

83072

6
26

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MÉXICO
UACPyP - CCH
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

OBTENCION DE UN GEN DE LA FENILALANINA
AMONIO LIASA DE *Phaseolus vulgaris* var negro jamapa

Q.B.P. Beatriz Eugenia Lauría Baca

TESIS DE MAESTRIA
1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

OBTENCION DE UN GEN DE LA FENILALANINA AMONIO LIASA
DE *Phaseolus vulgaris* var negro jamapa

Trabajo presentado para aspirar al Grado de Maestro en Ciencias por la
Q.B.P. Beatriz Eugenia Lauría Baca.

Tutores:

Dr. Miguel Lara Flores
Departamento de Plantas.
Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. Agustín López-Munguía Canales
Departamento de Ingeniería.
Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México.

Cotutores:

Dr. Federico E. Sánchez Rodríguez
Departamento de Plantas.
Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. José Luis Ortega Carranza
Departamento de Plantas.
Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México.

Jurado:

Dr. Miguel Lara Flores.
Presidente.
Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México.

Dra. Adriana Ortiz López
Vocal.
Facultad de Química.
Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. Marco Antonio Villanueva Méndez
Secretario.
Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. Baltazar Becerril Luján
Suplente.
Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. Agustín López-Munguía Canales
Suplente.
Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México.

Verano de 1996

Cuando emprendas el viaje rumbo a Itaca
ruega que sea muy largo tu camino
y abunde en aventuras y en hallazgos.
Lestrigones y cíclopes no temas
ni te arredre la furia de Poseidón,
pues nada de esto encontrarás si tu pensar es
alto
y una noble emoción tus actos guía.

Lestrigones y cíclopes,
furioso Poseidón, no encontrarás
a menos que los lleves
en tu interior o tu alma los erija
para cerrarte el paso.

Ruega que sea muy largo tu camino,
haya muchas mañanas de verano
en que, lleno de gratitud y de gozo,
bajes a un puerto por primera vez
y te detengas en los centros fenicios,
a comprar cosas delicadas:
madreperla, coral, ébano y ámbar
los perfumes sensuales
y visites las ciudades egipcias
y te colmes con la sabiduría de los sabios.

No dejes de pensar jamás en Itaca.
El desembarco en ella es tu destino.
Pero nunca apresures la jornada:
mejor que se prolongue muchos años
y ya seas viejo al divisar la isla;
rico por lo ganado en el camino
sin esperar que te enriquezca Itaca
Ella te ha dado el prodigioso viaje;
sin la isla jamás habrías partido:
¿Ya qué mas puede darte?
Y si pobre la encontraras
no habrá engaño:
sabio como ya eres
con tu experiencia,
para entonces sabrás que significa Itaca.

Dieciocho poemas de Constantino Cavafis

*A mis padres, Alicia y Vicente,
binomio prodigioso
con profunda admiración y amor.*

El presente trabajo se efectuó en el marco del proyecto DGAPA IN-506594 en el Laboratorio del Dr. Miguel Lara Flores del Instituto de Biotecnología perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la asesoría de los Drs. Miguel Lara Flores y Agustín López-Munguía Canales.

La realización del presente trabajo fue posible gracias al apoyo recibido por parte del **Instituto Politécnico Nacional** a través del programa del COTEPABE. Así como al apoyo otorgado a través de las becas 83180 del CONACyT y de alimentación y Hospedaje.

RESUMEN

Resumen

La fenilalanina amonio liasa (PAL; EC 4.3.1.5) cataliza la reacción de desaminación de la fenilalanina dando como productos ácido transcinámico y amonio. La PAL es una enzima tetramérica, que posee una dehidroalanina en su sitio activo y no requiere de cofactores. Es además una enzima que, evolutivamente, no ha sufrido de muchas modificaciones, lo cual se manifiesta en la identidad existente a nivel de aminoácidos entre diferentes organismos (86%). No se ha descrito la existencia de esta en animales superiores. En hongos, levaduras y actinomicetos la PAL interviene en el catabolismo de la L-fenilalanina, en las plantas juega un papel central dentro del metabolismo secundario, canalizando el flujo de carbono hacia la formación de compuestos tales como lignina, cumarinas, flavonoides, fitoalexinas y antocianinas. En las dicotiledóneas la enzima es altamente específica actuando únicamente sobre la L-fenilalanina. La PAL de *Phaseolus vulgaris* ha sido ampliamente estudiada; está codificada por una familia de al menos 3 clases de genes no agrupados. Hasta el momento, se conocen totalmente las secuencias nucleotídica y de aminoácidos de las clases II y III, y el gen de la clase I está parcialmente secuenciado. El gen de PAL está constituido por dos exones separados por un intrón que difiere de tamaño y codifica para una proteína de 710 -712 a.a.

Por sus características, la PAL puede emplearse en una variedad de procesos tales como: la síntesis de L-fenilalanina y de aspartamo; la detección de fenilcetonuria y la obtención de alimentos libres de L-fenilalanina, la obtención de plantas con menor contenido de lignina y más resistentes a estrés ambiental.

La PAL que se han utilizado en los procesos industriales proviene básicamente de levaduras.

Actualmente, en *E. coli* se ha logrado la expresión de la PAL de perejil. La enzima expresada en este sistema parece tener una mayor actividad que la enzima obtenida de cultivos inducidos de células de perejil. La enzima de frijol, a nuestro parecer, ofrece propiedades cinéticas más atractivas que las enzimas clonadas hasta ahora, ya que la actividad específica final encontrada en hoja, después de la infección por un hongo patógeno, es mayor a la reportada en otros organismos. Por otra parte, la afinidad hacia la L-fenilalanina es de las mayores encontradas en la literatura y la acción que la enzima tiene sobre la tirosina es de las más bajas, lo que la hace ser candidata idónea en el proceso de formación de L-fenilalanina ó L-fenilalanina metilester con vías a la obtención de aspartamo y/o aplicarla en procesos de eliminación de este aminoácido en alimentos para fenilcetonúricos.

Es por ello que nos propusimos aislar uno de los genes de la PAL del frijol, con la idea de clonarlo en *E. coli* para lograr su sobreexpresión y explorar la posibilidad de utilizar esta enzima en los procesos antes señalados.

Resumen

En este trabajo se exploraron varias técnicas de aislamiento para la obtención de uno de los genes de la PAL de *P. vulgaris*. A través de nuestra investigación se logró establecer que es posible identificar la fenilalanina amonio liasa del frijol mediante anticuerpos anti-PAL obtenidos contra la enzima de la levadura *Rhodotorula glutinis*. Estos anticuerpos se utilizaron para efectuar una búsqueda del gen de la PAL en un banco de expresión obtenido a partir de nódulos de frijol de 15 días de edad. Fue necesario muestrear una población mayor de 300000 utp para localizar una placa positiva. Se amplificaron específicamente por PCR los exones de PAL2 del frijol, estos se utilizaron para buscar en el mismo banco de expresión logrando obtener una clona de tamaño suficientemente grande como para contener al gen. La clona aislada se caracterizó a través de una secuencia parcial y por un mapa de restricción, resultando pertenecer al grupo I. Este resultado nos indica que la PAL1 del frijol está presente en nódulos de frijol de 15 días de edad.

Se llevó a cabo la fusión de los exones de la PAL, mediante la amplificación por PCR, de manera inespecífica. Aún así se considera que este es el método de elección para la obtención de los genes de la PAL. Los exones de PAL2 se pueden utilizar como sondas para la búsqueda de genes homólogos y como marcadores del estado fisiológico de la planta, en estudios citológicos para la localización subcelular del metabolismo secundario en plantas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

Por la certidumbre de que son todos los que están, no así están todos los que son, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis amigos, compañeros de viaje.

Agradezco en forma muy especial a:

Miguel Lara y Agustín López.

Federico Sánchez y José Luis Ortega.

Adriana Ortíz, Baltazar Becerril, Marco Antonio Villanueva, Rosario Vera.

Enrique Merino, Alberto Camas, Ignacio Monje, Katty Juárez, Jorge, Jairo, Roberto, Osvaldo,

Gabriel, Paul, Eugenio, Raúl, Noemí, Laras's y López's.

Thelma Villegas, Salvador Sánchez, Corina, Mario González-Pacheco, Mario Alberto Rodríguez,

Dolores Pastrana, Rafael Arzate, Alicia Espinosa, Alejandra Hernández, Arturo y al Grupo de

Genética microbiana.

Geo y J.P., Naatig y Metzuma, Beto y Lorena, Gabriel y Maru, Emi y Jim,

Sonia, Miguel, Gaby, Luis, Juan Pablo, Lalo, Marfa Luisa, Jhonny y Jacqueline.

A mi grandiosa familia.

Max y Alma, Ety.

INDICE

INDICE

RESUMEN

AGRADECIMIENTOS

INDICE

LISTA DE FIGURAS TABLAS Y CUADROS

INTRODUCCION

MARCO TEORICO

- El metabolismo secundario en las Plantas
- El metabolismo fenilpropanoide
- Relación del metabolismo secundario con la vía del Shikimate

La fenilalanina amonio liasa

- Aspecto estructural de la fenilalanina amonio liasa
- Aspecto cinético de la reacción efectuada por la PAL
- Estructura y organización genética
- La expresión de la PAL
- La interacción Planta-microorganismo
- La PAL dentro del catabolismo de la L-fenilalanina en microorganismos
- Expresión de la PAL en *Escherichia coli* y *Sacharomyces cereviceae*
- Aplicaciones potenciales de la PAL
- Perspectivas

ANTECEDENTES

- La PAL en el frijol
- Estructura y organización de la PAL del frijol
- Estudio con el promotor de gPAL2 del frijol

JUSTIFICACION

OBJETIVO

MATERIAL Y MÉTODOS

- MATERIAL BIOLÓGICO
 - Material vegetal
 - Cepas bacterianas, plásmidos y bacteriófagos
 - Banco de expresión
 - REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO
 - Reactivos
 - Medios de cultivo
 - METODOLOGÍA EMPLEADA
 - Obtención de hipocotilos
 - Inducción de la PAL con luz ultravioleta
 - Obtención de DNA y RNA de *Phaseolus vulgaris* var negro jamapa
 - Obtención de RNA total enriquecido en mRNA de la PAL
 - Obtención de DNA de *Phaseolus vulgaris* var negro jamapa
 - Preparación de extracto crudo de hipocotilos de frijol
 - Determinación de la concentración de proteínas
 - Obtención de una sonda específica para la PAL y obtención del gen de la PAL
 - Diseño de oligonucleótidos
 - Condiciones de la reacción de amplificación por PCR
 - Obtención del gen completo mediante la fusión de fragmentos traslapantes
-

INDICE

- Búsqueda en el banco de cDNA obtenido a partir de nódulos de *Phaseolus vulgaris* de 15 días de edad
- Hibridación del tipo *Southern blot* y *Northern blot*
- Hibridación del tipo *Southern blot*
- Hibridación del tipo *Northern blot*, modalidad en rendija (*slot blot*)
- Determinación de la secuencia nucleotídica
 - Técnicas electroforéticas
 - Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes (PAGE-SDS)
 - Electroforesis de DNA
- Obtención de anticuerpos policlonales anti-PAL
- Inmunodetección de la PAL en experimentos del tipo *Western blot*

RESULTADOS

- Ensayo de la especificidad de los anticuerpos dirigidos contra la PAL de R. glutinis y purificación de los mismos
- Inmunoselección de la PAL en un banco de expresión de cDNA proveniente de nódulos de frijol de 15 días de edad
- Alineamiento de las secuencias de la PAL
- Obtención de una sonda para la identificar la PAL utilizando el método de amplificación por PCR
- Búsqueda de los genes de la PAL en el banco de expresión λ zap con la sonda de PAL obtenida por PCR
- Reacción de fusión de los exones de PAL2 mediante amplificación por PCR

DISCUSION

CONCLUSION

BIBLIOGRAFIA

LISTA DE FIGURAS, TABLAS
Y CUADROS

LISTA DE FIGURAS

Página	FIGURA
3	Figura 1. Metabolismo fenilpropanoide. Se representan las reacciones que dan lugar a los diferentes metabolitos derivados del grupo fenilo partiendo de la L-fenilalanina. La enzima que vincula el metabolismo primario al metabolismo secundario (primer enzima de la vía) es la fenilalanina amonio liasa (PAL). Adaptado de Dixon, 1995.
6	Figura 2. Inducción del metabolismo fenilpropanoide debido a la acción de diferentes factores ambientales. Para cada inductor se indican los principales metabolitos que se sintetizan debido a su acción. Adaptado de Dixon, 1995.
16y 17	Figura 3a. Mecanismo de reacción propuesto por Havir en 1968. En él la reacción involucra un intermediario carbaniónico enzima-carbanión. A, grupo ácido; B, grupo básico. Adaptado de Havir, 1968b. Figura 3b. Mecanismo de reacción propuesto para la fenilalanina amonio liasa en el que la dehidroalanina promueve un ataque electrofílico al fenilo. E, enzima; S, substrato; P, producto. Adaptado de Schuster, 1995.
43	Figura 4. Esquema de la localización de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los exones de la PAL del frijol. Se indica la secuencia de gPAL2 y la correspondiente al oligo. Los oligonucleótidos de los extremos contienen sitios de restricción [PAL48 (BamH1) y PAL2215 (EcoR1)]. Los oligonucleótidos centrales contienen una cola correspondiente a la secuencia del extremo del otro exón (PAL463 y PAL380).
50	Figura 5. Representación esquemática de la estrategia seguida para obtener el gen de la PAL de <i>P. vulgaris</i> a expresarse en <i>E. coli</i> .
51	Figura 6. Ensayo del reconocimiento de la PAL de <i>S. pararoseus</i> . Se efectuó una prueba inmunológica <i>western blot</i> utilizando los anticuerpos dirigidos contra la PAL de <i>R. glutinis</i> (dilución 1:1000). Carril 1, marcador de peso; carril 2, 0.5µg de PAL <i>S. pararoseus</i> recién purificada (F102); carril 3, 0.5 µg de PAL <i>S. pararoseus</i> recién purificada (F103).
52	Figura 7A. Ensayo del reconocimiento de la PAL en extracto crudo de frijol, proveniente de hipocotilos inducidos. Se efectuó un ensayo inmunológico del tipo <i>western blot</i> utilizando los anticuerpos dirigidos contra la PAL de <i>R. glutinis</i> (dilución 1:1000) en el cual es posible observar que los anticuerpos contra la PAL de <i>R. glutinis</i> son capaces de reconocer a las enzimas del frijol y <i>S. pararoseus</i> . Carril 1, marcador de peso; carril 2, extracto proteico de frijol (20µg); carril 3, proteína comercial de <i>Rhodotorula glutinis</i> (0.5 µg); carril 4, proteína purificada de PAL <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (0.5 µg de F102). 7B. Representación esquemática de 7A resaltando las bandas observadas.

LISTA DE FIGURAS

Página	FIGURA
3	Figura 1. Metabolismo fenilpropanoide. Se representan las reacciones que dan lugar a los diferentes metabolitos derivados del grupo fenilo partiendo de la L-fenilalanina. La enzima que vincula el metabolismo primario al metabolismo secundario (primer enzima de la vía) es la fenilalanina amonio liasa (PAL). Adaptado de Dixon, 1995.
6	Figura 2. Inducción del metabolismo fenilpropanoide debido a la acción de diferentes factores ambientales. Para cada inductor se indican los principales metabolitos que se sintetizan debido a su acción. Adaptado de Dixon, 1995.
16y 17	Figura 3a. Mecanismo de reacción propuesto por Havir en 1968. En él la reacción involucra un intermediario carbaniónico enzima-carbanión. A, grupo ácido; B, grupo básico. Adaptado de Havir, 1968b. Figura 3b. Mecanismo de reacción propuesto para la fenilalanina amonio liasa en el que la dehidroalanina promueve un ataque electrofílico al fenilo. E, enzima; S, sustrato; P, producto. Adaptado de Schuster, 1995.
43	Figura 4. Esquema de la localización de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los exones de la PAL del frijol. Se indica la secuencia de gPAL2 y la correspondiente al oligo. Los oligonucleótidos de los extremos contienen sitios de restricción (PAL48 (BamH1) y PAL2215 (EcoR1)). Los oligonucleótidos centrales contienen una cola correspondiente a la secuencia del extremo del otro exón (PAL463 y PAL380).
50	Figura 5. Representación esquemática de la estrategia seguida para obtener el gen de la PAL de <i>P. vulgaris</i> a expresarse en <i>E. coli</i> .
51	Figura 6. Ensayo del reconocimiento de la PAL de <i>S. pararoseus</i> . Se efectuó una prueba inmunológica <i>western blot</i> utilizando los anticuerpos dirigidos contra la PAL de <i>R. glutinis</i> (dilución 1:1000). Carril 1, marcador de peso; carril 2, 0.5µg de PAL <i>S. pararoseus</i> recién purificada (F102); carril 3, 0.5 µg de PAL <i>S. pararoseus</i> recién purificada (F103).
52	Figura 7A. Ensayo del reconocimiento de la PAL en extracto crudo de frijol, proveniente de hipocotilos inducidos. Se efectuó un ensayo inmunológico del tipo <i>western blot</i> utilizando los anticuerpos dirigidos contra la PAL de <i>R. glutinis</i> (dilución 1:1000) en el cual es posible observar que los anticuerpos contra la PAL de <i>R. glutinis</i> son capaces de reconocer a las enzimas del frijol y <i>S. pararoseus</i> . Carril 1, marcador de peso; carril 2, extracto proteico de frijol (20µg); carril 3, proteína comercial de <i>Rhodotorula glutinis</i> (0.5 µg); carril 4, proteína purificada de PAL <i>Sporidiobolus pararoseus</i> (0.5 µg de F102). 7B. Representación esquemática de 7A resaltando las bandas observadas.

53	<p>Figura 8. Ensayo de reconocimiento de la PAL en nódulos de frijol de 15 días de edad. <i>Western blot</i> de la PAL de frijol utilizando anticuerpos contra la enzima de <i>R. glutinis</i> purificados (dilución 1:2.5). Se probaron diferentes concentraciones de extracto de nódulo de 15 días de edad. Carril 1, PAL de <i>S. paraseus</i> (0.5µg de F102); carriles 2-7, 9, 18, 36, 75, 150, 150µg de proteína total respectivamente; carril 8, marcador de peso molecular, carril 9, extracto celular de <i>E. coli</i>. Los carriles 7 y 8 fueron revelados con azul de coomassie.</p>
55	<p>Figura 9. Dendrograma que ilustra la relación entre las secuencias de la fenilalanina amonio liasa (PAL) de diferentes orígenes realizado con el programa <i>Geneworks</i>. La nomenclatura esta dada por el número de acceso en el GeneBank, en donde las claves son las siguientes: PALLY_RHORB, <i>Rhodotorula rubra</i>; PALLY_RHOTO, <i>Rhodospiridium toruloides</i>; PAL5_Lyces, Tomate; PALLY_TOBAC, Tabaco; PAL1_SOLTU, Papa; PALLY_IPOBA, Papa; PAL1_PETCR, Perejil; PAL1_PEA, Chicharo; PAL2_PEA, Chicharo; PALLY_MEDSA, Alfalfa; PAL1_SOYBN, Soya; PAL2_PHAVU, Frijol; PAL2_SOLTU, Papa; PAL3_PHAVU, Frijol; PAL1_PHAVU, Frijol; PALLY_ORYSA, Arroz.</p>
57	<p>Figura 10. Ensayo del reconocimiento de los mRNA de la PAL por los oligonucleótidos (PAL48 y PAL2215) en RNA total proveniente de hipocotilos tratados con luz ultravioleta y corte. Prueba de hibridación <i>northern blot</i> en la modalidad de rendija. Se colocaron diferentes concentraciones de RNA total obtenido de hipocotilos inducidos a las 0, 4.5 y 6 horas de inducción. A. Hibridación con el oligonucleótido PAL48. B. Hibridación con el oligonucleótido PAL2215.</p>
59	<p>Figura 11A. Electroforesis en agarosa 1% de los productos de amplificación por PCR. Carril 1 y 5, marcadores de peso (bacteriófago λ HindIII-EcoRI); carril 2 y 3, reacciones de fusión; carril 4 y 8, marcadores de peso (bacteriófago λ PstI); carril 6, amplificación del primer exón; carril 7, amplificación de segundo exón. 11B. Acentuación de la imagen de 11A para mostrar las bandas de interés. Las flechas señalan: a. Primer exón(450pb); b. Segundo exón(1850pb) y c. Producto de fusión (2300pb). MP, marcador de peso.</p>
60	<p>Figura 12. Mapa de restricción de las tres familias de genes para la PAL en el frijol.</p>
60	<p>Figura 13B. Electroforesis en gel de poliacrilamida 5% TBE de las digestiones del fragmento de 450pb (exón 1) y del fragmento de 1850pb (exón 2). Carril 1, 8 y 15, marcadores de peso molecular (bacteriófago λ Hind III-EcoRI); carril 2-7, fragmento de 450pb digerido con PvuII, NcoI, SacI, HindIII, KpnI y EcoRI respectivamente; carril 9-14, fragmento de 1850pb digerido con PvuII, NcoI, SacI, HindIII, KpnI y EcoRI respectivamente. 13B. Acentuación de la imagen presentada en 13A para mostrar las bandas de interés.</p>

62	Figura 14. Electroforesis de los plásmidos de las clonas obtenidas a partir del banco de expresión de nódulos de frijol de 15 días de edad utilizando como sonda el 2° exón de gPAL2. Los plásmidos se digirieron con las enzimas EcoRI y XhoI para liberar a los insertos. Carril 1, marcador de peso (bacteriófago λ PstI); carril 2, digestión del plásmido de la clona c9; carril 3, plásmido Bluescript pSK+; carril 4, digestión del plásmido de la clona c64; carril 5, degestión del plásmido de la clona c63-PAL.
62	Figura 15. Electroforesis en agarosa 1% y ensayo de hibridación del tipo <i>southern blot</i> de la clona c63-PAL. Panel A. carril 1, plásmido de c63-PAL digerido con EcoRI y XhoI; carril 2, plásmido de c63-PAL sin digerir; carril 3, plásmido Bluescript pSK+ linearizado; carril 4, marcador de peso (bacteriófago λ PstI). Panel B. b1. Electroforesis en agarosa 1% del plásmido de la clona c63-PAL digerido con EcoRI y XhoI; b2. Autorradiografía de la hibridación de (b1) utilizando como sonda el 2° exón de gPAL2.
63	Figura 16. <i>Southern blot</i> de los exones de gPAL amplificados y del plásmido de la clona c63-PAL. Electroforesis en agarosa al 1% . Del lado derecho se muestra la autorradiografía correspondiente a la electroforesis del lado izquierdo. Carril 1, marcador de peso (bacteriófago λ pstI); carril 2, fragmentos amplificados por PCR (450pb y 1850pb); carril 3 y 5, c63-PAL sin digerir; carril 4 y 6, c63-PAL (digerido con EcoRI y XhoI). El inserto de c63-PAL es mayor al fragmento de PAL de 1850pb.
64	Figura 17. Alineamiento de la secuencia nucleotídica parcial de c63-PAL y la secuencia de la región correspondiente en gPAL1. Las secuencias poseen un 95% de identidad. En la secuencia leída se encuentran los dos sitios de restricción para la enzima NcoI.

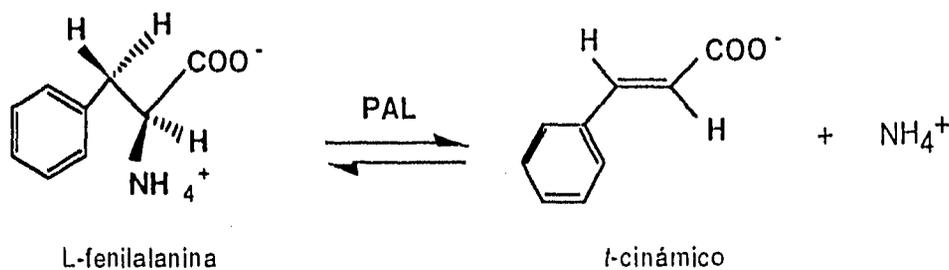
LISTA DE TABLAS Y CUADROS.

Página	TABLA O CUADRO
12	Tabla 1. Propiedades principales de la fenilalanina amonio liasa de diferentes organismos.
16	Tabla 2. Comparación relativa de los procesos de purificación reportados para la fenilalanina amonio liasa.
27	Tabla 3. Características de las isoformas de 77kDa encontradas en cultivos de células de frijol en suspensión. Km para la L-fenilalanina. Adaptado de Bolwell, 1985.
28	Tabla 4. Expresión diferencial de la fenilalanina amonio liasa en el frijol durante el desarrollo y como respuesta a diferentes factores ambientales. (niveles de transcrito) Adaptado de Liang, 1989.
35	Cuadro 1. Propiedades relevantes de las cepas de <i>Escherichia coli</i> y los plásmidos utilizados en el presente trabajo.

INTRODUCCIÓN

Introducción

La fenilalanina amonio liasa (PAL; EC. 4.3.1.5) fue originalmente aislada y caracterizada en cebada (*Hordeum vulgare*) en 1961 por Kokul y col. A partir de entonces, se ha descrito en una gran variedad de organismos (Emes, 1970; Camm, 1973; Jangaard, 1974; Fritz, 1976; Shetty, 1986). Esta enzima cataliza la reacción de desaminación de la L-fenilalanina dando como producto ácido transcinámico y amonio. La capacidad de la PAL para efectuar la síntesis de L-fenilalanina se demostró *in vitro* en 1968 (Havir, 1968). Sin embargo, *in vivo* esta reacción aún no se ha observado.



