



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

REGULACIÓN POSTRADUCCIONAL DE LA
PROTEÍNA 1-DEOXI-D-XILULOSA 5-
FOSFATO SINTASA DE LA VÍA DEL METIL
ERITRITOL 4-FOSFATO PARA LA SÍNTESIS
DE ISOPRENOIDES

T E S I S

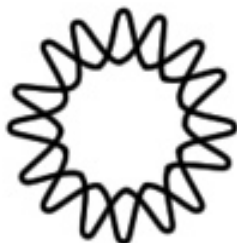
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

BIOL. MAREL CHENGE ESPINOSA

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. PATRICIA LEÓN MEJÍA

2012





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.

INDICE

- Resumen	3
- Abstract	5
- Introducción	7
▪ <i>Isoprenoides</i>	
▪ <i>Vía de síntesis de los isoprenoides</i>	
▪ <i>Compartimentalización de las síntesis de isoprenoides en plantas</i>	
▪ <i>Cloroplasto y su desarrollo</i>	
▪ <i>Proteasas y modificaciones postraduccionales en cloroplasto</i>	
▪ <i>Arabidopsis thaliana como modelo de estudio</i>	
▪ <i>Mutantes afectadas en el desarrollo del cloroplasto</i>	
- Antecedentes	24
- Antecedentes Directos	28
- Hipótesis	31
- Objetivo	31
- Materiales y Métodos	32
- Resultados y Discusión	42
▪ <i>Análisis estructural de diferentes proteínas DXS en busca de motivos conservados.</i>	
▪ <i>Análisis de la existencia de posibles modificaciones post-traduccionales en la proteína DXS que pudieran estar involucradas en cambios en su estabilidad.</i>	
▪ <i>Acotamiento de la región de la proteína DXS responsable de su regulación post-traducciona.</i>	
- Conclusiones	57
- Perspectivas	58
- Bibliografía	60
- Apéndices	66

RESUMEN

Los isoprenoides son una clase muy diversa de compuestos naturales con funciones centrales en las plantas. Estos son producidos a partir de dos precursores de cinco carbonos, el isopentil difosfato (IPP) y el dimetilalil difosfato (DMAPP). En las plantas, existen dos vías metabólicas para la síntesis de estas dos moléculas: la vía del mevalonato y la vía del Metil eritritol 4-fosfato (MEP). La vía MEP tiene lugar en el cloroplasto (Córdoba, 2009). Esta vía está presente en plantas, algas, algunos protozoos, y la mayoría de las eubacterias. El primer paso de la vía es catalizado por la enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS), el cual es un paso limitante de la vía (Estévez, 2001).

Estudios anteriores han demostrado que la expresión de los diferentes genes en esta vía está coordinada. En mutantes en genes de la vía los niveles de transcritos del resto de los genes se ven reducidos, similar a lo que se observa al de nivel proteína, a excepción de DXS la cual se acumula. La acumulación de la proteína DXS sugiere que esta proteína se regula postraduccionalmente en respuesta al un bloqueo de la ruta (Córdoba, 2009). Un efecto similar se observa en presencia de fosmidomicina, la cual es un herbicida que bloquea a la enzima 1-deoxi -D- xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXR) de la vía MEP (Guevara-García, et al, 2005). Estos resultados sugieren que se trata de un mecanismo de retroalimentación en respuesta a la demanda de los productos finales, IPP y DMAPP. En presencia de fosmidomicina, la vida media de DXS aumenta a más de 12 horas en comparación con una vida media de 80 minutos en ausencia de este inhibidor (San Román, no publicado).

Para analizar si la proteína DXS sufría posibles modificaciones postraduccionales que la estabilizarán, se realizaron geles de 2D geles de plantas silvestres tratadas con y sin fosmidomicina. El análisis de Western blot anti-DXS mostró diferencias en la migración de esta proteína en las muestras tratadas con el inhibidor. En el western varios puntos fueron reconocidas por el anticuerpo contra DXS, lo cual sugiere que existen modificaciones postraduccionales que cambian su punto isoeléctrico y la migración de la proteína y que probablemente podría estar relacionada con la estabilización DXS.

Para delimitar la región responsable de la estabilización de DXS, se realizaron construcciones basadas en un alineamiento de secuencias entre la proteína *Arabidopsis thaliana* contra sus ortólogos de *Escherichia coli* y *Deinococcus radiodurans*. Las construcciones fueron hechas removiendo progresivamente cada uno de los dominios de esta proteína. La primera construcción (DXS1726) elimina al dominio III; la segunda (DXS 1159), elimina a los dominios II y III. Éstas se compararon contra la proteína completa. Se generaron las plantas transgénicas con cada una de estas construcciones y fueron tratadas con y sin fosmidomicina. Al realizar western blots se observó que las construcciones que tenían a la proteína DXS completa y DXS 1726 se seguían acumulando en presencia de fosmidomicina. En el caso de DXS1159, esta acumulación no se observó. Estos datos indican que el segundo dominio de la proteína es importante para su estabilización

ABSTRACT

Isoprenoids are an extremely diverse class of natural compounds with central functions in plants. These are produced by two five-carbon precursors, the isopentylidiphosphate (IPP) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP). In plants, two metabolic pathways for the synthesis of these two molecules exist: the mevalonate pathway and the Methyl erythrytol 4-phosphate (MEP) pathway. The MEP pathway takes place in the chloroplast (Cordoba, 2009). This pathway is absent in animals, and present in plants, some protozoa, algae and most eubacteria. The first step of the pathway is catalyzed by the enzyme 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS) which is a limiting step of the pathway (Estévez, 2001).

Previous studies have shown that the expression of the different genes in this pathway is coordinated. When individual genes in the pathway are mutated, levels of the remaining genes are reduced. Similar response is observed at the protein level except for the DXS enzyme. This accumulation of the DXS protein suggests that this protein is regulated post-translationally in response to the block in the pathway (Córdoba, 2009). A similar effect is observed in the presence of fosmidomycin, an herbicide that blocks the DXR enzyme of the MEP pathway (Guevara-Garcia, et al, 2005). These results have led us to suggest that this constitutes a feedback mechanism in response to the demand for the IPP and DMAPP final products. In the presence of fosmidomycin the half-life of DXS increases to more than 12 hours in comparison to a half-life of 80 minutes in the absence of this inhibitor. We concluded that DXS is posttranslationally regulated.

To analyze any potential posttranslational modifications that the DXS protein may experienced, we performed 2D- gel electrophoresis protein analysis of wild type plants treated with and without fosmidomycin. Western blot analysis using an anti-DXS antibody shows, differences in the migration of this protein in the samples treated with the inhibitor. In the westerns several protein spots were recognized by the DXS antibodies suggesting that posttranslational modifications that change its isoelectric point and migration might probably related to the DXS stabilization.

To delimit the region responsible for DXS posttranslational modification a deletion series of the protein were made, based on bioinformatics sequence alignment between the *A. thaliana* DXS against the *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans* orthologs. Constructs were then made that progressively remove each of the domains of this protein. The first fragment (DXS1726) removes the domain III. The second deletion (DXS 1159), removes domains II and III. These deletions were compared to the full protein. Transgenic plants were generated with each of these constructs and were treated with and without fosmidomycin. Western blots of total protein extracts from the different transgenic lines were developed with anti-myc antibodies present in the fusion proteins. We observed that the DXS protein from the complete DXS and the DXS 1726 constructs accumulated in the presence of fosmidomycin. Interestingly, in the case of DXS 1159 this accumulation is not observed. This data indicates that the second domain of the protein is important for its stabilization.

INTRODUCCIÓN

Isoprenoides

Los isoprenoides o terpenoides son la familia de compuestos naturales más diversa que se conoce, esto se ve reflejado en los más de 40,000 isoprenoides que se han logrado aislar de distintos organismos (Roberts, 2007). Es de suponerse que debido a su gran diversidad, también tienen un papel importante en el desarrollo de todos los seres vivos, ya que varios de estos compuestos funcionan como reguladores de la expresión génica, como hormonas, como componentes de las membranas, como vitaminas, como agentes antimicrobianos, o como componentes de vías de transducción de señales (Holstein, 2004).

Las plantas son capaces de sintetizar muchos tipos de isoprenoides (del orden de miles) en diferentes órganos y/o en distintos momentos a lo largo de su desarrollo (Raven, 1999) y éstos se pueden clasificar como metabolitos primarios, necesarios para la función y el mantenimiento celular; o como metabolitos secundarios, los cuales son indispensables en el crecimiento o desarrollo de la planta. Los isoprenoides primarios incluyen a hormonas, pigmentos y esteroides, que sirven para funciones básicas como la modulación del crecimiento celular, en la captación de luz y protección de ésta, en la permeabilidad y fluidez de la membrana, entre otros. Los isoprenoides secundarios tienen gran atractivo comercial debido a que pueden ser usados como colorantes, saborizantes, químicos agrícolas y medicamentos, por lo cual también son sujeto de estudio por muchos grupos de investigación. (Roberts, 2007) (Tabla 1)

Tabla 1. Distintos isoprenoides de interés industrial y médico.

Nombre	# de Carbonos	Usos	Planta de la que se extrae
Artemisinina	15	antimalárico	<i>Artemisia annua</i>
Vinblastina	45	anti cancerígeno	<i>Catharanthus roseus</i>
Berberina	20	colorante amarillo, tratamientos para diabetes	<i>Berberis sp., Hydrastis canadensis</i>
Camptotecina	20	anticancerígeno	<i>Camptotheca acuminata</i>
Hipericina	30	antidepresivo, indicador de células cancerosas	<i>Hypericum perforatum</i>

Shikonina	15	anticancerígeno	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>
Paclitaxel/taxol	45	anticancerígeno	<i>Taxus brevifolia</i>

Todos los isoprenoides o terpenoides se derivan de bloques estructurales básicos de cinco carbonos, conocidos como isoprenos. Las unidades de isoprenos que dan lugar a los isoprenoides se unen de manera “cabeza-cola”, aunque las uniones “cabeza-cabeza” también son comunes, y algunos productos están formados de manera en que una “cabeza” se fusiona a una parte media del isopreno. (Figura 1)

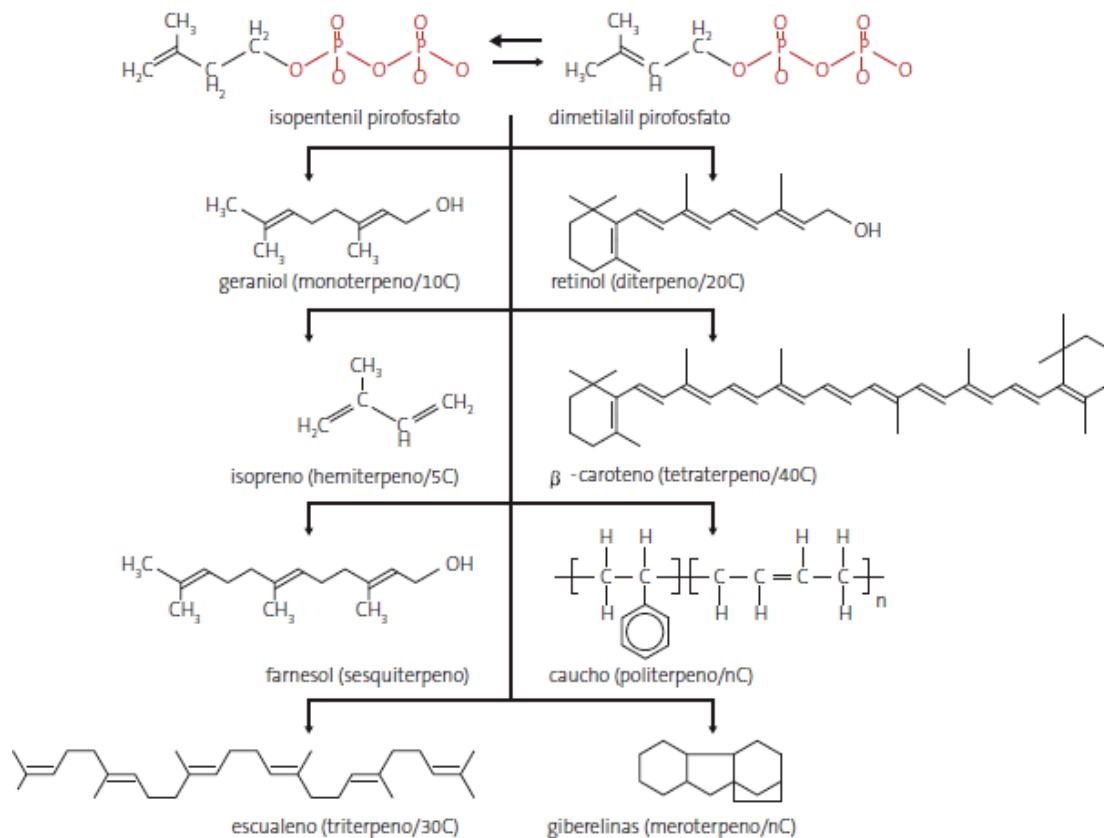


Figura 1 Estructura química de distintos isoprenoides y ejemplos representativos de cada uno de los subgrupos de compuestos (León y Guevara, 2007)

Los terpenoides o isoprenoides más pequeños contienen una sola unidad isoprenica. Estos son conocidos como hemiterpenos, siendo el más conocido el isopreno mismo, el cual es un producto volátil liberado por los tejidos fotosintéticamente activos. Los terpenoides de 10 carbonos son llamados monoterpenos, a pesar de estar constituidos por dos unidades

de isoprenos, esto debido a que originalmente eran considerados las unidades estructurales. Los monoterpenos mejor conocidos son componentes de las esencias volátiles de las flores y de los aceites esenciales de hierbas y especias, por lo que tienen importancia industrial para ser usados como saborizantes y perfumes.

Los isoprenoides que derivan de tres unidades de isopreno contienen 15 átomos de carbono y se llaman sequiterpenos. Estos también se encuentran en aceites esenciales, pero además actúan como fitoalexinas, que son compuestos con propiedades de antibióticos que producen las plantas en respuesta a la presencia de microbios. Los diterpenos son isoprenoides con esqueletos de 20 carbonos, es decir cuatro unidades de isoprenos. Ejemplos de estos compuestos son los fitoles, el cual es la cadena hidrofóbica de la clorofila, las hormonas giberelinas, las resinas ácidas de coníferas y leguminosas, algunas fitoalexinas y también compuestos de importancia farmacológica como el taxol, el cual se usa como un agente anticancerígeno.

Los terpenoides de 30 carbonos se denominan triterpenos y son generados por la unión de dos cadenas de 15 carbonos por su parte anterior, los brasinoesteroides son ejemplos de estos compuestos, al igual que los fitoesteroles componentes de la membrana celular, de algunas fitoalexinas, toxinas y ceras de la superficie.

Vías de síntesis de isoprenoides

Todos estos compuestos isoprenoides se derivan de dos precursores universales de cinco carbonos, el isopentil bifosfato (IPP) y su isómero alílico el dimetilalil bifosfato (DMAPP) (Córdoba, 2009) (Figura 2). Estos bloques estructurales se unen en diferentes número y sufren modificaciones diversas para dar origen a la gran diversidad de isoprenoides. Para la síntesis de estos dos bloques estructurales existen dos vías metabólicas evolutivamente no relacionadas.

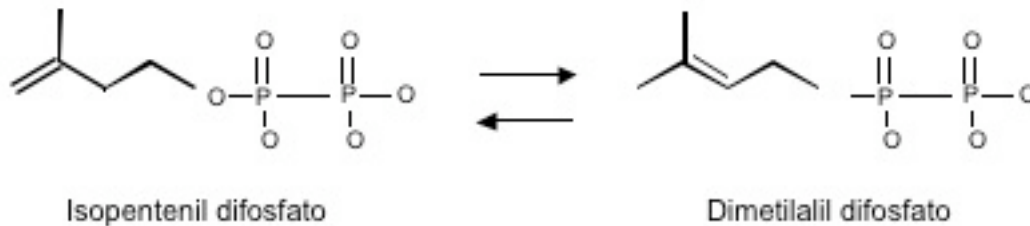


Figura 2 Estructura del isopentenil bifosfato (IPP) y del dimetilalil bifosfato (DMAPP).

Una de ellas es la vía del mevalonato (MEV), donde el ácido mevalónico es el precursor de estos dos compuestos. Esta vía se localiza en el citoplasma de las plantas y de muchos organismos. Los genes de que están involucrados en esta vía metabólica se han identificado en el genoma de arqueobacterias, levaduras, animales y plantas (Lange, 2000), y la mayoría de estos genes forman familias multigénicas.

En la vía mevalónica, el precursor inicial es el acetil coenzima A (acetil CoA), el cual es convertido a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMGCoA) por la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMGS). Posteriormente, el compuesto 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMGCoA) es reducido a mevalonato por la enzima, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR), este es un paso limitante en la vía y es por esto que esta ruta se denominó "vía del mevalonato" (Glodsten, 1990; Schaller, 1995). En el siguiente paso el mevalonato se fosforila a 5-fosfomevalonato por la enzima mevalonato cinasa (MK). Posteriormente ocurre una segunda fosforilación en el compuesto 5-fosfomevalonato para formar 5-difosfomevalonato por la enzima 5-fosfomevalonato cinasa (PMK), y es a partir de este último compuesto que la enzima 5-difosfomevalonato descarboxilasa (PMDC) forma IPP (Bach, 1999; Schulte, 2000). Por último la enzima isopentenil/dimetilalil difosfato isomerasa (IDI) cataliza la transformación reversible de isopentenil difosfato a dimetilalil difosfato (Figura 3).

