

Caracterización de genes implicados en la biosíntesis de estreptolidigina

Dina H. Horna, Cristina Gómez, Carlos Olano Alfredo F. Braña, Carmen Méndez y José A. Salas

Introducción

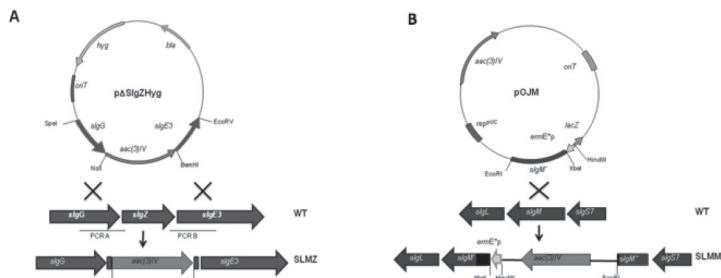
La estreptolidigina es un antibiótico perteneciente a la familia de los ácidos tetrámicos (Schobert y Schlenk, 2008) producido por *Streptomyces lydicus*. Estudios biosintéticos usando precursores marcados han demostrado la incorporación de propionato, acetato, metionina y ácido glutámico (probablemente en forma de metil-aspartico) en la formación de la estructura principal del antibiótico (Chen y Harrison, 2004; Chen *et al.*, 2006). Estos estudios apuntan a un sistema híbrido policétido sintasa-sintetasa de péptidos no ribosomales para la biosíntesis de estreptolidigina, lo cual se ha confirmado con el reciente aislamiento y caracterización del agrupamiento génico responsable de la biosíntesis del antibiótico (Olano *et al.*, 2009). Dentro de la ruta se han identificado genes encargados de la regulación y secreción del antibiótico y otros genes que codifican proteínas involucradas en el aporte y modificación final del precursor aminoacídico. En esta comunicación se presentan los experimentos de inactivación y expresión de los genes *slgZ* y *slgM*, para demostrar o comprobar su participación en la biosíntesis del antibiótico estreptolidigina.

Materiales y métodos

Con el fin de demostrar las funciones de *slgZ* y *slgM* en la biosíntesis de estreptolidigina, se inactivaron independientemente ambos genes en *S. lydicus*. Para la delección de *slgZ*, una asparagina sintetasa putativa, se amplificaron dos fragmentos de ADN de 1 kb por PCR del cósmido Slg4A8, usando los oligonucleótidos HEI19/HEI20 (PCR A) y HEI21//HEI22 (PCR B) y clonados en el plásmido pEFBAoriT, flanqueando el gen de resistencia a apramicina y posteriormente se subclonó el gen de resistencia a higromicina, obteniéndose el plásmido pDslgZHyg. Esta construcción fue introducida en *S. lydicus* dando origen al mutante SLMZ por reemplazamiento génico (figura 1a).

La inactivación de *slgM*, una metiltransferasa putativa, fue realizada por amplificación de un fragmento de 900 pb por PCR del cósmido Slg4A8, usando los oligonucleótidos Cris15 y Cris16. Este fragmento fue clonado en el vector pOJ260P originando el plásmido pOJM, posteriormente dicho plásmido fue introducido en *S. lydicus*, obteniendo el mutante SLMM (figura 1b).

Figura 1
SLMZ (a) y SLMM (b)



Resultados

SLMZ acumula un nuevo compuesto con un tiempo de retención de 6.1 min al ser analizado por UPLC (figura 2a) a diferencia de la estreptolidigina que presenta un tiempo de retención de 6.4 (figura 2b), la elucidación de la estructura de dicho compuesto nos permite identificarlo como estreptolidigina B, un derivado de estreptolidigina con modificación en la cadena lateral que deriva de glutamato en vez de 3 metil aspártico.

SLMM no demostró producir estreptolidigina ni otros compuestos derivados (figura 2c), resultado que se corrobora con los obtenidos al inactivar *lipMt* del cluster de biosíntesis de lipomicina.

El efecto de los genes encargados del aporte y modificación del aminoácido, luego de ser evaluados mediante su expresión en la cepa salvaje de *S. lydicus*, se observó que la producción de estreptolidigina en *S. lydicus* que albergan los plásmidos control presentan una variación del 60%, observándose mejor producción en *S. lydicus* que contiene a pEM4HT. La producción de estreptolidigina se ve aumentada 2 y hasta 3 veces comparada con el control. La expresión de *slgE* usando pEM4TslgZ incrementa en un 100% la producción de estreptolidigina.

Figura 2
SLMZ (a), estreptolidigina (b) y SLMM (c)

