

CLONACION Y EXPRESIÓN DE LA ANTRANILATO DIOXIGENASA DE *Pseudomonas aeruginosa* en *Escherichia coli*.

Luis G. Treviño, Georgina Hernández, Francisco Bolivar y Guillermo Gosset. Instituto de Biotecnología Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, UNAM. Av. Universidad 2001. Chamilpa, Cuernavaca, Mor., CP 62210, México.
Fax (777) 3 17 23 88. e-mail: gosset@ibt.unam.mx, gerardo@ibt.unam.mx.

Palabras clave: catecol, antranilato dioxigenasa, Pseudomonas aeruginosa

Introducción. Una de las herramientas más empleada para la producción de compuestos orgánicos de interés comercial en *E. coli* es la manipulación de sus vías metabólicas mediante la expresión de genes de otros microorganismos en este hospedero. El catecol es un compuesto de interés comercial debido a que puede ser utilizado como intermediario para la biosíntesis de nuevos productos orgánicos de alto valor agregado. En *Acinetobacter* sp. ADP1 este compuesto puede generarse a partir del antranilato, que es un producto de la degradación de los aminoácidos aromáticos, mediante la antranilato dioxigenasa que esta constituida por tres subunidades: la dioxigenasa AntA, la dioxigenasa AntB y una reductasa (AntC) (1).

El objetivo del presente trabajo fue la clonación, expresión, y caracterización en *E. coli* de los genes *antABC* de *Pseudomonas aeruginosa* que codifican para una probable antranilato dioxigenasa.

Metodología. Se utilizó la secuencia reportada de los genes *antABC* de *P. aeruginosa* para amplificar mediante PCR estos genes a partir de ADN total. Clonamos el producto de PCR obtenido en el plásmido pTRC99A, (2) para que la expresión de estos genes quedara bajo el control del promotor *trc* que es inducido por IPTG. Esta construcción se denomina pTRC-ant3 (Fig. 1). Las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo fueron la DH5 α como hospedera del plásmido pTRC-ant3 y la W3110 como cepa productora de catecol. Para visualizar la producción de catecol se utilizó el plásmido pACYC-XylE (Fig. 1) que contiene el gen *xylE* que codifica para una catecol dioxigenasa que corta en posición *meta* el anillo aromático del catecol generando el compuesto ácido *cis*, *cis*-mucónico- α -semialdehído que es de color amarillo. Para los ensayos de producción de catecol se utilizó M9-glucosa suplementado con ampicilina 200 μ g/ml, IPTG 0.1 mM y antranilato 2.5mM. La desaparición de antranilato y la producción de catecol se cuantificó por HPLC (1).

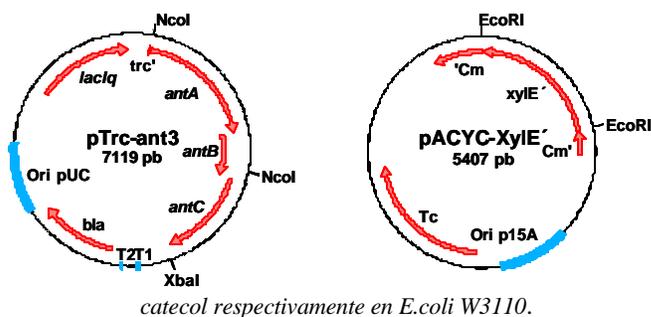
Resultados y discusión. La cepa de *E. coli* W3110 transformada con el plásmido pTrc-ant3 y sus respectivos controles se sembraron en placas de LB que contenían IPTG y antranilato. Las transformantes presentaron un fenotipo de pigmentación café debido a la oxidación espontánea del catecol producido. Las cepas control no presentaron este fenotipo.

Además confirmamos la generación del catecol por HPLC y mediante la producción del ácido *cis*, *cis*-muconico- α -

semialdehído en una cepa que contenía los plásmidos pTrc-ant3 y pACYC-XylE (Fig.1).

En el Cuadro 1 podemos apreciar la conversión del antranilato a catecol a las 24 horas de incubación. La producción teórica de catecol a partir de 343 mg/l de antranilato (2.5mM) es de 275 mg/l.

Fig. 1. Plásmidos utilizados para la producción y cuantificación de



Cuadro 1. Producción de catecol a partir de antranilato en diferentes cepas de *E.coli* W3110 después de 24 h de cultivo.

Plásmido	Antranilato (mg/l)	Catecol (mg/l)
pTRC99A	343	0
pTRC-ant3	15	263

Conclusiones. Se estableció que los genes homólogos a *antABC* de *Pseudomonas aeruginosa* codifican para una antranilato dioxigenasa. Además, estos genes están agrupados formando un operon.

La utilización de un promotor fuerte permitió la expresión adecuada de estos genes en *E. coli* debido a que la conversión de antranilato en catecol en medio mínimo es cercana al 100% del teórico.

Agradecimiento. A CONACyT por el apoyo económico de este trabajo como parte del proyecto NC-230.

Bibliografía.

- Bundy, B, Campbell, A and Neidle, E. (1998). Similarities between the *antABC*-encoded anthranilate dioxigenase and the *benABC*-encoded benzoate dioxigenase of *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *J. Bacteriol.* 180 (17): 4466-4474
- Amann, E, Ochs, B and Abel, K. (1988). Tight regulated *tac* promotorvectors useful for the expresión of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 69: 301-315.

