



DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UNA PROTEÍNA HÍBRIDA; HEMOGLOBINA/CITOCROMO P450, PARA EL MEJORAMIENTO EN LA PRODUCCIÓN DEL ANTIBIÓTICO RIFAMICINA B.

Doris J. Luna, Francisco J. Fernández, Luis H. Gutiérrez y Armando Mejía*

Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, CP 09340, Iztapalapa, México DF, fax: 5804-4712, *e-mail: ama@xanum.uam.mx.

Palabras clave: Amycolatopsis mediterranei, citocromo P450, Rifamicina.

Introducción. La lista de compuestos obtenidos a partir de microorganismos filamentosos tienen múltiples aplicaciones en la medicina, veterinaria y agricultura. (Cross T. 1981). Un problema común en estos procesos se debe a la elevada viscosidad que provoca el crecimiento miceliar, dificultando la transferencia de oxígeno al medio de cultivo (Mejía, et.al., 1998; Virgilio et al., 1964 y Lancini y Cavalleri, 1997).

En la producción del antibiótico rifamicina B por *Amycolatopsis mediterranei* el problema se agrava, ya que se trata de un aerobio estricto que además necesita de oxígeno para la biosíntesis del antibiótico. (Jin Z. H., 2004; Virgilio et al., 1964 y Lancini y Cavalleri, 1997).

En trabajos previos, hemos logrado transformar a *A. mediterranei* con el gen de *Vitreoscilla stercoraria* que codifica para una hemoglobina. Los resultados mostraron un incremento en la producción de la rifamicina B de alrededor del 30%. Sin embargo, a pesar de que este aumento consideramos que el oxígeno que es captado por la hemoglobina se libera en el citosol y ahí nuevamente se lleva a cabo una competencia por el oxígeno, entre la cadena respiratoria y el citocromo P450, enzima responsable del paso biosintético crítico en la producción del antibiótico.

Por esta razón, se pretende construir una proteína de fusión, bajo la hipótesis de que con esta proteína quimérica, el oxígeno captado por el dominio de la hemoglobina sea cedido de manera más eficiente al dominio del citocromo P450.

Metodología. Utilizando el programa Swiss-PdbViewer y las secuencias de las proteínas Vhb y Orf 5 se modeló la proteína de fusión y se optimizó su estructura. Con los resultados del modelamiento se procedió a la fusión de ambos genes y su clonación en el plásmido pULVK2.

Resultados y discusión Durante las diferentes dinámicas de modelamiento se probó la introducción de glicinas para ver un mayor disminución en la energía de minimización debido a que la Vhb termina en una alfa hélice y en un intento de garantizar que se rompa la continuidad de la estructura se introdujeron una glicina, sin embargo el principio de nuestra proteína Orf 5 presenta una zona no estructurada lo cual nos indica que probablemente no sea necesario la introducción de dicha glicina; ello fue comprobado al realizar diferentes modelamientos y comparando las energías de minimización. Seleccionando el siguiente modelo para la proteína quimérica donde no fue necesaria la introducción de glicinas o algún otro aminoácido; con una energía de minimización de -20 629.699 KJ/mol. (Fig. 1). A partir del conocimiento del probable

modelo calculado para la proteína de fusión y las secuencias de los genes de *orf 5* y *vhb* que se encuentran clonados en los plásmidos pGEM orf5 y pUAMSAG1; se diseñaron los oligonucleótidos o primers necesarios para la obtención por PCR de dichos fragmentos a los cuales se les adiciono los sitios de corte Hind III y Eco R1 para su posterior clonación en el vector pULVK2.

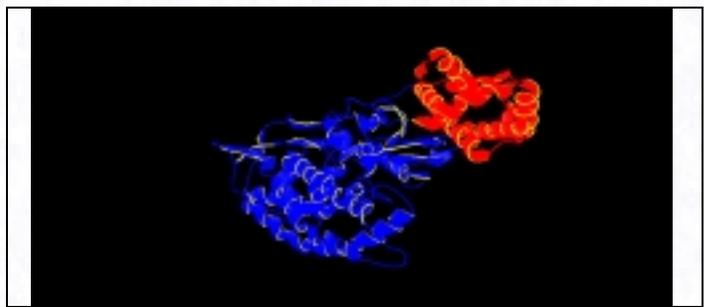


Fig. 1. Modelo propuesto para la proteína quimérica VHB-CYP450.

Conclusiones. El modelo obtenido tiene una energía de minimización de -20 629.699 KJ/mol., la cual hace pensar que se encuentra cerca de la realidad.

Se obtuvo el gen híbrido, se clonó en pULVK2 y se obtuvieron las transformantes buscadas para su evaluación.

Agradecimientos. Este trabajo está financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México.) (SEP-2003-C02-44911).

Bibliografía.

1. Mejía, A., Barrios-González, J., and Viniegra-González G. (1998). Overproduction of rifamycin B by *Amycolatopsis mediterranei* and its relationship with the toxic effect of barbital on growth. *J. Antibiot.* 51 (1): 58-63.
2. Lancini G and Cavalleri B (1997). Rifamycins. In: *Biotechnology of Industrial Antibiotics*. Strohl, W.R. ed. 2nd ed. Marcel Decker, New York, pp. 521-549.
3. Jensen PR, Fenical 1994, W. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: Ecological perspectives. *Annu Rev Microbiol*; 48: 559-84.
4. Guerra Priscila (2006). Clonación del gen *vhb* proveniente de *Vitreoscilla stercoraria* y evaluación de su efecto sobre la biosíntesis de rifamicina B por *Amycolatopsis mediterranei*. Tesis de Maestría. Biotecnología. UAM-I. México DF.