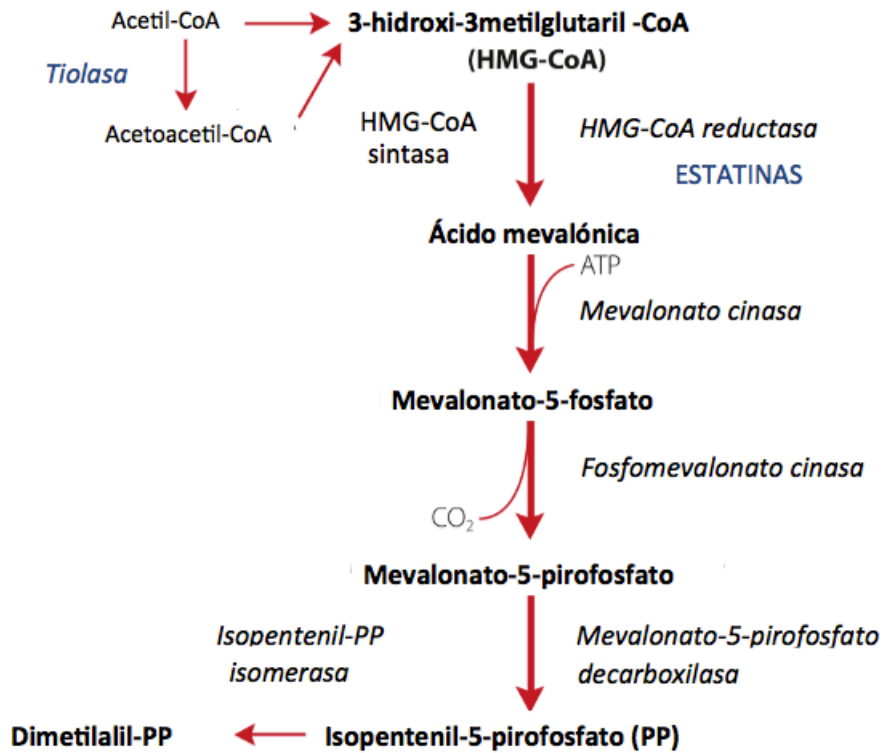


Figura 3. Vía mevalónica (MEV) para la síntesis de isoprenoides.

Por mucho tiempo se creyó que la síntesis de IPP y DMAPP se llevaba a cabo exclusivamente a través de vía mevalónica. Sin embargo, después de varias investigaciones bioquímicas, moleculares y genéticas se demostró la existencia de una vía totalmente distinta a la vía MEV, a la que se conoce como vía del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) y que también sintetiza IPP y DMAPP.

Uno de los experimentos que dio evidencia de la existencia de esta nueva vía fue realizado con mevalonato marcado en células de plantas, ya que se encontró que el [C¹⁴-] mevalonato se incorporaba de modo eficiente en isoprenoides del citoplasma pero muy pobremente en los isoprenoides ubicados en plástidos (Braithwaite, 1960). En otros trabajos con plantas, se mostró que usando un inhibidor específico de la HMGR, la cual es la responsable de sintetizar al mevalonato, se impedía la síntesis de isoprenoides citoplasmáticos, pero los niveles de isoprenoides plastídicos, como clorofilas o carotenoides, no se veían afectados (Bach, 1999).

La vía MEP recibe este nombre ya que el 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato es el primer intermediario exclusivo de la vía, y utiliza piruvato y gliceraldehído-3-fosfato como precursores (Córdoba, 2009) (Figura 4). La vía MEP consta de siete enzimas las cuales producen IPP y DMAPP. El primer compuesto intermediario formado es el 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP), la enzima que cataliza la formación de DXP es un miembro de la familia de las transcetolasas llamada 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS). (Figura 4)

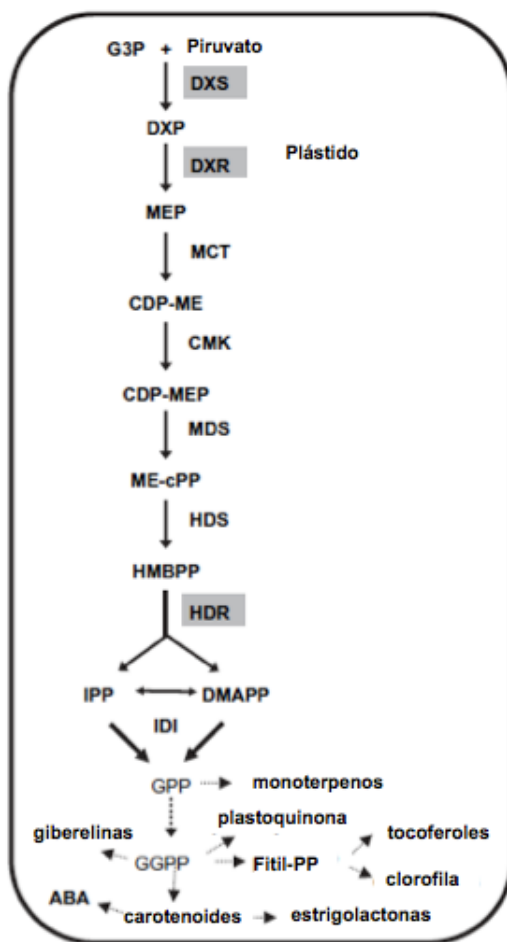


Figura 4. Pasos enzimáticos de la vía MEP para la síntesis de isoprenoides. (Cordoba, et al, 2009)

Los genes que codifican para la enzima DXS han sido clonados en bacterias (Sprenger, 1997) y en diversas plantas como *Mentha x piperita* (Lange, 1998), *Capsicum annum* (Bouvier, 1998) y *Arabidopsis thaliana*, en la cual es codificada por el gen CLA1 (Mandel, 1996; Estévez, 2000). En la bacteria *Escherichia coli* (Hill, 1989) y en plantas (Arigoni, 1997)

el compuesto DXP también es precursor para la síntesis de las vitaminas tiamina (B1) y piridoxol (B6). Después este compuesto es convertido a 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) que como ya se mencionó, es el primer compuesto comprometido con la vía. Esta conversión es catalizada por la enzima 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (DXR) (Kuzuyama, 1998). Genes que codifican para esta enzima han sido clonados en *E. coli* (Takahashi, 1998), *M. piperita* (Lange, 1999) y *A. thaliana* (Schwender, 1999).

Posteriormente el MEP es transformado en 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME) por la enzima 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintasa (MCT) (Rondich, 1999). El siguiente paso es catalizado por la enzima 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol cinasa (CMK), la cual fosforila al compuesto CDP-ME para formar 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol-2-fosfato (CDP-MEP) (Lüttgen, 2000). La enzima 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintasa (MDS) cataliza la formación de 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato (ME-cPP) a partir de CDP-MEP (Herz, 2000). La enzima codificada por el gen *ispG* en *E. coli* (HDS) cataliza la formación del compuesto ME-cPP en 1-hidroxi-2-metil-2-(*E*)-butenil 4-difosfato (HMB-PP) (Wolf, 2002). En *A. thaliana* se encontró un gen homólogo capaz de complementar a la de mutante de *E. coli* deficiente en HDS (Querol, 2002). Finalmente, el gen *ispH*, el cual fue identificado en la cianobacteria *Synechocystis* (Cunningham, 2000) y en *E. coli* (Adam, 2002), codifica para la enzima 1-hidroxi-2-metil-2-(*E*)-butenil 4-difosfato reductasa (HDR) la cual convierte al compuesto 1-hidroxi-2-metil-2-(*E*)-butenil 4-difosfato en IPP y DMAPP.

La enzima IDI (isopentenil/dimetilalil difosfato isomerasa) participa también en la vía MEP para la interconversión de IPP a DMAPP, sin embargo la actividad de esta enzima no es esencial para la vía, ya que la síntesis de ambos isómeros ocurre por esta vía de isoprenoides sin la presencia de esta isomerasa (Page, 2003) (Figura 4).

También ha sido posible identificar algunos inhibidores específicos de la vía entre los que se encuentra la fosmidomicina, que es un herbicida que inhibe a la segunda enzima de la vía (DXR). Este herbicida se ha pensado que podría ser una buena droga antimalárica ya que en *Plasmodium falciparum* la síntesis de isoprenoides esenciales depende de la vía MEP (Sauret- Güeto, 2006).

La vía MEP está ausente en células animales, y se sabe que se lleva a cabo en plástidos de plantas y algas, en protozoarios del phylum apicomplexa (causantes de distintas enfermedades como la malaria), y en la mayoría de las eubacterias (Tabla 2). Es por esto que esta vía representa un blanco interesante para el desarrollo de nuevos antibióticos, herbicidas y drogas antimaláricas (Rodríguez-Concepcion, 2004)

Tabla 2. Distribución de las vías para la síntesis de isoprenoides en distintos organismos. MVA (Modificado de León y Guevara, 2007)

Organismo	Vía de biosíntesis
Eubacterias	MVA o MEP
Arqueobacterias	MVA
Protozoarios	MVA y/o MEP
Algas	MVA y/o MEP
Plantas superiores	MVA y MEP
Hongos	MVA
Animales	MVA

MVA: vía mevalónica; MEP: vía del 2-C-metil-D-eritrol 4-fosfato (Modificado de León y Guevara, 2007)

Compartimentalización de la síntesis de isoprenoides en plantas

Para la síntesis de IPP y DMAPP las plantas utilizan ambas vías: la vía del mevalonato y la vía MEP. En las células vegetales estas vías están compartimentalizadas; en el citoplasma se lleva a cabo la vía mevalónica, mientras que en los plástidos se realiza la vía MEP. La compartimentalización de ambas vías hace suponer que éstas operan de manera independiente. Sin embargo a través de experimentos utilizando el compuesto 1-desoxi-D-xilulosa marcado radiactivamente, se ha demostrado que aunque el mayor porcentaje de la marca es incorporado en la biosíntesis de pigmentos, fitol y carotenos (provenientes de la vía MEP), un 6% de la marca se incorporó en fitoesteroles provenientes de la vía mevalonato. Estos resultados indican que existe una comunicación entre la vía MEP y la vía mevalónica mediante uno o mas intermediarios que aun se desconocen (Arigoni, 1997) (Figura 5).

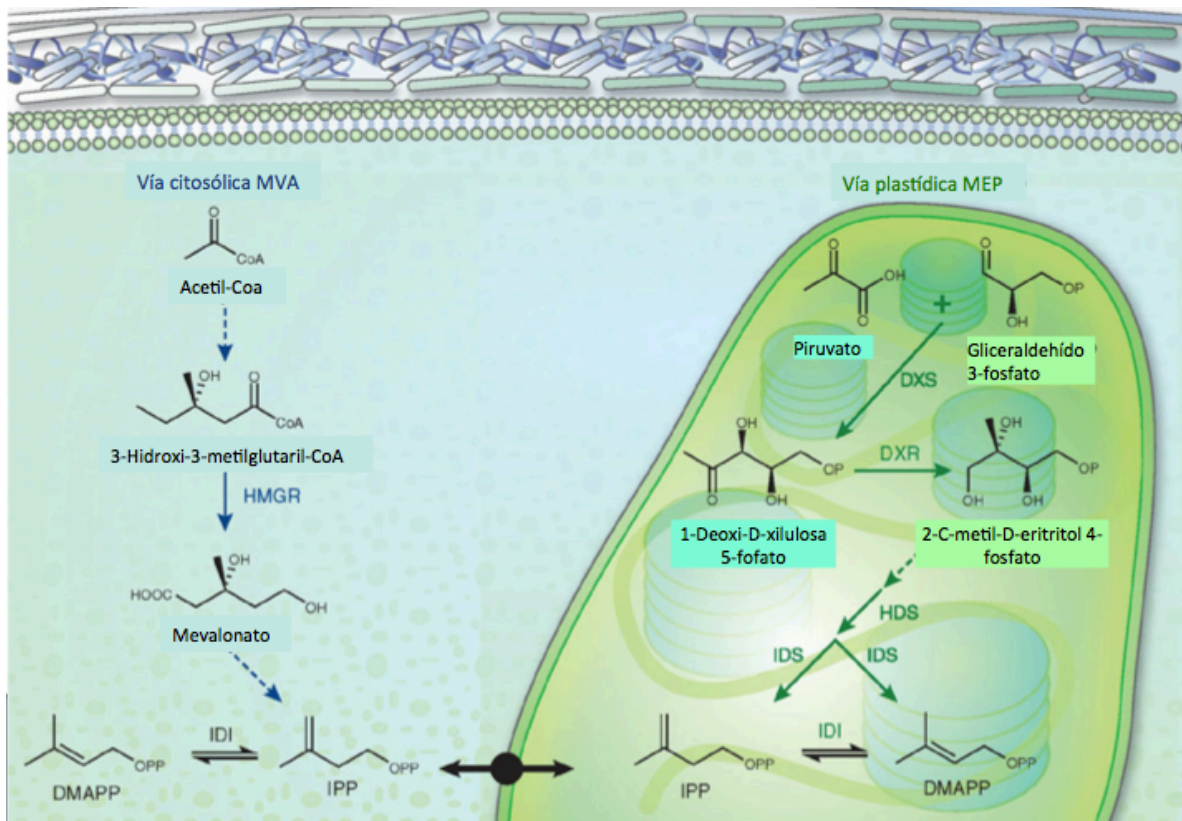


Figura 5. Compartimentalización de las vías para la síntesis de isoprenoides en plantas (Roberts, 2007).

A través de la vía mevalónica en plantas se sintetizan fitoesteroides, las hormonas brasinosteroides, citocininas, y fitoalexinas de origen isoprénico. Paralelamente la vía MEP es la encargada de sintetizar isoprenoides de vital importancia para el crecimiento y desarrollo de las plantas, como los pigmentos captadores de luz, las clorofilas y carotenoides, prenilquinonas, los cuales son moléculas importantes para las reacciones luminosas de la fotosíntesis y que participan en la cadena de transporte de electrones. Los carotenoides y tocoferoles también tienen una función protectora y preventiva, especialmente contra el estrés oxidativo que puede ser causado por alta irradiación fotosintética (Lichtenthaler, 1997). Otra función importante de los isoprenoides plastídicos es su participación en vías de señalización, especialmente para el control del desarrollo de la planta y del cloroplasto, ya que son precursores de distintas hormonas

como el ácido absísico y las giberelinas, estas últimas se sabe que están involucradas en el proceso de formación de estos organelos a partir de etioplastos (Alabadi, 2004).

Cloroplastos y su desarrollo.

Uno de los elementos característicos que diferencian a una célula vegetal de una animal son los plástidos. Estos organelos cumplen funciones muy importantes para la plantas, como la síntesis de moléculas esenciales y el almacenamiento de una amplia variedad de productos. Los plástidos varían en tamaño, forma, contenido y función, sin embargo todos tienen una envoltura que consta de dos membranas, y, al igual que las mitocondrias, son semiautónomos y contienen la maquinaria genética necesaria para la síntesis de algunas de sus propias proteínas, mientras que el resto se codifican en el núcleo (Buchanan, 2000).

Existen diferentes tipos de plástidos. Cada uno de ellos se localizan en tejidos particulares tienen funciones específicas. Entre los plástidos más estudiados están: los cromoplastos, los cuales son plástidos con una membrana interna que está poco desarrollada y que acumulan grandes cantidades de pigmentos de rojos a amarillos, responsables de brindar color a flores y frutos de las plantas; los leucoplastos, los cuales a su vez se pueden clasificar en amiloplastos, oleinoplastos y proteinoplastos. Estos plástidos son incoloros y están presentes principalmente en tubérculos y semillas, están especializados en el almacenamiento de almidón, aceites y proteínas respectivamente; y finalmente los cloroplastos (León y Guevara, 2008) (Figura 6).

Los cloroplastos, son los plástidos especializados en realizar la fotosíntesis. Estos organelos acumulan grandes cantidades de pigmentos tanto clorofila, como carotenos. El desarrollo y diferenciación de los cloroplastos está ligado con el desarrollo de su membrana interna, donde a partir de varios plegamientos conforma estructuras similares a sacos aplanados denominados tilacoides. Estos tilacoides, que a su vez se apilan para constituir los grana, conforman una estructura de anclaje membranal donde se incorporan proteínas y pigmentos para conformar los complejos fotosintéticos. Dichos complejos, se

encargan de realizar las reacciones que dependen de la luz y que involucran el transporte de electrones y la síntesis de energía metabólica y poder reductor (ATP y NADPH), requeridos para la fijación de CO₂ atmosférico (León y Guevara, 2008) (Figura 7).

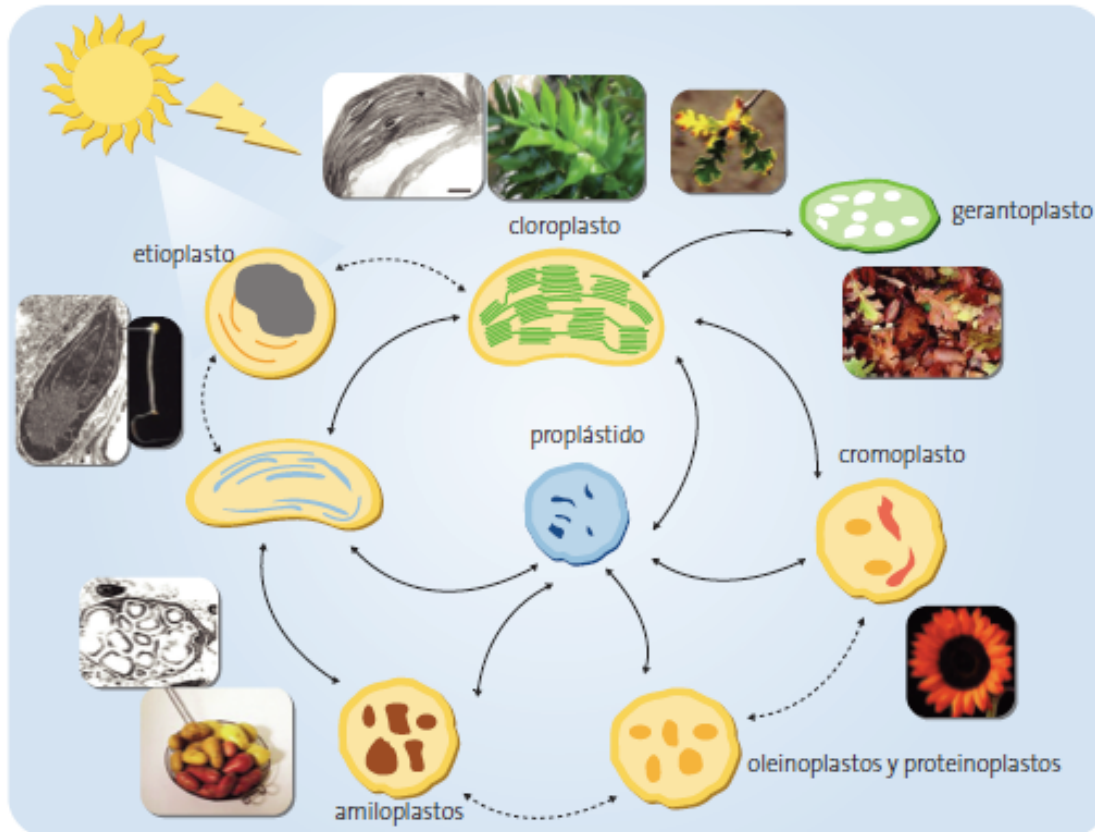


Figura 6. Distintos tipos de plástidos presentes en las plantas. Todos los plástidos provienen de los proplástidos, la diferenciación a cada tipo de plástido depende de distintas señales. (León y Guevara, 2007)

Los proplástidos son los precursores de todos los plástidos, y se localizan en las regiones meristemáticas de la planta. Cuando las células se diferencian, los proplástidos también lo hacen convirtiéndose en un tipo de plástido particular (Figura 6), sin embargo, una vez diferenciados, los plástidos son capaces de rediferenciarse en respuesta a señales externas o internas (León, 1998).