La PAL es una de las enzimas más estudiadas de las plantas, debido a que es la enzima que deriva la fenilalanina (metabolito primario) hacia la biosíntesis de los fenilpropanoides (metabolitos secundarios) (Figura 1).

Tanto la desaminación de la fenilalanina como su síntesis son procesos de interés comercial. Desde hace más de una década se propuso la utilización de esta enzima en procesos tales como el diagnóstico y el tratamiento de fenilcetonuria, así como para la producción de aspartamo (edulcorante no calórico). A nivel agrícola, se ha propuesto que el control de la expresión de la PAL puede contribuir a la producción de cultivos más resistentes a infecciones y a condiciones ambientales adversas, así como a la producción de forraje con un menor contenido de lignina.

A la luz de estas investigaciones, y buscando una enzima más específica, estable y activa, se pensó en la posibilidad de clonar la enzima de alguna fuente vegetal. Para ello se seleccionó a la PAL del frijol y se propuso obtener una cepa de *Escherichia coli* que la sobreprodujera.

El alcance del presente trabajo se limita a la obtención del gen de la PAL del frijol.

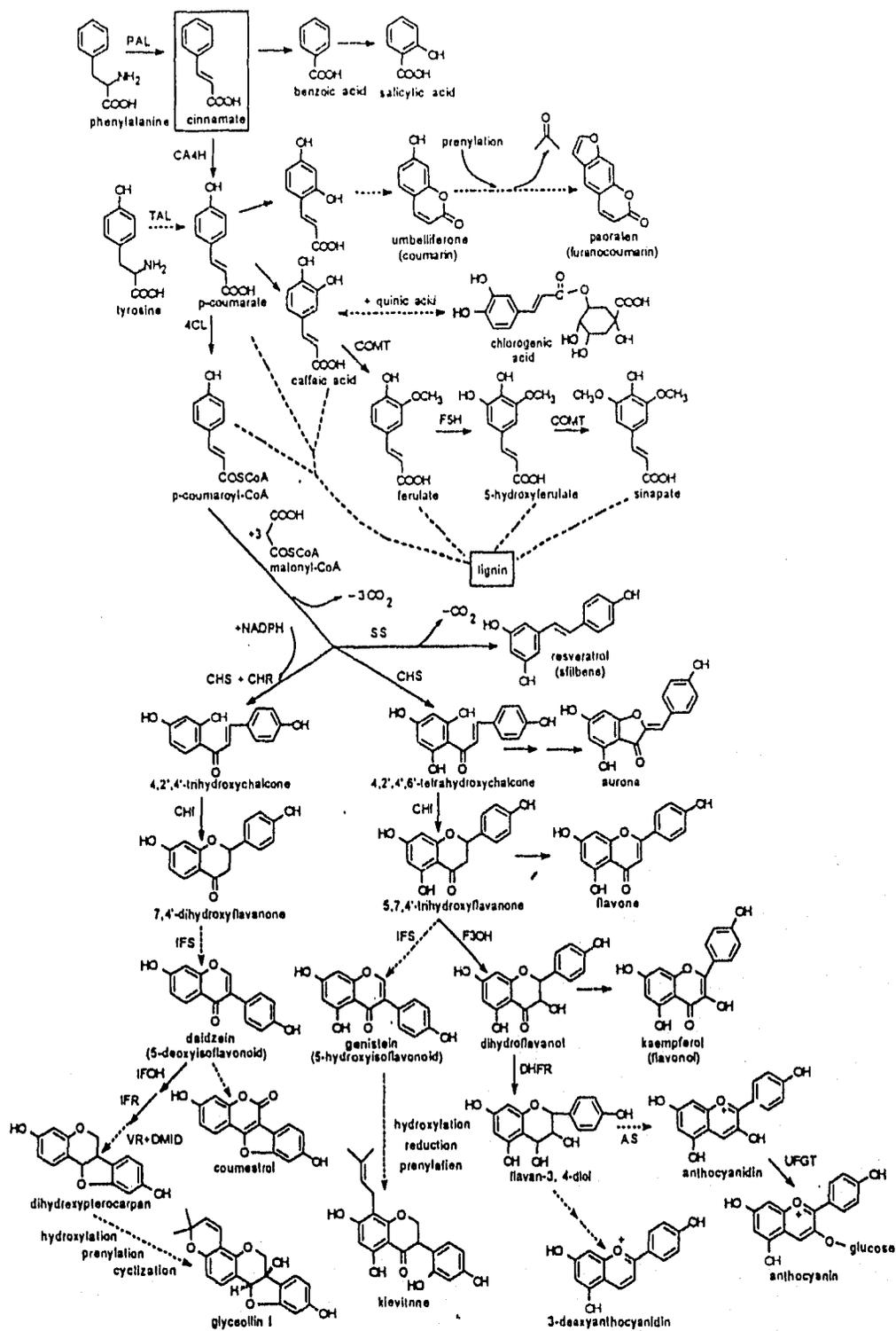


Figura 1. Metabolismo fenilpropanoide. Se representan las reacciones que dan lugar a los diferentes metabolitos derivados del grupo fenilo partiendo de la L-fenilalanina, la enzima que vincula el metabolismo primario al metabolismo secundario (primer enzima de la vía) es la fenilalanina amonio liasa (PAL). Adaptado de Dixon R.A., 1995.

MARCO TEÓRICO

1. EL METABOLISMO SECUNDARIO EN LAS PLANTAS.

A) El metabolismo fenilpropanoide.

Si consideramos que las plantas son organismos que para sobrevivir deben contender con su ambiente pues carecen de la posibilidad de desplazarse para evadir las condiciones adversas del medio, es fácil comprender la importancia que juega el que estas desarrollen mecanismos de defensa eficientes que les permitan responder a los cambios de manera rápida y oportuna. El metabolismo fenilpropanoide da como resultado una gran variedad de compuestos derivados del grupo fenilo (considerados dentro del metabolismo secundario) cuya principal actividad es participar, precisamente, en los mecanismos de defensa de la planta (Figura 2). Algunos intervienen en la defensa contra patógenos y herbívoros, mientras que otros juegan un papel importante como atrayentes de polinizadores, o como inhibidores de plantas que crecen a su alrededor. Algunos otros ayudan a contender con el medio al presentarse algún estrés ambiental ó funcionan como señales en la rizósfera (Peters, 1986) y pueden actuar internamente como moduladores de la acción y transporte de hormonas (citocinas y auxinas) (Binns, 1987; Jacobs, 1988; Dixon, 1995).

En la figura 1 se presenta la vía metabólica de los compuestos fenilpropanoides, la enzima que canaliza el carbono hacia esta variedad tan compleja de productos es la fenilalanina amonio liasa (PAL). A partir del ácido γ -cinámico se obtienen desde compuestos fenólicos simples (cumarinas) hasta polímeros complejos (lignina).

Dentro de esta vía las enzimas que se ha encontrado intervienen en su regulación son:

- La fenilalanina amonio liasa (PAL) que se induce por una gran gama de factores bióticos y abióticos.
- La chalcona sintasa (CHS) que se induce por acción de la luz ultravioleta y debido a la infección por hongos fitopatógenos.
- La chalcona isomerasa (CHI) que se induce por luz ultravioleta.

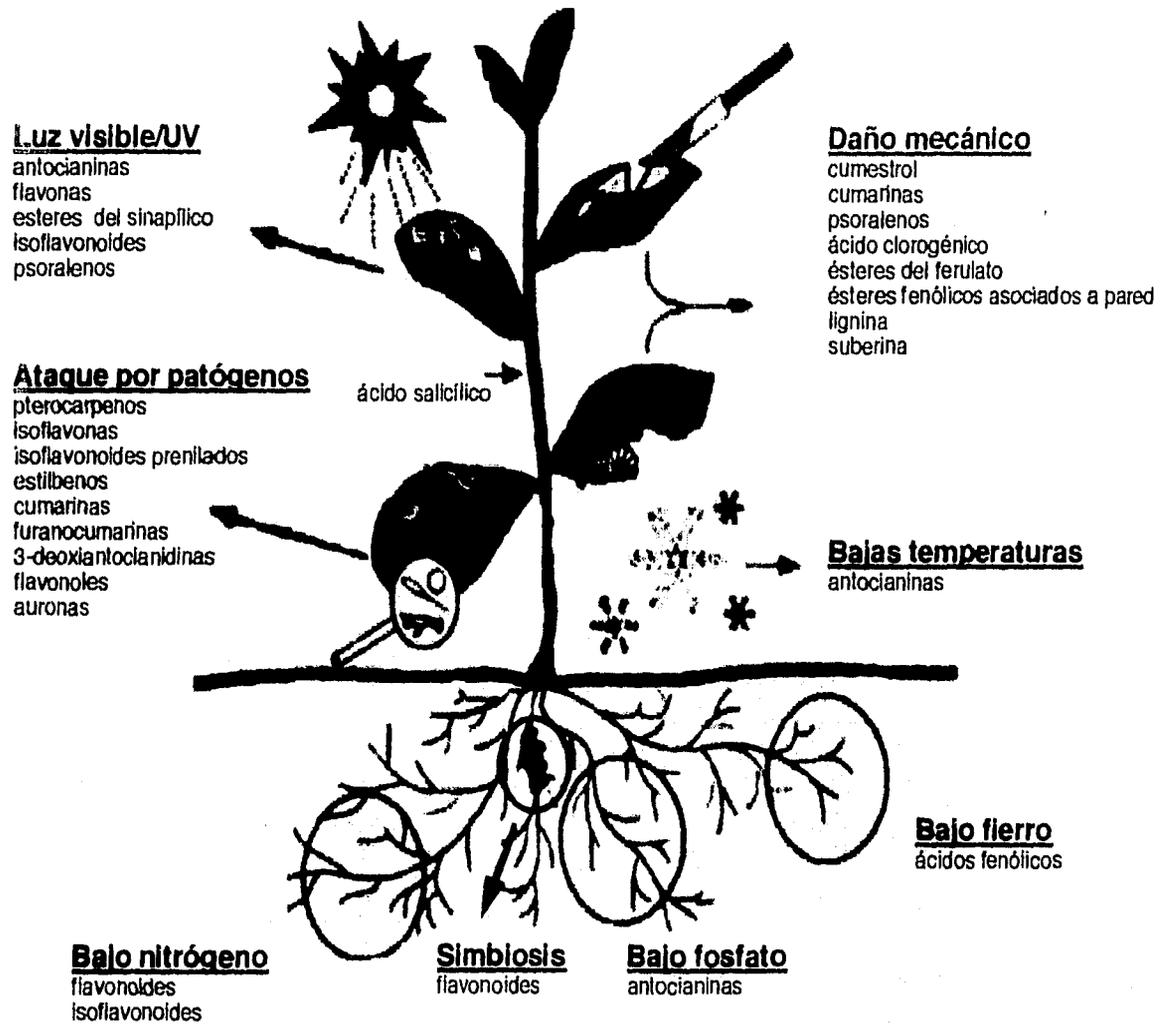


Figura 2. Inducción del metabolismo fenilpropanoide debido a la acción de diferentes factores ambientales. Para cada inductor se indican los principales metabolitos que se sintetizan debido a su acción.
 Adaptada de Dixon R.A., 1995.

A continuación se mencionan algunas características sobresalientes de algunos fenilpropanoides.

- Las cumarinas o sus derivados a menudo son extremadamente tóxicos para los animales, poseen efecto anticoagulante y estrogénico. Se ha observado su síntesis como respuesta a la invasión por patógenos.
- Las fitoalexinas tipo flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que resultan ser tóxicos para hongos, bacterias, nemátodos, insectos y virus. Afectan la respiración y el crecimiento de cultivos de células y tejidos vegetales, inhiben la germinación y retardan el crecimiento de la raíz. Las fitoalexinas del tipo fenilpropanoide se han encontrado en dicotiledóneas, monocotiledóneas y gimnospermas y al parecer están ausentes en plantas no vasculares (Smith, 1986).
- Los flavonoides actúan como protectores contra radiaciones UV (Calwell, 1983), como barreras químicas preformadas y como pigmentos en las flores, donde también actúan como atrayentes de polinizadores (Harborne, 1981; Brovillard, 1988). Adicionalmente, este grupo de compuestos, funcionan como compuestos de defensa contra patógenos, como repelentes de herbívoros (Heden, 1986), como señales moleculares en las interacciones planta-microorganismo (Hirsch, 1992).
- Los flavonoles son necesarios para que se lleve a cabo una polinización adecuada. Por ejemplo, en petunias el daño mecánico y la polinización inducen la formación de camferol y sus glicósidos (Mo, 1992).
- Las antocianinas son las encargadas de dar una gran gama de colores a las flores. Sin duda son un factor de atracción para los insectos polinizadores, favoreciendo además la dispersión de las semillas. Se localizan principalmente en pétalos, frutos, semillas, tallos y hojas. Adicionalmente, funcionan como protectores contra el daño causado por la luz ultravioleta. La síntesis de antocianinas es inducida por cambios en la temperatura (heladas), iluminación y baja concentración de fosfatos. Las antocianinas se acumulan en las vacuolas.
- La lignina es uno de los polímeros más abundantes en la tierra, está formada por una mezcla de fenilpropanoides simples (alcohol coniferílico, alcohol p-cumarílico y alcohol sinápico). Su composición varía de una especie a otra (Bernards, 1992; Whetten, 1995). La lignina sirve como matriz para los polisacáridos componentes de algunas paredes celulares de las plantas, además ayuda en la hidrofobicidad de la pared haciéndola más impermeable al agua y

provee de rigidez y resistencia adicional a la planta, de donde se deduce que las plantas vasculares terrestres debieron aparecer posteriormente a la evolución de la biosíntesis de este polímero. Los árboles también requieren de un gran soporte, se ha calculado que de un 15 a un 36% del peso seco de la madera corresponde a lignina (Sarkanen, 1971). Hay síntesis de lignina durante el desarrollo (en xilema) y en células afectadas por enfermedades ó daño mecánico. La demanda de lignina induce la expresión coordinada de la PAL y la 3-deoxy-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato sintasa (DHAP sintasa) (Hahlbrock, 1989).

Poco es lo que entendemos acerca de como se efectúa el vínculo entre la señal de percepción de un patógeno, la muerte de las células infectadas, la producción de señales endógenas y la inducción de una respuesta eficiente dirigida hacia el patógeno. Sin duda, este sistema integra a una serie de factores, de mecanismos de regulación intrínsecos de la planta, una cascada de eventos moleculares que desemboquen en una respuesta específica. En este sentido, Hahlbrock encontró en 1976, que las enzimas que intervienen en la síntesis de glicósidos flavonoides se inducen en una forma coordinada y propone a la PAL como el paso limitante para la vía entera. Posteriormente se asignó a la PAL como enzima clave en la biosíntesis de ácido clorogénico (Smith, 1981).

Aún cuando la regulación de las enzimas es coordinada, existe una respuesta específica de acuerdo al estímulo que recibe la planta, por ejemplo si el daño es debido a irradiación con luz ultravioleta, la respuesta será hacia la formación de flavonoides, mientras que una inducción por infección con un hongo patógeno da como resultado la síntesis de furanocumarinas (Hahlbrock, 1984).

Hay un interés muy marcado en la regulación de la biosíntesis de fenilpropanoides, tanto como modelo de estudio para entender como es el flujo de carbono hacia esta vía como para la identificación de moléculas clave para la manipulación biotecnológica de productos naturales de interés agrícola, médico e industrial. Se ha establecido que el metabolismo secundario, en plantas, normalmente se lleva acabo en el citoplasma. Sin embargo, existen informes sobre la asociación de la vía de los flavonoides con las membranas del retículo endoplásmico (Wagner, 1984). La presencia de complejos enzimáticos facilita la canalización de los productos intermediarios al sitio de la siguiente modificación sin que estos se liberen al citosol, lo cual permite un control más fino de la vía metabólica. Por ejemplo, la movilización del ácido *t*-cinámico entre la PAL y la cinamato 4-hidroxilasa, favorecería la existencia de regiones de mayor concentración de *t*-cinámico, lo que explicaría en gran medida, por que es posible que exista control por retroalimentación en la célula, aún cuando la concentración del ácido *t*-cinámico encontrada en extractos crudos no logre alcanzar los niveles requeridos para que este tipo de control se efectúe *in vitro*.

B) Relación del metabolismo secundario con la vía del shikimato.

La planta tiene que cubrir en primer instancia las necesidades energéticas que le permitan crecer y reproducirse. Sin embargo, el metabolismo secundario realmente juega un papel principal en el éxito que una especie vegetal tenga para sobrevivir en su ambiente, de tal forma que la respuesta hacia un estímulo determinado sea eficaz.

Al ser herida una planta, al presentarse una infección ó al haber un estrés ambiental hay incremento en la actividad de las vías glicolítica y pentosa fosfato con la finalidad de aumentar la producción de esqueletos de carbono para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, precursores de los metabolitos secundarios. La vía que deriva el flujo de carbono hacia estos compuestos es la vía del shikimato.

Esta ruta únicamente está presente en microorganismos y plantas. En las plantas superiores se encuentra localizada en plástidos y se ha propuesto su existencia en citoplasma como una vía secundaria. Bajo condiciones normales, se ha calculado que el 20% del carbono fijado por la planta fluye a través de esta vía (Haslam, 1993). Aquí se efectúa la condensación de la eritrosa 4 fosfato (E4P) (proveniente del ciclo de las pentosas) y el fosfoenolpirúvico (PEP) (proveniente de glicólisis) formando 3-deoxy-D-arabinoheptuloso 7 fosfato (DAHP) que después de varias modificaciones se transformará en corismato, último precursor común entre la tirosina, la fenilalanina y el triptófano. En los plástidos, la vía del shikimato, es la encargada de proveer de aminoácidos para la biosíntesis de proteínas; sin embargo, en el citoplasma además de cubrir esta necesidad los aminoácidos aromáticos se utilizan para efectuar la síntesis de productos naturales de importancia significativa para la planta como cumarinas, glicósidos cianogénicos, glucosinolatos, diversos compuestos flavonoides, isoflavonoides tipo fitoalexinas, estilbenos y ácido indol acético entre otros. Seguramente, uno de los primeros puntos de control de la síntesis de fenilpropanoides se encuentra asociado con la vía del shikimato, al respecto se han identificado como sitios de regulación los siguientes:

- La enzima DAHP sintasa, encargada de la primera reacción, es una metaloproteína. En las plantas se han distinguido 2 enzimas, una estimulada por Mn^{2+} (localizada en cloroplastos) y otra por Co^{2+} (citoplasmática) (Ganson, 1986); esta última posee una K_m para la eritrosa 4-fosfato un orden de magnitud mayor que la primera (Doong, 1992).

A diferencia de la DAHP proveniente de bacterias, en las plantas no se han logrado identificar especies que sean inhibidas por alguno de los tres aminoácidos aromáticos.

Al parecer existe un incremento en el flujo de carbono hacia la vía del shikimato como respuesta a ciertos estímulos, evidencia de esto es la acumulación de mRNA de la DAHP sintasa debido a la infección por hongos y al daño mecánico (Dyer,1989; Görlach, 1995); además, se sabe que plantas transgénicas que poseen un RNA antisentido de DAHP sintasa están dañadas en la síntesis de lignina (Jones,1995). Un punto de contacto entre los dos metabolismos es la inhibición de la DAHP sintasa debido al ácido caféico.

- El penúltimo paso de esta vía, catalizado por la enzima 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato (EPSP), es reversible. Esta reacción ha sido la más estudiada de la vía, pues sobre ella actúa el herbicida glifosato. En tomate su expresión es órgano específica (Görlach,1994).
- La corismato sintasa es la última enzima de la vía. Como cofactor la enzima requiere de FMNH₂. Al igual que la enzima anterior, su expresión es órgano específica en el tomate (Görlach,1994).

2. LA FENILALANINA AMONIO LIASA

A) Aspectos estructurales de la PAL.

La Fenilalanina amonio liasa ha sido aislada y purificada a homogeneidad electroforética en numerosos organismos (Camm, 1973; Jangaard, 1974; Bolwell, 1985), es una enzima tetramérica, de peso molecular entre 226 y 330kDa dependiendo del organismo que provenga (Tabla 1). Las subunidades de la PAL pesan entre 77 y 83kDa, aunque en algunos casos llega a pesar hasta 55kDa (Juárez, 1995).

En su sitio activo se ha descrito la existencia de un grupo prostético electrofílico, indispensable para la catálisis, correspondiente a una dehidroalanina; se cree que el papel de este residuo es el de formar un grupo más activo que el NH_3^+ . Por otro lado, la clonación de la PAL en *E. coli* sirvió para establecer que la formación de la dehidroalanina es mediante un proceso autocatalítico (Schulz, 1989; Orum, 1992). Efectuando mutagénesis sitio dirigida, en la PAL del perejil, se encontró que la serina 202 es el precursor de la dehidroalanina. Este aminoácido se ha conservado en todas las enzimas hasta ahora secuenciadas (Schuster, 1994).

La propiedad electrofílica de la dehidroalanina se demostró con el uso de varios agentes nucleofílicos, como son, el cianuro y el borohidruro de sodio (Havir, 1968). Estos compuestos causaron la inactivación irreversible de la enzima. A través de estudios de marcaje radiactivo, utilizando cianuro, se observó que la incorporación de la marca fue proporcional a la pérdida de la actividad (entre 1 y 2mol de PAL/mol de $^{14}\text{CN}^-$) hecho que llevó a establecer que la enzima posee dos sitios activos (Hodgins, 1971).

La presencia de una dehidroalanina dentro del sitio activo de una enzima únicamente se ha identificado en la PAL y la histidasa (HAL; histidina amonio liasa) por lo que se piensa que ambas enzimas tienen un origen común.

TABLA 1. Propiedades principales de la fenilalanina amonio liasa de diferentes organismos

Organismo	Peso molecular (kDa)	Km (mM)	pH ópt. de reacc.	Temperatura óptimo de reacc. (°C)	Referencia.
<i>Streptomyces verticillatus</i>	226	0.160	9.1	25	Bezanson, 1970
<i>Rhodotorula glutinis</i>	275	0.25	8.5	30	Hodgins, 1971
<i>Rhodospiridium torulaides</i>	---	2.1	9	20	Ogata, 1967
<i>Sporidiobolus pararoseus</i> NRRL-Y5484	300	0.314	8.5-9	65	Monje, 1995
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	330	1.25	8.8-9.2	---	Da Cunha, 1989
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	310	0.077 0.122 0.256 0.302	1 pI5.4 2 pI5.2 3 pI5.02 4 pI4.85	---	(40) Bolwell, 1985
<i>Petroselinum crispum</i>	330	0.240 0.032	---	--	Zimmermann, 1975
<i>Petroselinum crispum</i> Nym en <i>E. coli</i> *	300 400 *	0.024 0.015	8.5	58	Appert, 1994

B) Aspectos cinéticos de la reacción efectuada por la PAL.

La PAL posee una gran afinidad hacia la *L*-fenilalanina, sin embargo, en algunas especies también actúa sobre la *D*-fenilalanina, derivados de la *DL*-fenilalanina y la *L*-tirosina. La especificidad hacia la *L*-fenilalanina es mayor en plantas y dentro de ellas en las dicotiledóneas (Camín, 1973). La enzima no requiere de cofactores.

El mecanismo de reacción de la PAL fue inicialmente descrito por Havir y Hanson en 1968, usando la enzima proveniente de tubérculos de papa. Estos autores propusieron un modelo en el cual se plantea la presencia de un grupo carbonilo en el proceso catalítico y la formación de un intermediario enzima-amonio. Primero ocurre el ataque nucleofílico a la dehidroalanina por el grupo amino del sustrato (*L*-Phe) con la formación de un intermediario carbonil-amino que facilita el rompimiento del enlace N-C y da lugar a un segundo intermediario carbonil-amonio que por último es hidrolizado (Figura 3a).

En contraste, Schuster (1995) sugiere un mecanismo en el cual el paso crucial, es un ataque electrofílico del grupo prostético (dehidroalanina) a la posición 2 ó 6 del fenilo (Figura 3b). La propuesta involucra una acilación temporal (tipo Friedel-Crafts) del anillo fenólico. Este modelo está basado en los estudios efectuados con mutantes, en el codón 202, de la PAL del perejil. La mutante en la que se cambió la serina por una alanina y se inactivó con borohidruro de sodio (que causa 100% de inactivación) fue capaz de actuar sobre la *L*-4 nitrofenilalanina; al parecer, el grupo nitro pudo substituir parcialmente al grupo prostético.

Este último mecanismo parece ser el más apropiado, ya que la propuesta de Havir no explica claramente como se forma el intermediario carbaniónico involucrado (Schuster, 1995).

