

03072

12
26



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
SEDE FACULTAD DE QUIMICA

FALLA DE ORIGEN

Estudios sobre la producción de la enzima fenilalanina
amonioliasa de *Streptomyces verticillatus*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A

KATY JUAREZ LOPEZ

MEXICO, D. F.

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
MOLECULAR, DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS,
BAJO LA ASESORIA DEL DR. LUIS SERVIN GONZALEZ



Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado

Insurgentes Sur y Circuito Escolar, Ciudad Universitaria, México, D.F., Código Postal: 04510

JNAM-CCH

PROYECTO ACADEMICO ESPECIALIZACION, MAESTRIA Y DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA SEDE FACULTAD DE QUIMICA

Of. No. EMDB/131/94

BIOL. KATY JUAREZ LOPEZ
Alumna de la Maestría en Biotecnología,
Sede Facultad de Química
P r e s e n t e

Los miembros de la Comisión Académica en su sesión ordinaria del día 24 de agosto del presente año, conocieron su solicitud para asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA con la réplica oral de la tesis "Estudios sobre la producción de la enzima fenilalanina amonio liasa de *Streptomyces verticillatus*", dirigida por el Dr. Luis Servín González.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dr. Luis Servín González
VOCAL	Dr. Miguel Lara Flores
SECRETARIO	Dr. Jorge Calderón Jiménez
SUPLENTE	Dra. Alicia González Manjarrez
SUPLENTE	Dra. Laura Camarena Mejía

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 4 de octubre de 1994
LA COORDINADORA DE SEDE


DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA

C.c.p. Archivo.

AFGS*lgg.

CONTENIDO

RESUMEN-----2

INTRODUCCION-----4

- *Streptomyces* -----4

- Fenilalanina amonio liasa (PAL)-----5

- Relación PAL con histidina amonio liasa (HAL) -----9

- Asimilación de fenilalanina en *Streptomyces* -----9

- Producción de mitomicina por *S. verticillatus* ----- 10

OBJETIVOS----- 11

MATERIAL Y METODOS ----- 12

- Cepas empleadas----- 12

- Medios de cultivo ----- 12

- Condiciones de cultivo ----- 14

- Cuantificación del crecimiento----- 14

- Determinación de actividades enzimaticas----- 15

- Purificación enzimatica ----- 17

- Producción de anticuerpos policlonales----- 18

- PCR ----- 19

- Cromatografía en capa fina ----- 20

- Cuantificación de mitomicina ----- 21

RESULTADOS Y DISCUSION----- 22

- Asimilación de fenilalanina en
Streptomyces verticillatus----- 22

- Efecto del ácido fenilpropiónico (PPA) en el crecimiento de

<i>Streptomyces verticillatus</i>	24
- Efecto de p-fluorofenilalanina (PFP) en el crecimiento de <i>Streptomyces verticillatus</i>	26
- Inducción de la fenilalanina amonio liasa	30
- Producción de PAL con respecto al tiempo de cultivo -	32
- Actividad PAL en otros <i>Streptomyces</i>	33
- Posible relación entre la producción de mitomicina y la presencia de la enzima fenilalanina liasa	33
- Histidina amonio liasa (HAL) de <i>S. verticillatus</i>	38
- Purificación de la fenilalanina amonio liasa	46
- Producción de anticuerpos anti-PAL de <i>Rhodotorula</i> ---	51
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFIA	53

RESUMEN

La fenilalanina amonio liasa (PAL), es una enzima que cataliza la desaminación no oxidativa de fenilalanina, formando ácido trans-cinámico y amonio (Fig. 1). Esta enzima es de gran importancia a nivel industrial ya que se emplea en la producción de fenilalanina, además de tener una aplicación médica en el tratamiento y diagnóstico de la fenilcetonuria.

La presencia de esta enzima ha sido reportada en plantas, algunas levaduras y hongos superiores. En procariontes, solamente ha sido descrita en *Streptomyces verticillatus* y *Bacillus polymyxa* (éste último en un reporte aislado).

Presenta diferentes funciones en los diversos organismos. En plantas es fundamental en la producción de compuestos como lignina, formando parte del metabolismo secundario. En levaduras presenta un papel catabólico, permitiéndoles crecer en fenilalanina como fuente de carbono y de nitrógeno. En *Streptomyces verticillatus* no es clara su función, por lo que una parte de este estudio se enfocó a elucidar el papel que desempeña en el metabolismo de este microorganismo.

Se inició con el estudio de la PAL, tratando de elucidar si participa de manera fundamental en la asimilación de fenilalanina como fuente de carbono y/o nitrógeno, de manera similar a lo que se observa en levaduras. Los resultados obtenidos con inhibidores de la enzima sugieren que ésta no participa en dicha asimilación. Además se demostró, mediante la identificación de intermediarios de la degradación de fenilalanina, que en *S. verticillatus* se presenta otra ruta catabólica para la asimilación de fenilalanina. *S. verticillatus* asimila fenilalanina como fuente de nitrógeno principalmente, siendo una mala fuente de nitrógeno en comparación con arginina.

Se observó que PAL es una enzima inducible por fenilalanina, y que se produce en la etapa exponencial tardía del crecimiento.

Se buscó actividad de PAL en otros miembros del género *Streptomyces*; encontrándose solamente en *Streptoverticillium* sp. (antes *Streptomyces caespitosus*) un organismo cercano a *S. verticillatus*, también productor del antibiótico mitomicina.

Se realizaron varios experimentos cuyos resultados sugieren cierta relación entre la síntesis de mitomicina y la actividad PAL, a nivel de la formación del intermediario ácido 3-amino hidroxibenzoico.

Con la finalidad de lograr la sobreproducción de la PAL, se intentaron varias estrategias para la clonación del gen codificador de la enzima. Una de ellas fue la purificación de la enzima, alcanzándose factores de purificación muy altos; sin embargo la cantidad de enzima purificada fue muy pequeña, lo que imposibilitó la secuenciación del extremo amino terminal. También se produjeron anticuerpos anti-PAL de *Rhodotorula*, los cuales fueron capaces de cruzar con la PAL de *S. verticillatus*; sin embargo se presentaron muchas bandas inespecíficas.

Con base en las secuencias conservadas, a nivel de aminoácidos, de diversas PALs y aún con la histidina amonio liasa (HAL), se diseñaron cuatro oligonucleótidos, con el objetivo de emplearlos para amplificar un fragmento, mediante la técnica de PCR, que pudiera emplearse como sonda homóloga. No fue posible amplificar una banda específica correspondiente al gen de PAL.

Se intentó mediante la técnica de hibridación "Southern", emplear como sonda un fragmento interno del gen de HAL de *S. griseus* para detectar al gen codificador de PAL. Los resultados obtenidos muestran una sola banda de hibridación, que muy probablemente corresponda al gen de HAL de *S. verticillatus*, ya que se comprobó que este microorganismo presenta actividad de HAL.

INTRODUCCION

Streptomyces

El género *Streptomyces* pertenece al grupo de los actinomicetos, eubacterias gram positivas, con un alto contenido de guanina (G) y citocina (C) en su DNA. Estos organismos presentan un crecimiento miceliar, habitan generalmente en el suelo y para su nutrición producen enzimas hidrolíticas extracelulares tales como celulasas, lipasas, amilasas, proteasas y nucleasas (Goodfellow y Cross, 1984)

Presentan un ciclo complejo de diferenciación morfológica, que se inicia con la formación de micelio vegetativo a partir de una espora, éste se ramifica penetrando en los intersticios de los sustratos que emplea para su nutrición. En respuesta a una limitación de nutrientes, el micelio vegetativo da origen a hifas aéreas que posteriormente se septan formando cadenas de esporas uninucleoidales, las cuales se dispersan y al encontrar condiciones nutricionales y ambientales adecuadas germinan (Chater, 1984).

La formación de micelio aéreo generalmente coincide con la producción de metabolitos secundarios, entre los que se encuentran, antibióticos, pigmentos y compuestos con muy diversas estructuras. (Chater y Hopwood, 1989).

Los estreptomicetos presentan una gran importancia desde el punto de vista aplicado, principalmente por su capacidad de producir antibióticos. De los antibióticos descritos, el 60% son producidos por actinomicetos y de éstos el 90% corresponden a *Streptomyces*. En cuanto a los explotados comercialmente, el 40% provienen de dicho género, incluyendo macrólidos, aminoglucósidos, antraciclinas y tetraciclinas (Queener *et al.*, 1986).

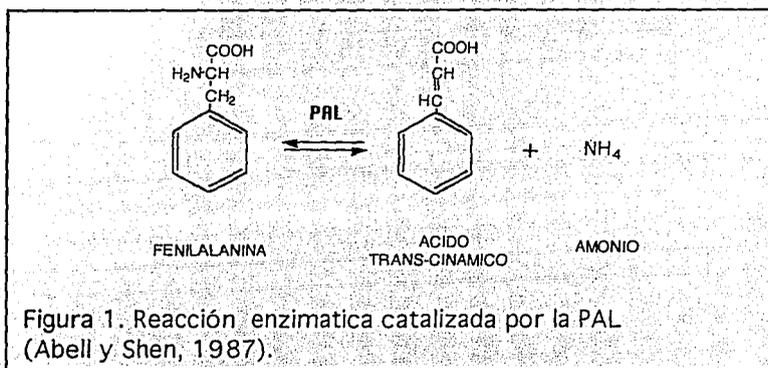
La producción de antibióticos generalmente es un proceso que demanda una gran cantidad de energía para el organismo productor. En algunas ocasiones se requieren mas de veinte enzimas para sintetizar un antibiótico, por lo que resulta paradójico que sean dispensables para el

organismo productor y que no presenten una función aparente (Vining, 1992)

Streptomyces verticillatus es organismo productor del antibiótico mitomicina y otros metabolitos secundarios como cinamamida. Posee la enzima fenilalanina amonio liasa, objeto de este estudio (Bezanson *et al.*, 1970).

Fenilalanina amonio liasa (PAL), E.C. 4.3.1.5.

La fenilalanina amonio liasa, cataliza la desaminación de la fenilalanina formando ácido trans-cinámico (TCN) y amonio:



Esta enzima es de gran interés industrial, principalmente para la producción de fenilalanina. Además de su aplicación médica en el tratamiento y diagnóstico de la fenilcetonuria (Inoue *et al.*, 1986; Hoskins *et al.*, 1980; Schemer y Chandler, 1988)

Función de la PAL en los diferentes organismos

La PAL se encuentra ampliamente distribuida en plantas, desempeñando un papel fundamental (Camm *et al.*, 1973). Es la primer enzima de la síntesis de compuestos fenilpropanoides como lignina, flavonoides y compuestos fenólicos (Orndorff *et al.*, 1988). Forma parte del complejo metabolismo secundario de las plantas, por lo que se existen

numerosos estudios de su síntesis y regulación (Jangaard *et al.*, 1974). Recientemente se han clonado y secuenciado una gran cantidad de genes de diversas plantas que codifican para esta enzima.

La presencia de PAL ha sido descrita en hongos superiores y en algunas levaduras como *Rhodotorula* y *Sporobolomyces*. En estos organismos, a diferencia de la función que presenta en plantas, es una enzima catabólica que les permite crecer con fenilalanina como única fuente de carbono y nitrógeno (Abell *et al.*, 1980; Kane *et al.*, 1988). Es una enzima inducible por fenilalanina y tirosina.

El conocimiento de la regulación de la PAL en levaduras, ha permitido obtener mutantes sobreproductoras de esta enzima. El ácido fenilpropiónico (PPA) es un inhibidor no competitivo de la PAL, por lo que en cultivos con fenilalanina como única fuente de carbono y nitrógeno en presencia de PPA, permitió obtener mutantes de *Rhodotorula graminis* resistentes a este análogo que producen cinco veces más enzima que la cepa silvestre (Orndorff *et al.*, 1988)

Otro caso fue el empleo, también en levaduras, de un análogo de fenilalanina, la p-fluorofenilalanina (PFP), que permitió el aislamiento de mutantes resistentes, con mutaciones regulatorias. El PFP es un potente inhibidor del crecimiento de *Rhodotorula glutinis*, la resistencia a este compuesto se da por una pérdida de la retroregulación de la primera enzima de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos o bien por una pérdida en la inducibilidad de PAL.

En levaduras, se sabe que existen tres isozimas de la primera enzima de la síntesis de aromáticos y que solo una de ellas es inhibida por PFP. Por otro lado se observó que esta enzima puede emplear como sustrato el PFP y transformarlo a p-fluorocinamato, compuesto que posiblemente sea un inhibidor del crecimiento, se sabe que el cinamato también inhibe el crecimiento en este organismo, por lo que la última opción parece la más viable, para explicar la resistencia. Es interesante mencionar que las mutantes obtenidas son capaces de permitir el crecimiento de auxótrofas de fenilalanina de *Bacillus*, al crecerlas contiguamente, por lo que se

propone que la PAL también podría tener una función en la regulación de la poza de fenilalanina (Kane y Fiske, 1985).

La PAL, no se encuentra ampliamente distribuída en procariontes; la actividad se ha buscado en *E. coli* y *Streptococcus* sin encontrarse (Abell y Shen, 1987). Solamente existen reportes de su presencia en *Streptomyces verticillatus* (Bezanson *et al.*, 1970) y una cepa de *Bacillus polymyxa* (Shetty *et al.*, 1986).

La PAL se identificó en *S. verticillatus* en relación a la producción de cinamamida, un metabolito secundario que se secreta al medio de cultivo y que se sintetiza a partir de ácido trans-cinámico, producto de la desaminación de fenilalanina. Lo anterior se comprobó mediante experimentos de incorporación de fenilalanina marcada radiactivamente (fenilalanina-carboxilo- ^{14}C). Este compuesto se incorporó específicamente en el grupo carboxilo del ácido t-cinámico y posteriormente en el de cinamamida. El primer paso es catalizado por la PAL y el siguiente por una enzima aún no identificada (Bezanson *et al.*, 1970).

