [22] P. Wang y N. E. Turner, «Virus resistance mediated by ribosome inactivating proteins,» *Advances in Virus Research*, vol. 55, pp. 325-355, 2000.
- [23] V. G. Checker, A. K. Chhibbar y P. Khurana, «Stress-inducible expression of barley Hva1 gene in transgenic mulberry displays enhanced tolerance against drought, salinity and cold stress,» *Transgenic Research*, vol. 21, nº Issue 5, pp. 939-957, 2011.
- [24] S. Mansouri, E. Nourollahzadeh y K. A. Hudak, «Pokeweed antiviral protein depurinates the sarcin/ricin loop of the rRNA prior to binding of aminoacyl-tRNA to the ribosomal A-site,» *RNA*, vol. 12, pp. 1683-1692, 2006.
- [25] D. Basu y N. E. Tumer, «Do the A Subunits Contribute to the Differences in the Toxicity of Shiga Toxin 1 and Shiga Toxin 2?,» *Toxins*, vol. 7, nº Issue 5, pp. 1467-1485, 2015.
- [26] L. Barbieri, P. Valbonesi, M. Bondioli, M. L. Alvarez, P. Dal Monte, M. P. Landini y F. Stirpe, «Adenine glycosylase activity in mammalian tissues: an equivalent of ribosome-inactivating proteins,» *FEBS Letters*, vol. 505, nº Issue 1, pp. 196-197, 2001.
- [27] R. Iglesias, Y. Pérez, C. de Torre, J. M. Ferreras, P. Antolín, P. Jiménez, M. Á. Rojo, E. Méndez y T. Girbés, «Molecular characterization and systemic induction of single-chain ribosome-inactivating proteins (RIPs) in sugar beet (*Beta vulgaris*) leaves,» *Experimental Botany*, vol. 56, nº Issue 416, pp. 1675-1684, 2005.
- [28] A. Parente, R. Berisio, A. Chambery y A. Di Maro, «Type 1 Ribosome-Inactivating



- Proteins from the Ombú Tree (*Phytolacca dioica* L.),» *Toxic Plant Proteins*, vol. 18, pp. 79-106, 2010.
- [29] A. Parente, A. Chambery, A. Di Maro, R. Russo y V. Severino, «Ribosome-inactivating Proteins from Phytolaccaceae,» *Ribosome-inactivating Proteins: Ricin and Related Proteins*, vol. Chapter 3, pp. 28-43, 2014.
- [30] A. Di Maro, A. Chambery, V. Carafa, S. Costantini, G. Colonna y A. Parente, «Structural characterization and comparative modeling of PD-Ls 1–3, type 1 ribosome-inactivating proteins from summer leaves of *Phytolacca dioica* L.,» *Biochimie*, vol. 91, nº Issue 3, pp. 352-363, 2009.
- [31] A. Parente, B. Conforto, A. Di Maro, A. Chambery, P. De Luca, A. Bolognesi, M. Iriti y F. Faoro, «Type 1 ribosome-inactivating proteins from *Phytolacca dioica* L. leaves: Differential seasonal and age expression, and cellular localization.,» *Planta*, vol. 228, pp. 963-975, 2008.
- [32] A. Ruggiero, A. Chambery, A. Di Maro, A. Parente y R. Berisio, «Atomic resolution (1.1 Å) structure of the ribosome-inactivating protein PD-L4 from *Phytolacca dioica* L. leaves,» *Proteins*, vol. 71, nº Issue 1, pp. 8-15, 2008.
- [33] R. Gilabert-Oriol, A. Weng, B. von Mallinckrodt, M. F. Melzig, H. Fuchs y M. Thakur, «Immunotoxins Constructed with Ribosome-Inactivating Proteins and their Enhancers: A Lethal Cocktail with Tumor Specific Efficacy,» *Current Pharmaceutical Design*, vol. 20, nº Issue 42, pp. 6584-6643, 2015.
- [34] P. Jonasson, S. Liljeqvist, P.-A. Nygren y S. Ståhl, «Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*,» *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 35, nº Issue 2, pp. 91-105, 2002.
- [35] J. H. Choi, K. C. Keum y S. Y. Lee, «Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*,» *Chemical Engineering Science*, vol. 61, nº Issue 3, pp. 876-885, 2006.
- [36] R. Donovan, C. Robinson y B. Glick, «Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter,» *Journal of*

*Industrial Microbiology*, vol. 16, nº Issue 3, pp. 145-154, 1996.