El cloroplasto es el plástido mejor caracterizado, ya que, como ya se mencionó, en él se lleva a cabo la fotosíntesis. La diferenciación de este organelo inicia en etapas tempranas del desarrollo de la planta. Una vez que la plántula se comienza a volver fotoautotrófica,

el meristemo apical se activa para producir hojas y adentro de sus células a los cloroplastos. Este evento está regido por un estricto programa de expresión génica, el cual da lugar a cambios estructurales y funcionales (para que se realice la fotosíntesis). Este proceso de diferenciación involucra el transporte y ensamblaje de un gran número de proteínas, las cuales, en su mayoría, están codificadas en el genoma nuclear y sintetizadas en el citoplasma de la célula. Estas proteínas comparten una característica particular, que es la presencia de un péptido de tránsito en su extremo amino terminal, el cual es reconocido por los complejos de traslocación de la membrana externa del cloroplasto (TOC, Translocon at the Outer envelope membrane of Chloroplast) y de la membrana interna del cloroplasto (TIC, Translocon at the Inner membrane of Chloroplast) (Waters, 2009).

Una vez que las proteínas con destino a cloroplasto son translocadas a este organelo, el péptido de tránsito es removido por proteasas estromales, y las proteínas son transportadas a compartimentos específicos dentro del plástido.

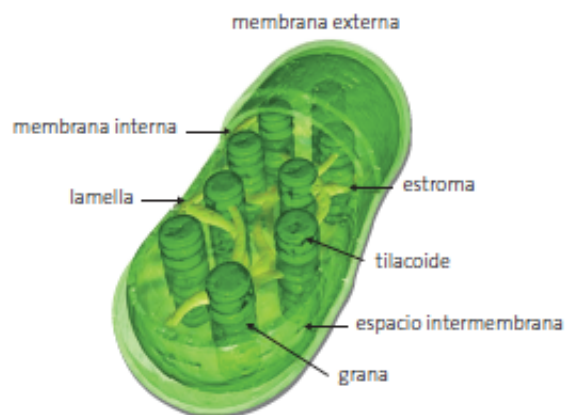


Figura 7. Estructura de un cloroplasto donde se aprecia su doble membrana (externa e interna) y la membrana tilacoidal, y el acomodamiento en granas. (León y Guevara, 2007)

Proteasas y modificaciones postraduccionales en cloroplasto.

La proteólisis regula una gama amplia de procesos en las células, incluyendo el control del ciclo celular, la expresión de genes, la translocación de proteínas a distintos organelos, entre otros procesos, por lo cual es de esperarse que las proteasas del cloroplasto participen en la regulación de funciones de este organelo (Adam, 2002). Sin embargo el cómo dichas proteasas actúan en condiciones particulares es aún desconocido.

Muchos factores activan la degradación de proteínas cloroplásticas inherentemente estables, como lo pueden ser las condiciones lumínicas, el desequilibrio estequiométrico de las subunidades que conforman a un complejo de proteínas, mutaciones genéticas y una disponibilidad limitada de cofactores (Adam, 2002).

Uno de los casos más conocidos de regulación funcional por proteasas es la del fotosistema II del cloroplasto, en donde la proteína D1 es un componente central para la fotoinhibición de este fotosistema. Se ha sugerido que cuando la proteína D1 del fotosistema II contiene daño fotooxidativo, éste complejo migra del grana a la región no compacta de los tilacoides para ser reparado. En el estroma de los tilacoides la proteína D1 es degradada por proteasas específicas, como es el caso de la proteasa FtsH, la cual es una metaloproteasa dependiente de ATP que se localiza en la membrana tilacoidal. Se ha sugerido que esta proteasa se oligomeriza para poder llevar a cabo su función, y que en presencia de estrés inducido por la luz esta oligomerización tiene lugar para formar un anillo compuesto por seis subunidades, en el centro de éste es donde se une el sustrato para ser degradado (Yoshioka, 2011).

El complejo proteolítico que se cree que es responsable de la degradación de la mayoría de las proteínas del estroma es la proteasa ATP-dependiente ClpP. Esta proteasa de dos componentes fue identificada en el cloroplasto por primera vez en 1990, con el descubrimiento de un gen plastídico con homología al gen *clpP* de *E. Coli* (Adam, 2002).

En *A. thaliana*, el sistema de proteasa Clp, constituye el complejo de proteasas solubles más abundante en el plástido; este complejo consta de 15 subunidades codificadas en el

núcleo y una subunidad codificada en el plástido. La caracterización de varias mutantes de *A. thaliana* afectadas en subunidades de este complejo ha demostrado el papel esencial que el sistema de proteasa Clp tiene para el desarrollo de los cloroplastos tanto en el embrión como en las hojas (Olinares, 2011).

En el cloroplasto hay otras proteasas que regulan a las proteínas de este organelo, como la proteasa independiente de ATP tipo serina, DegP, la cual se encuentra unida a la membrana interna del cloroplasto, y al parecer también está involucrada en la regulación del fotosistema II (Adam, 2002); o la proteína EGY1, la cual es una metaloproteasa localizada en el espacio intermembranal del cloroplasto y que es importante para el desarrollo del organelo y el gravitropismo de la planta (van der Hoorn, 2008).

Por otro lado, las modificaciones post-traduccionales modulan la actividad de una gran cantidad de proteínas eucarióticas (Kwon, 2006). Estas modificaciones son eventos de procesamiento covalente que cambian las propiedades de una proteína por rompimiento proteolítico o por la adición de un grupo a uno o varios aminoácidos. Tal vez las modificaciones más conocidas que alteran la vida media de las proteínas es la ubiquitinación y la fosforilación (Kwon, 2006), sin embargo otro ejemplo de modificación post-traducciona son las isoprenilaciones, donde se une covalentemente un grupo farnesil o geranilgeranil a un residuo de cisteína del extremo C-terminal de la proteína (Crowell, 2008). Este tipo de modificación es de interés en este trabajo, ya que el farnesil fosfato y el geranil geranil fosfato son productos de la vía MEP. Sin embargo poco se sabe de los fenómenos de regulación post-traducciona en el caso de proteínas cloroplásticas como es el caso de las proteínas de la vía,. Hasta ahora sólo hay un reporte de proteínas preniladas en cloroplastos de espinacas, donde describen un tipo de prenilación distinta a la que ocurre normalmente, ya que los grupos farnesil o geranilgeranil no están unidos por un enlace tioéter, sino por un mecanismo aún desconocido y exclusivo para proteínas codificadas en el genoma del cloroplasto (Parmryd, 1999).

Recientemente han descrito nuevos cambios post-traduccionales que modifican a las proteínas cloroplásticas. Un ejemplo es la acetilación de lisinas, la cual antes se creía que era una modificación exclusiva de proteínas asociadas a la cromatina, y actualmente se han descrito nueve proteínas involucradas con la fotosíntesis que tienen esta modificación (Finkemeier, 2011). También se ha encontrado que las acilaciones en el extremo N-terminal pueden estar involucradas en la localización de las proteínas hacia las membranas (Stael, 2011), inhibiendo la miristoilación del extremo N-terminal de proteínas cloroplásticas, estas ya no se dirigen a su destino.

***Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio**

Arabidopsis thaliana es miembro de la familia de plantas Brassicaceae (Cruciferae), a la cual también pertenecen varias plantas de interés agrícola como la col o el rábano. Esta planta tiene una distribución natural a través de Europa, Asia y Norte América, en donde se puede encontrar en hábitats diversos. Esta planta presenta varias ventajas para que hacen el modelo de estudio más usado dentro del ámbito de la biología molecular de plantas ya que es una planta diploide con un ciclo de vida relativamente corto (de 6 a 8 semanas), se puede autofecundar produciendo miles de semillas que son fáciles de almacenar y que permanecen viables por un largo periodo de tiempo. Además es una planta fácil de cultivar debido a que tiene un tamaño pequeño (las plantas adultas llegan a medir entre 15 a 20 cm y se puede mantener y propagar bajo condiciones controladas del laboratorio (Meinke, 1998).

Por otro lado, el genoma de *A. thaliana* es de tamaño pequeño (alrededor de 157 Mpb) organizado en cinco cromosomas, los cuales ya han sido totalmente secuenciados (The *Arabidopsis* Genome Initiative), lo cual facilita su estudio y análisis. Además cuenta con una amplia variedad genética entre sus líneas silvestres, o ecotipos, lo cual facilita su estudio genético y molecular. Entre los ecotipos más utilizados están Columbia, Landsberg y RLD; *A. thaliana* también tiene la ventaja de que puede ser transformada genéticamente utilizando a la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, de la cual se ha explotado su

mecanismo natural para transferir DNA (T-DNA) al genoma de la planta, y así obtener líneas transgénicas y mutantes (Meinke, 1998).

Mutantes afectadas en el desarrollo de los cloroplastos

Con el fin de estudiar el desarrollo de los cloroplastos se han aislado varias mutantes en *Arabidopsis thaliana* que tienen deficiencia en la pigmentación de sus tejidos. Entre estas mutantes están las variegadas como *immutans (im)*, *yellow variegated (var2)*, *var1* y *var3*, *chloroplast mutador (chm)*; las mutantes verdes pálidas como *pale cress (pac)*; las mutantes reticuladas *differential development of vascular-associated cells1 (dov1)*, *reticulata (re)*, *lower cell density1-1 (lcd1-1)*, *scabra3 (sca3)*, *chlorophyll a/b-binding protein under-expressed1 (cue1)* las cuales tienen una vascularización verde oscura sobre una lamina amarilla o verde claro, o viceversa (Yu, 2007). También existen varias mutantes albinas como *gun4*, la cual tiene una mutación en una proteína de unión a porfirinas, importante para la biosíntesis de clorofila, y la cual es una proteína plastídica de señalización núcleo-plástido (Larkin, 2003); la mutante *pp1*, la cual tiene una mutación en una GTPasa que es un componente del complejo de translocación a cloroplasto TOC (Bauer, 2000) y las mutantes *clb 4*, *clb6* y *cla1* las cuales tienen mutaciones en enzimas de la vía MEP para la síntesis de isoprenoides (Gutierrez-Nava 2004; Guevara-García 2005). *CLA1* codifica para la 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS), que es la enzima limitante de la vía MEP para la síntesis de isoprenoides. (Estévez, 2000). Esta mutante muestra alteraciones en la morfología de los cloroplastos, los cuales no se encuentran bien diferenciados y se asemejan a proplástidos. Estos organelos carecen de membranas tilacoideas y contienen estructuras en forma de vesículas (Mandel, 1996)(Figura 8). En esta mutante los niveles de pigmentos fotosintéticos, como clorofilas y carotenoides, y de otros compuestos, como el α -tocoferol y ácido absísico, están fuertemente disminuidos con respecto a la planta silvestre (Estévez, 2000) (Figura 8).

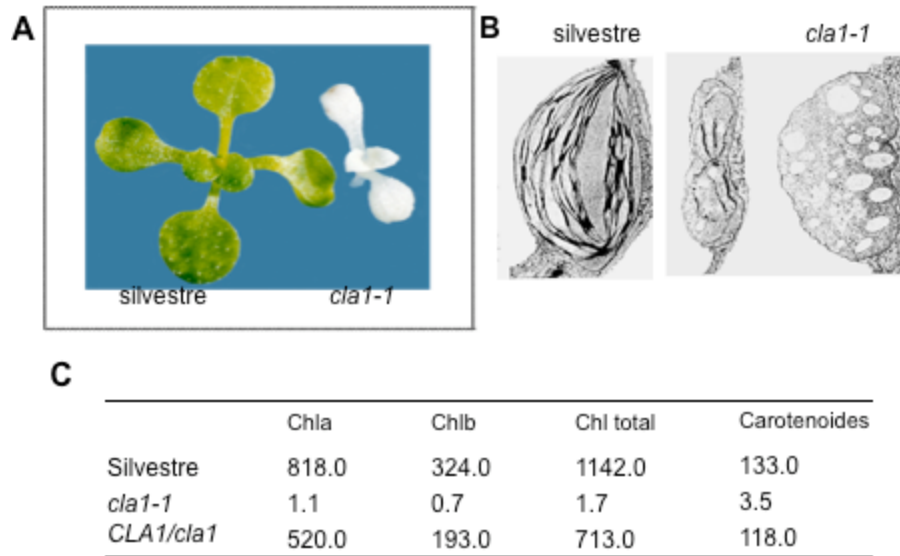


Figura 8 A) Fenotipo de la mutante *cla1-1* con respecto a la silvestre. B) cloroplastos de células de mesófilo de la planta mutante y de la planta silvestre. C) contenido de clorofilas y carotenoides totales en plantas silvestres, mutante *cla1-1* y *CLA1/cla1* (Estevez, et al. 2000).

ANTECEDENTES

Como ya se mencionó, la identificación del gen que codifica DXS se obtuvo de la caracterización de la mutante albina *cla1-1* aislada a partir de una colección de mutantes generadas por la inserción de T-DNA. Esta mutante muestra una reducción en la producción de pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides), vitamina E (α -tocoferol) y hormonas (ácido abscísico), así como una alteración en el desarrollo de los cloroplastos (Mandel, 1996; Estévez, 2000).

Cuando se identificó al producto del gen *CLA1* se encontró que esta proteína presentaba secuencias características a las de las proteínas transcetolasas, cuya función es transferir grupos cetoles. Las secuencias que caracterizan a esta familia de enzimas son el motivo transcetolasa y el sitio de unión a tiamina difosfato (TPP) que sirve como cofactor en su reacción catalítica. Esto sugirió que la proteína CLA1 era un miembro de la familia de las transcetolasas (Estevez, 2001). Estudios posteriores mostraron que la proteína CLA1 guardaba alta homología con una proteína que se denominó DXS de *Escherichia coli*, y que a la vez presentaba el dominio de transcetolasa y el sitio de unión a TPP y la cual participaba en una vía nueva para la síntesis de isoprenoides, que posteriormente se le denominó la vía MEP (Sprenger, 1997; Lois, 1998). Esto sugirió que el producto de *CLA1* podía ser la DXS de *Arabidopsis* y fue posteriormente comprobado a través de ensayos *in vivo*, donde al adicionar el compuesto 1-desoxi-D-xilulosa (producto de la reacción catalítica de DXS) se revertía al fenotipo de la mutante *cla1-1* (Estévez, 2001). Ensayos *in vitro* se demostraron que la proteína recombinante CLA1 catalizaba la formación del compuesto 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato a partir de piruvato y gliceraldehído 3-fosfato (Estévez, 2000) de igual forma que en bacterias (Sprenger, 1997).

Estudios de cristalografía de la proteína DXS de *E. coli* y *Deinococcus radiodurans* confirmaron que esta proteína contiene tres dominios, los cuales presentan similitud con los de otras transcetolasas. Sin embargo, la proteína DXS presenta un arreglo distinto de estos dominios al que previamente había sido descrito para transcetolasas, ya que el sitio activo de DXS está localizado en la interfase de los dominios I y II, mientras que en las

trancetolasas típicas, el sitio activo se localiza en la interfase donde se unen dos monómeros (Xiang, 2007) (Figura 9).

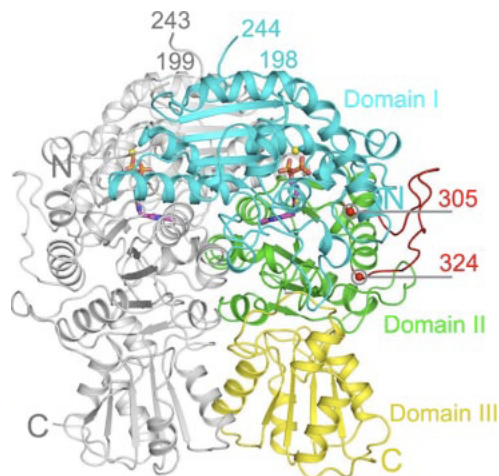


Figura 9 Estructura cristalizada de la proteína DXS en *E. coli*, en ella se aprecian dos monómeros, y se remarcan los tres dominios de la proteína (Xiang, 2007).

Para conocer el patrón de expresión espacial como temporal del gen *CLA1*, se analizó la acumulación de su mensajero y de su proteína. Los resultados mostraron que *CLA1* se expresa en todos los tejidos de la planta que se analizaron (raíz, hojas, tallo, flores y silículas) y durante diferentes estadios del desarrollo de la planta (Figura 10). Sin embargo, la mayor acumulación tanto del transcrito como de la proteína se observa en estadios tempranos del desarrollo y en tejidos jóvenes, mostrando que este gen es regulado durante el desarrollo (Estévez, 2000). También se demostró que el gen *CLA1* está regulado positivamente por luz (Mandel, 1996). Basados en la gran variedad de isoprenoides sintetizados a través de la vía MEP hace suponer que diferentes factores tanto internos como externos pueden regular la expresión de los genes que participan en esta vía.

El patrón de expresión del gen *CLA1 in planta*, se analizó a través de una fusión traduccional con un fragmento de aproximadamente 1.5 Kb de la región cuesta arriba del inicio de la traducción de *CLA1* con la región codificante del gen reportero GUS, que codifica para la enzima β -glucoronidasa. Con esta fusión se observó que DXS se expresa desde semillas en proceso de germinación hasta plantas adultas, pero principalmente en plántulas y en tejidos jóvenes (Figura 11). En conclusión, la acumulación de RNAm y de

proteína de *CLA1* así como la expresión de la fusión *CLA1::GUS*, mostraron que este gen se expresa en la mayoría de los tejidos y a lo largo del ciclo de vida de *A. thaliana* (Estévez, 2000). El patrón de expresión del gen *CLA1* es acorde con la participación de DXS en la síntesis de diversos isoprenoides plastídicos que desempeñan funciones específicas en procesos biológicos como la fotosíntesis (clorofilas y carotenoides) y el desarrollo (hormonas y vitaminas), particularmen durante estadíos tempranos del desarrollo y en tejidos jóvenes donde también hay una mayor demanda de algunos isoprenoides (Estévez, 2000).

