



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA

---

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

**“Aplicación biotecnológica de una Proteína Inactivadora de  
los Ribosomas de *Streptomyces coelicolor*”**

**TESIS**

Para obtener el grado de

**Maestra en Biotecnología**

PRESENTA

**I.B.I. Alma Rosa López Flores**

DIRECTOR

**Dr. Armando Mejía Álvarez**

ASESORES

**Dr. Ana Gisela Reyes Alvarado**

**Dr. Javier Barrios González**

México, D.F.

---

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”

El trabajo Aplicación biotecnológica de una Proteína Inactivadora de los Ribosomas de *Streptomyces coelicolor* contó con el apoyo de CONACYT, a través de la beca de maestría con número de registro 482810.



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA  
IZTAPALAPA**

*Otorga el presente reconocimiento a*

**ALMA ROSA LÓPEZ FLORES**

*En virtud de haber aprobado el examen de grado de*

**MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

*De la División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Ciudad de México., a 8 de noviembre de 2016.*

**Dr. Armando Mejía Álvarez**  
Director de Tesis

**Dr. Javier Barros González**  
Presidente del Jurado

**Dra. Gabriela M. Rodríguez S.**  
Coord. del Posgrado en Biotecnología

México, D.F. a 8 de Noviembre del 2016

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la  
Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**"Aplicación biotecnológica de una Proteína Inactivadora de los Ribosomas de  
*Streptomyces coelicolor*"**

Que presentó:

**I.B.I. Alma Rosa López Flores**

**Comité Tutoral:**

Director: Dr. Armando Mejía Álvarez

Asesores: Dr. Ana Gisela Reyes Alvarado

Dr. Javier Barrios González

**Jurado:**

Presidente: Javier Barrios González

Secretario: Octavio Loera Corral

Vocal: Ana Gisela Reyes Alvarado

Vocal: Ángel Absalón Constantino

# Agradecimientos

---

Al Dr. Armando Mejía Álvarez por haberme brindado la oportunidad de desarrollar este proyecto y formar parte de su grupo de trabajo y confiar en mí.

A la Dr. Ana Gisela Reyes Alvarado por su apoyo y orientación demostrando que la distancia no es impedimento para transmitir sus conocimientos.

A la M. en BE Marisol Roldán Tapia que durante el desarrollo del proyecto de investigación fue la persona más cercana a mí, por su paciencia, tiempo, orientación, conocimientos y sobre todo por la amistad y apoyo que me ha brindado.

Al Dr. Javier Barrios González quién aparte de ser mi asesor de tesis fue mi profesor durante mi formación académica logrando que mi interés por la biotecnología se incremente.

A mis compañeros de laboratorio: a Omar por orientarme y transmitirme su humor manteniendo un buen ambiente laboral, a Gerardo por brindarme su apoyo cuando lo he o no necesitado, a Ulises, Wylma, Eduardo, Ailed, Vicky, Jess por su guía, consejos y tips al momento de realizar alguna técnica de biología molecular y obtener mejores resultados; gracias por su recibimiento a Esmeralda, Hypatia, Tere, Hugo, Vanessa, Korelly, Moi, Cristian. Sé que la distancia, el tiempo y el camino que cada uno toma aleja a las personas, sin embargo, esta es una forma de plasmar mi gratitud por los momentos compartidos, las risas y amenas conversaciones.

Por último, y no menos importantes, a mi familia. A mis padres por confiar en mí y apoyarme siempre en mis decisiones y a mis hermanos por estar cerca de ellos. A mis amigos por sus mensajes de ánimo.

A todos, muchas gracias.

# Resumen

---

Las Proteínas inactivadora de los ribosomas (RIPs) son enzimas que poseen actividad N-glicosidasa inhibiendo irreversiblemente la síntesis proteica. Las RIPs se han encontrado en plantas, algas, hongos y bacterias, a menudo en múltiples formas y han sido clasificadas como de tipo 1, las cuales contiene una sola cadena con actividad enzimática y de tipo 2, las cuales poseen una cadena A similar a las RIPs de tipo 1 unida a una cadena B con propiedades de lectina. La principal característica de las RIPs es el efecto letal que ejerce en los organismos atacados, dicha actividad lo hace interesante en la aplicación contra células indeseables, pues es posible diseñar moléculas con especificidad controlada, proporcionando a la nueva molécula un valor agregado trascendente pues la inespecificidad es uno de los problemas que enfrentan los compuestos utilizados en campos como la medicina y la agricultura. En consecuencia, la elección de un sistema de expresión heteróloga tiene un importante impacto en el desarrollo de nuevos productos.

En el presente estudio, la RIPsc proveniente de *Streptomyces coelicolor* clasificada como de tipo 1, activa contra ribosomas bacterianos, fúngicos y de mamífero, se unió al péptido antifúngico PEP32 en el extremo N-terminal como en el extremo C-terminal, obteniéndose las proteínas PEP32-RIPsc y RIPsc-PEP32, esto con el objetivo de determinar en qué caso el péptido es capaz de cumplir la fusión de acarrear a la RIPsc dentro de las células sin alterar el dominio RIPsc, debido a que existe la posibilidad de que la fusión interfiera en su actividad por impedimento estérico. Se diseñó un *cassette* de expresión tanto para *S. lividans* TK24 y *Escherichia coli*. Como resultado, se logró obtener la transformante que secreta la proteína PEP32-RIPsc en *S. lividans* TK24 ya que se mostró cierta inhibición en el crecimiento de diferentes hongos (*Penicillium chrysogenum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus terreus*, *Colletotrichum sp*, y *Paecilomyces*) empleados, tres de ellos fitopatógenos. Mediante un gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) se detectó una banda de aproximadamente de 30 kDa, lo cual sugiere que se trata de la proteína de interés. La estrategia de fusionar el gen de interés a la secuencia señal de una proteína homóloga abundantemente secretada por la vía Sec parece ser una alternativa adecuada para la producción de proteínas heterólogas ya que el sistema de expresión para *Escherichia coli* no mostró los resultados esperados.

# Abstract

---

Ribosome-inactivating proteins (RIPs) are enzymes that possess N-glycosylase activity that irreversibly inhibits protein synthesis. RIPs have been found in plants, fungi, algae, and bacteria, often in multiple forms and have been classified as type 1, consisting of a single chain with enzymatic activity, and type 2, consisting of an A-chain similar to type 1 RIPs, linked to a B-chain with properties of a lectin. The principal characteristic of the RIPs is the lethal effect it has on the targeted organisms, such activity makes it interesting in the application against undesirable cells, it is possible to design molecules with controlled specificity, providing the new molecule added value transcendent as the inespecificidad it is one of the problems facing the compounds used in areas as medicine and agriculture. Consequently, the choice of a heterologous expression system has an important impact on the development of new products.

In the present study, the RIPsc from *Streptomyces coelicolor* classified as type 1, active against bacterial ribosomes, fungal and mammalian, joined antifungal peptide PEP32 at the N-terminal and the C-terminal, obtaining the PEP32-RIPsc and RIPsc-PEP32 proteins, this in order to determine in which case the peptide is able to meet the merger hauling the RIPsc within cells without altering the domain RIPsc, because there is a possibility that fusion interfere with its activity by steric hindrance. An expression cassette for *Streptomyces lividans* TK24 so *Escherichia coli* and was designed. As a result, it was possible to obtain the transformant secretes PEP32-RIPsc protein in *S. lividans* TK24 as certain inhibition was shown in the growth of different fungi (*Penicillium chrysogenum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus terreus*, *Colletotrichum sp* and *Paecilomyces*) employees, three of them phytopathogenic. Through a denaturing polyacrylamide gel (SDS-PAGE) a band of approximately 30 kDa was detected, suggesting that the protein is of interest. The strategy to fuse the gene of interest to the signal sequence of a homologous protein abundantly secreted by the Sec pathway appears to be a suitable alternative for the production of heterologous proteins as the expression system for *Escherichia coli* not showed the expected results.}

# Índice

---

Índice .....	VI
Índice de Figuras .....	IX
Índice de Tablas.....	XI
Abreviaturas .....	1
1. Introducción.....	2
1.1 Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas (RIPs).....	2
1.2 Mecanismo de acción y entrada a la célula de las RIPs .....	7
1.3 Aplicación biotecnológica de las RIPs .....	17
2. Antecedentes.....	20
2.1 <i>Streptomyces coelicolor</i> y su RIPsc .....	20
2.1 Péptidos bioactivos y su uso en la aplicación biotecnológicas de las RIPs.....	27
3. Justificación .....	34
4. Hipótesis y Objetivos .....	37
5. Materiales y métodos .....	38
5.1 Cepas y condiciones de cultivo .....	38
5.1.1 <i>Streptomyces lividans</i> .....	38
5.1.2 <i>Escherichia coli DH5<math>\alpha</math></i> .....	38

5.1.3 <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS .....	39
5.1.4 Hongos y Levaduras .....	39
5.2 Medios de Cultivo .....	41
5.2.1 Medio Phage .....	41
5.2.2 Medio R <sub>2</sub> .....	42
5.2.3 Medio S .....	42
5.2.4 Medio SFM.....	42
5.2.5 Medio LB.....	42
5.2.6 Agar Dextrosa Papa (PDA).....	43
5.2.7 Solución de elementos traza .....	43
5.2.8 Buffer PTC .....	43
5.3 Plásmidos .....	43
5.4 Oligonucleótidos.....	53
5.5 Manipulación de ADN .....	53
5.5.1 Transformación de <i>E.coli</i> .....	54
5.5.2 Minipreparaciones para la extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> .....	55
5.5.3 Selección de transformante de <i>E.coli</i> .....	56
5.5.4 Transformación de <i>Streptomyces lividans</i> .....	56
5.5.5 Selección de transformantes de <i>Streptomyces</i> por PCR de Colonia.....	57

5.6 Manipulación de ARN.....	58
5.6.1 Aislamiento de ARN de <i>E.coli</i> .....	58
5.6.2 PCR de transcriptasa reversa (RT-PCR).....	59
5.7 Expresión de proteínas.....	61
5.7.1 Sobre- expresión proteica por inducción en <i>E.coli</i> BL21(DE3) pLysS.....	61
5.7.2 Separación de fracciones proteicas solubles e insolubles de <i>E.coli</i> .....	62
5.7.3 Sobre-expresión proteica en <i>Streptomyces lividans</i> TK24.....	63
5.7.4 Electroforesis SDS-PAGE.....	64
5.8 Ensayo de actividad sobre hongos fitopatógenos.....	65
6. Resultados.....	66
6.1 Sobre-expresión de PEP32-RIPsc en <i>S. lividans</i> .....	71
6.2 Sobre-expresión de RIPsc-PEP32 en <i>S. lividans</i> .....	79
6.3 Ensayo de actividad sobre hongos.....	85
6. Discusión.....	88
7. Conclusión.....	93
7. Referencias.....	94

## Índice de Figuras

---

Figura 1. Actividad N-glicosidasa de las RIPs sobre la horquilla sarcina/ricina de la subunidad mayor de los ribosomas. _____	2
Figura 2. Clasificación de las Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas (RIPs). _____	3
Figura 3. Inhibición de la síntesis de proteica por PAP. _____	9
Figura 4. Mecanismo de entrada a la célula y acción de las RIPs. _____	13
Figura 5. Gráfica de expresión de RIPsc evaluada por qRT-PCR combinada con la curva de crecimiento de <i>S. coelicolor</i> (línea en rojo). _____	24
Figura 6. Mapa del plásmido pJET1.2/blunt. _____	44
Figura 7. Composición del vector pBSDKvsi. _____	45
Figura 8. Mapa del plásmido pJET-vsi-PEP32-RIPsc. _____	46
Figura 9. Mapa del plásmido pJET-vsi-RIPsc-PEP32. _____	47
Figura 10. Mapa del plásmido pJET-vsi-RIPsc. _____	48
Figura 11. Mapa del plásmido pIJ486. _____	49
Figura 12. Mapa del plásmido pIJ486-vsi-RIPsc. _____	50
Figura 13. Mapa del plásmido pIJ486-vsi-PEP32-RIPsc. _____	50
Figura 14. Mapa del plásmido pIJ486-vsi-RIPsc-PEP32. _____	51
Figura 15. Mapa del plásmido pET-PEP32-RIPsc. _____	51
Figura 16. Mapa del plásmido pET-RIPsc-PEP32. _____	52
Figura 17. Mapa del plásmido pET-RIPsc _____	52

Figura 18. Estrategia general para la obtención de PEP32-RIPsc. _____	66
Figura 19. Estrategia general para la obtención de RIPsc-PEP32. _____	67
Figura 20. Gel de poliacrilamida, SDS-PAGE al 12.5% para la separación de PEP32-RIPsc y RIPsc-PEP32, teñido con azul Coomasie. _____	68
Figura 21. Gel de agarosa 1%, donde se observa las bandas correspondientes al gen RIPsc, PEP32-RIPsc y RIPsc-PEP32. _____	69
Figura 22. Cassette de expresión PEP32-RIPsc para <i>Streptomyces lividans</i> TK24, el cual se clonará en el vector pIJ486. _____	71
Figura 23. Representación gráfica de la construcción del cassette de expresión para sobre-expresar PEP32-RIPsc en <i>S. lividans</i> . _____	73
Figura 24. Amplificación de los fragmentos vsi (a) y PEP32-RIPsc (b). _____	74
Figura 25. Fusión y amplificación del fragmento vsi-PEP32-RIPsc. _____	75
Figura 26. a) Gel de digestión de pJET-vsi-PEP32-RIPsc. b) Gel digestión de pIJ486-vsi-PEP32-RIPsc. _____	76
Figura 27. Transformantes de <i>Streptomyces lividans</i> TK24 obtenidas por protoplastos para sobre-expresar PEP32-RIPsc. _____	76
Figura 28. PCR de colonia realizado en las transformantes de <i>S. lividans</i> . _____	77
Figura 29. Curva de crecimiento de <i>S. lividans</i> TK24-(pIJ486-vsi-PEP32-RIPsc). _____	78
Figura 30. Cassette de expresión RIPsc-PEP32 para <i>Streptomyces lividans</i> TK24, el cual se clonará en el vector pIJ486. _____	80
Figura 31. Representación gráfica de la construcción del cassette de expresión para sobre-expresar RIPsc-PEP32 en <i>S. lividans</i> . _____	81

Figura 32. Amplificación de los fragmentos vsi (a), RIPsc-PEP32 (b) y vsi-RIPSC-PEP32 (c).	82
Figura 33. PCR de colonia realizado en las transformantes de <i>S. lividans</i> .	83
Figura 34. Transformantes de <i>Streptomyces lividans</i> TK24 obtenidas por protoplastos para sobre-expresar RIPsc- PEP32.	83
Figura 35. Curva de crecimiento de <i>S. lividans</i> TK24-(pIJ486-vsi-RIPsc- PEP32).	84
Figura 36. Prueba de inhibición sobre diferentes hongos..	86
Figura 37. Gel de poliacrilamida, SDS-PAGE 12% para la separación de PEP32-RIPsc.	87

## Índice de Tablas

---

Tabla 1. Distribución en la naturaleza de algunas RIPs.	6
Tabla 2. Péptidos antimicrobianos de penetración celular.	31
Tabla 3. Mezcla de reacción para la amplificación de vsi y PEP32-RIPsc así como el programa utilizado en cada caso.	74
Tabla 4. Mezcla de reacción para la fusión de los fragmentos así como el programa empleado.	75

## Abreviaturas

---

<b>μL</b>	Microlitro	<b>mM</b>	Milimolar
<b>°C</b>	Grados centígrados	<b>NaCl</b>	Cloruro de Sodio
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la Polimerasa
<b>amp<sup>R</sup></b>	Ampicilina	<b>PEG6000</b>	Polietilenglicol 6000
<b>AMPs</b>	Péptidos Antimicrobianos	<b>RNA (ARN)</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato	<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>C</b>	Citosina	<b>Rv</b>	primer reverse
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos Trifosfato	<b>rARN</b>	ARN ribosómico
<b>DO</b>	Densidad Óptica		
<b>Fw</b>	Primer Forward		
<b>G</b>	Guanina		
<b>h</b>	Horas		
<b>IPTG</b>	Isopropil tio _ D Galactosido		
<b>L</b>	Litro		
<b>LB</b>	Luria-Bertani		
<b>Mg</b>	miligramos		
<b>min</b>	minutos		
<b>mL</b>	Mililitros		

# 1. Introducción

## 1.1 Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas (RIPs)

Las Proteínas Inactivadoras de Ribosomas o mejor conocidas como RIPs (por sus siglas en inglés), son un grupo de proteínas que poseen la capacidad de causar daño irreversible a los ribosomas, inhibiendo así la síntesis proteica. La principal actividad conferida a las RIPs es la de N-glicosidasa causantes de la liberación de una adenina (A) de la estructura ribosomal, aunque recientemente se han reportado diversas actividades novedosas tales como DNAsas, antivirales, polinucleótido adenosin glicosidasas, entre otras (Peumans, *et al.*, 2001). Dicha actividad se lleva a cabo, por medio de la escisión de una enlace glicosídico (N-C) específico presente en la región

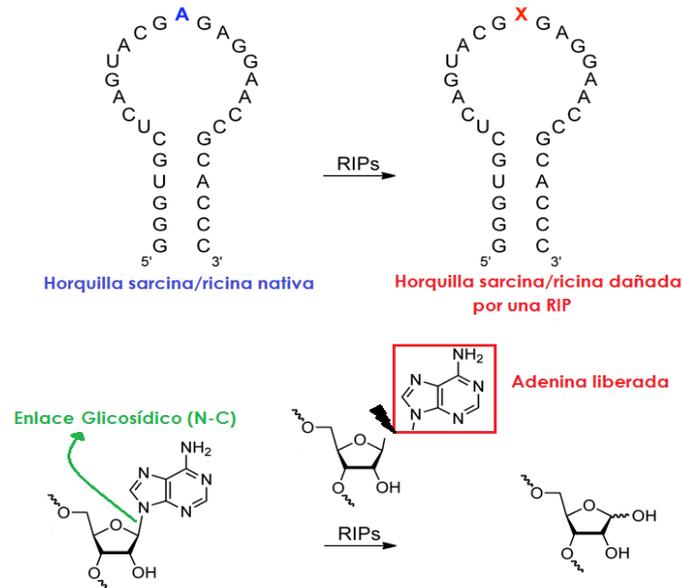


Figura 1. Actividad N-glicosidasa de las RIPs sobre la horquilla sarcina/ricina de la subunidad mayor de los ribosomas. (Figura modificada de Tor y Xie, 2009 y tomada de la Tesis de Reyes 2012 )

conservada del ARN ribosomal (rARN) denominada horquilla sarcina/ricina (Sarcin-Ricin Loop o SRL), ubicada en la subunidad grande de los ribosomas de todos los organismos (Figura 1). Esta SRL es una estructura característica del ribosoma, y resulta clave para su funcionalidad. El nombre de esta región del rARN (Sarcin-Ricin Loop/SRL), se debe a que es el sitio de acción de la ricina y la  $\alpha$ -sarcina, dos de las toxinas más potentes (DaSilva, *et al.*, 2003).

Originalmente, las RIPs fueron clasificadas en tres grupos con base en sus propiedades físicas, RIPs tipo 1, 2 y 3 (Mundy, *et al.*, 1994). Las RIPs de tipo 1 son proteínas monoméricas de aproximadamente 30 kDa con actividad N-glicosidasa, las RIPs de tipo 2 están constituidas por dos cadenas, la cadena A con actividad N-glicosidasa ligada a la cadena B con propiedades de lectina (Olsnes & Pihl, 1973), la ricina es la más representante de esta clase, y las de tipo 3 que son sintetizados como precursores inactivos (proRIPs) que además necesitan procesos proteolíticos entre los aminoácidos que forman el sitio activo antes de tener actividad N-glicosidasa. La función de su dominio C-Terminal es desconocida. La RIP del tipo 3 mejor estudiada es la proteína JIP-60, que es una RIP aislada de la cebada. Dentro del tipo 3 se incluyen todas las RIPs que no tiene las características descritas para los tipos 1 y 2. Sin embargo, debido a que una vez que son procesadas, poseen la misma capacidad enzimática que las del tipo 1, se ha sugerido incluirlas a tal grupo, teniendo finalmente dos grupos principales, RIPs del tipo 1 y RIPs del tipo 2 (Figura 2. ) (Nielsen, & Boston, 2001; Peumans, *et al.*, 2001).

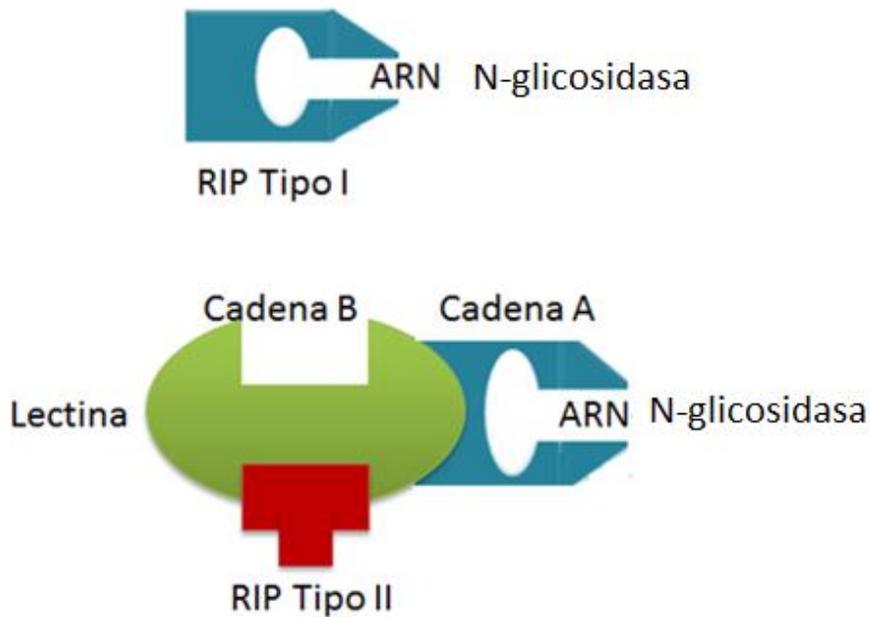


Figura 2. Clasificación de las Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas (RIPs).

Más de 50 genes de RIPs tipo de 1 y 15 RIPs de tipo 2 han sido secuenciados y/o clonados. La comparación de estas secuencias revela una fuerte similitud entre los RIPs tipo 1 con la cadena A de las RIPs tipo 2, así como entre las cadenas B de diferentes RIPs tipo 2. Un examen profundo indica que la similitud de secuencias entre los aminoácidos del extremo amino-terminal y la región central de las RIPs es mucho mayor que en el extremo carboxilo-terminal. Sugiriendo que, la preservación de la región central en la estructura de las RIPs es la responsable de la prevalencia de las actividades y presumiblemente las actividades que no se conservan son debidas a la variación en la región C-terminal (Van Damme, *et al.*, 2001).

Las RIPs se encuentran comúnmente en plantas y ampliamente distribuidas en el mismo reino, por lo que son las mejor estudiadas, caracterizadas y entendidas. Sin embargo, en reportes recientes se ha revelado la amplia distribución de las RIPs no solo en plantas sino también entre hongos, bacterias e inclusive tejido mamífero (Girbés, *et al.*, 2004).

Las RIPs del tipo 1 son las más abundantes. En cada planta se ha encontrado en diferentes concentraciones y también se ha mostrado su presencia en plantas consideradas como no tóxicas (Ishizaki, *et al.*, 2002; Barbieri, *et al.*, 2006); además existe una amplia distribución en las diferentes partes de la planta que las produce pues pueden estar presentes en las hojas, en las semillas, en la raíz, en las frutas, en el tallo o en las flores (Girbés, *et al.*, 2004). A veces, tanto en RIPs tipo 1 y tipo 2 se han encontrado en la misma planta co-existiendo, por ejemplo, en plantas como *Sambucus nigra* (Ferrerías, *et al.*, 2000) y *Cinnamomum camphora* (Ling, *et al.*, 1995). Dentro de las RIPs de tipo 2, sólo un pequeño número ha sido purificado y caracterizado (aproximadamente 40). Tales RIPs fueron aisladas de un grupo pequeño y limitado de plantas pertenecientes solo a 13 géneros (*Ricinus communis*, *Abrus sp.*, *Adnia sp.*, *Cinnamomun camphora*, *Sambucus sp.*, *Viscum sp.*, *Momordia charantia*, *Trichosathes sp.*, *Panax ginseng*, *Ximenia americana*, *Iris hallandica* y *Polygonatum multiflorum*) por lo que se cree que las RIPs del tipo 2 se encuentran distribuidas entre las plantas con flores (Peumans & Van Damme, 2010).

De acuerdo con Peumans y Van Damme (2010), todas las evidencias sugieren que un ancestro de las semillas modernas de plantas fue el responsable de desarrollar el

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

Las RIPs en bacterias están presentes solo en un número limitado, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* y en *Streptomyces coelicolor* recientemente descubierta. La producida por *S. coelicolor* es una RIP de tipo 1, denominada RIPsc (Reyes, *et al.*, 2010). Las producidas por *S. dysenteriae* y *E. coli* han sido denominadas toxinas Shiga y toxina tipo Shiga respectivamente, ambas pertenecen al tipo 2 de la clasificación de las RIPs (Reisbig , *et al.*, 1981; Obrig , 1997) y son responsables de enfermedades como síndrome urémico hemolítico, anemia hemolítica microangiopática, falla renal y en algunos casos de síntomas neurológicos. Las toxinas Shiga atacan a las células provocando su muerte a través del anclaje a la superficie celular que les permite ser transportadas por endocitosis, una vez dentro del citosol su dominio enzimático activo inhibe la síntesis proteica y mata a la célula (Falnes & Sadving , 2000).

Algunos hongos producen RIPs tipo 1 con una masa molecular cerca o debajo de 10 kDa mientras que otros varían entre 13.8 kDa (como velutin) (Ng & Parkash , 2002) y hasta 42 kDa (tal como flammulina) (Wang & Ng, 2001). Estos RIPs actúan exactamente como sus homólogos de plantas. Las RIPs también son producidas por algas como *Laminaria japonica* y hongos *Lentinus edodes*. En la Tabla 1 se resume la distribución de lagunas RIPs en la naturaleza.

Tabla 1. Distribución en la naturaleza de algunas RIPs.

