

ESTUDIOS SOBRE LA FORMACION DEL ANILLO DE DECALINA POR CHIE3 PARA LA PRODUCCION DE DERIVADOS DE CLOROTRICINA

Monserrat Manzo-Ruiz¹, Andrew Devine², Catherine R. Back¹, Nicholas J. Burton¹, Christine L. Willis², Paul R. Race¹

¹School of Biochemistry, University of Bristol, Biomedical Sciences Building, Bristol BS8 1TD, UK

²School of Chemistry, University of Bristol, Cantock's Close, Bristol BS8 1TS, UK

monserrat.manzoruiz@bristol.ac.uk

Palabras clave: Ciclasas, estructura de proteínas, *Streptomyces*

Introducción. *Streptomyces antibioticus* produce el antibiótico del tipo espirotetronato, clorotricina (1). La biosíntesis de este Producto Natural involucra dos ciclaciones, una de ellas es catalizada por la enzima ChIE3 y forma el distintivo anillo *trans*-decalina de este compuesto (2). Para entender esta reacción, la estructura de la proteína ChIE3 ha sido elucidada y se está caracterizando la reacción *in vitro* con su sustrato. Acoplado caracterización funcional y estructural de la proteína con la obtención de mutantes carentes de la ciclase, permitirá el desarrollo de derivados de clorotricina.

Metodología. El gen *chIE3* se clonó en pET29b. ChIE3 se expresó en *E. coli* BL21 (DE3), con IPTG 1 mM, incubando a 20°C durante 16 h. ChIE3 se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel y cromatografía de exclusión molecular. La proteína se cristalizó mediante el método de la gota sedente. Los cristales se difractaron en el sincrotrón Diamond Light Source. La estructura de ChIE3 fue elucidada mediante reemplazo molecular utilizando PHASER, y se refinó con REFMAC. La reacción de cicloadición se identificó mediante LC-MS y mediante espectrofotometría en UV-Vis. La eliminación del gen se realizó mediante CRISPR-Cas9 como se describió previamente (3).

Resultados. Se obtuvieron varios cristales amarillos. Los mejores datos de difracción se obtuvieron de un cristal crecido en LiCl, PEG y Tris-HCl. La estructura de ChIE3 se determinó a 1.92 Å. La estructura reveló la presencia de una molécula de FAD unida a la proteína y cerca del sitio de unión al sustrato [Figura 1], sugiriendo su intervención en la cicloadición [4+2] para la formación del anillo de decalina. La reacción de ciclación del sustrato de ChIE3 se identificó mediante LC-MS al observarse un pico adicional al del sustrato. La reacción también se siguió mediante espectrofotometría en UV-Vis al observarse la disminución de absorbancia en presencia del sustrato [Figura 2]. Otros estudios estructurales sobre la interacción del sustrato con ChIE3, así como la caracterización de la mutante $\Delta chIE3$ para la obtención de derivados de clorotricina están en progreso.

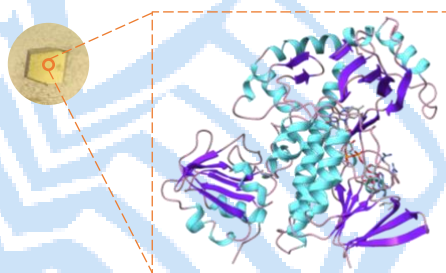


Figura 1. Representación de Ribbon de ChIE3.

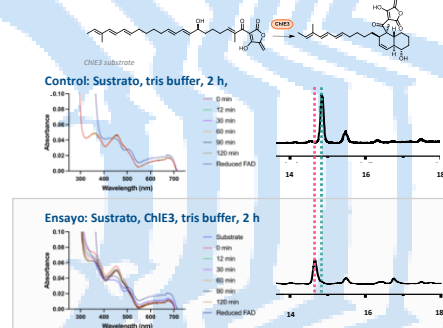


Figura 2. Formación del ciclo decalina por ChIE3. La reacción se siguió mediante espectrofotometría en UV-Vis y por LC-MS.

Conclusiones. Se elucidó la estructura de ChIE3 unida a FAD a 1.92 Å. La reacción de cicloadición [4+2] del sustrato se identificó mediante LC-MS y espectrofotometría en UV-Vis.

Agradecimiento. M Manzo recibe una beca Conacyt para estudios de doctorado en el extranjero. El proyecto es en colaboración con AstraZeneca, financiado por el BBSRC. Agradecemos al equipo de investigadores en Diamond Light Source por su asistencia durante la difracción de rayos X de los cristales.

Bibliografía.

- Jia XY, Tian ZH, Shao L, Qu XD, Zhao QF, Tang J, Tang GL, Liu W. (2006). *Chem Biol.* 13(6): 575-585.
- Tian Z, Sun P, Yan Y, Wu Z, Zheng Q, Zhou S, Zhang H, Yu F, Jia X, Chen D, Mándi A, Kurtán T, Liu W. (2015). *Nat Chem Biol.* 11(4): 259-265.
- Ye S, Enghiad B, Zhao H, Takano E. (2020). *J Ind Microbiol Biotechnol.* 47(4-5): 413-423.