

UDP-glucosa esteroil glucosiltransferasas como blanco para aumentar la producción de esteroides bioactivos en planta

Ana Laura Valdez-Arellanes^a, Marín Torres-Esquivel^a, Marcos J. Guerrero-Muñoz^a, Albert Ferrer^{bc}, Teresa Altabella^{bd}, Karla Ramírez-Estrada^{a,b*}

^a Laboratorio de Metabolismo Celular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L., México.

^b Programa de Metabolismo e Ingeniería Metabólica, Centre de Reserca en Agrigenomica (CRAG) (CSIC-IRTA-UAB-UB) Barcelona, España.

^c Departamento de Bioquímica y Fisiología, Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación, Universidad de Barcelona, Barcelona, España.

^d Departamento de Biología, Sanidad y Medio Ambiente, Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación, Universidad de Barcelona, Barcelona, España.

*karla.ramirezst@uanl.edu.mx

Palabras clave: *Solanum lycopersicum*, fitosteroides conjugados, esteroides glucosilados, compuestos bioactivos de plantas, esteroid-glucosiltransferasas.

Introducción

El uso de plantas medicinales es una práctica que ha existido por cientos de años; sin embargo, los estudios sobre el metabolismo secundario vegetal han ido en constante aumento en los últimos 60 años. Las moléculas derivadas del metabolismo secundario, para el ser humano, representan una gran fuente de compuestos con actividad farmacológica. Los fitosteroides son un ejemplo de esto, los podemos encontrar en forma libre (FS), conjugados con ésteres (SE), glucosilados (SG) o acetil-glucosilados (ASG). Estos dos últimos han demostrado tener importantes efectos farmacológicos. Estudios recientes han observado que presentan propiedades antiinflamatorias, antibióticas (1) y anticancerígenas (2) así como efectos neuroprotectores en modelos de enfermedades neurodegenerativas (3). El cultivo *in vitro* de células vegetales y plantas constituye una potente tecnología para la producción de metabolitos secundarios vegetales; además la ingeniería metabólica (IM) puede contribuir positivamente a aumentar producción y variedad de estos compuestos. Este trabajo se enfocó en caracterizar enzimas involucradas en el metabolismo de los SGs de tomate, para que posteriormente puedan ser utilizadas para mejorar cultivos celulares o planta entera por IM y generar mejores producciones de fitoesteroides de interés.

Metodología

Los genes de tomate candidatos a codificar esteroid-glucosiltransferasas (SGT) se identificaron realizando una búsqueda en la base de datos Phytozome utilizando como base la secuencia aminoacídica de las SGTs de *A. thaliana*. Las secuencias codificantes de las SGTs de tomate (SISGT) fueron clonadas mediante el sistema Gateway[®] en el plásmido binario pEarley-Gate101 para generar fusiones C-terminal con la YFP. Las proteínas fusionadas se expresaron transitoriamente por agroinfiltración en plantas de *N. benthamiana*. Después de 3 días, el envés de las hojas fue infiltrado con yoduro de propidio (IP) y analizado por microscopía confocal de fluorescencia, el análisis de recuperación de la fluorescencia (FRAP) fue realizado según previamente se ha descrito (4). Los esteroides totales se extrajeron de las hojas agroinfiltradas con una mezcla de cloroformo/metanol, los SGs fueron purificados por TLC y cuantificados por GC-MS.

Resultados y discusión

Con el objetivo de caracterizar las enzimas que catalizan la glucosilación de esteroides en tomate y los genes que las codifican, se buscaron secuencias aminoacídicas con potencial actividad SGT en la base de datos de Phytozome, el análisis identificó 4 posibles candidatas; SISGT1-4. Las secuencias codificantes fueron clonadas para producir fusiones en C-terminal con la YFP. La expresión transitoria en *N. benthamiana* de las proteínas de fusión y posterior análisis por microscopía confocal y FRAP demostró que estas fusiones se encuentran localizadas en distinta proporción asociadas a la membrana y en citosol. Las proteínas SISGT-YFP, demostraron ser activas en un ambiente homólogo, pues aumentaron los niveles de SGs en las plantas agroinfiltradas de *N. benthamiana*.

Conclusiones

Se comprobó la actividad de 4 isoenzimas (SISGT1-4) de tomate. Las cuales se encontraron localizadas en citosol y membrana citoplasmática. Se demostró que dichas enzimas son capaces de ser activas en un sistema homólogo, por lo que pueden ser utilizadas para aumentar los niveles de SGs en cultivos vegetales o plantas.

Referencias

- 1.-Corrêa, G. M.; Gomes, V.; Costa, D. A.; Alois, D.; Martins, D. E. A.; Takahashi, J. A.; Fontoura, H. D. E. S.; Cara, D. C.; Flávio, A.; Alcântara, D. E. C. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2014**, 6 (6), 75–81.
- 2.-Bing Han, Pu Jiang, Wuyang Liu, Heshan Xu, Yuanfeng Li, Zhaoxing Li, Hang Ma, Y. Y.; Xuegang Li, and X. Y. *Agric. food Chem.* **2018**, 66, 6031–60441.
- 3.-Ji, Z.-H.; Xu, Z.-Q.; Zhao, H.; Yu, X.-Y. *Steroids* **2017**, 119, 31–35.
- 4.- Ramírez-Estrada, K., Altabella, T., Onrubia, M., Moyano, E., Notredame, C., Osuna, L., et al. (2016). *Plant Biotechnol. J.* 14, 85–96.