Nombre	Fuente	Tipo	Referencia
<b>Plantas</b>			
Agrostina	<i>Agrostemma githago</i>	1	(Brigotti, <i>et al.</i> , 1989)
Saporina	<i>Saponaria officinalis</i>	1	(Ippoliti, <i>et al.</i> , 1992)
Trichosanquina	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	1	(Shaw, <i>et al.</i> , 2005)
Momordina	<i>Momordica charantia</i>	1	(Valbonesi, <i>et al.</i> , 1999)
Pokeweed antiviral protein (PAP)	<i>Phytolacca americana</i>	1	(Hudak, <i>et al.</i> , 1999)
Ebulina	<i>Sambucus ebulus</i>	2	(Citores, <i>et al.</i> , 1996)
Ricina	<i>Ricinus cominus</i>	2	(Olsnes & Pihl, 1973)
Porrectina	<i>Cinnamomum porrectum</i>	2	(Li, <i>et al.</i> , 1996)
JIP60	<i>Hordeum vulgare</i>	3	(Chaudhry, <i>et al.</i> , 1994)
Maize RIP	<i>Zea mays</i>	3	(Hey, <i>et al.</i> , 1995)
<b>Algas</b>			
Lamjapina	<i>Laminaria japonica</i>	1	(Ren-Shui, <i>et al.</i> , 2002)
<b>Hongos</b>			
Gigantina	<i>Aspergillus giganteus</i>	1	(Salvarelli, <i>et al.</i> , 1994)
Clavina	<i>Aspergillus clavatus</i>	1	(Huang, <i>et al.</i> , 1997)
Tricholina	<i>Trichoderma viride</i>	1	(Liu, <i>et al.</i> , 1991)
Flammulina	<i>Flammulina velutipes</i>	1	(Wang & Ng, 2000)
Pleuteregina	<i>Pleurotus tuber-regium</i>	1	(Wang & Ng, 2001)
<b>Bacterias</b>			
Shiga-tipo toxina	<i>Escherichia coli</i>	2	(Obrig, 1997)
Shiga toxina	<i>Shigella dysenteriae</i>	2	(Reisbig, <i>et al.</i> , 1981)
RIPsc	<i>Streptomyces coelicolor</i>	1	(Reyes, <i>et al.</i> , 2010)

## 1.2 Mecanismo de acción y entrada a la célula de las RIPs

La actividad enzimática N-glicosidasa es la función principal de las RIPs. En 1972, Olsnes y Pihl descubrieron que la ricina inhibe la síntesis de proteínas en un sistema libre de células, lo que llevó a la conclusión de que los ribosomas son el blanco de las RIPs. Asimismo, durante el auge de la investigación de las RIPs en 1970, se encontró una proteína aislada de la planta *Phytolacca americana* que inhibía la transmisión de virus a otras plantas, dicha proteína fue nombrada PAP (*Pokeweed Antiviral Protein*). Se llegó a la hipótesis de que los RIPs antivirales, que a menudo son extracelulares, compiten selectivamente por la entrada al citosol de células infectadas, inactivando los ribosomas y evitando de ese modo la replicación del virus. Hoy se sabe que esta actividad no depende únicamente de la inactivación ribosómica, sino de un mecanismo alternativo que implica depuración directa de la RIP en ARN o ADN viral (Raj. & Vennila Jannet, 2013; Domashevskiy & Goss , 2015). En 1983, Irvin demostró que la proteína PAP tenía el mismo efecto que la ricina sobre los ribosomas pues inactivaba e inhibía la síntesis proteica, además que PAP estaba constituida por una sola cadena con actividad RIP presentándose entonces la primera evidencia de una RIP tipo 1. Posteriormente, Endo y sus colegas demostraron que las RIPs removían selectivamente un residuo de adenina de rARN (Endo , *et al.*, 1987), por lo que, fueron clasificadas como rARN-glicosidasas en la nomenclatura de enzimas (EC 3.2.2.22). Otros estudios demostraron que algunas RIPs remueven más de una adenina por ribosoma (Barbieri, *et al.*, 1994) y posteriormente, se encontró que las RIPs no sólo eliminan adenina a partir del ARN, sino también a partir de ADN (Barbieri , *et al.*,

1997), poli A (Barbieri, et al., 1994), de ARN desnudo (Endo , *et al.*, 1991) y ARNm encapsulado (Hudak, *et al.*, 2000). La capacidad de las RIPs para eliminar residuos de adenina de diferentes sustratos llevó a nombrarlos polinucleótido adenin glicosidasa (Barbieri , *et al.*, 2001).

Gracias al estudio de PAP (*Pokeweed Antiviral Protein*) (RIP de tipo 1) y de la ricina (RIP de tipo 2) se entendió y caracterizó el modo de acción de las RIPs. Ambas proteínas son capaces de inactivar enzimáticamente los ribosomas e inhibir el ciclo de elongación de la síntesis proteica. Se demostró que PAP actúa removiendo una adenina e interrumpiendo la interacción de factores de elongación eucariotas eEF1A y eEF-2 (EF-Tu y EF-G en procariotas), bloqueando la síntesis de proteínas en el paso de la translocación (Gessner & Irvin , 1980). Se cree que PAP inhibe la unión de eEF1A dependiente de aminoacetyl-tRNA al sitio aceptor (sitio A del ribosoma) mediada por la hidrólisis de GTP. De la misma manera, PAP inhibe la formación del complejo eEF-2-GDP-ribosoma y estimula la hidrólisis del ribosoma dependiente de GTP (Irvin , 1983). Estos resultados sugieren que PAP causa daños al ribosoma en el sitio en el que se unen los factores eEF1A y eEF-2 inhibiendo la etapa de elongación de la síntesis proteica. La unión de eEF-2 y las hidrólisis del complejo GTP-eEF-2 son necesarias para la translocación de los péptidos recién elongados del sitio A ribosomal al sitio P. Por lo tanto, un efecto importante de PAP en la síntesis de proteínas es la inhibición de la reacción de translocación mediada por eEF-2 (Figura 3). Esta inhibición fue apoyada por la observación de que el factor de elongación EF-G en *Escherichia coli*, protege los ribosomas contra la acción de una RIP proveniente

de las semillas *Croton tiglium*, denominada crotina 2 (Alegre , *et al.*, 1996), lo que sugiere que el sitio de unión de EF-G en el ribosoma se solapa con el sitio de acción de la RIPs (Wang & Tumer , 2000).

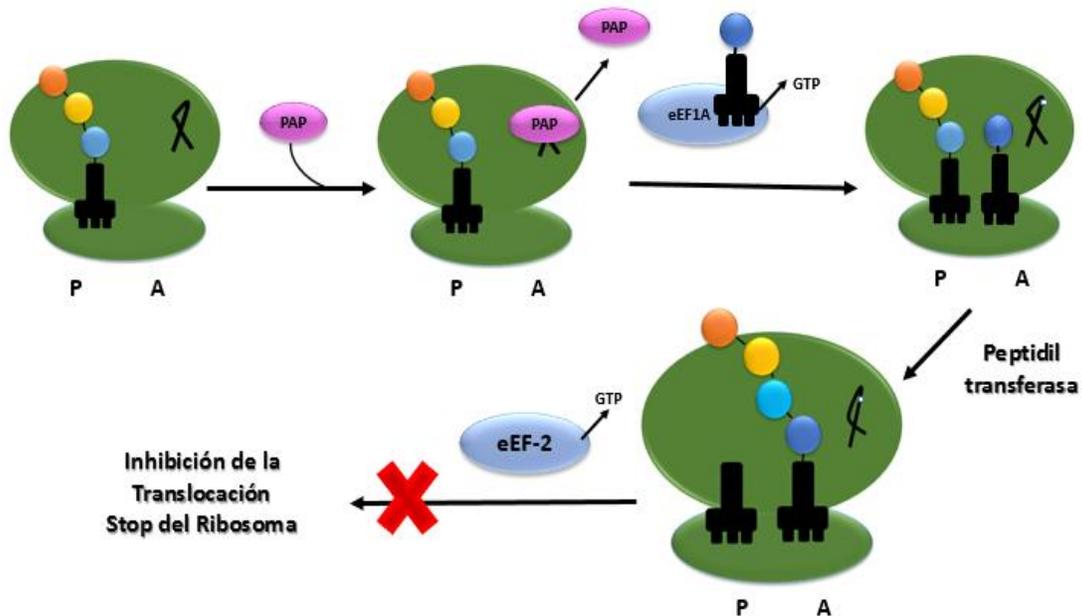


Figura 3. Inhibición de la síntesis de proteica por PAP. Después de la escisión del residuo de adenina en el bucle de ricina / sarcina de la subunidad mayor del rARN, el sitio de unión para el factor de elongación eEF-2 ya no está intacto. Sin la ayuda de eEF-2 la cadena peptídica en crecimiento no puede ser transferida al aminoácido recién llegado, por lo tanto, la síntesis de proteica se inhibe. Imagen de Mansouri, *et al.*, (2006).

Osborn y Harley demostraron que los ribosomas tratados con ricina fueron capaces de formar sólo un dipéptido N-Terminal Met-Val, aportando evidencias que sustentan que el paso inhibido por la ricina es la translocación proteica (Osborn & Hartley, 1990). Estudios recientes relacionados al mecanismo de acción de las RIPs demostraron que, el dominio C-terminal de las proteínas que componen el tallo ribosomal en la levadura pueden unirse a la cadena A de la ricina (mediante interacciones electrostáticas) en lugar de unirse al eEF-2, ofreciendo de esta forma

que la cadena A de la ricina se acerque al bucle sarcina/ricina y efectúe así su acción. Dado que las RIPs deben interactuar con un gran sustrato, el ribosoma, un mecanismo de doble etapa se contempla para el reconocimiento molecular, el cual implica primero la interacción con las proteínas ribosomales y después atacar al rARN (Xiao-Ping, *et al.*, 2009). Asimismo, se demostró que el tratamiento de los ribosomas de rata con ricina causó la eliminación específica de A<sub>4324</sub> del bucle sarcina/ricina (Endo, *et al.*, 1987) y que la toxicidad de las RIPs es dependiente del sustrato. Por ejemplo, la ricina muestra alta toxicidad sobre ribosomas de mamífero pero no tiene efecto sobre ribosomas de plantas ni de *E.coli*, mientras PAP tiene un espectro de toxicidad más amplio puesto que actúa sobre ribosoma de plantas, bacterias, levaduras y animales (Barbieri, *et al.*, 1993)

Por otra parte, aun cuando las RIPs actúan de manera preferente sobre ribosomas, hay pruebas que demuestran su acción sobre rARN desnudo con la misma actividad N-glicosidasa (Endo, *et al.*, 1991). Curiosamente algunas RIPs son capaces de de-adenilar rARN desnudo de manera distinta al sustrato que comúnmente atacan. La cadena A de la ricina es capaz de actuar sobre rARN 23S desnudo de *E.coli* pero incapaz de hacerlo sobre sus ribosomas intactos (Peumans, *et al.*, 2001). También se demostró que para la ricina y PAP, no sólo se escinde una adenina sino que además se remueve la guanina 4323 (G<sub>4323</sub>) del bucle sarcina/ricina (Endo, *et al.*, 1987; Rajamohan, *et al.*, 1999). Esta propiedad sólo ha sido demostrada en estas dos RIPs (Peumans, *et al.*, 2001).

A parte de las actividades ya mencionadas, las RIPs exhiben otras actividades enzimáticas novedosas tales como actividad fosfatasa en lípidos (Helmy , *et al.*, 1999) y en nucleótidos (Chen , *et al.*, 1996), actividad quitinasa (Shih , *et al.*, 1997) y superóxido dismutasa (SOD) (Li , *et al.*, 1996). Estas observaciones sugieren que las RIPs pueden poseer actividades bioquímicas duales y múltiples funciones biológicas ( Park , *et al.*, 2006).

Respecto a la forma de penetración a la célula diana, la primera interacción con la membrana externa varía entre las RIPs. Por ejemplo, las RIPs tipo 2 interactúan con las células a través de su cadena B que contiene lectina. El dominio de lectina de la mayoría de las RIPs de tipo 2 se unen específicamente a los residuos de galactosa que se encuentran en las glicoproteínas y glicolípidos en la superficie de cada tipo de célula, o N-acetilgalactosamina, que se encuentra, por ejemplo, en el residuo de azúcar terminal del grupo sanguíneo A antígeno (Marcus, *et al.*, 1964). Algunas RIPs han mostrado especificidad hacia los residuos de ácido siálico unidos a galactosa o N-acetilgalactosamina (Van Damme, *et al.*, 2001). Posteriormente, la internación, que ha sido bien caracterizada para el caso de la ricina, se lleva a cabo mediante endocitosis, tanto dependiente como independiente de clatrina. La clatrina es una proteína que recubre las vesículas formadas intracelularmente para mediar el transporte, llegando hasta el retículo endoplásmico donde, aprovechando el translocón, la subunidad catalítica entra el citoplasma y ejerce su actividad tóxica tras escapar del proteosoma (Sandvig & van Deurs, 2002; Simpson, *et al.*, 1999; Lord, *et al.*, 2003). En la Figura 4

se muestra como la ricina y la Shiga toxina interactúan con un receptor de glicoproteína y glicolípido Gb3 (globotriaosilceramida).

Después de su internalización las RIPs pueden seguir tres rutas diferentes: i) ser transportadas al aparato de Golgi y retículo endoplásmico (RE) donde se translocaran al citosol, ii) ser degradadas por enzimas lisosómicas o iii) ser excretadas de las células por exocitosis (Sandving & van Deurs, 2005). Por su parte, las RIPs de tipo 1 no poseen un dominio lectina y por lo tanto, en principio, no son

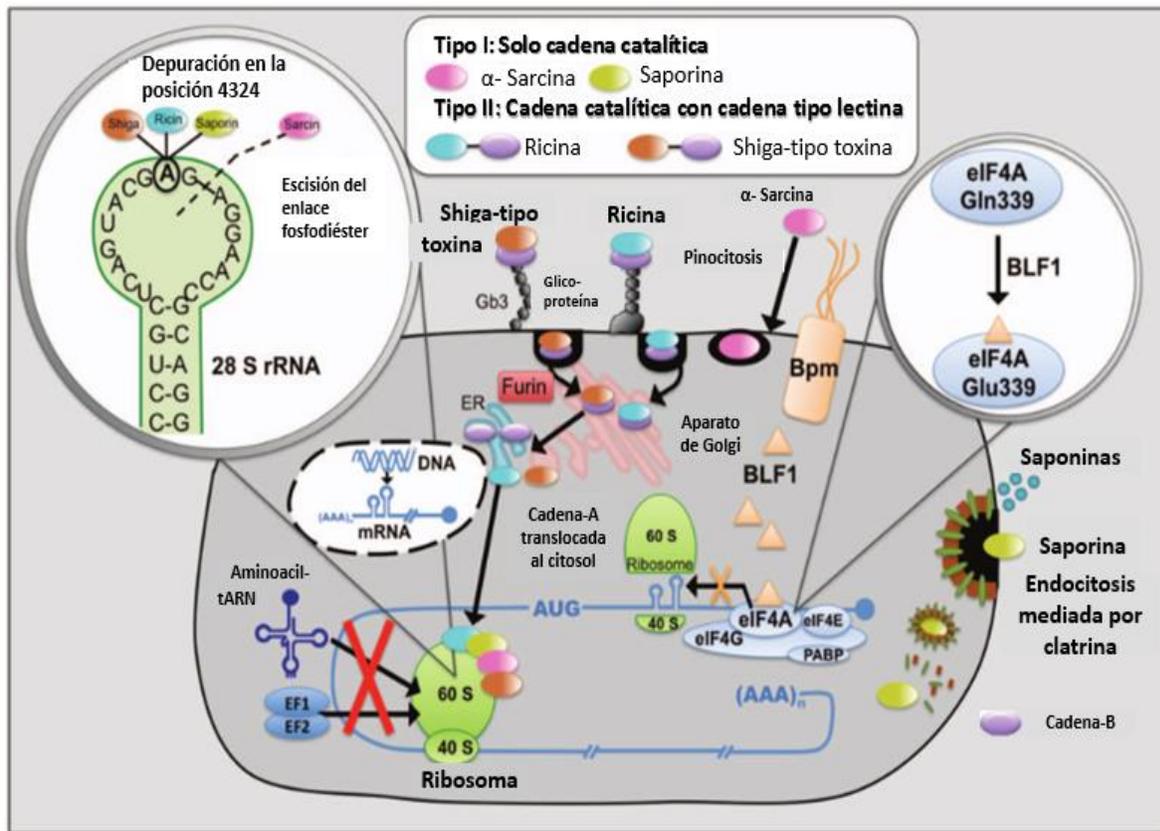


Figura 4. Mecanismo de entrada a la célula y acción de las RIPs. La Shiga toxina es liberada dentro de la célula después de que la Cadena B se une a la globotriaosilceramida (Gb3) para estimular la endocitosis dependiente/independiente de clatrina. Al llegar al aparato de Golgi la Cadena A es escindida por la proteasa Furina. La ricina es liberada dentro de la célula después de la unión de la Cadena B tipo lectina a las glicoproteínas/glicolípidos y endocitosis dependiente/independiente de clatrina. Después de la translocación retrógrada desde el aparato de Golgi al Retículo Endoplásmico (RE), la cadena A y B de la ricina y Shiga toxina son separados. La saporina es entregada al citoplasma a través de un mecanismo dependiente de clatrina con ayuda de saponinas. La Shiga toxina, ricina y saporina ejercen su actividad ARN N-glicosidasa removiendo A<sub>4324</sub>. La α-Sarcina entra vía pinocitosis y escinde el enlace fosfodiéster entre G<sub>4324</sub> y A<sub>4326</sub>. BLF1 es tipo ribotoxina, pero no posee actividad ARN N-glicosidasa. Es entregada por una bacteria patógena y desamida el factor de iniciación de la traducción eIF4A por su actividad ARN-helicasa. Imagen tomada de Walsh, *et al.*, 2013.

capaces de unirse a los receptores de la superficie celular, lo que explica su menor toxicidad hacia las células en comparación con las RIPs tipo 2 (Barbieri, *et al.*, 1993). Esta baja toxicidad no es debido a que sean pobres inactivadores de los ribosomas, ya que son potentes inhibidores de la traducción en sistemas libres de células. Es más

bien porque carecen de un medio eficaz para entrar a las células huésped. Sin embargo, las RIPs tipo 1 pueden entrar a la célula de otras formas. Las RIPs tipo 1 más estudiadas son la saporina, gelonina, PAP (*Pokeeweed Antiviral Protein*), momordina y tricosantina. Por ejemplo, se asume que la saporina entra a la célula por vía pinocitosis (un tipo de endocitosis) mediada por el receptor LRP1 (lipoproteína de baja densidad) (Cavallaro & Soria, 1995) o por endocitosis mediada por clatrina con ayuda de saponinas (Weng, *et al.*, 2008), alcanzando al citosol sin pasar por el aparato de Golgi. Esto se demostró debido a que la toxicidad de la saporina no se vio afectada por el tratamiento con Brefeldina A (antibiótico que inhibe el transporte de proteínas) lo que indicó que sigue una vía independiente de Golgi al citosol y no requiere de un pH bajo para la translocación de membrana, Figura 4 (Vago, *et al.*, 2005). Por otro lado, la tricosantina también entra a la célula de manera independiente de Golgi, pero requiere de un pH bajo para escapar del endosoma. Al bajar el pH, la tricosantina adopta un estado semi-desnaturalizado que se puede insertar en la membrana endosomal (Fang, *et al.*, 2011). Recientemente, se sugirió que el receptor LRP1 (lipoproteína de baja densidad) juega un papel importante en la unión y endocitosis de tricosantina (Jiao & Liu, 2010). Por otra parte, se ha visto que PAP es transportada al aparato de Golgi y luego al RE y de ahí al citosol vía retrotranslocación, similar a la ricina y otras RIPs tipo 2 (Parikh, *et al.*, 2005).

A pesar del conocimiento disponible y detallado en cuanto a la actividad, estructura y mecanismo de acción de las RIPs, no existe una respuesta certera acerca del por qué

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

Por otro lado y de manera contrastante, existen reportes que demuestran la existencia de RIPs carentes de toxicidad en contra de patógenos, al no presentar toxicidad hacia organismos antagónicos la hipótesis de su participación en mecanismos de defensa se debilita y da paso a la segunda hipótesis propuesta. En esta hipótesis se declara que las RIPs forman parte de mecanismos de apoptosis, dicha hipótesis se sustenta en el análisis de tejidos envejecidos o sometidos a diferentes tipos de estrés puesto que en ellos se ha encontrado alta expresión de algunas RIPs. Tal es el caso de la RIP denominada RIP1 presente en la planta

*Mesembryanthemum crystallium*, donde se demostró que los niveles más altos de expresión se encuentran después de sufrir estrés provocado por altas concentraciones de sal (Rippmann, *et al.*, 1997 ). En cuanto al estudio de tejidos envejecidos, la RIP de la planta *Hura crepitans* incrementa su actividad en las hojas de edad más avanzada quedando de manifiesto la relación directa de la actividad de las RIPs con la edad del tejido (Stirpe, *et al.*, 1996).

En resumen, la alta toxicidad de las RIPs de tipo 2 se explica por la presencia de la cadena B; la cadena B posee propiedades de lectina que le permiten anclarse a la superficie celular y facilitar la entrada a la célula, permitiendo entonces que la cadena A acceda y lleve a cabo su actividad sobre ribosomas (Sandving & van Deurs, 2000). El modo de acción de las RIPs del tipo 2 respalda la hipótesis que argumenta su participación en mecanismos de defensa para el organismo productor. En contraste, las RIPs del tipo 1, que son las más abundantes en la naturaleza (Barbieri , *et al.*, 1993), no poseen cadena B que facilite su acceso a las células haciendo que el mecanismo sea más complejo. Como consecuencia, la toxicidad de las RIPs tipo 1 puede considerarse de un nivel bajo en comparación con las RIPs del tipo 2. Sin embargo, este hecho solo puede afirmarse mientras no logren entrar a la célula porque una vez dentro su toxicidad es alta. La complejidad del proceso de penetración de las RIPs de tipo 1 contradice la hipótesis de defensa que se ha argumentado para la función de las RIPs, por lo que es necesario proponer nuevos argumentos con respecto a la función de este tipo de proteínas en los organismos

productores. La apoptosis es el mecanismo propuesto y más aceptado para la presencia de RIPs de tipo 1 en los organismos (Narayanan , *et al.*, 2005).

Con los experimentos hasta ahora realizados con el objetivo de demostrar la función de las RIPs en el organismo productor, siguen siendo necesarias más y mejores evidencias que permitan tener conclusiones infalibles de su rol. Mientras tanto, las actividades y propiedades de las RIPs han sido utilizadas en aplicaciones biotecnológicas que benefician a campos como la agricultura y la medicina (Raj. & Vennila Jannet, 2013). En la medicina, las RIPs se han relacionado con, o fusionado con, anticuerpos apropiados u otros soportes para formar "inmunotoxinas" u otros conjugados específicamente tóxicos para células diana, con el objetivo de eliminar células malignas o no deseadas. En la agricultura, se ha observado que una mayor expresión de RIPs confiere a las plantas una mayor resistencia a virus, hongos, insectos, y también a la sequía y salinidad (Stirpe, 2013).

### 1.3 Aplicación biotecnológica de las RIPs

Las propiedades de las RIPs las hacen una herramienta para ser utilizadas en diversos campos de la biotecnología. La mayoría de las RIPs poseen actividad antiviral (Parikh & Tumer, 2004; Kaur, et al., 2011), antifúngica (Ng, 2004; Theis & Stahl, 2004), insecticida (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002), propiedades abortivas (Ng, *et al.*, 1992) y parecen tener un papel en las plantas bajo condiciones de estrés. La medicina y la agricultura son los principales campos donde se han realizado estudios al respecto para aprovechar las propiedades de las RIPs.

En la agricultura, las RIPs han sido probadas en plantas para aumentar su resistencia contra virus, hongos y bacterias mediante la transfección de genes RIP, principalmente, se ha utilizado la RIP30 proveniente de la cebada, PAP (*Pokeweed Antiviral Protein*), Trichosanthina y diantina para obtener plantas transgénicas, tal es el ejemplo del trigo modificado con RIP30, el tabaco y la papa con PAP (Bieri, *et al.*, 2000; Rosenblum, 2004).

También se ha observado un incremento de resistencia a diversos insectos en plantas transfectadas con genes de RIPs, tanto de tipo 1 y tipo 2, por ejemplo, plantas de tabaco transfectadas con RIP de maíz (Dowd, *et al.*, 2003; Dowd, *et al.*, 2006) y SNA-I o *S. nigra aglutinina* de SNA-1 (Shahidi-Noghabi, *et al.*, 2009). Además, la resistencia a los insectos se obtuvo en plantas de maíz mediante la mejora de la expresión de una RIP endógena (Dowd, *et al.*, 2012).

Asimismo, debido a la toxicidad de las RIPs sobre virus, células tumorales, insectos y hongos patógenos de plantas, se han llevado a cabo estudios sobre las aplicaciones de las RIPs en el desarrollo de fármacos y cultivos de tejidos vegetales. Por otro lado, también se ha demostrado que las RIPs están involucradas en mecanismos de defensa de células vegetales y que detienen la síntesis de proteínas en condiciones fisiológicas apropiadas regulando procesos metabólicos. Además, algunas RIPs se acumulan en los tejidos no reproductivos, tales como cotiledones, corteza y la raíz. Por tal motivo, algunos investigadores han propuesto que las RIPs podrían desempeñar un papel como una proteína de almacenamiento en estos tejidos (Liu, *et al.*, 2002).

En 1970, Lin y colaboradores descubrieron que la abrina y la ricina tenían mayor toxicidad sobre células tumorales que sobre células normales. Esta fue la razón principal por la cual se generó mucho interés en las RIPs y sus posibles aplicaciones en medicina. Hoy en día, las RIPs están siendo probadas para el tratamiento y terapia del VIH (Parikh & Tumer, 2004; Kaur, *et al.*, 2011), cáncer, trastornos del sistema inmune, problemas neurológicos entre otros (Munish, *et al.*, 2012). Actualmente, la aplicación más prometedora de las RIPs en la medicina, es su uso en el diseño de conjugados, ya sean ligados por métodos químicos o fusionados genéticamente para dar origen a moléculas quiméricas con alta especificidad. Un ejemplo claro, es el caso de las inmunotoxinas creadas utilizando factores de crecimiento, anticuerpos, hormonas y lectinas ligadas a diversas RIPs (Fracasso, *et al.*, 2010). Las RIPs de tipo 2 no pueden ser utilizadas debido a que su cadena podría unirse inespecíficamente a todo tipo de célula provocando la muerte, por lo que las RIPs de tipo 1 las hace ideal para este propósito (Stirpe, 2013).