- [37] H. Yamaguchi y M. Miyazaki, «Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies,» *Biomolecules*, vol. 4, nº Issue 1, pp. 235-251, 2014.
- [38] M. O'Hare, A. N. Brown, K. Hussain, A. Gebhardt, G. Watson, L. M. Roberts, E. S. Vitetta, P. E. Thorpe y J. Lord, «Cytotoxicity of a recombinant ricin-A-chain fusion protein containing a proteolytically-cleavable spacer sequence,» *FEBS Letters*, vol. 273, nº Issue 1-2, pp. 200-204, 1990.
- [39] A. Lombardi, R. S. Marshall, C. Savino, M. S. Fabbrini y A. Ceriotti, «Type I Ribosome-Inactivating Proteins from *Saponaria officinalis*,» *Toxic Plant Proteins*, vol. 18 of the series Plant Cell Monographs, pp. 55-78, 2010.
- [40] F. Del Vecchio Blanco, V. Cafaro, A. Di Maro, R. Scognamiglio, G. Siniscalco, A. Parente y A. Di Donato, «A recombinant ribosome-inactivating protein from the plant *Phytolacca dioica* L. produced from a synthetic gene,» *FEBS Letters*, vol. 437, nº Issue 3, pp. 241-245, 1998.
- [41] A. Chambery, M. Pisante, A. Di Maro, E. Di Zazzo, M. Ruvo, S. Costantini, G. Colonna y A. Parente, «Invariant Ser211 is involved in the catalysis of PD-L4, type I RIP from *Phytolacca dioica* leaves,» *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 67, nº Issue 1, p. 209–218, 2007.
- [42] A. Di Maro, P. Valbonesi, A. Bolognesi, F. Stirpe, P. De Luca, G. S. Gigliano, L. Gaudio, P. Delli Bovi, P. Ferranti, A. Malorni y A. Parente, «Isolation and characterization of four type-1 ribosome-inactivating proteins, with polynucleotide:adenosine glycosidase activity, from leaves of *Phytolacca dioica* L.,» *Planta*, vol. 208, nº Issue 1, pp. 125-131, 1999.
- [43] L. UK, «Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.,» *Nature*, vol. 227, nº Issue 5259, pp. 680-685, 1970.
- [44] R. Iglesias, L. Citores y J. M. Ferreras, «Ribosomal RNA N-glycosylase Activity Assay of Ribosome-inactivating Proteins,» *Bio-protocol*, vol. 7, nº 6, p. e2180, 2017.

---

***Listado de tablas y figuras***

---

## **7. Listado de tablas y figuras**

### **7.1. Tablas**

- **Tabla 3.1.2.1.** Tabla de reactivos utilizados.
- **Tabla 9.1.1.** Tabla de RIPs de tipo 1 que han sido aisladas de plantas de la familia *Phytolaccaceae*.
- **Tabla 9.2.1.** Lista de inmunotoxinas que se encuentra en fase clínica en el tratamiento del cáncer.