La PAL de *S. verticillatus* se purificó parcialmente, encontrándose que presenta características similares a las de otras PAL descritas (Evans *et al.*, 1970). Sin embargo no hay reportes recientes de estudios con esta enzima, a excepción de algunas patentes del grupo Genex, en las que se evalúa la posibilidad de emplearla para la producción de fenilalanina (PN: US-US4584273;22.04.86; 1986).

Características de la PAL

La PAL es una enzima tetramérica con un peso molecular que va de 220 a 300 kDa en diferentes organismos, excepto en *Rhizoctonia solani* donde presenta dos subunidades (Kalghati *et al.*, 1975). Las cuatro subunidades que constituyen la enzima son del mismo peso molecular (55-60 kDa).

En el sitio activo contiene una deshidroalanina, que pudiera estar involucrada en el mecanismo de reacción de esta enzima (Hodgins, 1971), se sabe actualmente que la deshidroalanina es resultado de un proceso

autocatalítico y en caso de la PAL de *Petroselinum crispum* (perejil), mediante estudios de mutagénesis dirigida, se identificó a la serina-202 como su posible precursor (Schuster y Retey, 1994)

El punto isoeléctrico de la PAL es de 5.4 (Hodgins, 1971; Fritz *et al.*, 1976; Emes y Vining, 1970). El pH óptimo de la reacción de desaminación de fenilalanina va de 8.0 a 9.0 (Wieder *et al.*, 1979; Emes y Vining, 1970), y el pH en el que se lleva a cabo la reacción reversa es de 10.0 (Yamada *et al.*, 1981).

La temperatura óptima de la reacción va de 37°C a 49°C (Wieder *et al.*, 1979). La estabilidad térmica es de 100%, 5 min a 60°C, 75% a 65°C, inactivándose a 70°C, en el caso de la PAL de levadura (Ogata *et al.*, 1967). En el caso de *S. verticillatus* se mantiene activa después de calentar por 5 min a 95°C.

La especificidad por el sustrato varía según la fuente de la enzima. En levaduras y en plantas es capaz de aceptar como sustrato fenilalanina y tirosina, en *S. verticillatus* solamente reconoce fenilalanina.

Con respecto a la afinidad por el sustrato se presenta una gran variación dentro de las enzimas reportadas. Como se puede observar en la Tabla I, el organismo que presenta la mayor afinidad es *S. verticillatus*, sin embargo es el que presenta la actividad mas baja.

Tabla I. Km de la PAL de diferentes organismos. Fenilalanina como sustrato

FUENTE	Km (μ M)	Referencia
<i>Rhodotorula glutinis</i>	250	Hodgins, 1971
<i>Rhodospiridium</i>	600	Gilbert, 1985
<i>S. verticillatus</i>	160	Emes, 1970
<i>Sporobolomyces</i>	300	Parkhurst, 1971
<i>Rhodotorula rubra</i>	380	Evans, 1987
<i>Neurospora crasa</i>	500	Sikora, 1982
<i>Phaseolus vulgaris</i>	1250	Cunha, 1988

RELACION DE PAL CON HISTIDINA AMONIO LIASA (HAL).

La histidina amonio liasa o histidasa, es una enzima que desamina la histidina para formar urocanato y amonio, mediante un mecanismo muy parecido al que se observa en la actividad PAL (Magasanik *et al.*, 1971). Las dos enzimas poseen una deshidroalanina en su sitio activo (Consevage y Phillips, 1985; Hodgins, 1971). Recientemente se determinó mediante estudios de mutagénesis dirigida que de las cuatro serinas conservadas entre las diferentes histidasas y las PAL, la serina 143 es el probable precursor de la deshidroalanina en el caso de la HAL de *Pseudomonas putida* (Langer *et al.*, 1994), y la serina 254 en el caso de la enzima de rata (Taylor y McInnes, 1994).

La HAL se presenta tanto en procariontes como en eucariontes. Se conoce la secuencia nucleotídica de genes de histidasa de diversos organismos, tanto en bacterias como en mamíferos. A nivel de secuencia de aminoácidos se presentan zonas conservadas, algunas de las cuales coinciden con regiones conservadas entre las PAL (Taylor *et al.*, 1990).

Existen estudios con el gen de la histidasa de *S. griseus*, y actualmente se cuenta con la secuencia de aminoácidos de esta enzima (Wu *et al.*, 1992). Con base en a la homología que se presenta entre las histidasas y las PAL se ha propuesto que la fenilalanina amonio liasa surgió como resultado de una duplicación del gen de histidasa. Curiosamente con las secuencias que existen se realizó un dendrograma en el que se puede ver que la histidasa de *S. griseus* es la mas cercana a las PAL (Wu *et al.*, 1992).

ASIMILACION DE FENILALANINA EN *Streptomyces*

Se sabe muy poco acerca de la asimilación de aminoácidos aromáticos en este género. En un estudio realizado con varias especies capaces de degradar lignina (Pometo III y Crawford, 1985), se propuso una vía de asimilación para fenilalanina que se inicia con su transformación a fenilpiruvato que posteriormente se transforma en fenilacetato y este a su vez en homogentisato; finalmente se rompe el anillo aromático

mediante la enzima homogentisato 1,2-dioxigenasa produciendo maleilacetoacetato (Fig. 5).

Existe otro estudio sobre *Nocardia*, otro miembro del grupo de los actinomicetos, en el que se deduce la misma ruta catabólica. Este organismo fue capaz de crecer con fenilalanina como fuente de C y N (De-Boer *et al.*, 1986).

PRODUCCION DE MITOMICINA POR *S. verticillatus*

La mitomicina es compuesto con actividad antitumoral, sintetizado por *S. verticillatus*, *Streptovercillium sp.* (antes *S. caespitosus*) y *S. arduus* entre otros (Hornemann, 1981).

No se conoce completamente su ruta biosintética; sin embargo se piensa que es muy semejante a la de rifamicina, y que ambos presentan un intermediario común, el ácido 3-amino-7-hidroxibenzóico (C7N), derivado de la ruta del shikimato o ruta biosintética de los aminoácidos aromáticos (Fig.11).

Realmente existen muy pocos estudios actuales sobre este antibiótico; sin embargo, recientemente se clonó el locus (*mcr*), involucrado en su resistencia, a partir de *S. leventulae* (August *et al.*, 1994).

Se han encontrado relaciones regulatorias entre las rutas biosintéticas de este tipo de antibióticos y las vías metabólicas que llevan a la formación de los tres aminoácidos aromáticos, debido a que ambas requieren de un intermediario aromático. Las enzimas claves de esta regulación son: la 3-desoxiarabino-7-heptulose-6-P sintetasa (DAHPS sintetasa), antranilato sintetasa, corismato mutasa, y prefenato deshidratasa (Chiao *et al.*, 1988).

OBJETIVOS

- Determinar cómo se lleva a cabo la asimilación de fenilalanina por *Streptomyces verticillatus*
- Determinar el papel metabólico de la fenilalanina amonio liasa (PAL) en este microorganismo
- Sobreproducción de PAL mediante:
 - Clonación del gen estructural correspondiente
 - Obtención de mutantes sobreproductoras de la enzima

MATERIAL Y METODOS

CEPAS EMPLEADAS:

Streptomyces verticillatus : ATCC 13495

Streptoverticillium sp ATCC 27422 (antes *Streptomyces caespitosus*)

Streptomyces lividans 66 (cepa 1326)

Streptomyces coelicolor A3(2) (cepa M145)

Streptomyces phaeochromogenes NRRL-B3559

Streptomyces griseus NRRL-B2682

Bacillus subtilis NRRL -B3366

MEDIOS DE CULTIVO:

Medio de producción de la PAL (MP). (Bezanson et al., 1970)

- D-glucosa	2 %
- Hidrolizado de harina de soya	1 %
- Extracto de Levadura	0.5%
- Cloruro de Sodio	0.5%
- Carbonato de calcio	0.3%
- Fenilalanina	0.5%
- En agua destilada	

Medio para propagación de micelio vegetativo (TSB). (Hopwood et al., 1985)

- T S B - DIFCO (triptic soy broth) en agua destilada	3%
--	----

Medio Mínimo (MM). (Hopwood et al. 1985)

- Fuente de Carbono (C) *	
- Fuente de Nitrógeno (N) *	
- MgCl ₂ . 6H ₂ O	0.06%

- NaH ₂ PO ₄ / K ₂ HPO ₄ (pH 7.2)	0.01M
- elementos menores	
- ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.001%
- FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.001%
- MnCl ₂ · 6H ₂ O	0.001%
- CaCl ₂ (anhidro)	0.001%

* Las fuentes de C o N empleadas se variaron según el interés:

Glucosa (C)	0.5%
Fenilalanina (C y/o N)	0.5%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2%

Los elementos menores y el agua destilada se esterilizaron por separado y posteriormente se añadieron los otros reactivos esterilizados independientemente (en soluciones 1000X). La fenilalanina, los análogos y otros aminoácidos se esterilizaron por filtración a través de una membrana Millipore de 0.45µm.

Medio R5 para esporulación (MR5), (modificación del de Hopwood et al. 1985)

K ₂ SO ₄	0.25 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10.12g
Glucosa	10.0g
Casaminoácidos	0.1g
Extracto de levadura	5.0 g
Solución de elementos traza	2.0 ml
Trizma-Base	3.0 g
Agua (aforar)	1000 ml
Sol. de elementos menores para un litro de agua destilada	
Zn Cl ₂	40 mg

FeCl ₃ .6H ₂ O	200 mg
CuCl ₂	200 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	10 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	10 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	10 mg

Medio para antibiosis

Extracto de levadura	0.5 %
Triptona	1.0 %
Cloruro de sodio	0.5%
Agar	1.5 %

CONDICIONES DE CULTIVO

Los cultivos se crecieron en matraces Erlenmeyer, con 1/10 del volumen en el caso del medio TSB y 1/5 del volumen en el caso de medio mínimo y medio de producción, con una agitación de 200 rpm. a 30°C.

Los cultivos en medio mínimo y medio de producción se inocularon con micelio vegetativo crecido por 36h en TSB, lavado 2 veces con solución salina y homogenizado para obtener un micelio disperso.

Los cultivos en TSB, se inocularon a partir de un lote de esporas, conservadas a -20 ° C en glicerol al 20%.

La obtención de esporas de *Streptomyces verticillatus* no fue fácil, debido a que este microorganismo no esporula bien en los medios probados. La preparación de lotes de esporas se realizó a partir de una colonia aislada, la cual se homogenizó y se creció en medio TSB, para obtener mayor biomasa. Con este micelio se realizó un crecimiento confluyente en cajas de Petri con medio R5.

CUANTIFICACION DEL CRECIMIENTO

El crecimiento en MM se cuantificó por absorbancia a 540nm. En cultivos en MP se realizó mediante la cuantificación de proteína, por el método de Lowry (Lowry *et al*, 1956).

Soluciones amortiguadoras empleadas

-Amortiguador 1

Tris.HCl 50mM
pH 8.5

-Amortiguador 2

K_2HPO_4/KH_2PO_4 5 mM
pH 7.0

-Amortiguador 3

Borato de sodio 50mM
pH 7.0

-Amortiguador 4

PBS10X
 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 28.98 g
 KH_2PO_4 2.0 g
NaCl 80.0 g
KCl 2.0 g
aforar a 1000 ml con agua destilada

-Amortiguador 5

Tris.HCl 6.05 g
Glicina 28.97g
Metanol 400 ml
pH 8.3
aforar con agua destilada a 2000 ml

DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

Obtención de extracto libre de células

El micelio empleado para la extracción de la enzima, se creció en medio de producción, el cual fue inoculado con micelio vegetativo crecido en TSB por 36h (a partir de esporas).

Se lavó 2 veces con amortiguador 2, se homogenizó y se sonicó hasta que el micelio se veía completamente fragmentado, al observarlo bajo el

microscopio. La suspensión se clarificó por centrifugación a 16000 x g, 30 min, a 5°C

Generalmente éste extracto crudo se precipitó con sulfato de amonio (50-70%). Posteriormente se prosiguió con la determinación de la actividad PAL. En el caso de las determinaciones de HAL y homogentisato-1,2-dioxigenasa, también se hicieron con este tipo de extractos.

Determinación de actividad PAL (Emes y Vining, 1970)

La determinación de la actividad PAL se hizo conforme al método reportado por Emes (1970), midiendo la aparición de ácido trans-cinámico, a 290 nm. La mezcla de reacción consistió de fenilalanina 0.05M (0.25ml), amortiguador 1 (1.1-1.2ml) y extracto libre de células (0.05-0.15ml).

El tiempo de reacción varió según el extracto, de 15 a 60 min. Las determinaciones se hicieron en velocidad inicial, a temperatura ambiente.

Se monitoreó la absorbancia a 290nm (U.V.), en un espectrofotómetro. El blanco consistió de amortiguador y el extracto crudo, omitiendo el sustrato.

Se definió como una unidad a la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de ácido t-cinámico por minuto. Se empleó el valor de extinción molar de 10 700 l mol⁻¹cm⁻¹, para el ácido t-cinámico a 290 nm. La actividad enzimática se reporta como miliunidades. Para el cálculo de la actividad se empleó la ecuación de Lambert-Beer:

$$A = (\epsilon) (b) (C)$$

donde A= absorbancia

ϵ = coeficiente de extinción molar

b= longitud de la celda

C= concentración molar

Modificación de la ecuación:

$$m = (\epsilon) (b) (v_i)$$

m= cambio de absorbancia/min

v_i = cambio de concentración de ácido t-cinámico/min

Determinación de actividad HAL (Kendrick y Wheelis, 1982)

El ensayo de actividad se hizo de acuerdo al reportado por Kendrick (1982). La mezcla de reacción consistió en: L-histidina 100mM (0.05ml), extracto celular (5-20 μ l) y amortiguador 2, pH 7.2, (1.1ml).

