

## EXPRESIÓN DEL GEN *glk* DE *Streptomyces peucetius* var. *caesius* EN *E. coli*

Diana Rocha, Paloma Carranza, Itzel Nissen, Beatriz Ruiz, Romina Rodríguez y Sergio Sánchez.

Depto. Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. A.P. 70228, México, D.F. CP 04510. Fax: 56229212. [sersan@servidor.unam.mx](mailto:sersan@servidor.unam.mx)

Palabras clave: *glucosa cinasa*, *represión catabólica*, *Streptomyces*

**Introducción.** El género *Streptomyces* es conocido por su habilidad para producir metabolitos secundarios de interés en la medicina y la industria. La producción de estos compuestos está regulada por el proceso de represión catabólica por carbono (RCC). Se piensa que la glucosa cinasa (Glk) es clave en este proceso regulatorio (1,2) en los miembros de éste género. Sin embargo, aún no se ha esclarecido su mecanismo de acción en la RCC. Debido a ello, se clonó y secuenció la Glk de *S. peucetius* var. *caesius* (3) como un paso preliminar al estudio de su mecanismo de acción.

Los objetivos de este trabajo son la sobreexpresión de *glk* de *S. peucetius* var. *caesius* en *E. coli* y la purificación de la enzima para realizar ensayos de unión proteína-proteína. Dichos ensayos nos permitirán determinar las proteínas que se unen a Glk y su posible implicación en la RCC.

**Metodología.** El gen de *glk* (número de acceso AY651851) (3), se encuentra clonado en el vector pGEM-Teasy. A partir del mismo, se subclonó en el vector pBAD HisB, para someter su expresión al control del promotor de arabinosa y añadirle un tallo de histidinas para facilitar la purificación. El plásmido obtenido se transformó en *E. coli* TOP10 y se realizó el ensayo de expresión variando la concentración de arabinosa. La proteína obtenida se identificó por western blot usando anticuerpos anti-His a partir de extractos celulares completos.

**Resultados y discusión.** La ligación del plásmido pBAD con el gen *glk* fue transformada en *E. coli* DH5 $\alpha$  para verificar que el marco de lectura de la proteína fuera el correcto. Una vez verificado se transformó en la cepa de expresión TOP10. Con esta cepa se hicieron ensayos de inducción y se observó que la expresión de la enzima de fusión era muy baja. Para promover la expresión de la proteína, se disminuyó la temperatura de crecimiento e inducción a 28° C. Sin embargo, no se observó la presencia de la enzima por western blot. Revisando nuevamente la secuencia, se observó que el gen presentaba dos codones de bajo uso para *E. coli*, por lo que éstos fueron cambiados por medio de mutagénesis dirigida. Se transformó la cepa TOP10 con el nuevo

plásmido, se realizó el ensayo de inducción y se obtuvo la expresión de la enzima Glk con tallo de histidinas (Figura1) carriles 4, 5 y 6.



Fig. 1. Ensayo de expresión de 6XHis-Glk. (1): sin inductor, (2): con 0.00002%, (3): con 0.0002%, (4): con 0.002%, (5): con 0.02%, (6): con 0.2% de L-arabinosa como inductor de la expresión y (7): marcador de peso molecular.

**Conclusiones.** Se obtuvo la proteína Glk fusionada a 6XHis. Se utilizará este sistema para purificar la Glk en columnas de sefrosa niquelada y se realizarán ensayos de unión proteína-proteína.

### Bibliografía.

1. Angell, S., Lewis, C., Buttner, M. y Bibb, M. (1994). Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) a likely regulatory role for glucose kinase. *Mol. Gen. Genet.* 244:135-43.
2. Kwakman, J. y Postma, P. (1994) Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 176(9):2694-8.
3. Mascareñas Ruíz, N. A. 2005. Clonación del gen de la glucosa cinasa de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.