## 2. Antecedentes

---

### 2.1 *Streptomyces coelicolor* y su RIPsc

Los *estreptomicetes* son microorganismos Gram-positivos distribuidos ampliamente en la naturaleza, se encuentran predominantemente en el suelo y son productores de un amplio rango de metabolitos secundarios con actividades biológicas potenciales. Además, son productores de más de la mitad de los productos microbianos biológicamente activos que se conocen, incluyendo antibióticos de importancia comercial, compuestos inmunosupresivos, productos de salud animal y agroquímicos. También producen enzimas que son comercial y académicamente valiosas, tales como enzimas extracelulares capaces de degradar la lignocelulosa. El vasto reservorio de productos hace de los *estreptomicetes* uno de los géneros microbianos más importantes para la industria. Como consecuencia, existen herramientas de manipulación genética desarrolladas para este tipo de microorganismos (Vallin, *et al.*, 2005). *Streptomyces coelicolor* A (3)2 es la cepa mejor caracterizada genéticamente (Bentley, *et al.*, 2002). Sin embargo, contiene un poderoso sistema de restricción-modificación que actúa como una barrera de entrada y propagación, fundamentalmente de vectores bifuncionales derivados de *E.coli*. Por otro lado, *Streptomyces lividans* carece de un sistema de restricción dependiente de la metilación lo que facilita la transformación, posee una baja actividad proteolítica endógena extracelular en comparación con otras especies de *Streptomyces*, lo que lleva a una mayor recuperación de producto sin afectar los rendimientos de las

proteínas producidas al ser utilizado como hospedero en la producción heteróloga. Por otra parte, en comparación con *E. coli*, *S. lividans* es el mejor huésped para la producción de proteínas recombinantes eucariotas ya que las proteínas recombinantes producidas en *S. lividans* tienden a tener niveles más altos de solubilidad evitando el problema de la formación de cuerpos de inclusión (Lewis, *et al.*, 2010). Otra ventaja de esta cepa es que existe un amplio conocimiento sobre su tecnología de fermentación y los métodos de introducción de ADN por transformación y conjugación. Por lo tanto, *Streptomyces coelicolor* A (3)2 sólo puede considerarse como el organismo modelo para el análisis genético y morfológico de la especie. Y de manera general, *Streptomyces lividans*, es el huésped de elección preferentemente para fines de clonación (Jozef, *et al.*, 2014).

En adición a los beneficios que representa el uso de los estreptomicetes como sistemas de producción heteróloga también se ha puesto gran esfuerzo en el aislamiento de nuevos metabolitos provenientes de la especie. Al respecto, recientemente se demostró que el gen *SCO7092* de *Streptomyces coelicolor* codifica una Proteína Inactivadora de los Ribosomas (RIPsc) del tipo 1 con actividad N-Glicosidasa. Mostrando actividad, sobre ribosomas de *E. coli* *BL21 (DE3) pLysS*, removiendo de manera específica la adenina A<sub>2660</sub> del rARN (Reyes, 2012). Al inicio del desarrollo del trabajo que lo demuestra, se encontró evidencia de la presencia de un gen con similitud a las RIPs de plantas. La similitud de la secuencia nucleotídica codificada por el gen es de 22% con la cadena A de ricina, y de 23% con PAP. Sin embargo, pese al bajo porcentaje de similitud, los alineamientos realizados con las

secuencias, demostraron que los residuos presentes en el sitio activo tanto de la ricina como de la PAP estaban conservados. Después, mediante el modelamiento de la estructura proteica codificada por el gen de *S. coelicolor*, se realizó un acoplamiento estructural del modelo terciario de RIPsc con el modelo cristalográfico de la RIP de la planta *Phytolacca dioica*, obteniendo alta correspondencia. Por otro lado, con el análisis *in silico* se determinó que la secuencia del gen *ripsc* codifica 300 residuos de aminoácidos. Con el programa SignalP 3.0, se encontró que los primeros 35 residuos de la secuencia forman parte de un péptido señal ubicado en el extremo N-terminal, sugiriendo que es una proteína secretada. Las características fisico-químicas de la proteína madura RIPsc obtenidas en el análisis son: una masa molecular de 30 kDa, un pI de 8.1 y el potencial de la actividad de N-glicosidasa (Reyes, 2008).

En el genoma de *S. coelicolor*, el gen *ripsc* se ubica cerca del final de su cromosoma lineal, una región altamente variable en varias especies de *Streptomyces*. Puesto que los genes esenciales se sitúan en la región central del cromosoma, se sugiere que el gen que codifica la RIPsc no es un gen esencial para el crecimiento del organismo. Esto explicaría por qué la presencia del gen *ripsc* podría estar ausente en la mayoría de las especies de *Streptomyces*. Entre las especies de *Streptomyces*, *S. scabies* cuenta con la presencia de una secuencia similar a las de las RIPs de tipo I de la misma manera que *S.coelicolor* (Reyes, *et al.*, 2012).

Además del análisis *in silico*, se demostró la actividad de RIPsc sobre diferentes sistemas. Por ejemplo, en el momento de la inducción para la sobre-expresión de RIPsc en *E.coli*, se observó una disminución dramática en la tasa de crecimiento, lo

que sugiere un efecto tóxico de RIPsc sobre ribosomas de *E.coli*. En un sistema de traducción de luciferasa *in vitro* utilizando ribosomas de conejo, la producción de luciferasa decreció considerablemente, demostrando que RIPsc inhibe específicamente la traducción de proteínas sobre ribosomas de conejo. Asimismo, su efecto letal sobre *Saccharomyces cerevisiae* se demostró al expresar el gen *ripsc* en un sistema diseñado para levadura (Reyes, *et al.*, 2010). Estos resultados aludieron que la RIPsc es activa contra ribosomas bacterianos, fúngicos y de mamífero una vez dentro de la célula. Con evidencias sugerentes de la actividad de RIPsc, se evaluó su actividad antifúngica y antibacteriana sobre hongos y bacterias mediante bioensayos, al no observarse inhibición del crecimiento se presume que RIPsc sólo es capaz de mostrar actividad cuando alcanza a los ribosomas, una vez dentro de la célula, pero incapaz de tener actividad sobre células intactas debido a que no puede penetrar la membrana de la célula blanco. Por lo que, se concluye que la RIPsc de *Streptomyces coelicolor* es una RIP de tipo I, activa contra ribosomas bacterianos, fúngicos y de mamífero.

Finalmente, para analizar la función de RIPsc, ya sea que, forme parte de mecanismos de defensa o participe en mecanismos de apoptosis. Se correlacionó la expresión de RIPsc con el estado de desarrollo del organismo. Se observó que, a medida que la expresión de RIPsc se incrementa, el crecimiento de *S. coelicolor* es menor con el estado de desarrollo, y cuando el crecimiento de *S. coelicolor* se incrementa, la expresión de RIPsc decrece (Figura 5). Este hecho sustenta de manera parcial el argumento que declara que RIPsc forma parte de un mecanismo de apoptosis

mostrándose así el primer indicio de la posible función de RIPsc, enfatizando que se requiere de evidencias más claras (Reyes, 2012).

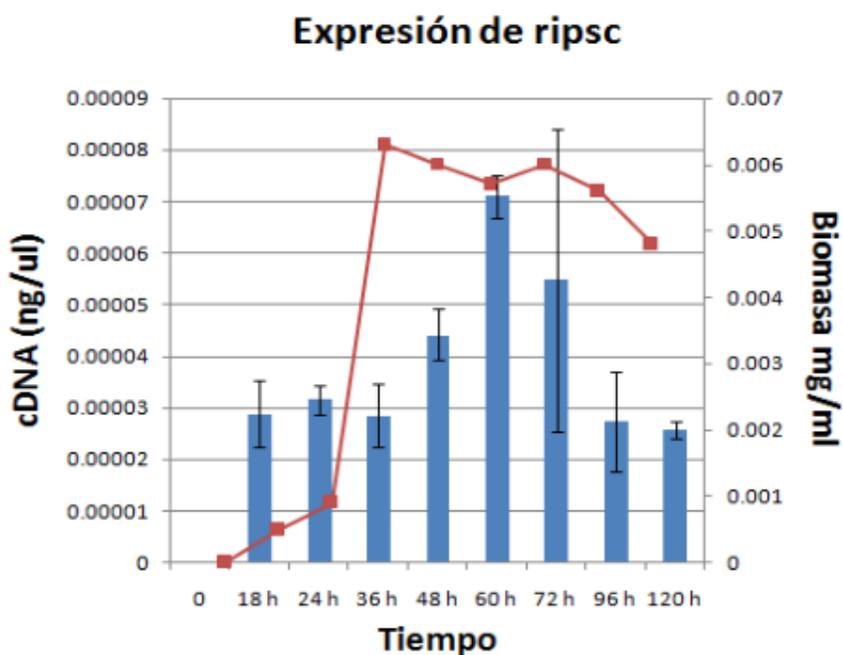


Figura 5. Gráfica de expresión de RIPsc evaluada por qRT-PCR combinada con la curva de crecimiento de *S. coelicolor* (línea en rojo). La expresión es inestable pero los niveles de expresión más altos, hasta ahora detectados coinciden con el momento en el que *S. coelicolor* sufre un decremento en el crecimiento (Reyes, 2012).

El descubrimiento de una proteína de este tipo en un estreptomiceto, abre las puertas a la investigación aplicada con el uso de RIPsc, en el desarrollo de moléculas novedosas y con potencial biotecnológico. Los retos más importantes en el diseño de nuevas moléculas derivadas de las RIPs son: la especificidad y la efectividad en su internalización a las células blanco, aunque el reto es grande, el uso correcto de las herramientas puede dar como resultado, la obtención de compuestos bio-activos interesantes que aportarían ganancias ambientales, terapéuticas y económicas

significativas. Al respecto, el uso de péptidos puede ser una alternativa adecuada en la funcionalidad dirigida de las RIPs (Zorko & Langel, 2005). Esto es debido a que los péptidos poseen características complementarias para la acción efectiva y específica de las RIPs, pues actúan sobre la membrana (ya sea en su acción desestabilizadora o en su acción penetrante) que para algunas proteínas de este tipo, es la barrera principal a vencer, por lo que el diseño y explotación de su aplicación como nuevas moléculas en combinación sinérgica resulta absolutamente interesante y novedosa (Marcos, *et al.*, 2008).

El diseño de nuevas estrategias rentables para la obtención de nuevas moléculas ha desencadenado la necesidad de implementar nuevas y mejores técnicas de producción. Generalmente, el uso de la tecnología de ADN recombinante provee ventajas como: bajos costos, facilidad en el escalamiento de la producción y precisión en la producción heteróloga del metabolito deseado facilitando los procesos de purificación. Por lo que, la elección de un sistema de expresión heteróloga tiene un importante impacto en el desarrollo de nuevos productos debido a que se pueden alcanzar mayores niveles de producción que la fuente original (Jozef, *et al.*, 2012). Las bacterias son, en muchos casos, los hospederos más utilizados debido a sus características de crecimiento y los bajos costos relativos asociados. *Escherichia coli* continúa siendo el hospedero bacteriano más utilizado debido fundamentalmente a, su genética bien caracterizada. En general, en este microorganismo, las proteínas recombinantes sobre-expresadas se acumulan frecuentemente en cuerpos de inclusión en el citoplasma o en el espacio periplasmático, lo cual requiere de procesos

de extracción de las proteínas con agentes fuertes y de renaturalización para el repliegamiento adecuado de las proteínas, los cuales pueden afectar su actividad biológica (Pisarra , 2000).

Por tales razones, algunos géneros de bacterias Gram positivas están siendo evaluados como hospederos para la producción de proteínas heterólogas debido a que estas bacterias secretan directamente las proteínas al medio extracelular, lo cual favorece su purificación. Particularmente, *Streptomyces lividans* secreta naturalmente grandes cantidades de enzimas hidrolíticas, no posee un extenso sistema de restricción-modificación al ADN foráneo y no es patógeno a los humanos (Kieser , *et al.*, 2000). Un claro ejemplo de la producción de proteínas recombinantes en *S. lividans*, ha sido la obtención del factor  $\alpha$  de necrosis tumoral murino (mTNFa) a niveles de 300 mg/L en el sobrenadante del cultivo cuando se utilizaron las señales reguladoras y de secreción del inhibidor de subtilisina de *Streptomyces venezuelae* CBS762.70 (vsi) (Lammertyn , *et al.*, 1997). De esta manera, cuando se utiliza *S. lividans* para la producción de proteínas recombinantes, la estrategia que se sigue es fusionar el gen de interés a la secuencia señal de una proteína homóloga abundantemente secretada a través de la vía de secreción Sec (Gilbert , *et al.*, 1995;Binnie, *et al.*, 1997).

En resumen, el uso correcto de las herramientas biotecnológicas para la aplicación dirigida de las RIPs por medio del diseño de conjugados con péptidos bioactivos así como la elección de un sistema de expresión eficiente se vislumbra como una

excelente estrategia para incrementar la actividad de las RIPs haciéndolas específicas y eficaces.

## 2.1 Péptidos bioactivos y su uso en la aplicación biotecnológicas de las RIPs

Los péptidos son cadenas cortas de aminoácidos, de entre 2 y 50 aminoácidos, que en algunos casos presentan actividades biológicas, tales como hormonas peptídicas, neuropéptidos, antibióticos, alcaloides y toxinas por lo que han sido denominadas péptidos bio-activos. Sus principales aplicaciones son: la producción de anticuerpos y el diseño de moléculas terapéuticas dirigidas a proteínas o receptores de enfermedades como el cáncer (Sandoval, *et al.*, 2008). De acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas (su composición por aminoácidos, carga neta, anfipaticidad, entre otros), existen dos tipos trascendentes en la aplicación de las RIPs; los CPPs (Cellular Penetrating Peptides) péptidos de penetración celular y AMPs (Antimicrobial Peptides) péptidos antimicrobianos.

Los CPPs o péptidos de penetración celular, son péptidos cortos que facilitan la internalización celular de cargos específicos (moléculas acarreadas). Los cargos pueden ser unidos al CPP (péptido de penetración celular) por medio de unión química covalente o por medio de interacciones no covalentes. Su función principal es la entrega de moléculas en el citoplasma o en cualquier organelo por medio de un proceso de endocitosis. Los CPPs poseen gran potencial de aplicación en medicina y en investigación de nuevos compuestos para ser usados como vectores de entrega de

diversas moléculas (Okuyama, *et al.*, 2007). Las principales aplicaciones para los CPPs son la entrega de ácidos nucleicos (ARN de interferencia, oligonucleótidos, plásmidos) con la finalidad de regulación génica (Morris, *et al.*, 2007; EL Andaloussi, *et al.*, 2005) y la entrega de proteínas de un rango de entre 30 kDa y 150 kDa (Wadia, *et al.*, 2004). Aunque se han reportado casos exitosos en la entrega de moléculas de interés, la desventaja más importante en el uso de CPPs es su baja estabilidad metabólica, consecuencia de la rápida degradación por peptidasas, lo que origina efectos biológicos de corta duración (Rennert, *et al.*, 2006).

Los AMPs o péptidos antimicrobianos tienen normalmente un tamaño de entre 12 y 50 aminoácidos. La gran mayoría posee carga neta positiva y generalmente son capaces de adoptar estructuras anfipáticas cuando se encuentran en solución en un medio no polar, lo que les concede estabilidad en ambientes tanto acuosos como hidrofóbicos (Papagianni, 2003). Se clasifican en tres grupos principales: péptidos con conformación  $\alpha$ -helicoidal, cíclica o de ciclo abierto con pares de residuos de cisteína y péptidos con alto contenido de algunos aminoácidos (ricos en prolina, ricos en histidina, etc.) (Bulet, *et al.*, 2004). La capacidad de asociarse con la membrana es una característica definitiva de los AMPs (Hancock, *et al.*, 2002), aunque la permeabilización de membrana no es absolutamente necesaria.

Los modos de acción de los AMPs mediante los cuales ejercen su actividad antimicrobiana son variados, principalmente pueden desestabilizar a las membranas, interferir con el metabolismo, y orientar su acción sobre los componentes citoplasmáticos. De manera general, el contacto inicial entre el péptido y el organismo

blanco es electrostático pues la mayoría de las superficies microbianas son aniónicas o hidrofóbicas, después gracias a características como su composición de aminoácidos, anfipáticidad, carga catiónica y tamaño, pueden anclarse a las membranas para desestabilizarlas o en su defecto penetrarlas para alcanzar moléculas intracelulares cruciales y actuar sobre ellas (Brodgen, 2005).

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

Inicialmente, la mayoría de los AMPs eran considerados como moléculas líticas que actuaban principalmente en las membranas biológicas de permeabilización, debido a sus propiedades catiónicas y anfipáticas que les confieren capacidad intrínseca para

alterar las membranas *in vitro*. Con la finalidad de facilitar el estudio de la interacción de AMPs con células diana, se han implementado métodos de biología molecular y celular en este campo. A partir de estos estudios, en la actualidad se reportan ejemplos en los que se demuestra que algunos AMPs alcanzan objetivos intracelulares y ejercen sus efectos antimicrobianos por mecanismos distintos a la permeabilización de la membrana celular (Marcos & Gandía, 2009; Nicolas, 2009; Wilmes, *et al.*, 2011).

Una clase muy interesante, pero tal vez menos abundante de estos AMPs son los llamados péptidos antimicrobianos de penetración celular, CP-AMPs (Henriques, *et al.*, 2006; Marcos, *et al.*, 2008). Algunos estudios recientes han demostrado propiedades antimicrobianas de péptidos conocidos anteriormente sólo como CPPs (Cell-Penetrating Peptides). De manera inversa, se han encontrado péptidos antimicrobianos capaces de atravesar la membrana plasmática de manera no disruptiva y trasladarse al interior de la célula. Esta capacidad de translocarse al interior de la célula fúngica o bacteriana se ha demostrado por el número creciente de péptidos antimicrobianos, algunos de los cuáles son activos contra fitopatógenos (Tabla 2) (Muñoz, *et al.*, 2013; Marcos, *et al.*, 2008). Como consecuencia, se ha puesto en tela de juicio las diferencias reales entre los péptidos de penetración celular y péptidos antimicrobianos, los cuales, de hecho, los hace pertenecer a una clase única para lo cual, el nombre propuesto de péptidos antimicrobianos de penetración celular (CP-AMPs) parece ser el apropiado.

Con respecto a su actividad, los péptidos con actividad antifúngica no ha recibido tanta atención como los péptidos antibacterianos, probablemente como consecuencia

de la percepción de impacto más alto de infecciones bacterianas que afectan la salud de los humanos (Marcos, *et al.*, 2012). Sin embargo, la importancia de las infecciones fúngicas se ha subestimado. Aproximadamente el 25% de la población ha sufrido infecciones fúngicas y la mayoría de las enfermedades de los cultivos son causadas por hongos (Agrios, 2004). Además, hay pérdidas considerables de alimentos almacenados después de su cosecha como resultado de la putrefacción fúngica y debido a la contaminación por micotoxinas. Por lo tanto, los hongos representan una gran amenaza para la seguridad alimentaria en el planeta. La aparición de nuevas enfermedades fúngicas de plantas y animales es un problema adicional y grave que afecta a la sostenibilidad global y la biodiversidad (Fisher, *et al.*, 2012). Existe, por tanto, una necesidad urgente de nuevos agentes antifúngicos y por lo tanto, el gran interés en péptidos antifúngicos.

Tabla 2. Péptidos antimicrobianos de penetración celular. Tomada de Marcos, *et al.*, (2008).

Péptido	Secuencia	Patógeno
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRK	Fúngico
Tat (47-58)	GRKKRRQRRRPPQ	Fúngico
Apidaecin	GNNRPVYIPQFRPPHPRI	Bacteriano
Indolicidin	ILPWKWPWWPWRR	Fúngico
LfinB	FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF	Fúngico
PAF26	RKKWFW	Fúngico
PEP32 (PAF32)	RKWHFW	Fúngico
BP100	KKLFFKKILKYL	Bacteriano

Al respecto, se ha identificado a partir de una biblioteca combinatoria de péptidos un grupo de hexapéptidos, llamados PAFs, con actividad antimicrobiana contra ciertos hongos filamentosos, incluyendo patógenos de plantas y dermatofitos humanos,

inhibiendo la infección *in vivo* de los fitopatógenos seleccionados. Los PAFs (péptidos antifúngicos de penetración celular), presentan secuencias estrechamente relacionadas y diferentes perfiles de actividad, algunos de ellos presentan una alta actividad antimicrobiana contra hongos, pero menor toxicidad frente a células bacterianas (Muñoz, *et al.*, 2006). El péptido PAF26 ha sido seleccionado como modelo de los PAFs debido a su potencia y especificidad para inhibir el crecimiento de hongos filamentosos. Se ha demostrado sensibilidad a PAF26 los fitopatógenos *Penicillium italicum*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum* (López-García *et al.*, 2002, 2003), los patógenos humanos *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* y varios dermatofitos y el hongo modelo *Neurospora crassa* (López-García, *et al.*, 2007, Muñoz, *et al.*, 2012). De igual forma, el péptido PEP32 ha mostrado fuerte actividad contra cepas de *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* y *Botrytis cinerea*, caso contrario frente a *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, lo que demuestra su selectividad hacia ciertos hongos filamentosos (López-García, *et al.*, 2002). Por lo tanto, los PAFs pueden ser una alternativa prometedora en la medicina como en la agricultura para el control de hongos con mayor eficacia. Con la investigación y el desarrollo de nuevas moléculas fusionados a estos péptidos-bioactivos se muestra un gran potencial para proporcionar nuevos productos farmacéuticos antimicóticos.

Un claro ejemplo para la producción de una molécula conjugada de interés industrial y de alto valor agregado sería la unión de un péptido con las RIPs de tipo I, ya que hasta ahora, los tres grupos mencionados, poseen características complementarias

para la acción efectiva y específica de las RIPs de tipo I, pues actúan sobre la membrana que para algunas proteínas de este tipo, es la barrera a vencer debido a que carecen de la Cadena B con propiedades de lectina que le sirve de anclaje a la superficie celular, por lo que, esta estrategia resulta absolutamente interesante y novedosa.

## 3. Justificación

---

Las **Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas (RIPs)** son una familia de proteínas identificadas y descritas en los últimos cuarenta años. Las RIPs se han encontrado en plantas, hongos y bacterias, a menudo en múltiples formas y han sido clasificados como de tipo 1, que constan de una sola cadena con actividad enzimática, y de tipo 2, que consiste en una cadena A similar a las RIPs tipo 1, ligado a una cadena B con propiedades de lectina. La investigación biotecnológica actual de las RIPs está dirigida a una mejor comprensión y la posterior mejora del mecanismo de entrada en la célula, aumentando la especificidad, la reducción de la antigenicidad RIP, prolongando su vida media plasmática y la comprensión de su papel en la apoptosis.

La principal característica de las RIPs es el efecto letal que ejerce en los organismos atacados, dicha actividad lo hace interesante en la aplicación contra células indeseables, pues es posible diseñar moléculas con especificidad controlada, lo que le da a la nueva molécula un valor agregado trascendente pues la inespecificidad es uno de los problemas que enfrentan los compuestos utilizados en campos como la medicina y la agricultura. Al respecto, la agricultura es un campo que necesita del constante mejoramiento de sustancias que ayuden en el ataque de los fitopatógenos responsables de la pérdida de millones de hectáreas de cultivo en el mundo, siendo la mayoría de las enfermedades de los cultivos causadas por hongos, por lo que, el reto en el campo es encontrar sustancias que tengan como blanco sólo a los microorganismos fitopatógenos, sin terminar con la diversidad microbiana benéfica

necesaria para el buen desarrollo de los cultivos. Existe, por tanto, una necesidad urgente de nuevos agentes antifúngicos y las RIPs son actualmente una atractiva alternativa para el desarrollo de moléculas novedosas y con potencial biotecnológico. Para ello, las RIPs pueden ligarse químicamente, o sus genes fusionarlos con genes de acarreadores capaces de transportar a las RIPs a un determinado tipo de célula de una manera selectiva. Por esa razón, las RIPs tipo 1 y la cadena A aislado de las RIPs tipo 2 son apropiados.

Recientemente en nuestro laboratorio se detectó la presencia de una RIP en *Streptomyces coelicolor* clasificada como tipo 1, con actividad *in vitro* contra ribosomas bacterianos, fúngicos y de mamífero. Su actividad la hace atractiva para fusionarse con alguna lectina o péptido transportador y de esta manera utilizarse como sustancia antifúngica y antibacteriana con posible aplicación en la agricultura. Al obtener la fusión de esta RIP de *S. coelicolor* (RIPsc) con algún agente que le ayude a penetrar la membrana celular se obtendrá una molécula específica y letal. Los péptidos bioactivos son una buena alternativa para diseñar la molécula deseada, por lo que, se plantea obtener una construcción genética en un sistema de sobre-expresión adecuado para la producción de la proteína de fusión de interés. Por consiguiente, la elección del péptido acarreador se basó en ciertas características específicas para su posterior uso en la industria agroquímica, entre las principales características requeridas se encuentra la especificidad del péptido por membranas fúngicas e inocuidad al ambiente. El péptido denominado PEP32 (RKWHFW) es un péptido de penetración celular con alta actividad contra hongos filamentosos pero no

contra bacterias y levaduras ( López-García, *et al.*, 2002), su selectividad lo hace no ser tóxico para plantas y animales, y por lo tanto, adecuado para el fin perseguido. *Escherichia coli* y *Streptomyces lividans* son los hospederos más utilizados debido a sus características de crecimiento y los bajos costos relativos asociados. En consecuencia, la elección de un sistema de expresión heteróloga tiene un importante impacto en el desarrollo de nuevos productos. Seguramente la unión de RIPsc con un péptido bio-activo incrementará su especificidad.

Otro hecho importante para la sobre-expresión de un conjugado a partir de la RIPsc es que, actualmente en la agricultura las RIPs tipo 1 han sido utilizadas para mejorar la resistencia de las plantas contra virus u otras plagas mediante la transformación, sin embargo, estas plantas transgénicas no son aún aceptadas y son un tema controversial, ya que se cuestiona la seguridad en la salud humana así como el impacto sobre la biodiversidad.

## 4. Hipótesis y Objetivos

---

### **Hipótesis:**

“La fusión del péptido PEP32, permitirá la penetración específica de RIPsc sobre células fúngicas, sin pérdida de su actividad inactivadora de ribosomas”.

### **Objetivo General:**

Obtener mediante expresión heteróloga la proteína fusión RIPsc - PEP32 y evaluar su actividad contra hongos.

### **Objetivos particulares:**

- ❖ Fusionar el gen que codifica para PEP32, con RIPsc en el extremo carboxilo terminal y de igual manera con el extremo amino terminal.
- ❖ Clonar las fusiones obtenidas en el vector de expresión pIJ486.
- ❖ Transformar de *Streptomyces lividans* TK 24.
- ❖ Sobre-expresar de la fusión del PEP32 -RIP en *Streptomyces lividans* TK 24.
- ❖ Sobre-expresar de la fusión del RIP- PEP32, en *Streptomyces lividans* TK 24.
- ❖ Evaluar la actividad PEP32-RIP/RIP- PEP32 sobre hongos.