### **7.2. Figuras**

- **Figura 1.1.1.** Línea de tiempo de los hitos en la investigación de RIPs.
- **Figura 1.2.1.** Clasificación de las RIPs (figura modificada de Citores et al, 2013).
- **Figura 1.4.1.** Secuencia conservada de rRNA 28S que es depurinada por la RIP.
- **Figura 1.4.2.** Inhibición de la síntesis de proteínas por las RIPs en la etapa de elongación.
- **Figura 1.4.3.** Estructura del rRNA sustrato para la actividad N-glicosilasa de las RIPs.
- **Figura 1.5.1.** Representación de la estructura PD-L1, PD-L2, PD-L3 y PD-L4.
- **Figura 1.5.2.** Representación del sitio activo de las RIPs de la familia *Phytolaccaceae*.
- **Figura 1.5.3.** Estructura tridimensional de las secuencias de las RIPs de la familia *Phytolaccaceae*.
- **Figura 1.7.1.** Ilustración esquemática del método de diálisis para eliminar el desnaturizante de la proteína solubilizada.
- **Figura 3.1.3.1.1.** Mapa genético del plásmido pET-22b(+).
- **Figura 3.2.2.1.** Esquema del vector de expresión recombinante.
- **Figura 3.2.8.1.** Vector de expresión que contiene el gen de la luciferasa.
- **Figura 4.1.1.A.** Curva de crecimiento de la cepa *E.coli* BL21 DE3 y de la cepa recombinante *E. coli* BL21 DE3//pET-22b(+)-PD-L4 en ausencia y presencia de el inductor (IPTG).

- **Figura 4.1.1.B.** Análisis electroforético (SDS-PAGE) de la fracción proteica del clon *E. coli* BL21 (DE3)//pET-22b(+)-PD-L4.
- **Figura 4.2.1** Análisis electroforético (SDS-PAGE) del sobrenadante y el pellet obtenidos después del tratamiento de solubilización.
- **Figura 4.4.1.A.** Purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de intercambio catiónico (Source 15S).
- **Figura 4.4.1.B.** Análisis electroforético del pico B de la cromatografía de intercambio catiónico.
- **Figura 4.5.1.** Actividad inhibidora de PD-L4 sobre la síntesis de proteínas en lisados de reticulocitos de conejo.
- **Figura 4.6.1.** Actividad N-glicosilasa de la proteína PD-L4 recombinante sobre el rRNA de reticulocitos de conejo.
- **Figura 4.7.1.** Actividad polinucleótido: adenina glicosilasa de las RIPs sobre DNA de esperma de salmón.
- **Figura 4.8.1.** Actividad desoxirribonucleasa de PD-L4 recombinante sobre el plásmido pCR2.1.
- **Figura 9.3.1.** Mapa genético del plásmido pCR2.1.



---

***Listado de abreviaturas***

---

## 8. Abreviaturas

- **APS**: Persulfato amónico
- **cDNA**: Acrónimo en inglés de “complementary deoxyribonucleic acid”, (Acido desoxirribonucleico complementario del RNA mensajero).
- **DNA**: “Deoxyribonucleic acid”, ácido desoxirribonucleico.
- **EDTA**: Ácido etilendiaminotetraacético.
- **FPLC**: “Fast protein liquid chromatography”.
- **IC<sub>50</sub>**: Concentración que inhibe la síntesis de proteínas un 50%.
- **IPTG**: Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido.
- **kDa**: unidad de masa atómica Dalton (Da) o kilo dalton (kDa).
- **LB**: Medio de cultivo Luria Bertani.
- **RIPs**: “Ribosome inactivating proteins”, proteínas inactivadoras de ribosomas.
- **RNA**: “Ribonucleic acid”, ácido ribonucleico.
- **rRNA**: Ácido ribonucleico ribosómico
- **RT-PCR**: Transcripción inversa del mRNA seguida de la reacción en cadena de la polimerasa.
- **SDS**: Dodecilsulfato sódico,
- **SDS-PAGE**: *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, electroforesis en geles de poliacrilamida /dodecilsulfato sódico
- **TEMED**: N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina
- **TMV**: Virus del mosaico del tabaco.
- **Tris**: Tris (hidroximetil) aminometano
- **tRNA**: “Transfer ribonucleic acid”, ARN de transferencia



---

***Anexos***

---

## 9. Anexos

### 9.1. Anexo I: RIPs de tipo 1 que hasta la actualidad han sido aisladas y caracterizadas de plantas de la familia *Phytolaccaceae*.

Tabla 9.1.1 RIPs aisladas de la especie de plantas de la familia *Phytolaccaceae*.