Se monitoreó la aparición de urocanato a 277 nm (UV). El coeficiente de extinción de éste compuesto es de 18 800 l mol⁻¹cm⁻¹, en ésta longitud de onda. Una unidad de actividad se considera a la formación de 1 μ mol de urocanato por minuto.

Determinación de la actividad homogentisato 1,2-dioxigenasa. (Crawford, 1975).

La determinación de ésta enzima se realizó en base a lo reportado por Crawford (1975). El ensayo es espectrofotométrico, midiendo la producción de maleilacetoacetato a 334 nm. El extracto crudo se preparó a partir de medio mínimo.

La mezcla de reacción consistió de homogentisato 10mM (10 μ l), extracto celular (100 μ l) y amortiguador 1 (1.4 ml).

PURIFICACION

Columnas y resinas empleadas

Filtración por peso molecular

- Columna Sephacryl S-300

Dextrana/bisacrilamida

Rango de fraccionamiento: 10-1500 kDa

1.- Diámetro 1.7 cm, Altura 44 cm, volumen 100 ml

L/D 25.88, flujo 22 ml/hora

2.- Diámetro 1.7 cm, altura 90 cm, volumen 180 ml

L/D

amortiguador 2, pH 7.0

- Columna Sephacryl S-400

Dextrana/bisacrilamida

Rango de fraccionamiento 20-8000 kDa

Diámetro 1.5 cm, altura 56.4, volumen 99 ml

L/D 37.6

amortiguador 2, pH 7.0

Intercambio iónico

- Columna DEAE-celulosa

Intercambio aniónico

Diámetro 1.5, altura 15.5, volumen 29.14 ml

amortiguador 2, pH 7.0

- Columna CARBOXIMETIL-celulosa

Intercambio catiónico

Diámetro 1.5, altura 15.5, volumen 29.14 ml

amortiguador 2, pH 6.0

Afinidad

Columna agarosa-fenilalanina

Volumen 5 ml, altura 4 cm, diámetro 1 cm

amortiguador 3, pH 6.0. En ocasiones se añadió

Tween 20.

Precipitación con sulfato de amonio

El extracto crudo, después de ser clarificado por centrifugación, se precipitó con sulfato de amonio 50%, controlando el pH (7.0-7.5) con NH_4OH en hielo. Se centrifugó a $16000 \times g$, 30 min a 4°C ; el pellet se resuspendió en amortiguador y se volvió a precipitar a 70% de sulfato de amonio. Nuevamente se centrifugó como en el paso anterior y se resuspendió en amortiguador para ser dializado.

ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI-PAL

Inmunización y producción de anticuerpos

La inmunización se realizó con una preparación comercial de la enzima PAL, de *Rhodotorula glutinis*, en conejos Nueva Zelanda de 1.5 kg de peso, inicialmente con adyuvante de Freund completo y la segunda inmunización se llevo a cabo con adyuvante incompleto. Debido a que no

venía pura la enzima comercial se separó en PAGE y se cortó la banda con la cual se inmunizó.

Después de tres semanas de la primera inmunización, se realizó la segunda. Se obtuvo un título de 1: 32000.

Los sueros obtenidos se guardaron a - 70°C.

Inmunoblot

Las proteínas se corrieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida y se transfirieron en un electroblot por 1 h; se empleó el amortiguador 5. La transferencia se realizó en nitrocelulosa, la cual se bloqueo con PBS-BSA 3%. Se lavó dos veces con PBS. Se incubó posteriormente con el primer anticuerpo por 2-4 h y se lavó como se describe anteriormente. Se agregó O-Cl-naftol y peróxido de hidrógeno, dejándose en oscuridad de 5-10 min.

PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y Southern (hibridación de DNA-DNA).

Extracción de DNA cromosomal

La extracción de DNA cromosomal se llevó a cabo mediante un método que consiste en hacer la extracción de células completas sin dar tratamiento con lisozima. Se eligió éste método debido a la dificultad de extraer DNA de *Streptomyces verticillatus*.

Condiciones del PCR

El PCR se realizó bajo las siguientes condiciones:

- Se emplearon cuatro oligonucleótidos, diseñados a partir de las regiones conservadas de aminoácidos de PAL y las HAL de diferentes orígenes.

Condiciones de reacción

- desoxinucleótidos	200µM
- MgCl ₂	1.0 a 3.0 mM
- Templado	1.0 a 10 ng
- Taq-polimerasa	2.5 U

- oligonucleótidos 5.0 a 100 ng
- Volumen final de la reacción 100µl
- ciclos 25-35
- temperatura de desnaturalización (92-95°C)
- temperatura de apareamiento (40-55°C)
- temperatura de polimerización (72 °C)

Condiciones del Southern

La transferencia e hibridación se realizó conforme al método descrito por Hopwood *et al.* (1985). La sonda empleada se marco por "Nick translation", con fósforo radiactivo.

Se realizaron hibridaciones empleando también una sonda biotinilada la cual se biotiniló por random primer; usando el sistema Bio-Prime (GIBCO-BRL), se siguió el método propuesto por el fabricante del Sistema Photogene (GIBCO-BRL).

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC)

Extracción del caldo de cultivo para detección de intermediarios

El medio de cultivo se ajustó a pH de 1-2 con HCl, posteriormente se extrajo con éter dos veces recuperando y concentrando la fase eterea.

Finalmente se resuspendió en un milésimo del volumen original y se aplicó a una placa de gel de sílice (F-254, Merck) con indicador fluorescente.

Las fases empleadas fueron:

- Benceno:dioxano:ác. acético (9:2.5:0.4)
- Butanol:ác.acético:agua (80:20:20)

Extracción del medio de cultivo para determinación de mitomicina y cinamamida

En este caso se realizó de igual forma que para los intermediarios, solo que con cloroformo.

La fase empleada para la cromatografía fue:

- cloroformo: metanol (9:1)

CUANTIFICACION DE MITOMICINA

Se tomaron muestras de los diferentes cultivos, se separó el micelio del medio de cultivo, en el cual se determinó la concentración de antibiótico.

Bioensayo

Se empleó como microorganismo de prueba *Bacillus subtilis*. Consiste en preparar cajas con microorganismo de prueba, en las cuales se colocan discos de papel filtro previamente preparados con una alícuota de sobrenadante. Dependiendo de la concentración de antibiótico se forma un halo de inhibición de crecimiento. El diámetro del halo se mide y se obtiene la concentración del antibiótico por interpolación, utilizando una curva estándar realizada con cantidades conocidas del antibiótico.

Bioautografía

Este método se basa en el mismo principio del bioensayo, por inhibición del crecimiento de un microorganismo de prueba. En este caso se separan los constituyentes del caldo de cultivo por medio de TLC, y directamente se emplea la placa de gel de sílice, poniéndola en contacto con la caja y permitiendo que difundan los compuestos. De esta forma mediante compuestos estandar, se comprueba la identidad del compuesto que está produciendo la inhibición del crecimiento.

RESULTADOS Y DISCUSION

ASIMILACION DE FENILALANINA EN *Streptomyces verticillatus*

Los estudios de asimilación de fenilalanina se iniciaron tratando de elucidar si la fenilalanina amonio liasa presentaba un papel fundamental en la asimilación de fenilalanina como fuente de carbono (C) y/o nitrógeno (N) en *S. verticillatus*, aparte de su papel en la biosíntesis de cinamamida. Este papel catabólico había sido sugerido en otros trabajos, sin demostrarse (Orndorff *et al.*, 1988; De Boer *et al.*, 1991).

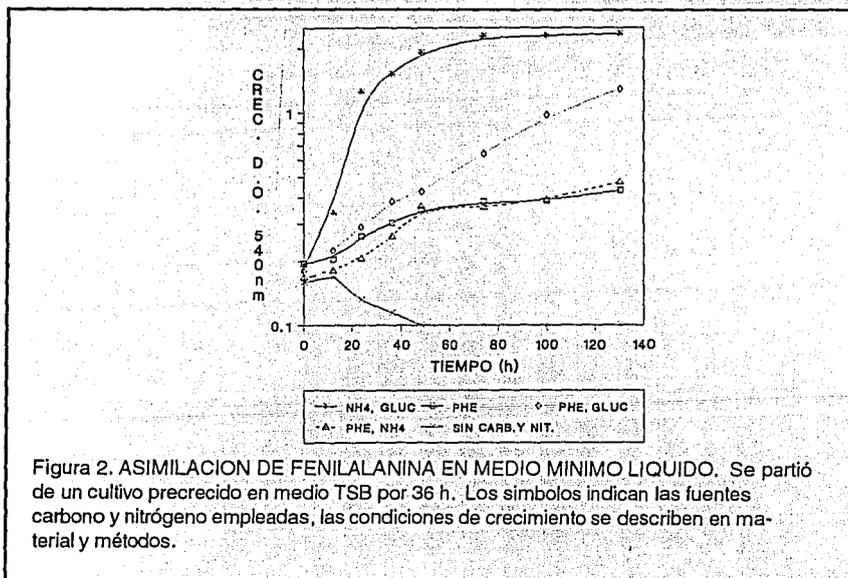
Con los datos anteriores se formuló la siguiente hipótesis de trabajo: si la PAL de *S. verticillatus*, tiene una función catabólica, entonces debería ser posible aislar mutantes incapaces de utilizar fenilalanina, afectadas en PAL. Posteriormente por complementación a partir de un banco genómico, se podría seleccionar una clona con gen que codifica para esta enzima.

TABLA II. Características fenotípicas de *S. verticillatus* en medio mínimo sólido

FUENTE DE CARBONO	FUENTE DE NITROGENO	CARACTERISTICAS
fenilalanina	fenilalanina	colonias sin micelio aéreo
fenilalanina	(NH ₄) ₂ SO ₄	colonias sin micelio aéreo
glucosa	fenilalanina	colonias con micelio aéreo, sin esporulación
glucosa	(NH ₄) ₂ SO ₄	colonias con micelio aéreo, con esporulación
ninguna	ninguna	sin crecimiento

En la tabla II se pueden observar las características fenotípicas de las colonias crecidas en medio mínimo sólido. Solamente se obtuvo un crecimiento vigoroso, con formación de micelio aéreo y esporas, en los cultivos con glucosa y amonio como fuentes de C y N respectivamente. En los cultivos con fenilalanina como fuente de carbono, el crecimiento fue menor y aunque las colonias desarrollaron micelio aéreo éste no fue capaz de esporular. En el caso de fenilalanina como fuente de C y N, o como fuente de C, no se formaron micelio aéreo ni esporas, aunque si se obtuvo algo de crecimiento.

Los experimentos anteriores se repitieron en medio líquido, con el objetivo de cuantificar el crecimiento (Fig. 2). Como se puede observar, los resultados obtenidos nos permiten corroborar que la fenilalanina se emplea principalmente como fuente de nitrógeno; sin embargo, en estos cultivos no se alcanza una fase estacionaria de crecimiento en el tiempo estudiado, a diferencia de los cultivos con amonio y glucosa e incluso los cultivos con fenilalanina y amonio, que prácticamente no crecieron.



Efecto del ácido fenilpropiónico (PPA) en el crecimiento de *Streptomyces verticillatus*.

El PPA es un análogo del ácido trans-cinámico (uno de los productos de la desaminación de la fenilalanina). Tiene la capacidad de inhibir la actividad de la PAL en algunos organismos.

En la levadura *Rhodotorula glutinis*, este compuesto a una concentración de $100\mu\text{M}$, inhibe el crecimiento en cultivos con fenilalanina como fuente de C y N, permitiendo obtener mutantes resistentes, con la capacidad de crecer en estas condiciones, las cuales sobreproducen la enzima (Orndorff *et al.*, 1988).

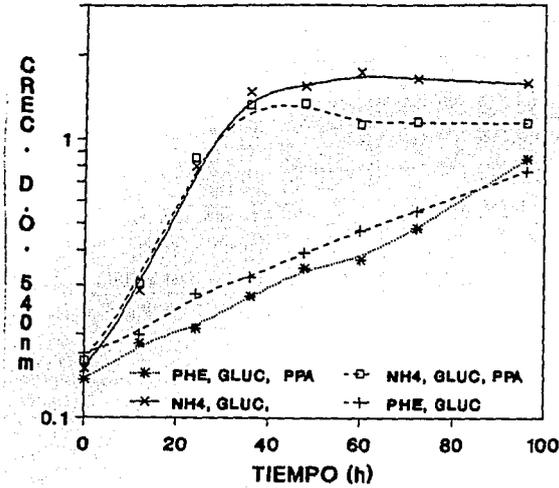
En *Streptomyces verticillatus*, se realizaron estudios con este análogo, con el objetivo de emplearlo para la obtención de mutantes sobreproductoras de PAL, seleccionando en cultivos con fenilalanina como fuente de N.

En estudios *in vitro*, con extractos celulares de *S. verticillatus*, el PPA produce una inhibición del 96.54% de la actividad PAL (Tabla III).

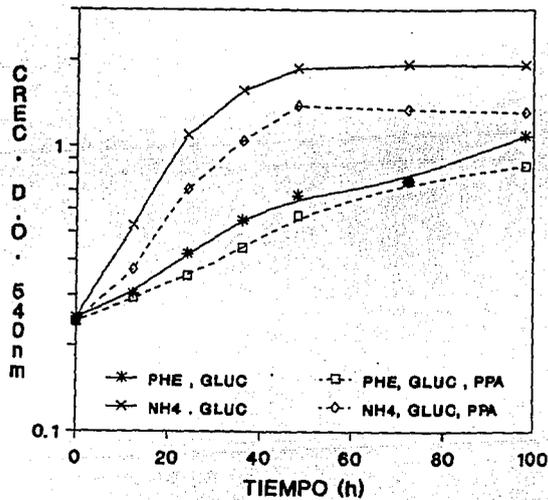
TABLA III. Efecto de análogos de fenilalanina (p-fluorofenilalanina PFP) y ácido t-cinámico (PPA), en la actividad enzimática *in vitro*. Ensayo realizado con extractos crudos precipitados con sulfato de amonio al 80%.