## 5. Materiales y métodos

---

### 5.1 Cepas y condiciones de cultivo

#### 5.1.1 *Streptomyces lividans*

Para el desarrollo de este proyecto se usará *Streptomyces lividans* TK24 como sistema de expresión. Esta bacteria Gram-positiva perteneciente al grupo de los actinomicetos secreta bajas cantidades de proteasas extracelulares que pueden afectar los rendimientos de las proteínas producidas al ser utilizada como hospedera en la producción heteróloga. El sistema utiliza como plásmido de clonación, el vector pIJ486 que contiene un gen de resistencia a tiostrepton (Hopwood, *et al.*, 1985). Las condiciones de cultivo utilizadas fueron: para su propagación se cultivó en medio Phage o medio R2 suplementados con el antibiótico correspondiente en caso de ser necesario y se incubó durante 48 h a 30°C y con agitación a 150 rpm, para la obtención de esporas se cultivó en medio SFM sólido suplementado con el antibiótico correspondiente en caso de ser necesario y se incubó de 10 a 15 días a 30 °C.

#### 5.1.2 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$

Esta cepa cuyo genotipo es *F<sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG  $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ llacZYA-argF)U169, hsdR17 ( $\Gamma_K^-$  m $K^-$ )* es utilizada para sub-clonar y amplificar plásmidos. Las condiciones de cultivo utilizadas fueron: medio LB suplementado con el antibiótico apropiado, temperatura de incubación 37°C y 250 rpm de agitación (Sambrook, *et al.*, 1989).

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

Esta cepa (*Escherichia coli* B  $F^-$  *dcm ompT hsdS* ( $r_B^- m_B^-$ ) *gal*  $\lambda$  (DE3) [pLysS *Cam<sup>r</sup>*]) es utilizada comúnmente en la sobre-expresión de proteínas tóxicas). Ejerce un control estricto de la expresión de la proteína, lo que ayuda a la expresión de proteínas tóxicas, además de ser resistentes al cloranfenicol. Tienen el lisógeno del fago  $\lambda$  DE3 que expresa el gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor lacUV5, cuando se induce con IPTG. Los plásmidos pLysS expresan constitutivamente niveles bajos de lisozima T7 que inhibe los niveles basales de la RNA polimerasa de T7 y, de este modo, reduce el nivel basal de expresión del gen clonado. Otras características importantes de esta cepa son la deficiencia en la proteasa dependiente de la ATPasa con lo que disminuye la degradación de la proteína recombinante expresada en la bacteria, y la ausencia del elemento lacZ $\Delta$ M15, requerido para el test de complementación  $\alpha$ , además de ser la hospedadora más comúnmente utilizada en la producción a gran escala de proteínas recombinantes. La cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS, se cultivó a 37°C con agitación de 250 rpm en medio LB suplementado con 35  $\mu$ g/mL de Cloranfenicol (CM) (Novagen® 2003, Phue, *et al.*, 2008).

### 5.1.4 Hongos y Levaduras

Para evaluar la actividad de la proteína de fusión RIPsc-PPEP32 se utilizaron los siguientes hongos:

*Penicillium chrysogenum*: hongo filamentoso que presenta conidióforos tabicados de pared lisa, ramificado al final, con méticas y fiáides en forma de botella, donde nacen conidios lisos, elipsoidales azules o verde-azulados en cadenas, sin ramificar, con un penacho o pincel característico. Está ampliamente distribuido en la naturaleza, suele formar colonias verdeazuladas sobre el pan duro y los cítricos, sus esporas se encuentran frecuentemente en el polvo doméstico. Es contaminante común en alimentos y es raro que cause enfermedades en humanos (Pontón, *et al.*, 2002).

*Aspergillus terreus*: pertenece al género mitospórico que se caracteriza por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originarán las esporas asexuales o conidios. Tiene una distribución mundial, pero con mayor frecuencia se produce en las zonas tropicales y subtropicales. Con una distribución en todo el mundo, es la especie más comúnmente aislada de los suelos cultivados y no cultivados. Es contaminante de alimentos almacenados y es patógena que causa aspergilosis, otomicosis, onicomicosis, abscesos de la raíz aórtica y diversas infecciones de la piel (Gené & Guarro, 2004).

*Colletotrichum sp.*: es uno de los géneros patógenos de plantas más importantes y de mayor distribución en el mundo ya que ataca especialmente cultivos de regiones tropicales y subtropicales de alto impacto económico. Es causante de la antracnosis (Pérez Castro, *et al.*, 2003).

*Paecilomyces sp.*: las especies de *Paecilomyces* se han aislado a partir del suelo, restos vegetales, y frutas. Usualmente es considerado como contaminante, pero se ha aislado como agente de Hialohifomicosis (micosis causadas por hongos hialinos que presentan hifas septadas en los tejidos) (Aguilar, *et al.*, 1998).

*Saccharomyces cerevisiae*: es un hongo unicelular, un tipo de levadura que en la naturaleza se encuentra sobre sustratos ricos en azúcares o en los exudados y savias dulces de algunas plantas. Es un ascomiceto ubicuo que se encuentra en las plantas, frutas y suelos, y también se usa ampliamente en la industria para la producción de alimentos y bebidas, como pan, cerveza y vino. Es uno de los modelos más adecuados para el estudio de problemas biológicos debido a su rápido crecimiento, dispersión celular y la facilidad con que se replican cultivos y aíslan mutantes, además destaca su sencillo pero versátil sistema de transformación de ADN (Pontón, *et al.*, 2002).

Los hongos mencionados fueron cultivados en agar PDA a 30°C por 48 h.

## 5.2 Medios de Cultivo

### 5.2.1 Medio Phage

MgSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0.5 g/L; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0.74 g/L; Glucosa, 10 g/L; Triptona, 5 g/L; Extracto de Levadura, 5 g/L; Lab Lemco powder 5 g/L; pH 7.2. Medio utilizado para la propagación y conservación de las células bacterianas. Es importante utilizar agua de la llave.

### **5.2.2 Medio R<sub>2</sub>**

Sacarosa, 103 g/L; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.25 g/L; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 10.12 g/L; Glucosa, 10 g/L; Casaminoácidos, 0.1 g/L; Extracto de levadura, 1 g/L; Lab Lemco powder, 5 g/L. Por cada litro de medio se agregaron 100 mL de TES (0.25 M, pH 7.2), 2 mL de solución de elementos traza y 10 mL de una solución al 0.5% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. El medio se suplementó con CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 2 mM (1/1000) y CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 36.8% (1/100), antes de usarse. Para medio sólido se agregó 22 g de agar por cada litro de medio R<sub>2</sub>. Este medio es utilizado normalmente en la regeneración de protoplastos. Se utiliza agua de la llave.

### **5.2.3 Medio S**

Peptona, 4 g/L; Extracto de levadura, 4 g/L; Mg SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g/L. Por cada litro se adicionó 50 mL de glucosa al 6.6 % y 12.64 mL de glicina al 20%. Medio utilizado para la producción de protoplastos.

### **5.2.4 Medio SFM**

Manitol, 20 g/L; Harina de Soya 20 g/L; Bacto Agar 20 g/L. Medio utilizado en la producción de esporas. Es importante utilizar agua de la llave.

### **5.2.5 Medio LB**

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

### 5.2.6 Agar Dextrosa Papa (PDA)

39 g de agar PDA marca Difco en 1 L de agua. Medio utilizado para el crecimiento de hongos y levaduras.

### 5.2.7 Solución de elementos traza

ZnCl<sub>2</sub>, 40 mg/L; FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 200 mg/L; CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 10 mg/L; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 10 mg/L; Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O, 10 mg/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> MO<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O, 10 mg/L.

### 5.2.8 Buffer PTC

Sacarosa, 103 g/L; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.25 g/L; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 2.03 g/L; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 2.94 g/L; TES buffer (pH7.2, 0.25 M), 80 mL; Solución de elementos traza, 2 mL.

## 5.3 Plásmidos

**pJET1.2/blunt:** Vector de clonación de *E.coli*. Contiene un gen que codifica para una enzima de restricción letal que se inactiva al clonar un fragmento de ADN en el sitio de clonación por lo que solo las bacterias que contengan el gen son capaces de sobrevivir. En caso de haber un plásmido religado la expresión de la proteína letal elimina aquellas colonias que la contengan y el proceso de screening se facilita.

Además contiene el promotor T7, el gen de resistencia a ampicilina y dos sitios *Bgl II* que flanquean el sitio de clonación (Biotechnology Explorer™ Ligation and Transformation Module Instruction Manual. BIO-RAD. <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lse/literature/1665019.pdf>).

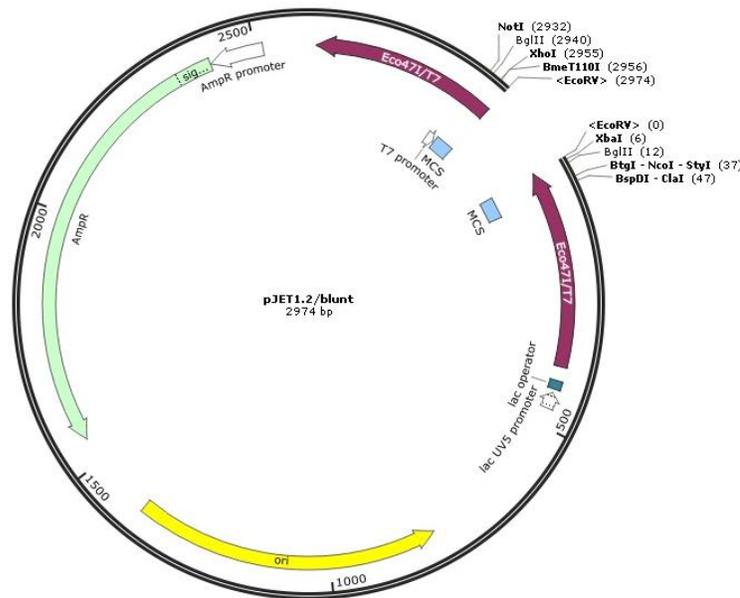


Figura 6. Mapa del plásmido pJET1.2/blunt.

**pBSDKvsi:** Es un plásmido de estreptomicetos derivado del plásmido de expresión pBluescript KS (+), contiene el cassette de expresión para el péptido señal del inhibidor de subtilisina aislado de *S. venezuelae* CBS762.70, lo que lo hace un sistema útil para la fusión de genes que se requieren expresar extracelularmente. Una vez

fusionado el péptido señal, se digiere el fragmento de interés para ser clonado en el plásmido de expresión (Lammertyn , *et al.*, 1997).

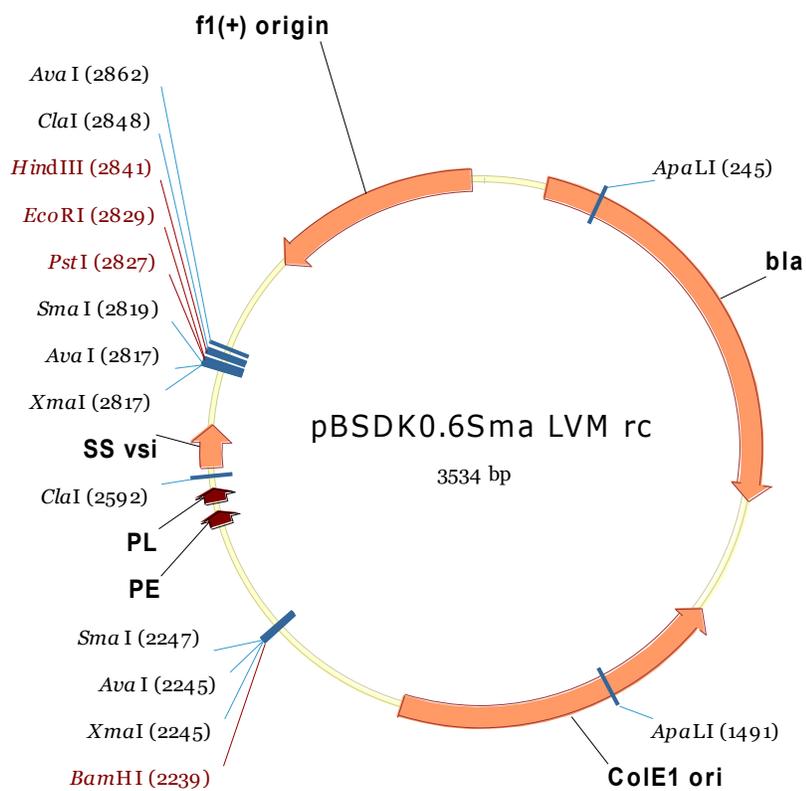


Figura 7. Composición del vector pBSDKvsi. PE y PL (Promotores), RBS (sitio de reconocimiento ribosomal), vsi (péptido señal de *S. venezuelae*).

**pJET-vsi-PEP32-RIPsc:** Plásmido de clonación derivativo de pJET 1.2/blunt que contiene el cassette de expresión vsi-PEP32-RIPsc.

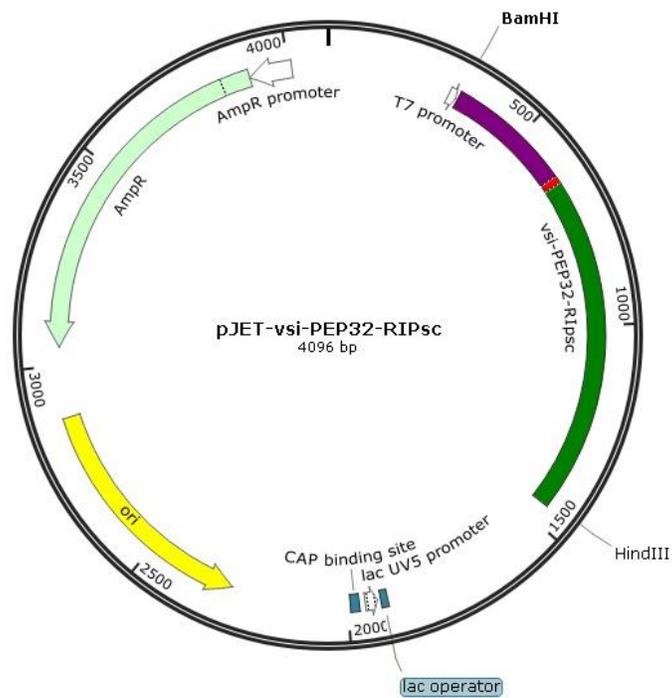


Figura 8. Mapa del plásmido pJET-vsi-PEP32-RIPsc.

**pJET-vsi-RIPsc- PEP32:** Plásmido de clonación derivativo de pJET 1.2/blunt que contiene el cassette de expresión vsi- RIPsc-PEP32.

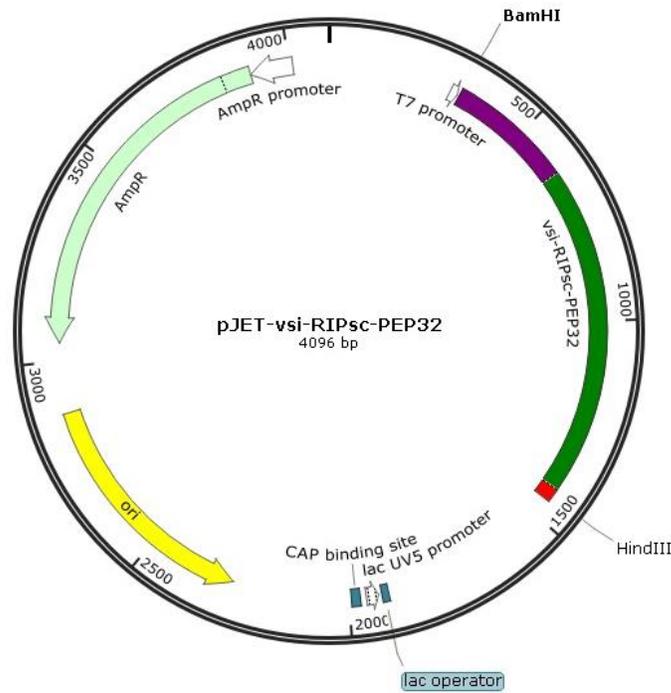


Figura 9. Mapa del plásmido pJET-vsi-RIPsc-PEP32.

**pJET-vsi-RIPsc:** Plásmido de clonación derivativo de pJET 1.2/blunt que contiene el cassette de expresión vsi- RIPsc.

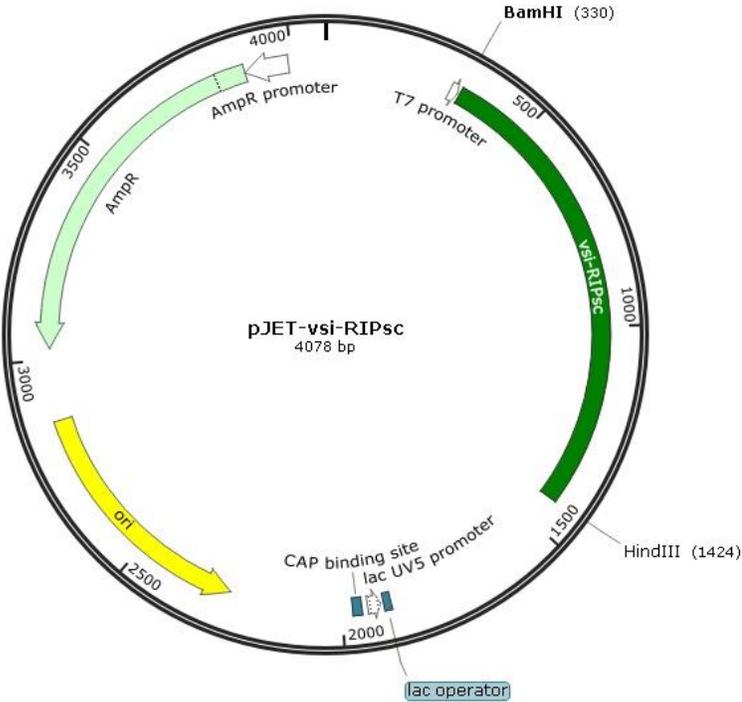


Figura 10. Mapa del plásmido pJET-vsi-RIPsc.

**pIJ486:** Es un plásmido de expresión para *Streptomyces* de alto número de copias, que contiene un gen de resistencia al tiostrepton y con un tamaño de 6.2 Kb (Kieser , *et al.*, 2000).

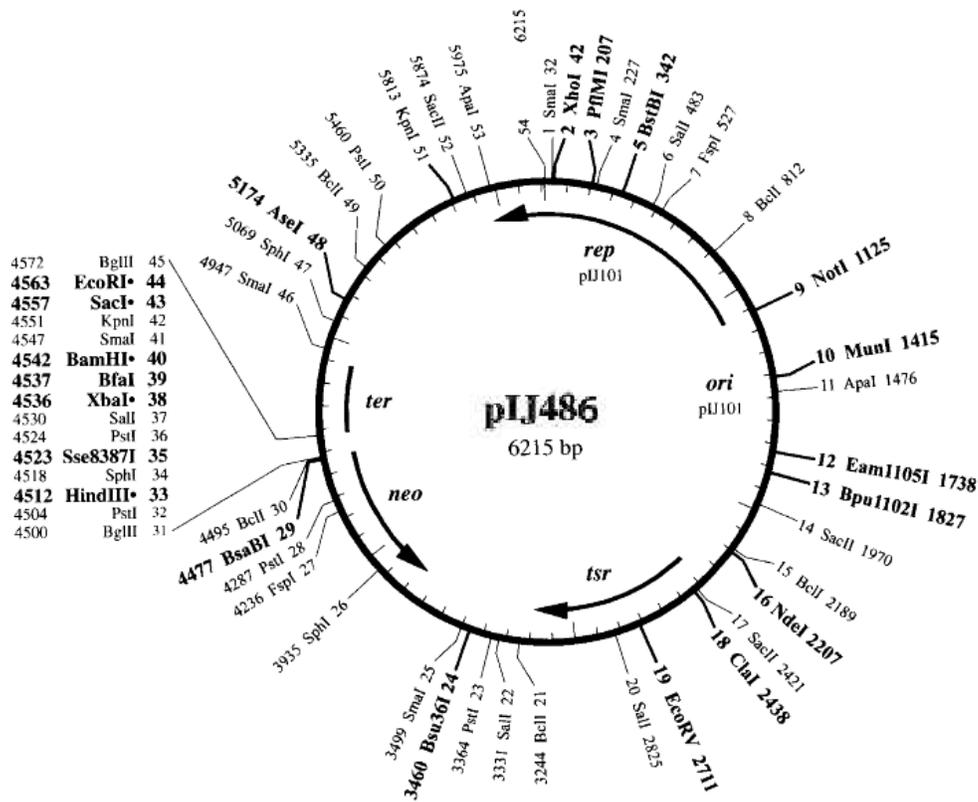


Figura 11. Mapa del plásmido pIJ486.

**pIJ486-vsi-RIPsc:** Plásmido derivativo de pIJ486 que contiene el *cassette* de expresión vsi-PEP32-RIPsc para *Streptomyces lividans* TK24.

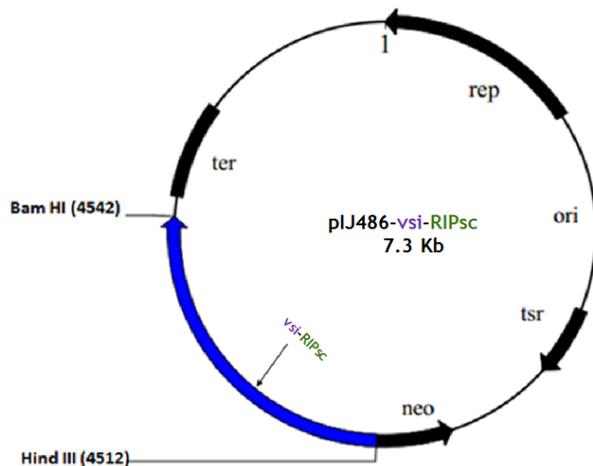


Figura 12. Mapa del plásmido pIJ486-vsi-RIPsc.

**pIJ486-vsi-PEP32-RIPsc:** Plásmido derivativo de pIJ486 que contiene el *cassette* de expresión vsi-PEP32-RIPsc para *Streptomyces lividans* TK24.

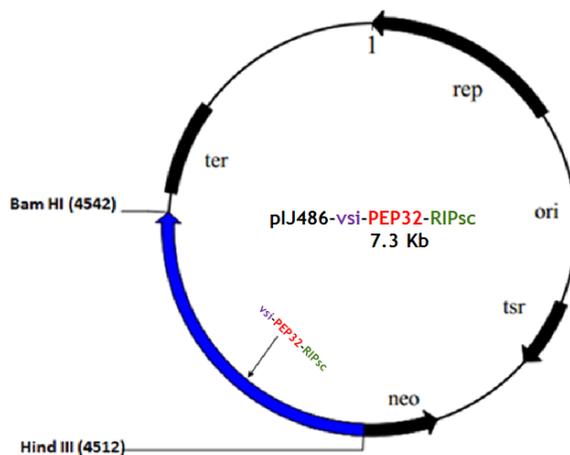


Figura 13. Mapa del plásmido pIJ486-vsi-PEP32-RIPsc.

**pIJ486-vsi-RIPsc-PEP32:** Plásmido derivativo de pIJ486 que contiene el cassette de expresión vsi-RIPsc-PEP32 para *Streptomyces lividans* TK24.

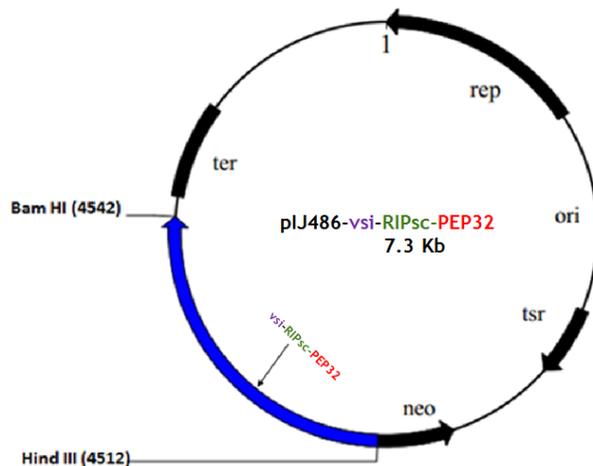


Figura 14. Mapa del plásmido IJ486-vsi-RIPsc-PEP32.

**pET-PEP32-RIPsc:** Plásmido derivado de pET17b clonado con el fragmento *SacI* /*BamHI* que codifica la fusión PEP32-RIPsc.

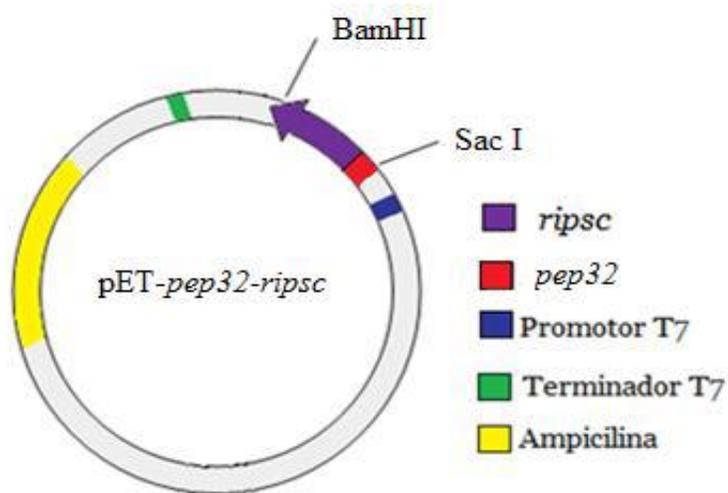


Figura 15. Mapa del plásmido pET-PEP32-RIPsc.

**pET-RIPsc-PEP32:** Plásmido derivado de pET17b clonado con el fragmento *NdeI*/*XhoI* que codifica la fusión RIPsc -PEP32.

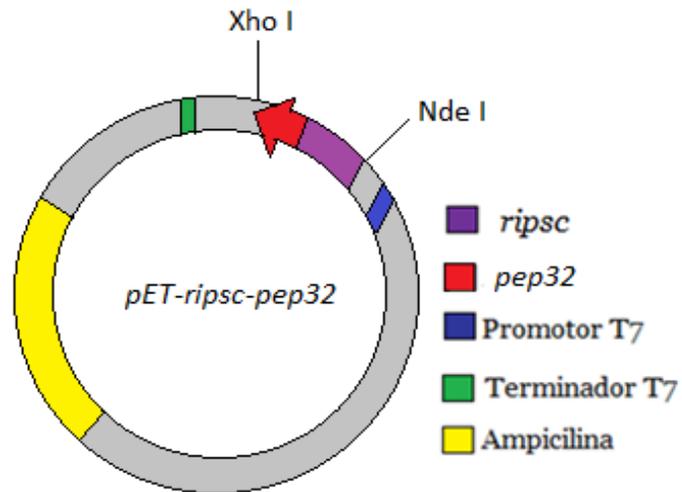


Figura 16. Mapa del plásmido pET-RIPsc-PEP32.