Planta	RIP	Tipo	Masa molecular (kDa)	Inmunotoxinas
<i>Phytolacca americana</i> L.	PAP (pokeweed antiviral protein, <i>Phytolacca</i> antiviral protein)	1	29	Si
<i>Phytolacca americana</i> L.	PAP II (pokeweed antiviral protein II)	1	30	Si
<i>Phytolacca americana</i> L.	PAP III (pokeweed antiviral protein III)	1	30	
<i>Phytolacca americana</i> L.	PAP-S	1	30	Si
<i>Phytolacca americana</i> L.	PAP-C	1	29	
<i>Phytolacca americana</i> L.	PAP-R	1	29.8	
<i>Phytolacca americana</i> L.	PAP-H	1	29.5	
<i>Phytolacca dioica</i> L.	PD-S1 ( <i>Phytolacca dioica</i> RIP1)	1	30	
<i>Phytolacca dioica</i> L.	PD-S2 ( <i>Phytolacca dioica</i> RIP2)	1	29.6	Si
<i>Phytolacca dioica</i> L.	PD-S3 ( <i>Phytolacca dioica</i> RIP3)	1	30	
<i>Phytolacca dioica</i> L.	PD-L1	1	32.7	
<i>Phytolacca dioica</i> L.	PD-L2	1	31.5	
<i>Phytolacca dioica</i> L.	PD-L3	1	30.4	
<i>Phytolacca dioica</i> L.	PD-L4	1	29.2	
<i>Phytolacca dioica</i> L.	Diocin 1	1	30	

Continuación Tabla 9.1.1

Planta	RIP	Tipo	Masa molecular (kDa)	Inmunotoxinas
<i>Phytolacca dioica</i> L.	Diocin 2	1	29.9	
<i>Phytolacca dodecandra</i> L' Herit	Dodecandrin	1	29	
<i>Phytolacca heterotepala</i> H. Walter	Heterotepalin- 4 (Mexican pokeweed RIP-4, <i>Phytolacca heterotepala</i> antiviral protein PAP)	1	29.3	
<i>Phytolacca heterotepala</i> H. Walter	Heterotepalin- 5b (Mexican pokeweed RIP- 5b)	1	30.5	
<i>Phytolacca insularis</i> Nakai	<i>Phytolacca insularis</i> antiviral protein (PIP, insularin)	1	35	
<i>Phytolacca insularis</i> Nakai	<i>Phytolacca insularis</i> antiviral protein 2 (PIP2)	1	35.7	

## 9.2. Anexo II: Lista de inmunotoxinas que se encuentra en fase clínica en el tratamiento del cáncer

Tabla 9.2.1 Lista de inmunotoxinas en fase clínica en el tratamiento de tumores hematológicos y tumores sólidos.

Toxina	Inmunotoxina	Ligando	Antígeno objetivo	Tumor / Enfermedad	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	Estado de prueba medica
de Bouganin	VB6-845	Fab (4D5MOCB)	EpCAM	Tumores sólidos de origen epitelial	Si	Si	Fase I
Gelonin	HuM195 / rGel	mAb (HuM-195)	CD33	AML, CML, síndrome mielodisplástico	Si	Si	Fase I
Momordin	BDI-1-momordin	mAb (BDI-1)	Antígeno del cáncer de vejiga	Cáncer de vejiga	Si	Si	Fase I
PAP	B43-PAP	mAb(B43)	CD19	Leucemia, células B, ALL	Si	Si	Fase I
PAP	TXU-PAP	mAb (TXU)	CD7	T-NHL, VIH tipo 1	Si	Si	Fase I
Ricin	Anti-CD6-bR	mAb (anti-CD6)	CD6	CTCL, ALL	Si	Si	Fase I
Ricin	Anti-B4-br	mAb (anti-B4)	CD19	B-NHL	Si	Si	Fase III
Ricin	Anti-My9-bR	mAb (anti-My9)	CD33	AML	Si	Si	Fase I
Ricin	N901-bR	mAb (N901)	CD56 N-CAM)	SCLC	Si	Si	Fase II
Ricin	Anti-CEA-bR	mAb (I-1)	Antígeno carcinoembrionario (CEA)	Cáncer colorrectal	Si	Si	Fase I / II
RTA	Anti-CD7-dgA (DA7)	mAb (3A1e)	CD7	T-NHL, Leucemia, GVHD	Si	Si	Fase I
RTA	HD37-dgA (IMTOX-19)	mAb (HD37)	CD19	B-NHL, ALL	Si	Si	Fase I