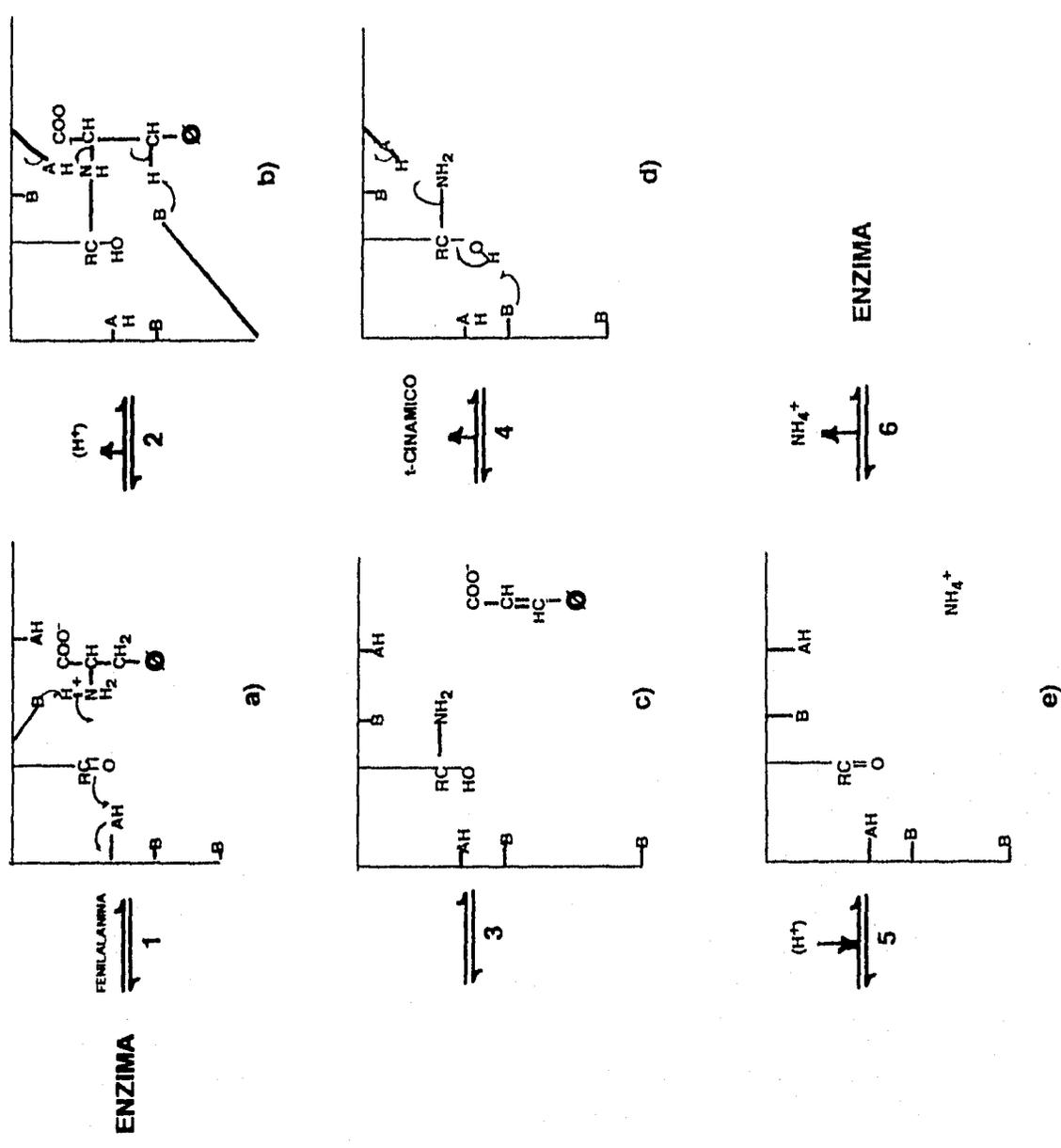


Figura 3a. Mecanismo de reacción propuesto por Havir en 1968.
 En él la reacción involucra un intermediario carbaniónico enzima-carbanión.
 A, grupo ácido; B, grupo básico

Adaptado de Havir, 1968b.

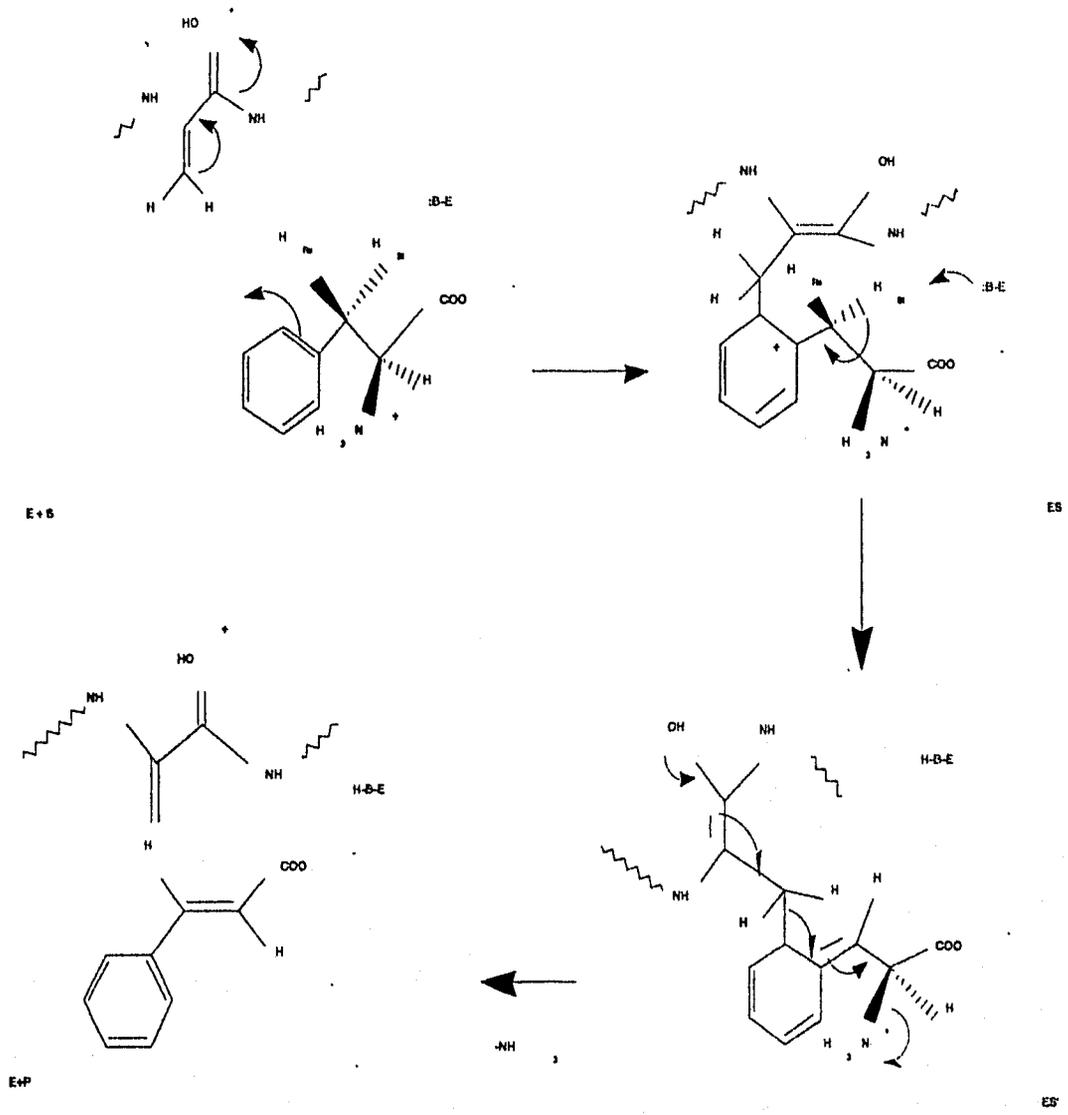


Figura 3b. Mecanismo de reacción propuesto para la fenilalanina amoníasa en el que la dehidroalanina promueve un ataque electrofílico al fenilo. E, enzima; S, substrato; P, producto. Adaptado de Schuster, 1995.

Marco teórico

El comportamiento cinético de la fenilalanina amonio liasa depende del organismo del cual se haya aislado, en algunos casos se observa una cinética clásica del tipo de Michaelis-Menten, en otros, inhibición competitiva por exceso de producto ó sustrato. Aún cuando la composición de la PAL no se ha establecido, es decir, no se sabe con certeza si hay formación de un heterotetrámero o si solamente se ensambla como homotetrámero. Se ha observado que la cinética generada por una enzima aislada mediante procesos en los que no se involucró la separación de las diferentes subunidades se desvía de la cinética tipo Michaelis-Menten, no así al separar las diferentes subunidades por su punto isoeléctrico (pI) (Bolwell, 1985). Por otro lado, los homotetrámeros de la PAL del perejil, expresados en *E. coli*, presentan esta misma cinética, a diferencia de las formas expresadas en la planta (Appert, 1994). En la papa al colocar D-fenilalanina (inhibidor competitivo) se observa también una cinética clásica de Michaelis-Menten, sugiriendo que este resultado es debido a interacciones alostéricas más que a la presencia de isoenzimas (Havir, 1981).

En la PAL la constante cinética K_m , para la L-fenilalanina es muy variable, lo que podría atribuirse a las condiciones en las que se hicieron las medidas. Sin embargo en el frijol, por ejemplo, se han obtenido diferentes K_m para cada una de las isoformas, lo que podría estar relacionado a la función que tiene esta enzima en las plantas. La Tabla 1 contiene algunas propiedades de la PAL aislada de diferentes organismos, en ella podemos observar, que en general, el pH óptimo de reacción de la enzima es básico y que la temperatura óptima de reacción varía y casi siempre es menor en la enzima proveniente de fuentes microbianas.

La actividad específica alcanzada es muy variable, al comparar los resultados de algunos procesos de purificación de la enzima proveniente de diversos organismos se observa que con la enzima de *P. vulgaris* se ha logrado obtener una mayor actividad específica (3.26 U mg^{-1}) y que esta ha sido menor en el caso de la de *S. verticillatus* ATCC13495 (0.02 U mg^{-1}) (Tabla 2). Al parecer, el uso de columnas de afinidad durante la purificación de la proteína fue un paso crucial para obtener dicha actividad específica (Da Cunha, 1989).

La PAL es una enzima regulable, los compuestos que ejercen una acción inhibitoria más potente sobre ella son los ácido *t*-cinámico y *p*-cumárico, sin embargo, algunos intermediarios y productos del metabolismo fenilpropanoide tienen la facultad de inhibir a la PAL, tal es el caso de los ácidos caféico y ácido gálico (Sato, 1982).

TABLA 2. Comparación relativa de los procesos de purificación reportados para la fenilalanina amonio liasa.

Organismo	Act. esp. Inicial	Act. esp. Final	F.P.	Etapas de Purificación.	Rendimiento (%)	Referencia
	(U mg ⁻¹ de proteína)					
<i>Streptomyces verticillatus</i> ATCC13495	0.0005	0.0201	40	5	9	Emes, 1970
<i>Streptomyces verticillatus</i>	0.0024	1.06	449	4	4.57	Juárez, 1995
<i>Rhodotorula glutinis</i> 0559	0.01	2.6	260	4	28	Hodgins, 1971
<i>Sporidiobolus pararoseus</i> NRRL-Y5484	0.022	0.72	32.6	2	80.3	Monje, 1995
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	0.138	3.26	24	4	-	Da Cunha, 1989
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.++						
1		0.148	123			
2	0.0012	0.316	263	4	12	Bolwell, 1985
3		0.182	152			
4		0.340	286			
<i>Petroselinum crispum</i> Nym en <i>E. coli</i>	0.054	--	--	-	---	Schulz, 1989
<i>Petroselinum crispum</i> Nym en <i>E. coli</i> *	0.060	2.4	40	1	10	Appert, 1944
<i>Rhodospiridium toruloides</i> en <i>E. coli</i>	0.003	--	--	-	---	Orum, 1992
<i>Rhodospiridium toruloides</i> en <i>E. coli</i> y <i>S. cerevisiae</i>	0.355	--	--	-	---	Faulkner, 1994

Código: Act. esp. Actividad específica; F.P. Factor de purificación; ++ valores para las diferentes isoformas (1, pI 5.4; 2, pI 5.2; 3, pI 5.02; 4, pI 4.85); *Phaseolus vulgaris* (Frijol); *Petroselinum crispum* (Perejil); *Fusión con Glutación S-Transferasa (GST). U= unidad enzimática, entendida como la cantidad de ácido trans-cinámico (µmoles) formado por minuto bajo las condiciones de temperatura empleada.

Adaptada de Monje R.I., 1995.

C) Estructura y Organización genética.

Se han aislado y secuenciado genes de la PAL de varias familias de plantas, incluyendo gimnospermas, monocotiledóneas y dicotiledóneas, herbáceas y leñosas (Cramer, 1989; Joss, 1992; Appert; 1994; Nagai, 1994; Osakabe, 1995; Wanner, 1995). En la mayoría de las familias la PAL esta representada en una pequeña familia de genes de entre 2 y 6 miembros, con la excepción de la papa, la cual contiene mas de 40 genes, lo que demuestra que, en esta especie, la PAL posee una complejidad genómica poco usual en este grupo (Joss, 1992).

En las plantas superiores en que los genes de la PAL se han secuenciado, se ha encontrado que éstos contienen un único intrón. Sin embargo, la PAL3 de *Arabidopsis thaliana* posee un intrón adicional y una menor similitud con los demás genes de la PAL reportados (Wanner, 1995).

Generalmente los genes que codifican para las enzimas que intervienen en el metabolismo secundario están agrupados; empero, este tipo de organización no se había observado en el caso de los genes de la PAL. Recientemente, se encontró que en la leguminosa *Trifolium subterraneum* los genes de la PAL están agrupados dentro de aproximadamente 20 kilobases (Howles, 1994).

Algunos promotores de la PAL tienen la capacidad de integrar una serie de señales ambientales durante el desarrollo con el fin de adaptar la expresión del gen a las funciones tan diversas que tienen los compuestos fenilpropanoides. El promotor que más se ha estudiado es el de la PAL2 del frijol (Leyva, 1992).

D) La expresión de la PAL.

El patrón de expresión de la PAL, descrito en el frijol, perejil y *Arabidopsis* es fundamentalmente diferencial y organo específico, tal como lo demuestran los ensayos efectuados durante el desarrollo normal de las plantas y al someterlas a algún estrés ambiental (Liang, 1989; Halbrock, 1989; Lois, 1989; Bevan, 1989; Yamada, 1992). En general se ha encontrado que un aumento en los niveles de la PAL esta ligado al aumento en el nivel de etileno, lo que indica que existe una respuesta de la PAL que es etileno dependiente (Ecker, 1987). Sin embargo, en el melón se distinguen dos tipos de respuesta

de la PAL, una etileno dependiente y la otra etileno independiente. La respuesta dependiente se presenta durante el desarrollo del fruto y la respuesta independiente al existir daño mecánico en la planta (Diallinas, 1994).

Hace relativamente poco tiempo fue posible generar plantas transgénicas de tabaco que expresaron diferentes niveles de la PAL (Bate, 1994). La transformación del tabaco se efectuó con el gen de la PAL2 del frijol modificado en su promotor por la inclusión de una secuencia potenciadora de la expresión. Como resultado se obtuvieron una gama de plantas que expresaron la PAL desde el nivel silvestre hasta un 0.2% de este, estudios efectuados con las transgénicas permitieron demostrar que la acción de la PAL es un paso crucial sobre el flujo de carbono hacia el metabolismo fenilpropanoide y por lo tanto hacia la acumulación de la mayoría de sus productos (Bate, 1994).

E) La Interacción Planta-microorganismo.

Se atribuye a los flavonoides el ser uno de los primeros compuestos involucrados en el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Fundamentan este hecho los siguientes eventos: en la raíz, la elaboración de exudados flavonoides está controlada durante el desarrollo y es en esta zona donde se localiza una mayor infección (Peters, 1988); al inicio del "diálogo" entre la leguminosa y el *Rhizobium*, los flavonoides provenientes de la planta hospedera interactúan con la proteína NodD del *Rhizobium* activando la transcripción de otros genes nod, cuya función es la síntesis de un tetraglucósido llamado factor de nodulación (Peters, 1986). Por último, se ha observado que la biosíntesis *de novo* de flavonoides, por parte de la planta hospedera, ocurre tras la inoculación con *Rhizobium* (Recourt, 1992).

Aún cuando algunos estadios en el desarrollo del nódulo podrían compararse con interacciones planta-patógeno, (Vance, 1983) en el hospedero no se produce una respuesta de defensa contra el simbiote mediada por compuestos del tipo fenilpropanoide. Incluso se ha encontrado que los genes de la PAL y la CHS inducidos durante la simbiosis no son inducidos por estrés o interacciones con patógenos (Estabrook, 1991). Sin embargo, la simbiosis con una bacteria Nod+ Fix- trae como consecuencia la producción de fitoalexinas (Werner, 1985), al parecer, si el nódulo no es activo la planta desarrolla una respuesta de defensa.

Marco teórico

A diferencia de la interacción planta-simbionte, la respuesta a la presencia de algún patógeno es la biosíntesis de compuestos de defensa en el hospedero. Por ejemplo, en la soya la interacción con un hongo patógeno provoca un aumento en los niveles de la PAL que conlleva a la biosíntesis de una fitoalexina; la gliceolina I (Ebel, 1984). Más aún, en el frijol la actividad de PAL es inducida poco tiempo después de la infección por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var *fuscans* en variedades resistentes, mientras que en las variedades susceptibles esta se manifestó en forma tardía. La presencia de los compuestos tipo flavonoides encontrados podría estar asociada a la respuesta de resistencia (Camas, 1993).

F) La PAL dentro del Catabolismo de la L-Phe en microorganismos.

En microorganismos la PAL funciona como una enzima catabólica pues permite a las levaduras y los hongos utilizar la L-fenilalanina como única fuente de carbono y energía ó bien, como fuente de nitrógeno (Hanson, 1981; Marusich, 1981). En actinomicetos (del genero *Streptomyces*) esta enzima no es responsable de la asimilación de fenilalanina, más bien, su presencia parece estar relacionada con la síntesis de mitomicina. En este caso, la enzima es inducible por fenilalanina y su máxima actividad se presenta en la etapa tardía del crecimiento exponencial siendo su inhibidor más potente el ácido *t*-cinámico (Juárez, 1995).

G) Expresión de la fenilalanina amonio liasa en *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*.

El grupo de Hahlbrock (Schulz, 1989) fue uno de los primeros que consiguió clonar el gen de la PAL en *Escherichia coli* y obtener una enzima activa. La actividad específica de la PAL1 del perejil expresada en *E. coli* (BL21(DE3)) fue mayor a la obtenida con la enzima proveniente de células de perejil estimuladas con un inductor (54nmol mg⁻¹ min⁻¹ y 6nmol mg⁻¹ min⁻¹, respectivamente). La importancia de esta investigación radica en el hecho de establecer que la bacteria es capaz de sintetizar

Marco teórico

y ensamblar un homotetrámero con actividad de la PAL, lo que podría significar que la planta no necesariamente requiere de la expresión de todos los genes de la PAL para formar una enzima activa.

Posteriormente, en 1994 Appert et al., lograron expresar la PAL fusionada con glutathion S-transferasa en *Escherichia coli* DH5 α . El resultado que obtuvieron fue que todas las enzimas, fusionadas y libres, expresadas en *E. coli* fueron catalíticamente activas; la K_m , para la L-fenilalanina, calculada para estas enzimas (15-24.5 μ M) fue muy similar a la de la enzima nativa, así como la temperatura y pH óptimos de 58°C y 8.5 respectivamente. Todas las enzimas actuaron también sobre la L-tirosina y fueron inhibidas competitivamente por el *t*-cinámico. Solo el 10% de la proteína fusionada se unió a la matriz glutathion-seferosa, sin embargo, aún cuando no se recupera una gran parte de la enzima, el método de purificación fue efectivo, ya que la actividad aumentó 40 veces después de eluirla de la columna de afinidad, siendo la actividad original del extracto crudo de 60nmol mg⁻¹min⁻¹. El peso molecular calculado para las enzimas catalíticamente activas PAL1 y GST-PAL1 fue el esperado (300 y 400kDa respectivamente). Esto es una evidencia mas de la naturaleza tetramérica de la PAL y de que homotetrámeros de la enzima son activos. La reacción reversa también se estudió y se demostró que todas la isoenzimas de la PAL de perejil fueron capaces de formar L-fenilalanina a partir de *t*-cinámico y amonio a una velocidad idéntica con respecto a la levadura *R. glutinis*, utilizada como referencia. El rendimiento que se obtuvo con este sistema fue de 1 mg de PAL por litro de cultivo bacteriano.

Por otra parte, se ha construido un sistema de expresión bifuncional (Faulkner, 1994) que permite la expresión de genes heterólogos en *Escherichia coli* (TG1 K-12) y *Saccharomyces cerevisiae* AS33, consistente en un plásmido que posee, entre otras características, un promotor quimérico de levadura (pPGK::REP2) capaz de promover altos niveles de expresión en ambos organismos. Este sistema ha demostrado ser eficiente en la expresión del gen de la PAL proveniente de *Rhodospiridium toruloides*, como resultado se ha obtenido la acumulación de la PAL, totalmente activa, en un 9 y 10% del total de la proteína soluble en *S. cerevisiae* y *E. coli* respectivamente. Los niveles de expresión de este sistema resultaron ser 100 veces mayores al logrado por Orum y Rasmussen, en 1992, al expresar el mismo gen bajo el control del promotor *tac* en *E. coli* (SG1611). La región rica en A+T hacia arriba de la región -35 en el promotor PGK::REP2 podría estar actuando como un *potenciador* transcripcional adicional (Faulkner et al.,1994).

H) Aplicaciones potenciales de la fenilalanina amonio liasa.

Las aplicaciones potenciales de la fenilalanina amonio liasa recaen en tres áreas: La agrícola, la clínica y la tecnología de alimentos.

Area Agrícola.

A diferencia de las otras áreas en donde se aplica la PAL, en esta área, el efecto que puede producir la sobreexpresión o la supresión de la enzima no depende exclusivamente de la enzima. La interacción que se establece con los demás componentes del metabolismo secundario e incluso con otros sistemas son los que determinan en última instancia el efecto.

Una de las aplicaciones mas atractivas que se ha sugerido es la obtención de plantas mas resistentes a los cambios ambientales. Dado que la PAL juega un papel tan importante en el desarrollo, crecimiento y la respuesta a estrés ambiental, se podría, mediante la sobreexpresión de los compuestos fenilpropanoides involucrados, obtener variedades mas resistentes.

Actualmente, callos transgénicos provenientes de hojas de tabaco que sobreexpresan la PAL han desarrollado una mayor producción de compuestos fenilpropanoides, mismos que en condiciones normales solo se expresaban en cantidades traza (Bate, 1994). Si logramos establecer, en este tipo de sistemas, las condiciones que favorezcan la producción de un metabolito de interés agrícola (por ejemplo, del tipo fitoalexina), la posibilidad de producirlo a mayor escala, posiblemente no sea un evento muy lejano.

Adicionalmente, la importancia que tiene la PAL en el proceso de lignificación de las plantas, ha llevado a sugerir la obtención de árboles y plantas forrajeras transgénicas que posean una baja lignificación, debido a la disminución de la expresión y/o actividad de la PAL, esto con el fin de disminuir los costos en la producción del papel y de favorecer su digestión por el ganado, respectivamente (Bate, 1994).

Area clínica.

En el área clínica se ha propuesto el uso de la PAL en el descubrimiento y el monitoreo de niveles anormales de fenilalanina en sangre en los pacientes fenilcetonúricos. Para este propósito y con el fin de evitar la interferencia debido a la presencia de tirosina, es indispensable utilizar una enzima

Marco teórico

específica para L-fenilalanina. En general la enzima proveniente de dicotiledóneas presenta una mayor especificidad para L-fenilalanina. La enzima del frijol podría ser un buen candidato para emplearse en bioensayos, pues aún cuando posee una actividad de 0.6 a 1.3% de TAL (Scott, 1992), valor de los más bajos encontrados, la interferencia que puede existir por la presencia de tirosina podría ser mínima.

Otro de los posibles usos de la enzima en la clínica es el tratamiento mismo de la fenilcetonuria. La dieta baja en L-fenilalanina es una práctica común en el tratamiento de fenilcetonúricos. Al respecto, se han logrado obtener alimentos libres o con bajo contenido de fenilalanina a través de procesos que involucran a la PAL de *Sporidiobolus pararoseus* y *Rhodospiridium toruloides*. Sin embargo, ambas proteínas actúan también sobre la tirosina, por lo que posterior al tratamiento es necesario restablecer la tirosina perdida, lo que encarece al producto. Por otro lado, estudios recientes, sugieren que una dieta libre en L-fenilalanina podría no ser suficiente para evitar los daños provocados por la acumulación de esta, debido a que la recirculación de "los aminoácidos endógenos", en muchas ocasiones, representa en el intestino un mayor aporte de L-fenilalanina que el proveniente de la dieta (Chang, 1995). Alternativamente, en 1985 Bourget y Chang elaboraron un biocatalizador, microencapsulando a la PAL, para tratar a ratas fenilcetonúricas. La aplicación de este, vía oral, permitió llevar los niveles de fenilalanina a valores muy cercanos a los normales. Estos biocatalizadores han probado ser efectivos, en este sistema, al administrarse vía parenteral, vía oral ó en hemoperfusiones.