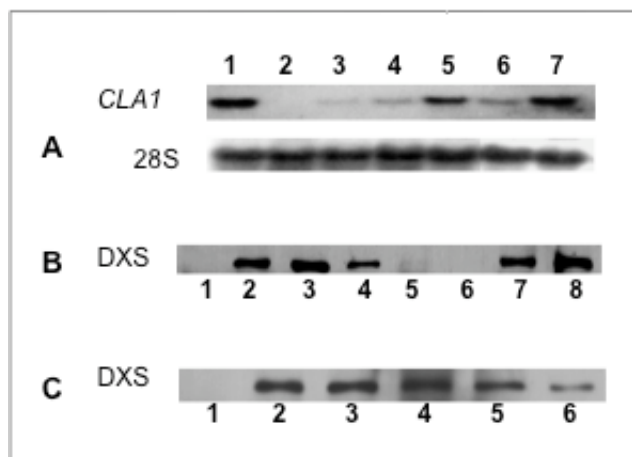


Figura 10 Análisis del transcrito y acumulación de proteína del gen *CLA1* en plantas de *Arabidospis thaliana*. **A)**Acumulación del transcrito de *CLA1*: 1)plántulas silvestres de 15 días de edad; 2)plántulas de *cla1-1*; 3)hojas maduras; 4)hojas caulinas; 5)brotos; 6)raíces; 7)plántulas de 15 días; 28S: control de carga de RNAm **B)**Acumulación de la proteína DXS en diferentes tejidos: 1)plántulas *cla1-1* de15 días; 2)plántulas silvestres de 15 días; 3)hojas de roseta jóvenes; 4)hojas de roseta maduras; 5)raíces; 6)semillas; 7)flores; 8)silicuas inmaduras. **C)**Expresión de la proteína DXS a través del desarrollo : 1)plántulas *cla1-1* de 15 días; 2)plántulas silvestres de 5 días; 3)plántulas silvestres de 8 días; 4)plántulas silvestres de 15 días; 5)plántulas silvestres de 20 días; 6)plántulas silvestres de 25 días (Estevez, 2000).

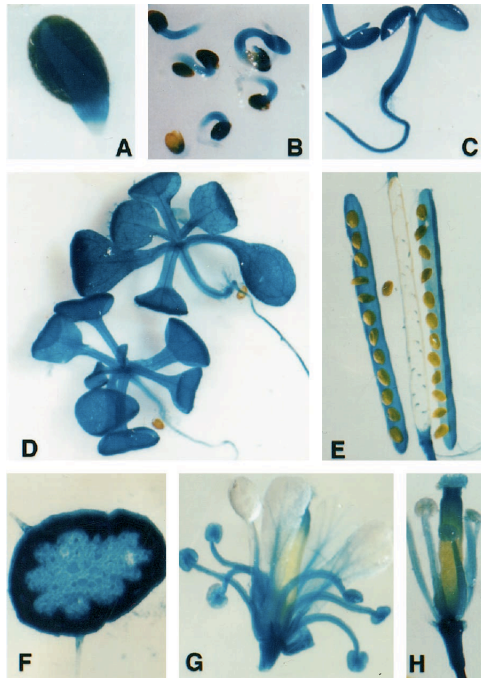


Figura 11 Patrón de expresión espacial y temporal del gen *CLA1* en plantas transgénicas *CLA1::GUS* de *Arabidopsis thaliana*. A)semilla; B)semilla germinando; C)plántula; D)planta de 15 días; E)silicua con semillas inmaduras; F)corte transversal de la inflorescencia; G)flor; H) estigmas y anteras. (Estevez, 2000)

ANTECEDENTES DIRECTOS

Análisis de expresión de los genes de la vía MEP mostraron una clara coordinación en los niveles de los transcritos para todos los genes de la vía en respuesta a diferentes señales. Así por ejemplo en mutantes que afectan a un gene particular de la vía MEP, los niveles de los transcritos de todos los otros genes de esta vía disminuyen en comparación con las plantas silvestres. Esto también conlleva a la acumulación de bajos niveles de la mayoría de las proteínas correspondientes, salvo de las enzimas DXS y HDR (Guevara-García, 2005), y en algunos reportes de DXR (Carretero-Paulet, 2004). En el caso de la mutante *clb6* (*chloroplast biogenesis 6*), la cual afecta el último gen de la vía, *HDR*, mientras que el transcrito de la enzima DXS se encuentra a muy bajos niveles con respecto a las plantas silvestres, la cantidad de la proteína aumenta considerablemente (alrededor de 10 veces) (Guevara-García, 2005). Este comportamiento es igual en otras mutantes de la vía MEP (Figura 12) y no parece ser consecuencia del fenotipo albino debido a la baja producción de diversos isoprenoides, incluyendo a los diferentes pigmentos fotosintéticos, ya que en otras mutantes albinas afectadas en otras vías metabólicas DXS no se acumula. En base a estos resultados se postuló la existencia de una regulación retrógrada de los niveles de la proteína DXS en respuesta a niveles bajos de los productos finales de la vía (Guevara-García, 2005).

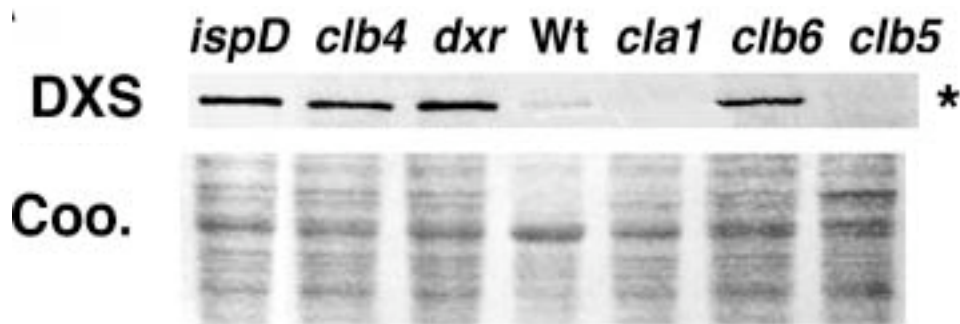


Figura 12 Acumulación de la proteína DXS en distintas mutantes de la vía MEP. *cla1* es la mutante deficiente en DXS, todas las demás son mutantes que afectan a enzimas de la vía MEP, salvo *clb5*, donde DXS no se acumula

Como ya se mencionó, la fosmidomicina es un herbicida que bloquea a la segunda enzima de la vía MEP (DXR), y como consecuencia reduce drásticamente los niveles de IPP y DMAPP. Los resultados mostraron que cuando plantas silvestres son tratadas con este compuesto también acumulan altos niveles de DXS (García-Guevara, 2005). Estos resultados apoyan también la existencia de una regulación retrógrada de la enzima DXS.

Con el fin de identificar el nivel al cual dicha regulación actúa, en el laboratorio se realizaron los mismos ensayos con fosmidomicina y en presencia de cicloheximida (figura 13). La cicloheximida es un inhibidor de la síntesis de proteínas en eucariontes, que actúa bloqueando la elongación traduccional y que por lo tanto permite medir la vida media de las proteínas. En este ensayo se observó que la vida media de DXS es de alrededor de 80 minutos, pero en presencia de fosmidomicina, la vida media de DXS aumenta hasta más de 12 horas. Esto sugiere que el aumento de los niveles de DXS es consecuencia de un aumento en la vida media de esta proteína (San Román, C, no publicado).

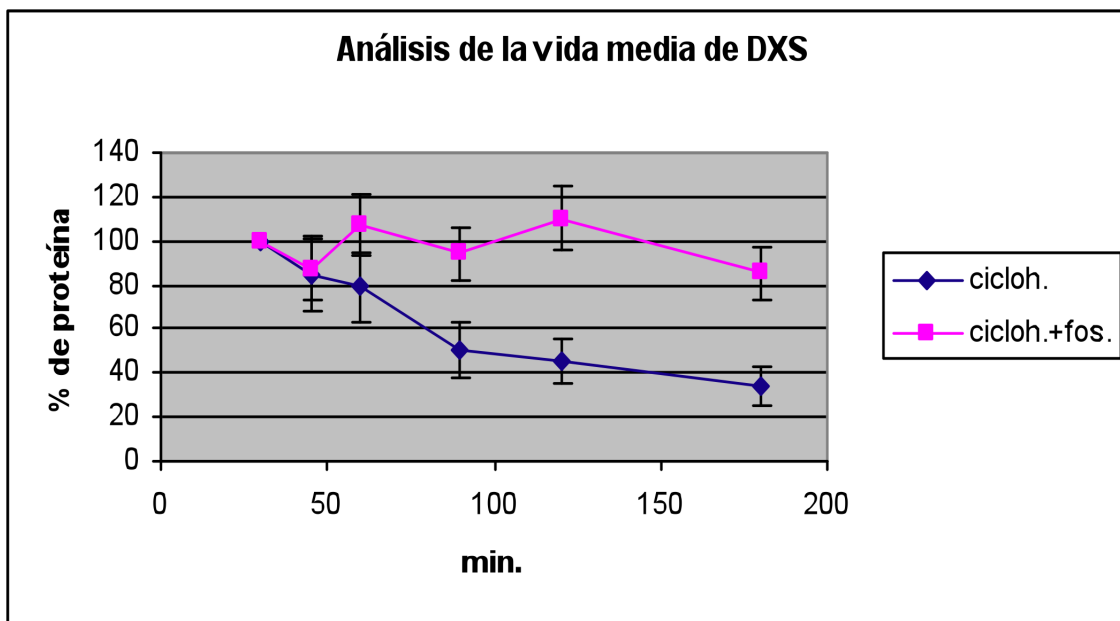


Figura 13 Vida media de la proteína DXS de *A. thaliana* en presencia de cicloheximida y cicloheximida más fosmidomicina. (San Román, no publicado).

Otros grupos interesados en entender el mecanismo de regulación postraducciona de las enzimas DXS, HDR y DXR, han identificado mutantes resistentes a fosmidomicina (*rif*) y han encontrado que dentro de este grupo algunas de las enzimas de la vía MEP están acumuladas. Entre ellas la mutante *rif1*, que afecta a una proteína de función poco clara y en donde la expresión de genes codificados en plástidos, incluyendo a *ClpP* que codifica para una de las subunidades de la principal proteasa del estroma plastídico ClpPb, está afectada (Koussevitzky, 2007). En esta mutante DXS también se acumula a altos niveles, por lo que se ha especulado que esto se puede deber a que DXS es blanco de esta proteasa, aunque evidencias directas son aún requeridas. (Sauret-Güeto, 2006; Flórez-Pérez, 2008).

HIPÓTESIS

Si los productos finales de la vía MEP afectan la vida media de DXS, entonces esta proteína debe sufrir modificaciones postraduccionales que afectan su estabilidad.

OBJETIVOS

Objetivo general

Conocer los mecanismos de regulación post-traduccionales de la proteína DXS y cómo es que estos afectan su estabilidad.

Objetivos particulares

1. Realizar un análisis estructural de diferentes proteínas DXS en busca de motivos conservados entre éstas.
2. Analizar la existencia de posibles modificaciones post-traduccionales en la proteína DXS que pudieran estar involucradas en cambios en su estabilidad.
3. Delimitar la región de la proteína DXS responsable de su regulación post-traduccionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

- El ecotipo de *Arabidopsis thaliana* que se utilizó para la realización de este trabajo fue Columbia (Col-0).
- La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* que se utilizó para transformar a las plantas fue la GV2260 en fondo C58, la cual es resistente a rifampicina y contiene el plásmido Ti pGV2260(pTiB6s3↓T-DNA)
- La cepa de *Escherichia coli* DH5α para la transformación de las construcciones.

Esterilización de semillas y estratificación de semillas

El proceso de esterilización de semillas se realiza en una campana de flujo laminar. Las semillas se embeben en agua estéril por 30 minutos. Posteriormente se retira el agua y se añade 1 ml de etanol absoluto por 1 minuto. Se elimina el etanol y se añade 1 ml de una solución de hipoclorito de sodio al 20%, , y se dejan reposar por 5 a 10 minutos con agitación frecuente, pasado este tiempo se descarta esta solución y se hacen de 3 o 4 lavados con agua estéril, dejándolas finalmente en 1 ml de agua. Las semillas estériles se mantienen a 4°C por cuatro días. Una vez transcurrido este tiempo de estratificación, se siembran en cajas petri con medio GM (apéndice I).

Crecimiento de A. thaliana en sustrato.

Las plantas de *A.thaliana* son crecidas en de Metromix-200 (Sun Gro Horticulture Canada), ya sea desde semillas o bien transplantadas de medio de cultivo a 10 días. Las plantas se crecen en un cuarto de crecimiento a 22°C y con un fotoperiodo de 16 horas luz con 8 horas de oscuridad, con una intensidad lumínica de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Obtención de DNA plasmídico a pequeña escala (miniprep) de E. coli

Se inoculan de 2-3 ml de LB líquido (apéndice I) con la cepa de interés y con el antibiótico al que ésta tenga resistencia, y se dejan crecer toda la noche a 37°C a 250rpm.

Se centrifugan 1.5 ml del cultivo a 16200g a temperatura ambiente por 1 minuto y se descarta el sobrenadante. Se resuspende la pastilla en 100 μ l de la solución I (apéndice I), vortexeando hasta que se disuelva. Se adicionan 200 μ l de la solución II (apéndice I), la cual debe de ser preparada en el momento, mezclando por inversión 4-5 veces. Se adicionan 150 μ l de solución III (apéndice I) y se mezcla también por inversión. Se centrifuga a 16200g por 5 minutos a 4°C, recuperando el sobrenadante en un tubo nuevo. Se añaden 500 μ l de fenol y se vortexea, y posteriormente se añaden 500 μ l de cloroformo y se vortexea nuevamente, después se centrifuga por un minuto a 16200g y a temperatura ambiente. Después de centrifugar se forman dos fases, se toma la de arriba y se transfiere a un tubo nuevo. Se adicionan 2 volúmenes de etanol absoluto y se deja 2 minutos a temperatura ambiente o toda la noche a -20°C. Se centrifuga por 10 minutos a 16200g y se elimina el sobrenadante. Posteriormente se hacen dos lavados con etanol 70% cuidando de no tirar la pastilla. Se seca al vacío por aproximadamente 5 minutos, para finalmente resuspender en 50 μ l de agua estéril.

Clonación en el vector pENTR™D-TOPO

Para las reacciones de ligación en el vector pENTR™/D-TOPO se siguieron las especificaciones del proveedor (Invitrogen Life Technologies). Brevemente, se mezclan 4.2 μ L del producto de PCR purificado con 1 μ L de solución salina diluida 1:4 v:v y con 0.8 μ L de vector pENTR™D-TOPO, incubándose a temperatura ambiente por 1hr y a 4°C entre 8 a 16 hrs, antes de proceder a la transformación de *E. coli* por electroporación.

De la reacción de ligación descrita se utilizan 1.5-2 μ L para transformar 50 μ l de células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α . La mezcla de células/plásmido se coloca en una celda de electroporación mantenida en hielo y se les aplica un pulso de 1.8 kV en un electroporador (MicroPulser™ de BIO-RAD), se le agrega 700 μ l de medio LB líquido (Apéndice I) y se incuban durante 45 min a 37°C con agitación ligera para su recuperación. El cultivo se centrifuga durante 1 min a 6000g, la pastillas se resuspende en ~100 μ L de LB líquido y se dispersa en cajas de petri con medio LB sólido (apéndice I) suplementado con

el antibiótico al que el vector confiere resistencia, las placas se incuban a 37°C hasta que el crecimiento de colonias resistentes es evidente (12 horas).

Movilización de genes del vector de entrada a vectores destino.

Sobre algunas de las colonias crecidas en placas selectivas, se realizan reacciones de PCR utilizando iniciadores específicos para el gen de interés para corroborar su presencia en el vector. Con aquellas colonias que resultan positivas, se realiza una segunda reacción de PCR utilizando como iniciadores oligonucleótidos contra la región del fago M13 que contiene el vector, lo que permite amplificar un fragmento que contiene el gen de interés más dos sitios de recombinación que hacen posible su movilización hacia cualquier vector destino del sistema Gateway, en este caso, los vectores pEarly103 y pCTAPa,

Para la reacción de recombinación se mezclan 3 µL del producto del segundo PCR purificado, 2 µL del vector destino, 4 µL de Buffer 5X LR clonasa, cbp 16 µL de TE pH 8.0 y 4 µL de enzima LR, en un volumen final de 20 µL. Esta mezcla de reacción se incuba durante un tiempo mínimo de 1 hora a 25°C, la reacción de recombinación se detiene con 2 µL de proteinasa K e incubación por 10 min a 37°C. Con 4 µL de la reacción anterior se electropan células de *E. coli* de la manera previamente descrita y utilizando el antibiótico correspondiente al vector destino. La verificación de las construcciones en el vector destino se realiza por PCR en colonia, utilizando como iniciadores un oligonucleótido que aparece con el vector (5') y un oligonucleótido sobre el gen de interés (3').

Las colonias seleccionadas se emplean para la purificación de DNA plasmídico que posteriormente se usará para transformar la cepa *A. tumefaciens* para transformar a las plantas.

Transformación de A.thaliana con A. tumefaciens

Primero la construcción que se desea insertar en la planta se transforma en la bacteria *A. tumefaciens*, para esto se utilizan células electrocompetentes de esta cepa, y se añaden 5 µl de la construcción que se desee transformar, se electropan dando un pulso de 1800V

a 25mA. Posteriormente se siembran en medio LB sólido, con el antibiótico correspondiente y se incuban a 30°C por 2 días.

Se selecciona una colonia y se crece en 400 ml de medio YEB con el antibiótico correspondiente durante toda la noche a 28°C a 250rpm.

Se siembran semillas de *A. thaliana* en medio GM, a los 10 días se transplantan a sustrato Metromix-200, y se dejan crecer las plantas hasta que presentan los primeros botones florales. En este momento se corta el meristemo apical para inducir nuevas formaciones de meristemas florales. Previo a la agroinfiltración (cuando se añade *Agrobacterium* con la construcción que se desea transformar) se eliminan las vainas y flores abiertas, dejando únicamente a las flores en botón.

