



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## Caracterización funcional de la MtKO de *Montanoa tomentosa*, usando *Saccharomyces cerevisiae* como sistema de expresión proteica.

Nemesio Villa-Ruano<sup>a</sup>, Edmundo Lozoya-Gloria<sup>b</sup>, Martha Guadalupe Betancourt Jiménez<sup>b</sup>, Yesenia Pacheco-Hernández<sup>a</sup>, Nestor Hernández-Silva<sup>b</sup>, Erika Beatriz Lara-Zaragoza<sup>a</sup>, José Franco-Monsreal<sup>a</sup>,

<sup>a</sup> Instituto de Investigación sobre la Salud Pública. Licenciatura en Nutrición. Universidad de la Sierra Sur, Guillermo Rojas Mijangos S/N. Ciudad Universitaria. Miahuatlán de Porfirio Díaz Oaxaca, México. CP. 70800.

<sup>b</sup> Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Irapuato. Carretera Irapuato-León, Km 9.6. CP 36000

email: [nvilla@unsis.edu.mx](mailto:nvilla@unsis.edu.mx)

Palabras clave: Zoapatle, MtKO, caracterización.

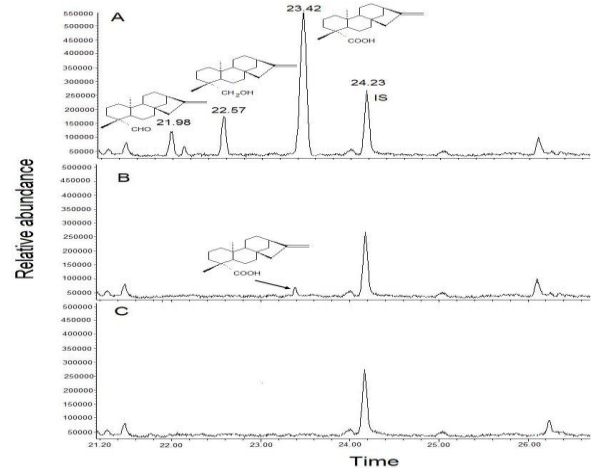
**Introducción.** El ácido *ent*-kaurenoico (KA) es un diterpeno tetracíclico de ocurrencia natural, valuado entre otras actividades, por su potente efecto hipoglucémico (Bresciani *et al.*, 2004). En las plantas de la familia *Asteraceae*, la tasa metabólica para la producción de KA es mucho más elevada que en plantas modelo comunes. Éste hecho podría estar correlacionado con la actividad de las enzimas *ent*-kaureno oxidasas (KO) que lo generan. A la fecha solo se ha demostrado someramente la función de una enzima proveniente de una *Asterácea* que corresponde a *Stevia rebaudiana* (Humphrey *et al.*, 2006). Aquí nosotros evidenciamos la funcionalidad de un ADNc aislado de *Montanoa tomentosa* (zoapatle), que codifica para una KO, denominado MtKO (Villa-Ruano *et al.*, 2010). Se muestran la caracterización bioquímica parcial de la proteína heteróloga MtKO, usando *Saccharomyces cerevisiae* como sistema de expresión.

El objetivo de este trabajo, fue iniciar con el proceso de obtención de una levadura genéticamente modificada que produzca el compuesto hipoglucémico KA a disposición y con miras al diseño de reactores biológicos.

**Metodología.** El ADNc completo de la MtKO del zoapatle, que cataliza la oxidación del *ent*-kaureno en ácido *ent*-kaurenoico mediante tres pasos intermedios de oxido-reducción, fue obtenido y almacenado físicamente por Villa-Ruano *et al.*, 2010. A partir de esta secuencia se obtuvieron distintas construcciones génicas, cuyo vector de expresión fue el PYEST52D (Invitrogen<sup>TM</sup>) conteniendo la secuencia de la MtKO. Las construcciones fueron insertadas por choque térmico en células INVSc1 de *S. cerevisiae*, previamente tratadas con acetato de litio. Las células fueron inducidas en medio mínimo con galactosa. Entonces la proteína heteróloga fue extraída por medio de fracciones microsomales y sometida a ensayos enzimáticos usando *ent*-kaureno como precursor inmediato. Los productos de la reacción fueron identificados y cuantificados por GC-MS. Una vez demostrada su actividad, se procedió a obtener los parámetros bioquímicos de la proteína heteróloga, así como a verificar el metabolismo *in vivo* del *ent*-kaureno.

**Resultados.** Los análisis moleculares de PCR en colonia de levadura, mostraron la presencia de las construcciones de expresión génica dentro de las células INVSc1 de *S. cerevisiae*. Algunas colonias positivas a la

reacción, fueron escogidas al azar e inducidas con galactosa. La transformación del *ent*-kaureno *in vitro* (fracciones microsomales) e *in vivo* (levadura intacta), fue demostrada por la identificación de los 3 productos de oxidación de la MtKO mediante GC-MS: *ent*-kaurenal, *ent*-kaurenol y KA (Figura 1A). El pH y temperatura óptimos de la enzima fue de 7.6 y 30 °C mientras que las constantes cinéticas aparentes fueron calculadas con valores  $K_{m,app}$  de 80.63  $\mu$ M y  $V_{max,app}$  de 31.80  $\text{nmol}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$ . Los parámetros cinéticos revelan una alta eficiencia enzimática, mientras que de manera particular el valor de la  $K_{m,app}$ , sugiere fuertemente una promiscuidad de la proteína MtKO. Los ensayos *in vivo* demostraron la absorción del *ent*-kaureno y la excreción del KA al medio de cultivo (Figura 1B).



**Fig. 1.** Perfil químico de los tres productos de oxidación de la MtKO a partir del *ent*-kaureno, utilizando microsomas (A), y células intactas INVSc1 (B). Reacciones con levadura sin transformar son mostradas (C). IS, ácido abiético como estándar interno.

**Conclusiones.** Se obtuvieron distintas líneas de levaduras transgénicas que metabolizan el *ent*-kaureno y lo transforman en el compuesto hipoglucémico KA. Se logró caracterizar parcialmente a la proteína MtKO.

**Agradecimientos.** CONACyT. Proyecto CB-2007/82884

### Bibliografía.

1. Bresciani LFV, Yunes RA, Bürguer C, De Oliveira LE, Bof KL, Cechinel-Filho. (2004). *Z Naturforsch* 59c: 229-232.
2. Humphrey TV, Richman AS, Menassa R, Brandle JE (2006). *Plant Mol Biol* 61 (1-2): 47-62
3. Villa-Ruano N, Betancourt-Jiménez MG, Lozoya-Gloria E. (2010). *Rev Lat Quim.* 38 (2): 21-28.