Tecnología de alimentos.

Debido a que la reacción catalizada por la PAL se efectúa en ambos sentidos, se ha propuesto el uso de la enzima con el fin de producir L-fenilalanina partiendo de ácido trans-cinámico y amonio. El atractivo de la PAL en el área de los alimentos, radica principalmente en que mediante su empleo es posible obtener específicamente al aminoácido a través de un proceso enzimático que no requiere de cofactores.

Marco teórico

Producción de L-fenilalanina y aspartamo.

El aspartamo (Nutrasweet ;L- α -aspartil-L-fenilalanina metilester) es un edulcorante no calórico utilizado en alimentos y bebidas. Entre los atributos de este producto están el ser 200 veces más dulce que el azúcar, el reforzar saborizantes de frutos y el no contribuir al deterioro dental. Aún cuando se descubrió en 1965, hasta 1981 se aprobó su uso como edulcorante y en 1983 se permitió se utilizara en bebidas carbonatadas. A partir de entonces su uso se ha extendido a un gran número de productos, tales como, yogurt, gelatinas, cereales, té, bebidas refrescantes, café instantáneo y dulces.

La demanda mundial de L-fenilalanina para la producción de aspartamo se ha incrementado de forma espectacular, de ser 50 toneladas en el año 1981 para 1985 aumentó hasta 3000 toneladas (De Boer, 1991). Este hecho está relacionado con la autorización del uso de aspartamo en bebidas carbonatadas.

En nuestro país la empresa ENZYMOLOGA lleva a cabo la producción de aspartamo. El proceso utilizaba una cepa recombinante de *E.coli* capaz de producir 30g de L-fenilalanina /litro en un fermentador de 20m³ (García, 1993). Aún cuando la empresa proyectaba, para 1991, tener una capacidad instalada de 200ton/año, el aminoácido se dejó de producir ese mismo año debido a los altos costos de producción, elaborando el aspartamo a partir de los aminoácidos importados.

La mayoría de los desarrollos tecnológicos en los que se aplica la fenilalanina amonio liasa, han utilizado como modelo la enzima proveniente de la levadura *Rhodotorula glutinis*. El logro más importante con este organismo ha sido la sobreproducción de L-fenilalanina mediante la pérdida de la regulación por producto final de la DAHP sintasa. Sin embargo se ha reportado que niveles bajos de cinamato son tóxicos para la levadura (Fiske, 1984).

Producción de L-Phe-OMe precursor en la síntesis de aspartamo.

Las investigaciones de Godwin *et al* (1994), introducen a la PAL en un nuevo campo de estudio, la biocatálisis en medios orgánicos. Ellos, propusieron un método directo para la bioconversión del t-cinamil-metil-ester en L-fenilalanina-metil-ester (precursor del aspartamo) mediado por la PAL de *Rhodotorula glutinis*. En este reporte se utiliza por primera ocasión la enzima en un sistema bifásico (heptano:buffer Tris-Sulfato 0.1M pH 9.0, en una relación 2:1), con objeto de solubilizar al substrato logrando un 70% de conversión.

De este ensayo sobresale el hecho de que la PAL retiene apreciablemente su actividad en solventes orgánicos.

1) Perspectivas.

La mutagénesis sobre los sitios de regulación podría aumentar la actividad específica de la enzima. Se sabe que el ácido p-coumárico es un fuerte inhibidor, si se lograra mutagenizar el sitio de su unión a la enzima podrían mejorarse las características de la PAL.

En algunos procesos la actividad de PAL es indeseable, por ejemplo en la elaboración de quesos por *Penicillium roquefortii*, altos niveles de expresión de la PAL modifican las propiedades organolépticas del producto, esto se podría eliminar o reducir introduciendo un DNA antisentido.

Existe una gran necesidad de conocer más acerca de la estructura, la regulación, la actividad y las modificaciones post traduccionales de la PAL con objeto de entender como se controlan las rutas del metabolismo secundario y así obtener enzimas con mejores características para su aplicación industrial. La ingeniería de proteínas y la ingeniería de rutas metabólicas en los próximos años proporcionarán enzimas y cepas con mejores características para su explotación a nivel industrial.

ANTECEDENTES

LA FENILALANINA AMONIO LIASA EN EL FRIJOL.

En el año de 1976 ya se había relacionado la fluctuación en los niveles de la PAL en el frijol con el aumento de faseolina (fitoalexina del tipo fenilpropanoide). Este hecho se basó en la observación de la inducción tanto de faseolina como de la PAL debida al ataque por *Colletotrichum lindemuthianum* (patógeno del frijol); a la presencia de auxinas y citocinas; RNAsas (sometidas a altas temperaturas) y algunas sales de metales pesados (Dixon, 1976; Lamb, 1978). Por otro lado, existían informes en los que se observaba también que la biosíntesis de flavonoides en leguminosas se conducía con mayor proporción hacia isoflavonoides tipo fitoalexinas (Cumestrol, faseolina, keivitona y genisteina). Sin embargo, era posible distinguir una expresión diferencial de fitoalexinas, por ejemplo, la inducción de keivitona era mayor en cotiledones y de faseolina en hipocotilos (Whitehead, 1982; Dixon, 1983). La enzima que inicia la síntesis de los flavonoides es la chalcona sintasa que se induce coordinadamente junto con la PAL y la chalcona isomerasa en: a) hipocotilos inducidos por daño mecánico, b) cultivos celulares inducidos con inductor fúngico, c) hipocotilos inducidos con esporas de hongos virulentos y avirulentos y d) hojas infectadas con bacterias patógenas (Camas, 1993; Liang, 1989; Edwards, 1985). Adicionalmente, los flavonoides pueden ser reguladores naturales del transporte de auxinas polares (Jacobs, 1988).

Los resultados señalados anteriormente contribuyeron para generar la hipótesis de que la PAL era un elemento clave en la biosíntesis de los compuestos fenilpropanoides en las plantas superiores y que intervenía tanto en su morfogénesis como en la defensa de éstas. En cuanto al desarrollo de la planta, Holst (1989) encontró que la composición de la pared celular en hipocotilos etiolados variaba su contenido de lignina pero no así el de celulosa reforzando con esto la hipótesis generada años atrás. Además, anteriormente ya se había demostrado que intermediarios de la vía fenilpropanoide (ácido *t*-cinámico, el ácido *p*-coumárico y el ácido ferúlico) evitaban la inducción de la PAL (Dixon, 1980).

En la actualidad, la posibilidad de clonar genes en especies heterólogas ha permitido generar plantas de tabaco transgénicas en las que se expresa el gen de la PAL2 de frijol, en estas transgénicas la expresión de PAL2 causa una supresión en la actividad de la PAL y una reducción en la acumulación de fenilpropanoides que es revertida gradualmente en las siguientes generaciones homocigotas para el transgen PAL2. Este hecho ha permitido el contar con plantas que expresan un amplio rango de actividades de la PAL que han servido para confirmar que la expresión de esta enzima, es un paso crítico en la síntesis de fenilpropanoides y que estos últimos contribuyen en la defensa de la planta (Maher, 1994).

LA FENILALANINA AMONIO LIASA EN EL FRIJOL.

En el año de 1976 ya se había relacionado la fluctuación en los niveles de la PAL en el frijol con el aumento de faseolina (fitoalexina del tipo fenilpropanoide). Este hecho se basó en la observación de la inducción tanto de faseolina como de la PAL debida al ataque por *Colletotrichum lindemuthianum* (patógeno del frijol); a la presencia de auxinas y citocinas; RNAsas (sometidas a altas temperaturas) y algunas sales de metales pesados (Dixon, 1976; Lamb, 1978). Por otro lado, existían informes en los que se observaba también que la biosíntesis de flavonoides en leguminosas se conducía con mayor proporción hacia isoflavonoides tipo fitoalexinas (Cumestrol, faseolina, kevitona y genisteína). Sin embargo, era posible distinguir una expresión diferencial de fitoalexinas, por ejemplo, la inducción de kevitona era mayor en cotiledones y de faseolina en hipocotilos (Whitehead, 1982; Dixon, 1983). La enzima que inicia la síntesis de los flavonoides es la chalcona sintasa que se induce coordinadamente junto con la PAL y la chalcona isomerasa en: a) hipocotilos inducidos por daño mecánico, b) cultivos celulares inducidos con inductor fúngico, c) hipocotilos inducidos con esporas de hongos virulentos y avirulentos y d) hojas infectadas con bacterias patógenas (Camas, 1993; Liang, 1989; Edwards, 1985). Adicionalmente, los flavonoides pueden ser reguladores naturales del transporte de auxinas polares (Jacobs, 1988).

Los resultados señalados anteriormente contribuyeron para generar la hipótesis de que la PAL era un elemento clave en la biosíntesis de los compuestos fenilpropanoides en las plantas superiores y que intervenía tanto en su morfogénesis como en la defensa de éstas. En cuanto al desarrollo de la planta, Holst (1989) encontró que la composición de la pared celular en hipocotilos etiolados variaba su contenido de lignina pero no así el de celulosa reforzando con esto la hipótesis generada años atrás. Además, anteriormente ya se había demostrado que intermediarios de la vía fenilpropanoide (ácido *t*-cinámico, el ácido *p*-coumárico y el ácido ferúlico) evitaban la inducción de la PAL (Dixon, 1980).

En la actualidad, la posibilidad de clonar genes en especies heterólogas ha permitido generar plantas de tabaco transgénicas en las que se expresa el gen de la PAL2 de frijol, en estas transgénicas la expresión de PAL2 causa una supresión en la actividad de la PAL y una reducción en la acumulación de fenilpropanoides que es revertida gradualmente en las siguientes generaciones homocigotas para el transgen PAL2. Este hecho a permitido el contar con plantas que expresan un amplio rango de actividades de la PAL que han servido para confirmar que la expresión de esta enzima, es un paso crítico en la síntesis de fenilpropanoides y que estos últimos contribuyen en la defensa de la planta (Maher, 1994).

Antecedentes

Edwards (1985) utilizando cultivos de células en suspensión tratadas con inductor fúngico y mediante ensayos tipo *northern blot*, siguió el curso de la inducción de mensajeros de la PAL del frijol. La conclusión del trabajo fue que existía una correspondencia directa entre los tiempos de inducción y los niveles de mensajeros de la PAL. Paralelamente, Bolwell (1985) lograba diferenciar cuatro isoformas de la PAL en el mismo sistema (cultivos de células en suspensión tratadas con inductor fúngico). Las cuatro isoformas poseían un peso molecular de 77kDa pero diferían en su punto isoeléctrico (pI), hecho que llevó a identificarlas. El comportamiento cinético seguido por las formas individuales fue del tipo Michaelis-Menten. En la Tabla 3 se incluyen los valores de Km y la actividad específica encontrada para cada una de las isoformas. Es de llamar la atención que las especies más ácidas presentan una menor afinidad por la L-fenilalanina y que, al parecer, el tratamiento con inductor fúngico, en células de frijol en suspensión, favorece la expresión de las especies con pI de 5.2 y 4.85. Ensayos inmunológicos evidencian la inestabilidad de las subunidades de la PAL de 77kDa y muestran la degradación de la proteína a productos de 70, 53 y 46kDa (Bolwell *et al.*, 1985b).

Posteriormente, Liang (1989) exploró ampliamente la regulación de los genes de la PAL en el frijol bajo diferentes condiciones de estrés ambiental y durante el desarrollo normal de la planta. El estudio se efectuó mediante ensayos de protección al ataque de RNAsa por sondas específicas para cada una de las familias de genes de la PAL. Entre los resultados sobresalientes en este trabajo se encontró que la máxima inducción de la PAL fue provocada por el daño mecánico a hipocotilos, representando el total del transcrito de la PAL cerca de 1ng/μg del RNA celular, correspondiendo hasta 450pg de éste a la PAL2. La expresión de la PAL2 (en diferentes tejidos) sugiere su importancia en la síntesis de lignina y de pigmentos. Por otra parte, se encontró que la PAL3 no se expresa más que en raíz durante el desarrollo normal de la planta. Por último, se concluyó que la PAL2 correspondía con la especie más ácida, la PAL3 con la más básica y por ende la PAL1 con la intermedia. La tabla 4 resume los resultados obtenidos por Liang.

Isoforma	pI	K _m mM	Actividad específica mmol min ⁻¹ mg ⁻¹
a	5.4	0.077	0.148
b	5.2	0.122	0.316
c	5.05	0.256	0.182
d	4.85	0.302	0.340

La actividad específica se evaluó después del cuarto paso de purificación (2^o cromatograma)

Adaptado de Bolwell, 1985

Tabla 3. Características de las isoformas de 77kDa encontradas en cultivos de células de frijol en suspensión.
Km para la L-fenilalanina

Fuente	PAL1	PAL2	PAL3
Raíz	++	++	+
Brotes	++	++	-
Hojas	+	-	-
Sepalos	+	++	-
Pétalos	+	+++	-
Daño mecánico a hipocotilos	+++	+++	++
Infección de hipocotilos por hongos (C.l)	++	-	++
Cultivo de células en suspensión tratadas (pC.l)	++	++	-
Iluminación de hipocotilos etiolados	++	++	-

Tabla 4. Expresión diferencial de la fenilalanina amonio liasa en el frijol durante el desarrollo y como respuesta a diferentes factores ambientales.

(niveles de transcrito)

Código: + expresión débil (<15pg/μg RNA total); ++ expresión media (20-100pg/μg RNA total); +++ expresión alta (250-550pg/μg RNA total); - no hay expresión; C.l, *Colletotrichum lindemuthianum* (razas compatibles e incompatibles); pC.l, paredes celulares de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Adaptado de Liang, 1989.

Estructura y organización genética de la PAL del frijol.

La PAL en el frijol esta codificada por una pequeña familia de genes divergentes no agrupados. Se han reportado tres clases de genes, denominados gPAL1 (clase I), gPAL2 (clase II) y gPAL3 (clase III), cada uno de ellas conteniendo formas polimórficas. La secuencia nucleotídica de gPAL1 y gPAL3 ha sido totalmente establecida observándose que, al igual que en la mayoría de las plantas superiores, están interrumpidos por un intrón, en este caso localizado en el codón correspondiente al aminoácido 130 (una arginina ampliamente conservada). El gen gPAL2 presenta un marco de lectura abierto que codifica para 712 aminoácidos (77 849Da de peso molecular) y su intrón tiene una extensión de 1720 pares de bases; mientras que, el polipéptido codificado por gPAL3 es de 710 aminoácidos (77 364 Da de peso molecular) y su intrón de 447 pares de bases. Existe un 72% de identidad entre los polipéptidos producto de gPAL2 y gPAL3. Resulta interesante que el extremo 5' del segundo exón está bastante conservado (74% de identidad), por lo que se piensa que en esta región se encuentran residuos importantes para el sitio activo de la proteína; de hecho, la serina que da origen a la dehidroalanina pertenece a esta región. El primer exón esta menos conservado presentando un 59% de identidad entre gPAL2 y gPAL3; se considera que aquí esta codificada la secuencia que participa en la regulación de la actividad enzimática. Los intrones de gPAL2 y de gPAL3 son ricos en AT y difieren en tamaño. Con respecto a gPAL1 actualmente se conoce parcialmente su secuencia nucleotídica, sin embargo existe un 90% de similitud a nivel de aminoácidos con la región correspondiente a gPAL2.

Se ha determinado que en el genoma de *Phaseolus vulgaris* hay varias copias de los genes gPAL1 y gPAL3 (Cramer, 1989). Mediante ensayos tipo *northern blot* se ha encontrado que la PAL en el frijol es sintetizada a partir de un mRNA monocistrónico de 2.5 kb de longitud (Edwards, 1985).

Aún cuando casi todas las investigaciones efectuadas con frijol consideran que la PAL tiene un peso molecular aproximado de 310kDa se ha aislado de hoja, a homogeneidad electroforética, una proteína de aproximadamente 330kDa (Da Cunha, 1988). Dicha proteína está constituida por cuatro subunidades idénticas de 83kDa y un pI de 4.2; el pH óptimo de la enzima activa es de 8.8 a 9.2 y su constante cinética Km, de 1.25mM para la L-fenilalanina. En el trabajo de Da Cunha, se encontró que la síntesis *de novo* de la enzima (de 330kDa) se induce debido a la infección por *Colletotrichum lindemuthianum*, un hongo patógeno, y que esta relacionada con la biosíntesis de faseolina. La actividad específica de la PAL encontrada en los extractos de hojas inducidas fue de 0.138 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ que, después de 4 pasos de purificación (23.8 veces), logró alcanzar 3.26 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Al almacenar

Estructura y organización genética de la PAL del frijol.

La PAL en el frijol esta codificada por una pequeña familia de genes divergentes no agrupados. Se han reportado tres clases de genes, denominados gPAL1 (clase I), gPAL2 (clase II) y gPAL3 (clase III), cada uno de ellas conteniendo formas polimórficas. La secuencia nucleotídica de gPAL1 y gPAL3 ha sido totalmente establecida observándose que, al igual que en la mayoría de las plantas superiores, están interrumpidos por un intrón, en este caso localizado en el codón correspondiente al aminoácido 130 (una arginina ampliamente conservada). El gen gPAL2 presenta un marco de lectura abierto que codifica para 712 aminoácidos (77 849Da de peso molecular) y su intrón tiene una extensión de 1720 pares de bases; mientras que, el polipéptido codificado por gPAL3 es de 710 aminoácidos (77 364 Da de peso molecular) y su intrón de 447 pares de bases. Existe un 72% de identidad entre los polipéptidos producto de gPAL2 y gPAL3. Resulta interesante que el extremo 5' del segundo exón está bastante conservado (74% de identidad), por lo que se piensa que en esta región se encuentran residuos importantes para el sitio activo de la proteína; de hecho, la serina que da origen a la dehidroalanina pertenece a esta región. El primer exón esta menos conservado presentando un 59% de identidad entre gPAL2 y gPAL3; se considera que aquí esta codificada la secuencia que participa en la regulación de la actividad enzimática. Los intrones de gPAL2 y de gPAL3 son ricos en AT y difieren en tamaño. Con respecto a gPAL1 actualmente se conoce parcialmente su secuencia nucleotídica, sin embargo existe un 90% de similitud a nivel de aminoácidos con la región correspondiente a gPAL2.

Se ha determinado que en el genoma de *Phaseolus vulgaris* hay varias copias de los genes gPAL1 y gPAL3 (Cramer, 1989). Mediante ensayos tipo *northern blot* se ha encontrado que la PAL en el frijol es sintetizada a partir de un mRNA monocistrónico de 2.5 kb de longitud (Edwards, 1985).

Aún cuando casi todas las investigaciones efectuadas con frijol consideran que la PAL tiene un peso molecular aproximado de 310kDa se ha aislado de hoja, a homogeneidad electroforética, una proteína de aproximadamente 330kDa (Da Cunha, 1988). Dicha proteína está constituida por cuatro subunidades idénticas de 83kDa y un pI de 4.2; el pH óptimo de la enzima activa es de 8.8 a 9.2 y su constante cinética Km, de 1.25mM para la L-fenilalanina. En el trabajo de Da Cunha, se encontró que la síntesis *de novo* de la enzima (de 330kDa) se induce debido a la infección por *Colletotrichum lindemuthianum*, un hongo patógeno, y que esta relacionada con la biosíntesis de faseolina. La actividad específica de la PAL encontrada en los extractos de hojas inducidas fue de 0.138 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ que, después de 4 pasos de purificación (23.8 veces), logró alcanzar 3.26 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Al almacenar

Antecedentes

la enzima a 4°C se observó que había pérdida de actividad, lo que se asoció a la formación de monómeros y dímeros; para proteger a la enzima se adicionó albúmina al 1% (p/v) (Da Cunha, 1988). Anteriormente, Bolwell (1986) había encontrado que la disminución de la actividad estaba asociada a la pérdida o modificación de la dehidroalanina en el sitio activo. En 1991, Bolwell y Rodgers ratificaron la existencia de la enzima de 330kDa, ellos encontraron la subunidad de 83kDa en cultivos de células en suspensión y propusieron que probablemente esta forma de la enzima sea constitutiva y esté involucrada en la mayoría de los tipos celulares en la acumulación de bajos niveles de compuestos fenólicos. La proteína de 83kDa., aislada por Bolwell, a diferencia de la reportada anteriormente, esta asociada a glicósidos y tiene un Km de 0.433 mM y un pl de 4.5-4.6. Por último, se concluyó que este polipéptido debe ser un transcrito directo de un gen que aún no ha sido mapeado.

Se cree que las subunidades de la PAL pueden presentar modificaciones post transcripcionales, esto debido a que se han observado al menos 11 isoformas al efectuar estudios *in vivo* por medio de marcaje radioactivo (Bolwell, 1985).

Estudios efectuados con el promotor de gPAL2 del frijol.

Mediante la obtención de plantas transgénicas, utilizando fusiones del promotor de gPAL2 con el gen reportero GUS (gPAL2-GUS), se han ampliado los estudios de la expresión de la fenilalanina amonio liasa en la planta y se ha profundizado en el conocimiento de los promotores de ésta. Como resultados de estas investigaciones podemos mencionar que en plantas transgénicas de tabaco, fusiones de gPAL2-GUS son activas en: a) pétalos, en las células de la corola; b) xilema, en los rayos de células que forman el parénquima; c) tejido dañado, en la capa de células adyacentes a la región dañada y d) en tejido apical, en células jóvenes del xilema. Estas últimas observaciones indican que la activación transcripcional del gen para la PAL2 es, en algunos casos, un evento temprano en el desarrollo del tejido vascular en el inicio de la diferenciación del xilema (Bevan, 1989 ; Leyva, 1992). Sin embargo la delección en el promotor de gPAL2 de elementos importantes para la expresión en xilema, no afecta la expresión tejido específica del promotor en pétalos o en primordios y nodos de hoja. Esto es un indicativo de la organización modular del promotor gPAL2 (Leyva, 1992). Por otro lado, el promotor de gPAL2 posee una gran actividad en zonas de proliferación celular, la expresión en células jóvenes podría estar relacionada a la generación de señales durante el desarrollo; esto explicaría las observaciones hechas en el sentido de que una expresión inapropiada de la PAL2 en plantas

Antecedentes

transgénicas de tabaco, puede causar un desarrollo anormal de la planta (Elkind, 1990). La expresión de la PAL2 causa la supresión de la actividad de la PAL y reduce marcadamente la acumulación de fenilpropanoides, a este proceso se le llama cosupresión (Elkind, 1990).

Recientemente Bate *et al.* (1994) demostraron que la actividad de la PAL es el punto de mayor control en la vía de biosíntesis de los fenilpropanoides, ya que en plantas transgénicas de tabaco que expresan diferentes niveles de PAL se encontró que existe una relación directa entre estos y la acumulación de fenilpropanoides. Aparentemente, el promotor de gPAL2 es capaz de traducir señales durante el desarrollo de la planta y bajo un grupo complejo de cambios ambientales en un programa de expresión, integrado espacial y temporalmente, que regula la síntesis de una gran variedad de compuestos naturales.

JUSTIFICACIÓN

Justificación

Algunos de los problemas que se han enfrentado al trabajar con la PAL son su baja actividad, su baja estabilidad y su amplio rango de sustratos.

En estudios previos efectuados, por Monje en 1995, con la PAL de *Sporidiobolus pararoseus* NRRL Y-5484 se encontró que la enzima de este organismo es poco estable y que además de actuar sobre la L-fenilalanina es capaz de desaminar a la L-tirosina. En esta investigación se logró estabilizar a la enzima utilizando glicerol al 20% como agente estabilizante durante y después de los procesos de purificación. La PAL de *Sporidiobolus pararoseus* se inmovilizó por enlace covalente encontrándose que el Spherosil (sílica porosa) funcionó como mejor soporte, presentando una vida media de 20 días y una actividad específica de 2.3 U/g soporte.

Paralelamente, buscando una enzima que actuara únicamente sobre la L-fenilalanina, que fuera más estable y tuviera una mayor actividad específica y contando con los siguientes antecedentes: a) la PAL en las dicotiledóneas está reportada como la más específica, es decir reconoce como sustrato únicamente a la L-fenilalanina; b) en el frijol la PAL presenta isoformas con diferentes K_m . (desde 0.077 hasta 0.302 mM) (Bolwell *et al.*, 1985); c) la actividad específica (3.26 U mg^{-1} de proteína) lograda con la PAL del frijol después de 4 pasos de purificación es alta (Da Cunha, 1988); d) existe la posibilidad de ensamblar homotetrámeros activos en *E.coli*, incluso, con mayor actividad específica que la expresada en las células inducidas (Schulz, 1989).

Por tales razones, fue que nos propusimos el obtener un gen de la PAL de frijol para sobreexpresarlo en *E. coli*, pensando que de esta manera lograríamos obtener una enzima específica para L-fenilalanina con mayor actividad que la lograda hasta entonces con la enzima de *S. pararoseus* (0.720 U mg^{-1} de proteína) con la que se ha trabajado.