La agroinfiltración se lleva a cabo poniendo en contacto los botones florales con la agrosuspensión de la cepa de *A. tumefaciens* portadora de la construcción que se desee en medio MS con 1% de Silwet, y se aplica vacío por un minuto. Posteriormente se elimina el exceso de la agrosuspensión de los botones florales enjuagando a las plantas con un aspersor. Las plantas se dejan crecer y se recolecta su semilla.

Extracción de DNA genómico de A.thaliana (extracción con CTAB).

Se muele una pequeña cantidad de tejido recolectado en un tubo eppendorf de con la ayuda de un pistilo, se le agregan 300 µL de buffer CTAB 2X y se incuban a 65°C por al menos 10 minutos, transcurrido el tiempo de incubación se deja 5 minutos a temperatura ambiente, se le agregan 300 µL de cloroformo y se mezcla con ayuda de un vortex. Después se centrifuga a 16200g por 10 minutos, se forman 2 fases de las cuales se recupera la fase acuosa que se encuentra en la parte superior del tubo y se transfiere a un tubo limpio, se le agregan 300 µL de isopropanol y se mezcla bien por inversión. Posteriormente se centrifuga a 16200g por 10 minutos para precipitar el DNA, se elimina el sobrenadante y se lava la pastilla con 500 µL de etanol al 70%, se agita bien con la ayuda de un vortex se centrifuga a 9300g por 5 minutos y se elimina el sobrenadante, después se deja secando por 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar completamente los restos de etanol. Finalmente, la pastilla se resuspende en 50 µL de

agua tetradestilada estéril, el DNA se puede almacenar a 4°C por semanas o a -20°C por periodos prolongados. Para reacciones de PCR se utilizan en promedio 1-2 µL.

Obtención de DNA plasmídico por gradiente de CsCl

Se inocula con la cepa de interés 3ml de LB líquido (en presencia del antibiótico), y se deja crecer por 6 horas. Con este precultivo, se inocula un litro de LB para dejarlo creciendo por 18 horas en agitación continua a 37°C.

Este cultivo se centrifuga a 7500g durante 10 minutos a 4°C. La pastilla se resuspende en 40 ml de la solución I, se agregan 80ml de la solución II y se agita lentamente hasta obtener una solución clara. Posteriormente se agregan 30 ml de la solución III y se mezcla lentamente por inversión. Se centrifuga nuevamente a 7500g por 10 minutos y el sobrenadante se transfiere a una botella nueva para adicionar un volumen igual de isopropanol frío. Se centrifuga a 7500g por 10 minutos, en este caso se descarta el sobrenadante y se adicionan 10 ml de etanol al 95%. La pastilla se resuspende en 3.5 ml de la solución I; luego esta solución, que contiene el DNA, se transfiere a un tubo de 15 ml y se ajusta a un volumen de 4.7 ml con TE. Se agregan 5.5 g de CsCl y 0.3 ml de EtBr (10mg/ml), mezclando perfectamente y se centrifuga por 5 minutos a 5500g. Después de esto se cuantifica la densidad de la solución, la cual se tiene que ajustar entre 1.47g/ml y 1.55g/ml. La muestra se transfiere entonces a una ampolleta para ultracentrifuga y se sella perfectamente, y esto se debe de hacer también con el contrapeso, cuidando que ambos pesen exactamente lo mismo. Se centrifuga en una ultracentrifuga (Beckman XL-90) 286000g por 12 horas en el rotor VT190.

Una vez obtenido el gradiente la banda de plásmido superenrollado (teñida por el Br de ET) se extrae utilizando una jeringa, y se transfiere a un tubo de 15 ml. Se añaden 2 volúmenes de agua tetradestilada estéril y 7 ml de N-butanol saturado, con el fin de extraer el EtBr. Posteriormente se agregan 3 volúmenes de etanol al 100% para precipitar el DNA, y se centrifuga a 15300g por 10 minutos. La pastilla obtenida se deja secar y se resuspende en un volumen de 0.3 a 0.5 ml de agua tetradestilada, dependiendo del tamaño de la pastilla. Esta solución se transfiere a tubos de 1.5 ml y se realizan lavados a

través de precipitación con 2 volúmenes de etanol al 100% y 1/10 de acetato de sodio 3M pH 5.2. El plásmido se obtiene por centrifugación a 16200g por 10 minutos en una microcentrífuga a 4°C. El sobrenadante se descarta y se enjuaga la pastilla con 1 ml de etanol al 70% por lo menos dos veces, con el fin de remover cualquier presencia de CsCl. Finalmente, el DNA se seca y se resuspende en 0.6 ml de agua tetradestilada estéril.

Obtención de protoplastos

Para el aislamiento de protoplastos se utilizan plántulas del ecotipo Col-0, crecidas en el sustrato Metromix-200. Transcurridas 3 a 4 semanas se seleccionan las plantas que no presentan abundantes tricomas y que tengan las hojas bien expandidas (Figura 14). Se cortan aproximadamente 80 transversalmente en cortes de 0.5 a 1 mm de grosor procurando no dañar el tejido. El tejido se incuba en 5 a 10 ml de una solución enzimática que contiene celulasa y macerozima (apéndice I) en una caja petri estéril.

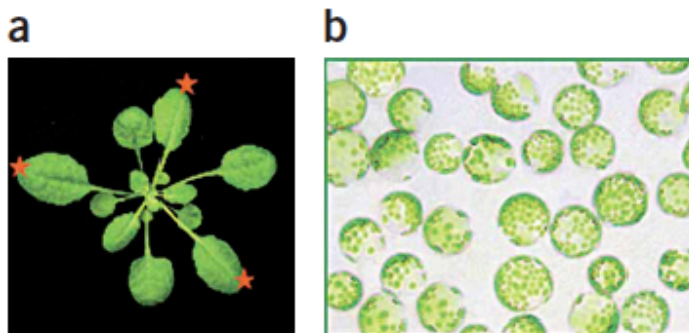


Figura 54 Hojas que se deben seleccionar para la obtención de protoplastos (Yoo, 2007)

Con el fin de que la solución enzimática infiltre bien en el tejido de las hojas, se aplica vacío 3 veces por un minuto. Posteriormente el tejido se mantiene en agitación a 40 rpm por una hora en oscuridad. Para liberar a los protoplastos se agitan por un minuto a 80 rpm, en este paso la solución se debe ver de un color verde claro, lo cual indica que los si hubo liberación de protoplastos.

Para limpiar los protoplastos de los restos de tejido la digestión es filtrada a través de una membrana de nylon (35-75 μ m) estéril, la caja se enjuaga con la solución W5 (apéndice I)

y se filtra nuevamente hasta alcanzar un volumen de 20 ml. Los protoplastos se sedimentan por centrifugación durante 3 minutos a 850g y 1 minuto a 1500g. El sobrenadante se decanta y con 1 ml de la solución W5 se resuspende la pastilla suavemente. Una vez resuspendidos los protoplastos se añade solución W5 hasta alcanzar un volumen de 15 ml. Los protoplastos se incuban en hielo por 30 minutos, para posteriormente centrifugarlos durante 3 minutos a 850g, se descarta el sobrenadante y finalmente se resuspende el pellet de protoplastos en 1 ml de la solución MMg (apéndice I). Los protoplastos se cuantifican usando una celda de Neubaer bajo el microscopio óptico y su concentración se ajusta para tener entre 2×10^5 .

Transformación de protoplastos

Para la transformación se utilizan 100 μ l de la solución con los protoplastos (aprox 4×10^4) los cuales se colocan en un tubo eppendorf de 2 ml conteniendo de 20 a 40 μ g del plásmido que se desea transformar. A estos se le añaden 200 μ l de la solución de PEG/ Ca^{++} (apéndice I) y se mezcla bien. La mezcla se incuba durante 30 minutos en oscuridad, y una vez transcurrido el PEG es removido, primero diluyendo esta solución con 800 μ l de la solución W5 mezclando lentamente. Posteriormente los protoplastos se recuperan por centrifugación por 2 minutos a 3000 rpm. Los protoplastos se resuspenden en 100 μ l de la solución W1 (apéndice I). Posteriormente los protoplastos transformados se resuspenden en 1 ml de la solución W1 y se incuban en oscuridad por 12 horas a 24°C en una placa de cultivo de tejido de 6 pozos previamente tratando cada pozo con suero bovino al 5% estéril.

Extracción de proteínas de plantas

El tejido vegetal recolectado se pulveriza con la ayuda de nitrógeno líquido en un tubo eppendorf de 1.5ml. Las muestras se resuspenden en proporción 1:1 v/v en un buffer desnaturizante de tipo Laemmli (apéndice I). Las muestras se incuban a 95°C por cinco minutos. Los extractos de proteína se cuantifican con el método de Bradford (Bradford, 1976). En celdas para espectrofotómetro, se agregan 800 μ l de agua destilada, 2 μ l del

extracto proteico y 200µl de Bradford. Se agita la celda con su contenido y se lee a 595nm en el espectrofotómetro.

SDS PAGE

Para la electroforesis de proteínas las muestras y el marcador de peso molecular se corren en un gel desnaturante SDS-poliacrilamida al 10% (apéndice I) en un buffer de corrida Tris-glicina (apéndice I). Los geles se corren a 120 Volts durante aproximadamente 2 horas. El gel se puede teñir con azul brillante Coomassie R-250 (apéndice I) para la visualización de proteínas o se puede usar para electrotransferirse a una membrana.

Western blot

Los extractos proteicos se separan por SDS-PAGE al 10% y luego son transferidas a una membrana de nitrocelulosa por 90 minutos a 0.35 A en una cámara de electrotransferencia con buffer de transferencia a 4°C. La membrana que contiene las proteínas se tiñe con Ponceau's al 0.2% (apéndice I) para verificar la presencia de proteínas, la cual puede ser usada como control de carga. Se bloquea la membrana con leche descremada al 5% en PBS (apéndice I) con Tween 20 al 0.5% por dos horas. Posteriormente, se elimina el exceso de leche mediante tres lavados sucesivos de al menos 5 minutos con la solución PBS Tween 0.5%. Se agrega el anticuerpo primario en la solución de lavado con 0.5% de leche descremada se pone a incubar durante dos horas a temperatura ambiente. Se desecha la solución con el anticuerpo primario, y se lava la membrana con 3 lavados sucesivos de al menos 5 minutos con la solución PBS Tween 0.5%. Después, se agrega el anticuerpo secundario con la solución de lavado (anti conejo o ratón) anti HRP durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se hacen tres lavados con PBS Tween 0.5%. y por último un enjuague con agua. La membrana se revela mediante quimioluminiscencia usando el kit de Lumigen: se agrega 1ml de Lumigen PS-3 detection reagent solution A y se le agrega 25 µl de lumigen Ps-3detection solution B. La mezcla se esparce en la membrana y se coloca un film fotosensible.

Extracción de RNA (método con TRIzol Invitrogen Life Technologies).

El tejido recolectado se muele en un mortero manteniéndolo siempre frío con ayuda de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo homogéneo, a 50-100 mg de este tejido pulverizado se le agrega 1 mL de TRIzol (Invitrogen Life Technologies) y se mezcla con la ayuda de un vórtex. Posteriormente se deja reposar por 5 minutos a temperatura ambiente y se adicionan 200 μ L de cloroformo por cada ml de TRIzol utilizado, se agita con ayuda de un vórtex. Después se centrifugan las muestras a 13,200 rpm durante 15 minutos a 4°C y la parte acuosa se recupera transfiriéndola a un tubo eppendorf limpio al que se le adicionan 500 μ L de alcohol isopropílico por cada mL de TRIzol utilizado, se mezcla suavemente y se deja en reposo por 10 minutos a temperatura ambiente ó a -20°C. Si se decide no continuar con la extracción, se centrifuga a 13,200 rpm por 10 minutos a 4°C, se elimina el sobrenadante y se lava la pastilla (sedimento blanco) con 1 mL de etanol al 75% por cada mL de TRIzol utilizado, se agita bien con la ayuda de un vortex, se centrifuga a 10,000 rpm por 5 minutos a 4°C y se elimina el sobrenadante, posteriormente se deja secando por 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar completamente los restos de etanol. Finalmente, la pastilla se resuspende en 400 μ L de agua tetradesilada estéril. Para determinar la concentración y pureza del RNA obtenido se utiliza un espectrofotómetro para medir la absorbancia a 260/280 nm, haciendo la cuantificación según la siguiente relación:

$$1U A_{260} \text{ de RNA} = 40 \mu\text{g/ml}$$

Análisis tipo Northern Blot

Esta técnica se utiliza para la detección de niveles de RNA. El RNA es extraído como se explicó previamente. Las muestras de RNA se corren en un gel desnaturizante de 1.5% de agarosa con formaldehído (apéndice I) con buffer MOPS 1X (apéndice I). Para la desnaturización del RNA, éste se incubó a 65°C por 10 minutos en el buffer de carga.

El RNA se transfiere a una membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham Bioscience) utilizando SSC10X (apéndice I), por un periodo aproximado de 18 horas. Posteriormente el RNA se fija a la membrana con luz UV y se tiñe con azul de metileno para corroborar la

transferencia. Se prehibrida con la solución de prehibridación por dos horas. Mientras se marca la sonda que se utilizará para la hibridación. Esto se realiza con el kit Megaprime DNA labelling systems (Amersham Bioscience) y se siguieron las especificaciones del proveedor. Una vez prehibridada la membrana, se añade la sonda marcada y se hibrida por un periodo de 18 horas a 65°C. Terminado este periodo, se procede a realizar los lavado de alta astringencia por 15 minutos a 55 ° con una serie de soluciones: SSC 2X/SDS 0.1%, SSC 0.5X/SDS 0.1% y SSC 0.1X/SDS 0.1%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis estructural de diferentes proteínas DXS en busca de motivos conservados.

Como se describió anteriormente, estudios previos del grupo han demostrado que la enzima DXS es regulada a nivel de la estabilidad de su proteína como respuesta a cambios en los niveles de los productos finales de la vía MEP. Esto nos hizo presuponer que esta enzima debe de ser de alguna manera modificada bajo ciertas condiciones que cambien su vida media. Se sabe que uno de los mecanismos a través de los cuales se puede alterar la vida media de una proteína involucra modificaciones postraduccionales. Con el propósito de conocer en detalle el mecanismo de dicha regulación, primeramente se realizó análisis de la proteína DXS de *Arabidopsis thaliana* con distintos softwares en busca de sitios para posibles modificaciones postraduccionales. Se encontró que en esta proteína se predicen varios residuos fosforilables, siendo los más probables las serinas 22, 29, 90, 179, 552 y 637; las treoninas 74, 155 y 353; y las tirosinas 67, 235 y 631. También se encontró un sitio de posible acetilación en el extremo N-terminal. Por otro lado, el software utilizado para encontrar sitios de prenilación no predijo ningún sitio para este tipo de modificación. Estas modificaciones ocurren generalmente en el extremo C-terminal de las proteínas, en el caso de las geranil geranilaciones ocurren en las cisteínas de motivos CaaX, donde la X corresponde a una leucina o isoleucina; en el caso de las farnesilaciones las cisteínas modificadas también pertenecen a motivos CaaX, donde “a” son aminoácidos alifáticos y X puede ser metionina, serina, alanina, glutamina u otra cisteína. (Crowell, 2009). Sin embargo se realizó una búsqueda manual de posibles sitios de farnesilaciones o geranil geranilaciones. La proteína DXS de *A. thaliana* presenta en una zona cercana a su extremo C-terminal un posible sitio para que se lleve a cabo una farnesilación, sin embargo no se han reportado prenilaciones que no ocurran exactamente en el extremo C-terminal. Adicionalmente, solo hay un reporte de prenilación de una proteína dentro de cloroplastos de espinaca (Parmryd, 1999), con lo que queda en duda si este tipo de modificaciones postraduccionales se llevan a cabo en plástidos. Por lo que, aunque parecía atractivo el hecho de que DXS presentara una prenilación, hemos considerado que

esta modificación queda como poco probable en este caso.

Con respecto a las fosforilaciones, Reiland, en el 2009, realizó un análisis global del fosfoproteoma del cloroplasto y reportó que DXS es fosforilada, particularmente en una serina, la cual en la predicción bioinformática de sitios de fosforilación de DXS tiene un score muy bajo, es decir, que está predicha como un sitio poco probable para sufrir una fosforilación; y por otro lado, en otros dos trabajos donde realizaron el fosfoproteoma del cloroplasto, la proteína DXS no es reportada, es decir, que no se encontraron fosforilaciones en ella. (Sugiyama, 2008; Lohring, 2008).

En el caso de las acetilaciones, se sabe que estas modificaciones es una de las modificaciones covalentes más comunes que se han reportado y se ha sugerido que funcionan como una modificación regulatoria igual de importante que las fosforilaciones (Soppa, 2010). Por otro lado las modificaciones en los extremos N-terminales de las proteínas tienen un papel importante en el destino de las proteínas en términos de actividad, estabilidad o compartimentalización celular. (Bienvenut, 2012) Actualmente se sabe que en *A. thaliana*, una gran proporción de las proteínas cloroplásticas que están codificadas en el núcleo sufren N- α -acetilaciones una vez que se remueve el péptido de tránsito. Por lo que es probable que DXS la presente. Al realizar un análisis de otras DXS de otras plantas (arroz y maíz) se observó que también presentaban un sitio predicho para N-acetilación(figura 15), lo cual sugiere que de existir esta modificación, está conservada en la evolución. Además se ha sugerido que las N- α -acetilaciones son un factor importante que influencia la vida media de las proteínas volviéndolas más estables (Bienvenut, 2012), En el caso de este trabajo, se buscaron factores que pudieran afectar la vida media de DXS haciéndola más estable, por lo que la N-acetilación parece ser un candidato a la posible modificación que nuestra proteína sufre.

