

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y ESTRUCTURAL DE UNA POLICÉTILO SINTASA TIPO III DE ORIGEN MARINO

Diana Arismendi-Segura, Arianna Soto-Hernández, Sara Centeno-Leija, Hugo Serrano-Posada*
Laboratorio de Agrobiotecnología, Universidad de Colima, Libramiento los limones-Loma de Juárez, Colima. C.P. 28629. scenteno0@uclm.mx; hserrano0@uclm.mx

Alquilresorcinoles; Compuestos Bioactivos; Microbacteracea

INTRODUCCIÓN

Las enzimas policétido sintasa tipo III (PKS III) producen policétidos tipo pironas, estilbenos y resorcinoles, que frecuentemente presentan capacidades bioactivas útiles para la industria biotecnológica (1). La elucidación de la estructura cristalográfica de PKSs III bacterianas, contribuye al conocimiento del mecanismo de biosíntesis de nuevos policétidos potencialmente bioactivos. Nuestro grupo de trabajo identificó una PKS III bacteriana (ArsMB) en microbiomas marinos, que además de presentar un bajo porcentaje de identidad con otras PKSs III reportadas, es productora de un alquilresorcinol con capacidad antioxidante. Sin embargo, permanece desconocida su estructura tridimensional, lo que limita el estudio de su relación estructura-función. En este trabajo se presenta la producción recombinante, purificación y ensayos de cristalización de ArsMB, como una aproximación para obtener la estructura cristalográfica de esta PKS III inédita.

METODOLOGÍA

El análisis de la secuencia ArsMB se realizó mediante los programas predictivos: Pfam, BLAST, X-talpred, PROSO II, SignalP, ProtParam e iPSORT. La producción recombinante se realizó a partir de un gen sintético (IDT company) con los codones optimizados para la expresión en *Escherichia coli*. La purificación se realizó mediante cromatografías de afinidad por níquel y exclusión molecular utilizando un FPLC ÄKTA Pure 25 M1 (GE Healthcare). Actualmente se están realizando ensayos de cristalización, utilizando utilizando las matrices de cristalización de Hampton Research (Crystal Screen I y II, Index I y II, Crystal Screen Cryo y PEG/Ion Screen) y Rigaku (Wizard I, II, III y IV).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de secuencia demostró que ArsMB (*Microbacteriaceae bacterium*; No. de acceso: KRO38894.1.) presenta 349 residuos en su secuencia de aminoácidos y un peso molecular teórico de 36.9 kDa. El gen sintético se subclonó exitosamente en el plásmido pET-22b (Fig. 1A).

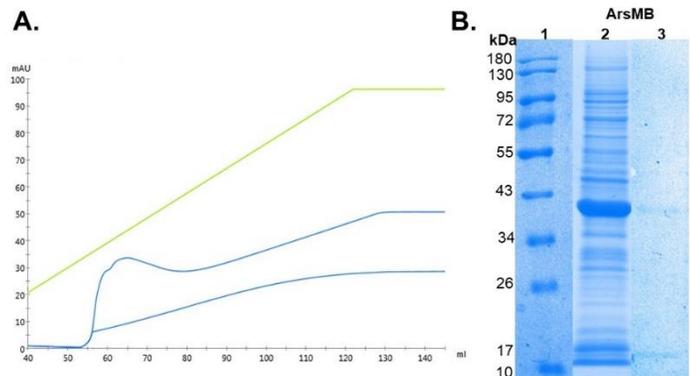


Figura 2. (A) Purificación por cromatografía de afinidad por níquel en un ÄKTA Pure. Gradiente de imidazol (línea verde); elución de ArsMB (línea azul). (B) Gel SDS-PAGE. Carril 1: marcador de peso molecular de proteínas; Carril 2: extracto bacteriano mostrando la sobreexpresión de ArsMB; Carril 3: ArsMB purificada.

Actualmente se escaló la producción recombinante y purificación de ArsMB para incrementar los ensayos de cristalización (Fig. 3), así como profundizar en la determinación de su estructura cuaternaria mediante estudios acoplados (SEC-DLS) y funcionales *in vitro* utilizando los sustratos malonil-CoA/metilmalonil-CoA y/o *soaking*, entre otros.

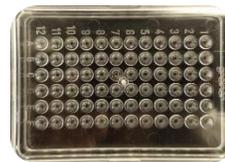


Figura 3. Ensayo preliminar de cristalización de la enzima ArsMB utilizando la técnica de *microbatch*. Gotas: 1 + 1 μ L. Temp.: 4 y 18 $^{\circ}$ C.

CONCLUSIONES

Se establecieron las condiciones de producción recombinante y purificación preliminar de una PKS III inédita de origen marino, ArsMB. Los ensayos de cristalización, así como la determinación de la estructura cristalográfica de esta enzima, permitirán profundizar en el estudio de su relación estructura-función.

AGRADECIMIENTOS

SCL y HSP agradecen al CONACyT por el apoyo a los proyectos INFR-280608 y CB-285001. A los Biol. Verónica Rodríguez-Celestino y Julio Navarro-Bautista por el apoyo técnico.

BIBLIOGRAFÍA [1] Robbins, T., *et al.* (2016). *Curr. Opin. Struct. Biol.* 41: 10-18. [2] Síntesis *in vivo* y evaluación de la bioactividad de un policétido tipo III proveniente de microbiomas marinos. Tesis de Maestría (2019). Arianna Soto-Hernández.

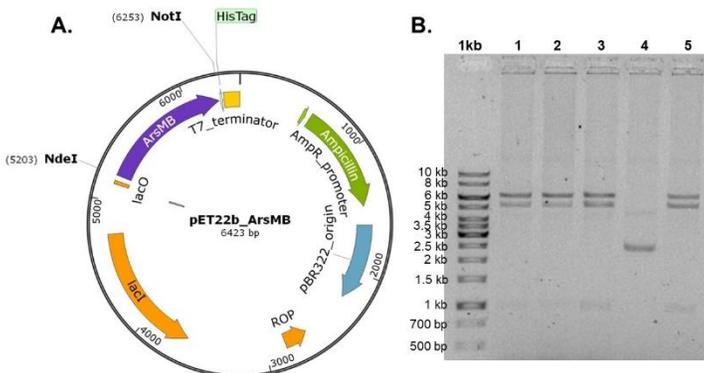


Figura 1. (A) Mapa del vector pET-22b modificado con el gen de interés. (B) Gel de agarosa en el que se muestran patrones de digestión enzimática. Se realizó por quintuplicado y se obtuvieron 4 clones positivos de 5 en total.

Para la producción recombinante de ArsMB se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS con el plásmido pET-22b/ArsMB (Fig. 1B), obteniéndose altos niveles de expresión en medio LB, resistencia a ampicilina e inducción con IPTG. Los ensayos preliminares de purificación demostraron que la enzima se purifica a homogeneidad por medio de una cromatografía de afinidad por níquel y que el peso molecular coincide con el peso molecular esperado de ~37 kDa (Fig. 2).