SUSTRATOS	% ACT. ESPECIFICA
Phe (5mM)	100
Phe+PPA($0.16\mu\text{M}$)	3.46
PPA	0
Phe+PFP($0.9\mu\text{M}$)	84.7
PFP*	50.7

* posiblemente el compuesto formado sea p-fluorocinamato, que al igual que t-cinámico, también absorbe a 290 nm.



A



B

Figura 3. Efecto de ácido fenilpropiónico (PPA) en el crecimiento de *S. verticillatus*, se empleó medio mínimo con diferentes fuentes de C y N, como lo indica la simbología. Se probaron dos concentraciones de PPA. A) 100 μM y B) 25 mM.

En cultivos en medio mínimo líquido se adicionó este análogo a una concentración de $100\mu\text{M}$, como se puede observar en la Fig. (3A), no se obtuvo ningún efecto sobre el crecimiento, ni aún en los cultivos con fenilalanina como fuente de nitrógeno. Se aumentó la concentración del PPA a 25mM , observándose una inhibición muy ligera del crecimiento en los cultivos con amonio y glucosa. Sin embargo, en los cultivos con fenilalanina como fuente de N, contrariamente a lo esperado, no se observa ningún efecto del PPA, Fig. (3B).

Estos datos sugieren que la PAL no participa en la asimilación de fenilalanina, como se pensaba inicialmente. Otra posible explicación a los resultados obtenidos sería una falta de transporte del PPA al interior de la célula. Sin embargo la inhibición que se produce en los cultivos con amonio y glucosa, y tomando en cuenta que la concentración que se requiere para inhibir *in vitro* la actividad PAL, es mucho menor a la empleada en éstos cultivos, es posible que el resultado obtenido no se deba simplemente a la falta de transporte.

Posteriormente mediante cromatografía en capa fina, se observó que en cultivos con PPA, se inhibe la formación de ácido trans-cinámico y cinamamida; lo cual podría explicarse por una inhibición de PAL.

Efecto de p-fluorofenilalanina (PFP) en el crecimiento de *Streptomyces verticillatus*.

La p-fluorofenilalanina es un análogo de fenilalanina, empleado en este estudio con el objetivo de obtener mutantes resistentes en *S. verticillatus*, que de manera similar a *Rhodotorula glutinis*, tuvieran mutaciones regulatorias que afectaran la expresión de PAL (Kane y Fiske, 1985).

El efecto de inhibición del crecimiento que causa PFP en levaduras posiblemente se debe a que PFP es utilizada por PAL para dar un

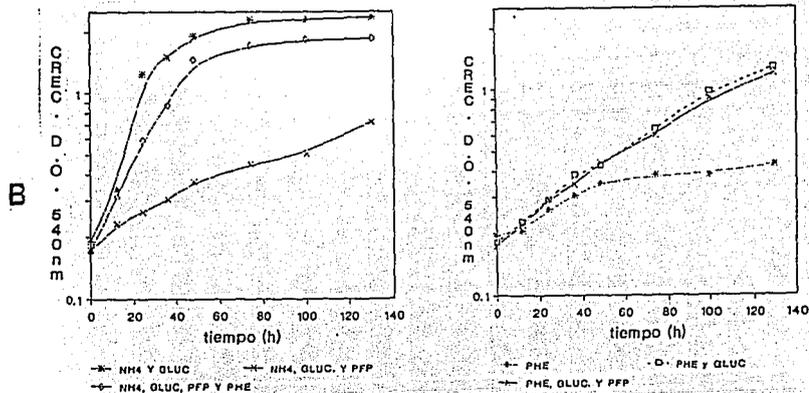
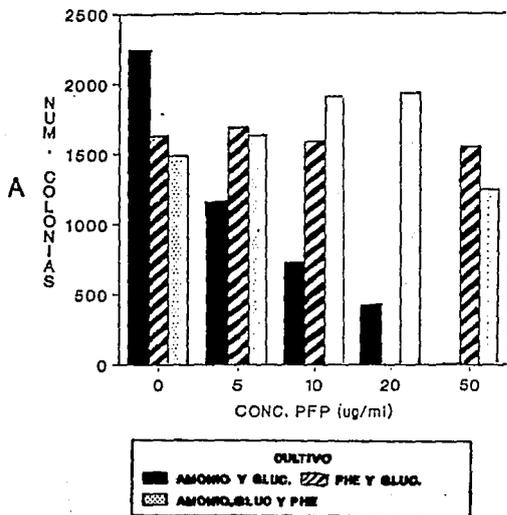


Figura 4. Efecto de p-fluorofenilalanina en el crecimiento de *S. verticillatus*.: A) Crecimiento en medio sólido con diferentes concentraciones de PFP (72 h de cultivo), B) Crecimiento en medio líquido, la concentración empleada de PFP fue de 10 $\mu\text{g/ml}$. Los símbolos indican la fuente de C y N empleada.

compuesto tóxico, el p-fluorocinamato. Es importante mencionar que también es un inhibidor de la DAHP sintetasa (primer enzima de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos); sin embargo en levaduras se presentan dos isozimas que no son inhibidas por este compuesto, lo que favorece la hipótesis de que el p-fluorocinamato sea el inhibidor del crecimiento. En el caso de actinomicetos se sabe que solo presentan una DAHP sintetasa, la cual podría ser inhibida por PFP (De Boer, 1991).

Se realizaron estudios *in vitro* con PFP en extractos celulares para determinar su efecto sobre la PAL. Se observó una inhibición del 15.3% de la actividad, además esta enzima es capaz de emplear el PFP como sustrato convirtiéndolo posiblemente en p-fluorocinamato (TABLA III).

En cultivos en medio mínimo, la adición de este análogo ocasiona un efecto inhibitorio del crecimiento en cultivos sin fenilalanina. En la Fig. 4(A) se puede observar el efecto de PFP en medio sólido. Concentraciones de 5 mg/ml inhiben totalmente el crecimiento. En medio líquido el comportamiento es similar y la inhibición es revertida casi completamente por fenilalanina, (Fig. 4[B]).

Se realizaron varios experimentos de mutagénesis, empleando como mutágeno NTG (N-metil-N-nitrosoguanidina); sin embargo no se obtuvieron mutantes resistentes a PFP. La explicación a esto podría ser que no se manejaron las condiciones adecuadas, aunado a la dificultad de trabajar con micelio fragmentado en lugar de esporas, ya que como se mencionó en material y métodos, la cepa empleada presenta cierta dificultad para esporular.

La mutantes esperadas, resistentes a PFP, posiblemente serían de dos tipos; las que acumulan fenilalanina porque pierden la retroregulación de la DAHP sintetasa (primer enzima en la biosíntesis de aromáticos) y las PAL (-), que por carecer de esta enzima, no lo transformarían en p-fluorocinamato.

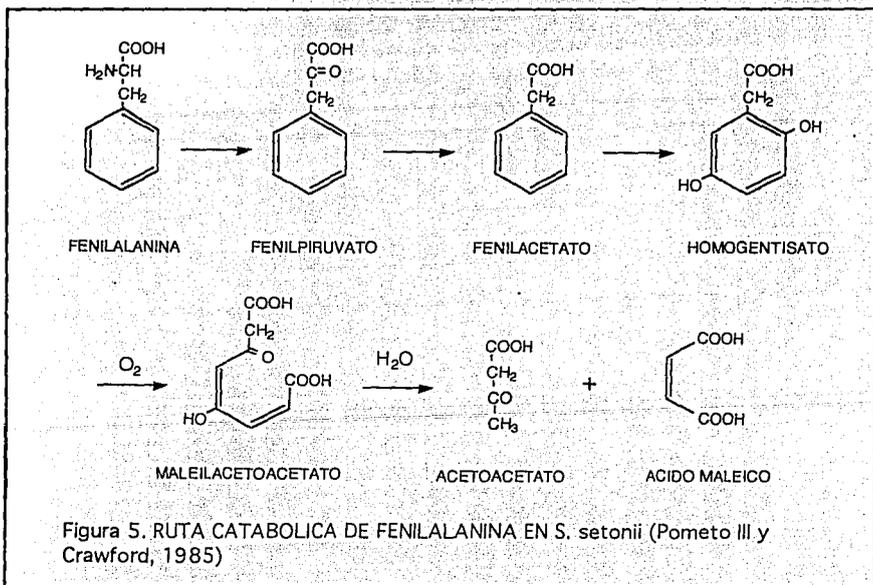
Otra parte de la selección consistiría en diferenciar los dos tipos de mutantes, para lo cual se pensaba crecerlas en medio mínimo con fenilalanina como fuente de nitrógeno; las que fueran incapaces de crecer

muy probablemente serían PAL (-), lo cual funcionaría en caso de que la PAL fuera responsable de la asimilación de fenilalanina.

Debido a que varios resultados indicaban que la PAL, no era responsable de la asimilación de fenilalanina en *S. verticillatus*, no se continuó la estrategia planteada anteriormente.

Con el fin de comprobar que existe una ruta de asimilación de fenilalanina en *S. verticillatus*, en la que no interviene PAL de manera directa, se realizaron los siguientes experimentos.

Se han descrito varias rutas catabólicas para aminoácidos aromáticos en numerosos organismos; sin embargo en el género *Streptomyces* existen muy pocos reportes. Basándose en estos estudios y en la ruta mas generalizada en actinomicetos, (Fig. 5); se buscaron los intermediarios por medio de cromatografía en capa fina.



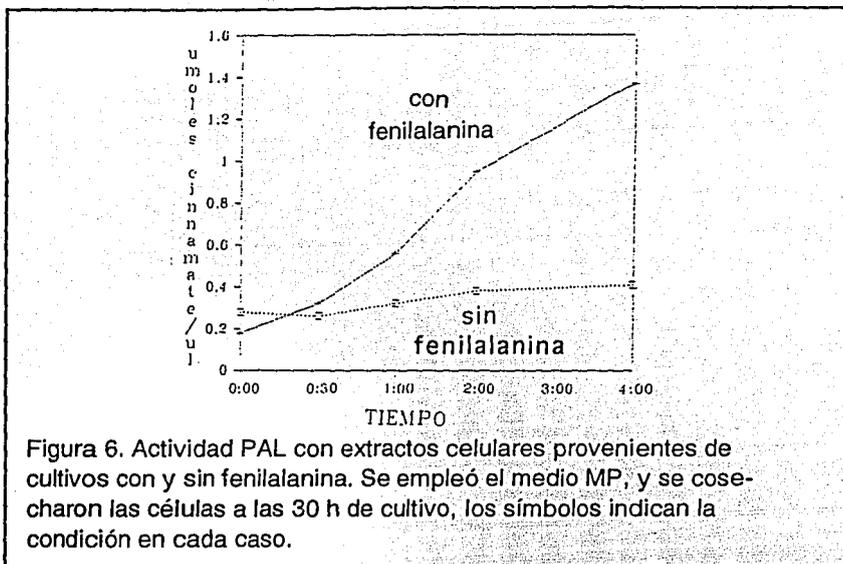
Se hicieron extracciones de sobrenadantes de cultivos con medio mínimo y fenilalanina como fuente de nitrógeno, los cuales se analizaron por TLC. Los compuestos identificados fueron el ácido fenilacético y el ácido homogentísico; no fue posible identificar si se formaba fenilpiruvato debido a que el estándar contenía otros compuestos contaminantes. Se demostró la existencia de la enzima homogentisato 1,2-dioxigenasa, enzima que rompe el anillo aromático del ácido homogentísico convirtiéndolo en maleilacetoacetato, mediante la cuantificación espectrofotométrica de este compuesto (Crawford, 1975; Sutherland *et al.*, 1981).

Al demostrar de una manera indirecta que la PAL no participa en la asimilación de fenilalanina, y que posiblemente la ruta del homogentisato sea la que actúa para catabolizarlo, surgió la pregunta: ¿Qué función desempeña la enzima dentro del microorganismo y para qué presenta la actividad PAL?

Inducción de la fenilalanina amonio liasa

La fenilalanina amonio liasa de *S. verticillatus* es una enzima inducible como se observa en la Fig. 6, al igual que la mayoría de las PAL descritas. Como anteriormente se mencionó participa en la formación del ácido trans-cinámico, el cual a su vez es transformado a cinamamida, un compuesto considerado como metabolito secundario. De aquí surge la pregunta de si ésta es la única función de PAL en el microorganismo.

Estudios con ácido trans-cinámico en cultivos tanto en medio mínimo como en medio rico demuestran que éste compuesto es un metabolito que inhibe el crecimiento de *S. verticillatus*, lo cual sugiere que cuando se produce por la PAL, debe ser transformado a cinamamida rápidamente.



En la Fig.7, se puede observar el efecto de TCN (0.5 mM) en medio mínimo. En el caso de glucosa y amonio, el efecto es mayor al observado con fenilalanina y glucosa e incluso con amonio, glucosa y fenilalanina. Una posible explicación a éstos resultados, sería que al inducirse la PAL y probablemente la enzima que transforma TCN en cinamamida, se favorece su modificación a este compuesto, que como se había mencionado, es un metabolito que se excreta al medio y no es tóxico. Cabe mencionar que en estudios posteriores se demostró por medio de TLC, que la formación de cinamamida se incrementa en estos cultivos, a diferencia de los cultivos en los que no se adicionó fenilalanina.