**pET-RIPsc:** Plásmido derivado de pET3a clonado con el inserto *BamHI/NdeI* que codifica la proteína RIPsc.

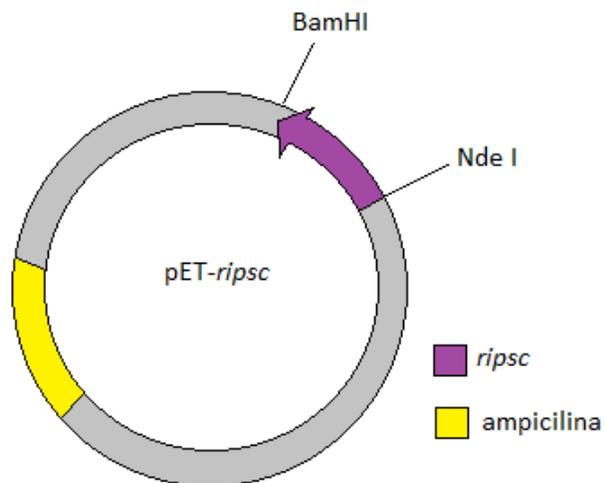


Figura 17. Mapa del plásmido pET-RIPsc

## 5.4 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo se resumen a continuación.

<b>Oligo</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Referencia</b>
T7 FW	aatacgactcactataggg	Este trabajo
T7 RV	gctagtattgctcagcgg	Este trabajo
PEPRIP_FW	tagagctcatgcgtaaattggcattttgggatacgcccaacaggc	Reyes,2012
PEPRIP_RV	taggatcctcacctttgcccgttgatggc	Reyes, 2012
RIPEP_FW	tacatatggatacgcccaacaggcagacaacatacattgatttc	Reyes, 2012
RIPEP_RV	tactcgagtcacaaaaatgccatttacgctttgccggtgatgg	Reyes, 2012
pvsipep_fw	taggatccggttataaccattaccgttcgtccatgctggacaggcgccacg	Este trabajo.
PEPpvsipep_rv	ctggtggcgtatcccaaaaatgccatttacggcctgcgcg	Este trabajo.
vsiRIP_FW	cgcgaggcccgtaaattggcattttgggatacgcccaacag	Este trabajo.
RIPvsi_RV	taaagcttctatcacctttgcccggtgatggcgcggaggattttgtccacg	Este trabajo.
pvsipep_fw	taggatccggttataaccattaccgttcgtccatgctggacaggcgcc	Este trabajo.
RIPpvsipep_rv	ttgtctgcctggtggcgtatcggcctgcgcggtg	Este trabajo.
vsiPEP_FW	caccgcgaggccgatacgcccaacaggcagacaa	Este trabajo.
PEPvsi_RV	taaagctttcacaaaaatgccatttacgctttgcccggtgatggcgcggaggta	Este trabajo.
pIJ486_FW	cgcaattccttagttgttc	Soliveri, <i>et al.</i> ,1999
pIJ486_RV	gcgaaacgatcctcatcc	Soliveri, <i>et al.</i> ,1999

## 5.5 Manipulación de ADN

La manipulación de ADN en todos los casos fue llevada a cabo bajo técnicas estándar (Sambrook, et al., 1989). Los plásmidos y oligonucleótidos usados en el trabajo son listados en apartados anteriores. Las endonucleasas de restricción fueron provistas por Promega Inc. Se realizaron reacciones estándar de PCR utilizando *Pfu DNA Polymerase (Thermo Scientific)*. Generalmente los fragmentos obtenidos de PCR fueron clonados en pJET 1.2 y después transferidos al vector de interés. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la Unidad de Síntesis y Secuenciación de

DNA, Instituto de Biotecnología, UNAM.

### 5.5.1 Transformación de *E.coli*

La transformación de *E.coli* se llevó a cabo por *heat-shock*, para lo cual se prepararon células ultra-competentes (Hengen, 1996; Inou, *et al.*, 1990) de la siguiente manera: Se inocularon 25 mL de medio LB con una colonia de DH5 $\alpha$ , se incubaron a 37°C durante 8 – 10 h. Se inocularon 100 mL de LB con 10 mL del pre-inóculo. Se dejaron crecer con agitación constante (250 rpm) a 18°C durante aproximadamente dos días hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.5 – 0.6. Se transfirió el matraz a un baño de hielo y se mantuvo durante 10 min. Se centrifugó el medio a 3,836  $\times g$  por 10 min a 4°C. El *pellet* se resuspendió en 40 mL de Buffer TB (10 mM; Pipes; 15 mM; CaCl<sub>2</sub>, 250 mM; KCl, pH 6.7, posteriormente adicionado con 55 mM; MnCl<sub>2</sub>) frío, y se mantuvo en hielo durante 10 min. Se centrifugó a 3,836  $\times g$  por 10 min a 4°C. El *pellet* se resuspendió en 10 mL de TB más 0.7 mL de DMSO (dimetilsulfóxido), y se mantuvo en hielo durante 10 min. El volumen final se repartió en alícuotas de 100  $\mu$ L en tubos eppendorf de 1.5 mL, y se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido. Se almacenaron a -70°C para su uso. Para la transformación se tomaron 50  $\mu$ L de células ultra-competentes y se depositaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se le adicionaron 10  $\mu$ L de plásmido, se resuspendió suavemente y se mantuvo en hielo durante 30 min. Se transfirió la mezcla a un baño de agua a 42°C durante 2 min y se enfrió rápidamente en hielo. Se adicionaron 800  $\mu$ L de medio LB, se mezcló por inversión y se incubó a

37°C durante 1 h. Se sembró una alícuota de 100 µL en la superficie de una placa con LB/agar y con el antibiótico específico. Se incubó toda la noche a 37°C.

### **5.5.2 Minipreparaciones para la extracción de ADN plasmídico de *E. coli***

Se tomó una colonia bacteriana proveniente de una placa de agar LB con ampicilina (100 µg/mL) con 12-16 h de crecimiento y se puso a crecer en una placa nueva a 37°C toda la noche. Se tomó un botón celular con un palillo y se resuspendió en 59 µL de agua estéril. Se adicionaron 350 µL de STET (EDTA 50 mM, pH 8; sacarosa 8%; Tris-HCl 10 mM, pH 8; Tritón X-100, 0.5%) más 10 µL de lisozima a una concentración de 10 mg/mL y se hirvió durante 1 minuto, las proteínas y el ADN cromosómico se precipitaron por centrifugación a 14,000 rpm, 10 minutos a temperatura ambiente. El precipitado formado se eliminó con un palillo estéril. El ADN plasmídico se precipitó con 40 µL de acetato de sodio (3 M pH 5.2) más 600 µL de isopropanol, el contenido del tubo se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos para posteriormente centrifugar a 14,000 rpm, 5 minutos a temperatura ambiente.

El sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó con 600 µL de etanol al 70% centrifugando a 14,000 rpm por 5 minutos, eliminando el sobrenadante; los precipitados se dejaron secar por 15 minutos después de los cuales se resuspendieron con 25 µL de agua estéril y con estas muestras se corrió una electroforesis en gel de agarosa.

### 5.5.3 Selección de transformante de *E.coli*

Para llevar a cabo la selección de las transformantes de *E.coli*, en primer lugar se hizo uso de los marcadores adecuados que confieren resistencia a algún antibiótico. Este es un método rápido y efectivo para la selección. Una vez crecidas las transformantes, se seleccionaron al azar algunas de ellas y se sembraron nuevamente en placas de LB/agar con ampicilina (100 µg/mL) en condiciones de crecimiento para *E.coli*. Posteriormente se llevaron a cabo minipreparaciones para extraer AND plasmídico (5.5.2) de cada transformante seleccionada. Se corrió una electroforesis en gel de agarosa, se seleccionó las transformantes que contenían DNA plasmídico y se llevó a cabo una digestión enzimática con las enzimas HindIII/BamHI (Promega) con el fin de comprobar que el inserto se allá ligado al plásmido.

### 5.5.4 Transformación de *Streptomyces lividans*

La transformación de esta cepa se llevó a cabo mediante la técnica de protoplastos. Los protoplastos se prepararon de la siguiente manera: se colocó un pre-cultivo de 48 h de *Streptomyces lividans* Tk24 en medio Phage a 30°C y 150 rpm. Después del tiempo de incubación, se inocularon 50 mL de medio S suplementado con glicina 20% y glucosa 6.6% con 5 mL del pre-cultivo previamente homogenizado y se incubó durante 24 h a 30°C y 150 rpm. La biomasa obtenida se centrifugó a 6,137 x g durante 8 min, se descartó el sobrenadante, el *pellet* se lavó con buffer PTC, se centrifugó bajo las mismas condiciones y se resuspendió en 10 mL de buffer PTC adicionado con 10

g/mL de lisozima, se incubó a 30°C y 120 rpm. La suspensión se monitoreó por medio de la observación al microscopio hasta que se observó la formación de protoplastos (1 h aproximadamente). Una vez obtenidos los protoplastos se agregó 10 mL de PTC y se resuspendió por pipeteo, la suspensión se centrifugó a 6,137  $\times$  g durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se centrifugó nuevamente a 6,137  $\times$  g durante 5 min. El *pellet* obtenido se lavó con 5 mL de PTC y se hicieron alícuotas de 200  $\mu$ L y se conservaron a -70°C hasta su uso.

Para la transformación se descongeló una alícuota de protoplastos en baño de agua a 37°C, se agregaron 10  $\mu$ L de ADN plasmídico y se mezcló por pipeteo. Se agregó 500  $\mu$ L de PEG 6000 al 35 % (el polietilenglicol actúa como desestabilizador de la membrana y facilita así la captura de ADN exógeno), se mezcló y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Se prepararon cajas con medio R<sub>2</sub> suplementadas con CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 2mM (1/1000) y CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 36.8% (1/100). Se inocularon las cajas con 150  $\mu$ L de la mezcla y se incubaron a 30°C por 24 h con el fin de que los protoplastos se regeneraran. Después de este tiempo se agregó 1 mL de tioestrepton a una concentración de 50  $\mu$ g/ml y se difundió en el agar y se incubaron a 30°C hasta obtener transformantes.

#### **5.5.5 Selección de transformantes de *Streptomyces* por PCR de Colonia**

Para verificar que el cassette de expresión se encuentra en las transformantes se realizó PCR de colonia utilizando oligos específicos para pIJ486. Para ello, se maceró la colonia transformante, la cual se tomó como ADN molde en la PCR. El programa

usado es el reportado por (Soliveri, *et al.*, 1999). Posteriormente se secuenció el inserto.

## 5.6 Manipulación de ARN

El aislamiento del ARN se llevó a cabo bajo esterilidad y asepsia absoluta, de acuerdo a condiciones estándar (Sambrook, *et al.*, 1989), ya que las RNAsas son proteínas altamente estables y difíciles de inactivar (Fleige & Pfaffl, 2006). Por lo tanto, para obtener ARN de calidad, libre de contaminantes y en buena concentración se debe mantener las condiciones adecuadas. Para asegurar la ausencia completa de ADN en las muestras, se incluyó un tratamiento con DNAsas (Promega). En los casos necesarios, se realizó la electroforesis de ARN bajo condiciones desnaturalizantes con el uso de formaldehído (para 50 mL de gel, agarosa 1% y formaldehído 3%) y con el buffer de corrida MAE (10x, 0.2 MOPS, 50mM acetato sódico y 10 mM de EDTA, ajustado a pH 7 con NaOH). La concentración y pureza del ARN fueron determinadas por medio de un espectrofotómetro nanodrop 2000 provisto por *Thermo scientific*. El agua y todas las soluciones utilizadas para cada experimento de manipulación de ARN fueron tratadas con DEPC (dietilpirocarbonato) y preparadas o almacenadas en recipientes libres de nucleasas.

### 5.6.1 Aislamiento de ARN de *E.coli*

La extracción de ARN para *E.coli* fue llevada mediante la técnica de trizol de la siguiente manera: la biomasa obtenida se congeló con N<sub>2</sub> líquido y se almacenó a -70

hasta su uso. Se maceró la biomasa con N<sub>2</sub> líquido. Sin dejar descongelar las muestras se tomó con una espátula estéril 50 µL de volumen del macerado y se depositó en tubos eppendorf estériles congelados. Después se añadió 1 mL de Trizol a cada muestra, se homogeneizó vigorosamente en vórtex, se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente y se agregó 200 µL de cloroformo. Posteriormente, se mezcló vigorosamente 15 seg en vórtex y se incubó 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 4 °C y 14,000 rpm por 15 min y se transfirió la fase acuosa a nuevos tubos. El RNA presente en la fase acuosa se precipitó con 500 µL de isopropanol y se almacenó a -20 °C toda la noche. El precipitado se centrifugó a 4°C, 14000 rpm por 30 min, se descartó el sobrenadante. El *pellet* se lavó con 1 mL de etanol al 70%, se centrifugó a 4°C, 8000 rpm, 5 min, se desechó el sobrenadante. El *pellet* se dejó secar 10 min. El RNA se resuspendió en 20 µL de agua destilada libre de RNAsas, después se colocó en baño de hielo 10 min, se incubó a 65°C, 10 min con agitación constante. Posteriormente se almacenó a -70 °C.

### **5.6.2 PCR de transcriptasa reversa (RT-PCR)**

La reacción RT-PCR fue llevada a cabo mediante el uso del Kit One Step RT-PCR provisto por Quiagen tal como lo especifica el proveedor. El programa utilizado para la reacción fue: 30 minutos a 50°C para la transcripción reversa; 15 minutos a 95°C para la activación de la PCR inicial, 30 segundos a 94°C para la desnaturalización, 1 minuto a 60°C para la hibridación, 1 minutos a 72 °C x 40 ciclos para la extensión; y 10 minutos a 72°C para la extensión final. El ARN total utilizado como molde fue previamente tratado con DNAsas con el fin de eliminar resultados debido a la

contaminación por ADN. Como control negativo se corrió un PCR clásico utilizando ARN como molde.

## 5.7 Expresión de proteínas

---

En el estudio de la aplicación de RIPsc se construyeron proteínas quiméricas con el objetivo de brindar especificidad. La proteína de interés se sobre-expresó en dos sistemas de expresión diferentes. El primer sistema de expresión es para células de *E.coli* BL21(DE3) pLysS, en el cual se hizo uso del plásmido pET17b como vector de expresión y para el segundo se diseñó un sistema de expresión para *Streptomyces lividans* TK24, ya que además de ser considerado un organismo no patógeno a humanos (nivel de contención 1), secreta bajas cantidades de proteasas extracelulares, las cuales pueden afectar los rendimientos de la proteína de interés. Este sistema de expresión se diseñó fusionando un péptido señal a la proteína de interés, lo que constituye una unidad de translocación única, y que ha sido usado como herramienta molecular para optimizar los rendimientos de las proteínas secretadas, evitando con esto la toxicidad a la célula hospedera (Kieser, *et al.*, 2000). El sistema utiliza como plásmido de clonación, el vector pIJ486 que contiene un gen de resistencia a tioestrepton.

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

La sobre-expresión de las proteínas quiméricas PEP32-RIPsc y RIPsc-PEP32 fue llevada a cabo en el sistema de expresión pET17b con células de *E.coli* BL21(DE3) pLysS, que es regulado bajo la inducción con IPTG. Para llevar a cabo la inducción se hizo un pre-cultivo de 10 mL de medio LB suplementado con ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL y cloranfenicol a una concentración final de 35

$\mu\text{g}/\text{mL}$  en condiciones de crecimiento para *E.coli* (37°C, 250 rpm). Los 10 mL del pre-cultivo fueron utilizados para inocular 100 mL de medio LB con el antibiótico correspondiente. Después de la inoculación se incubó a 37°C y se monitoreo la densidad óptica hasta alcanzar un valor de 0.8 UA. Una vez alcanzada la densidad óptica necesaria, se agregó 1 mL de una solución stock de IPTG 100 mM (0.0238 g/mL) para tener una concentración final de 1 mM de IPTG. Se tomaron muestras de 1 mL a las 0, 2 y 4 h después de la inducción. Se recogió el *pellet* por medio de centrifugación. El *pellet* se almacenó a una temperatura de -20°C hasta su uso (no más de 5 días).

### **5.7.2 Separación de fracciones proteicas solubles e insolubles de *E.coli***

Para la separación de las fracciones soluble e insoluble de las proteínas totales obtenidas durante la inducción de RIPsc, se tomaron muestras de 1 ml del cultivo bacteriano resultante de la sobre-expresión bajo inducción con IPTG, en diferentes tiempos, 0 h, 2 h y 4 h. Las muestras fueron centrifugadas (3 minutos 10,000  $\times g$ ). Los *pellets* obtenidos fueron resuspendidos en 57  $\mu\text{L}$  ATRIT (10 % sucrosa, 50 mM Tris-HCl, pH 8), con la adición de 19  $\mu\text{l}$  de solución de lisozima (20 mg/mL), la mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación se agregó a la mezcla 76  $\mu\text{L}$  de CTRIT (0.2 % Tritón X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8). Las muestras fueron mezcladas con un vórtex e incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después las células se lisaron por medio de congelamiento ( $\text{N}_2$  líquido) y descongelamiento ( $\text{H}_2\text{O}$  a temperatura ambiente), las muestras obtenidas se centrifugaron durante 5 minutos a 10,000  $\times g$ . El

sobrenadante, correspondiente a la fracción soluble, fue mezclado con 25  $\mu\text{L}$  de buffer de carga para proteína y analizado por electroforesis SDS-PAGE. El *pellet* restante, es decir, la fracción insoluble, fue lavado con 150  $\mu\text{L}$  of BTRIT (25 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8), se resuspendió en 167  $\mu\text{L}$  de TRIT (3 vol. ATRIT, 1 vol. ATRIT y 4 vol. CTRIT) y se mezcló con 33  $\mu\text{L}$  de buffer de carga para proteína para el subsecuente análisis con electroforesis SDS-PAGE.

### 5.7.3 Sobre-expresión proteica en *Streptomyces lividans* TK24

Para llevar a cabo la sobre-expresión proteica en *Streptomyces lividans*, primero se diseñó un *cassette* de expresión el cual contiene el péptido señal del inhibidor de subtilisina de *Streptomyces venezuelae* CBS762.70 (*vsi*) unido a PEP32-RIPsc y RIPsc-PEP32 respectivamente, dando como resultado el fragmento fusión *vsi*-PEP32-RIPsc y *vsi*-RIPsc-PEP32. Posteriormente el *cassette* de expresión fue clonado en el vector de amplificación pJET 1.2. A partir de la construcción pJET-*vsi*-PEP32-RIPsc y pJET-*vsi*-RIPsc-PEP32, se obtuvo el fragmento de fusión por digestión con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, de la misma manera el vector de expresión pIJ486 fue digerido con las mismas enzimas. La clonación de *vsi*-PEP32-RIPsc y *vsi*-RIPsc-PEP32 en pIJ486 resultó en las siguientes construcciones: pIJ486-*vsi*-PEP32-RIPsc y pIJ486-*vsi*-RIPsc-PEP32, las cuales se utilizaron para transformar *S. lividans*.

Para llevar a cabo la secreción de PEP32-RIPsc y RIPsc-PEP32, las transformantes fueron inoculadas en 50 mL de medio Phage suplementadas con tioestrepton a una concentración final de 50  $\mu\text{g/mL}$ , se incubaron a 30°C, 150 rpm durante 20 días.

Posteriormente se centrifugó 30 minutos a 5,000 rpm ( $3,836 \times g$ ), 4°C para retirar biomasa, el extracto crudo obtenido se clarificó mediante filtración (0.22  $\mu$ m poro de filtro) para llevar a cabo la precipitación proteica con TCA. La precipitación proteica con TCA se realizó de la siguiente manera: al extracto crudo se le agregó un volumen de una solución de TCA/acetona 20%, se almacenó a -20°C por 12 h, se centrifugó 15 minutos a 5,000 rpm, 4°C. El *pellet* obtenido se lavó con acetona pura a 4°C y se centrifugó 15 minutos a 5,000 rpm, 4°C (este paso se repitió dos veces) y después con acetona al 80 %. Se dejó secar el *pellet* durante 10 minutos aproximadamente y se resuspendió en buffer de muestra para SDS-PAGE sin azul de bromofenol. Las muestras se almacenaron a -70°C.

#### **5.7.4 Electroforesis SDS-PAGE**

Se realizaron geles unidimensionales bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de acuerdo con la metodología descrita por (Laemmli, 1970). El gel de concentración fue al 5% y el de separación al 12%, con condiciones eléctricas de voltaje constante de 100 V, la muestra fue revelada mediante tinción con azul de Coomasie (Bio-Rad, número de catálogo 161-0786). El marcador utilizado fue Prestained SDA-PAGE Standards, broad range (Bio-Rad, número de catálogo 161-03818).

## 5.8 Ensayo de actividad sobre hongos fitopatógenos

El bioensayo consistió en montar una fermentación de 20 días, después, se centrifugó para retirar biomasa por 30 minutos a 5,000 rpm ( $3,836 \times g$ ), 4°C y se filtró (2.5 µm poro de filtro) en vacío para retirar la biomasa que llegó a resuspenderse. Se mezcló un volumen del extracto con un volumen de PDA/agar con el hongo embebido y se incubaron las cajas a 30°C por aproximadamente 48 h. Los hongos utilizados para los bioensayos fueron los siguientes. *Penicillium chrysogenum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus terreus*, *Colletotrichum sp* y *Paecilomyces sp*.

## 6. Resultados

De acuerdo a los antecedentes del trabajo, la proteína RIPsc es inactiva sobre células fúngicas y bacterianas en ensayos *in vivo* (Reyes, *et al.*, 210). Sin embargo, su actividad es interesante en aplicaciones agrícolas en las que se busca combatir hongos fitopatógenos. Por tal motivo, se diseñó una estrategia experimental que consiste en la construcción de una proteína quimérica compuesta por la cadena con dominio RIP y un péptido específico de penetración celular contra hongos que facilite su internalización sobre fitopatógenos. La estrategia general para el desarrollo experimental de la proteína quimérica se muestra a continuación.

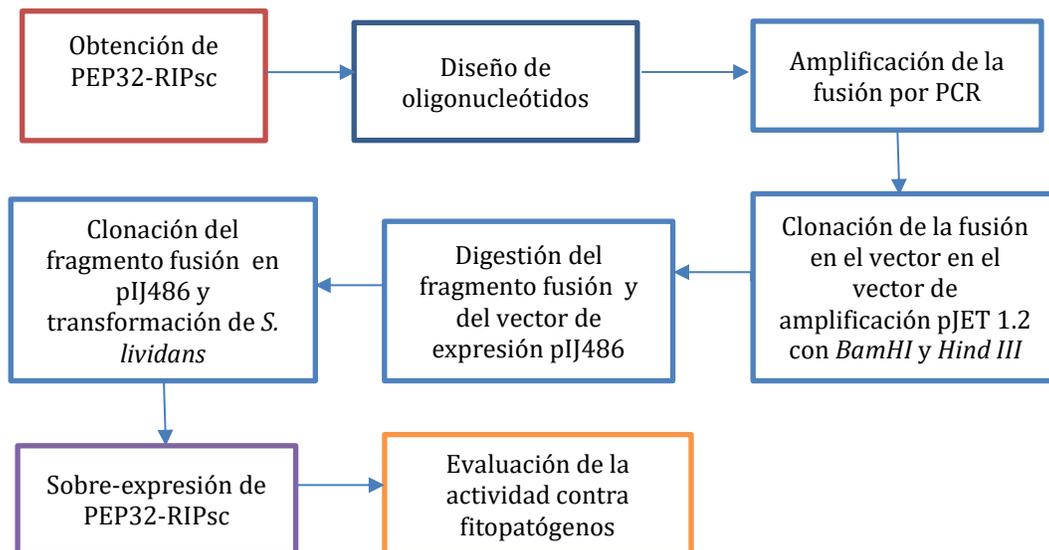


Figura 18. Estrategia general para la obtención de PEP32-RIPsc.

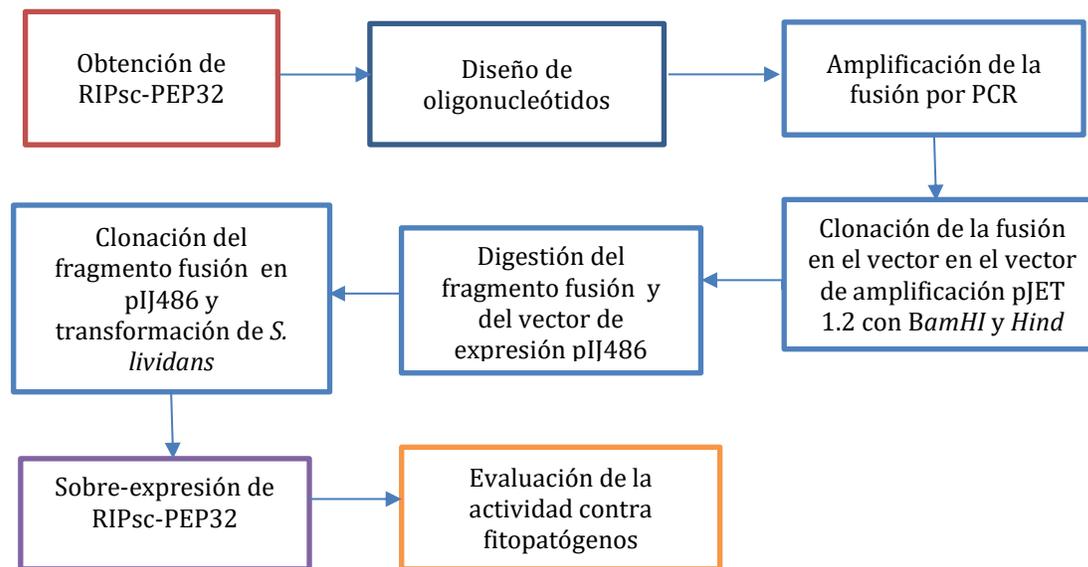


Figura 19. Estrategia general para la obtención de RIPsc-PEP32

En esta estrategia, se plantean dos posibilidades, una es fusionar el péptido al extremo amino terminal y la otra al extremo carboxilo terminal de RIPsc. Esto con el objetivo de determinar en qué caso el péptido es capaz de cumplir la función de acarrear a RIPsc dentro de las células sin alterar la función del dominio RIPsc, debido a que existe la posibilidad de que la fusión interfiera en la actividad de RIPsc por impedimento estérico. Por otro lado, utilizar dos sistemas de expresión para ambas proteínas, con el fin de determinar qué sistema es más eficiente para la obtención de la proteína quimérica.

La obtención de las transformantes para PEP32-RIPsc y RIPsc-PEP32 en el sistema de expresión de *E.coli* fue realizada previamente en nuestro laboratorio por Reyes, (2012) y evaluada en el presente trabajo. En la Figura 20, se muestra las fracciones

proteicas obtenidas en un gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12.5%, donde: a) PEP32-RIPsc y b) RIPsc-PEP32 respectivamente. Las muestras se tomaron a las 0 h, 2 h y 4 h de la inducción para realizar el fraccionamiento proteico. La finalidad de la separación de fracciones fue analizar la naturaleza de la proteína heteróloga y verificar si se encuentra en el cultivo de manera nativa o en cuerpos de inclusión. El proceso de fraccionamiento proteico se describe en la sección 5.7.2.

