



SÍNTESIS *IN VIVO* Y EVALUACIÓN DE LA BIOACTIVIDAD DE UN POLICÉTIDO TIPO III PROVENIENTE DE MICROBIOMAS MARINOS

Arianna Soto-Hernández, Holber Zuleta-Prada, Omar Jiménez-Rodríguez, Diana Arismendi-Segura, Sergio Sánchez Esquivel, Hugo Serrano-Posada, Sara Centeno-Leija. Laboratorio de Agrobiotecnología, Universidad de Colima, Libramiento los limones, Loma de Juárez, Colima, México. C.P. 28629. hserrano@ucol.mx; scenteno0@ucol.mx

Compuestos Bioactivos; Biología Sintética; Streptomyces

INTRODUCCIÓN.

La biosíntesis de policétidos tipo III involucra a las enzimas clave policétido sintasa tipo III (PKS III), que condensan monómeros de acil-CoA para formar distintas variedades de estilbenos, pironas o resorcinoles, los cuales son bastante apreciados por sus capacidades bioactivas (1). Comparado con el sobreexplorado mundo de las plantas, las PKS III bacterianas y sus productos han sido poco estudiados. En este trabajo, anclamos al metabolismo central de *Streptomyces* (con genoma simplificado), la actividad de una PKS III inédita (ArsMB) encontrada en metagenomas de microbiomas marinos, como una estrategia para explorar nichos alternativos que lleve a la obtención de policétidos bacterianos con potenciales propiedades bioactivas.

METODOLOGÍA

Minería de datos: BLASTP/HMMER en la plataforma "metagenomes IMG/M". Programas de análisis de secuencia y diseño del gen: Pfam, KEGG, BLAST, X-talpred, proso II, SignalP, ProtParam, iPSORT, Codon Optimization. Modelado por homología: PDB, Coot, y Swiss-Model, YASARA y CCP4mg. Gen sintético *arsMB*: IDT company. Sistema de integración cromosómica/expresión inducible: Φ C31/pIJ6902 y hospederos *S. coelicolor* M1152 carentes de rutas de metabolitos secundarios (2) y *S. venezuelae*. Medio de producción: GYM (2). Extractos de biomasa/acetato de etilo: 10mL/g. Placas TLC: Sílica gel 60, cloroformo:acetato de etilo con revelador Fast blue B (para alquil-resorcinoles). HPLC: columna C-18 en fase metanol:agua. Pruebas de resistencia a antibiótico: cm, km, amp, apra (Δ ug/mL) en agar MS y MYM.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis del metagenoma de un microbioma del Mar Báltico (LIAY01000086.1), permitió identificar una enzima hipotética (ArsMB; KRO38894.1) que posee el motivo Cys¹³⁸/His²⁷⁷/Asn³¹⁰ típico del dominio cetosintasa de PKS III (Fig. 1). ArsMB posee una baja identidad con otras PKS III (<45%) y se encuentra dentro de un clúster de tres genes, similar a los clústeres involucrados en la síntesis de alquil-resorcinoles, los cuales se ha demostrado que favorecen la resistencia a antibióticos de algunas bacterias, así como presentan capacidad antioxidante (3).

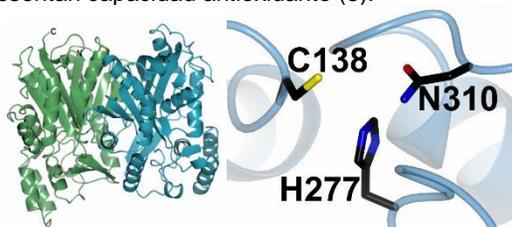


Figura 1. (A) Modelo por homología de ArsMB utilizando como templado a la PKS III de *Mycobacterium tuberculosis* (Código PDB 4JAO). (B) Triada catalítica Cys/His/Asn en el sitio activo.

Posteriormente, se ancló la actividad ArsMB al metabolismo de *S. coelicolor* M1152 mediante la integración en su genoma, fusionando el gen sintético *arsMB* a un promotor inducible *tipA* y a un sitio de unión a ribosoma compatible con Actinobacterias (2). La integración se comprobó por PCR y secuenciación capilar. Después, en la cepa M1152::arsMB, se realizaron ensayos de producción del policétido en un proceso en dos etapas, induciendo a la mitad de la fase de crecimiento exponencial para asegurar la producción durante el metabolismo secundario (Fig. 2A). El análisis de los extractos de producción mostró la presencia de un metabolito asociado a biomasa, ausente en la cepa control no productora M1152::pIJ6902 (Fig. 2B).

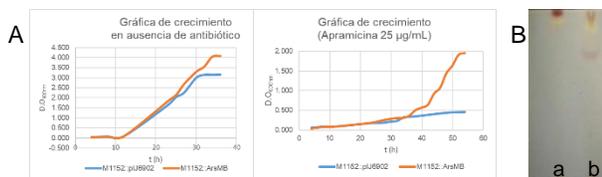


Figura 2. (A) Gráfica de crecimiento de las cepas *S. coelicolor* M1152::pIJ6902 y M1152::arsMB, en ausencia y en presencia de antibiótico. (B) Placa de TLC de los extractos de biomasa de la cepa control (a), y la cepa productora (b).

Para demostrar que el policétido producido confiere resistencia a antibióticos se probó la capacidad de crecimiento mediante análisis comparativos entre las cepas M1152::arsMB y M1152::pIJ6902, así como entre *S. venezuelae*::arsMB y *S. venezuelae*::pIJ6902. Así, se utilizaron distintas concentraciones de antibióticos (cm, km, amp, apra y tioestreptona; ug/mL) y se observó que en presencia del gen *arsMB* ambas cepas resisten hasta 10 μ g/mL de cloranfenicol, mientras que las cepas control no lo hacen, y, además, resisten una concentración hasta 10 veces mayor de apramicina que las cepas control (Fig. 3). Lo anterior abre un nicho de oportunidad para investigar a profundidad la relación del producto de ArsMB, con los fenómenos de resistencia a antibióticos.

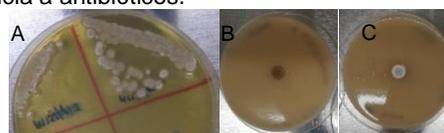


Figura 3. Crecimiento bacteriano en placas de agar. (A) Apramicina (200 μ g/mL). Izda: cepa control. Dcha: cepa productora. Cloranfenicol (10 μ g/mL): (B) cepa control sin crecimiento y (C) cepa productora con crecimiento normal.

Conclusiones. ArsMB es una PKS III inédita, proveniente de microbiomas marinos, cuyo producto bioactivo confiere resistencia a antibióticos a cepas de *Streptomyces*. Este descubrimiento invita a continuar estudiado la relación estructura-función de esta PKS III, así como la influencia de su producto en los fenómenos de resistencia a antibióticos. La purificación del policétido y determinación de su estructura química mediante HPLC y RMN, respectivamente, están actualmente en proceso.

Agradecimientos. ASH recibe una beca de Maestría CONACyT-628964. HSP y SCL agradecen al CONACyT por el apoyo a los proyectos INFR-280608 y CB-285001. A los Biól. Verónica Rodríguez-Celestino y Julio Navarro-Bautista por el apoyo técnico.

Bibliografía. [1] Yu, D., et al., (2012). IUBMB Life, 285–295. [2] Kieser, T.B., et al., (2000), 249-250. [3] Funabashi, M., et al., (2008). JBC, 13983–13991.