Se intentaron buscar mutantes resistentes a TCN, las cuales se esperaba que pudieran ser sobreproductoras de PAL y por medio de la reacción reversa de la enzima, transformaran éste compuesto a fenilalanina, permitiéndoles crecer en presencia de TCN. Otro tipo de mutantes serían las que sobreprodujeran la enzima encargada de transformar el TCN en cinamamida (metabolito no tóxico, que se excreta al medio de cultivo). Como se mencionó anteriormente, no fue posible

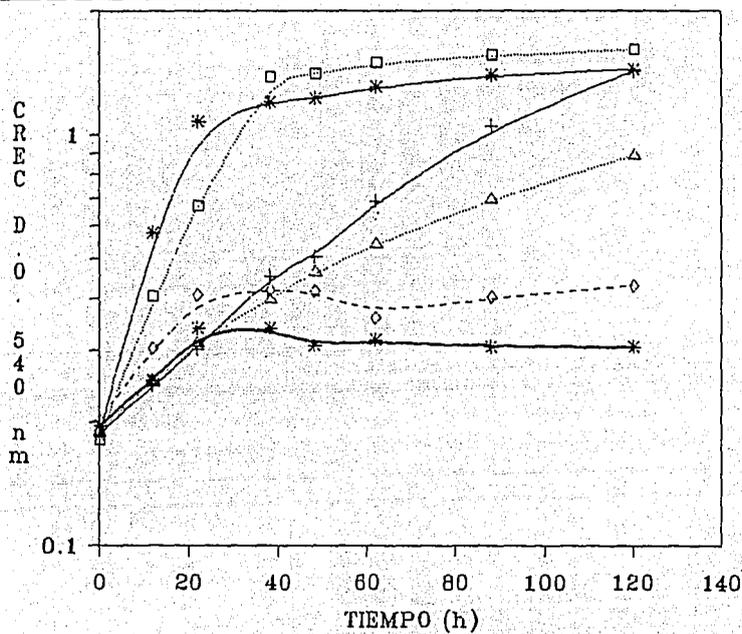


Figura 7. Efecto de ácido t-cinámico TCN (2mM) en el crecimiento de *S. verticillatus*. Las condiciones de cultivo se indican mediante los símbolos.

obtener mutantes empleando NTG, las posibles causas se indican con anterioridad.

PRODUCCION DE PAL CON RESPECTO AL TIEMPO DE CULTIVO

Se determinó la etapa del crecimiento en la que aparece la actividad PAL. Como se observa en la Fig. 8, esta enzima se presenta en la fase exponencial tardía del crecimiento y por un periodo muy corto de tiempo. No se comprobó si posteriormente se degrada o es inhibida por algún metabolito que se sintetice en esta fase. Sin embargo, por presentarse en una etapa del cultivo en la que el crecimiento es menor, además de que, como se sugiere con los experimentos de asimilación, no tiene un papel catabólico, podría pensarse que se trata de una enzima de metabolismo secundario.

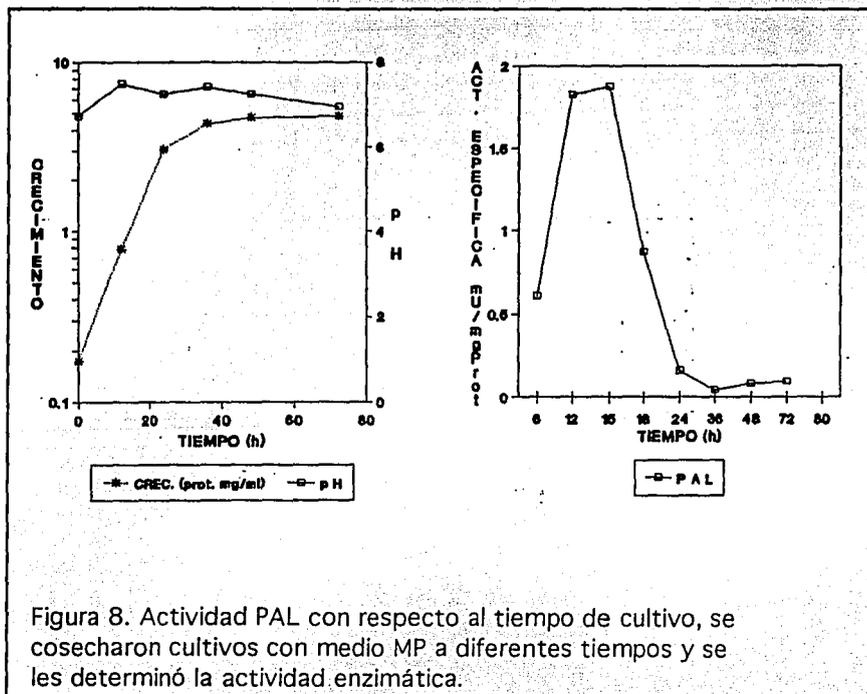


Figura 8. Actividad PAL con respecto al tiempo de cultivo, se cosecharon cultivos con medio MP a diferentes tiempos y se les determinó la actividad enzimática.

ACTIVIDAD PAL EN OTROS *Streptomyces*

Es conveniente hacer notar que la PAL no se presenta en procariontes excepto por *S. verticillatus* y *Bacillus polymixa*; en este último sólo existe un reporte aislado de la actividad de esta enzima (Shetty *et al.*, 1986). Se ha buscado en otras bacterias como *Streptococcus faecalis* y *Escherichia coli* (Young *et al.*, 1966) y no se ha observado. En este estudio se buscó en otros estreptomicetos (Tabla IV)

TABLA IV. Presencia de PAL en diversos *Streptomyces*

Microorganismo	Actividad	Producción de mitomicina
<i>S. lividans</i>	-	-
<i>S. coelicolor</i>	-	-
<i>S. griseus</i>	-	-
<i>S. phaeocromogenes</i>	-	-
<i>Streptovercillum sp.</i>	+	+
<i>S. verticillatus</i>	+	+

Como se puede observar en la TABLA IV, la actividad PAL solamente se presentó en *S. caespitosus* (actualmente reclasificado como *Streptovercillum sp.*), cercano filogenéticamente a *S. verticillatus*, que también produce mitomicina. Esta relación filogenética podría explicar la presencia de la enzima, sin embargo no se puede descartar la posible relación entre la producción de mitomicina y la actividad PAL.

POSIBLE RELACION ENTRE LA PRODUCCION DE MITOMICINA Y LA PRESENCIA DE LA ENZIMA FENILALANINA AMONIO LIASA.

La ruta biosintética de la producción de mitomicina no ha sido elucidada completamente, aunque se sugiere que algunos pasos sean similares a la ruta biosintética de la rifamicina, un antibiótico que pertenece a la familia de las ansamicinas, del cual se cuenta con mayor

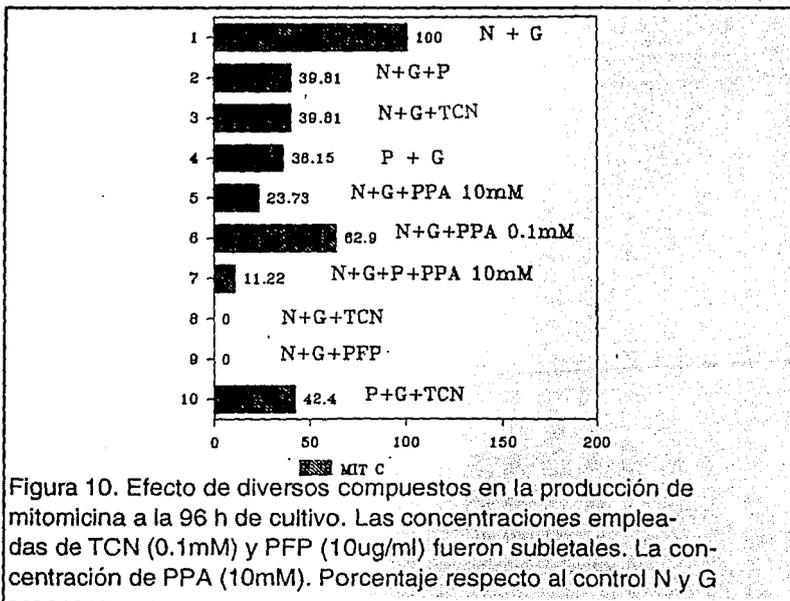
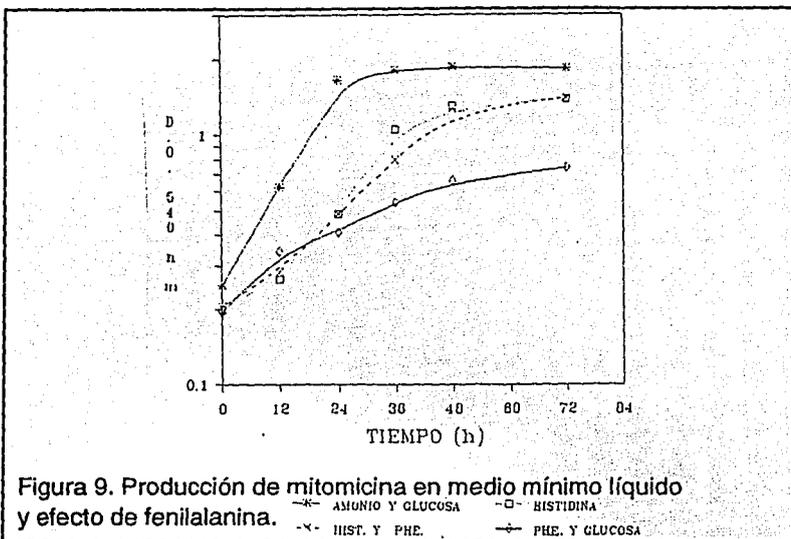
información (Hornemann, 1981). Este grupo de antibióticos tienen un intermediario común, el ácido 3-amino-5-hidroxibenzoico (C7N), derivado de la ruta del shikimato o ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos.

Se sabe que la regulación de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos se presenta a diversos niveles. Uno de los puntos de regulación más importantes se presenta a nivel de la primera enzima de la ruta biosintética, la 3-deoxi-D-arabinoheptuloso-7-fosfato sintetasa (DAHP sintetasa). Existen numerosos reportes en los que se ha observado que la regulación de la síntesis de antibióticos en esta familia se presenta a nivel de esta enzima y que los aminoácidos aromáticos intervienen de manera importante en dicho control (Chiao, *et al.*, 1988; Tianhui y Chiao, 1989).

Con estos antecedentes se llevaron a cabo experimentos para determinar si se presentaba algún efecto sobre la biosíntesis de mitomicina, ejercido por los aminoácidos aromáticos, específicamente por fenilalanina. Los estudios de producción de mitomicina se realizaron inicialmente en medio mínimo y posteriormente suplementando éste con extracto de levadura (0.1%) y casaminoácidos (0.2%), para favorecer un mejor crecimiento. En estas condiciones, en cultivos con amonio y glucosa, la mitomicina se produce en la etapa estacionaria del crecimiento, a partir de las 48 h del cultivo (Fig. 9).

Como se puede observar en la Fig. 10, la fenilalanina presentó un efecto negativo sobre la producción de mitomicina al igual que el triptofano. Los reportes existentes con respecto a la regulación de la DAHP sintetasa en actinomicetos muestran ejemplos de regulación por medio del triptofano, sin embargo no podría descartarse la regulación por medio de la fenilalanina como se observa con otros organismos.

Estos resultados nos llevaron a pensar en un posible modelo de regulación de la biosíntesis de mitomicina en el que intervinieran la fenilalanina y la fenilalanina amonio liasa (Fig.11). Este modelo se sustenta en la observación de que la fenilalanina amonio liasa



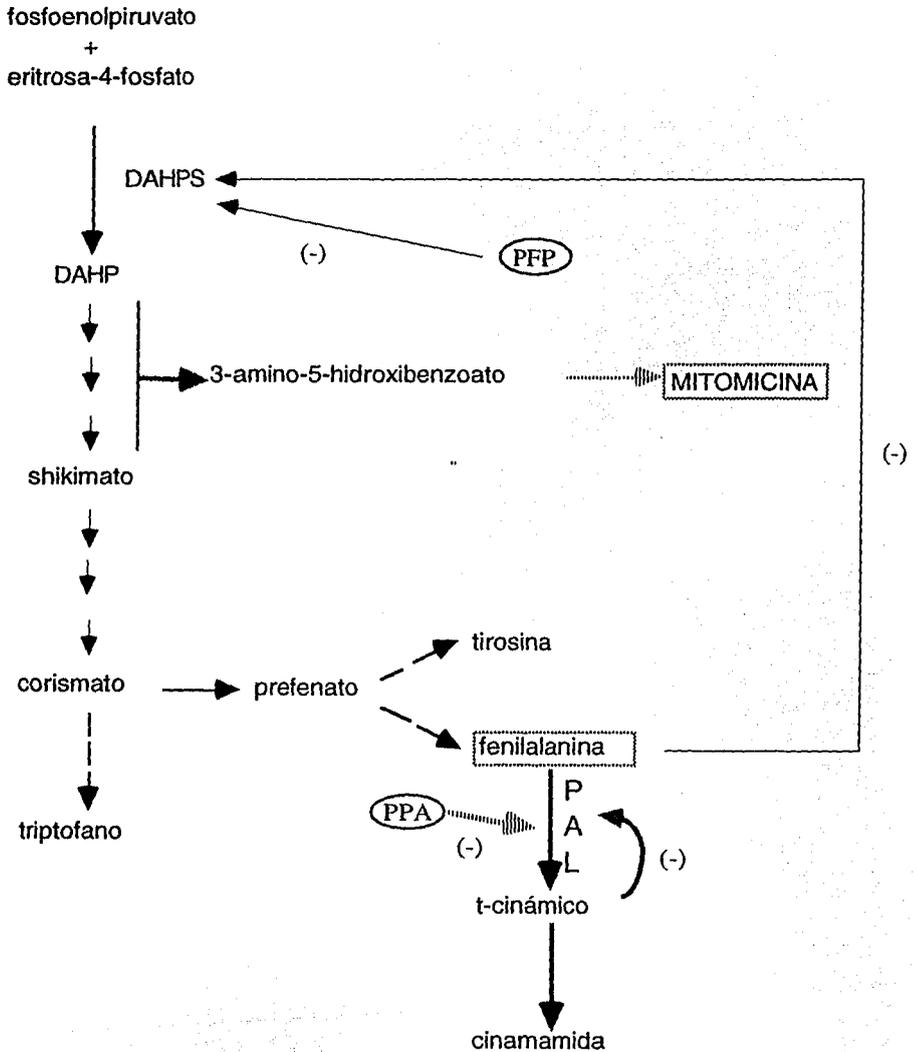


FIGURA11. MODELO DE INTERACCION PAL-MITOMICINA

posiblemente sea una enzima de metabolismo secundario de igual manera que la producción de mitomicina.

