

00591

2



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MÉXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

**“LA PARTICIPACIÓN DEL GEN *CLA1* EN LA SÍNTESIS
DE ISOPRENOIDES, A TRAVÉS DE LA VÍA 2C-METIL-
D-ERITRITOL 4-FOSFATO EN *Arabidopsis thaliana*”**

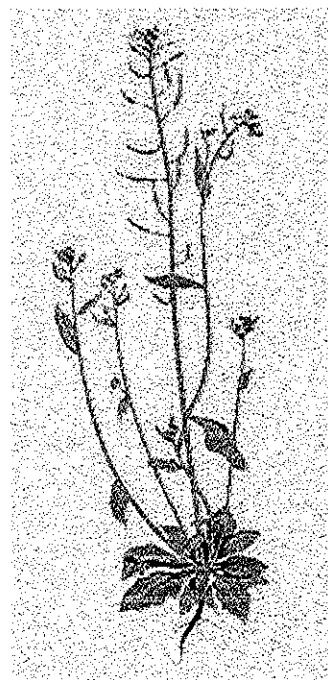
T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

Biólogo

JUAN MANUEL ESTÉVEZ PALMAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Cuernavaca Morelos, Septiembre 2002.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.



Instituto de Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

Juán Manuel Estévez Palmas
P r e s e n t e .

Por este conducto me permito informarle que la Comisión Académica acordó asignarle el siguiente jurado de examen para obtener el grado de Doctor en Ciencias.

Presidente:	Dr. Federico Sánchez Rodríguez
Secretario:	Dra. Patricia León Mejía
Vocal:	Dra. Georgina Hernández Delgado
Vocal:	Dr. David Romero Camarena
Vocal:	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Suplente:	Dr. Lorenzo Patrick Segovia
Suplente:	Dr. Mario Rocha Sosa

Sin mas por el momento me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuernavaca, Mor. a 12 de julio de 2001

Dr. Baltazar Becerril Luján
Coordinador de Docencia



TELS. (52) 56 22 76 00 TELS (7) 329 16 00 FAX. 317 23 88
APDO 510-3, CUERNAVACA, MORELOS 62250, MEXICO

DEDICATORIA

*Porque simplemente todo se lo debo a mis abuelos,
dedico esta tesis al hombre que más admiro, al Sr.*

**Tereso
Fuentes**

Estévez

y a la memoria de la Sra.

**Albertina Gutierrez
de Estévez†**

AGRADECIMIENTOS

*A todas aquellas personas que me han ayudado,
simplemente gracias.*

Juan Manuel Estévez Palmas

ÍNDICE GENERAL

Paginas

Resumen	I
Abstract	III
Lista de abreviaturas	V
1.- INTRODUCCIÓN	1
• Aspectos generales de los isoprenoides (terpenoides)	1
• Biosíntesis de los isoprenoides	4
- La vía del mevalonato (MEV)	4
Descubrimiento de la víaMEV	4
Incongruencias de la vía Mev	5
Intermediarios, enzimas y genes de la vía Mev	5
- La vía del 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP)	7
Descubrimiento de la vía MEP en eubacterias	7
Descubrimiento de la vía MEP en algas y plantas	11
Intermediarios, enzimas y genes de la vía MEP	13
• Biosíntesis de isoprenoides en plantas	19
-Localización de la vía MEP en los plástidos	19
-Comunicación entre las vías mevalonato y MEP	20
• Distribución de las vías mevalonato y MEP en la naturaleza	22
2.- ANTECEDENTES	25
• La mutante <i>cla1-1</i>	25
• El gen <i>CLA1 (DXS1)</i>	25
• La enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS)	28
3.- OBJETIVOS	31
4.- METODOLOGÍA ADICIONAL	32
5.- RESULTADOS	34
• Artículos publicados	34
-Estévez y cols. (2000) Plant Physiol. 124. 95-103	
-Estévez y cols. (2001) J. Biol. Chem. 276 (25), 22901-22909	
• Resultados adicionales	35
- Caracterización del gen <i>CLA1</i> de <i>A. thaliana</i>	35
La proteína DXS1 es importada a plástidos	

- Caracterización de la región regulatoria <i>CLA1</i> Construcción de fusiones traduccionales y generación de plantas transgénicas	35
- Manipulación de los niveles de la enzima DXS1 Contenido de ácido abscísico en semillas transgénicas	37
- Análisis de la vía MEP en el genoma de <i>A. thaliana</i> Secuencias homólogas al gen <i>CLA1</i>	39
6.- DISCUSIÓN	43
- El gen <i>CLA1</i> codifica la enzima DXS1 de <i>A. thaliana</i> .	43
- Expresión espacial y temporal del gen <i>CLA1</i>	44
- La DXS1 es una enzima limitante en la vía MEP	45
- Genes de la vía MEP en el genoma de <i>A. thaliana</i>	48
7.- CONCLUSIONES	50
8.- PERSPECTIVAS	51
9.- BIBLIOGRAFÍA	53