OBJETIVOS

Objetivos

El objetivo global de nuestra investigación consiste en obtener una cepa de *Escherichia coli* que sobreexpresen la enzima fenilalanina amonio liasa proveniente del frijol (*Phaseolus vulgaris* var negro jamapa). Para ello nos propusimos como objetivo inicial el:

Obtener un gen de la fenilalanina amonio liasa de *Phaseolus vulgaris* var negro jamapa

Como objetivos específicos contemplamos los siguientes:

- 1) Buscar los genes que codifican para la fenilalanina amonio liasa en una biblioteca de expresión obtenida a partir de mRNA proveniente de nódulos de 15 días de edad de *P. vulgaris* inoculada con *Rhizobium phaseoli* CNPAF512

Para ello se seguirán dos estrategias: la primera consistirá en hacer la búsqueda utilizando como detector anticuerpos antiPAL obtenidos contra la enzima de *Rhodotorula glutinis*. En la segunda se utilizará como detector una sonda de DNA específica para la PAL.

- 2) Obtener el gen a través de la amplificación directa del gen utilizando como molde al DNA genómico o al RNA total.

Mediante el análisis de las secuencias de la PAL depositadas en el GENE BANK y las secuencias reportadas de frijol, se seleccionará un par de oligonucleótidos que permitirán amplificar el gen completo de la PAL, utilizando como molde al DNA genómico ó al RNA proveniente de tejido inducido.

- 3) Obtener el gen a partir de la fusión de los exones de PAL.

Mediante el análisis de las secuencias de PAL reportadas de frijol, se seleccionarán dos pares de oligonucleótidos que nos permitirán amplificar los exones de la PAL por separado utilizando como molde al DNA genómico. Posteriormente se efectuará la fusión de ellos mediante una reacción de extensión-amplificación con PCR.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. Material vegetal

La especie vegetal empleada en el presente trabajo fue *Phaseolus vulgaris* var negro jamapa, leguminosa originaria de Mesoamérica comúnmente conocida como frijol negro.

Germinación de las plantas.

Las semillas de frijol se desinfectaron superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio comercial diluido al 10% durante 10 min. Después, con el fin de eliminar los restos de hipoclorito, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente, las semillas se colocaron, en charolas previamente esterilizadas, sobre dos capas de papel absorbente humedecido con agua destilada. Finalmente, las charolas se cubrieron con papel aluminio para evitar la pérdida de la humedad y se mantuvieron en la obscuridad durante 7-9 días a 26°C.

La desinfección de las semillas y la preparación de las cámaras de germinación se llevó a cabo en una campana de flujo laminar para evitar contaminaciones.

1.2. Cepas bacterianas, plásmidos y bacteriófagos

Las cepas de *Escherichia coli*, los plásmidos y los bacteriófagos utilizados en este trabajo se encuentran enlistados, junto con sus características relevantes, en el Cuadro 1.

Las cepas bacterianas se conservaron en placas de agar-LB a 4°C y se resembraron cada mes. Para evitar la pérdida de características genéticas por sucesivas resiembras, cultivos líquidos microbianos en fase logarítmica de crecimiento se guardaron a -20°C en 50% (v/v) de glicerol.

1.2.1. Crecimiento Bacteriano

Los cultivos bacterianos se obtuvieron a partir de una colonia de la cepa de interés crecida en cajas de petri sobre un medio apropiado adicionado de antibiótico. Estos se crecieron durante toda la noche a 37°C en agitación a 300rpm. Cuando fue necesario los cultivos se ajustaron a una determinada densidad óptica a 600nm.

1.3. Banco de expresión

La Biblioteca de expresión se construyó en el vector λ ZAP y fue elaborada por Stratagene. El cDNA se obtuvo a partir de mRNA de nódulos de frijol de 15 días de edad. Para su elaboración se utilizó como iniciador oligo dT. Los insertos que la componen son mayores de 400 pb y fueron clonados entre EcoR1 y Xho1. El título estimado del banco al amplificarlo fue de 6.4×10^9 ufp/ml.

Material y métodos

Se utilizó la cepa XL1-Blue MRF' para amplificar el banco y hacer las búsquedas en la biblioteca, así como para la selección de las clonas recombinantes (colonias blancas al crecer en placas de agar-LB con IPTG y X-gal).

CEPA O PLASMIDO	PROVEEDOR	PROPIEDADES RELEVANTES
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	GibcoBRL	<i>supresora</i>
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	Stratagene	<i>supresora, recA⁻</i> , resistente a tetraciclina
<i>Escherichia coli</i> XL1-BlueMRF'	Stratagene	<i>supresora, recA⁻</i> , resistente a tetraciclina
<i>Escherichia coli</i> SOLR	Stratagene	<i>no supresora</i> , resistente a kanamicina
Plásmido pSK Bluescript y pKS Bluescript	Stratagene	fagémido de 2961 pb derivado de pUC19. Posee una porción de <i>lacZ</i> que permite la selección por α complementación. SK y KS indica que la transcripción de <i>lacZ</i> va desde <i>SacI</i> a <i>KpnI</i> ó de <i>KpnI</i> a <i>SacI</i> respectivamente. Como origen de replicación tiene a ColE1. Posee MCS (Sitio de clonación múltiple) franqueado por promotores de: T3 y T7. Posee un gen de resistencia a ampicilina.
ExAssist™	Stratagene	Bacteriófago que posee una mutación ambar que evita su replicación en cepas de <i>E. coli</i> no supresoras, como es el caso de la cepa SOLR, lo cual facilita que se lleve a cabo la escisión del plásmido pBluescript del bacteriófago λ ZAP.

Cuadro1. Propiedades relevantes de las cepas de *Escherichia coli* y los plásmidos utilizados en el presente trabajo.

2. REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

2.1 Reactivos.

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron grado analítico.

Material y métodos

2.2. Medios de Cultivo.

Los medios de cultivo usados en este trabajo se prepararon de acuerdo a Sambrook (1989).

2.2.1. Medio LB (Luria-Bertani).

Se utilizó para el crecimiento de las cepas de *Escherichia coli*. Su composición fue la siguiente: 1.0% Bacto triptona, 1.0% NaCl y 0.5% extracto de levadura. Se ajustó el pH del medio a 7.2-7.5 y se esterilizó a 117°C durante 20 min. Cuando se utilizó en forma sólida se le adicionó agar al 1.5%.

3. METODOLOGIA EMPLEADA

3.1. Obtención de los hipocotilos.

Los hipocotilos se obtuvieron a partir de plántulas de 9 días de edad, cortándolos a 10mm de la base y a 20mm de los cotiledones. Se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio comercial diluido al 10% y se enjuagaron, en forma abundante, con agua destilada estéril. Los hipocotilos se cortaron en secciones de 5 a 10mm y se mantuvieron en buffer de 50mM Tris-HCl pH 8.5 y en obscuridad. Si el tejido no se utilizó inmediatamente, se lavó con agua destilada estéril, se secó sobre un papel filtro y se congeló con nitrógeno líquido para almacenarse a -70°C hasta ser requerido.

3.2. Inducción de la PAL con luz ultravioleta.

Se utilizó una lámpara Westinghouse 782H-30 de luz UV de onda corta (254nm) que proporcionó una intensidad de 73 μ watts/cm³. Cinco gramos de tejido (hipocotilo) se colocaron sobre cajas de petri y se sometieron al tratamiento de irradiación con luz ultravioleta por tres horas. Después de ese tiempo se tomaron muestras a las 4.5 y 6 horas (tiempo de inducción de PAL). El tejido inducido se guardó a -70°C hasta su uso para la obtención de RNA mensajero y para el estudio de la actividad de PAL.

3.3. Obtención de DNA y RNA de *Phaseolus vulgaris* var negro jamapa.

3.3.1 Obtención de RNA enriquecido en mRNA de la PAL.

La extracción del RNA se efectuó utilizando buffer Z6 (8M Tiocianato de guanidina, 20mM MES, 20mM EDTA, 50mM β mercaptoetanol ajustado a un pH de 7). El tejido inducido se congeló con nitrógeno líquido y se molió en presencia de buffer de extracción. Se realizaron dos extracciones con fenol-cloroformo (24:1). La fase acuosa se precipitó con Isopropanol, se lavó y resuspendió en buffer TE. Se

Material y métodos

volvió a precipitar con cloruro de sodio, con urea-cloruro de litio y con acetato de potasio. Finalmente el RNA se resuspendió en agua estéril a una concentración de 1mg/ml.

3.3.2 Obtención de DNA de *Phaseolus vulgaris* var negro jamapa.

El método seleccionado para la obtención de DNA fue una modificación del descrito por Saghai-Marooof en 1984¹. Trecientos mg de hojas de *P. vulgaris* congeladas en nitrógeno líquido se pulverizaron en un mortero, se pasaron a un tubo y se homogenizaron en 7.5ml de buffer CTAB. Posteriormente, se incubaron a 65°C por 20 min y se centrifugaron a 3024xg durante 10 min. Después de esto, al sobrenadante se le efectuó una extracción con una mezcla de cloroformo-álcool isoamílico(1:1), se adicionaron 0.7 volúmenes de isopropanol y después de 5 min, se centrifugó a 756xg durante 10 min. El precipitado se disolvió en 400µl de 1M CsCl, se transfirió a un tubo eppendorf y se adicionaron 800 µl de 96% etanol, se centrifugó a 5927xg durante 10 min y el precipitado se disolvió en 250µl de TE-RNAsa, se adicionaron 60µl de 5M NaCl, se efectuó una extracción con fenol-cloroformo y se precipitó con etanol. El precipitado resultante se lavó con 70% etanol, se secó y finalmente se disolvió en 250µl de TE. Las centrifugaciones se efectuaron en una centrifuga Beckman, modelo JS-HS, utilizando un rotor JA20.

3.4. Preparación del extracto crudo de hipocotilos de frijol.

Cinco gramos de hipocotilos de *Phaseolus vulgaris* inducidos con luz UV y congelados en nitrógeno líquido se homogenizaron con dos volúmenes de buffer de extracción [50mM Tris-HCl pH 8.5, conteniendo 14mM de βmercaptoetanol y 5% PVPP (p/v)] mediante el uso de un homogenizador Sorvall (USA, modelo Omnimixer 17106) en baño de hielo. La extracción se realizó a velocidad máxima durante 7 períodos de 30 segundos con intervalos de 30 segundos entre sí. El homogenado se filtró a través de dos capas de gasa y se centrifugó a 10000xg durante 10 min a 4°C.

3.5. Determinación de la concentración de proteínas.

Se siguió el método descrito por Bradford (1976), basado en la unión del azul brillante de Coomassie G-250 a las proteínas. Como patrón se utilizó seroalbúmina bovina.

¹Saghai-Marooof. 1984,PNAS 81:8014-8018.

Material y métodos

3.6. Obtención de una sonda específica para la PAL y obtención del gen de la PAL.

La obtención de una sonda específica para la detección de secuencias de PAL se efectuó por la amplificación de un fragmento del gen mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.6.1. Diseño de oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos, que nos ayudó a la obtención de las sondas específicas de PAL de *P. vulgaris*, se hizo a partir de las secuencias de PAL reportadas de este organismo y con ayuda de los programas *oligos 4* y *Geneworks 2.4*. Inicialmente, se seleccionaron 15 pares de oligonucleótidos de los cuales, algunos permiten la amplificación de regiones específicas para cada uno de los genes, otros que permiten la amplificación de una región intermedia menos conservada y por último otros que permiten la amplificación del gen completo.

Se decidió, en primera instancia, probar el par de oligonucleótidos que amplificarían al gen completo y que se encontraban flanqueando al gen. Posteriormente se utilizaron, junto con los primeros, otros dos oligonucleótidos cuyas secuencias correspondieron a las colindantes con el intrón; el uso de estos oligonucleótidos nos permitieron la amplificación de los exones por separado. La figura 4 muestra la localización de los oligonucleótidos en el gen PAL2.

Los oligonucleótidos seleccionados fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis de Macromoléculas del Instituto de Biotecnología/UNAM y se describen a continuación.

	Tm (°C)
oligoPal48	
5' <u>GCGGATC</u> CTCATTTAAATCTGCTTCCCCTCAC 3'	66.93
... BamH1	
oligoPal463	
5' <u>CCGCGGAACGTCCTTCTCGAATAGTCCAAAACCTTA</u> 3'	68.98
traslape con Pal380	
	Tm (°C)
oligoPal380	
5' <u>AGCTTATCAGGTTTTGAATGCTGGGATATTTGGCA</u> 3'	65.56
traslape con Pal463	
oligoPal2215	
5' <u>CCACGAGGAGAAGGTTAAACAATCAACTTAAGCG</u> 3'	64.52
EcoR1	

Material y métodos

3.6. Obtención de una sonda específica para la PAL y obtención del gen de la PAL.

La obtención de una sonda específica para la detección de secuencias de PAL se efectuó por la amplificación de un fragmento del gen mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.6.1. Diseño de oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos, que nos ayudó a la obtención de las sondas específicas de PAL de *P. vulgaris*, se hizo a partir de las secuencias de PAL reportadas de este organismo y con ayuda de los programas *oligos 4* y *Geneworks 2.4*. Inicialmente, se seleccionaron 15 pares de oligonucleótidos de los cuales, algunos permiten la amplificación de regiones específicas para cada uno de los genes, otros que permiten la amplificación de una región intermedia menos conservada y por último otros que permiten la amplificación del gen completo.

Se decidió, en primera instancia, probar el par de oligonucleótidos que amplificarían al gen completo y que se encontraban flanqueando al gen. Posteriormente se utilizaron, junto con los primeros, otros dos oligonucleótidos cuyas secuencias correspondieron a las colindantes con el intrón; el uso de estos oligonucleótidos nos permitieron la amplificación de los exones por separado. La figura 4 muestra la localización de los oligonucleótidos en el gen PAL2.

Los oligonucleótidos seleccionados fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis de Macromoléculas del Instituto de Biotecnología/UNAM y se describen a continuación.

	Tm (°C)
oligoPal48	
5' <u>GCGGATCCTCATT</u> TAATCTGCTTCCCACTCAC 3'	66.93
... BamH1	
oligoPal463	
5' <u>CCGCGGAACGTCTTCTCGAATAGTCCAAAACTTA</u> 3'	68.98
traslape con Pal380	
	Tm (°C)
oligoPal380	
5' <u>AGCTATCAGGTTTTTGAATGCTGGGATATTGGCA</u> 3'	65.56
traslape con Pal463	
oligoPal2215	
5' <u>CCACGAGGAGAAGGTTAAACAATCAACTTAAGCG</u> 3'	64.52
EcoR1	

ESTRATEGIA DE AMPLIFICACION

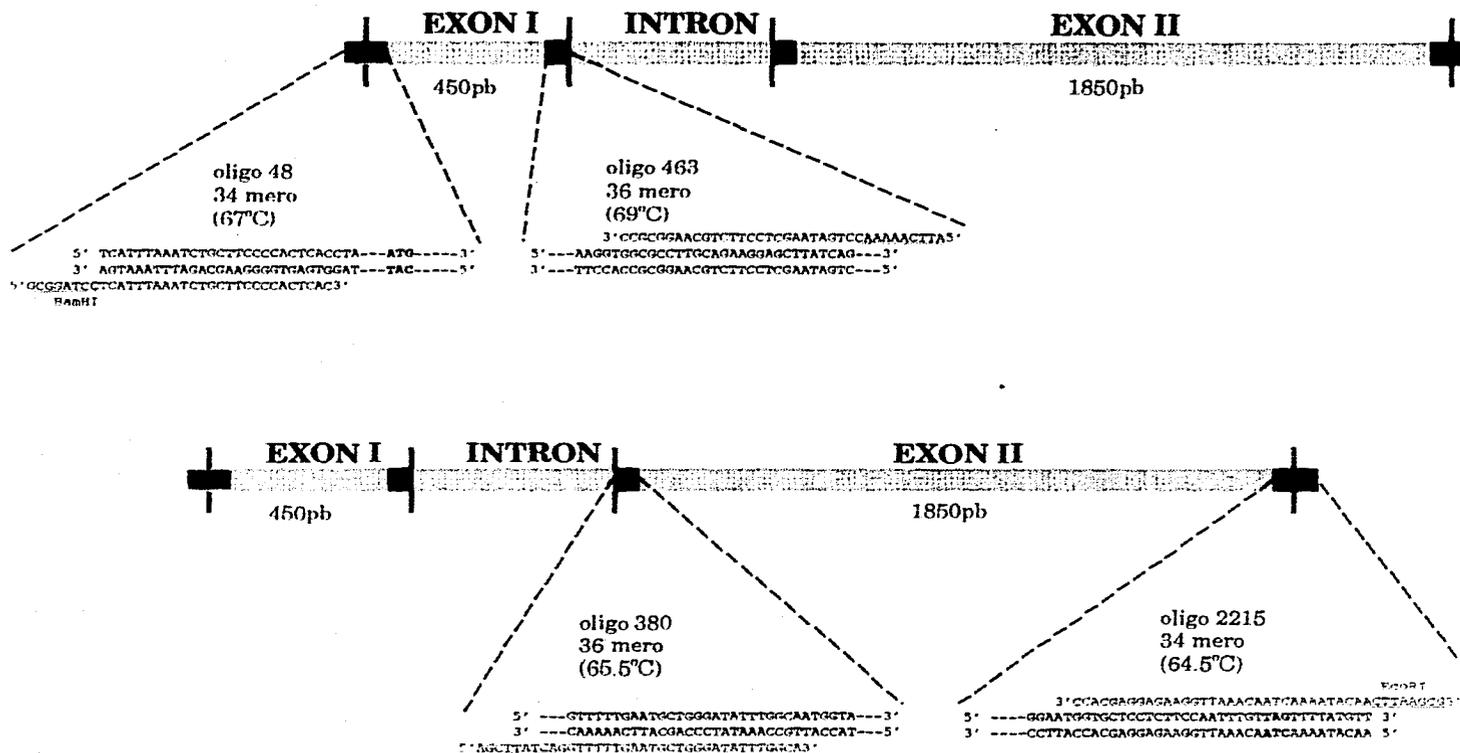


Figura 4. Esquema de la localización de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los exones de la PAL del frijol. Se indica la secuencia de gPAL2 y la correspondiente al oligo. Los oligonucleótidos de los extremos contienen sitios de restricción (PAL0048 (BamHI) y PAL2215 (EcoRI)). Los oligonucleótidos centrales contienen una cola correspondiente a la secuencia del extremo del otro exón (PAL0463 y PAL0380).

Material y métodos

3.6.2. Condiciones de la reacción de amplificación por PCR

La mezcla de reacción consistió de 3.5µg de DNA genómico en un volumen final de 100µl. Además, la mezcla de reacción contuvo: 30pmolas de cada uno de los oligonucleótidos, 2mM de MgCl₂, 250 µM de cada uno de los dNTPs en Buffer 100mM Tris-HCl pH 9.0, 1% Triton X-100 (*buffer* de Promega). Por reacción se utilizaron 2.5U de las enzimas *Taq* Polimerasa (Promega) ó *Pfu* Polimerasa (Stratagene) según la conveniencia.

Para la extensión y amplificación del primer exón se utilizaron los oligonucleótidos Pal48 y Pal463 bajo las siguientes condiciones de amplificación. Un ciclo desnaturizando el DNA por tres minutos a 95°C, reasociando las cadenas con los primers a 50°C por un minuto y permitiendo la replicación de las cadenas 2 minutos a 72°C. Posteriormente se efectuaron treinta ciclos con las mismas condiciones de reasociación y polimerización de las cadenas pero llevando a cabo la desnaturización del DNA en 45 segundos a 95°C.

La amplificación del segundo exón requirió de los oligonucleótidos Pal380 y Pal2215, las condiciones utilizadas fueron las siguientes: Un ciclo desnaturizando el DNA por tres minutos a 95°C, reasociando las cadenas con los primers a 65°C por un minuto y permitiendo la replicación de las cadenas 3 minutos con cincuenta segundos a 72°C. Continuaron treinta ciclos con las mismas condiciones de reasociación y polimerización de las cadenas pero llevando a cabo la desnaturización del DNA en 45 segundos a 95°C. Como controles se montaron reacciones sín oligonucleótidos ó dNTPs y se amplificó un fragmento de 400 pb del bacteriófago λ. Los productos de la amplificación se purificaron directamente a través de columnas centricon-10 (Amicon Inc) ó por geneclean a partir de una electroforesis en geles 1% agarosa.

3.6.3. Obtención del gen completo mediante la fusión de fragmentos traslapantes.

La reacción de Fusión de los dos exones se realizó mediante un MegaPCR.

Esta se efectuó de forma similar a un PCR con la diferencia de que en esta ocasión el DNA que sirvió como molde correspondió a los dos exones amplificados por separado [120ng del fragmento de 450pb (1^{er} exón) y 480ng del fragmento de 1850pb (2^o exón)]. El DNA se desnaturizó por ebullición durante diez minutos e inmediatamente se colocó en un baño de hielo por un min, pasado este tiempo se agregaron los dNTPs, el buffer y la *Taq* polimerasa. Se realizó una primera ronda de polimerización a 60°C por 10 min seguida de 7 ciclos (desnaturizando el DNA en 45 segundos a 95°C, reasociando los cadenas (se asocian los exones) a 60°C por un minuto y permitiendo la replicación de las cadenas 3 min con cincuenta segundos a 72°C), posteriormente, se adicionaron los oligonucleótidos Pal48 y Pal2215 y se continuó la amplificación durante 30 ciclos más (manteniendo las mismas condiciones).

Material y métodos

Los primeros 7 ciclos permitieron la fusión de los exones y los siguientes 30 ciclos amplificaron el gen completo de la PAL. La figura 5, ejemplifica los primeros ciclos de la reacción de fusión.

3.7. Búsqueda en el banco de cDNA obtenido a partir de nódulos de *Phaseolus vulgaris* de 15 días de edad.

Se buscó el gen de la PAL en una muestra de 150 000 placas líticas. Como sonda se utilizaron los exones obtenidos a partir de la reacción de PCR marcados con ^{32}P mediante la reacción de random primer. La búsqueda se trabajó siguiendo el protocolo proporcionado por Stratagene para el Sistema ExAssistTM/SOLRTM.

La búsqueda del gen de la PAL, mediante el uso de anticuerpos, se efectuó usando como probador anticuerpos antiPAL de *R. glutinis*, purificados con la proteína de *S. paraseus*. Se muestrearon en total 300 000 placas líticas. Se siguió el método descrito por Sambrook (1989).

El bacteriófago ExAssist y los fagos seleccionados, se usaron con un título de 1×10^6 ufp/ml y de 1×10^5 ufp/ml respectivamente. La cepa SOLR se utilizó exclusivamente para efectuar la escisión del fagémido.

3.8. Hibridación tipo *Southern blot* y *Northern blot*.

3.8.1. Hibridación tipo *Southern blot*.

El DNA se digirió con enzimas de restricción apropiadas y los fragmentos se separaron por electroforesis en gel de 1% agarosa. Previa desnaturalización del DNA (30 min a temperatura ambiente, con una solución de 1.5M NaCl y 0.5M NaOH) y neutralización del gel (15 min a temperatura ambiente en una solución de 1.5M NaCl, 0.001M EDTA y 0.5M Tris-HCl pH 7.2) se efectuó la transferencia de los fragmentos de DNA a una membrana de Nylon cargada positivamente (Hibond N+) y se fijaron con 0.4M NaOH. Después la membrana se colocó en la mezcla de prehibridación (50% de formamida, 100µg/ml Heparina, 6X SSC y 0.05% SDS) durante 2 horas a 42°C y se hibridó con la sonda, desnaturalizada y marcada con ^{32}P a una actividad específica de 2×10^8 cpm/µg, durante 12 horas. Pasado el tiempo de hibridación, la membrana se lavó con una solución 2X SSC-1% SDS durante 15 min a 65°C y después se hicieron otros lavados por 15 min con soluciones cuya concentración de sal cada vez era menor hasta llegar a una solución 0.5X SSC-SDS 1%. Los filtros se expusieron bajo películas fotográficas para rayos-X en congelación a -70°C por lo menos durante 16 horas.

Material y métodos

3.8.2. Hibridación tipo Northern blot, modalidad en rendija (slot blot).

Se siguió el procedimiento sugerido por Sambrook (1989) utilizando un aparato para hacer las rendijas (Hoefel Scientific Instruments PR648). Se colocaron por rendija de 20 a 200µg de RNA total obtenido de hipocotilos inducidos con luz ultravioleta y corte mecánico. Como probadores se utilizaron los oligonucleótidos (Pal48 y Pal2215) marcados con ³²P por cinación. La membrana se hibridó por 18 horas a 42°C tras prehibridarla durante 2 horas a 42°C en una solución de 50% formamida, 5X SSPE, 2X solución Denhardt's y 0.1% SDS. Posteriormente se lavó por 20 min en 1X SSC, 0.1% SDS a temperatura ambiente y se hicieron tres lavados más de 20 min a 68°C en 0.2% SSC, 0.1% SDS. La membrana se expuso por 24 horas a una temperatura de -70°C bajo una película fotográfica para rayos X.

3.9. Determinación de la secuencia nucleotídica.

La secuencia nucleotídica se determinó utilizando DNA de doble cadena y siguiendo el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos descrito por Sanger (1978). El "Kit" usado provino de Dupont. Se utilizaron oligonucleótidos comerciales (promotores de T3 y T7) y sintetizados específicamente (Pal2215).

La secuencia nucleotídica obtenida fue comparada con las secuencias depositadas en el GENBANK, empleando en su análisis los programas *Blast* y *Geneworks* versión 2.4.