Si en algún momento del crecimiento de *S. verticillatus* se presentara una acumulación de fenilalanina, habría un efecto negativo sobre alguna de las primera tres enzimas de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, que también intervienen en la formación del intermediario de la síntesis de mitomicina, el 3-amino-hidroxibenzoato, lo cual afectaría la producción de este antibiótico. Este incremento en la poza intracelular de fenilalanina permitiría la inducción de la fenilalanina amonio liasa, transformando este aminoácido en ácido trans-cinámico, el cual a su vez se transformaría en cinamamida. Este proceso debe ser eficiente, ya que, como se mencionó anteriormente, el ácido TCN es tóxico para *S. verticillatus*.

La canalización de fenilalanina a cinamamida evitaría una posible retroregulación de alguna de las primeras tres enzimas de la ruta del shikimato, favoreciendo la producción de mitomicina.

Para comprobar esta hipótesis, se probaron varios compuestos que afectan la actividad de la fenilalanina amonio liasa. Estos experimentos se realizaron en medio mínimo, controlando que todos los cultivos alcanzaran un crecimiento similar, para evitar un efecto de éste.

Como se puede observar en la Fig. 11, el ácido fenilpropiónico (PPA) ejerce un efecto negativo sobre la producción de mitomicina. Como se había mencionado anteriormente éste compuesto inhibe la actividad PAL un 95%.

El ácido trans-cinámico (TCN), también es un inhibidor de PAL y ejerce un efecto negativo sobre la síntesis de mitomicina.

El análogo de fenilalanina, p-fluorofenilalanina (PFP), como se mencionó anteriormente es un inhibidor de la DAHP sintetasa de numerosos organismos y en éste caso ejerce un efecto muy marcado evitando que se produzca el antibiótico.

La cuantificación de la producción de antibiótico se realizó por el método de bioensayo y se comprobó la identidad de la mitomicina por medio de cromatografía en capa fina. Además se realizaron bioautografías para comprobar que la inhibición del crecimiento se debía a la mitomicina y no a otro compuesto intermediario.

En los casos descritos anteriormente (Fig. 10), muy probablemente se incrementa la concentración intracelular de fenilalanina, evitando su transformación en TCN y cinamamida; afectando alguna de las tres primeras enzimas de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, evitando a su vez la formación del intermediario 3-hidroxi-aminobenzoato. La enzima que más probablemente juegue un papel determinante, es la DAHP sintetasa, ya que existen numerosos reportes en los que tanto la regulación de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, como la regulación de la síntesis de antibióticos relacionados, se lleva a cabo a nivel de esta enzima.

Resulta interesante hacer notar que en el caso de los compuestos que inhibieron la actividad PAL, también se inhibió la síntesis de cinamamida lo cual se comprobó por medio de TLC, excepto en el caso de la adición de TCN, al contrario se incrementa como era de esperarse. Estos resultados apoyan la posible función de la PAL en la regulación de la poza de fenilalanina y consecuentemente del inicio de la síntesis de mitomicina en etapas tardías de crecimiento.

En el caso de *S. antibioticus*, organismo productor de antibióticos con precursores aromáticos, se presenta cierta inhibición por triptofano a nivel de la DAHP sintetasa (Murphy y Katz, 1980). En el caso de *Streptomyces sp* 3022a, productor de cloranfenicol, un antibiótico que también presenta un precursor derivado de la ruta del shikimato, se observó que la DAHP sintetasa se induce en la etapa exponencial de crecimiento justo antes de la producción del antibiótico (Lowe y Westlake, 1970). En *S. antibioticus* se presenta cierta represión por triptofano a nivel de esta enzima.

Es muy importante hacer notar que en *Nocardia mediterranei*, un organismo productor de rifamicina, con el intermediario aminobenzoato; se presenta cierta regulación a nivel de la DAHP sintetasa, por la acción de los tres aminoácidos aromáticos (Gygax, *et al.*, 1982). Curiosamente también se ha observado que este microorganismo presenta una ruta de asimilación de fenilalanina igual a la propuesta para *S. verticillatus* (DeBoer, *et al.*, 1989).

HISTIDINA AMONIO LIASA (HAL) DE *Streptomyces verticillatus*.

Con el fin de clonar el gen estructural de la fenilalanina amonio liasa se intentaron otras estrategias basadas en la homología que presentan a nivel de aminoácidos algunas PAL y HAL de diversos organismos

Inicialmente se intentó mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), amplificar un fragmento que se pudiera emplear como sonda homóloga para la detección del gen de PAL. Se diseñaron cuatro oligonucleótidos degenerados con base en la homología con HAL y PAL y tomando en cuenta el uso de codones de *Streptomyces* (Fig. 12), como se puede observar, hay regiones en las que las dos enzimas comparten aminoácidos conservados y regiones en las que solamente se comparten en las PAL. De esta forma se intentaba amplificar inespecíficamente la HAL y específicamente la PAL. Se tomaron en cuenta las secuencias de aminoácidos reportadas en ese momento; sin embargo actualmente se cuenta con mas secuencias de aminoácidos, correspondientes a fenilalanina amonio liasas de plantas.

Se requería saber si *S. verticillatus* contaba con actividad de histidasa, para lo cual se hicieron pruebas de actividad de histidasa en este microorganismo. Como se puede observar en la Tabla V, *S. verticillatus* presenta una actividad HAL que le permite crecer en medio mínimo con histidina como fuente de carbono y nitrógeno (Fig. 13).

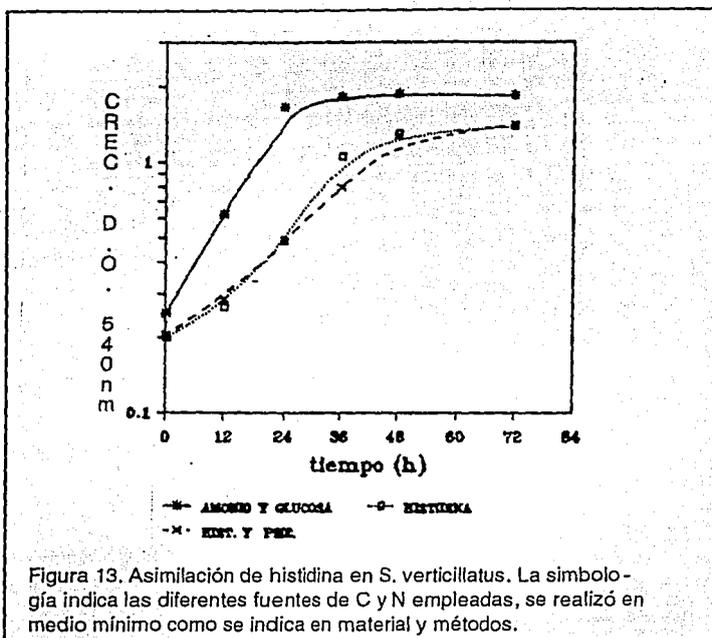


Tabla V. Actividad de histidasa en *S. griseus* y *S. verticillatus*

CULTIVO	<i>S. griseus</i>		<i>S. verticillatus</i>	
	PAL mU	HAL mU	PAL mU	HAL mU
NH ₄ , GLU	-	-	-	0
HIS	-	1.194	-	83.2
HIS, GLU	-	0.105	-	ND
HIS, PHE	-	0.360	2.035	28.0
PHE, GLU	-	-	3.75	0
PHE	-	-	ND	ND

Con estos antecedentes se realizaron numerosos intentos de amplificar alguna secuencia específicamente, empleando DNA de *S. verticillatus* y de *S. caespitosus* (que también tiene actividad PAL). Se obtuvieron amplificaciones inespecíficas, por lo que se variaron los diferentes parámetros que se sabe influyen en la reacción como son: concentración de cloruro de magnesio, concentración de nucleótidos, concentración de los templados, número de ciclos, así como su duración y las temperaturas de alineamiento y desnaturalización. El parámetro que resultó mas importante para este DNA fue la concentración de $MgCl_2$ (2.5 mM), lográndose obtener amplificaciones que no eran del tamaño esperado pero que repetían consistentemente. Posteriormente se les hizo un "Southern" con un fragmento interno del gen de histidasa de *S. griseus*, y no se observó hibridización.

Contando con el gen de histidasa de *S. griseus*, clonado en el plásmido pKK501 se hicieron pruebas de PCR con este DNA y de igual manera que con el DNA cromosomal de los organismos descritos anteriormente no se logró obtener una banda específica y del tamaño esperado.

Las razones por las cuales se piensa que no se lograron observar amplificaciones específicas son las siguientes: el empleo de oligonucleótidos degenerados disminuyó la probabilidad de amplificar la secuencia de interés. Aunque dentro de la mezcla de secuencias existía la capacidad de hibridar con el gen de histidasa de *S. griseus*, tampoco se pudo amplificar esta secuencia a partir del DNA cromosomal, ni aún empleando el DNA del plásmido pKK501, que contiene el gen de histidasa. Otra causa pudo ser la dificultad que existe de amplificar DNA de *Streptomyces* por su alto contenido de G+C (mayor a un 65%), y que las temperaturas empleadas no fueran las adecuadas. Por último no se puede eliminar la posibilidad de que los oligonucleótidos estuvieran mal diseñados o que hicieran falta ensayar otras condiciones de reacción.

Como se mencionó anteriormente se contaba con el gen de la histidasa de *S. griseus* y además de emplearlo como control en las reacciones de PCR, se intentaron hacer hibridaciones con el DNA de *S.*

verticillatus y un fragmento interno del gen de histidasa (750 pb), que al parecer comparte homología a nivel de aminoácidos entre las HAL y las PAL. Como controles se emplearon el DNA de *S. griseus* del cual se clonó el gen de histidasa empleado y el DNA de *S. coelicolor* que también presenta actividad HAL. Ya que se demostró que *S. verticillatus* presentaba actividad de histidasa, se esperaban obtener al menos dos bandas de hibridación, una correspondiente a HAL y otra a PAL.

Los experimentos de hibridación tipo Southern se realizaron marcando el fragmento empleado como sonda con ^{32}P o biotinilándolo. En los dos casos los resultados fueron similares, como se puede observar en la Fig. 14, sólo se obtuvo una banda de hibridación con el DNA de *S. verticillatus* y mucho más tenue que las bandas obtenidas con *S. coelicolor* y *S. lividans*. Se asumió que esta banda pertenece al gen de histidasa de *S. verticillatus* y no al de PAL. Se probaron varias condiciones de severidad en los lavados de los filtros con el DNA fijado, sin embargo bajando mucho la severidad del lavado no se obtenían bandas definidas, por lo que se decidieron probar otras estrategias de clonación.

Como se mencionó anteriormente recientemente se han reportado varias secuencias de aminoácidos de PAL de diversas plantas. Se realizó un alineamiento y como se puede observar en la Fig. 15 (A), se pueden distinguir varias familias, de éstas se tomó un representante y se hizo un alineamiento con las secuencias de aminoácidos de las diferentes histidasas reportadas hasta el momento (Fig. 15(B)). Es evidente que la histidasa de *S. griseus*, es mas semejante a las PAL que a las otras histidasas, y que como propone (Taylor *et al*, 1990), posiblemente la fenilalanina amonio liasa surgió de HAL o de un ancestro común.

