



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

Alma R. López, Ana G. Reyes, Javier Barrios y Armando Mejía*, Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186 Col. Vicentina C.P.09340 Del. Iztapalapa, DF México. Edificio S laboratorio 153. Tel 58046453, fax 58044712 DF, ama@xanum.uam.mx*

Palabras clave: *Streptomyces*, RIPsc, péptido señal

Introducción. Las Proteínas Inactivadoras de Ribosomas (RIPs), son enzimas con actividad N-glicosidasa causantes de la liberación de una adenina (A) de la estructura ribosomal, interrumpiendo la síntesis proteica y causando la muerte celular¹. Las RIPs se clasifican en dos grandes grupos: las RIPs de tipo 1 son proteínas monoméricas de aproximadamente 30 kDa con actividad N-glicosidasa, y 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^{1,2}. Las RIPs de tipo 1 son ideales para el diseño de conjugados. 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. El uso de péptidos puede ser la alternativa adecuada en la funcionalidad de las RIPs³. Recientemente se comprobó que el gen *SCO7092* de *S. coelicolor* codifica una Proteína Inactivadora de los Ribosomas (RIPsc) de tipo 1 con actividad N-Glicosidasa sobre ribosomas de *E. coli* *BL21 (DE3) pLysS*, removiéndolo de manera específica la adenina *A*₂₆₆₀⁴. El presente trabajo tiene como objetivo obtener la expresión heteróloga de la fusión RIPsc con PEP32 (unido al extremo N-terminal o/y C-terminal) seleccionado contra hongos utilizando *S. lividans* TK24 como sistema de expresión.

Metodología. Se diseñó un *cassette* de expresión para obtener la sobre-expresión de PEP32-RIPsc y RIPsc-PEP32 utilizando el péptido señal *vs1* de *S. venezuelae* CBS762.70. Se clonó el *cassette* en el vector pIJ486 y se transformó *S. lividans* por protoplastos. Una vez seleccionadas las transformantes utilizando tioestrepton como marcador y PCR de colonia, se llevó a cabo una fermentación de 20 días en Medio Phage (50 µg/mL, 30°C, 150 rpm). Se obtuvo el extracto crudo para realizar bioensayos de inhibición contra hongos e identificar la proteína de interés. Se secuenció el fragmento de AND.

Resultados. Se llevó a cabo la sobre-expresión de PEP32-RIPsc y RIPsc-PEP32. En la Figura 1, se puede observar que hay cierto grado de inhibición de PEP32-RIPsc contra los hongos probados. Este efecto no se observa en la construcción RIPsc-PEP32. Se tomó como control la *wt* de *S. lividans* y con el vector pIJ486. De manera paralela se identificó la proteína de interés de 30 kDa aproximadamente, mediante un gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% (Fig.2).

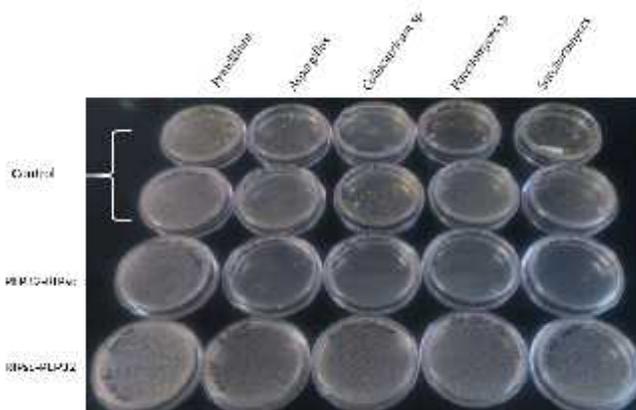


Figura 1. Prueba de inhibición sobre diferentes hongos.

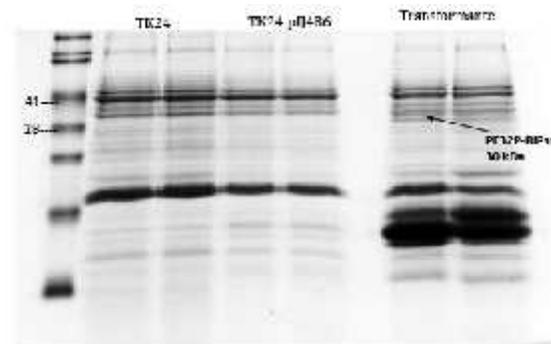


Figura 2. Gel de poliacrilamida, SDS-PAGE 12% para la separación de PEP32-RIPsc. En cada carril se corrieron 10 µL de muestra. Marcador de peso molecular Prestained SDS-PAGE Standards, broad range.

Conclusiones. Se obtuvo una transformante que secreta la proteína PEP32-RIPsc con cierto grado de inhibición contra hongos. Es necesario corroborar que la inhibición sea producto de la proteína de interés y no de algún otro tipo de compuesto que se haya sobre-expresado.

Bibliografía.

1. Peumans, W., Hao, Q. & Van Damme, E.,(2001). Ribosome-inactivating from plants: more than RNA N-glycosidases?. *FASEB J.*, Issue 15, pp. 1493-1506.
2. Nielsen, K. & Boston, R., (2001). Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Volumen 52, pp. 785-816.3.
3. Zorko, M. & Langel, U.,(2005). Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(4), pp. 529-545.
4. Reyes, A., (2012). Función y aplicación biotecnológica de una proteína Inactivadora de los Ribosomas de *Streptomyces coelicolor*.



XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería

21 al 26 de Junio de 2015 Guadalajara, Jalisco, México.

Guadalajara