DXS1arroz: MALTTFSISRGGFVGALPQEGHFAPAAAELSLHKLQSRPHKARRRSSSSISASLSTEREAEE
DXS2arroz: MALQASSSPSMFRAIPTNTNASCRRKLVRAASAAAAANGGGDGKVMRKEAASGAWKIDYSG
DXS1maíz: MALSTFSVPRGFLGVPAQDSHFASAVELHVNKLLQARPINLKPRRRPACVSA LSSEREAEYY
DXS1Athal: MASSAFAPPSYIITKGGGLSTDCKSTSLSSSRSLVTDLPSCLKPNNSHNSNRRRAKVCASLA
DXS1Athal: MSYQTQINKFSQMALSVFAFPSYINRNPSLKYLPSSMSSTKYSKVRATIFSEKGEYYSNRPP
DXS3Athal: MGSASIGYQFGISARFYGNFNLSSDITVSSLPCKLDVSIKSLFSAPSSTHKEYSNRARRVCSLP

Figura 15. Sitios de posibles N-acetilaciones en distintas DXS. En amarillo se muestra la secuencia correspondiente al péptido de tránsito, en verde se muestra el posible sitio de acetilación

Como una estrategia paralela y con la idea de poder delimitar la zona involucrada en los cambios de estabilidad de DXS se realizó un modelaje de la proteína DXS de *A. thaliana* basado en la estructura cristalográfica de la DXS de *Escherichia coli* (figura 16) usando el software Swiss Model (Arnold, 2006). Este modelo se realizó sin tomar en cuenta la secuencia correspondiente al péptido de tránsito, la cual se predijo con el software ChloroP 1.1 . Dicho análisis mostró que a pesar de que ambas proteínas tienen un alto grado de identidad (47%) presentan diferencias importantes en la estructura del primer dominio ya que en el caso de la de *A. thaliana* éste es considerablemente más grande. Esto hace que no se puede predecir de una forma segura su estructura ya que no se puede comparar con la cristalizada (Figura 16). Cabe mencionar que esta diferencia podría deberse al método que se utilizó para cristalizar a la proteína de *E.coli*, ya que fue necesario utilizar una proteólisis controlada de la proteína DXS por una proteasa fúngica, lo cual dio como consecuencia que ciertas regiones de la estructura sin poderse predecir (Xiang, 2007).

A pesar de esto, este análisis nos permitió delimitar los tres dominios de la proteína DXS de *A. thaliana*, los cuales fueron seleccionados posteriormente para generar construcciones que contuvieran distintos fragmentos de la proteína con el fin de analizar su estabilidad, lo cual se explicará más adelante

Cabe remarcar que a pesar de las diferencias mencionadas el parecido entre ambas proteínas nos sugiere que probablemente el mecanismo de regulación pudiera estar conservado entre plantas y bacterias. De ser así también descartaría la posibilidad de una prenilación, ya que en bacterias estas modificaciones no ocurren. Sin embargo, no se puede descartar del todo este tipo de modificación, ya que la regulación de DXS pudo haber cambiado a través de la evolución.

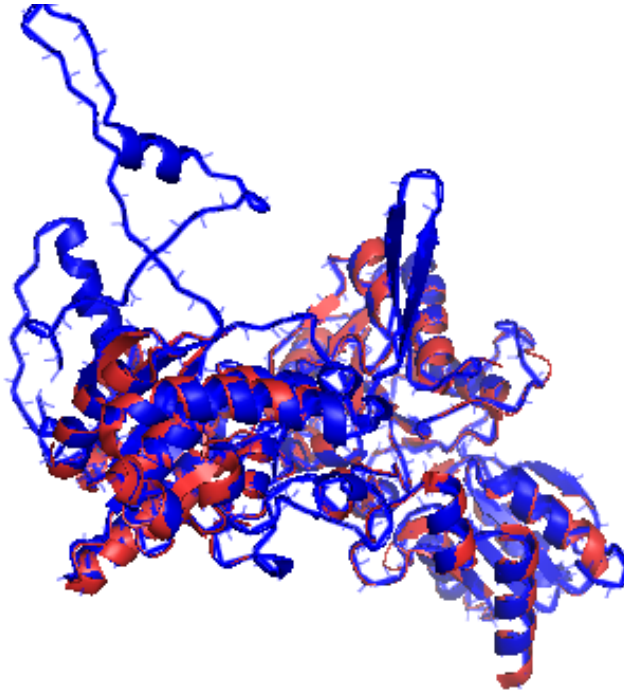


Figura 66 Modelo de DXS de *A. thaliana* (azul), superpuesto sobre la estructura cristalizada de DXS *E.coli* (rojo).

Análisis de la existencia de posibles modificaciones post-traduccionales en la proteína DXS que pudieran estar involucradas en cambios en su estabilidad.

Basados en los resultados que se obtuvieron en el análisis *in silico* quedó claro que existen diferentes modificaciones posibles para esta proteína. Como una estrategia para analizar de forma experimental posibles modificaciones post-traduccionales en la proteína DXS de *A. thaliana*, se realizaron geles de dos dimensiones de plantas silvestres tratadas con y sin el inhibidor fosmidomicina. Como ya se mencionó anteriormente, este inhibidor actúa sobre la segunda enzima de la vía MEP, DXR, (Mueller, 2000) generando una disminución en los productos finales de la vía. El uso de este inhibidor, permite emular condiciones donde estos productos son demandados por la planta.

En los geles de dos dimensiones, la migración de las proteínas depende de dos propiedades, su punto isoeléctrico (durante la primera dimensión) y el peso molecular (para la segunda dimensión). En este tipo de análisis cualquier diferencia causada por

alguna modificación postraduccional de DXS provocaría variaciones en la migración de esta proteína.

Para estos experimentos se obtuvieron extractos de plántulas de *A. thaliana* crecidas en medio líquido GM durante cuatro días, posteriormente se les agregó el inhibidor fosmidomicina en una concentración final de 100 μ M por un periodo de 12 horas, para después recolectar el material. Como control se utilizaron plántulas crecidas bajo las mismas condiciones, pero no se les añadió el inhibidor. Posteriormente se obtuvieron extractos totales de proteínas.

Para correr la primera dimensión se cargaron 100 μ g de ambos extractos, en tiras con un gradiente de pH de 3 a 10, y ambos geles fueron corridos en paralelo.

Posteriormente se corrió la segunda dimensión en un gel desnaturizante tipo SDS-Page al 12%, igualmente en paralelo. Los geles fueron teñidos con Coomasie. Como se puede ver en la Figura 17, en estos geles se pueden apreciar ciertas diferencias en la expresión de algunas proteínas o la aparición de nuevos puntos.

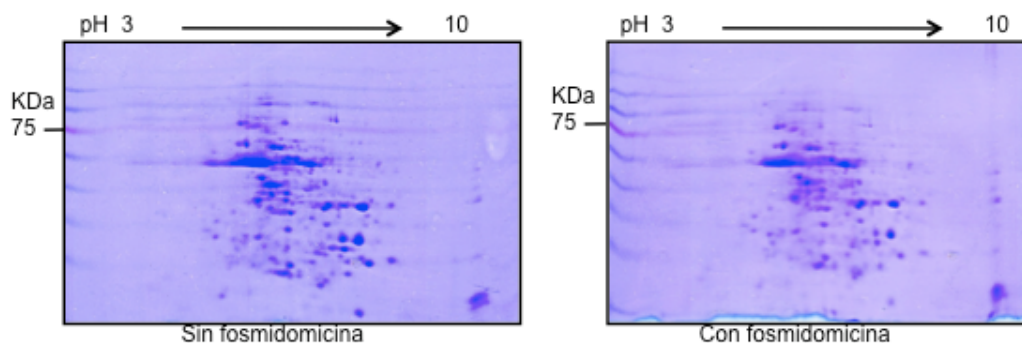


Figura 17 Geles de dos dimensiones de plantas silvestres tratadas con y sin fosmidomicina teñido con Coomasie. El gradiente de pH va de 3 a 10, y fueron corridos en geles de acrilamida al 12%. Se pueden apreciar diferencias en distintos puntos de ambos geles.

Al realizar un western blot anti-DXS de estos geles se observaron claras diferencias en la migración de la proteína DXS. De esta manera en la muestra que no fue tratada con fosmidomicina (Figura 18A) se observa un punto que corresponde a DXS, en la muestra tratada con fosmidomicina fue posible apreciar varios puntos o un barrido (Figura 18B),

Estos cambios en la migración del punto isoeléctrico mostraron un corrimiento hacia un pH más básico (Figura 18B). Este corrimiento descarta que se trate de una fosforilación, ya que de ser así, el corrimiento hubiera sido hacia un pH más ácido. Por otro lado tampoco corresponde a la migración que se esperaría en caso de una acetilación. Este resultado, no descarta la presencia de estas modificaciones (fosforilaciones o acetilaciones), simplemente es probable que no sean las que le confieran la estabilidad a DXS en presencia de fosmidomicina.

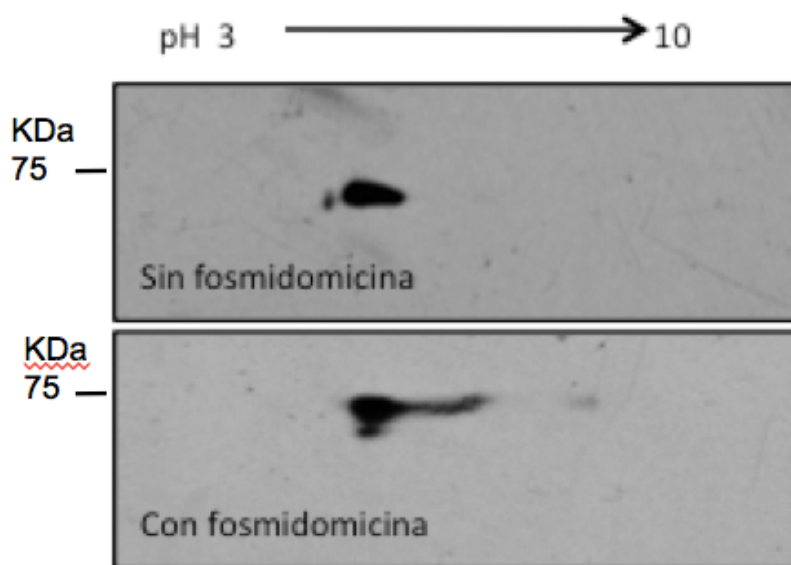


Figura 18 Western blots anti DXS de los geles de dos dimensiones de las plantas tratadas con y sin fosmidomicina. Se muestran repeticiones del experimento, ya que esos fueron los patrones que se apreciaron.

Una explicación al cambio de la migración hacia un pH alcalino puede ser la presencia de metilaciones. Estas modificaciones no tienen casi efecto en el tamaño de las proteínas y enmascaran aminoácidos ácidos (tales como Asp y Glu), además estas modificaciones se sabe que son importantes en las vías de señalización y en el destino de las proteínas (Mumby, 2001).

Estos resultados fueron obtenidos en varios experimentos independientes por lo que podemos concluir que en respuesta a la presencia del inhibidor fosmidomicina sí existe un cambio claro en la migración de la proteína DXS lo que apoya que dicha proteína sufre alguna modificación postraduccional. Sin embargo, no parece ser ninguna de las

predichas, es por ello que se tendrán que analizar estas muestras para saber de que modificación se trata, y la manera más sencilla para realizar esto es mandándola a secuenciar.

Acotamiento de la región de la proteína DXS responsable de su regulación post-traducciona.

Otro de los objetivos del trabajo fue poder acotar la región necesaria para el cambio en estabilidad de DXS. Con el fin de ir delimitando la región de DXS responsable de su regulación postraducciona, se realizaron deleciones de la proteína. Las deleciones de DXS se seleccionaron a partir de un análisis bioinformático, alineando la secuencia de DXS de *A. thaliana* con las DXS de *E. coli* y de *Deinococcus radiodurans*, las cuales ya fueron cristalizadas y se conoce su estructura terciaria (Xiang, et al, 2007). Con base en el análisis cristalográfico se supo que DXS contiene tres dominios (figura 19). Por lo tanto se decidió deletar cada uno de dichos dominios de manera consecutiva y dichos fragmentos fusionarlos a la proteína verde fluorescente (GFP) o adicionarles un epítipo (Figura 19). Con este propósito se diseñaron oligonucleótidos específicos (Apéndice III) con los cuales se amplificaron cada uno de los fragmentos de interés. Estos fragmentos fueron inicialmente clonados en un vector de entrada tipo Gateway (Landy, 1989), los cuales aprovechan las propiedades de recombinación sitio-específica del bacteriófago Lambda, este sistema se utiliza para insertar productos de PCR de manera direccional, en este trabajo en particular se utilizó el pENTR/D-TOPO (Invitrogen)

Posteriormente cada uno de los fragmentos fue recombinado hacia dos plásmidos destino:

El primero de ellos el vector pEarlyGate103, para la fusión a GFP, y el segundo al vector pCTAPa, el cual contiene los epítipos de nueve secuencias myc y seis histidinas (Rubio, 2005), ambos vectores tienen un promotor 35s, y en ambos se clonaron las secuencias para la proteína DXS completa y para cada una de las deleciones.

Cada uno de los fragmentos se seleccionaron entonces con el fin de remover cada uno de los dominios, el primer fragmento (DXS1726) remueve únicamente al dominio III de DXS, el segundo (DXS 1159) remueve al dominio II y al dominio III. (figura 19)

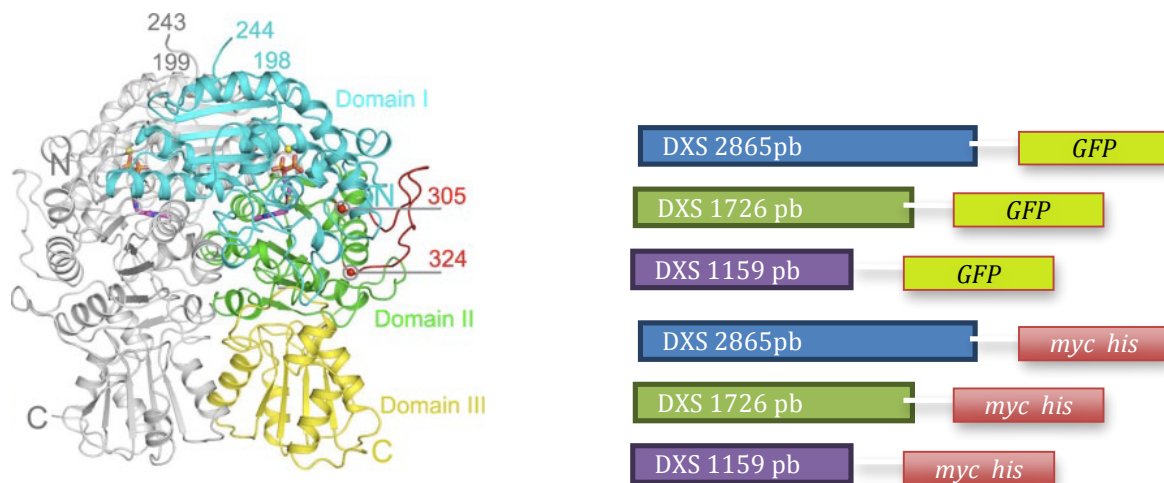


Figura 19 Estructura de DXS de *E.coli* donde se aprecian los tres dominios de la proteína.(Xiang, 2007) Del lado derecho se muestran esquemas de las construcciones que se realizaron con base a los dominios de la proteína DXS, fusionadas a GFP y a los epítopes de myc e histidinas

Las construcciones fusionadas a GFP se transformaron en protoplastos. La idea original de este experimento consistía en realizar un ensayo transitorio que nos permitiera tener un acercamiento rápido al comportamiento de las construcciones en presencia de fosmidomicina en estas células. Sin embargo no se pudo observar la respuesta a fosmidomicina en los protoplastos, a pesar de que los ensayos con este inhibidor se realizaron a una concentración final de 100 μ M, la misma que se utilizó para los demás ensayos, aún así no hubo respuesta en la acumulación de la proteína DXS endógena.

Al realizar western blots de los extractos proteicos de estos protoplastos transformados con las construcciones fusionadas a GFP, se observó que no había ninguna diferencia entre los tratamientos, como era de suponerse, ya que la proteína endógena tampoco respondía, sin embargo si se pudo ver que las construcciones se expresaban bien y en gran cantidad, pero no fuimos capaces de observar a la proteína endógena. (figura 20)

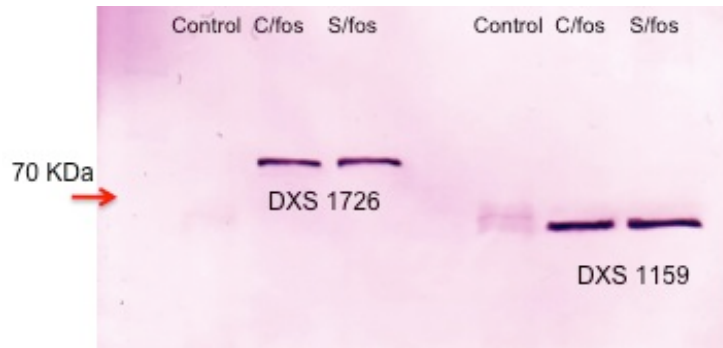


Figura 20. Western blot anti-DXS de protoplastos tratados con y sin fosmidomicina transformados con las construcciones DXS 1726 y DXS1159, no se observa respuesta en presencia del inhibidor, ni a la proteína endógena.

La falta de respuesta en los protoplastos con los diferentes tratamientos puede deberse a la gran carga metabólica que representa expresar a las construcciones lo que impide ver si hay acumulación de la proteína, ya que el vector pEarley 103 tiene un promotor 35S que genera que se produzca mucha proteína en este sistema, enmascarando así a la proteína endógena, es por eso que no pudimos apreciarla con este método.

Es importante concluir que los resultados obtenidos nos muestran que, desafortunadamente, el uso de un sistema transitorio parece no ser una alternativa para nuestro estudio ya que nunca pudimos observar la respuesta al inhibidor en este sistema. Sin embargo, las fusiones a GFP nos permitieron ver que las distintas delecciones si colocalizaban (figura 21) en el cloroplasto en los protoplastos, lo que era de esperarse debido a que contenían el péptido de tránsito.

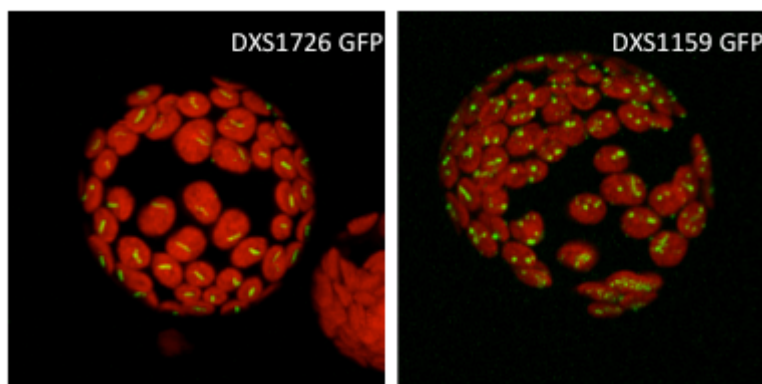


Figura 21. Expresión de las construcciones de DXS fusionadas a GFP. Del lado izquierdo se muestra la construcción de DXS1726 y del lado derecho a la construcción DXS1159; ambas fueron transformadas en protoplastos y en ambos casos se aprecian dentro de los cloroplastos (rojo) (San Román).