Continuación tabla 9.2.1

Toxina	Inmunotoxina	Ligando	Antígeno objetivo	Tumor / Enfermedad	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	Estado de prueba medica
RTA	RFB4-Fab'-dgA	Fab' (RFB4)	CD22	B-NHL, Leucemia, linfoma	Si	Si	Fase I
RTA	RFT5-dgA (IMTOX-25)	mAb (RFT5)	CD25	Linfoma de Hodgkin, CTCL, Melanoma, GVHD	Si	Si	Fase II
RTA	Ki-4.dgA	mAb (Ki-4)	CD30	Linfoma de Hodgkin, NHL	Si	Si	Fase I
RTA	RFB4-dgA (IMTOX-22)	mAb (RFB4)	CD22	B-NHL, CLL, ALL, Leucemia, Linfoma, Mieloma	Si	Si	Fase I
RTA	Combotox (RFB4-dgA/HD37-dgA)	mAb (RFB4) + mAb (HD37)	CD22 CD19	NHL, ALL	Si	Si	Fase I
RTA	SPV-T3a-dgA + WT1-dgA	mAb (SPV-T3a) + mAb (WT1)	CD3 CD7	GVHD	Si	Si	Fase I / II
RTA	H65-RTA (CD5 Plus) (XomaZyme-CD5 Plus)	mAb (H65)	CD5	GVHD, CTCL, CLL, Artritis reumatoide, Lupus sistémico eritematoso (SLE), Diabetes mellitus	Si	Si	Fase II

Continuación tabla 9.2.1

Toxina	Inmunotoxina	Ligando	Antígeno objetivo	Tumor / Enfermedad	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	Estado de prueba médica
RTA	454A 12-rRA	mAb (454A 12)	TfR	Cáncer de mama, Neoplasia leptomenígea	Si	Si	Fase I
RTA	260F9-rRTA	mAb (260F9)	55 kDa Antígeno de cáncer de mama (p55)	Cáncer de mama, cáncer de ovario	Si	Si	Fase I
RTA	XMMME-001-RTA (XomaZyme-Me1)	mAb (XMMME-001)	Antígeno melanoma (Proteoglycan)	Melanoma	Si	Si	Fase I / II
RTA	791T/36-RTA (XomaZyme-791)	mAb (791T/36)	72 kDa Antígeno del cáncer (72 kDa TAA) (p72)	Cáncer colorrectal	Si	Si	Fase I
RTA	T101-RTA	mAb (T101)	CD5	CLL	Si	Si	Fase I
RTA	MDX-RA (4197X-RA)	mAb (4197X)	Human lens epithelial antigen	Opacificación de la capsula posterior (Caratata secundaria)	-	Si	Fase III
Saporin	BsAb (4KB 128 x anti-saporin) / (RFB9 x anti-saporin) / saporin	Bispecific F(ab') <sub>2</sub> (4KB128 x anti-saporin) / (RFB9 x anti-saporin)	CD22	Linfoma, CLL	Si	Si	Fase I

Continuación tabla 9.2.1

Toxina	Inmunotoxina	Ligando	Antígeno objetivo	Tumor / Enfermedad	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	Estado de prueba medica
Saporin	BsAb (4KB 128 x anti-saporin) / (HD6 x anti-saporin) / saporin	Bispecific F(ab') <sub>2</sub> (4KB128 x anti-saporin) / (HD6 x anti-saporin)	CD22	Linfoma B-cell	Si	Si	Fase I
Saporin	Ber-H2-Saporin	mAb (Ber-H2)	CD30	Linfoma de Hodgkin, Linfoma anaplastico de células grandes (ALCL)	Si	Si	Fase I