3.10. Técnicas electroforéticas.

3.10.1. Electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes (PAGE-SDS).

El análisis electroforético de las proteínas (extractos crudos y PAL purificada) se realizó en el sistema Mighty Small II de Hoefel Scientific Instruments utilizando la técnica descrita por Laemmli (1970). En cada carril se cargaron alrededor de 30µg de proteína en extractos crudos ó 0.5 a 1µg de PAL purificada. Las muestras aplicadas se prepararon en una relación 4:1 con una solución compuesta de 0.25M Tris pH 6.8, 40% (v/v) glicerol, 20% (v/v) β mercaptoetanol, 8% (p/v) SDS y 0.015% (p/v) azul de bromofenol y se hirvieron durante 5 minutos.

Los marcadores de peso molecular fueron: β galactosidasa (116.4kDa), Fructosa 6 fosfato kinasa (85.2kDa), Glutamato Deshidrogenasa (55.6kDa) y Aldolasa (39.2kDa).

La electroforesis se desarrolló a corriente constante (15mA/gel para el gel concentrador y 30mA/gel para el gel separador). Por último, de ser necesario, el gel se tiñó con una solución de azul Coomassie R-250 al 0.1% (p/v) en isopropanol-acético (25:10) y se destiñó con una solución de metanol-acético (50:10) en agua.

Material y métodos

3.10.2. Electroforesis de DNA.

La separación electroforética de plásmidos y fragmentos de DNA se hizo en geles de agarosa al 1% usando *buffer* TAE como *buffer* de corrida. Como marcador se usó el DNA del fago λ cortado con las enzimas HindIII; HindIII / EcoR1 y PstI. La electroforesis se desarrolló en cámaras horizontales para geles sumergidos de Hoefer Scientific Instruments a voltaje constante de 60 volts.

Cuando fue necesario, los fragmentos de DNA se separaron por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 5% usando como *buffer* de corrida TBE. La electroforesis se realizó a una intensidad constante de 15mA/gel en una cámara vertical (Mighty Small II de Hoefer Scientific Instruments).

3.11. Obtención de anticuerpos policlonales anti-PAL.

Los anticuerpos anti-PAL utilizados fueron proporcionados por la M. en C. Katty Juárez López². Estos anticuerpos se obtuvieron mediante la inmunización de conejos Nueva Zelanda de 1.5Kg de peso con la PAL de *Rhodotorula glutinis*.

Los anticuerpos anti PAL de *R. glutinis* se purificaron mediante el método descrito por Harlow *et al.* en 1988; la adsorción se efectuó sobre la proteína homóloga de *S. pararoseus* inmovilizada en nitrocelulosa. Los anticuerpos se diluyeron (1:2.5) con TBS previo a su utilización.

3.12. Inmunodetección de la PAL en experimentos tipo Western blot.

Los extractos proteicos obtenidos de hipocotilos inducidos se separaron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes. La transferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa se efectuó empleando el equipo de la serie TE (transphor electrophoresis) de Hoefer Scientific Instruments bajo las siguientes condiciones: Buffer de transferencia [25mM Tris-190mM glicina pH 8.3 y 20% (v/v) metanol]; durante un tiempo de transferencia de por lo menos 2 horas a una corriente constante de 200mA/gel. La transferencia se comprobó mediante la tinción de los filtros sumergiéndolos durante 1 min en una solución de Ponceau S preparada al 0.2% (p/v) en 3% (p/v) ácido tricloroacético . Posteriormente el colorante se eliminó con agua destilada.

El revelado del antígeno (PAL) se efectuó mediante la técnica de la fosfatasa alcalina siguiendo el protocolo sugerido por Sambrook en 1989. Como controles se utilizaron la PAL de *R. glutinis* y *S. pararoseus*.

² Instituto de Investigaciones Biomédicas. Departamento de Biología Molecular. Lab. Dr. Luis Servín González

RESULTADOS

Resultados

Ensayo de la especificidad de los anticuerpos dirigidos contra la PAL de *R. glutinis* y purificación de los mismos.

Partiendo del hecho de que la fenilalanina amonio liasa (PAL) es una enzima conservada, se decidió probar si los anticuerpos dirigidos contra la PAL de *R. glutinis* eran capaces de reconocer a la PAL de diferentes orígenes; de ser así, utilizarlos para la inmunoselección de la PAL en un banco de expresión de frijol.

El ensayo del reconocimiento de los anticuerpos dirigidos contra la PAL de *R. glutinis* (dilución 1:1000) a la PAL de *S. pararoseus* se efectuó con 0.5µg de enzima recién purificada. Como se muestra en la Figura 6 los anticuerpos contra la PAL de *R. glutinis* fueron capaces de reconocer a la enzima de *S. pararoseus*. El siguiente paso consistió en comprobar la especificidad de los anticuerpos en extractos crudos de frijol, el ensayo se realizó con 20µg de extracto crudo proveniente de hipocotilos inducidos con luz ultravioleta y por corte; adicionalmente se incluyeron en la electroforesis 0.5µg de la enzima comercial de *R. glutinis* (Figura 7, carril 3) y purificada de *S. pararoseus* (Figura 7, carril 4); nuevamente en el ensayo inmunológico tipo western blot podemos observar que en la dilución 1:1000 se obtiene una señal clara y específica para la PAL, permitiéndonos reconocer a la PAL en 20µg de proteína total provenientes de un extracto crudo de hipocotilo inducido (Figura 7, carril 2), por lo que se concluye que los anticuerpos presentan una alta afinidad hacia la PAL de frijol. Experimentando con otras concentraciones del anticuerpo encontramos que a diluciones mayores la señal se debilita hasta perderse en la dilución 1:5000; a diluciones menores la especificidad hacia la PAL disminuye habiendo reconocimiento de muchas más proteínas. Es evidente que el anticuerpo contra la PAL de *R. glutinis* reconoce, en el caso de las enzimas de *R. glutinis* y *S. pararoseus*, a la PAL y a algunos otros polipéptidos con un patrón semejante en ambas proteínas (Figura 7, carriles 3 y 4). Las enzimas se mantuvieron a -20°C hasta por tres meses, por lo que es muy probable que estas se hubieran degradado y que las bandas que aparecen correspondieran sobre todo a los productos de su degradación; apoya esta hipótesis el hecho de que en el ensayo previo, con la PAL de *S. pararoseus*, efectuado bajo las mismas condiciones no hay reconocimiento más que de la banda correspondiente a la PAL (Figura 6, carriles 2 y 3).

Los resultados obtenidos en los experimentos anteriores nos indicaron que la PAL proveniente de la levadura (*R. glutinis*) comparte ciertos epítopes con sus homólogas en el frijol y *S. pararoseus*. Los anticuerpos reconocieron, tanto a la proteína pura, como a los productos de su degradación. Por otro lado, se observó que en los hipocotilos inducidos está presente la subunidad de 83kDa, el peso molecular fue calculado a partir de las electroforesis en geles al 10% poliacrilamida bajo condiciones

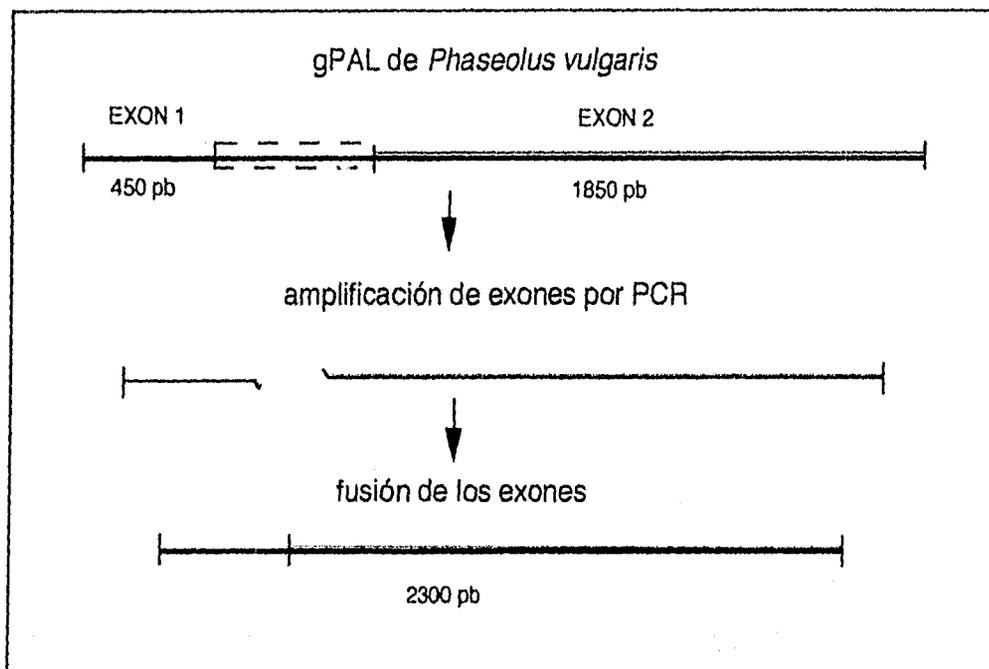


Figura 5. Representación esquemática de la estrategia seguida para obtener el gen de PAL de *P.vulgaris* a expresarse en *E. coli*.

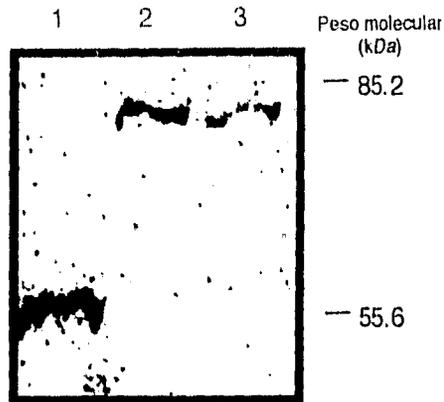


Figura 6. Ensayo del reconocimiento de la PAL de *S. pararoseus*. Se efectuó una prueba inmunológica *western blot* utilizando los anticuerpos dirigidos contra la PAL de *R. glutinis* (dilución 1:1000). Carril 1, Marcador de peso; carril 2, 0.5 μ g de PAL de *S. pararoseus* recién purificada (F102); carril 3, 0.5 μ g de PAL de *S. pararoseus* recién purificada (F103).

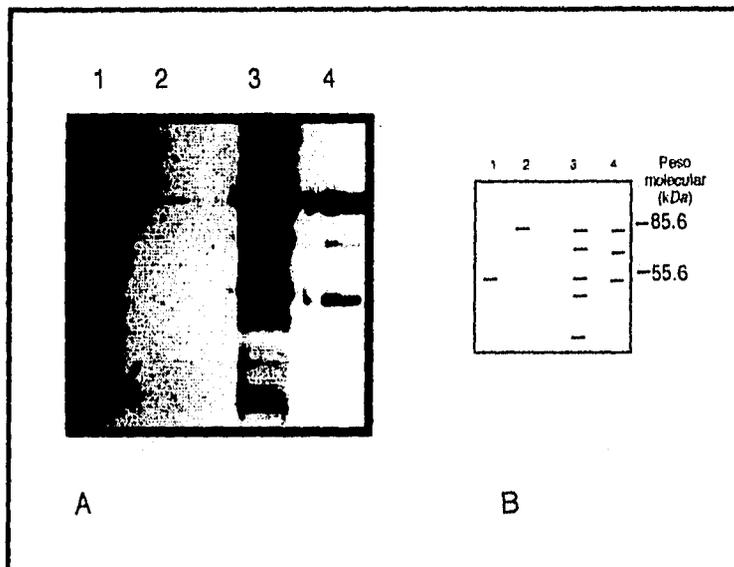


Figura 7A. Ensayo del reconocimiento de la PAL en extracto crudo de frijol, proveniente de hipocotilos inducidos. Se efectuó un ensayo inmunológico del tipo *western blot* utilizando los anticuerpos dirigidos contra la PAL de *R. glutinis* (dilución 1:1000) en el cual es posible observar que los anticuerpos contra la PAL de *R. glutinis* son capaces de reconocer a las enzimas de frijol y de *S. pararoseus*. Carril 1, marcador de peso; carril 2, extracto proteico de *Phaseolus vulgaris* (20 μ g); carril 3, Proteína comercial de *Rhodotorula glutinis* (0.5 μ g); carril 4, Proteína purificada de *Sporidiobolus pararoseus* (0.5 μ g de F102). 7B. Representación esquemática de 7A resaltando las bandas observadas.

Resultados

desnaturalizantes. Esta forma de la PAL se ha identificado como la especie que se expresa en estado basal, el hecho de que sea la forma que se identifica en hipocotilo inducido podría deberse a ello o podría ser que los anticuerpos contra la PAL de la levadura tengan una mayor afinidad por esta forma (que por otro lado de las PAL reportadas en frijol es la menos semejante).

Para comprobar si en efecto las bandas observadas eran producto de la degradación de la PAL y con el objeto de dirigir la reacción de los anticuerpos hacia el reconocimiento de las especies sin degradar, se procedió a purificarlos utilizando la proteína pura de *S. pararoseus*. Posteriormente los anticuerpos purificados se diluyeron (1:2.5) y se hicieron ensayos inmunológicos (*western blot*) con diferente concentración de extractos crudos procedentes de nódulos de frijol de 15 días de edad (para investigar desde que concentración de proteína total era posible identificar a la PAL), con extracto celular de la cepa *E. coli* XL1 Blue MRF' (para asegurarnos de que no habría interferencia con alguna proteína propia de la bacteria al utilizar los anticuerpos en la búsqueda en el banco de expresión) y con la proteína de *S. pararoseus* (testigo). La figura 8, muestra que los anticuerpos anti-PAL no reconocieron proteínas provenientes de la cepa de *E. coli* XL1 Blue MRF' (Figura 8, carril 9) por lo que se decidió utilizarlos para efectuar la búsqueda de las clonas de PAL en el banco de expresión. Además, los anticuerpos purificados continuaron identificando el mismo patrón de bandas en la electroforesis de la enzima de *S. pararoseus* (Figura 8, carril 1), por lo cual se consideró que efectivamente éstas provienen de la degradación de la PAL. En el caso de los extractos provenientes de nódulo, los anticuerpos fueron capaces de reconocer a la PAL en 18µg de proteína total y en 75µg ya se comenzaron a observar las bandas correspondientes a la degradación de la enzima (el patrón de degradación corresponde al presentado tanto en la PAL de *R. glutinis* como la de *S. pararoseus*). Adicionalmente, los pesos moleculares calculados a partir del electroferograma (84, 77, 55, 50kDa), correspondieron con los calculados por Bolwell para la PAL del frijol y sus productos de degradación (70, 53 y 46kDa) (Bolwell, 1985b; Bolwell, 1989). De aquí concluimos que los anticuerpos dirigidos contra la PAL de *R. glutinis* (purificados con la banda de 85kDa de la PAL de *S. pararoseus*) presentan cierta especificidad hacia la PAL del frijol y que además de identificar a la enzima, son capaces de reconocer a los productos de la degradación de ésta y por lo cual podían usarse en la inmunoselección de la PAL.



Figura 8. Ensayo de reconocimiento de la PAL en nódulos de frijol de 15 días de edad.

Western blot de la PAL de frijol utilizando anticuerpos contra la enzima de *R. glutinis* purificados (dilución 1:2.5). Se probaron diferentes concentraciones de extracto de nódulo de frijol de 15 días de edad. Carril 1, PAL de *S. paraseus* (0.5µg de F102); carriles 2-7, 9, 18, 36, 75, 150, 150µg de proteína total respectivamente; carril 8, marcador de peso molecular; carril 9, extracto celular de *E. coli*. Los carriles 7 y 8 fueron revelados con azul de coomassie.

Resultados

Inmunoselección de la PAL en un banco de expresión de cDNA proveniente de nódulos de frijol de 15 días de edad.

La búsqueda del gen en el banco de expresión se realizó empleando el anticuerpo anti-PAL de *R. glutinis*, purificado con la PAL de *S. paraseus* (dilución 1:2.5). Se muestrearon 300 000ufp en total, de las cuales se obtuvieron 17 probables positivas, aún cuando la señal obtenida con el anticuerpo fue muy débil, lo cual, probablemente se debió a una baja expresión de la proteína en este sistema. Al intentar el aislamiento de las placas positivas en las siguientes rondas de purificación, el resultado en todos los ensayos no fue el esperado ya que el porcentaje de éstas no se incrementó. Cuando se realizaron ensayos inmunológicos *western blot* (modalidad en rendija) con extractos provenientes de la propagación de los fagos en medio líquido inducidos con IPTG, no se detectó la presencia de la PAL. Partiendo del conocimiento de que los anticuerpos reconocen a la PAL y de que en nódulo hay expresión de ella, no hay motivo aparente para que la inmunoselección no funcionara. Además, investigaciones recientes han mostrado que es posible expresar la PAL en *E. coli* sin ningún problema (Appert, 1994), lo que nos hace pensar que en el banco de expresión deben existir algunas clonas que expresen la PAL. Actualmente, después de haber muestreado ese mismo banco con una sonda de DNA homóloga de gPAL, consideramos que para poder aislar una clona con el gen completo de la PAL y en el marco de lectura correcto en el sistema empleado, es necesario aumentar la población muestreada por lo menos a 600 000ufp para aislar 4 clonas de PAL con un tamaño lo suficientemente grande como para contener al gen completo.

Alineamiento de secuencias de la PAL.

El alineamiento de las secuencias de la PAL depositadas en el banco de datos "*GenBank*", como se observa en el dendrograma presentado en la figura 9, muestra que la enzima se ha mantenido sin muchas modificaciones a lo largo de la evolución, distinguiéndose claramente la familia de las leguminosas, de las solanáceas y de las levaduras. Así mismo, es posible observar, en algunos casos, que existe una mayor similitud entre proteínas de diferentes organismos que entre las subunidades de una misma especie. Como ejemplo presentamos la PAL2 y la PAL3 de *Phaseolus vulgaris*, en donde incluso la PAL3 difiere del patrón correspondiente a las leguminosas, lo que nos indica que la duplicación del gen debió efectuarse antes de la formación de las plantas vasculares.

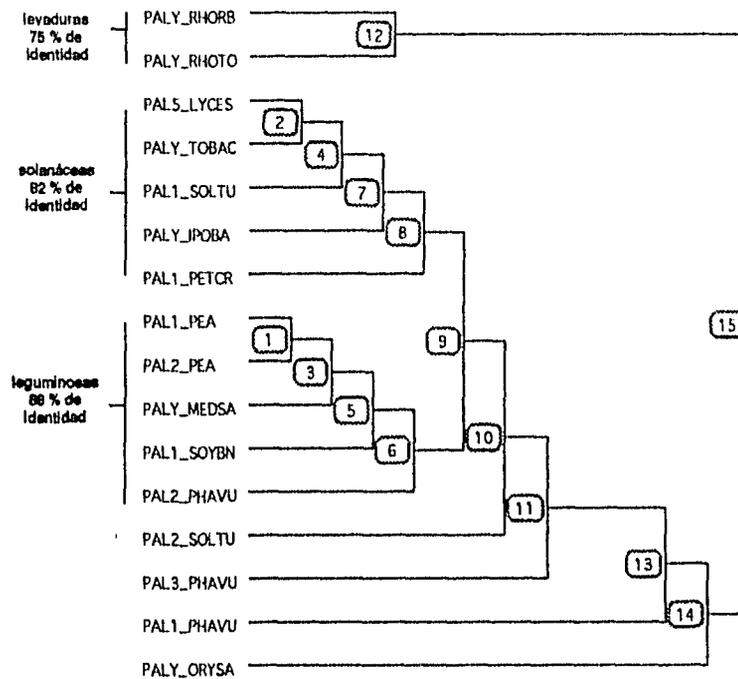


Figura 9. Dendrograma que ilustra la relación entre las secuencias de la Fenilalanina amonio liasa (PAL) de diferentes orígenes realizado con el programa *Geneworks*. La nomenclatura esta dada por el número de acceso en el Gene Bank, en donde las claves corresponden a: PALY_RHORB, *Rhodotorula rubra*; PALY_RHOTO, *Rhodospiridium toruloides*; PAL5_LYCES, Tomate; PALY_TOBAC, Tabaco; PAL1_SOLTU, Papa; PALY_IPOBA, Papa; PAL1_PETCR, Perejil; PAL1_PEA, Chicharo; PAL2_PEA, Chicharo, PALY_MEDSA, Alfalfa; PAL1_SOYBN, Soya; PAL2_PHAVU, Frijol; PAL2_SOLTU, Papa; PAL3_PHAVU, Frijol; PAL1_PHAVU, Frijol; PALY_ORYSA, Arroz.

Obtención de una sonda para identificar la PAL utilizando el método de amplificación por PCR .

La secuencia de los oligonucleótidos se estableció a partir de la de gPAL2. Se adoptó esta estrategia por varias razones: a) por que la actividad específica lograda en PAL2 ha sido de las mayores (3.26 y 0.340U mg⁻¹ en hoja y en cultivo de células en suspensión); b) debido a que la secuencia de gPAL3 se aleja un poco de la del grupo de las leguminosas (tal como se observa en la Figura 9) y de usarla como molde podría hacer mas específica la reacción hacia la amplificación de esta única especie; c) porque se desconoce la secuencia del primer exón de gPAL1; y d) por que en los tres genes de PAL el segundo exón esta muy conservado. Fue así como se pensó dirigir nuestro trabajo hacia la obtención del cDNA de la PAL1 y/o de la PAL2, con objeto de lograr aislar el cDNA de la proteína de 83kDa (de la clase II) y/o los cDNAs de las proteínas de 77kDa (de la clase I o de la clase II). Por otro lado, considerando la similitud que existe entre la secuencia de los genes de la PAL no se descartaba la posibilidad de poder amplificar gPAL3 con los oligos obtenidos de la secuencia de gPAL2.

Se construyeron cuatro oligonucleótidos, dos de ellos delimitan al gen de la PAL (Figura 4, oligonucleótidos PAL48 y PAL2215). Estos oligonucleótidos se eligieron con la idea de poder amplificar el cDNA completo, a partir de mRNA proveniente de tejido inducido. El otro par de oligonucleótidos elegidos se unen en el extremo 3' del primer exón (oligonucleótido PAL463) y en 5' del segundo exón (oligonucleótido PAL380) y se utilizaron, junto con los anteriores, en la amplificación por separado de los exones, para posteriormente, obtener el gen de la PAL mediante una reacción de fusión ó bien, servir como sondas específicas.

Se efectuó un ensayo de hibridación *northern blot* en la modalidad de rendija con la finalidad de comprobar que los oligonucleótidos seleccionados eran capaces de reconocer al transcrito de la PAL. Además de investigar si la inducción de la PAL en los hipocotilos tratados con luz UV y corte había sido efectiva, así como también establecer la concentración de RNA total que se utilizaría en las reacciones de PCR. Se colocaron de 20 a 200µg de RNA total por pozo, obtenido a los tiempos indicados (Figura 10); como sondas, se utilizaron los oligonucleótidos PAL48 y PAL2215. La figura 10, muestra que ambos oligonucleótidos hibridaron con el RNA y que desde los 20µg de RNA total hubo reacción. De estos resultados concluimos lo siguiente: a) que los oligonucleótidos fueron capaces de reconocer alguna secuencia presente en el RNA aislado de hipocotilos inducidos; b) que el tratamiento de inducción empleado fue efectivo, pues se observó un aumento en la señal de los oligonucleótidos por µg de RNA total a los tiempos señalados (indicando que la secuencia reconocida se comporta como lo haría la PAL); c) que la reacción de transcripción reversa podía efectuarse a partir de 20µg de RNA total.

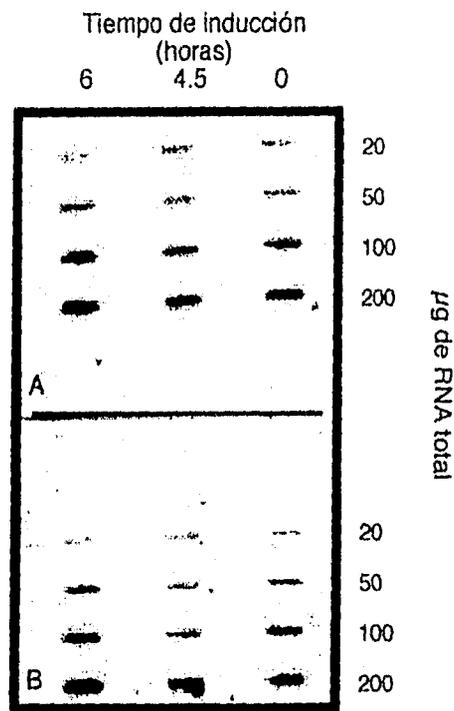


Figura 10. Ensayo del reconocimiento de los mRNA de la PAL por los oligonucleótidos (PAL48 y PAL2215) en RNA total proveniente de hipocotilos tratados con luz ultravioleta y corte. Prueba de hibridación *northern blot* en la modalidad de rendija. Se colocaron diferentes concentraciones de RNA total obtenido de hipocotilos inducidos a las 0, 4.5 y 6 horas de inducción.
 A. Hibridación con el oligonucleótido PAL48.
 B. Hibridación con el oligonucleótido PAL2215.