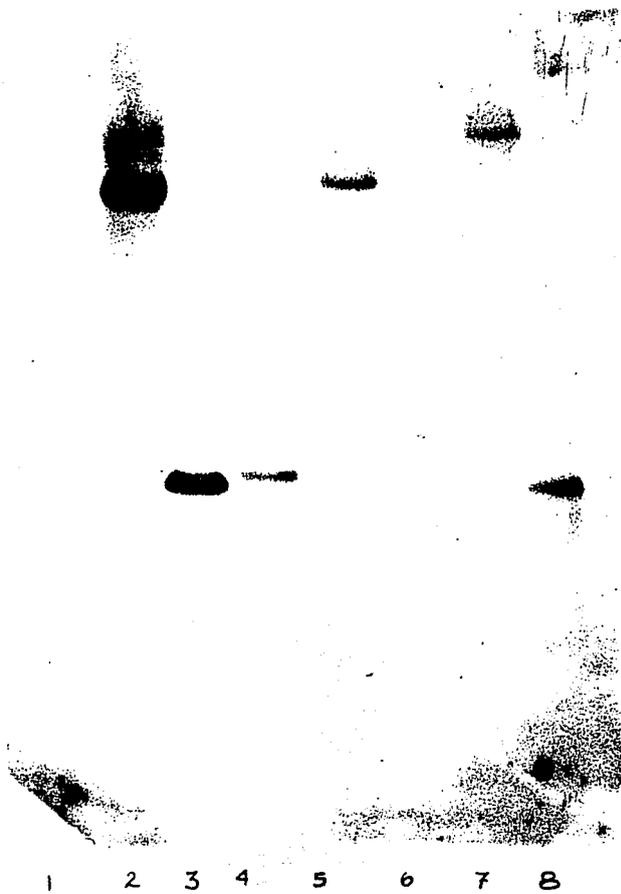


Figura 14. Hibridación de DNA cromosomal de diferentes especies de *Streptomyces*, con un fragmento interno del gen de histidasa de *Streptomyces griseus*. Carriles 1) marcador, 2) BamH1 (*S. griseus*), 3)Kpn (*S. griseus*), 4) Kpn (*S. coelicolor*), 5)BamH1 (*S. lividans*), 6)Kpn (*S. lividans*), 7) BamH1 (*S. verticillatus*) 8) Kpn (*S. verticillatus*)

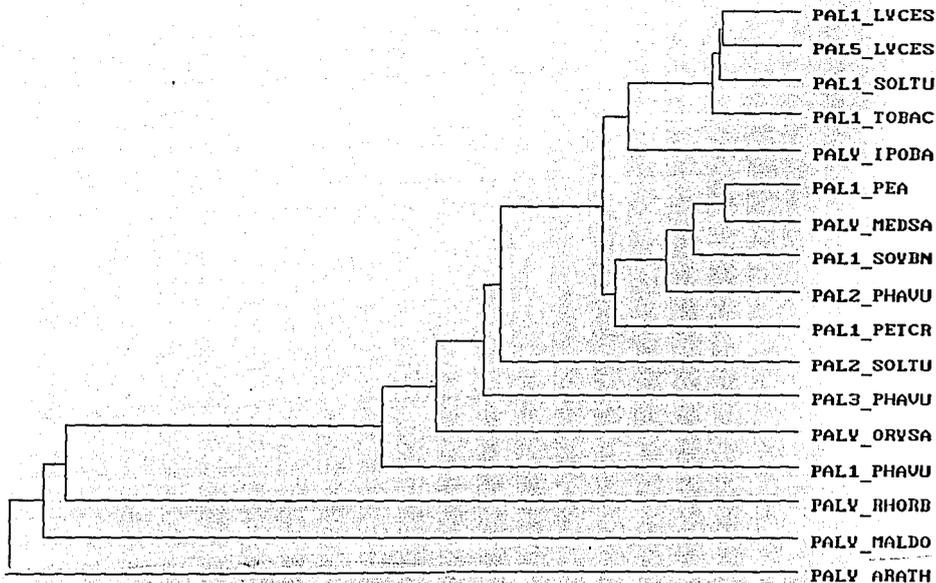
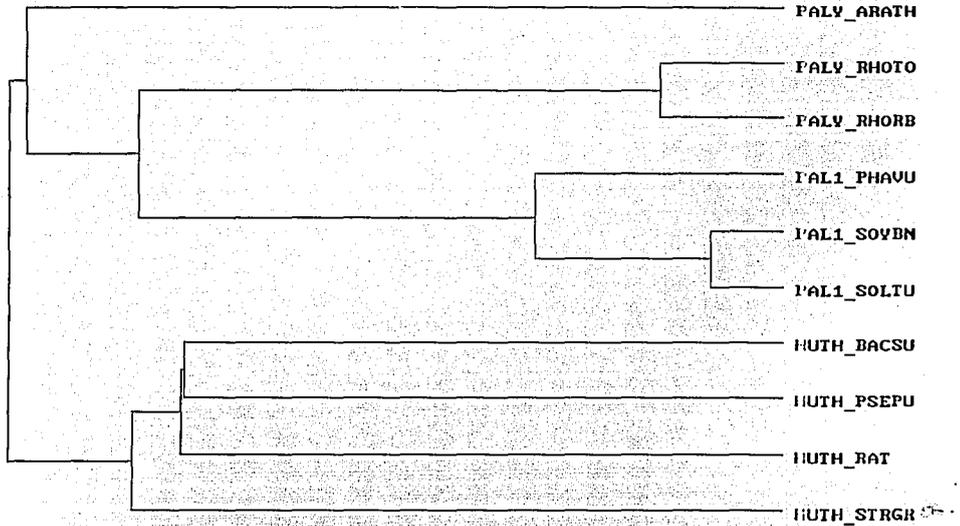


Figura 15. A) Dendrograma del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las PAL. Realizado con el programa Clustal de PCgene

- [1] PAL1 *Lycopersicon esculentum* (TOMATO).704 residuos.
- [2] PAL5_LVCES *Lycopersicon esculentum* (TOMATO)721 residuos.
- [3] PAL1_SOLTU *Solanum tuberosum* (PAPA)720 residuos.
- [4] PAL1_TOBAC *Nicotiana tabacum* (TOBACO)715 residuos.
- [5] PALY_IPOBA *Ipomea batatas* (CAMOTE)707 residuos.
- [6] PAL1_PEA *Pisum sativum* (CHICHARO)723 residuos.
- [7] PALY_MEDSA *Medicago sativa* (ALFALFA)725 residuos.
- [8] PAL1_SOYBN *Glycine max* (SOYA)713 residuos.
- [9] PAL2_PHAVU *Phaseolus vulgaris* (FRIJOL) 712 residuos.
- [10] PAL1_PETCR *Petroselinum crispum* (PEREJIL)716 residuos.
- [11] PAL2_SOLTU *Solanum tuberosum* (PAPA)590 residuos.
- [12] PAL3_PHAVU *Phaseolus vulgaris* (FRIJOL)710 residuos.
- [13] PALY_ORYSA *Oryza sativa* (ARROZ)701 residuos.
- [14] PAL1_PHAVU *Phaseolus vulgaris* (FRIJOL)(FRAGMENTO)506 residuos.
- [15] PALY_RHORB *Rhodotorula rubra* (LEVADURA) 713 residuos.
- [17] PALY_ARATH *Arabidopsis thaliana* (FRAGMENTO)240 residuos.



B) Dendrograma del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de diversas PAL y HAL.

- [1] PALY_ARATH *Arabidopsis thaliana* (FRAGMENTO) 240 residuos.
- [2] PALY_RHOTO *Rhodospiridium toruloides* (LEVADURA) 716 residuos.
- [3] PALY_RHORB *Rhodotorula rubra* (LEVADURA) 713 residuos
- [4] PAL1_PHAVU *Phaseolus vulgaris* (FRIJOL) 712 residuos.
- [5] PAL1_SOYBN *Glycine max* (SOYA) 713 residuos.
- [6] PAL1_SOLTU *Solanum tuberosum* (PAPA) 720 residuos.
- [7] HUTH_BACSU *Bacillus subtilis* 508 residuos.
- [8] HUTH_RAT *Rattus norvegicus* (RATA) 657 residuos
- [9] HUTH_PSEPU *Pseudomonas putida* 509 residuos
- [10] HUTH_STRGR *Streptomyces griseus* 516 residuos

PURIFICACION DE LA FENILALANINA AMONIO LIASA

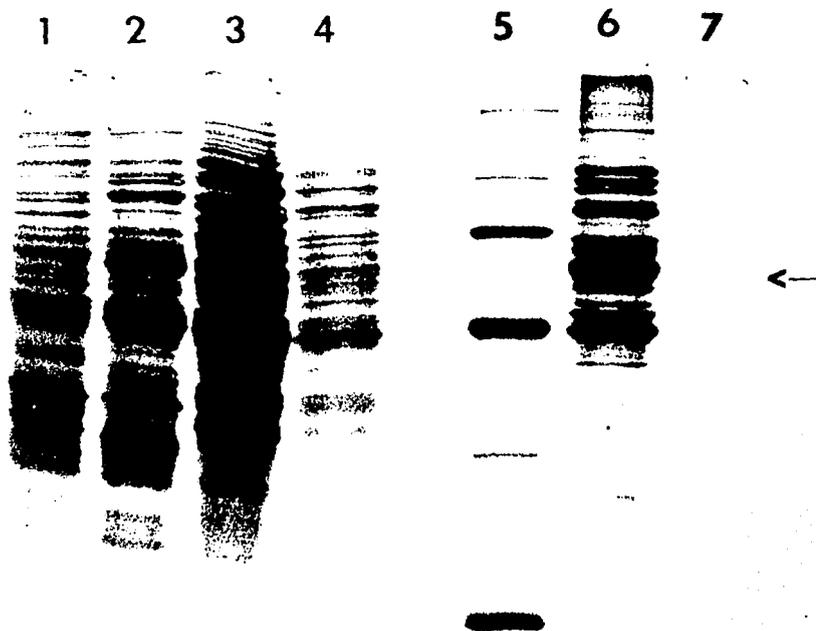
La purificación de PAL se realizó con el objeto de secuenciar el extremo amino terminal de la proteína y diseñar un oligonucleótido específico que se empleara como sonda para la selección a partir de un banco genómico. Se hicieron numerosos intentos y numerosos cambios en la estrategia inicial y aquí se presenta solo un ejemplo de una purificación, en la que se obtuvo un factor de purificación alto. Se puede observar en la Fig. 16, que en el último paso de purificación se presentan muy pocas bandas; sin embargo no se logró obtener una purificación de la proteína a homogeneidad. Posteriormente se identificó la banda correspondiente a la PAL por medio de inmunoblot.

Tabla VI. TABLA DE PURIFICACION DE LA PAL

CONDICION	VOL.INICIAL (ml)	VOL.FINAL (ml)	PROTEINA (mg/ml)	ACT.VOL. (mU/ml)	ACT. ESP. (mU/mg)	RENDIMEN- TO (%)	FACTOR DE PURIF.
EXTRACTO CRUDO	16.8	16.0	21.01	49.71	2.36	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ 50-70%	4.0	3.0	26.8	146.4	5.46	73.6	2.3
SEPHACRYL S-300	15.0	14.5	1.39	20.17	11.44	38.06	6.1
CENTRIP. C-100	1.7	1.5	ND	104.23	ND	22.27	ND
DEAE-CEL	0.7	0.65	0.049	52.0	1061.22	4.57	449.66
SEPHACRYL S-400*	1.5	1.5	0.0022	1.85	840.9	0.34	356.31

*cabe mencionar que en este paso se perdió la actividad enzimática

Entre las dificultades para la purificación de la PAL se encontraron los siguientes:



PURIFICACION DE PAL

La purificación de la PAL llevo a cabo con el fin de obtener la secuencia del amino terminal e intentar, por medio de una sonda, clonar el gen estructural de la enzima. Los avances se muestran en el SDS/PAGE, empleando diferentes resinas cromatograficas.

- 1.- extracto crudo
- 2.- precipitación con sulfato de amonio (50-70%)
- 3.- filtración en gel en Sephacryl S-300
- 4.- concentración con centrífep-100
- 5.- marcador de peso molecular
- 6.- cromatografía de intercambio ionico (DEAE-celulosa)
- 7.- filtración en gel en Sephacryl S-400
posible PAL

Figura 16. Ejemplo de Purificación . PAGE- SDS

La enzima presenta un pico de actividad durante un periodo de tiempo muy corto como se mencionó con anterioridad. Además, resulta difícil monitorear la etapa de crecimiento en el cultivo por absorbancia, debido al tipo de medio empleado para la producción de la enzima.

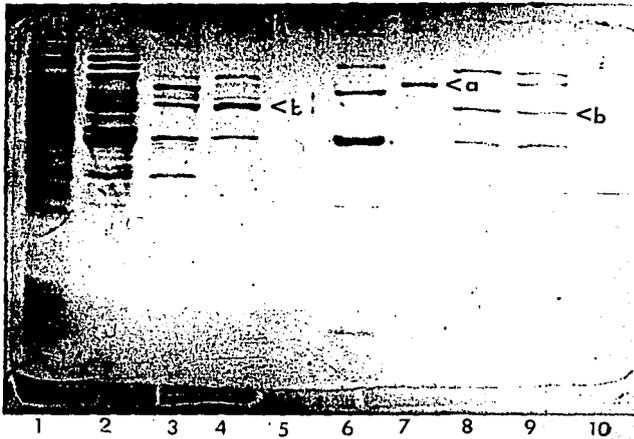
- La cantidad de la enzima aún en el pico de actividad, es muy pequeña con respecto al resto de las proteínas intracelulares, por lo que se partió de volúmenes mayores de cultivo (hasta 2l); sin embargo la infraestructura con la que se contaba para la purificación no permitió trabajar con volúmenes aún mayores.

- La PAL presenta características comunes a la mayoría de proteínas intracelulares favoreciendo la copurificación de otras proteínas. Por lo que se empleó una columna de afinidad fenilalanina-agarosa, sin embargo ésta columna funcionó como una columna hidrofóbica.

- Inicialmente no se podía identificar la banda correspondiente a la PAL, además en los últimos pasos de purificación, en PAGE no se observaban bandas tiñendo los geles con azul de coomasie, aún detectándose actividad en las fracciones.

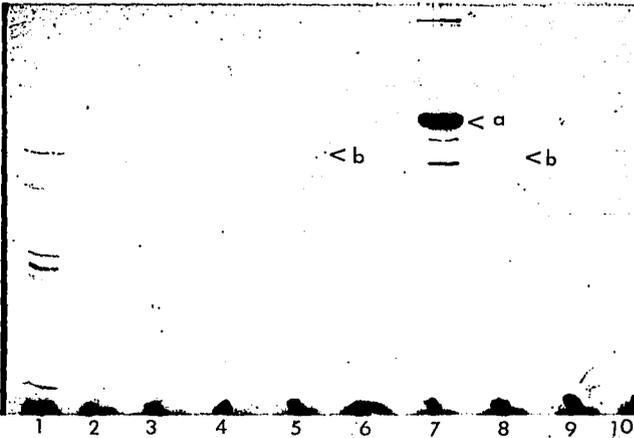
La banda correspondiente a la PAL, se pudo identificar gracias al empleo de anticuerpos anti-PAL de *Rhodotorula* elaborados con otro objetivo que se describirá posteriormente. En la Fig. 17, se observa un ejemplo de purificación en PAGE (A) y el inmunoblot (B) en donde se puede apreciar la banda correspondiente a PAL.