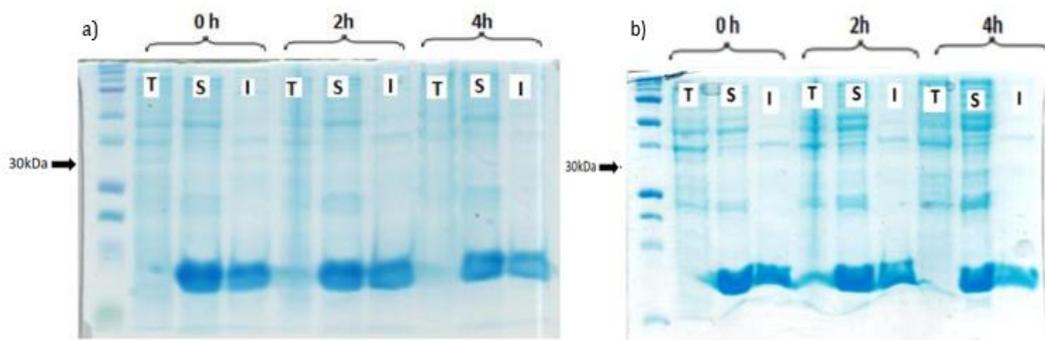


Figura 19. Gel de poliacrilamida, SDS-PAGE al 12.5% para la separación de PEP32-RIPsc y RIPsc-PEP32, teñido con azul Coomassie. Las muestras separadas en el gel corresponden a las fracciones, T= Proteínas Totales, S=Proteínas Solubles, I=Proteínas Insoluble, dichas fracciones fueron separadas de muestras tomadas a las 0 h, 2h y 4 h de la inducción. En cada carril se corrieron 20  $\mu$ L de muestras. Marcador de peso molecular All Blue de Bio-RAD (Reyes, 2012).

Como se puede observar, no fue posible detectar la banda correspondiente a PEP32-RIPsc y RIPsc-PEP32, cuyo tamaño es de 30 kDa.

Con base a estos resultados, se analizó la expresión de RIPsc a nivel de transcripción para evaluar la efectividad del sistema. Se siguió la misma metodología llevada a cabo por Reyes, (2012) para inducir la sobre-expresión de PEP32-RIPsc y RIPsc-PEP32

(ver Sección 5.7.1). Se tomaron muestras a las 0 h, 2 h y 4 h de la inducción para extraer el ARN total mediante la técnica de trizol y se realizó la PCR de transcriptasa reversa. En la Figura 21, se puede observar las bandas de ADN que corresponden a la retrotranscripción de RIPsc, PEP32-RIPsc y RIPsc-PEP32, cabe señalar que los controles de la cepa TK24 y TK24-pIJ486 no produjeron ninguna banda que indicara

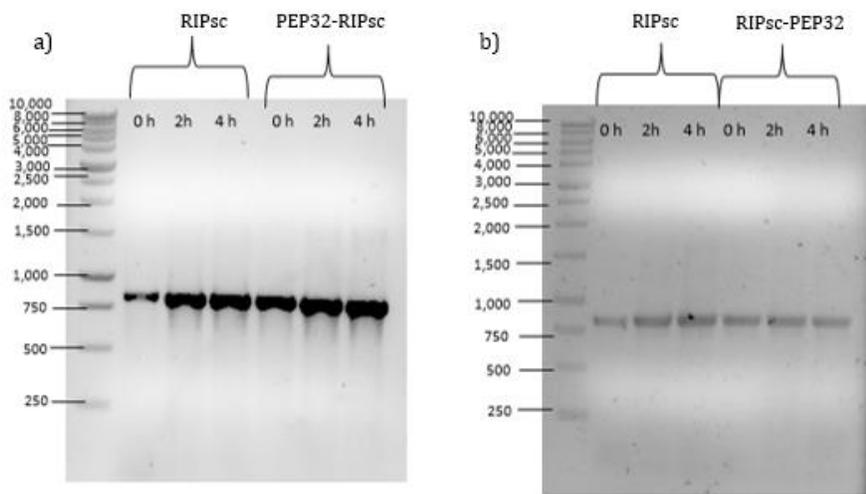


Figura 20. Gel de agarosa 1%, donde se observa las bandas correspondientes al gen RIPsc, PEP32-RIPsc y RIPsc-PEP32.

alguna expresión inespecífica. Asimismo, se secuenciaron los genes en cuestión obteniéndose un 100% de identidad. Por lo tanto, se puede concluir que los genes se están transcribiendo correctamente, sin embargo, la falta de detección de las proteínas puede ser debida a niveles bajos de traducción de la proteína de fusión o a que la proteína al ser de naturaleza tóxica interfiere con la sobre-expresión debido a que es perjudicial sobre la célula huésped.

Se sabe que, cuando la proteína de interés no se puede detectar a través de una técnica sensible (por ejemplo, Western blot) o se detecta pero en niveles muy bajos ( $\leq 1 \mu\text{g/L}$ )

de cultivo) (Miroux y Walker, 1996; Dumon-Seignovert *et al*, 2004), es porque la proteína interfiere con la proliferación normal y la homeostasis del microorganismo y el resultado visible es la lenta tasa de crecimiento, densidad celular final baja, y la muerte (Doherty *et al*, 1993; Dong *et al.*, 1995).

De acuerdo con los resultados obtenidos de la transcripción reversa y a los antecedentes, se pensó en la sobre-expresión en *Streptomyces lividans* TK24, ya que *E.coli* pese a que es el hospedero heterólogo preferentemente seleccionado debido a la serie de modificaciones genéticas que se le han hecho para lograr una cepa adecuada para sobre-expresar proteínas, no siempre es el adecuado, ya sea porque no es capaz de llevar a cabo modificaciones post-traduccionales apropiadas (por ejemplo, la glicosilación) o porque no facilita el plegado de proteínas a su configuración nativa (proteína funcional) o se da en niveles bajos de expresión. Asimismo, como bacteria Gram-negativa, su membrana externa contiene lipopolisacáridos, una fuente de endotoxinas.

Las proteínas recombinantes sobre-expresadas en *E.coli* se acumulan frecuentemente en cuerpos de inclusión en el citoplasma o en el espacio periplasmático, lo cual requiere de procesos de extracción de las proteínas con agentes fuertes y de renaturalización para el replegamiento adecuado de las proteínas, los cuales pueden afectar su actividad biológica. Por otro lado, *S. lividans* TK24, una bacteria Gram-positiva, no posee membrana externa por lo que las proteínas heterólogas son secretadas directamente al medio extracelular, lo cual favorece su posterior recuperación. No posee un extenso sistema de restricción-

modificación al ADN foráneo y no es patógeno a los humanos. Cuando se ha utilizado a *S. lividans* para la producción de proteínas recombinantes, la estrategia ha sido fusionar el gen de interés a la secuencia señal de una proteína homóloga abundantemente secretada a través de la vía de secreción Sec (Gilbert, *et al.*, 1995; Kieser, *et al.*, 2000). Uno de los ejemplos más sobresalientes ha sido la obtención del factor  $\alpha$  de necrosis tumoral murino (mTNF $\alpha$ ) a concentraciones de 300 mg/L de sobrenadante de cultivo (SN) cuando se utilizaron las señales reguladoras y de secreción del inhibidor de subtilisina de *Streptomyces venezuelae* CBS762.70 (*vsI*) (Lammertyn, *et al.*, 1997). Para hacer esto posible, se diseñó un *cassette* de expresión para *S. lividans* y se clonó en el vector pIJ486 y de esta manera obtener las proteínas PEP32-RIPsc y RIPsc-PEP32.

### 6.1 Sobre-expresión de PEP32-RIPsc en *S. lividans*

Se diseñó el *cassette* de expresión PEP32-RIPsc y se siguió la estrategia para su construcción como se muestra en la Figura 22.

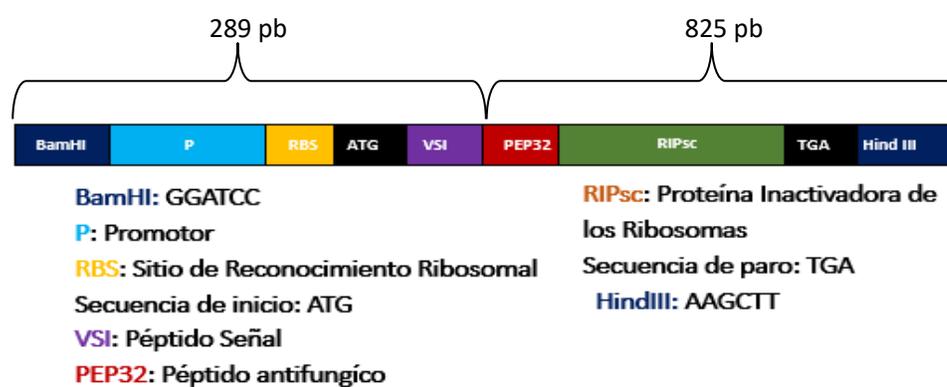


Figura 21. *Cassette* de expresión PEP32-RIPsc para *Streptomyces lividans* TK24, el cual se clonará en el vector pIJ486.

Se tomó como base la técnica de Double-Joint PCR (*double-joint polymerase chain reaction*) o PCR de doble unión, la cual se ha utilizado para construir vectores para su integración al genoma específico sin etapas de subclonación laborioso (Yu, *et al.*, 2004). En una primera ronda de PCR, se utilizó la enzima *Pfu* DNA Polymerase, de alta fidelidad para amplificar los componentes 5' y 3' de cada gen con los oligonucleótidos específicos *Foward* y *Reverse-Fusión* y *Fusión-Foward* y *Reverse* respectivamente. Los oligonucleótidos de fusión contienen una región de homología. En la segunda ronda de PCR, que es una reacción de ensamblaje, los fragmentos obtenidos de cada amplificación funcionan como ADN molde y como primers. El fragmento de menor tamaño se adicionó en mayor proporción, en una relación 3:1. Finalmente, en la tercera ronda de PCR, la combinación del oligo *Foward* de la primera amplificación con el oligo *Reverse* de la segunda amplificación son utilizados para la amplificación del producto final (Figura 23).

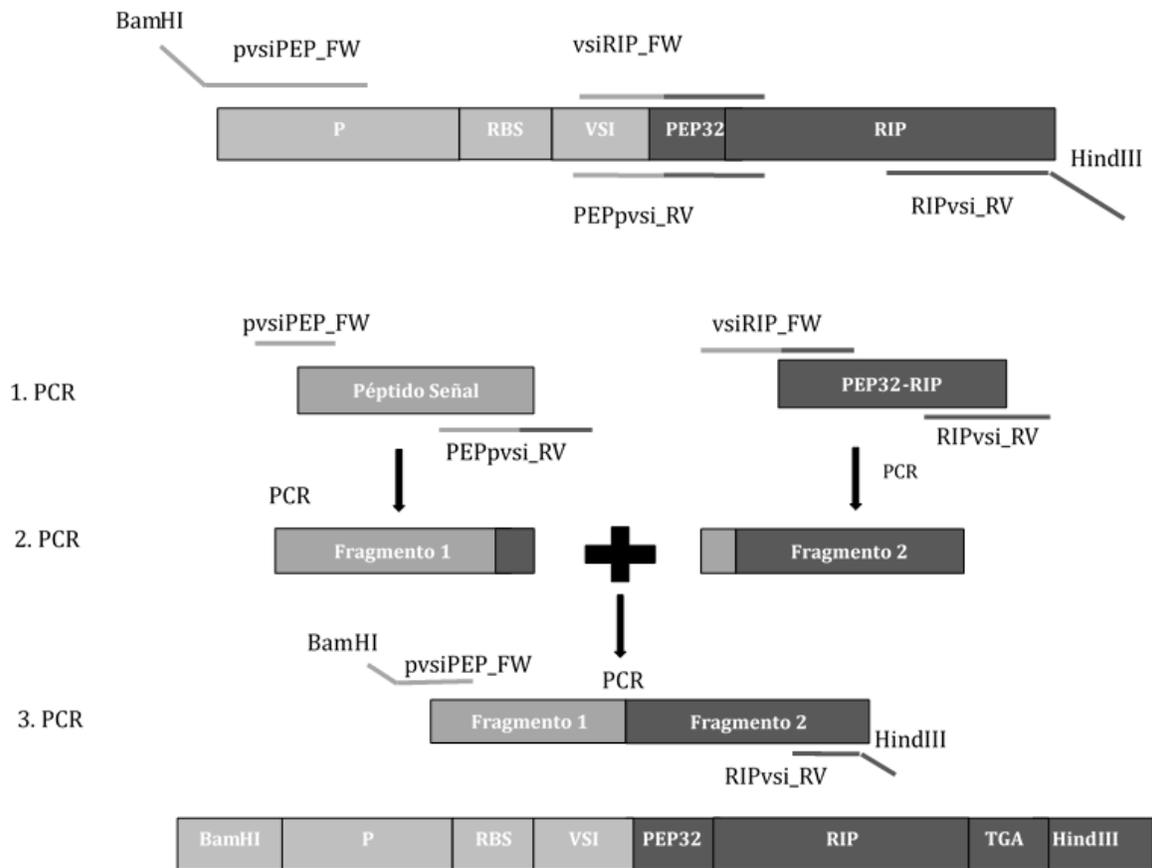


Figura 22. Representación gráfica de la construcción del *cassette* de expresión para sobre-expresar PEP32-RIPsc en *S. lividans*. Donde vsirip-fw y PEPpvsirv actúan como oligo *Fusión-Foward* y *Reverse-Fusión*.

El programa usado para la primera ronda de PCR así como las condiciones de reacción fue como sigue:

Tabla 3. Mezcla de reacción para la amplificación de *vsí* y PEP32-RIPsc así como el programa utilizado en cada caso.

Componente de la PCR	Volumen (μL)	Programa	<i>VSI</i>	PEP32-RIPsc
Buffer 10x	5	1.Inicio	95°C - 2 min	95°C- 2 min
dNTP's (10 mM)	1	2.Desnaturalización	95°C-1 min	95°C-1 min
Oligo foward FW (10 μM)	2.5	3.Hibridación	56°C -30 s	63°C -30 s
Oligo reverse RV (10 μM)	2.5	4.Extensión	72°C-min	72°C-2min
ADN (100 ng)	1	Repetir desde paso 2, 30 veces.		
Pfu DNA Polymerase (2.5 U/μL)	0.5	5.Extensión final	72°C- 5 min	72°C- min
Agua	37.75	Mantener A 4°C		
Volumen total	50 μL			

A continuación se muestra las bandas obtenidas de la primera amplificación de manera independiente de *vsí* y PEP32-RIPsc. La banda de *vsí* tiene un tamaño de 320 pb y la proteína PEP32-RIPsc de 837 pb (Figura 24).

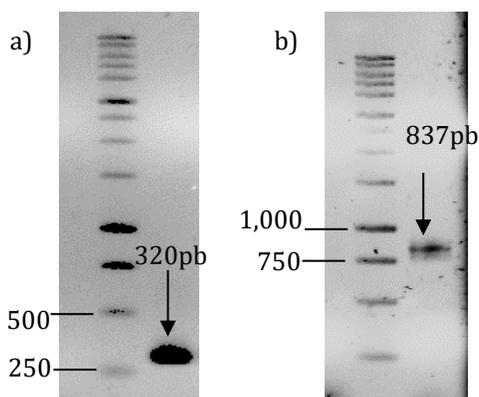


Figura 23. Amplificación de los fragmentos *vsí* (a) y PEP32-RIPsc (b). Gel de agarosa al 1%, marcador de peso molecular 1 Kb.

El programa para la reacción de ensamblaje de la segunda ronda de PCR fue la siguiente:

Tabla 4. Mezcla de reacción para la fusión de los fragmentos así como el programa empleado (Yu, *et al.*, 2004).

Componente	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	PROGRAMA	
Buffer 10x	2.5	1.Inicio	94°C- 2 min
dNTP's (10 mM)	0.5	2.Desnaturalización	94°C-30 s
Fragmento 1_FW	3	3.Hibridación	63°C -10 min
Fragmento 2_RV	1	4.Extensión	72°C-5 min
Pfu DNA Polymerase (2.5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.25	Repetir desde paso 2, 15 veces.	
Agua	17.75	5.Extensión final	72°C- 10min
Volumen total	25 $\mu\text{L}$	Mantener a 4°C	

En la Figura 25 se muestra la banda obtenida de la fusión de fragmentos y que corresponde a un tamaño de 1.1 kb.

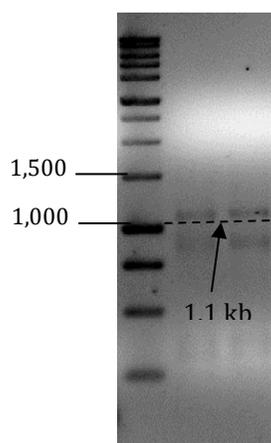


Figura 24. Fusión y amplificación del fragmento vsi-PEP32-RIPsc. Peso molecular de 1.1 kb. Gel de agarosa 1%, marcador de peso molecular de 1kb.

La banda que corresponde al fragmento vsi-PEP32-RIPsc se cortó y se purificó, después se ligó en el vector pJET 1.2. La ligación pJET-vsi-PEP32-RIPsc se digirió con las endonucleasas *Bam*HI y *Hind*III, lo mismo se hizo con el vector pIJ486 (Figura 26). La clonación del fragmento vsi-PEP32-RIPsc en pIJ486 resultó en la construcción

pIJ486-vsi-PEP32-RIPsc, que se usó para la sobre-expresión de PEP32-RIPsc en *Streptomyces lividans*.

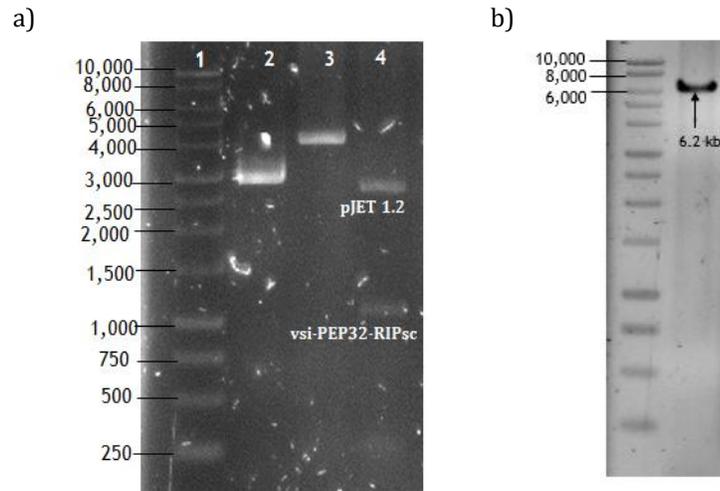


Figura 25. a) Gel de digestión de pJET-vsi-PEP32-RIPsc. Carril 1: marcador de peso molecular de 1kb, Carril 2: vector pJET1.2, Carril 3: vsi-PEP32-RIPsc ligado a pJET1.2 y Carril 4: pJET-vsi-PEP32-RIPsc digerido con *BamHI* y *HindIII*. b) Gel digestión de pIJ486-vsi-PEP32-RIPsc.

La transformación de *Streptomyces lividans* se llevó a cabo por protoplastos (Sección 5.5.4), en la Figura 27 se puede observar las transformantes obtenidas.



Figura 26. Transformantes de *Streptomyces lividans* TK24 obtenidas por protoplastos para sobre-expresa PEP32-RIPsc

Se seleccionaron algunas de las transformantes y se le realizó PCR de colonia para comprobar que vsi-PEP32-RIPsc se encontrara en ellas. La PCR se llevó a cabo con *primers* específicos (Sección 5.4), que flaquean el sitio de múltiple clonación del vector pIJ486 (Soliveri, et al., 1999), lo que asegura que la región amplificada corresponda al inserto de interés.

En la Figura 28 se muestra una banda entre 1,000 y 1,500 que corresponde a vsi-PEP32-RIPsc presente en algunas de las colonias seleccionadas.

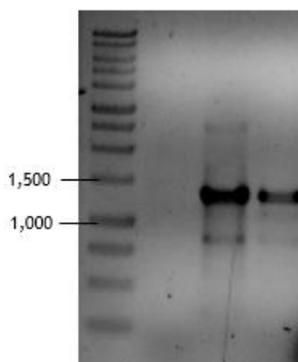


Figura 27. PCR de colonia realizado en las transformantes de *S. lividans*. Se aprecia una banda entre 1,000 y 1,500 que corresponde al inserto.

Posteriormente se secuenció el material contenido en estas bandas para comprobar que la región amplificada corresponde al inserto de interés. Los resultados de secuenciación arrojaron un 99% de identidad entre la región amplificada y la secuencia de oligonucleótidos del *cassette* de expresión. De esta manera se obtuvo la cepa *S. lividans* TK24-(pIJ486-vsi-PEP32-RIPsc).

De manera paralela, se realizó una curva de crecimiento para comparar el efecto de sobre-expresión de PEP32-RIPsc en *S. lividans* tomando como control a *S. lividans* TK24, *S. lividans* TK24-(pIJ486), *S. lividans* TK24-(pIJ486-vsi-RIPsc); esta última sobre-expresa a la Proteína Inactivadora de los Ribosomas sin el péptido acarreador. Las cepas fueron inoculadas en 50 mL de medio Phage por duplicado, suplementadas con tioestrepton a una concentración final de 50  $\mu\text{g/mL}$ , se incubaron a 30°C, 150 rpm durante 5 días. Se tomaron muestras por triplicado de 1 mL a las 0 h, 24 h, 48h, 72 h, 96 h y 120 h. La curva de crecimiento se realizó por peso seco (Figura 29).

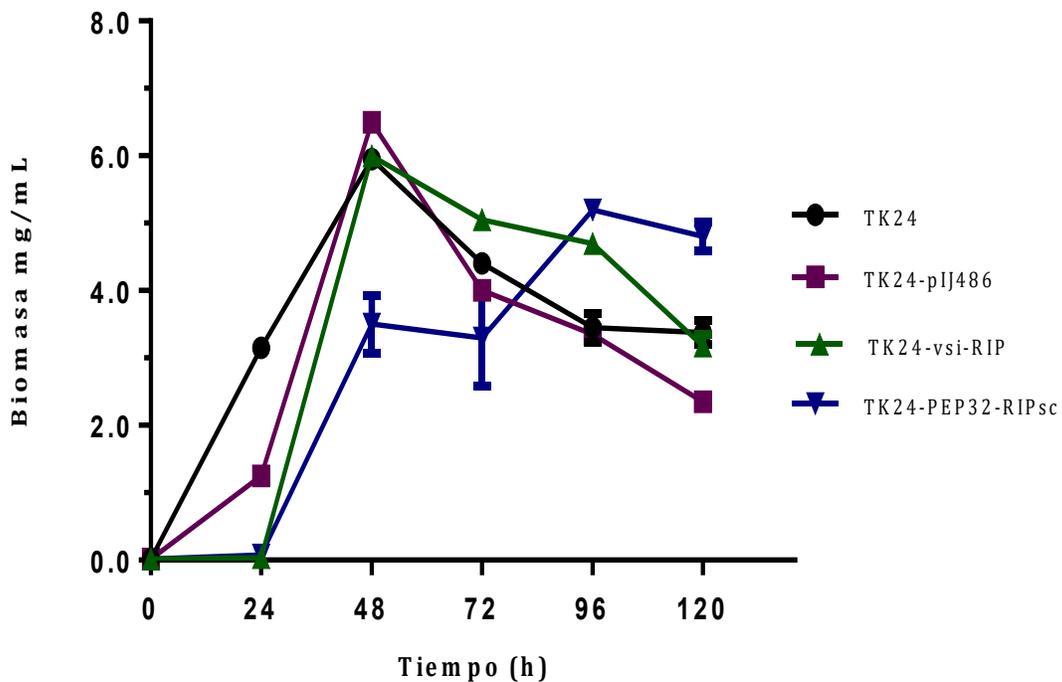


Figura 28. Curva de crecimiento de *S. lividans* TK24-(pIJ486-vsi-PEP32-RIPsc).

De acuerdo a la gráfica se puede observar que hay un efecto de sobre-expresión de PEP32-RIPsc en el cultivo ya que se ve afectado el crecimiento obteniéndose un máximo a las 96 h con respecto a los controles que es a las 48 h. Las curvas obtenidas de *S. lividans* TK24, *S. lividans* TK24-(pIJ486), *S. lividans* TK24-(pIJ486-vsi-RIPsc) tienen un comportamiento similar. La explicación a esto puede ser debido a que el péptido activo seleccionado tiene un efecto extra sobre la cepa hospedera. Esto se puede observar claramente al comparar la curva de *S. lividans* TK24-(pIJ486-vsi-RIPsc) y *S. lividans* TK24-(pIJ486-vsi-PEP32-RIPsc).

## 6.2 Sobre-expresión de RIPsc-PEP32 en *S. lividans*

Para llevar a cabo esta parte se procedió de la misma forma que en la sobre-expresión de PEP32-RIPsc (ver Sección 6.1).

Se diseñó un *cassette* de expresión para sobre-expresar RIPsc-PEP32 en *Streptomyces lividans* TK24.

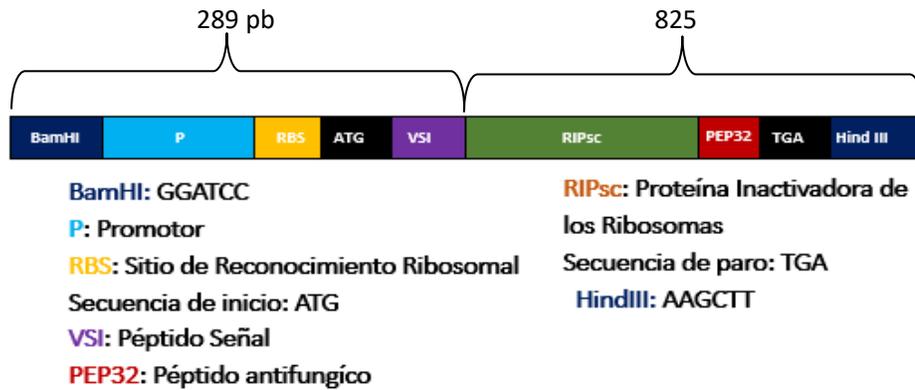


Figura 30. *Cassette* de expresión RIPsc- PEP32 para *Streptomyces lividans* TK24, el cual se clonará en el vector pJJ486

En la Figura 31 se describe como se llevó a cabo la construcción de dicho *cassette* con la técnica de Double-Joint PCR anteriormente mencionada.