Algo que llama la atención en estas imágenes es que las fusiones pareciera que se localizan en sitios específicos dentro del cloroplasto, ya que se observan como líneas o puntos definidos dentro de estos organelos, y no difundidas por el espacio estromal. (figura 21). Sería interesante entonces realizar un análisis específico de la localización de la proteína DXS dentro del cloroplasto, expresando a la proteína fusionada con GFP bajo el propio promotor de DXS (para asegurarse que la localización no sea un artefacto de la sobreexpresión) y también sería de interés observar si hay diferencias en la localización suborganelar de la proteína en presencia del inhibidor fosmidomicina.

Por lo tanto para poder estudiar la regulación postraduccional de DXS la alternativa restante comprendió usar plantas transgénicas. Por lo que cada una de las proteínas de fusión conteniendo los diversos fragmentos de la proteína DXS fusionados a los epítopes myc e his en el vector pCTAPa fueron introducidos en *A. thaliana*.

Se obtuvieron 2 líneas de la construcción de la proteína completa fusionada o los epítopes, y tres líneas de cada una de las otras dos construcciones (DXS1726 y DXS1159). Se corroboró que estas plantas si tuvieran el transgen por medio de PCR de DNA genómico de las plantas seleccionadas.

Con el fin de analizar como se comportaba la acumulación de las diferentes delecciones con la presencia de fosmidomicina, se hicieron ensayos de las diferentes líneas transgénica con y sin este inhibidor. Las semillas de las plantas transgénicas con cada una de las construcciones previamente mencionadas fueron crecidas en medio GM líquido por 5 días momento en el cual se añadió el inhibidor fosmidomicina en una concentración de 100 uM por 12 horas, teniendo como control a las mismas plantas sin el inhibidor. Posteriormente cada una de los lotes de plantas transgénicas con los diferentes tratamientos fueron recolectado y se extrajo la proteína total de cada una de las muestras con el propósito de analizar los niveles de cada una de las proteínas de fusión utilizando el anticuerpo contra el epítape myc.

Al hacer el western blot anty-myc, se apreció que en tanto en la construcción de DXS completa como la construcción de DXS1726 tenían un comportamiento igual al

previamente reportado, es decir, que la proteína se acumulaba en presencia de fosmidomicina (García-Guevara, 2005). Contrariamente a esto en el caso de la construcción de DXS 1159 esto no ocurre, y no se observan diferencias entre los tratamientos (Figura 22).

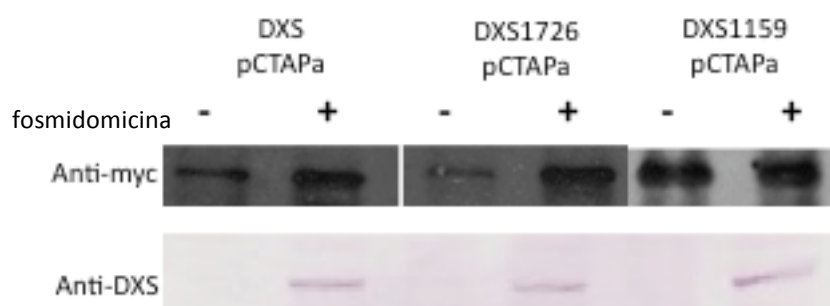


Figura 22 Western blot contra el epítipo myc de las distintas construcciones en presencia (+) y ausencia (-) de fosmidomicina (arriba). Western blot anti-DXS de las mismas plantas con el mismo tratamiento, donde se aprecia que la proteína endógena si se acumula en presencia de fosmidomicina.

Para corroborar que el tratamiento de fosmidomicina fue efectivo en cada una de las muestras se hizo un western y se analizó los niveles de la proteína DXS endógena en estas plantas transgénicas. Como se observa en el panel inferior de la figura 22, la proteína DXS endógena se acumula en todas las muestras incluyendo a la que contiene la fusión de pCTAP 1159. Por lo tanto podemos concluir que la falta de diferencia en los niveles de la delección de DXS1159 no se debe a que el tratamiento no funcionara.

Se hicieron 2 repeticiones de estos ensayos utilizando otras líneas independientes para cada la construcción DXS 1159 en pCTAPa, y en todos los casos el comportamiento fue el mismo, es decir, que no existen diferencias en los niveles de la proteína de fusión en ausencia o presencia de fosmidomicina. (figura 23)

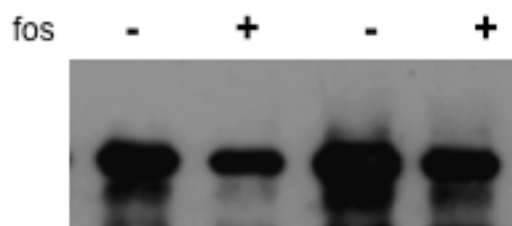


Figura 23. Western blot anti-myc de dos líneas más de la construcción DXS1159 pCTAPa, en donde no se ve una acumulación de esta delección de DXS en presencia de fosmidomicina.

Este resultado nos sugiere que o bien uno o todos los elementos necesarios para la regulación postraduccional de la proteína DXS en respuesta a fosmidomicina se encuentran en segundo dominio de la proteína DXS (figura 19), o que esta construcción que sólo contiene al primer dominio de la proteína no es lo suficientemente estable para responder al tratamiento. Esta no parece ser la explicación ya que, aún sin el inhibidor fosmidomicina somos capaces de observar suficiente cantidad de la proteína derivada de la construcción DXS1159.

Estos resultados no descartan que haya otras modificaciones a lo largo de la proteína, pero quizás de haber otras modificaciones, no son importantes para la acumulación de DXS en presencia de fosmidomicina.

Algo que llamó nuestra atención durante estos experimentos fue que utilizando estas construcciones si éramos capaces de ver por western blot a las proteína fusionadas a los epítopes usando el anticuerpo anti-myc.. Sin embargo, al revelar el western blot con el anticuerpo anti-DXS y con fosfatasa alcalina fuimos incapaces de apreciar a las construcciones, sólo se veía a la proteína DXS endógena. Esto nos hace suponer que la cantidad de proteína producida a partir de los transgenes era muy baja. Al realizar el western blot revelándolo por quimioluminiscencia, apenas se distingue a las proteínas fusionadas, e inclusive se ve que los niveles de la proteína endógena están disminuidos con respecto a la planta silvestre.

Una posible explicación de estos resultados es que exista un silenciamiento de las diferentes construcciones e incluso de la DXS endógena. Cabe mencionar que, en ciertas ocasiones, algunas de las plantas transgénicas después de ser seleccionadas, se volvieron albinas con un fenotipo parecido al las mutantes en DXS. Esto refuerza la idea de que hay un mecanismo de silenciamiento, sin embargo, este fenómeno no ocurre siempre y pareciera ser azaroso.

Para analizar los niveles de expresión tanto de la DXS endógena como de las cada una de las construcciones en las plantas transgénicas se analizó los niveles de transcrito de estos genes a través de hibridaciones DNA:RNA tipo “northern blots”. Inicialmente se utilizó una sonda de 900 pb de *cla1/DXS1* que incluye la secuencia que corresponde a la parte carboxilo terminal de la proteína. Dicha sonda ha sido usada para identificar a *cla1/DXS* endógeno en la mayoría de los análisis realizados en nuestro laboratorio. Sin embargo, como ya se mencionó, esta sonda hibrida con la parte correspondiente al extremo carboxilo del gen, en consecuencia al realizar la hibridación tipo Northern blot con esta sonda solo se pudo sólo apreciar al mensajero de *cla1/DXS* en la planta silvestre (figura 24) y no en el resto de las construcciones, ya que en ellas se removieron los extremos carboxilo, con el fin de remover los dominios III y II. En el caso de la construcción de la proteína completa, si esperábamos ver el transcrito con estas sonda, sin embargo no fue posible. Esto nos indicaba que al parecer si había un evento de silenciamiento.

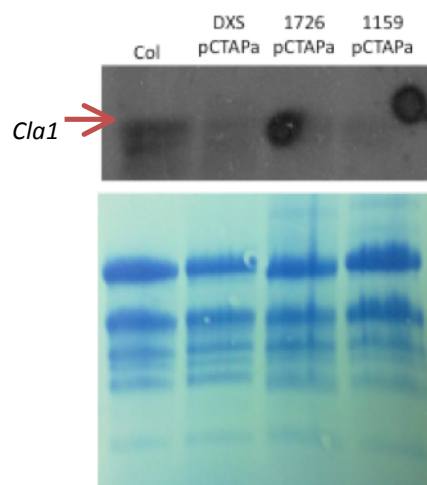


Figura 24 Northern blot contra *cla1/DXS* en plantas crecidas por 10 días (arriba). Control de carga teñido con azul de metileno (abajo). La señal aun en el control de Columbia es muy baja con respecto a lo que se esperaba, y en el caso de las cosntrucciones no se observó al transcrito

Por lo tanto con el fin de poder observar el mensajero de nuestras construcciones en nuestros ensayos, se diseñó una sonda diferente la cual abarcaba 900 pb correspondientes a la región amino de la proteína a partir de la metionina (ATG) inicial. Con esta sonda fuimos capaces de apreciar al transcrito *cla1/DXS* en las plantas silvestres y en la construcción de DXS completa, en este caso, además, se aprecia un banda de

mayor tamaño que corresponde al transcrito de la construcción, sin embargo se ve de mucho menor intensidad que el transcrito correspondiente al gen endógeno. En el caso de la construcción DXS1726 no se observó ningún transcrito, a pesar de que en el control de carga con azul de metileno se ve una cantidad proporcional de RNA que las otras muestras; y por último en el caso de la construcción DXS 1159, pareciera que el transcrito es degradado, ya que se aprecia un barrido, esto a pesar de que el control de carga no muestra ningún tipo de degradación del RNA. (figura 25)

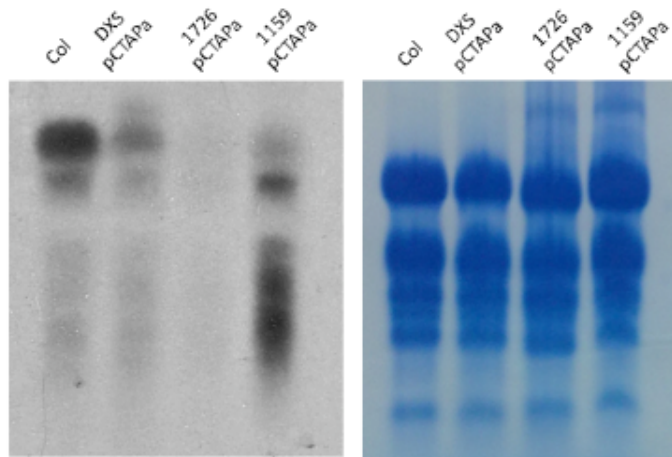


Figura 25 Northern blot contra *CLA1* (izquierda) Control de carga teñido con azul de metileno (derecha) En el caso de DXS1726 no se aprecia ninguna señal. En el caso de DXS1159 pareciera que el transcrito se degrada.

La vía MEP es de gran importancia para las plantas debido a todos los compuestos que derivan de ella, es por eso que debe de haber varios mecanismo para su regulación, los cuales pueden ser a nivel transcripcional o traduccional, esto queda reflejado en el aparente silenciamiento que ocurre del transcrito de *cla1/DXS* endógena en presencia de los transgenes. Se sabe que en *E.coli*, la sobreexpresión de la enzima DXS es tóxica para la bacteria, por lo cual probablemente para la planta también lo sea y busque mecanismos para contrarrestar una sobreexpresión de esta enzima.

Por otro lado otros grupos interesados en entender el mecanismo de regulación postraducciona de las enzimas de la vía MEP (DXS, HDR y DXR), han identificado mutantes resistentes a fosmidomicina a las que se les ha denominado como (*rif*). Interesantemente han encontrado que dentro de estas mutantes algunas enzimas de la vía MEP están acumuladas. En particular destaca la mutante *rif1*, que afecta a una proteína de función poco clara y en donde la expresión de varios genes codificados en plástidos, incluyendo a la subunidad *ClpP* está afectada (Koussevitzky, et al, 2007). En esta mutante, DXS también se acumula a altos niveles, por lo que se ha especulado que esto se puede deber a que DXS es blanco de esta proteasa, aunque evidencias directas son aún requeridas. (Sauret-Güeto, 2006; Flórez-Pérez, 2008).

En resumen los datos acumulados hasta el momento han mostrado que DXS es regulada a nivel de la estabilidad de su proteína en respuesta a los niveles de sus productos finales. Al parecer dicha regulación involucra una degradación selectiva de esta proteína bajo ciertas condiciones. Una de las posibles proteasas que pudieran estar involucradas en dicho control es la proteasa ClpP. Sin embargo aún es poco claro tanto el mecanismo involucrado en dicha regulación como su importancia fisiológica.

CONCLUSIONES

Como parte de mi trabajo de maestría a través de geles de dos dimensiones, se observó que DXS sufre modificaciones postraduccionales que afectan su punto isoeléctrico y por lo tanto su migración en respuesta a tratamientos con el inhibidor fosmidomicina. Estos resultados apoyan a que exista una relación entre la estabilidad de DXS y una posible modificación postraducciona, que amerita estudios adicionales.

Con el propósito de tratar de acotar la región de DXS involucrada en la estabilidad de la proteína durante mi trabajo de maestría se hicieron distintas deleciones de la proteína DXS, la acumulación reportada de la proteína DXS no se observó en la construcción que sólo contiene al primer dominio. Estos resultados sugieren que la región implicada en su estabilidad se encuentra en el segundo dominio de la proteína DXS.

En resumen los datos acumulados hasta el momento han mostrado que DXS es regulada a nivel de la estabilidad de su proteína en respuesta a los niveles de sus productos finales. Al parecer dicha regulación involucra una degradación selectiva de esta proteína bajo ciertas condiciones

PERSPECTIVAS

Este trabajo deja muchas interrogantes a contestar, siendo quizás estas tres las más importantes:

1) Identificar la modificación postraducciona de la proteína DXS que se observa en respuesta a bajo niveles de isoprenoides.

Para identificar la posible modificación postraducciona que sufre DXS se mandará a secuenciar a la proteína que se extraiga en presencia de fosmidomicina a partir de un gel de doble dimensión.

Una vez identificada la modificación postraducciona que sufre DXS en presencia de fosmidomicina con la idea de poder conocer si dicha modificación afecta la estabilidad de esta proteína se harán mutagénesis dirigida con el fin de quitar esta modificación. Dicha construcción será introducida a plantas transgénicas y posteriormente se observará el comportamiento de DXS en presencia y ausencia del inhibidor. Lo que se espera es no ver acumulación de la proteína en presencia de fosmidomicina lo que corroboraría que dicha modificación sí participa en la estabilidad de DXS.

2) Identificar posibles interactores de DXS.

Un aspecto que sería de sumo interés para conocer posibles factores involucrados en la regulación de DXS es identificar proteínas interactoras presentes bajo ciertas condiciones. La estrategia planteada para dicho objetivo es utilizar una planta transgénica que contiene una construcción de DXS marcada con histidinas y el epítoto de myc. A partir de extractos proteicos de dicha construcción se realizará una coimmunoprecipitación. Una vez que encontremos posibles candidatos con las inmunoprecipitaciones, se mandarán a secuenciar con el fin de conocer su identidad.

3) Analizar la relevancia fisiológica de la regulación postraducciona de DXS para la regulación de la vía.

Como ya se mencionó, en las mutantes de las distintas enzimas de la vía se acumula DXS, lo que sugiere que ninguno de los intermediarios podrían ser los responsables de la regulación postraducciona de DXS, esto apoya la idea de que la señal depende de la

percepción de los niveles de los productos finales de la vía (IPP y DMAPP, o alguno de los productos derivado de estos); esto mismo lo apoya el fenómeno que ocurre en presencia del inhibidor fosmidomicina. Con esta premisa, surge la pregunta de como se comporta DXS si se aumentan los niveles de los productos finales. Para esto, se añadirá 1-Deoxi-D-xilulosa a plantas silvestres, el cual es el producto de la reacción de condensación realizada por DXS, esperando que con esto se aumente el flujo de la vía para la producción de los compuestos finales, ya que DXS es una de las enzimas limitantes de la vía. En estos casos se realizará western blots contra DXS con el fin de observar diferencias en su acumulación, esperando que sucediera lo contrario que lo sucede con la fosmidomicina. Los resultados obtenidos de estos ensayos creemos que nos permitirán apoyar la relevancia fisiológica de la regulación postraduccional de DXS.

BIBLIOGRAFÍA

- Adam, P. et al. 2002. Biosynthesis of terpenes: studies on 1-hydroxy-2methyl 2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase. *Proc. Natl. Acad.Sci* 1-6
- Adam, Z. 2000. Chloroplast protease: Possible regulators of gene expression?. *Biochimie* **82**. 647-654.
- Alabadí, D. Blázquez, M.A. García-Martínez, J.L. 2004. Giberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol.* **134**. 1050-1057.
- Arigoni, D., et al. 1997. Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**. 10600-10605
- Arnold K., et al. 2006. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22,195-201.
- Bach, T. J. et al. 1999. Mevalonate biosynthesis in plants. *Critical Rev. Biochem. Mol. Biol.* **34**.107-122
- Bauer, J. 2000. The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis. *Nature.* **403**. 203-207
- Bouvier, F. et al. 1998. Dedicated roles plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits. *Plant Physiol.* **117**. 1423-1431.
- Braithwaite, G.D. Goodwin, T.W. 1960. Studies in carotenogenesis. 25. The incorporation of [1-¹⁴C]acetate, [2-¹⁴C]acetate and ¹⁴CO₂ into lycopene by tomato slices. *Biochem. J.* **76**. 1-5.
- Buchanan, B.B. Gruissem, W. Jones, R.L. 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. USA.
- Carretero-Paulet, L. et al. 2004. Expression and molecular analysis of the *Arabidopsis* DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Phys.* **129**. 1581-1591.