Resultados

No obstante que se probaron diferentes condiciones para amplificar los genes a partir de RNA total (reacción de transcripción reversa acoplada a PCR), únicamente fue posible obtener la amplificación inespecífica de algún producto bajo las siguientes condiciones: la reacción de transcripción reversa se efectuó con 20µg de RNA total (obtenido de hipocotilos inducidos con luz ultravioleta y corte por 6 horas); la reacción de amplificación requirió de 2.5mM de MgCl₂ y un *buffer* que contenía Tritón X-100. En vista de ello, suponemos que la reacción, en el caso de la amplificación del cDNA de la PAL, podría no haberse efectuado con éxito debido a la no existencia de cDNAs que contuvieran los dos sitios de reconncimiento de los oligonucleótidos específicos para gPAL y/o a que en el mRNA correspondiente a la enzima existiera una estructura secundaria que evitó la unión de alguno de los oligonucleótidos.

La amplificación por separado de los exones, empleando como molde DNA genómico, se logró establecer después de modificar en varias ocasiones las condiciones de la reacción. Principalmente, se probaron diferentes concentraciones de MgCl₂(1.0mM a 5mM), diferentes *buffers* y diferentes concentraciones de DNA (2 a 4µg). La reacción estuvo gobernada por la presencia de 2mM MgCl₂ y de 1% Tritón X-100 y se efectuó mejor con 4µg de DNA genómico, 30pmolas de oligonucleótidos, 100nM de dNTPs. La amplificación para ambos exones resultó ser muy específica. Se logró amplificar el primer exón de la PAL, obteniendo un fragmento de aproximadamente 450pb (Figura 11, carril 6) utilizando como iniciadores a los oligonucleótidos PAL48 y PAL463; así como el segundo exón de PAL produciendo un fragmento de aproximadamente 1850pb (Figura 11, carril 7) con los oligonucleótidos PAL380 y PAL2215 (las condiciones de la reacción de amplificación se especifican en materiales y métodos). Para investigar a qué clase correspondía el producto de la amplificación, se seleccionaron una serie de enzimas de restricción de acuerdo al patrón de restricción de las clases de la PAL de frijol identificadas. En la figura 12 se muestran los mapas de restricción para cada uno de los genes de PAL de frijol reportados. La figura 13 corresponde a una electroforesis de las digestiones efectuadas con las enzimas de restricción seleccionadas. De estos resultados únicamente podemos sugerir, en el caso del fragmento de 450pb, que este probablemente pertenezca a la clase II, ya que la enzima PvuII no produjo ningún corte (indicativo de la clase III) y la secuencia de gPAL1 en esta región no se conoce. En el caso del segundo exón (fragmento de 1850pb) se puede concluir que corresponde a gPAL2, pues no hubo cortes con SacI (indicativo de gPAL1), ni con KpnI, EcoRI ni con PvuII (que cortan a gPAL3). Por otra parte las enzimas HindIII y NcoI (que pueden actuar sobre los tres genes) sí cortaron generando fragmentos de los tamaños esperados en la clase II.

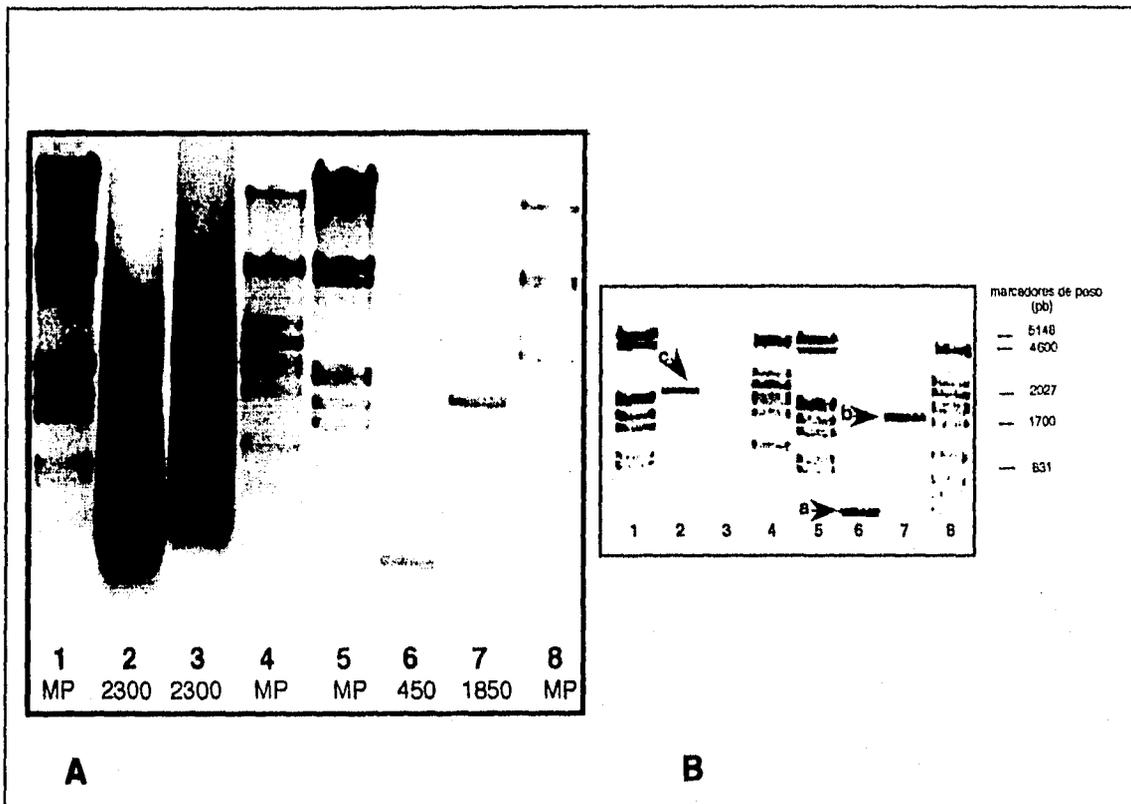


Figura 11A. Electroforesis en agarosa 1% de los productos de amplificación por PCR. Carril 1 y 5, marcadores de peso (bacteriófago I HindIII-EcoRI); carril 2 y 3, reacciones de fusión; carril 4 y 8, marcadores de peso (bacteriófago I PstI); carril 6, amplificación del primer exón; carril 7, amplificación de segundo exón.

11B. Acentuación de la imagen de 11A para mostrar las bandas de interés. Las flechas señalan: a. Primer exón(450pb); b. Segundo exón(1850pb) y c. Producto de fusión (2300pb). MP, marcador de peso.

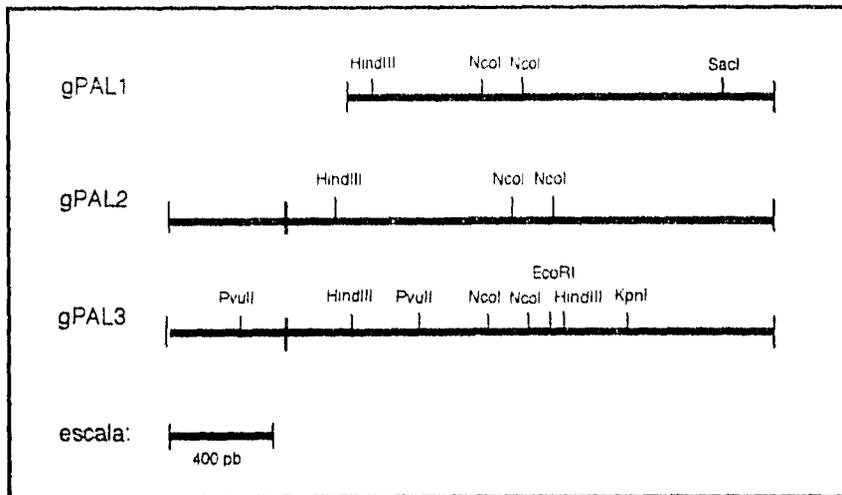


Figura 12. Mapa de restricción de las tres familias de genes para la PAL del frijol.

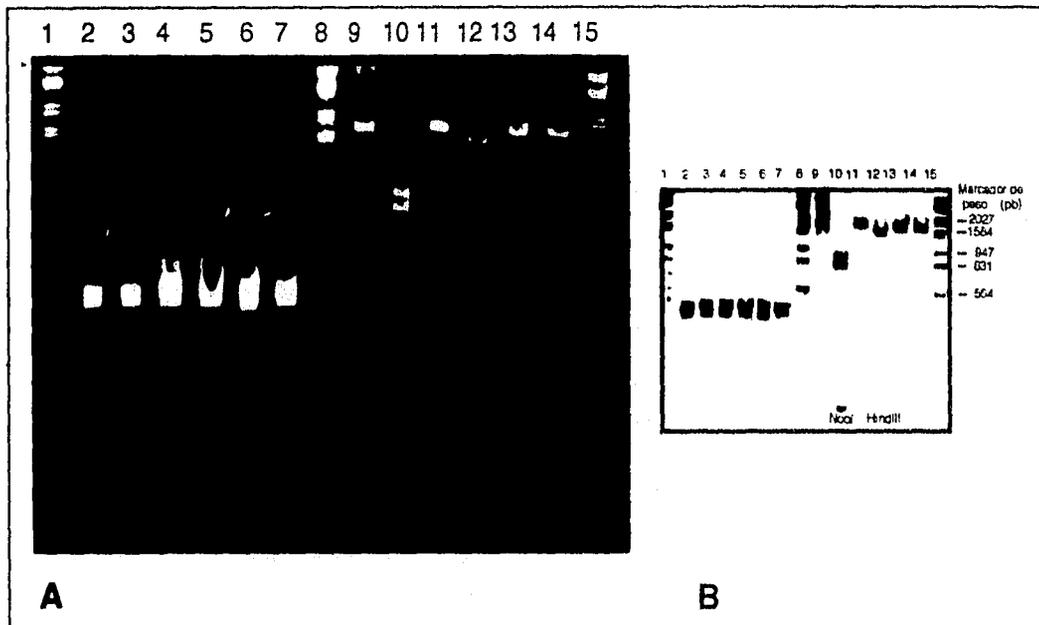


Figura 13A. Electroforesis en gel de poliacrilamida 5% TBE de las digestiones del fragmento de 450pb (exón 1) y del fragmento de 1850pb (exón 2). carril 1, 8 y 15, Marcadores de peso molecular (bacteriófago I Hind III-EcoR1); carril 2-7, fragmento de 450pb digerido con PvuII, NcoI, SacI, HindIII, KpnI y EcoRI respectivamente; carril 9-14, fragmento de 1859pb digerido con PvuII, NcoI, SacI, HindIII, KpnI y EcoRI respectivamente. 13B. Acentuación de la imagen presentada en 13A para mostrar las bandas de Interés.

Resultados

Búsqueda de los genes de la PAL en el banco de expresión λ zap con la sonda de PAL obtenida por PCR.

Se realizó la búsqueda en el banco de expresión partiendo de 150 000ufp, empleando como sonda los exones amplificados por PCR marcados con ^{32}P .

Durante el primer muestreo se aislaron 7 placas positivas con la sonda correspondiente al segundo exón (1850pb), no hubo reconocimiento de ellas por la sonda correspondiente al primer exón (450pb). Se continuó con el aislamiento de las placas positivas efectuando dos rondas de purificación obteniendo por último 3 clonas diferentes. De las clonas positivas una (c63-PAL) contenía un inserto mayor al tamaño de la sonda empleada (Figura 16, carriles 4 y 6 contra carril 2) y cercano a 2500 pares de bases, tamaño reportado para el RNA mensajero de la PAL (Gilbert, 1985; Edwards, 1985), por lo que se consideró un buen candidato para contener el gen completo. Se subclonó el plásmido en XL1Blue MRF⁺ y se caracterizó éste electroforéticamente. En la figura 15 se muestra el inserto de aproximadamente 2300pb (A) y la prueba de hibridación *southern blot* del mismo utilizando como sonda el fragmento de 1850pb (B). La secuencia del inserto (c63-PAL) desde el extremo 5' mostró un 95% de identidad con el correspondiente al gen PAL1 (Figura 17), en la región secuenciada se encuentran los dos sitios NcoII característicos de los genes de PAL (Figura 12). Sin embargo, la clona está incompleta ya que la secuencia a partir del extremo 5' pertenece al segundo exón. El extremo 3' se intentó secuenciar sin resultado, ya que utilizando como iniciador al promotor T7, después de la lectura del poliA (de más de 50 pb) la reacción se paró. Se modificaron las condiciones de la reacción de secuenciación y se intentó secuenciar con el mismo iniciador y cambiándolo por el oligonucleótido PAL2196, que complementa con una región muy conservada de PAL localizada a 15 pares de bases del codón de terminación, la reacción continuó presentando un alto fuerte, probablemente esto se deba a una estructura secundaria que no logra eliminarse bajo las condiciones probadas.

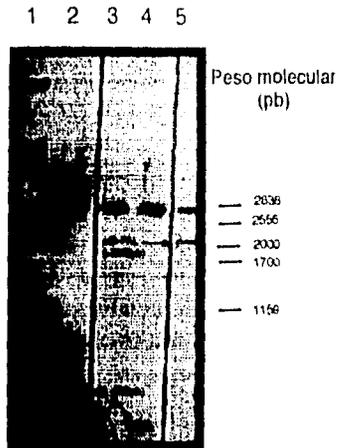


Figura 14. Electroforesis de los plásmidos de las clonas obtenidas a partir del banco de expresión de nódulos de frijol de 15 días de edad utilizando como sonda el 2º exón de gPAL2. Los plásmidos se digirieron con las enzimas EcoRI y XhoI para liberar a los Insertos. Carril 1, marcador de peso (bacteriófago I PstI); carril 2, digestión del plásmido de la clona c9; carril 3, plásmido Bluescript pSK+; carril 4, digestión del plásmido de la clona c64; carril 5, digestión del plásmido de la clona c63-PAL.

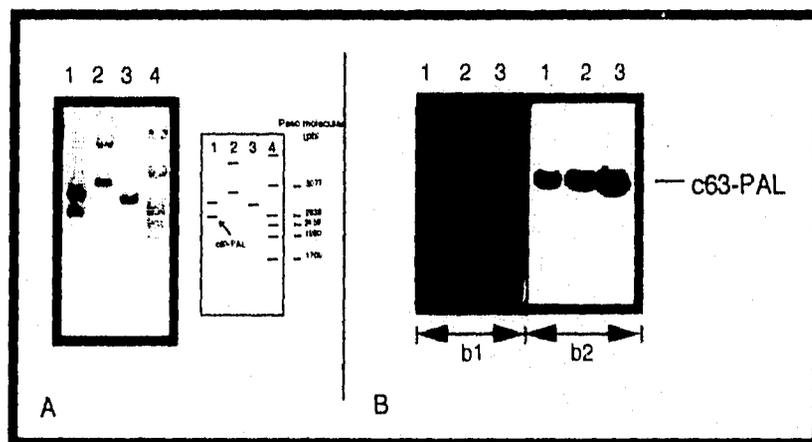


Figura 15. Electroforesis en agarosa 1% y ensayo de hibridación del tipo southern blot de la clona c63-PAL. Panel A. carril 1, plásmido de c63-PAL digerido con EcoRI y XhoI; carril 2, plásmido de c63-PAL sin digerir; carril 3, plásmido Bluescript pSK+ linearizado; carril 4, marcador de peso (bacteriófago I PstI). Panel B. b1. Electroforesis en agarosa 1% del plásmido de la clona c63-PAL (carriles 1-3) digerido con EcoRI y XhoI; b2. Autorradigrafía de la hibridación de (b1) utilizando como sonda el 2º exón de gPAL2.

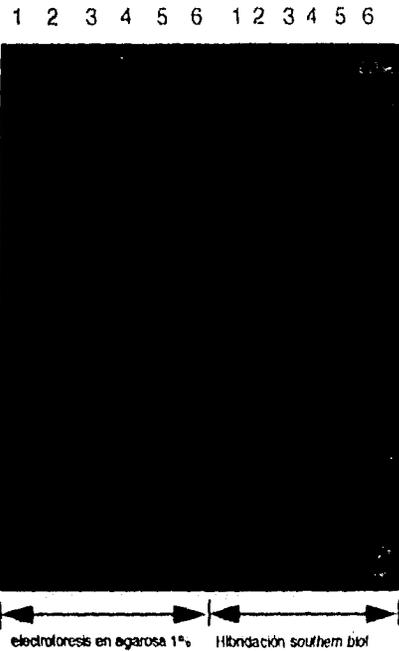


Figura 16. *Southern blot* de los exones de gPAL amplificados y del plásmido de la clona c63-PAL. Electroforesis en agarosa al 1% . Del lado derecho se muestra la autorradiografía correspondiente a la electroforesis del lado izquierdo. Carril 1, marcador de peso (1 pst); carril 2, fragmentos amplificados por PCR (450 y 1850pb); carril 3 y 5, plásmido de c63-PAL sin digerir; carril 4 y 6, plásmido de c63-PAL (digerido con EcoRI y XhoI). El inserto de c63-PAL es mayor al fragmento de PAL de 1850pb.

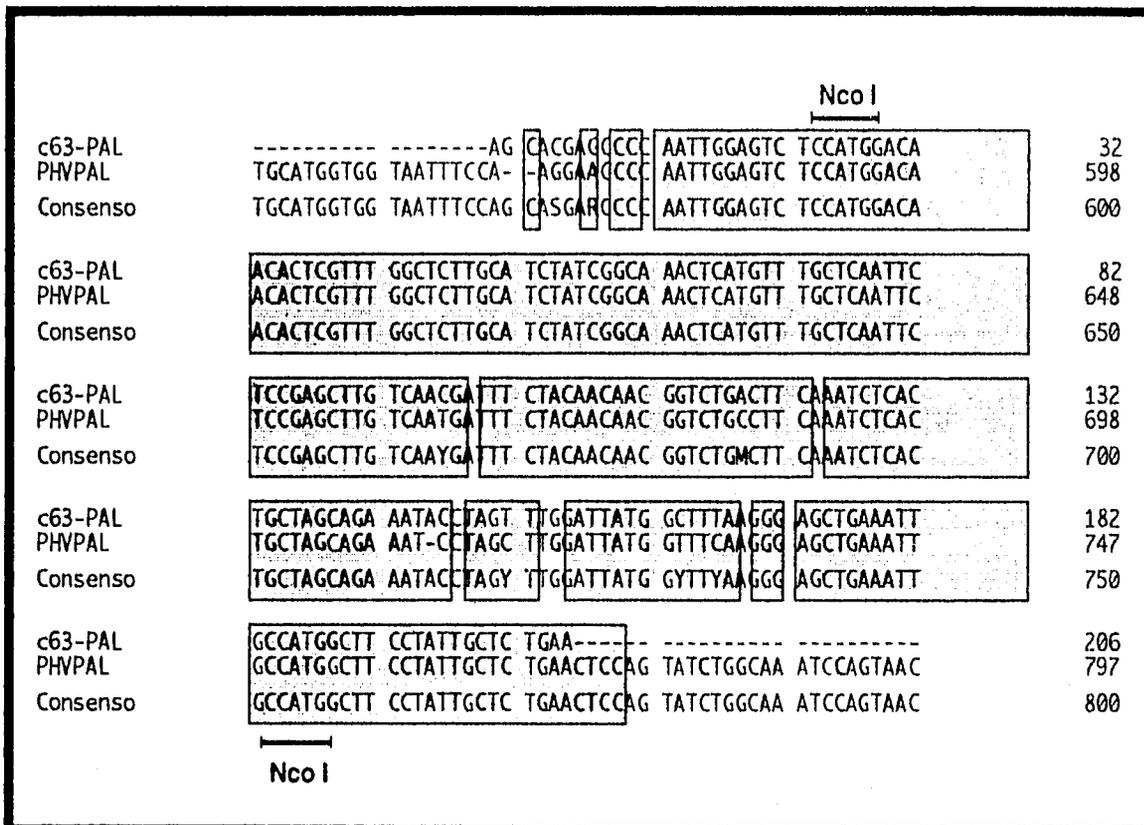


Figura 17. Alineamiento de la secuencia nucleotídica parcial de c63-PAL y secuencia de la región correspondiente en gPAL1. Las secuencias poseen un 95% de identidad. En la secuencia leída se encuentran los dos sitios de restricción para la enzima NcoI.

Resultados

Reacción de fusión de los exones de PAL2 mediante amplificación por PCR.

La reacción de fusión se logró efectuar en una forma inespecífica (en el *buffer* con y sin tritón X-100), como se muestra en la Figura 11 (carril 2) el uso del *buffer* con Tritón X-100 nuevamente favorece la reacción hacia el producto deseado, consideramos que la reacción podría hacerse más específica si se aumentan en 5 nucleótidos cada uno de los oligos centrales (PAL463 y PAL380) pues los exones inicialmente sólo traslapan en 20 pares de bases (Figuras 5 y 12) y son estos los que actúan como *primers*, en los primeros 8 ciclos de amplificación, presumimos que este aumento logrará favorecer la reacción de fusión hacia la formación de una sola especie (2300pb). Por otro lado, los sitios de restricción que se colocaron en los oligonucleótidos de los extremos (PAL48 y PAL2215) pudieron favorecer la formación de concalámeros provocando que la reacción se efectuara de una manera tan inespecífica. Es necesario recalcar que la reacción de fusión se llevó a cabo y hubo amplificación de un producto del peso esperado. No hemos logrado clonar en pSK+ el producto de fusión obtenido por la reacción de PCR, ni tampoco hemos logrado reamplificar éste.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

DISCUSIÓN

Discusión

La estrategia utilizada para conducir los resultados hacia la obtención de gPAL1 y gPAL2 fue efectiva. El uso de la técnica de amplificación por PCR nos permitió el aislamiento del segundo exón de gPAL2 y posiblemente el primer exón de gPAL2 por separado y, la aplicación de éstos como sondas homólogas hicieron posible la selección de una clona c63-PAL (de la clase 1) de más de 2000pb, en un banco de expresión. Adicionalmente, los exones obtenidos (sondas de la PAL) se pueden utilizar como marcadores del estado fisiológico de la planta sometida a diferentes condiciones de estrés ambiental.

Se aislaron tres clonas de la PAL en una población de 150 000u_fp al utilizar sondas homólogas de DNA (Figura 14). Por lo que, en una población de 300 000u_fp se podrían identificar únicamente 2 clonas con el marco de lectura correcto. Es decir, que mediante el uso de anticuerpos, bajo las condiciones ensayadas y considerando que los epítopes que se reconocen estuvieran presentes en todas las clonas que respetaran el marco de lectura, lo más que podría lograrse sería el aislamiento de 2 clonas positivas. Por lo que, proponemos que para la inmunoselección de genes de PAL ó relacionados al utilizar este banco de expresión o algún otro banco, con características similares al trabajado, es necesario muestrear cuando menos una población de 600 000u_fp para lograr así identificar al menos 4 clonas positivas.

La inducción de los hipocotilos por corte y con luz ultravioleta fue efectiva, sin embargo, no fue posible aislar ningún gen de la PAL a partir del RNA total obtenido de este tejido. Por los resultados en experimentos anteriores se ha calculado que, en un µg de RNA total, proveniente de hipocotilos inducidos por daño mecánico, existe aproximadamente un ng de RNA correspondiente al transcrito total de la PAL (Liang, 1989). Además, en *Arabidopsis thaliana* es posible amplificar genes de la PAL a partir de 2µg de RNA total aislados de raíces (Wanner, 1995); por ello se considera que las muestras de RNA total con las que se trabajó (de 5 a 20µg de RNA) contenían suficiente mRNA de PAL como para poder llevar a cabo la reacción de transcripción reversa acoplada a la amplificación por PCR. El problema probablemente fue que, en el extremo 3' de los transcritos de la PAL del frijol pudo existir la capacidad de adoptar una estructura secundaria estable aún a la temperatura de trabajo, que evitó se efectuara la reacción de transcripción reversa. Este mismo hecho explicaría, cual fué la causa por la que no fué posible secuenciar la clona de PAL1 desde el extremo 3'. Una forma de salvar este obstáculo sería utilizando una DNA polimerasa que resista temperaturas más elevadas en la reacción de secuenciación (del tipo de Taq polimerasa). Otra razón podría ser que aún existiendo suficiente mRNA, la reacción de transcripción reversa no hubiera generado cDNAs completos y entonces estos últimos no contuvieran las secuencias que reconocen los oligonucleótidos [recordemos que los oligonucleótidos

Discusión

flanquean al gen (Figura 4)), esta misma explicación sería válida para los resultados obtenidos al tratar de amplificar al gen de la PAL a través del banco de expresión (no hubo amplificación). Refuerza esta hipótesis el hecho de que utilizando DNA genómico si fue posible amplificar a los exones de gPAL del frijol.

La fenilalanina amonio liasa es una de las enzimas de origen vegetal más estudiada; no obstante, es muy poco lo que se ha logrado saber acerca de su estructura. Existen numerosos estudios realizados para determinar cuáles son sus inhibidores, la especificidad de substratos, la naturaleza de algunos aminoácidos en el sitio catalítico y su participación en el desarrollo y defensa de la planta, pero la información que se ha obtenido con respecto a los sitios de regulación de la enzima, su conformación espacial, como se llevan a cabo las interacciones que puede tener con algunos metabolitos o enzimas involucradas en la biosíntesis de compuestos fenilpropanoides, es muy pobre.

Actualmente la mayoría de los estudios sobre la PAL se enfocan en sus promotores. Mediante la fusión de estos con genes reporteros se ha podido estudiar la expresión diferencial de la PAL en diversos órganos y tejidos que conforman a la planta así como establecer su papel en la expresión de otros genes de la vía fenilpropanoide.