Resumen

El descubrimiento de la vía 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), ha conducido a replantear la biosíntesis de isoprenoides en bacterias, algas y plantas. Ahora se sabe que en la célula vegetal hay dos rutas para la biosíntesis de isoprenoides: la vía mevalonato en el citoplasma y la vía MEP en plástios, a través de la cual se sintetizan hormonas, vitaminas, pigmentos fotosintéticos, etc. En esta nueva ruta, el paso inicial es la conversión de piruvato y gliceraldehído 3-fosfato en el compuesto 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato, reacción catalizada por la enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS).

Debido al papel central de la vía MEP en la vida de las plantas, es importante estudiar la regulación de la expresión de sus genes para un mejor entendimiento de su biosíntesis. En nuestro grupo se aisló la mutante albina de *Arabidopsis*, llamada *cla1-1*. La mutación en el gen *CLA1* provocó alteraciones en el contenido de isoprenoides plásticos, así como en el desarrollo de los cloroplastos y etioplastos. La gran similitud entre las proteínas *CLA1* y *DXS*, sugirió que *CLA1* podría tener una función importante en la vía MEP.

En este trabajo se reporta que el gen *CLA1* codifica la enzima *DXS1*. Esta actividad se demostró a través de la complementación del fenotipo de la mutante *cla1-1*, con el compuesto 1-desoxi-D-xilulosa, así como por ensayos enzimáticos realizados con la proteína recombinante *CLA1*. Estudios de expresión transitoria hechos en protoplastos demostraron que la *DXS1* (*CLA1*) es importada a cloroplastos, hecho congruente con la localización de la vía MEP en estos organelos. El patrón de expresión espacial y temporal del gen *DXS1* (*CLA1*) fue analizado a nivel de RNAm y proteína, así como mediante ensayos histoquímicos usando una fusión con la región regulatoria (*CLA1::GUS*). Los resultados mostraron que *DXS1* es expresado en la mayoría de los tejidos de la planta y durante todo su ciclo de vida, aunque los niveles máximos de expresión fueron detectados en tejidos jóvenes. Estos datos sugieren una regulación tejido-específico y por desarrollo. Para identificar regiones 5' importantes en la expresión espacial y temporal del gen *DXS1*, se generaron deleciones progresivas de la región regulatoria. Aquí se reportan las fusiones generadas y la obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis*. Para explorar la participación de la *DXS1* en la biosíntesis de isoprenoides plásticos, los niveles de esta enzima fueron incrementados o disminuidos en plantas transgénicas de *Arabidopsis*. En comparación con plantas silvestres, las líneas transgénicas sobreexpresoras incrementaron el contenido de productos finales, tales como clorofilas, tocoferoles, carotenoides, ácido abscísico y giberelinas. En contraste, plantas con niveles reducidos de *DXS1* tuvieron cantidades menores de estos productos. Fenotípicamente, las plantas transgénicas tuvieron ligeras alteraciones en el crecimiento y germinación. Los cambios en los niveles de la enzima *DXS1* correlacionaron con el contenido de los isoprenoides plásticos analizados, este hecho demostró que dicha enzima cataliza uno de los pasos limitantes en la producción de IPP plástico, y por lo tanto de isoprenoides en plantas.

La secuenciación completa del genoma de *A. thaliana*, ha revelado la presencia de una secuencia con gran similitud a *DXS1 (CLA1)*. Esto sugiere que en Arabidopsis, la enzima DXS podría ser codificada por más de un gen, como se ha demostrado en otros organismos.

Abstract

The identification of 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway has led to a complete reappraisal of isoprenoid biosynthesis in many organisms. It is now clear that plant cells contain two pathways for biosynthesis of isoprenoids: the cytoplasmic mevalonate pathway and the MEP pathway, which leads for the biosynthesis of plastidic isoprenoids. In the MEP pathway the initial step is the formation of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) by condensation of piruvate and glyceraldehyde 3-phosphate catalyzed by 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS). Due to the role of MEP pathway for plants life, it is important to analyze the regulation of their genes, for a better understanding of its biosynthesis. In our group, an *Arabidopsis* mutant designated as *cla1-1* was previously reported. *cla1-1* mutant shows an early arrest of chloroplast development and it lacks chlorophyll and carotenoid pigments. The *CLA1* gene exhibits sequence similarity to genes encoding for the DXS. This suggested that *CLA1* gene could encode a DXS.