SDS PAGE



A) PAGE-SDS

INMUNOBLOT



B) Inmunoblot.

PURIFICACION DE PAL Y DETECCION POR MEDIO DE ANTICUERPOS ANTI-PAL (Rhodotorula) SDS/PAGE

Figura 17

- 1.- EXTRACTO CRUDO
- 2.- PREC. SULFATO DE AMONIO (50-70%)
- 3.- FILTRACION EN GEL (sephacryl s-300)
- 4.- DEAE- CEL (GRADIENTE NaCl 2- 4 M)
- 5.- AGAROSA-FENILALANINA
- 6.- MARCADOR DE PESO MOLECULAR
- 7.- PAL Rhodotorula
- 8.- DEAE- CEL

Debido a que la cantidad de proteína necesaria para la secuenciación del extremo amino terminal es muy superior a la alcanzada en los últimos pasos de purificación se intentó otra estrategia para la clonación del gen de PAL.

Producción de Anticuerpos anti-PAL de *Rhodotorula*

Se intentó probar otra estrategia que permitiera la clonación del gen estructural de la fenilalanina amonio liasa de *S. verticillatus*, basada en la semejanza a nivel de aminoácidos y posiblemente también a nivel de estructura de las diferentes PAL que han sido descritas. Esta estrategia consistía en obtener anticuerpos anti-PAL de otro organismo que pudieran cruzar con la PAL de *S. verticillatus* y permitieran identificar empleando un banco de genes expresado en un vector λ gt11, una clona positiva que llevara el gen de PAL.

Estos anticuerpos se hicieron contra la PAL de *Rhodotorula glutinis* porque es la proteína que estaba disponible comercialmente y semipurificada. Se obtuvieron los anticuerpos con un título de 1:36000. Cruzaron prácticamente con una sola banda de la mezcla de proteínas de las que se partió, sin embargo estos anticuerpos daban una señal muy baja con la PAL de *S. verticillatus* y varias bandas con otras proteínas de un extracto celular de este microorganismo. Incluso el suero preinmune de conejo cruza con algunas bandas de un extracto celular.

Los resultados anteriores hacían poco factible el poder seleccionar una clona positiva específica que llevara el gen de PAL, ya que igualmente se obtendrían falsas positivas.

Estos anticuerpos nos sirvieron para identificar en un extracto purificado la proteína de nuestro interés. Incluso se han empleado en otros estudios para identificar otras PAL de plantas ya que, como se mencionó si tienen la capacidad de cruzar con otras enzimas aún sin ser de la misma especie.

CONCLUSIONES

- *Streptomyces verticillatus* utiliza la fenilalanina principalmente como fuente de nitrógeno.

- Estudios con análogos de fenilalanina y ac. t-cinámico sugieren que la PAL no es la responsable de dicha asimilación.

- Se identificaron los intermediarios y una de las enzimas de una posible vía de asimilación para la fenilalanina; la vía del homogentisato.

- La PAL es una enzima inducible por fenilalanina en este microorganismo, y su máxima actividad se presenta en la etapa tardía del crecimiento exponencial.

- Además de *S. verticillatus*, la actividad PAL solo se encontró en *Streptoverticillium* (antes *S. caespitosus*), un organismo también productor de mitomicina.

- Por medio de anticuerpos anti-PAL, se identificó la banda correspondiente a la PAL de *S. verticillatus*, en geles de SDS/PAGE, mostrando que las subunidades de esta enzima presentan un peso molecular de aproximadamente 55 kDa.

- Empleando un fragmento interno del gen de histidasa de *S. griseus* se identificó el gen de histidasa de *S. verticillatus*.

- En cuanto a la producción de mitomicina, se ha observado que la fenilalanina, triptofano y p-flourofenilalanina presentan un efecto negativo, disminuyendo notablemente la producción del antibiótico, lo cual posiblemente se deba a un efecto sobre la DAHPS.

- También se observó que el ác. t-cinámico y su análogo el ac. fenilpropiólico (inhibidores de PAL), también ejercen un efecto negativo en cuanto a la producción de mitomicina

BIBLIOGRAFIA

- Abell, W. C. y Shen, R. (1987) Phenylalanine Ammonia Lyase from Yeast *Rhodotorula glutinis*. Meth. Enzymol. 142: 242-249.
- August, R., Flickinger, C. y Sherman, D. (1994). Cloning and Analysis of a Locus (*mcr*) Involved in Mitomycin C Resistance in *Streptomyces lavendulae*. J. Bacteriol. 176(14):4448-4454.
- Bezanson, S. G., Desaty, D., Emes, V. A. y Vining, C. L. (1970). Biosynthesis of cinnamamide and detection of phenylalanine ammonia-lyase in *Streptomyces verticillatus*. Can. J. Microbiol. 16:147-151.
- Camm, L. E. y Towers, N. (1973). Phenylalanine Ammonia Lyase. Phytochemistry. 12:961-973.
- Consevage, W. M. y Phillips, T. A. (1985). Presence and Quantity of Dehydroalanine in Histidine Ammonia-Lyase from *Pseudomonas putida*. Biochem. 24:301-308.
- Crawford, L. R. (1975). Degradation of homogentisate by strains of *Bacillus* and *Moraxella*. Can. J. Microbiol. 22:276-280.
- Cunha, A. (1988). Purification, characterization and induction of L-phenylalanine ammonia-lyase in *Phaseolus vulgaris*. Eur. J. Biochem. 178:243-248.
- Chater, K. (1984) Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. En Losick, R. y Shapiro, L. (eds). Microbial Development. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Chater, K. y Hopwood, D. (1989). Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. En Hopwood, D. y Chater, K. Genetics of Bacterial Diversity. Academic Press London Cap.7:129-148.
- Chiao, J. S., Xia, T. H. Ni, L., Gu, W. Jin. Z. y Mei. B. (1988) Studies on the metabolic regulation of rifamycin-SV biosynthesis. Biol. Actinomycetes 88. 412-417.
- De Boer, L. y Dijkhuizen, L. (1991) Microbial and Enzymatic Processes for L-Phenylalanine Production.
- De Boer, L., Vrijbloed, W., Rijssel, M. y Dijkhuizen, L. (1987) Regulation of phenylalanine metabolism in the facultative methylotroph *Nocardia sp.* Eur. Congr. Biotechnol. 3:453.

- Emes, V. A y Vining, C. L. (1970). Partial purification and properties of L-phenylalanine ammonia-lyase from *Streptomyces verticillatus*. Can. J. Biochem. 48:613-622.
- Evans, T. C., Hanna, K., Conrad, D., Peterson, W. y Misawa, M. (1987). Production of phenylalanine ammonia-lyase (PAL):isolation and evaluation of yeast strains suitable for commercial production of L-phenylalanine. Appl. Microbio. Biotechnol. 25:406-414.
- Evans, T. C., Conrad, D., Hanna, K., Peterson, W., Choma, Ch. y Misawa, M. (1987). Novel stabilization of phenylalanine ammonia lyase catalyst during bioconversion of trans-cinnamic acid to phenylalanine. Appl. Microbio. Biotechnol. 25:399-405.
- Fritz, R. R, Hodgins, S. D. y Abell W. (1976) J. Biol? Chem. 251(15):4646-4650. .
- Gilbert, H., Clarke, T., Gibson, R., Stephenson, J. y Tully M. (1985). Molecular Cloning of the Phenylalanine Ammonia Lyase Gene from *Rhodospiridium totuloides* in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 161: 314-320.
- Goodfellow, M. y Cross, T. (1984) Classification. En Goodfellow, M., Modarski, M. y Williams, S.T.(Eds) The biology of the Actinomycetes. Academic press, London.
- Gyax , D., Christ, M., Ghisalba, O y Nüesch, J. (1982). Regulation of 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-Phosphate synthetase in *Nocardia mediterranei*. FEMS Microbil. Lett. 15:169-173.
- Gyax, D., Ghisalba, O., Treichler, H. y Nuesch, J. (1990). Study to the biosynthesis of the rifamycin-chromophore in *Nocardia mediterranei*. J. Antibiot. 43(3):324-326.
- Hodgins, S. D. (1971). Yeast Phenylalanine Ammonia-Lyase. J. Biol. Chem.246(9):2977-2985.
- Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, D. J., Smith, C. P., Ward, J. M. y Schrempf, H. (1985) Genetic manipulation of *Streptomyces* : A laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, England.

- Hornemann, U. (1981) Biosynthesis of the Mitomycins. En J. W. Corcoran (ed) Antibiotics IV . Springer Verlag. p. 295-312.
- Hoskins, J., Jack, G., Wade, H., Peiris, R., Wright, E., Starr, D. y Stern, J. (1980). Enzymatic control of phenylalanine intake in phenylketonuria. Lancet. February:392-396.
- Inoue, S., Mutsunaga, Y., Iwane, H., Sotomura, M. y Takashi N. (1986) Entrapment of phenylalanine ammonia-lyase in Silk fibroin for protection from proteolytic attack. Biochim. Biophys. Res. Comm. 141(1):165-170.
- Jangaard, O. N. (1974). The characterization of phenylalanine ammonia-lyase from several plant species. Phytochem. 13:1765-1767.
- Kalghati, K. K. y Subba Rao, P. V. (1975) Microbial Phenylalanine Ammonia lyase, Purification , subunit structure and Kinetic properties of the enzyme from *Rhizoctonia solani* . Biochem. J. 149:65-72.
- Kane, F. J. y Fiske, J. M. (1985). Regulation of Phenylalanine Ammonia Lyase in *Rhodotorula glutinis*. J. Bacteriol. 161(3):963-966.
- Kendrick, K. y Wheelis, M. (1982). Histidine Dissimilation in *Streptomyces coelicolor*. J. Gen. Microbiol. 128:2029-2040.
- Langer, M., Reck, G., Reed, J. y Retey, J. (1994) Identification of serine-143 as the most likely precursor of dehydroalanine in the active site of histidine ammonia-lyase. A study of the overexpressed enzyme by site-directed mutagenesis. Biochemistry. 33: 6462-7
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N.J., Farr, A. C. y Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem 193:265-275.
- Lowe, D. A. y Westlake, D. W. (1970) Regulation of Chrolamphenicol Synthesis in *Streptomyces* sp. 3022a. 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-Phosphate synthetase. Can. J. Biochem. 49:448-455.
- Magasanik, B., Kaminskas, E. y Kimhi, Y. (1971). Histidase (histidine ammonia-lyase) (*Bacillus subtilis*). Methods Enzymol. 17B:47-50.
- Murphy, M y Katz, E. (1980) Regulatory control of 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-Phosphate synthetase in *Streptomyces antibioticus*. Can. J. Microbiol. 26:874-880.

- Ogata, K., Uchiyama, K. y Yamada, H. (1967). Metabolism of aromatic amino acids in microorganism. Part. 1:formation of cinnamic acid from phenylalanine. *Agric. Biol. Chem.* 31:200-206.
- Orndorff, A. S., Constantino, N., Stewart, D. y Durhams, D. (1988). Strain Improvement of *Rhodotorula graminis* for Pruduction of a novel L-Phenylalanine Ammonia-lyase. *Appl. Env. Microbiol.* 54(4):996-1002.
- Pometo III, A. y Crawford, D. L. (1985). L-Phenylalanine and L-Tyrosine Catabolism by Selected *Streptomyces* Species. *Appl. Env. Microbiol.* 49(3):727-729.
- Schemer, G., y Chandler, W. (1988) Enzyme Reactors for the Removal of Amino Acids from Plasma. *Meth. Enzymol.* 137:470-491.
- Schuster, B. y Retey J. (1994). Serine-202 is the putative precursor of the active site dehydroalanine ofphenylalanine ammonia lyase. Site-directed mutagenesis studies on the enzyme from parsley (*Petroselinum crispum* L.). *FEBS Lett* 349: 252-254.
- Shetty, K., Crawford, L. D. y Pometto III, L. A. (1986). Production of L-Phenylalanine from Starch by Analog-Rsistant Mutants of *Bacillus polymyxa* . *Appl. Env. Microbiol.* 52(4):637-643.
- Sikora, A. L. y Marzluf, A. G. (1982) Regulation of L-Phenylalanine Ammonia -Lyase by L-Phenylalanine and Nitrogen in *Neurospora crassa* . *J. Bacteriol.* 150(3):1287-1291.
- Sutherland, B. J., Crawford, L. D. y Pometto III, L. A. (1981). Catabolism of Substituted Benzoic Acids by *Streptomyces* Species. *Appl. Env. Microbiol.* 41(2):442-448.
- Taylor, G., Lambert, A., Sexmith, E., Sadler, J., Ray, N., Mahurant, J. y McInnes, R. (1990). Cloning and Expression of Rat Histidase. *J. Biol. Chem.* 265(30):18192-18199.
- Taylor, G. y McInnes, R. (1994). Site-directed mutagenesis of conserved serines in rat histidase. Identification of serine 254 as an essential active site residue. *J Biol Chem* 269:27473-27477 .
- Tianhui, X. y Chiao J. S. (1989) Purification of properties of DAHP synthase from *Nocardia mediterranei*. *Bichim Biophys. Acta.* 991: 1-5.

- Vining, C.L. (1992) Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity - a review. *Gene* 115:135-140.
- Wu, P., Kroening, A. T., White, J. P. y Kendrick, K. (1992). Histidine ammonia-lyase from *Streptomyces griseus*. *Gene*. 115:19-25.
- Yamada, S., Nabe, K., Izuo, N., Nakamichi, K. y Chibata, I. (1981). Production of L-Phenylalanine from t-cinnamic acid with *Rhodotorula glutinis*. containing L-Phenylalanine Ammonia Lyase activity. *Appl. Enviro. Microbiol.*, 42(5):773-778.