Se sabe que la síntesis *de novo* es un evento muy importante tras la aplicación de un estímulo; pero, por sí misma, ésta no explica la capacidad que posee la enzima para canalizar el flujo de carbono hacia vías de síntesis tan específicas. La regulación del metabolismo secundario es muy compleja, de hecho, es un mecanismo concertado en donde intervienen tanto enzimas lejanas, como la DHAP sintasa, que capta e introduce a dos metabolitos primarios (PEP y E-4P) en la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos, hasta enzimas tan específicas como la ácido caféico-5-hidroxi-felúrico O-metil transferasa, capaz de modificar el contenido y la composición de lignina de una planta (Figura 1). El hecho de que una DHAP y la PAL sean citoplásmicas y que algunas otras enzimas del metabolismo fenilpropanoide se hayan asociado a la membrana del retículo endoplásmico explicaría la capacidad que tiene la planta para canalizar tan eficientemente el ácido *t*-cinámico hacia la producción de un metabolito determinado. De cualquier forma, la PAL debe poseer un mecanismo de comunicación (a nivel de proteína) que le permita distinguir a quién le va a ceder el *t*-cinámico.

El que la estructura y organización genética de los genes de la PAL se conserve en las plantas superiores, sus isoenzimas tengan la capacidad de responder en forma diferencial a los estímulos ambientales y sus constantes cinéticas varíen de una clase a otra, nos conduce a pensar que es posible obtener, mediante el intercambio de exones, enzimas híbridas probablemente activas con características distintas a aquellas que les dieron origen. Mediante el análisis de estas, es posible

Discusión

efectuar la localización de regiones que intervienen en la regulación de la actividad de la enzima. Esta misma técnica, posiblemente permitiría el obtener enzimas no regulables, evitando así la inhibición por retroalimentación. La forma más sencilla de efectuar un intercambio de exones es a través de la amplificación de estos por separado para posteriormente juntarlos mediante una reacción de fusión. En la presente investigación se logró efectuar, en forma específica, la amplificación de los exones de la PAL e inespecíficamente la fusión de éstos. El aumento del tamaño de los oligonucleótidos centrales podría favorecer la fusión ya que de esta manera, la región donde se complementarían ambos exones sería mayor, el primer alineamiento de los exones sería más efectivo y la reacción de extensión de estos sería más eficiente mejorando así los siguientes ciclos de amplificación.

Actualmente y gracias a la clonación por separado de los genes que codifican para la PAL en el perejil, se ha logrado establecer que la información contenida en un gen de la PAL es suficiente para dar origen a una enzima activa. Las constantes cinéticas de las enzimas obtenidas *in vivo* y de los homotetrámeros obtenidos en *E. coli* son diferentes (ver tabla 1 y tabla 2), este hecho es interesante pues indica que de alguna manera la formación de heterotetrámeros está modificando las propiedades cinéticas de la enzima. La actividad lograda al expresar la enzima en *E. coli* ha resultado ser mayor a la obtenida en células inducidas (Schulz, 1989; Appert, 1994).

Estos resultados apoyan el objetivo general de esta investigación y nos hacen pensar que la enzima de frijol, es una candidata idónea para aplicarse en el proceso de formación de L-fenilalanina ó L-fenilalanina metilester con vías a la obtención de aspartamo, ya que ofrece propiedades cinéticas mas atractivas que las enzimas clonadas hasta el momento (la actividad específica final encontrada en la hoja, después de haberlas infectado con un hongo patógeno, es mayor a la reportada en otros organismos (Tabla 2).

Por último, la PAL como modelo de estudio a nivel molecular se presenta muy atractiva, los resultados hasta ahora obtenidos marcan claramente que gran parte de la regulación del metabolismo fenilpropanoide en que la PAL está involucrada, recae no solo en la expresión diferencial de la PAL, sino en los sitios reguladores propios de la enzima, el conocimiento de la estructura terciaria de la PAL, conjuntamente con el análisis de las regiones involucradas en su regulación se presenta como un campo poco explorado que podría ayudar a entender mejor la regulación no solo de esta enzima sino en general del metabolismo secundario en las plantas.

CONCLUSIÓN

Conclusión

En conclusión.

- Se estableció que es posible identificar a la fenilalanina amonio liasa del frijol utilizando anticuerpos obtenidos contra la enzima de la levadura *R. glutinis*.
- Se amplificaron específicamente los exones correspondientes al segundo exón de gPAL2 y posiblemente el primer exón de gPAL2, y mediante su uso se identificó una clona (2300 pares de bases), de la clase I, en un banco de expresión proveniente de mRNA de nódulos de frijol de 15 días de edad. Estos resultados indican que la estrategia utilizada fue adecuada ya que nos permitió dirigir los resultados hacia la obtención de las especies deseadas (gPAL1 y gPAL2).
- Se determinó que la PAL1 está presente en nódulos de frijol de 15 días de edad.
- Se propone la fusión de exones como metodología para obtener genes de la PAL, resaltando la importancia que puede llegar a tener dicha metodología en el estudio de los sitios de regulación de la actividad de esta enzima y en la generación de isoenzimas no regulatorias.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Appert C., E. Logemann, K. Hahlbrock, J. Schmid and N. Amrhein. 1994. Structural and catalytic properties of the four phenylalanine ammonia lyase isoenzymes from parsley (*Petroselinum crispum* Nym.). *Eur. J. Biochem.* 225:491-499.
- Bate N.J., J. Orr, W. Ni, A. Meromi, T. Nadler-Hassar, P. Doerner, R.A. Dixon, C.J. Lamb and Y. Elkind. 1994. Quantitative relationship between phenylalanine ammonia lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 91:7608-7612.
- Bernards M.A. and Lewis N.G. 1992. Alkyl ferulates in wound healing potato tubers. *Phytochem.* 31:3409-3412.
- Bevan M., D. Shufflebottom, K. Edwards, R. Jefferson and W. Schuch. 1989. Tissue- and cell-specific activity of phenylalanine ammonia lyase promoter in transgenic plants. *EMBO J.* 8(7):1899-1906
- Bezanson G.S., D. Desaty, A.V. Emes and L.C. Vining. 1970. Biosynthesis of cinnamide and detection of phenylalanine ammonia lyase in *Streptomyces verticillatus*. *Can. J. Microbiol.* 16:147-151.
- Blins A.N., R. H. Chen, H.N. Wood and D.G. Lynn. 1987. Cell division promoting activity of naturally occurring dehydrodiconiferyl glycosides: Do cell wall components control cell division? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 4:980-984.
- Bolwell G.P., J.N. Bell, C.L. Cramer, W. Schuch, C. J. Lamb and R.A. Dixon. 1985. L-phenylalanine ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris*. *Eur. J. Biochem.* 149:411-419.
- Bolwell G.P., J. Sap, C.L. Cramer, C.J. Lamb, W. Schuch and R.A. Dixon. 1985b. L-phenylalanine ammonia lyase from *Phaseolus vulgaris*: Partial degradation of enzyme subunits in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Acta.* 881:210-222.
- Bolwell G.P., C.L. Cramer, C. J. Lamb, W. Schuch, and R.A. Dixon. 1986. L-phenylalanine ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris*: Modulation of the levels of active enzyme by trans cinammic acid. *Planta* 169:97-107
- Bolwell G.P. and M.W. Rodgers. 1991. L-phenylalanine ammonia lyase from french bean (*Phaseolus vulgaris*). *Biochem J.* 279:231-236.
- Camas J. A. R., 1993. Respuesta de defensa del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a la infección con la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. phaseoli. TESIS. IBT. UNAM.
- Camm E.L. and G.H. N. Towers. 1973. Phenylalanine ammonia lyase (Review articule). *Phytochem.*, 12:961-973.
- Cramer C.L., K. Edwards, M. Dron, X. Liang, S.L. Dildine, G.P. Bolwell, R.A. Dixon, C.J. Lamb and W. Schuch. 1989. Phenylalanine ammonia lyase gene organization and structure. *Plant Mol. Biol.* 12:367-383.

Bibliografía

- Chang T.M.S., L. Bourget and C. Lister. 1995. A new theory of enterorecirculation of amino acids and its use for depleting unwanted amino acids using oral enzyme-artificial cells, as in removing phenylalanine in phenylketonuria., *Art. Cells. Blood Subs. and Immob. Biotech.*, 23(1):1-21.
- D' Cunha G.B., V. Satyanarayan and P.M. Nair. 1994. Novel direct synthesis of L-phenylalanine methyl ester by using *Rhodotorula glutinis* phenylalanine ammonia lyase in an organic-aqueous biphasic system. *Enzyme Microb. Technol.* 16:318-322.
- Da Cunha A. 1988. Purification, characterization and induction of L-phenylalanine ammonia lyase in *Phaseolus vulgaris*. *Eur. J. Biochem.* 178:243-248.
- De Boer L. and L. Dijkhuizen. 1991. Microbial and Enzymatic processes for L-Phenylalanine production. Department of Microbiology. University Groningen. Haren, The Netherlands. pp.1-27.
- Diallinas G and A.K. Kanellis. 1994. A phenylalanine ammonia lyase gene from melon fruit: cDNA cloning, sequence and expression in response to development and wounding. *Plant Mol. Biol.* 26:473-479.
- Dixon R.A. and Füller K.W. 1976. Effect of synthetic auxin reveals on phaseolin production and phenylalanine ammonia lyase activity in tissue cultures of *Phaseolus vulgaris* L. *Physiol. Plant Pathol.* 9:299-312.
- Dixon R.A. and K.W. Fuller. 1978. *Physiol. Plant Pathol.* 12:279-288.
- Dixon R.A., T. Browne and M. Ward. 1980. Modulation of phenylalanine ammonia lyase by pathway intermediates in cell suspension cultures of dwarf french bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Planta.* 150:279-285.
- Dixon R.A., P.M. Dey, D.L. Morphy and I.M. Whitehead. 1981. Dose responses for *Colletotrichum lindemuthianum* elicitor-mediated enzyme induction in french bean cell suspension cultures. *Planta.* 151:272-280.
- Dixon R.A, P.M. Dey, M.A. Lawton and C.J. Lamb. 1983. Phytoalexin induction in french bean. Intercellular transmission of elicitation in cell suspension cultures and hypocotyl sections of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* 71:251-256.
- Dixon R.A and C.J. Lamb. 1990. Molecular communication in Interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41:339-367.
- Dixon R.A and N.L. Paiva. 1995. Stress-Induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell.* 7(7):1095-1097.
- Doong R.L., J.E. Gander, R.J. Ganson and R.A. Jensen. 1992. The cytosolic isoenzyme of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate synthase in *Spinacia oleracea* and other higher plants: Extreme substrate ambiguity and other properties. *Plant. Physiol.* 84:351-360.

Bibliografía

- Dyer W.E., L.M. Henstrand, A.K. Handa and K.M. Harrmann. 1989. Wounding induces the first enzyme of the shikimate pathway in Solanaceae. Proc. Natl.Acad. Sci. USA, 86:7370-7373.
- Ebel J., W.E. Schmidt and R. Loyal. 1984. Phytoalexin synthesis in soybean cells: Elicitor induction of phenylalanine ammonia lyase and chalcone synthase mRNAs and correlation with phytoalexin accumulation. Arch. Biochem. Biophys. 232:240-248.
- Edwards K., C.L. Cramer, G.P. Bolwell, R.A. Dixon, W. Schuch and C.J. Lamb. 1985. Rapid transient induction of phenylalanine ammonia lyase mRNA in elicitor treated bean cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:6731-6735.
- Emes V.A., L.C. Vining. 1970. Partial purification and properties of L-phenylalanine ammonia lyase from *Streptomyces verticillatus*. Can. J. Biochem. 48:613-622.
- Estabrook E.M., and C. Sengupta-Gopalan. 1991. Differential expression of phenylalanine ammonia lyase and chalcone synthase during soybean nodule development. Plant Cell. 3:299-308.
- Faulkner J.D.B., J.G. Anson, M.F. Tuite and N.P. Minton. 1994. High-level expression of the phenylalanine ammonia lyase-encoding gene from *Rhodospiridium toruloides* in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* using a bifunctional expression system. Gene. 143:13-20.
- Fiske M.J. and Kane F. 1984. Regulation of phenylalanine biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. J. Bacteriol. 160(2):676-681.
- Fritz, R.R., D.S. Hodgins and C.W. Abell. 1976. Phenylalanine ammonia lyase. Induction and purification from yeast and clearance in mammals. J.Biol. Chem. 251:4646-4650.
- Faulkner J.D.B., J.G. Anson, M.F. Tuite and N.P. Minton. 1994. High-level expression of the phenylalanine ammonia lyase-encoding gene from *Rhodospiridium toruloides* in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* using a bifunctional expression system. Gene. 143:13-20.
- Ganson R.J, T.A. D'Amato and R.A. Jensen. 1986. The two isoenzyme system of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase in *Nicotiana glauca* and other higher plants. Plant Physiol. 82:203-210.
- García G.M., R.R. Quintero y A. López-Munguía. 1993. Biotecnología Alimentaria. Ed. Limusa. México. pp. 103-124.
- Gilbert H.J., I.N. Clarke, R.K. Gibson, J.R. Stephenson and M. Tully. 1985. Molecular cloning of the phenylalanine ammonia lyase gene from *Rhodospiridium toruloides* in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 161:314-320.

Bibliografía

- Görlach J., H. Raesecke, D. Rentsch, M. Regenass, P. Roy, M. Zala, C. Keel, T. Boller, N. Amrhein and J. Schmid. 1995. Temporally distinct accumulation of transcripts encoding enzymes of the prechorismate pathway in elicitor-treated, cultured tomato cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:3166-3170.
- Hahlbrock K., K.H. Knobloch, F. Kreuzaler, J.R. M. Potts and E. Wellmann. 1976. Coordinated induction and subsequent activity changes of two groups of metabolically interrelated enzymes. *Eur. J. Biochem.* 61:199-206.
- Hahlbrock K and D. Scheel. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:347-369.
- Hanson K.R. and E.A. Havir. 1981. Phenylalanine ammonia lyase: In "The Biochemistry of Plants". Ed. Stumpf P.K. and E.E. Conn., Academic Press. New York, USA. Vol.7, Chap.20., pp.577-625.
- Haslam E. 1993. Shikimic acid: Metabolism and metabolites. Chichester, John Wiley and Sons: Citado por: Herrmann K.M., 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell.* 7:907-919.
- Havir E.A. and K.R. Hanson. 1968. L-phenylalanine ammonia lyase I. Purification and molecular size of the enzyme from potato tubers. *Biochem.* 7(5):1896-1903.
- Havir E.A. and K.R. Hanson. 1968b. L-phenylalanine ammonia lyase II. Mechanism and kinetic properties of the enzyme from potato tubers. *Biochem.* 7(5):1904-1914.
- Havir E.A. and K.R. Hanson. 1981. (72a). L-phenylalanine ammonia lyase (Potato tubers). "This series" 171:575-580.
- Herrmann K.M 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell.* 7:907-919.
- Hodgins S.D, 1971. Yeast phenylalanine ammonia lyase: Purification, properties and the identification of catalytically essential dehydroalanine. *J. Biol. Chem.* 246:2977-2985.
- Howles P.A, T. Arioli and J. Weinman. 1994. Characterization of phenylalanine ammonia lyase multigene family in *Trifolium subterraneum*. *Gene.* 138:87-92.
- Hrazdina G. and A.J. Roy. 1992. Spatial organization of enzymes in Plant Metabolic Pathways. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:241-267.
- Hrazdina G. and G.J. Wagner. 1985. Metabolic pathways as enzyme complexes. Evidence for the synthesis of phenylpropanoids on membrane associated enzyme complexes. *Arch. Biochem. Biophys.* 237:88-100.
- Jacobs M. and P.H. Rubery. 1988. Naturally occurring auxin transport regulators. *Science.* 241:346-349.

Bibliografía

- Jangaard N.O. 1974. The characterization of phenylalanine ammonia lyase from several plant species. *Phytochem.* 13:1765-1768.
- Jones J.D., J.M. Henstrand, A.K. Handa, K.M. Herrmann and S.C. Weller. 1995. Impaired wound induction of DAHP synthase and altered stem development in transgenic potato plants expressing a DAHP synthase antisense construct. *Plant Physiol.* 108.
- Joss H.J. and K. Hahlbrock. 1992. Phenylalanine ammonia lyase in potato (*Solanum tuberosum* L). *Eur. J. Biochem.* 204:621-629.
- Juárez L.K., 1995. Estudio sobre la producción de la enzima fenilalanina amonio liasa de *Streptomyces verticillatus*. TESIS. Facultad de Ciencias, UACPyP del CCH, UNAM, México.
- Kawasaki S., G. Hernández, F. Ilurbe and A. López-Munguía. 1992. Phenylalanine ammonia lyase from *Sporidiobolus pararoseus* and *Rhodosporidium toruloides*: Application for phenylalanine and tyrosine deamination. *W.J. Microbiol. Biotechnol.* 8:406-410.
- Koukol J. and E. Conn. 1961. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. *J. Biol. Chem.* 236(10):2692-2698.
- Laemmli, 1970. *Nature.* 227:680-685.
- Lamb C.J and P.H. Rubery. 1976. Photocontrol of chlorogenic acid biosynthesis in potato tuber discs. *Phytochem.* 15:665-668.
- Lamb C.J and P.H. Rubery. 1976b. Phenylalanine ammonia lyase and cinnamic acid 4-hydroxylase: Product repression of the level of enzyme activity in potato tuber discs. *Planta.* 130:283-290.
- Lamb C.J and R.A. Dixon. 1978. Stimulation of de novo synthesis of PAL during induction of phytoalexin biosynthesis in cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*. *FEBS Lett.* 94(2):277-280.
- Leyva A., X. Liang, J.A. Pintor-Toro, R.A. Dixon and C.J. Lamb. 1992. cis-Element combinations determine phenylalanine ammonia lyase gene tissue-specific expression patterns. *Plant Cell.* 4:263-271.
- Liang X., M. Dron, C.L. Cramer, R.A. Dixon and C.J. Lamb. 1989. Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during plant development and by environmental cues. *J. Biol. Chem.* 264:14486-14492.
- Lols R, A. Dietrich, K. Hahlbrock and W. Schulz. 1989. A phenylalanine ammonia lyase gene from parsley: Structure, regulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements. *EMBO J.* 8: 1641-1648.
- Maher E.A., N.J. Bate, W. Li, Y. Elkind and R.A. Dixon. 1994. Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:7802-7806.

Bibliografía

- Marusch W.C., R.A. Jensen and L.O. Zamir. 1981. Induction of L-Phenylalanine ammonia lyase during utilization of Phenylalanine as a carbon or nitrogen source in *Rhodotorula glutinis*. J. Bacteriol. 146:1013-1019.
- Mo Y., C. Nagel and L.P. Taylor. 1992. Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:7213-7217.
- Monje R.I. 1994. Purificación, caracterización e inmovilización de la enzima fenilalanina amonio liasa de *Sporidiobolus pararoseus* NRRLY-5484. TESIS, IBT, UACPyP del CCH, UNAM. México
- Monge R.I., M. Lara and A. López-Munguía. 1995. Purification and stabilization of phenylalanine ammonia lyase from *Sporidiobolus pararoseus*. Biotech. Tech. 9(6):423-428.
- Nagal N., F. Kitauchi, M. Shimosaka and M. Okazaki. 1994. Cloning and sequencing of a full-length cDNA coding for phenylalanine ammonia lyase from tobacco cell culture. Plant Physiol. 104:1091-1092.
- Ogata K., K. Uchiyama and H. Yamada. 1967. Metabolism of aromatic amino acids in microorganism. Part. II. Properties of phenylalanine ammonia lyase. Agric. Biol. Chem. 31:200-206.
- Orum H. and O.F. Rasmussen. 1992. Expression in *E. coli* of the gene encoding phenylalanine ammonia lyase from *Rhodosporidium toruloides*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36:745-748.
- Osakabe Y., Y. Ohtsubo, S. Kawai, Y. Katayama and N. Morohoshi. 1995. Structure and tissue-specific expression of genes for phenylalanine ammonia lyase from aspen, *Populus kitakamiensis*. Plant Science. 105:217-226.
- Peters N.K. and S.R. Long. 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. Science. 233:977-980.
- Peters N.K. and S.R. Long. 1988. Alfalfa roots exudates and compounds which promote or inhibit induction of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. Plant Physiol. 88:396-400.
- Recourt K., A.J. Van-Tunen, L.A. Mur, A.A.N. Van-Brussel, B.J.J. Lugtenberg and J.W. Kijne. 1992. Activation of flavonoid biosynthesis in roots of *Vicia sativa* subsp. *nigra* plants by inoculation with *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. Plant Mol. Biol. 19:411-420.
- Sambrook J, E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning -Laboratory manuals, 2nd edition, Cold Spring Harbor Lab. Press, New York.
- Sanger F. and A.R. Coulson. 1978. The use of thin acrylamide gel for DNA sequencing. FEBS Lett. 87: 107-110.

Bibliografía

- Sarkanen K.V. and H.L. Hergert. 1971. Definition and nomenclature. Lignins: Occurrence, formation, structure and reactions. Sarkanen K.V. and C.H. Ludwing, eds (New York: Wiley Intersciencias), pp 43-94; Citado por Whetten R. and R. Sederoff. 1995. Lignin Biosynthesis. *Plant Cell*. 7:1001-1013.
- Sato T., F. Kiuchi and U. Sankawa. 1982. Inhibition of phenylalanine ammonia lyase by cinnamic acid derivatives and related compounds. *Phytochem*. 21(4):845-850.
- Schulz W., H.G. Eiben and K. Hahlbrock. 1989. Expression in *Escherichia coli* of catalytically active phenylalanine ammonia lyase from parsley. *FEBS Letts*. 258(2):335-338.
- Schuster B. and J. Rétey. 1994. Serine-202 is the putative precursor of the active site dehydroalanine of phenylalanine ammonia lyase. Site-directed mutagenesis studies on the enzyme from parsley (*Petroselinum crispum* L.). *FEBS Letts*. 349:252-254.
- Schuster B. and J. Rétey. 1995. The mechanism of action of phenylalanine ammonia lyase : The role of prosthetic dehydroalanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92(18): 8433-8437.
- Scott D.A., P.M. Hammond, G.M. Brearley and C.P. Price. 1992. Identification by high-performance liquid chromatography of tyrosine ammonia-lyase activity in purified fractions of *Phaseolus vulgaris* phenylalanine ammonia lyase. *J. Cromatogr*. 573(2):309-312.
- Shetty K., D.L. Crawford and A.L. Pometto III. 1986. Production of L-Phenylalanine from starch by analog-resistant mutants of *Bacillus polymyxa*. *Appl. Environ. Microbiol*. 52(4):637-643.
- Smith D.A. and S.W. Banks. 1986. Formation and biological properties of isoflavonoid phytoalexins. In *Plant flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, pharmacological and structure-activity relationships*. Alan R. Liss, Inc. pp. 113-124.
- Smith B.G. and P.H. Rubery. 1981. The effects of infection by *Phytophthora infestans* on the control of phenylpropanoid metabolism in wounded potato tissue. *Planta*. 151:535-540.
- Vance C.P. 1983. Rhizobium infection and nodulation: A beneficial plant disease? *Annu. Rev. Microbiol*. 37:399-424.
- Wagner G.J. and G. Hrazdina. 1984. Endoplasmic reticulum as site of phenylpropanoid and flavonoid metabolism in *Hippeastrum*. *Plant Physiol*. 74: 901-906.
- Wanner L.A., G.Li, D. Ware, I.E. Somssich and K.R. Davis. 1995. The phenylalanine ammonia lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol*. 27:327-388.
- Werner D., R.B. Mellor, M.G. Hahn and H. Grisebach. 1985. Soybean root response to symbiotic infection: Glyceolin I accumulation in an ineffective type of soybean nodules with an early loss of peribacteroid membrane. *Z. Naturforsch*, 40c:179-181; Citado por Estabrook E.M., and C. Sengupta-Gopalan. 1991. Differential expression of phenylalanine ammonia lyase and chalcone synthase during soybean nodule development. *Plant Cell*. 3:299-308.

Bibliografia

Whetten R. and R. Sederoff. 1995. Lignin Biosynthesis. *Plant Cell*. 7(7):1001-1013

Whitehead I.M., M. Prakash and R.A. Dixon. 1982. Differential patterns of phytoalexin accumulation and enzyme induction in wounded and elicitor treated tissue of *Phaseolus vulgaris*. *Planta*. 154:156-164.

Yamada T., Y. Tanaka, P. Sriprasertsak, H. Kato, T. Hashimoto, S. Kawamata, Y. Ichinose, H. Kato, T. Shiraishi and H. Oku. 1992. Phenylalanine ammonia lyase genes from *Pisium sativum*: structure, organ-specific expression and regulation by fungal elicitor and suppressor. *Plant Cell Physiol*. 33:715-725.

Zimmermann A and K. Hahlbrock. 1995. Light-induced changes of enzymes-activities in parsley cell suspension cultures. Purification and some properties of phenylalanine ammonia lyase (E.C. 4.3.1.5.). *Arch. Biochem. Biophys.* 166:47-53.