

ACTIVIDAD DE LA ESTRICTOSIDINA SINTASA Y 1-DEOXI-D-XILULOSA-5 FOSFATO SINTASA EN RAÍCES DE *UNCARIA TOMENTOSA* PRODUCTORAS DE ALCALOIDES OXINDÓLICOS

Yeni Santos Mendoza, Ana C. Ramos Valdivia. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN, Av. IPN 2508. México, D. F. 07360. E-mail: aramos@cinvestav.mx.

Palabras clave: *Estrictosidina sintasa*, *1-Deoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa*

Introducción. Dentro de la familia de las *Rubiáceas* se encuentra *Uncaria tomentosa* conocida como “Uña de gato”. Esta planta es productora de alcaloides oxindol-monoterpénicos (AOM), los cuales tienen propiedades farmacológicas, inmunoestimulantes y antitumorales, entre otras (1). En la ruta de biosíntesis de alcaloides indol-terpénicos destacan dos sintasas que pueden ser inducidas por estrés biótico (4), por lo que se ha propuesto que tienen una actividad reguladora. La Estrictosidina sintasa (STR, EC 4.3.3.2), condensa la triptamina y la secologanina (núcleo indólico y terpénico respectivamente) para formar la estrictosidina, precursor universal de los alcaloides indol-terpénicos. La 1-Deoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa, (DXS, EC 2.2.1.7) cataliza una importante reacción que une el metabolismo primario y secundario mediante la unión del piruvato y gliceraldehído-3-fosfato para formar el metileritritol 4-fosfato precursor del núcleo terpénico.

En este trabajo se establecieron las condiciones de ensayo de la actividad de STR y DXS, así como su medición en cultivos de raíces de *U.tomentosa* bajo un régimen de elicitación con ácido jasmónico (JA).

Metodología. Para los experimentos de la actividad enzimática, se inocularon raíces de *U. tomentosa* al 2%(pf), en 20 matraces con 100 ml de medio Murashige y Skoog, sin reguladores de crecimiento y sacarosa al 3% (p/v). Luego de 12 días de crecimiento de las raíces; a 10 matraces, se les adicionó una concentración final 100 μ M de JA y los otros 10 se tomaron como controles. Cada 3er. día se realizó el extracto protéico de las raíces de cultivos controles y elicitados. Los extractos crudos se realizaron a partir de 1 g de biomasa con buffer Tris-HCl pH 7 50mM, 2mM Ditiotretitol y 1mM PSMF. El ensayo de actividad de STR fue realizado según (2) y la estrictosidina fue cuantificada por HPLC (1). Para la inhibición de la actividad de la Estrictosidina glucosidasa (SG) que pudiera transformar la estrictosidina formada, se adición al ensayo de STR, 200mM de gluconolactona. En el ensayo de DXS, la separación y detección del producto fue por TLC y densitometría (3). La extracción y análisis de alcaloides por HPLC fue realizado de acuerdo a (1).

Resultados y discusión. La actividad de STR fue medida durante 12 días posteriores a la adición de JA (Fig.1). Al inhibir la enzima SG, la actividad de STR se incremento 10 veces (2.3 a 12 pkat/mg) tal como ocurre en otras especies (4) tanto en cultivos controles como

elicitados (Fig. 1). En ambos casos la mayor actividad de STR se encontró a los 9 días, coincidiendo con el mayor pico de producción de alcaloides oxindólicos totales en cultivos elicitados (Fig. 1C). En el caso de DXS, la actividad fue mayor en los cultivos elicitados.

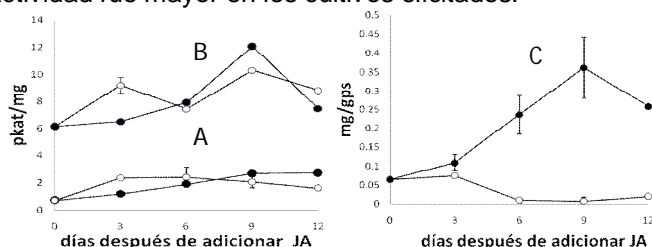


Fig. 1. Actividad de STR sin inhibidor de SG (A) STR con inhibidor de SG (B) y AOM totales (C) en cultivos controles (o) y con adición de 100 μ M JA (●).

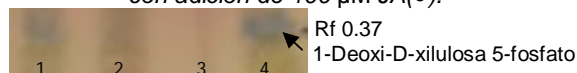


Fig. 2. Actividad de DXS por TLC en raíces de *U. tomentosa*. 1,2 control, 3 blanco de sustrato y 4 elicitado.

Conclusiones. Para la actividad de STR es conveniente adicionar inhibidor de la SG. No hubo mayor diferencia de STR en los cultivos controles y elicitados mientras que la DXS, presentó una mayor actividad en elicitados

Agradecimiento. Al CONACyT por el apoyo al trabajo de tesis de maestría No. 227414.

Bibliografía. 1. Luna-Palencia, G.R., Cerda-García-Rojas, C.M., Rodríguez-Monroy, M., Ramos Valdivia, A.C. (2005). Influence of auxins and sucrose in monoterpenoid oxindol alkaloid production by *Uncaria tomentosa* cell suspension cultures. *Biotechnol. Prog.* 21:198-204.

2. Pennings, M.J.E, Van den Bosch, A.R., Van der Heijden, R., Stevens, H.L., Duine, A.J., Verpoorte, R., (1989). Assay of strictosidine synthase from plant cell cultures by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 176: 412-415.

3. Lois L.M., Campos, N., Putra S. R., Danielsen K., Rohmer, M., Boronat, A. (1998), Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:2105-2110.

4. Geerlings, A., Hallard, D., Caballero, M. A., Cardoso, L. I., Heijen van der R., Verpoorte, R. (1999), Alkaloid production by a *Cinchona officinalis* *Ledgeriana* hairy root culture containing constitutive expression constructs of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase cDNAs from *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep.* 19:191-196.