### 9.3. Anexo III: Mapa genético del plásmido pCR2.1

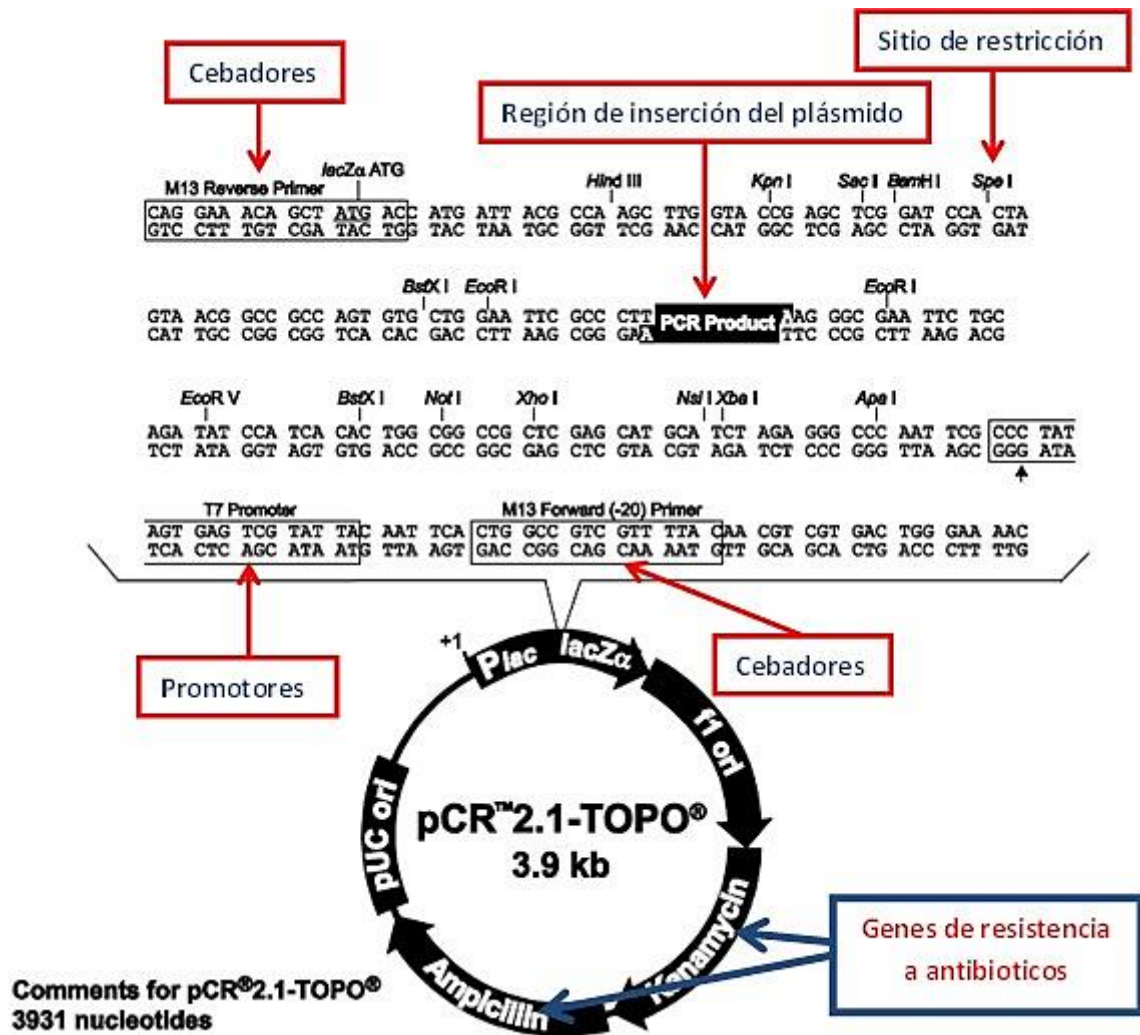


Figura 9.3.1 Mapa genético del plásmido pCR2.1. Aparecen remarcadas las regiones más importantes del plásmido: un origen de replicación, genes de resistencia a antibióticos y un sitio de clonación de DNA exógeno que se encuentra dentro del gen Lac Z, donde aparecen señaladas las secuencias de corte de las enzimas de restricción.