



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



GLUCOSA CINASA DE *Streptomyces peucetius* var. *caesius*: ESTUDIO DE SUS POSIBLES INTERACCIONES PROTEICAS

Diana Rocha, Beatriz Ruíz y Sergio Sánchez. UNAM, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, México D. F., C.P. 04510. divonne29@hotmail.com.

Palabras clave: *Streptomyces*, glucosa cinasa y represión catabólica por carbono.

Introducción. El género *Streptomyces* se caracteriza por su capacidad para producir una gran variedad de metabolitos secundarios, entre ellos los antibióticos. La producción de dichos compuestos se encuentra sujeta de regulación por el fenómeno de represión catabólica por carbono (RCC), cuyo mecanismo aún se desconoce. Se sabe que la enzima glucosa cinasa (Glc) desempeña un papel central en este mecanismo (1, 2). La Glc no presenta dominios de unión a ADN por lo que se sospecha que uniéndose a proteínas es como ejerce su efecto regulador. Mediante el uso de biosensores se encontró que la Glc de *S. coelicolor* se une a otras proteínas, pero esta técnica no permite la identificación de las mismas (3). Similarmente, en *S. lividans* crecido en glucosa, la Glc se encuentra asociada a la membrana lo que sugiere su unión a la permeasa de glucosa (4). En este trabajo se pretende evaluar la posible interacción de la Glc con otras proteínas en *S. peucetius* var. *caesius* (Spvc), productor del antitumoral doxorubicina.

Metodología. Se subclonó *glk* en el plásmido pQE31. Se expresó la proteína en *E. coli* M15. Se purificó la proteína de fusión 6xHis-Glc con sefarosa Ni²⁺. Se obtuvo los extractos citosólicos de Spvc crecido en medio mínimo (MM) con glucosa en condiciones no represoras (100 mM) y represoras (495 mM). Se enfrentó la proteína de fusión 6xHis-Glc (carnada) contra las proteínas de Spvc (presa) en dos metodologías de unión proteína-proteína, pull-down y far-western.

Resultados. Se sobre-expresó y purificó la proteína de fusión 6xHis-Glc, la cual presentó actividad enzimática. Se realizó el far-western (Fig. 1) en condiciones no desnaturizantes y desnaturizantes. Se evaluaron los extractos citosólicos de varios tiempos de fermentación (0, 2, 7, 12, 24, 32 y 48 h) del Spvc, variando las condiciones de incubación de las proteínas "presa" y la proteína "carnada". Bajo estas condiciones no se observó señal referente a alguna proteína que se una a Glc. Sólo se observa señal del control positivo (6xHis-Glc). También se realizó el ensayo de interacción entre proteínas por la metodología de pull-down, evaluando los mismos tiempos de fermentación ensayados en el far-western. Se evaluó la sefarosa limpia, 6xHis-Glc unida a sefarosa, sefarosa con extracto citosólico de Spvc, y sefarosa con 6xHis-Glc y extracto citosólico. Este patrón se repitió para los tiempos evaluados (Fig. 2). Lo que se observa en la figura es que en ninguna de las

condiciones evaluadas se encontró alguna proteína retenida por la interacción con la Glc.

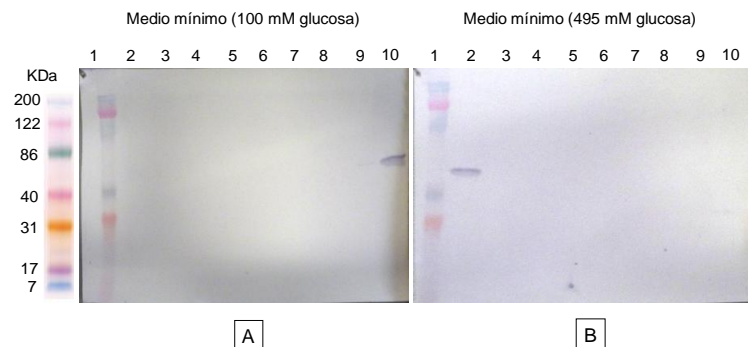


Fig. 1. Far-western obtenidos de geles SDS-PAGE al 10%. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 10 (A) y 2 (B) control positivo (6xHis-Glc).

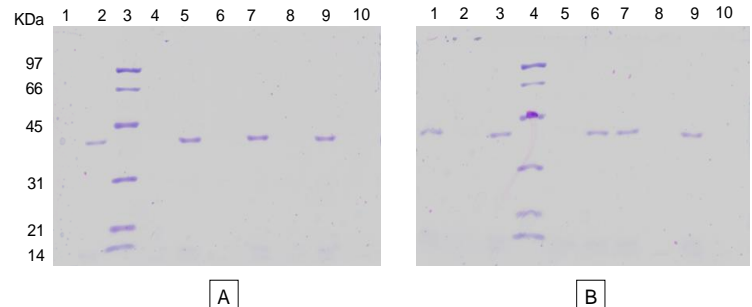


Fig. 2. Pull-down de extractos citosólicos de Spvc crecidos en MM con 495 mM de glucosa. Carril 3 (A) y 4 (B): marcador de peso molecular.

Conclusiones. Aún cuando no se haya encontrado alguna proteína que establezca una unión fuerte y estable con la Glc, no se descarta que sea a través de interacciones con otras proteínas la forma en que Glc regula el proceso de RCC.

Agradecimientos. Financiado en parte por CB2008-100564-IIBO (CONACYT, México) y PAPIIT, IN209210 (Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, México).

Bibliografía.

1. Kwakman J y Postma P. 1994. *J. Bacteriol.* 176 (9): 2694-2698.
2. Angell S, Lewis, C, Buttner M. y Bibb M. 1994. *Mol. Gen. Genet.* 244 (2):135-43.
3. Mahr K, van Wezel G, Svensson C, Kregel U, Bibb MJ, Titgemeyer F. 2000. *Anton. Leeuw. Int J. G.* 78 (3-4): 253-261.
4. van Wezel G, König M, Mahr K, Nothhaft H, Thomae A, Bibb M, Titgemeyer F. 2007. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 12 (1-2): 67-74.