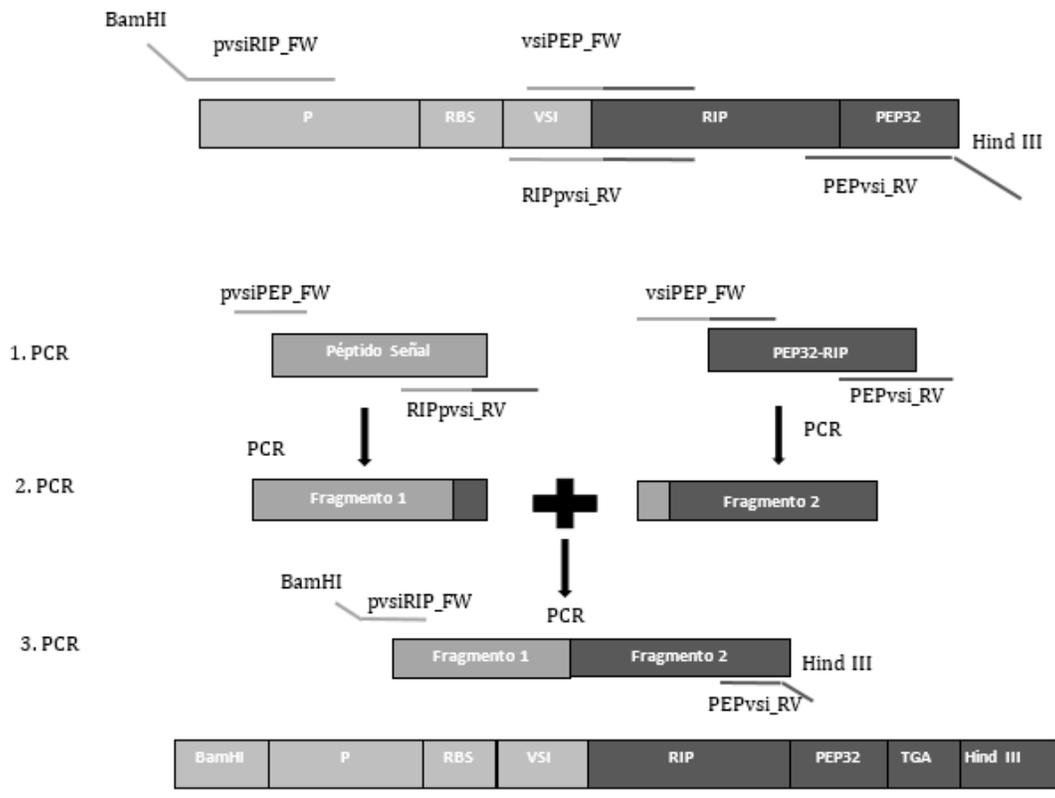


Figura 29. Representación gráfica de la construcción del *cassette* de expresión para sobre-expresar RIPsc-PEP32 en *S. lividans*.

Las mezclas de reacción así como los programas para cada PCR son los mismos que se usaron en la sobre-expresión de PEP32-RIPsc (ver tabla 3 y 4).

En la Figura 32 se muestra la amplificación de cada fragmento así como la fusión de los mismos. Los tamaños de cada banda son los mismos que se obtuvieron en el apartado 6.1.

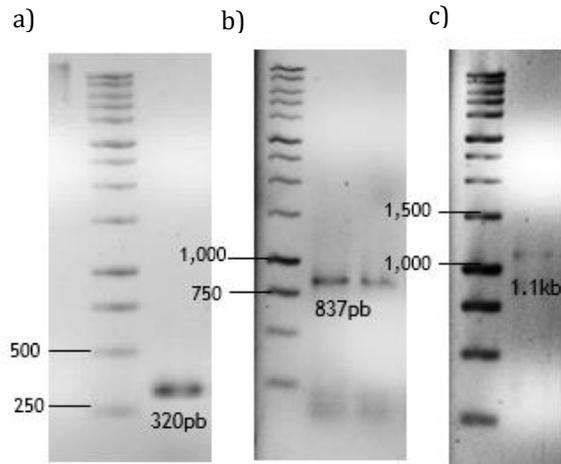


Figura 30. Amplificación de los fragmentos *vsi* (a), RIPsc-PEP32 (b) y *vsi*-RIPsc-PEP32 (c). Gel de agarosa 1%, marcador de peso molecular 1kb.

El fragmento fusión obtenida se clonó en el vector pJET1.2. Se digirió pJET-*vsi*-RIPsc-PEP32 y pIJ486 con las endonucleasas *Bam*HI/*Hind*III y posteriormente se ligó. La clonación del fragmento *vsi*-RIPsc-PEP32 en pIJ486 resultó en la construcción pIJ486-*vsi*-RIPsc-PEP32, utilizada para transformar *S. lividans* por protoplastos (Figura 34). Una vez que se obtuvieron las transformantes, se realizó PCR de colonia para comprobar que el inserto se encuentra dentro de ellas utilizando los *primers* específicos que flaquean el sitio de múltiple clonación del vector pIJ486 (Soliveri, et al., 1999). En la Figura 33 se muestra las colonias en las que se observa una banda entre 1,500 y 1,000 pb, correspondiente al gen de interés. Se secuenció el material contenido en la banda. Los resultados arrojaron un 99% de identidad entre la región amplificada y la secuencia nucleotídica del *cassette* de expresión.

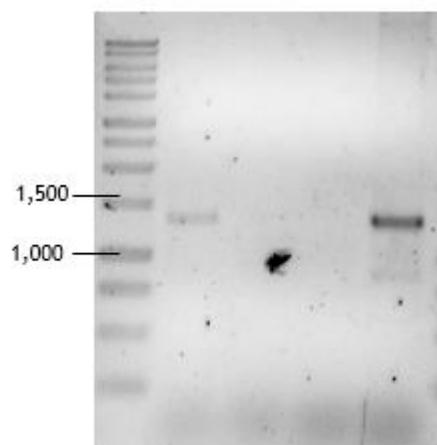


Figura 31. PCR de colonia realizado en las transformantes de *S. lividans*. Se aprecia una banda entre 1,000 y 1,500 que corresponde al inserto vsi-RIPsc-PEP32.

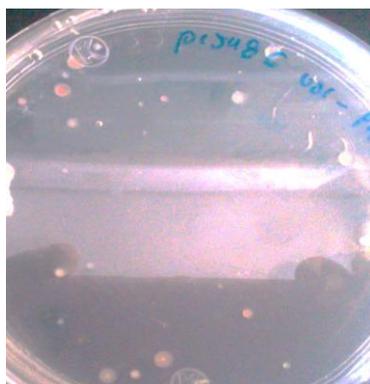


Figura 32. Transformantes de *Streptomyces lividans* TK24 obtenidas por protoplastos para sobre-expresar RIPsc- PEP32.

De igual modo que en PEP32-RIPsc, se realizó una curva de crecimiento para comparar el efecto de sobre-expresión de RIPsc-PEP32 en *S. lividans* tomando como control a *S. lividans* TK24, *S. lividans* TK24-(pIJ486) y *S. lividans* TK24-(pIJ486-vsi-RIPsc) bajo las mismas condiciones. Se tomaron 3 muestras de 1 mL para el duplicado

de la fermentación a las 0 h, 24 h, 48h, 72 h, 96 h y 120 h. La curva de crecimiento se realizó por peso seco (Figura 35).

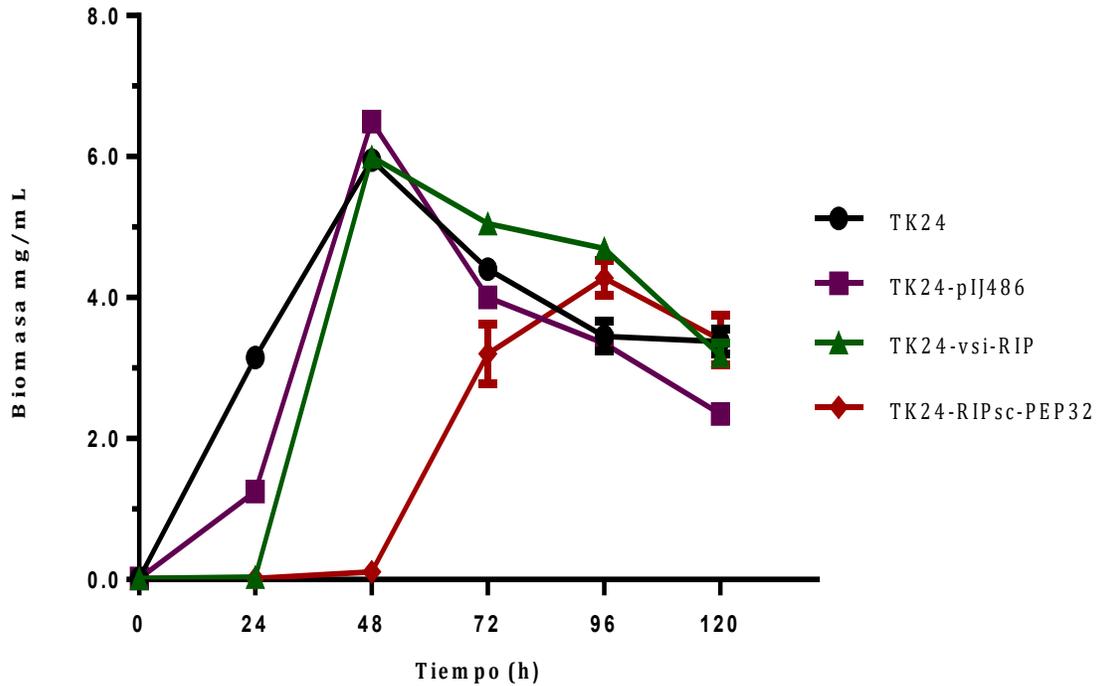


Figura 33. Curva de crecimiento de *S. lividans* TK24-(pIJ486-vsi-RIPsc- PEP32).

Se puede observar el mismo efecto de la sobre-expresión de RIPsc-PEP32 que en PEP32-RIPsc en el cultivo, afectando el crecimiento, obteniéndose un máximo a las 96 h con respecto a los controles que es a las 48 h en ambos casos. Esto puede deberse a que, el péptido activo seleccionado tiene un efecto extra sobre la cepa hospedera que afecta su crecimiento. Por otro lado, comparando la cinética en ambas construcciones se tiene que, el crecimiento de *S. lividans* TK24-(pIJ486-vsi-RIPsc-PEP32) se mantiene constante hasta por 48 h aproximadamente (fase de adaptación) (Figura 29) contrario a *S.*

*lividans* TK24-(pIJ486-vsi-PEP32-RIPsc) cuyo crecimiento exponencial inicia a una edad más temprana (24 horas) (Figura 29). De igual manera, se puede apreciar una disminución de la biomasa al sobre-expresarse la proteína RIPsc-PEP32 con respecto a PEP32-RIPsc, por lo que, la sobre-expresión de PEP32-RIPsc al no tener el mismo efecto perjudicial sobre la cepa hospedera podría dar un indicio de cuál es la construcción adecuada para nuestros fines.

### 6.3 Ensayo de actividad sobre hongos

Con las transformantes obtenidas se realizó un ensayo de actividad con el fin de comprobar que la proteína de interés se producía, si era secretado al medio y si era activo contra algún fitopatógeno. Las transformantes fueron *S. lividans* TK24-(pIJ486-vsi-PEP32-RIPsc) y *S. lividans* TK24-(pIJ486-vsi-RIPsc-PEP32) y como control para el ensayo *S. lividans* TK24, *S. lividans* TK24-(pIJ486) y *S. lividans* TK24-(pIJ486-vsi-RIPsc). El bioensayo consistió en montar una fermentación de 20 días (150 rpm, 30°C), centrifugar y filtrar (2.5 µm poro de filtro) para retirar la biomasa y obtener así el extracto crudo. Posteriormente se mezcló un volumen del extracto con un volumen de PDA/agar con el hongo embebido y se incubaron las cajas a 30°C por 48 h aproximadamente. Los hongos utilizados para los bioensayos fueron los siguientes. *Penicillium chrysogenum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus terreus*, *Colletotrichum sp*, y *Paecilomyces sp*. En la Figura 36 se observa que hubo inhibición

parcial en casi todas las cepas utilizadas cuando se está en contacto con PEP32-RIPsc, caso contrario con la proteína RIPsc-PEP32.

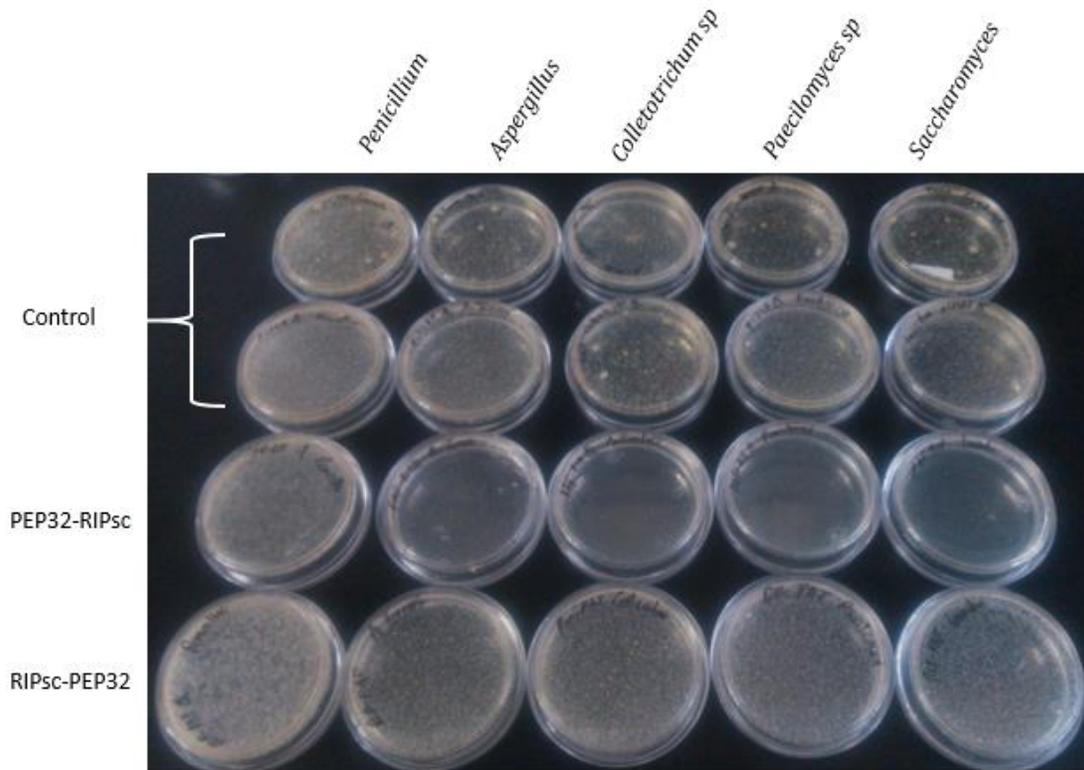


Figura 34. Prueba de inhibición sobre diferentes hongos. Cepas *S. lividans* TK24-(pIJ486-vsi-PEP32-RIPsc) y *S. lividans* TK24-(pIJ486-vsi-RIPsc-PEP32). Cepas control: *S. lividans* TK24, *S. lividans* TK24-(pIJ486). Nota: no se anexa a la imagen los ensayos realizados con la cepa *S. lividans* TK24-(pIJ486-vsi-RIPsc). El resultado es similar como a los demás controles.

Con base en estos resultados, se realizaron gels de electroforesis con el fin de identificar a la proteína presente en el extracto. Para evaluar la secreción de PEP32-RIPsc se tomó como control las proteínas secretadas por *S. lividans* TK24 y *S. lividans* TK24-(pIJ486). Como se puede apreciar en el la Figura 37, hay una banda en el carril de la transformante de un tamaño aproximado de 30 kDa, por lo que podría sugerirse que se trata de la proteína PEP32-RIPsc. Sin embargo, hace falta más pruebas

concluyentes para aseverar de que se trata de la proteína de interés y que el efecto obtenido sobre los hongos es debido a ella.

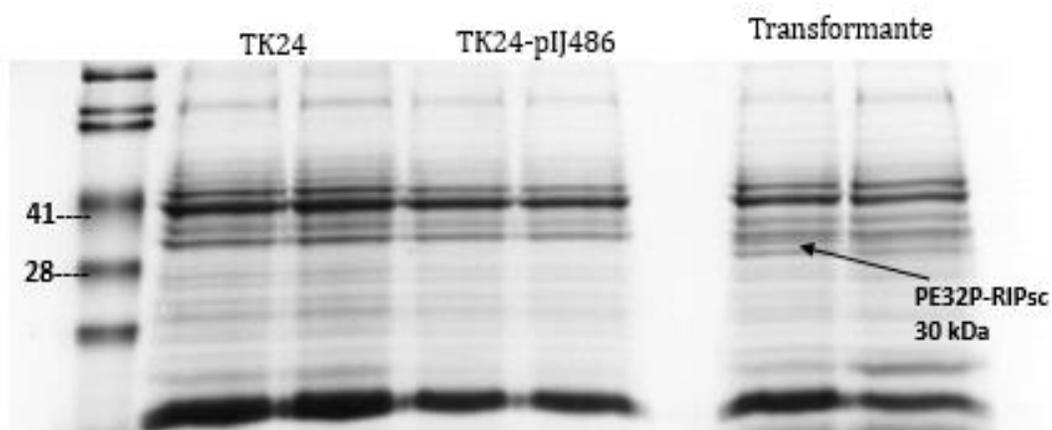


Figura 35. Gel de poliacrilamida, SDS-PAGE 12% para la separación de PEP32-RIPsc. En cada carril se corrieron 10  $\mu$ L de muestra. Marcador de peso molecular Prestained SDS-PAGE Standards, broad range.

## 6. Discusión

---

En este trabajo se diseñó la fusión del dominio RIPsc activo en ribosomas fúngicos y bacterianos con un péptido capaz de penetrar la membrana celular, característica que complementa a RIPsc puesto que una vez dentro de la célula su efecto es letal. El péptido acarreador seleccionado posee actividad antifúngica y además es seguro para plantas, animales y humanos. Por lo que, la molécula derivada de esta fusión tendrá especificidad y efectividad en su internalización a las células blanco. En el diseño se consideró fusionar el péptido seleccionado, PEP32, que es un péptido antifúngico de penetración celular (PAFs) con el gen RIPsc tanto en el extremo N-terminal y C-terminal pues se desconoce de qué manera puede interactuar pudiendo existir impedimento estérico, lo cual se pretendió probar con la fusión del péptido en ambos extremos. Se utilizaron dos sistemas de expresión heteróloga en donde la fusión fue clonada en un plásmido de expresión específico tanto para *E.coli* como para *S. lividans* respectivamente.

Como se puede apreciar en los resultados, no fue posible detectar la expresión tanto de PEP32-RIPsc como RIPsc-PEP32 en el sistema de expresión para *E. coli* (Figura 20). Una posible explicación, tras el resultado negativo es que la fusión de ambas moléculas tóxicas tal vez afecta los niveles proteicos sobre-expresados por lo que no es posible detectar a la proteína bajo métodos estándar (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Se analizó la expresión de la proteína de fusión a nivel transcripcional para evaluar la efectividad del sistema. Con RT-PCR de punto final se pudo observar bandas de ADN que corresponden a la retrotranscripción PEP32-RIPsc y RIPsc-PEP32 y con la secuenciación de los genes que arrojó un 100% de identidad se pudo concluir que no existe problema a nivel de transcripción. Con base en lo anterior, la no detección de la proteína podría ser debida a algún problema durante la traducción y a niveles bajos de proteína de fusión (Miroux y Walker, 1996; Dumon-Seignovert *et al*, 2004),

Como estrategia alternativa, se llevó a cabo la transformación de *S. lividans* TK24 mediante el diseño de un *cassette* de expresión para obtener las transformantes *S. lividans* TK24-(pIJ486-vsi-PEP32-RIPsc) y *S. lividans* TK24-(pIJ486-vsi-RIPsc-PEP32). En ambos casos se observó que la expresión de la proteína de fusión afecta el crecimiento de la célula huésped ya que por sí sola la RIPsc se comporta de manera similar a la curva de crecimiento de *S. lividans* TK24 y *S. lividans* TK24-(pIJ486) (Figura 29 y 35). Esto puede deberse a que, la fusión con el péptido seleccionado potencia su efecto sobre la cepa hospedera. Comparando la cinética de ambas construcciones se puede apreciar una disminución de la biomasa al sobre-expresarse la proteína RIPsc-PEP32 con respecto a PEP32-RIPsc, por lo que esta diferencia sobre la cepa hospedera puede ser indicativo de cuál es la construcción adecuada para nuestros fines. Con las transformantes obtenidas se realizó un ensayo de actividad con el fin de comprobar que la proteína de interés se producía, si era secretado al medio y si esta podía penetrar hogos y mantener su actividad. De esta manera se obtuvo con éxito la sobre-expresión de la proteína de fusión PEP32-RIPsc en

*Streptomyces lividans*, en la Figura 36 se puede observar un efecto inhibitorio contra los hongos seleccionados (*Penicillium chrysogenum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus terreus*, *Colletotrichum sp*, y *Paecilomyces*). Este efecto no se observa en la proteína RIPsc-PEP32 cuyo péptido está unido al extremo C-terminal, sugiriendo que existe un impedimento estérico y en consecuencia no se presenta actividad biológica. El tiempo de fermentación que se requirió para obtener un nivel detectable de la proteína fue de 20 días ya que en tiempos menores a este no se logró detectar. De manera paralela, se logró identificar la proteína de interés de 30 kDa aproximadamente, mediante un gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% (Figura 37) y la secuenciación del gen *ripsc-pep32*.

Por consiguiente, el éxito obtenido para la obtención de la proteína PEP32-RIPsc puede ser debido a la correcta elaboración del *cassette* de expresión, que incluyó la fusión de PEP32-RIPsc a un péptido señal y a sus promotores para la correcta secreción de la proteína de fusión, la elección del vector de expresión pIJ486 por su alto número de copias y por supuesto a la célula hospedera *S. lividans Tk24*, que ha sido reportada como un buen modelo de expresión para algunas proteínas heterólogas. Otro aspecto importante del por qué la unión del péptido PEP32 en el extremo N-terminal de RIPsc resultó exitosa puede deberse a las características propias de las RIPs tipo I. Utilizando como modelo la Cadena A de ricina (RTA), se sabe que es un polipéptido de 267 aminoácidos que contiene una región hidrófoba cerca de su extremo carboxilo terminal (residuos 245-256) implicado en la etapa de translocación de membrana para que esta toxina catalíticamente activa pueda llegar

a su sustrato intracelular. Una alineación de la secuencia de aminoácidos de la Cadena A de ricina con diferentes RIPs tipo I (Tricosantina, Saporina, Diantina, PAP, Bouganin, Gelonina y RIPsc de *S. colelicolor*) definió nueve aminoácidos invariantes en común: Tir<sub>21</sub>, Arg<sub>29</sub>, Tir<sub>80</sub>, Tir<sub>123</sub>, Leu<sub>144</sub>, Glu<sub>177</sub>, Ala<sub>178</sub>, Arg<sub>180</sub>, y el Tri<sub>211</sub> (Katzin, *et al.*, 1991; Reyes, *et al.*, 2012). Donde los residuos del sitio activo clave son Glu<sub>177</sub>, Arg<sub>180</sub>, y el Tri<sub>211</sub> (Virgilio, *et al.*, 2012; Reyes, 2012). Asimismo, se ha sugerido que la región C-terminal entre las RIPs como la saporina SO6, diantina30, PAP y RTA (cadena A de ricina) contiene varios restos de lisina que parecen estar implicados en el reconocimiento molecular del ribosoma. Una comparación estructural de la saporina SO6 con otras RIPs en el extremo C-terminal reveló un motivo conservado que incluye tres residuos de lisina en las posiciones 220,226 y 234, sugiriendo así su participación en la unión a proteínas ribosomales (Savino, *et al.*, 2000; Virgilio, *et al.*, 2012). Por tales razones, se puede inferir que el péptido PEP32 unido al extremo N-terminal de RIPsc se mantiene alejado del sitio activo así como de los residuos de lisina que participan en la unión a ribosoma y por lo tanto no interfiere con la actividad catalítica de la RIPsc.

Ahora bien, el péptido PEP32 está constituido por la siguiente secuencia de aminoácidos RKWHFW, los residuos de triptófano determinan las propiedades de penetración celular y los residuos catiónicos del extremo N-terminal ayudan a la unión del péptido a la pared celular de los hongos ya que son atraídos por las cargas negativas de la envoltura celular formado por la pared celular y la membrana plasmática. No es sorprendente que la eliminación o sustitución de residuos

catiónicos en la secuencia del péptido deterioran en gran medida su actividad y la extensión del extremo N-terminal con aminoácidos catiónicos realza su potencia antifúngica (Muñoz, *et al.*, 2013). Por tal motivo, al estar unido el péptido en el extremo N-terminal de la RIPsc podría no verse afectado el extremo catiónico responsable de la unión a la pared celular de los hongos ya que este se encontraría libre, sin embargo, al localizarse el péptido en el extremo carboxilo terminal estos residuos se encontrarían unidos a la RIPsc lo que podría dificultar el reconocimiento a la célula blanco.

Todo esto en conjunto, nos brindó un buen modelo de expresión y construcción para la proteína de fusión con actividad antifúngica, ya que se logró producir y secretar de forma exitosa PEP32-RIPsc, una proteína quimérica potencialmente tóxica, específica y eficaz. También se puede decir que el empleo de péptidos bioactivos en el diseño de nuevas moléculas derivadas de las RIPs parece prometedor ya que la estrategia planteada parece ser más accesible con respecto al empleo de RIPs y análogos de RIPs tipo I con residuo de cisteína libre como se mencionó con anterioridad. El siguiente paso a seguir para la continuidad del trabajo, sería la comprobación de que la proteína PEP32-RIPsc recombinante es la causante del efecto inhibitorio mostrado sobre los diferentes hongos, su purificación y caracterización junto con la optimización de su producción, es decir, encontrar un medio de cultivo adecuado cuyas características permitan obtener mayores rendimientos y/o productividad.

## 7. Conclusión

---

Mediante el diseño de un *cassette* de expresión para *S. lividans* TK24 el cual se clonó exitosamente en el vector pIJ486, se logró obtener la transformante que secreta la proteína PEP32-RIPsc con efecto inhibitorio contra los cinco diferentes hongos (*Penicillium chrysogenum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus terreus*, *Colletotrichum sp*, y *Paecilomyces*), tres de ellos fitopatógenos. La estrategia de fusionar el gen de interés a la secuencia señal de una proteína homóloga abundantemente secretada por la vía Sec parece ser una alternativa adecuada para la producción de proteínas heterólogas ya que el sistema de expresión para *Escherichia coli* no mostró los resultados esperados.

