

LA MINERÍA GENÓMICA SOBRE *Actinoplanes* TFC3 PERMITIÓ LA IDENTIFICACIÓN DE UNA POLICÉTIDO SINTASA DE TIPO III PRODUCTORA DE ANTIOXIDANTES.

Omar Jiménez-Rodríguez¹; Sara G. Centeno-Leija²; Fausto J. Rivero-Cruz³; Beatriz Ruiz-Villafán¹, Sergio Sánchez*¹.

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM. Ciudad Universitaria, Coyoacán, CDMX, CP 04510.

²Laboratorio de Agrobiotecnología. Universidad de Colima. Loma de Juárez, Colima, CP 28629.

³Conjunto E, Facultad de Química, UNAM. Ciudad Universitaria, Coyoacán, CDMX, CP 04510.

o.jimenesciens@gmail.com

Palabras clave: policétidos, actinobacterias, antioxidantes.

Introducción. Los policétidos son compuestos naturales con estructura diversa y que poseen numerosas actividades biológicas como: anticancerígena, antifúngica, antibacteriana y antioxidante. Se sintetizan mediante la condensación descarboxilativa de residuos de acil-CoA por enzimas llamadas policétido sintasas (PKS), clasificadas en tres tipos (I, II y III). Las de tipo III son las más simples al formar homodímeros de subunidades de condensación y utilizar directamente el grupo tioéster del acil-CoA. Dado que el potencial genético bacteriano suele ser limitado en condiciones de laboratorio¹, herramientas como la minería genómica y la expresión heteróloga desempeñan un papel importante en el descubrimiento de nuevos metabolitos². Recientemente, fue secuenciado y ensamblado el genoma de *Actinoplanes* sp. TFC3, una actinobacteria endófito de la planta medicinal *Amphipterygium adstringens* (cuachalalate)³; en su genoma se encontró un clúster biosintético que contiene a una enzima PKSIII.

El objetivo del proyecto fue la expresión heteróloga del gen principal de la vía, la evaluación de la bioactividad y la elucidación estructural de los compuestos producidos.

Metodología. El genoma de *Actinoplanes* sp. TFC3 se analizó con antiSMASH 3.0⁴ en búsqueda de clústeres involucrados en la biosíntesis de policétidos. La expresión del gen principal del clúster (*alkA*) se realizó en la cepa de *Escherichia coli* BL21. Se utilizaron SDS-PAGE y western blot para verificar la presencia del producto de expresión de dicho gen. La expresión heteróloga de *alkA* se llevó a cabo en *Streptomyces coelicolor* M1152¹ por medio del vector integrativo pIJ6902⁵. Los cultivos de las cepas se realizaron de acuerdo con metodologías descritas previamente¹, y las extracciones de la biomasa se realizaron con metanol y asistidas por sonicación. La comparación de la producción diferencial entre las cepas se efectuó por medio de cromatografía en capa fina (TLC), usando el reactivo de Folin-Ciocalteu y Fast Blue B como reveladores. Se procedió a evaluar la capacidad antioxidante a través del ensayo con DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), en placas de TLC. Finalmente, la elucidación estructural se llevó a cabo por medio de las técnicas de RMN y MS.

Resultados. La expresión de *alkA* en *Escherichia coli* permitió encontrar una proteína de 37.8 kDa, tanto en la fracción soluble como en la insoluble, la cual se denominó AlkA. Por otro lado, al realizar la expresión heteróloga en *S. coelicolor* M1152, se generó una cepa que contenía al vector pIJ6902 con el gen *alkA* (MalkA), así como la cepa control con el plásmido vacío (MplJ). Cuando se evaluó el crecimiento de ambas cepas, pudo corroborarse que la expresión de AlkA no afectó el crecimiento de MalkA respecto al control. Los extractos de ambas cepas, analizados por TLC, evidenciaron un perfil metabólico distinto entre ellas, lo que permitió presumir que MalkA estaba produciendo compuestos diferentes a los del control debido a la presencia de la PKSIII. Los reveladores utilizados sugirieron que los compuestos eran aromáticos, de tipo alquilresorcinol, tal como se esperaba. Respecto a la evaluación de la capacidad antioxidante, se encontró dicha actividad en los extractos de la cepa MalkA, a diferencia de MplJ en la cual no se detectó. Finalmente, la elucidación estructural permitió corroborar que los compuestos producidos diferencialmente entre las cepas MplJ y MalkA fueron alquilresorcinoles.

Conclusiones. El producto de expresión del gen *alkA* fue una proteína denominada AlkA. La expresión heteróloga de dicha proteína en *S. coelicolor* condujo a la producción de alquilresorcinoles con actividad antioxidante.

Agradecimientos. A PAPIIT (IN202216), DGAPA UNAM; al programa NUATEI del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; quienes proporcionaron los recursos para desarrollar esta investigación. A M. y M. Bibb del John Innes Centre, Norwich, UK, quienes donaron amablemente la cepa de *Streptomyces coelicolor* M1152.

Bibliografía.

- (1) Gomez-Escribano JP & Bibb M (2011). *Microb Biotechnol.* 4(2): 207-215.
- (2) Rutledge PJ & Challis GL (2015). *Nat Rev Microbiol.* 13(8):509-23.
- (3) Centeno-Leija S *et al.* (2016). *Genome Announc.* 4(2), e00164-16.
- (4) Weber T *et al.* (2015). *Nucleic Acids Res.* 43(W1), W237-W243.
- (5) Huang J *et al.* (2005). *Mol Microbiol.* 58(5), 1276-1287.

