



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^a, Edmundo Lozoya-Gloria^b, Martha Guadalupe Betancourt Jiménez^b, Yesenia Pacheco-Hernández^a, Nestor Hernández-Silva^b, Erika Beatriz Lara-Zaragoza^a, José Franco-Monsreal^a,

^a 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.

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

email: 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 (InvitrogenTM) 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 μ 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).

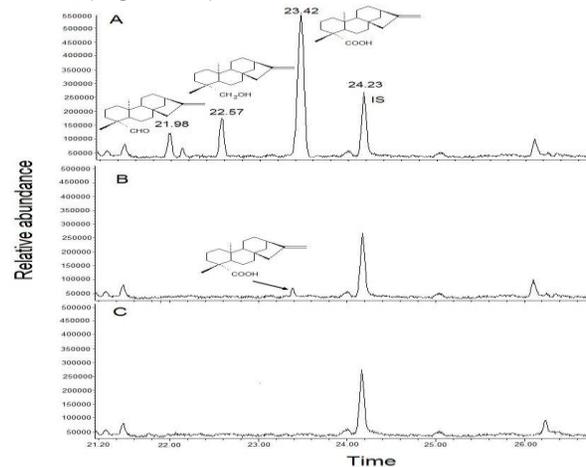


Fig. 1. Perfil químico de los tres productos de oxidación de la MtKO a partir del *ent*-kaureno, utilizando microsomas (A), y células intactas INVSc1 (B). Reacciones con levadura sin transformar son mostradas (C). IS, ácido abiético como estándar interno.

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.