## 7. Referencias

- Aguilar, C., Pujol, I., Sala, J. & Guarro, J., 1998. Antifungal Susceptibilities of *Paecilomyces* Species. *Antimicrob Agents Chemother*, p. 601–1604.
- López-García, B., Pérez-Payá, E. & F. Marcos, J., 2002. Identification of Novel Hexapeptides Bioactive against Phytopathogenic Fungi through Screening of a Synthetic Peptide Combinatorial Library. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), p. 2453–2460 .
- Park, S., Prithiviraj, B., Vepachedu, R. & Vivanco, J., 2006. Isolation and Purification of Ribosome-inactivating Proteins. *Methods in Molecular Biology*, Volumen 318, pp. 335–347.
- Reyes, A., Jozef, A. & Mejía, A., 2012. Ribosome-inactivating proteins with an emphasis on bacterial RIPs and their potential medical applications. *Future Microbiology*, 7(6), pp. 705-717.
- Rosenblum, M., 2004. Immunotoxins and toxin constructs in the treatment of leukemia and lymphoma. *Adv. Pharmacol*, Issue 51, p. 209–228.
- Agapov, I. y otros, 1997. The role of structural domains in RIP II toxin model membrane binding. *FEBS Lett.* 402, pp. 91-91.
- Agrios, G., 2004. Plant Pathology.. En: Academic Press.San Diego,USA: s.n.
- Alegre, C. y otros, 1996. Sensitivity of ribosomes from *Agrobacterium tumefaciens* to the ribosome-inactivating protein crotonin 2 depending on the translocational state. *Cell Mol. Biol.*, 42(2), p. 151–158.
- Barbieri, L., Batteli, M. & Stirpe, F., 1993. Ribosome-Inactivating proteins from plants. *Biochim.Biophys.Acta* 1154, pp. 237-282.
- Barbieri, L. y otros, 2006. Ribosome-inactivating proteins in edible plants and purification and characterization of a new ribosome-inactivating protein from *Cucurbita moschata*. *Biochemical and Biophysical*, Issue 1760, p. 783–792.
- Barbieri, L., Valbonesi, P. & Bondioli, M., 2001. Adenine glycosylase activity in mammalian tissues: an equivalent of ribosome-inactivating proteins. *FEBS*, 550(1), p. 196–197.
- Barbieri, L. y otros, 1997. Polynucleotide:adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on NA, RNA and poly(A). *Nucleic Acids Res.*, 25(3), p. 518–522 .
- Barbieri, L. y otros, 1994. Unexpected activity of saporins.. *Nature* 372(6507), 624 (1994)., Volumen 6057.

- Bentley, S. y otros, 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, pp. 141-147.
- Bieri, S., Potrycus, I. & Futterer, J., 2000. Expression of active barley seed ribosome-inactivating protein in transgenic wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, Issue 100, pp. 755-763.
- Binnie, C., Cossar, J. & Stewart, D., 1997. Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*. *Trends Biotechnology*, pp. 315-320.
- Brigotti, M. y otros, 1989. Effect of -sarcin and ribosome inactivating proteins on the interaction of elongation factors with ribosomes. *Biochem. J.*, pp. 723-727.
- Brodgen, K., 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), pp. 238-250.
- Bulet, P., Stocklin, R. & Menin, L., 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews*, Volumen 198, pp. 169-184.
- Carlini, C. & Grossi-de-Sá, M., 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, Volumen 40, p. 1515-1539.
- Cavallaro, U. & Soria, M., 1995. Targeting plant toxins to the urokinase and alpha 2-macroglobulin receptors. *Semin. Cancer Biol.*, pp. 6:269-278.
- Chaudhry, B. y otros, 1994. The barley 60 kDa jasmonate-induced protein (JIP60) is a novel ribosome-inactivating protein. *Plant Journal*, Volumen 6, pp. 815-824.
- Chen, H. y otros, 1996. The phosphatase activity of five ribosome-inactivating proteins. *Chin. Biochem. J.*, Volumen 12, p. 125-129.
- Chen, Y., Peumans, W. & Vandamme, E., 2002. The *Sambucus nigra* type-2 ribosome-inactivating protein SNAI' exhibits antiviral activity in transgenic tobacco. *FEBS Lett.* 516, p. 27-30.
- Citores, L. y otros, 1996. Differential sensitivity of HeLa cells to the type 2 ribosome-inactivating proteins ebulin 1, nigrin b and nigrin f as compared with ricin. *Cell. Mol. Biochem.*, Volumen 42, pp. 473-476.
- DaSilva, L. y otros, 2003. Pulmonary gene expression profiling of inhaled ricin. *Toxicol.* 41(7), pp. 813-822.
- Domashevskiy, A. V. & Goss, D. J., 2015. Pokeweed Antiviral Protein, a Ribosome Inactivating Protein: Activity, Inhibition and Prospects. *Toxins*, 7(2), pp. 274-298.
- Dowd, P. y otros, 2006. Relative activity of a tobacco hybrid expressing high levels of a tobacco anionic peroxidase and maize ribosome-inactivating protein against

*Helicoverpa zea* and *Lasioderma serricorne*. *J. Agric. Food Chem.*, Volumen 54, p. 2629–2634.

Dowd, P., Johnson, E. & Price, N., 2012. Enhanced pest resistance of maize leaves expressing monocot crop plant-derived ribosome-inactivating protein and agglutinin. *J. Agric. Food Chem.*, Volumen 60, p. 10768–10775.

Dowd, P. y otros, 2003. Enhanced resistance to *Helicoverpa zea* in tobacco expressing an activated form of maize ribosome-inactivating protein. *J. Agric. Food Chem.*, Volumen 51, p. 3568–3574.

EL Andaloussi, S., Holm, T. & Langel, U., 2005. Cell-penetrating peptides: mechanisms and applications. *Curr Pharm Des*, Volumen 11, pp. 3597-3611.

Endo, Y., Gluck, A. & Wool, I., 1991. Ribosomal RNA identity elements for ricin A-chain recognition and catalysis. *J. Mol. Biol.*, 221(1), p. 193–207.

Endo, Y., Mitsui, K., Motizuki, M. & Tsurugi, K., 1987. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28S ribosomal RNA caused by the toxins. *J. Biol. Chem.*, 262(12), pp. 5908-5912.

Falnes, P. & Sadving, K., 2000. Penetration of proteins toxins into cells. *Cell Biol.*, Volumen 12, pp. 407-413.

Fang, E., Ng, T., Shaw, P. & Wong, R., 2011. Recent progress in medicinal investigations on trichosanthin and other ribosome-inactivating proteins. *Curr. Med. Chem*, pp. 18:4410-4417.

Ferreras, J. y otros, 2000. Ribosome-inactivating proteins and lectins from *Sambucus*. *Topics Phytochem*, Issue 3, pp. 113-128.

Fisher, M. y otros, 2012. Emerging fungal threats to animal plant and ecosystem health. *Nature*, Issue 484, pp. 186 -194.

Fleige, S. & Pfaffl, M., 2006. Impact of RNA integrity on the quantitative real-time RT-PCR performance and relative mRNA quantification models.

Fracasso, G., Stirpe, F. & Colombatti, M., 2010. Ribosome-inactivating protein-containing conjugates for therapeutic use. In: Lord, J.M., Artley, M.R. (Eds.). *Toxic Plant Proteins. Plant Cell Monographs*, Volumen 18. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 225–263.

Gené, J. & Guarro, J., 2004. Identificación de otros hongos miceliares. *Revista Iberoamericana de Micología*.

Gessner, S. & Irvin, J., 1980. Inhibition of elongation factor 2-dependent translocation by the pokeweed antiviral protein and ricin. *J. Biol. Chem.*, 255(8), p. 3251–3253.

- Gilbert, M., Morosoli, R., Shareck, F. & Kluepfel, D., 1995. Production and secretion of proteins by *streptomyces*. *Crit Rev Biotechnol*, Volumen 15, pp. 13-39.
- Gilbert, M., Morosoli, R., Shareck, F. & Kluepfel, D., 1995. Production and secretion of proteins by *streptomyces*. *Crit Rev Biotechnol*, Volumen 15, pp. 13-39.
- Girbés, T., Ferreras, J., Arias, F. & Stirpe, F., 2004. Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. *Mini Rev Med Chem*, Volumen 4, pp. 461-476.
- Hancock, Robert, E. & Rozek, A., 2002. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiology Letters*, 206(2), pp. 143-149.
- Helmy, M., Lombard, S. & Pieroni, G., 1999. Ricin CA60: evidence of its phospholipase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 258(2), p. 252-255.
- Hengen, P., 1996. Methods and reagents: Preparing ultra-competent *Escherichia coli*. *Trends in Biochem. Science*, 21(2), pp. 75-76.
- Henriques, S., Melo, M. & Castanho M.A.R.B., M., 2006. Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they?. *Biochemical Journal*, Volumen 399, pp. 1-7.
- Hey, T., Hartley, M. & Walsh, T., 1995. Mize ribosome inactivating protein (b-32). *Plant Physiology*, Volumen 107, pp. 1323-1332.
- Hopwood, D. y otros, 1985. *Genetic Manipulation of Streptomyces: a laboratory manual*. s.l.: John Innes Foundation.
- Hoskin, D. & Ramamoorthy, A., 2008. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1778(2), pp. 357-375.
- Huang, K., Huang, Y., Hwu, L. & Lin, A., 1997. Characterization of a new ribotoxin gene (c-Sar) from *Aspergillus clavatus*. *Toxicon*, Volumen 350, pp. 383-92.
- Hudak, K., Dinman, J. & Tumer, N., 1999. Pokeweed antiviral protein accesses ribosomes by binding to L3. *J. Biol. Chem.*, Volumen 274, pp. 3859-3864.
- Hudak, K., Wang, P. & Tumer, N., 2000. A novel mechanism for inhibition of translation by pokeweed antiviral protein: depurination of the capped RNA template. *RNA*, 6(3), p. 369-380.
- Inou, H., H., N. & H., O., 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, Issue 96, pp. 23-28.
- Ippoliti, R., Lendaro, E., Belelli, A. & Brunori, M., 1992. A ribosomal protein is specifically recognized by saporin, a plant toxin which inhibits protein synthesis. *FEBS Lett.*, pp. 145-148.

- Irvin , J., 1983. Pokeweed antiviral protein. *harmacol. Ther.* , 21(3), p. 371–387 .
- Ishizaki , T. y otros, 2002. Accumulation of a 31-kDa glycoprotein in association with the expression of embryogenic potential by spinach callus in culture. *Physiol Plant*, Issue 114, p. 109–115.
- Jiao, Y. & Liu, W., 2010. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is an essential receptor for trichosanthin in 2 choriocarcinoma cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, pp. 392:1579-1584.
- Jozef, A. y otros, 2012. Recombinant protein production and *streptomyces*. *Journal of Biotechnology*, Issue 158, pp. 159-167.
- Jozef, A. y otros, 2014. Protein secretion biotechnology in Gram-Positive bacterial with special emphasis on *Streptomyces lividans*. *Biochimica et Biophysica Acta*, pp. 1750-1761.
- Kaur, I., Gupta, R. & Puri, M., 2011. Ribosome inactivating proteins from plants inhibiting viruses. *Virol.* , Volumen 26, p. 357–365.
- Kieser , T. y otros, 2000. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, UK.: John Innes Foundation.
- Kumar , M. y otros, 1993. Characterization of the lectin from the bulbs of *Eranthis hyemalis* (winter aconite) as an inhibitor of protein synthesis. *J. Biol. Chem.*, Volumen 268, p. 25176–25183.
- Laemmli, U., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, pp. 227:680-685.
- Lammertyn , E. y otros, 1997. Evaluation of a novel subtilisin inhibitor gene and mutant derivatives for the expression and secretion of mouse tumor necrosis factor alpha by *Streptomyces lividans*. *Appl Environ Microbiol*, pp. 63: 1808-1813.
- Lewis, R. A. y otros, 2010. Metabolic and evolutionary insights into the closely-related species *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces lividans* deduced from high-resolution comparative hybridization. *BMC Genomics* , p. 11:682.
- Li , X. y otros, 2009. A two-step binding model proposed for the electrostatic interactions of ricin A chain with ribosomes. *Biochemistry* , 48(18), pp. 3853-3863.
- Li , X., Liu, W. & Niu , C., 1996. Purification of a new ribosome-inactivating protein from the seeds of *Cinnamomum porrectum* and characterization of the N-glycosidase activity of the toxic protein. *Biol. Chem.*, Volumen 377, p. 825–831 .
- Ling , J., Liu , W. & Wang , T., 1995. Simultaneous existence of two types of ribosome-inactivating proteins in the seeds of *Cinnamomum camphora*: characterization of the enzymatic activities of these cytotoxic proteins. *Biochim. Biophys.*, p. 15–22.

- Lin, J. y otros, 1970. Abrin and ricin: new anti-tumour substances. *Nature*, Issue 227, pp. 292-293.
- Liu , A., Chen , C. & Chen , Y., 1991. Molecular action of tricholin, a ribosome-inactivating protein isolated from *Trichoderma viride*. *Mol Microbiol*, Volumen 5, pp. 3007-13.
- Liu , R. y otros, 2002. *Cinnamomin*, a type II ribosome-inactivating protein, is a storage protein in the seed of the camphor tree (*Cinnamomum camphora*). *Biochemical Journal*, Issue 362, pp. 659-663.
- Li, X., Liu, W. & Niu, C., 1996. Purification of a new ribosome-inactivating protein from the seeds of *Cinnamumum porrectum* and characterization of the RNA N-glycosidase activity of the toxic protein. *Biol. Chem.*, Volumen 377, pp. 825-831.
- López-García, B., Ubhayasekera , W., Gallo, R. & Marcos, J., 2007. Parallel evaluation of antimicrobial peptides derived from the synthetic PAF26 and the human LL37. *Biochem.Biophys.Res.Commun*, Volumen 356, pp. 107-113.
- López-García, B. y otros, 2003. Comparasion of the activity of antifungal hexapeptides and the fungicides thiabendazole and imazalili against postharvest fungal pathogens. *Int. J. Food Microbiol.*, Volumen 89, pp. 163-170.
- Lord, M. y otros, 2003. Ricin mechanisms of cytotoxicity. *Toxicol Rev.*, Volumen 22, pp. 53-64.
- Mansouri, S., Nourollahadeh, E. & Hudak, K., 2006. Pokeweed antiviral protein depurinates the sarcin/ricin loop of the rRNA prior to binding of aminoacyl-tRNA to the ribosomal A-site. *RNA* , Volumen 12, pp. 1683-1692.
- Marcos, J. y otros, 2008. Annu. Rev. Phytopathol. *Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection*, Volumen 46, pp. 273-301.
- Marcos, J. F. y otros, 2012. Antifungal Peptides:Exploiting Non-Lytic Mechanisms and Cell Penetration Properties. En: : *Small Wonders: Peptides for disease control*. s.l.:s.n., p. 337-357.
- Marcos, J. & Gandía, M., 2009. Antimicrobial peptides: to membranes and beyond. *Expert Opin. Drug Discov*, Volumen 4, pp. 659-671.
- Marcus, D., Kabat, E. & Schiffman, G., 1964. Destruction of Blood Group A Activity by an Enzyme from *Clostridium tertium* Which Deacetylates N-Acetylgalactosamine in ntact Blood Group Substances. *Biochemistry* , Volumen 3, pp. 437-443..
- Matsuzaki, K., 2008. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1788(8), pp. 1687-92.

- Montesinos, E., 2007. Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiology Letters*, 270(1).
- Morris, M. y otros, 2007. A noncovalent peptide-based strategy for peptide and short interfering RNA delivery. *U.Langel Cell-penetrating peptides*, pp. 387-408.
- Mundy , J. y otros, 1994. Genes encoding ribosome-inactivating proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*, Issue 12, pp. 60-62.
- Munish, P., Inderdeep, K., Matthew , A. & Raghbir, C., 2012. Ribosome-inactivating proteins: current status and biomedical applications. *Drug Discovery Today*, Volumen 17, pp. 774-783.
- Muñoz, A. y otros, 2013. Two Functional Motifs Define the Interaction, Internalization and Toxicity of the Cell-Penetrating Antifungal Peptide PAF26 on Fungal Cells. *PLoS ONE* 8(1): e54813. doi:10.1371/journal.pone.0054813.
- Muñoz, A., López-García, B. & Marcos, J. F., 2006. Studies on the Mode of Action of the Antifungal Hexapeptide PAF26. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), pp. 3847-3855.
- Narayanan , S. y otros, 2005. Ribosome Inactivating Proteins and apoptosis. *FEBS Lett.*579, pp. 1324-1331.
- Ng , T. & Parkash , A., 2002. Hispin, a novel ribosome inactivating protein with antifungal activity from hairy melon seeds. *Protein Expr. Purif.*, 26(2), pp. 211-217.
- Ng, T., 2004. Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. *Peptides*, Volumen 25, p. 1215–1222.
- Ng, T., Chan, W. & Yeung, H., 1992. Proteins with abortifacient, ribosome inactivating, immunomodulatory, antitumor and anti-AIDS ctivities from Cucurbitaceae plants. *Gen. Pharmacol.* , Volumen 23, p. 575–590.
- Nicolas, P., 2009. Multifunctional host defense peptides:intracellular-targeting antimicrobial peptides. *FEBS J*, Volumen 276, p. 6483e6496.
- Nielsen,, K. & Boston, R., 2001. Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective.. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Volumen 52, pp. 785-816.
- Obrig, T., 1997. Shiga toxin mode of action in E.coli. *Front. Biosci.*, p. 635–642 .
- Okuyama, M. y otros, 2007. Small-molecule mimics of an alfa-helix for efficient transport of proteins into cells. *Nature Methods*, 4(2), pp. 153-159.

Olsnes, S. & Pihl, A., 1973. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. *Biochemistry*, Issue 12, p. 3121–3126..

Osborn, R. & Hartley, M., 1990. Dual effects of the ricin A on protein synthesis in rabbit reticulocyte lysate. Inhibition of initiation and translocation. *Eur. J. Biochem.*, pp. 193:401-417.

Papagianni, M., 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnol Adv*, 21(6), pp. 465-499.

Parikh, B., Baykal, U., Di, R. & Tumer, N., 2005. Evidence for retro-translocation of pokeweed antiviral protein from endoplasmic reticulum into cytosol and separation of its activity on ribosomes from its activity on capped RNA. *Biochemistry*, Volumen 44, pp. 2478-2490.

Parikh, B. & Tumer, N., 2004. Antiviral activity of ribosome inactivating proteins in medicine. *Mini Rev. Med.Chem.*, Volumen 4, p. 523–543.

Pérez Castro, L. M., Saquero, M. J. & Beltrán Herrera, J. D., 2003. Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum sp.* como agente causal de la antracnosis. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(1), pp. 24-35.

Peumans, W. & Van Damme, E., 2010. Evolution of lant ribosome-inactivating proteins. *Toxic Plant Proteins. Plant Cell Monographs*, pp. 1-26.

Peumans, W., Hao, Q. & Van Damme, E., 2001. Ribosome-Inactivating from plants: more than RNA N-glycosidases?. *FASEB J*, Issue 15, pp. 1493-1506.

Phue, J., Lee, S., Trinh, L. & Shiloach, J., 2008. Modified *Escherichia coli* B (BL21), a superior producer of plasmid DNA compared with *Escherichia coli* (DH5  $\alpha$ ). *Biotechnol Bioeng*, pp. 831-836.

Pisarra, P., 2000. Recombinant DNA Proteins for the Biopharmaceutical Industry and the Future for *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*, Issue 18, pp. 831-833.

Pontón, J. y otros, 2002. Hongos y actinomicetos alérgicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, pp. 36-39.

Raj., S. & Vennila Jannet, 2013. Progress in Ribosomal Inactivating Protein (RIP) studies: recent review of potential applications. *Int J Pharm Bio Sci*, 3(3), pp. 88-100.

Rajamohan, F., Kurinov, I., Venkatachalam, T. & Uckun, F., 1999. Deguanlylation of human immunodeficiency virus (HIV-1) RNA by recombinant pokeweed antiviral protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 263(2), p. 419–424.

- Reisbig , R., Olsnes , S. & Eiklid , K., 1981. The cytotoxic activity of Shigella toxin. Evidence for catalytic inactivation of the 60 S ribosomal subunit. *J. Biol. Chem.*, Issue 16, p. 8739–8744.
- Rennert, R., Wespe, C., Beck-Sickinger , A. & Neundorf, I., 2006. Developing novel hCT derived cell-penetrating peptides with improved metabolic stability. *Biochim Biophys*, Volumen 1758, pp. 347-354.
- Ren-Shui , L., Jia-Hua , Y. & Wang-Yi , L., 2002. Isolation and enzymatic characterization of lamjapin, the first ribosome-inactivating protein from cryptogamic algal plant (*Laminaria japonica A*). *Journal Biochemical*, 269(19), pp. 4746-52.
- Reyes, A.G., 2008. *Proteína Inactivadora de los Ribosomas de Streptomyces coelicolor*, s.l.: Universidad Autónoma Metropolitana. Tesis de Maestría en Biotecnología.
- Reyes, A., 2012. Función y aplicación biotecnológica de una proteína Inactivadora de los Ribosomas de Streptomyces coelicolor. Tesis de Doctorado en Biotecnología.
- Reyes, A. G., Anné, J. & Mejía, A., 2012. Ribosome-inactivating proteins with an emphasis on bacterial RIPs and their potential medical applications. *Review Future Microbiology*, pp. 7(6),705-717.
- Reyes, A. y otros, 2010. The *Streptomyces coelicolor* genome encodes a type I ribosome-inactivating protein. *Microbiology*, Volumen 156, pp. 3021-3030.
- Rippmann, J., Michalowski, C., Nelson, D. & Bohner, H., 1997 . Induction of a ribosome-inactivating protein upon environmental stress. *Plant Mol. Biol.*, Volumen 35, pp. 701-709.
- Rosano, G. & Ceccarelli , E., 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. Microbiology*, Volumen 5, p. 172.
- Salvarelli , S., Muñoz, S. & Conde , F., 1994. Purification and characterization of a ribosome inactivating protein from *Aspergillus giganteus*. *Journal Biochemical* , Volumen 225, pp. 243-251.
- Sambrook , J., Fritsch , E. & Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sandoval, G., Olguín, A. & Paniagua, J., 2008. Péptidos: aplicaciones en investigación y desarrollo. Biotecnología Farmacéutica. *Laboratorios Silanes S.A. de C.V.Lecturas*, p. 3463.

- Sandvig, K. & van Deurs, B., 2002. Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett.* 529, pp. 49-53.
- Sandvig, K. & van Deurs, B., 2000. Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives (Review). *EMBO J.*, Volumen 19, pp. 5943-5950.
- Sandvig, K. & van Deurs, B., 2005. Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins. *Gene Ther.*, Volumen 12, pp. 865-872.
- Shahidi-Noghabi, S., van Damme, E. & Smagghe, G., 2009. Expression of *Sambucus nigra* agglutinin (SNA-I) from elderberry bark in transgenic tobacco plants results in enhanced resistance to different insect species. *Transgenic Res.*, Volumen 18, pp. 249-259.
- Shaw, P., Lee, K. & Wong, K., 2005. Recent advances in trichosanthin, a ribosome-inactivating protein with multiple pharmacological properties. *Toxicon*, Volumen 45, pp. 683-689.
- Shih, N. y otros, 1997. Bifunctional plant defense enzymes with chitinase and ribosome-inactivating activities from *Trichosanthes kirilowii* cell cultures. *Plant Sci.*, Volumen 130, p. 145-150.
- Simpson, J. y otros, 1999. Ricin A chain utilizes the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter the cytosol of yeast. *FEBS Lett.* 459, pp. 80-84.
- Soliveri, J., Scheu, A., Hernández Copa-Patiño, J. & Chater, K., 1999. Faster Recombinant DNA-procedures for *Streptomyces*. *Bio Techniques*, pp. 26:394-396.
- Stirpe, F., 2013. Mini-review: Ribosome-inactivating proteins: From toxins to useful proteins. *Toxicon*, Volumen 67, pp. 12-16.
- Stirpe, F. y otros, 1996. Activities associated with the presence of ribosome-inactivating proteins increase in senescent and stressed leaves. *FEBS Lett.* 382, pp. 309-312.
- Theis, T. & Stahl, U., 2004. Antifungal proteins: targets, mechanisms and respective applications. *Cell. Mol. Life Sci.*, Volumen 61, p. 437-455.
- Tor, Y. & Xie, Y., 2009. New fluorescent nucleosides for real-time exploration of nucleic acids. *SPIE Newsroom: Biomedical Optics & Medical Imaging*.
- Vago, R. y otros, 2005. Saporin and ricin A chain follow different intracellular routes to enter the cytosol of intoxicated cells. *FEBS J.* 272, pp. 4983-4995.
- Valbonesi, P. y otros, 1999. Preparation of highly purified momordin II without ribonuclease activity. *Life Scientific*, Volumen 65, p. 1485-1491.

- Vallin, . C. y otros, 2005. Streptomyces as a host for the secretion of heterologous proteins for the production of biopharmaceuticals. *Journal of Business Chemistry*, 2(3), pp. 107-111.
- Van Damme, E. y otros, 2001. Ribosome inactivating proteins:a family of plant proteins that do more than inactivate plant proteins that do more than inactivate ribosomes. *Crit.Rev. Plant Sci.*, Volumen 20, pp. 395-465.
- Wadia , J., Stan, R. & Dowdy, S., 2004. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytis. *Nat Med*, Volumen 10, pp. 310-315.
- Walsh, M., Dood, J. & Hautbergue, G., 2013. Ribosome-inactivating proteins:Potent poisons and molecular tools. *Virulence* , 4(8), p. 774–784.
- Wang , H. & Ng , T., 2000. Flammulin: a novel ribosome-inactivating protein from fruiting bodies of the winter mushroom *Flammulina velutipes*. *Biochem Cell Biol* , Volumen 8, pp. 1-4.
- Wang , P. & Tumer , N., 2000. Virus resistance mediated by ribosome inactivating proteins. *Adv. Virus Res.* , Volumen 55, p. 325–355 .
- Wang, H. & Ng, T., 2001. Isolation and characterization of velutin, a novel low-molecular-weight ribosome-inactivating protein from winter mushroom (*Flammulina velutipes*) fruiting bodies. *Life Scientific* , 68(18), pp. 2151-2158.
- Weng, A., Bachran , C., Fuchs , H. & Melzing, M., 2008. Soapwort saponins trigger clathrin-mediated endocytosis of saporin,a type I ribosome-inactivating protein. *Chem Biol Interact*, pp. 176:204-11.
- Wilmes , M., Cammue, B., Sahl, H. & Thevissen, K., 2011. Antibiotic activities of host defense peptides: more to it than lipid bilayer perturbation. *Nat. Prod. Rep.*, Volumen 28, pp. 1350-1358.
- Xiao-Ping, L. y otros, 2009. A two-step bifing model proposed for the electrostatic interactions of ricin A chain with ribosome. *Biochemistry*, 48(18), pp. 3853-3863.
- Yu, J.-H.y otros, 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, Issue 41, pp. 974-981.
- Zorko, M. & Langel, U., 2005. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(4), pp. 529-545.