- Cordoba, E. Salmi, M. León, P. 2009. Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. *Journal of Experimental Botany* **60**. 2933-2943.
- Crowell, D. Huizinga, D. 2008. Protein isoprenylation: the fat of the matter. *Trends in Plant Science* **14**. 163-170
- Cunningham, F. Grant, E. 2000. Identification of multi-gene families encoding isopentenyl diphosphate isomerase in plants by heterologous complementation in *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol.* **41**. 119-123
- Estévez J.M. *et al.* 2000. Analysis of the expression of *CLA1*, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-derythritol-4-phosphate pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology* **124**, 95–104.
- Estévez, J.M. *et al.* 2001. 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *The Journal of Biological Chemistry* **276**. 22901-22909.
- Finkemeier, I. *et al.* 2011. Proteins of diverse function and subcellular location are lysine acetylated in Arabidopsis. *Plant Physiology*. **155**. 1779-1790
- Flores-Pérez, U. *et al.* 2008. A mutant impaired in the production of plastome-encoded proteins uncover a mechanism or the homeostasis of isoprenoid biosynthetic enzymes in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **20**. 1303-1315.
- Goldstein, J. L. and Brown, M. S. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Science* **343**. 425-430
- Guevara-Garcia, A. *et al.* 2005. Characterization of the Arabidopsis *clb6* mutant illustrates the importance of posttranscriptional regulation of the methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Cell*. **17**. 628-643.
- Gutierrez-Nava, M.L. 2004. CHLOROPLAST BIOGENESIS Genes Act Cell and Noncell Autonomously in Early Chloroplast Development. *Plant Physiology*, **135**. 471–482.
- Herz, S. *et al.* 2000. Biosynthesis of terpenoids: YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl 2-C-methyl-D-erythritol 2-phosphate to 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate. *Proc. Natl. Acad.Sci.* **97**. 2486-2490.

- Hill, R.E. Sayer, B.G. Spenser, I.D. 1989. Biosynthesis of vitamin B6: incorporation of 1-deoxyxylulose. *J. Am. Chem. Soc.* **111**. 1916-1917
- Holstein, S.A. Hohl, R.J. 2004. Isoprenoids: Remarkable diversity of form and function. *Lipids*. **39**. 293-309.
- Koussevitzky S, et al. 2007. An *Arabidopsis thaliana* virescent mutant reveals a role for ClpR1 in plastid development. *Plant Molecular Biology* **63**, 85–96.
- Kwon, et al. 2006. Proteomic studies of post-translational modifications in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**. 1547-1551
- Kuzumaya, T. et al 1998. Direct formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate from 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate by 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, a new enzyme in the non-mevalonate pathway to isopentenyl diphosphate. *Tetrahedron Letters*. **39**. 4509-4512.
- Landy, A. (1989). Dynamic, structural and regulatory aspects of Lambda site-specific recombination. *Ann. Rev. Biochem.* **58**. 913-949.
- Lange, B. M. et al. 1998. A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**. 2100-2104
- Lange, B. M. et al. 2000. Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **24**. 13172-13177
- Larkin R.M. et al. 2003. GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signaling. *Science* **299**. 902–906
- Leon, P. Arroyo, A. Mackenzie, S. 1998. Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**. 453–80
- León, P Guevara-García, A.A. 2007. El cloroplasto: un organelo clave en la vida y el aprovechamiento de las plantas. En *Una ventana al quehacer científico*. UNAM. 215-230 pp

- Lichtenthaler, H.K. et al. 1997. Biosynthesis of isoprenoids in higher plants chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Letters*. **400**. 271-274
- Lois, L. et al. 1998. Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of 1-D-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**. 2105-2110
- Lüttgen, H. et al. 2000. Biosynthesis of terpenoids: YchB protein of *Escherichia coli* phosphorylates the 2-hydroxy group of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**. 1062-1067
- Mandel, M.A. et al. 1996. CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant J* **9**. 649-658
- Meinke, D.W. 1998. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*. **282**. 679-682.
- Olinares, P.D. Kim, J. van Wijk, K.J. 2011. The Clp protease system, a central component of the chloroplast protease network. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1807**. 999-1011.
- Page, J.E. 2003. Functional analysis of the final steps of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) pathway to isoprenoids in plants using virus-induced gene silencing. *Plant Physiol.* **134**. 1401-1413
- Parmryd, I. et al. 1999. Protein prenylation in spinach chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**. 10074-10079.
- Querol, J. et al. 2002. Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* GCPE protein involved in plastid isoprenoid biosynthesis. *FEBS Letters*. **514**. 343-346
- Roberts, S.C. 2007. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nature Chemical Biology* **3**. 387-395.
- Rodriguez-Concepcion, M. et al. 2001. 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. *Plant Journal*. **27**. 213-222

- Rohdich, F. et al. 1999. Cytidine 5-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbB protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl 2-C-methylerythritol. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**. 11758-11763.
- Rubio, V. et al. 2005. An alternative tandem affinity purification strategy applied to Arabidopsis protein complex isolation. *The Plant Journal* **41**. 767-778.
- Sauret-Güeto, S. et al. 2006. Plastid cues posttranscriptionally regulate the accumulation of key enzymes of the methylerythritol phosphate pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology* **141**. 75-84.
- Schaller, H. et al. 1995. Expression of the *Hevea brasiliensis* (H.B.K.) Mull. Arg. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzymeA reductase1 in tobacco results in sterol overproduction. *Plant Physiol.* **109**. 761-770.
- Schwender, J. et al. 1999. Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*. **455**. 140-144.
- Schulte, A. E. et al. 2000. Mevalonate kinase activity in *Chatarantus roseus* plants and suspension cultured cells. *Plant Sci.* **150**. 59-69
- Sprenger, G. A. et al. 1997. Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor of isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**. 12857-62.
- Stael, S. 2011. Protein N-acylation overrides differing trageting signals. *FEBS Letters*. **585**. 517-522
- Takahashi, S. et al. 1998. A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D_erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**. 9879-9884.
- Van der Hoorn R.A.L. 2008. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **59**. 191-223.
- Waters, M.T. Langdale. 2009. The making of the chloroplast. *The EMBO Journal* **28**. 2861–2873.

- Wolf, M. et al. 2002. Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway. (E)-4-hydroxy 3-methylbutenyl 2-diphosphate: chemical synthesis and formation from methylerythritol cyclodiphosphate by cell-free system from *Escherichia coli*. *Tetrahedron Letters*. **43**. 2555-2559.
- Xiang, S, et al. 2006. Crystal Structure of 1-Deoxy-D-xylulose 5-Phosphate Synthase, a Crucial Enzyme for Isoprenoids Biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry* **282**. 2676-2682.
- Yoo, S.D. Cho, Y.D. Sheen, J. 2007. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc*. **2**. 1565-1572.
- Yoshioka, M. Yamamoto, Y. 2011. Quality control of photosystem II: Where and how does the degradation of the D1 protein by FtsH proteases start under light stress?- Facts and hypotheses. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. **104**. 229-235
- Yu, F. et al. 2007. Variegation mutants and mechanisms of chloroplast biogenesis. *Plant, Cell and Environment* **30**. 350–365.

Apéndices I: Soluciones y Medios

Medios de cultivo para plantas y bacterias

Medio GM (1 L)

Murashige y Skoog	4.31 g
MES	0.5 g
Vitamina B5	1 ml
Sacarosa	10 g
Phytagar 0.8%	2 g

Medio GM líquido (1 L)

Murashige y Skoog	4.31 g
MES	0.5 g
Vitamina B5	1 ml
Sacarosa	

Llevar a 1 L con agua destilada

Medio de infiltración (1 L)

Murashige y Skoog (0.5%)	5 g	
Vitamina B5	100 µl	
Sacarosa (50%)		50 g
MES	0.5 g	
Silwet L-77 (0.02%)	200µl	

Medio LB (Luria-Bertoni) (1 L)

Peptona		10 g
Extracto de levadura	5 g	
NaCl	10 g	

Para medio sólido añadir 3.75 g de Agar

Soluciones para Northern blot

Buffer de carga de RNA

Formamida	150 µl
Formaldehído (37%)	56.8 µl
MOPS 10X	30 µl

Colorante azul de bromofenol y azul de xilencianol
EtBr

MOPS 1X (1 L)

MOPS	41.86 g
Acetato de sodio	4.1 g
EDTA (0.5M, pH8)	20 ml

Ajustar a pH 7 con NaOH

SSC 20X (1 L)

NaCl 52.9 g

Citrato de sodio 26.4 g

Disolver en 800 ml de H₂O destilada, ajustar pH 7 con NaOH, aforar a 1 L.

Solución de prehibridación (100 ml)

NaH₂PO₄ (1M, pH7.2) 52 ml

SDS 20% 32 ml

EDTA (0.5M, pH8) 102.5 µl

BSA 1 g

Solución para teñir la membrana

Acetato de sodio (0.5 M, pH5.2)

Azul de metileno 0.03%

Soluciones de lavado

SSC 2X – SDS 0.1%

SSC 0.5X – SDS 0.1%

SSC 0.1X – SDS 0.1%

SDS-Page

Gel de poliacrilamida 10% (10 mL):

Mezcla de acrilamida 30% 3.3 mL

Tris/glicina 1.5 M (pH 8.8) 1.3 mL

SDS 10% 0.05 mL

Persulfato de sodio 10% 0.05 mL

TEMED (Tetrametil Etil N-Diamina) 0.02 mL

En agua destilada.

Gel concentrador para gel de poliacrilamida (2 mL):

Mezcla de acrilamida 30% 0.33 mL

Tris/glicina 1 M (pH 6.8) 0.25 mL

SDS 10% 0.02 mL

Persulfato de sodio 10% 0.02 mL

TEMED 0.001 mL

En agua destilada.

Mezcla de acrilamida 30%:

Acrilamida 29.2%

N,N'-metilen-bis-acrilamida 0.8%

En agua destilada.

Laemmli 2x (20 ml)

Tris 1M pH 6.8 3 ml

SDS 10% 8 ml

Glicerol 4 ml

β -mercaptoetanol 2 ml

Adicionar azul de bromofenol

Buffer de corrida para geles de proteínas 10X (1 L)

Tris 30.2g

Glicina 144g

SDS 10g

Filtrar con papel whatmann

Azul de Coomasie

Metanol 40%

Ácido acético 7%

Coomasie blue R-250 0.25%

(Disolver primero el Coomasie en metanol y ác. acético)

Solución para desteñir

Metanol 50%

Ácido acético 10%

Soluciones para Western blot**Buffer de transferencia (2 L)**

Tris 6g

Glicina 28.8g

Metanol 400 ml

PBS 10X (500 ml)

NaH_2PO_4 2.28g

Na_2HPO_4 11.5g

NaCl 43.84g

Ajustar a pH 7.4

Ponceau's:

Ponceau's 0.2%

Ácido acético 1%

En agua destilada.

Soluciones para obtención de protoplastos

Solución enzimática

Celulasa	1%
Macerozima	0.4%
Manitol	0.4 M
KCl	20 mM
MES	20 mM

Calentar a 55°C por 10 minutos para inactivar proteasas, posteriormente agregar:

CaCl ₂	10 mM
Mercaptoetanol	5 mM
BSA	0.1%

Solución W1

Manitol	0.5 M
MES	4 mM
KCl	0.02 M

Solución W5

NaCl	0.154 M
CaCl ₂	0.125 M
KCl	0.005 M
MES	2 mM

Solución MMg

Manitol	0.4 M
MgCl ₂	0.015 M
MES	4 mM

Solución PEG/Ca

PEG4000	40%
Manitol	0.2 M
CaCl ₂	100 mM

Extracción de DNA de Arabidopsis

CTAB buffer

Bromuro de cetiltrimetilamonio 2%w/v
1.4 M NaCl
100mM Tris HCl pH8.0
20 mM EDTA

TAE 1X (1 L)

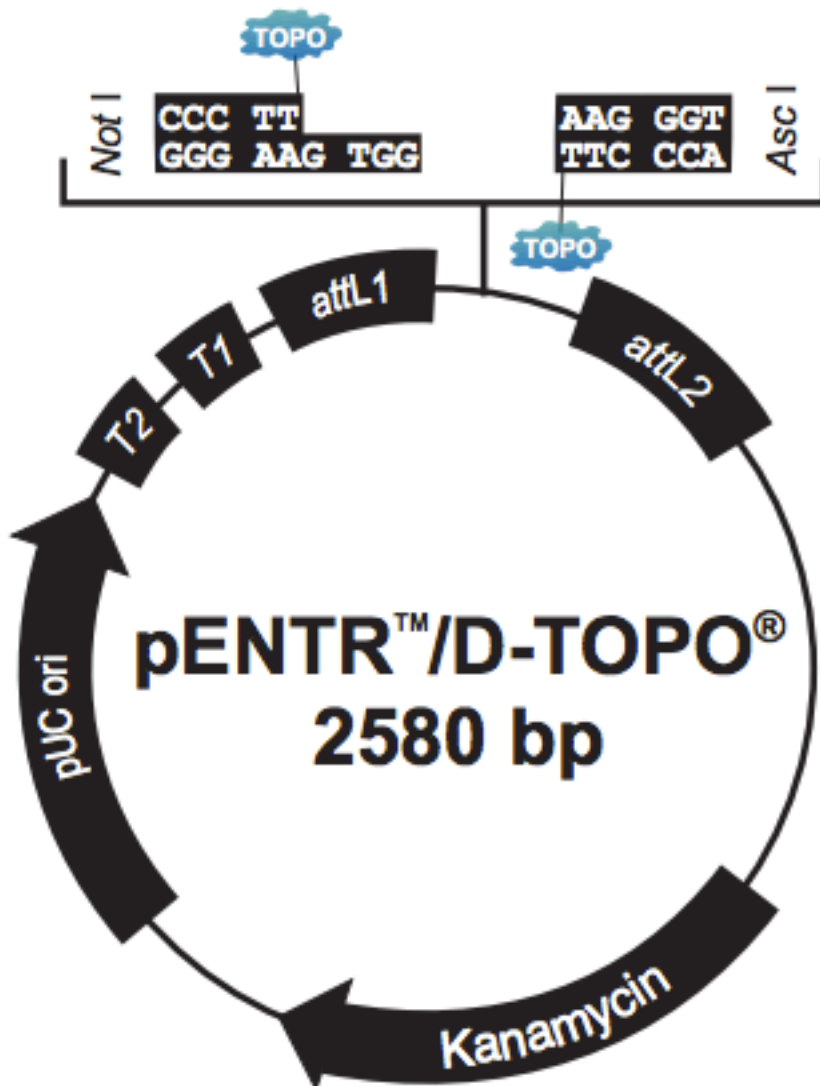
TAE 50X	20 ml
Tris base	242g
Ácido acético	57 ml
EDTA 0.5M pH	100 ml

Buffer T₁₀ E₁ (TE):

Tris HCl pH8	10mM
EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético)	1 mM
Ajustar a pH 8	
En agua destilada.	

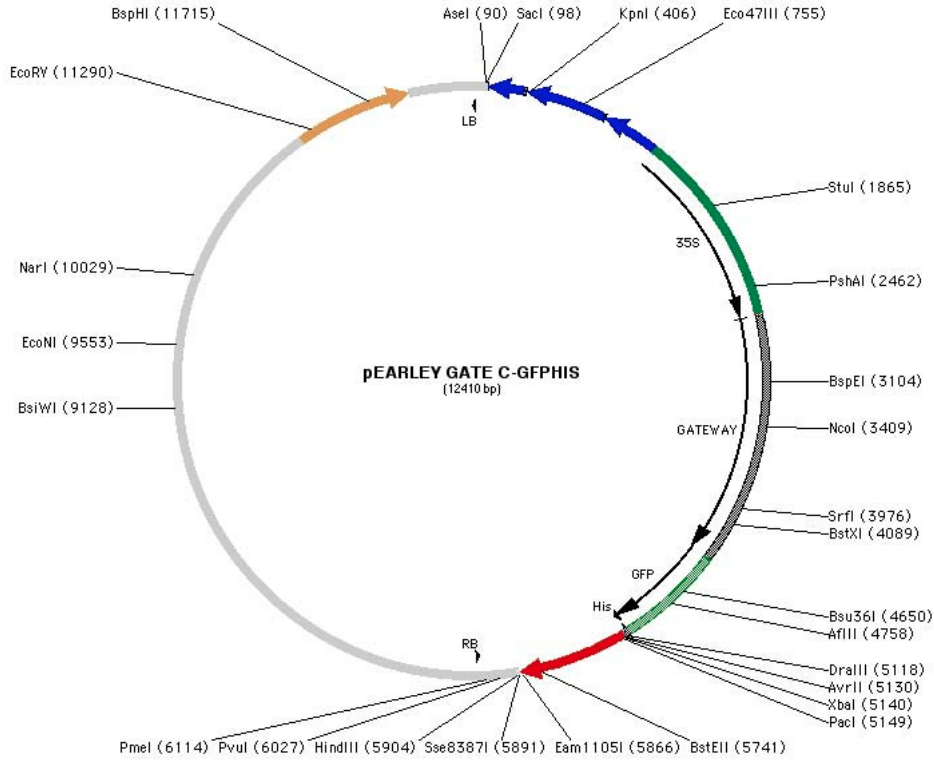
Apéndice II: Mapas de los vectores utilizados

- pENTR/D TOPO:



- pEarlyGate 103:

Resistencia a Kanamicina



- pC-TAP a:

Resistencia a gentamicina



Apéndice III: Lista de oligonucleótidos utilizados

Nombre	Secuencia (5'-3')	Observaciones
Cla ATG5'	cac cat ggc ttc ttc tgc	Amplifica <i>cla1</i> en el extremo 5'
Cla1159	ttt gaa ctg tct acc cgt tgc	Amplifica 3' para la construcción DXS1159
Cla1726	aat tct acc ttt ccc aat ctc	Amplifica e 3' para la construcción DXS1726
ClaRNSTP	cag agc ttc cct tgg tgc ac	Amplifica 3' para la construcción de DXS completa
415	gcc cat caa ctg gac caa tat ag	Amplifica 3' para la sonda de <i>cla1</i>
M13Rv	cag gaa aca gct atg acc	Para corroborar inserto en el vector de entrada
M13Fw	gta aaa cga cgg cca	Para corroborar inserto en el vector de entrada