The aim of this thesis was to study the role of the *CLA1* gene in the MEP pathway of higher plants. We demonstrated that *CLA1* gene encodes an active DXS. The enzymatic activity was demonstrated by an *in vivo* complementation, in which the addition of 1-deoxy-D-xylulose rescues the albino phenotype of the *cla1-1* mutant. Also *in vitro*, it was shown that a recombinant *CLA1* protein is able to transform labeled piruvate and glyceraldehyde-3P to DXP. To determine the localization of DXS1 (*CLA1*) in the plant cell, a transiently assay was used where an expressed green fluorescent protein fused with the DXS1 transit peptide was transformed into tobacco protoplasts. This fusion protein was localized within the chloroplasts, which demonstrates that DXS1 is localized in plastids.

We analyzed the expression pattern of *CLA1* gene at mRNA and protein levels as well as by histochemical analyses of GUS (gene driven from the *CLA1* promoter in transgenic plants). Accordingly with the transcript and protein expression data, histochemical analysis demonstrated that *CLA1* is widely expressed throughout the *Arabidopsis* plant but higher expression levels are found in the young tissues, suggesting a tissue-specific and developmental regulation. To identify *cis*-acting elements involved in the *CLA1* gene regulation, several 5' fragments were used to generate translational fusions with the GUS reporter gene. These fusions were used to generate transgenic plants. In order to explore the role of DXS within the plastidic isoprenoid biosynthesis, the DXS enzyme levels were increased or decreased in transgenic *Arabidopsis* plants. Compared with wild-type plants, transgenic lines overexpressing DXS had increased levels of several isoprenoids final products, such as chlorophylls, tocopherols, carotenoids, abscisic acid and gibberellins. Moreover, plants with suppressed levels of DXS had decreased amounts of all of these products. Phenotypically, the transgenic plants had slight alterations in growth and germination rates. Alterations in DXS levels lead to changes of various isoprenoid end products demonstrating that this enzyme catalyzes one of the rate-limiting steps in the production of plastidic IPP and, therefore, of isoprenoids in higher plants.

A search of the *A. thaliana* genome database using the *CLA1* gene as query, revealed the presence of one additional sequence that had strong homology with *CLA1*. This suggests that in Arabidopsis the DXS could be encoded by more than one gene.

Lista de abreviaturas

Nota: las siglas de las abreviaturas en este trabajo, se mantuvieron en el idioma original (inglés o español).

ABA	Ácido abscísico
AACT	Acetoacetil-CoA tiolasa
ATP	Adenosin trifosfato
CaMV35S	Promotor del virus del mosaico de la coliflor
CMEC	4-difosfocitidil 2C-metileritritol cinasa
CMES	2C-metil-D-eritritol 4-fosfato sintasa
Co ²⁺	Cobalto
CoA	Citidil trifosfato
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DPMC	5-difosfomevalonato descarboxilasa
DX	1-desoxi-D-xilulosa
DXP	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato
DXR	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa
DXS	1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa
GA3-P	Gliceraldehído 3-fosfato
GAs	Giberelinas
GFP	Proteína verde fluorescente
GUS	β-glucoronidasa
HMB-PP	1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato
HMGR	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa
HMGS	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa
IPP	Isopentenil difosfato
IPPI	Isopentenil difosfato isomerasa
KDa	Kilodaltones
MC	Mevalonato cinasa
MECS	2C-metileritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa
MEP	2C-metil-D-eritritol 4-fosfato
Mg ⁺²	Magnesio
Mn ⁺²	Manganeso
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato (forma reducida)
NOS	Sitio de poliadenilación de la enzima nopalina sintasa
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PMC	5-fosfomevalonato cinasa
PTP	Péptido de transporte a plástidos
RBCS	Subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa
IPP	Tiamin difosfato
XC	Xilulosa cinasa

INTRODUCCION

ASPECTOS GENERALES DE LOS ISOPRENOIDES (TERPENOIDES)

El nombre terpenoide o terpeno surge cuando los primeros miembros de la familia fueron aislados del turpentino (terpentin, en alemán). El turpentino es una mezcla de compuestos orgánicos (en su mayoría terpenoides) producido por algunas especies de pinos como *Pistacia terebinthus*. En 1914 se descubrió que el turpentino, así como otros aceites esenciales de plantas podían ser disectados en moléculas de cinco carbonos, cuya estructura está basada en un esqueleto isopentano (Figura #1). Estos monómeros por su similitud con la estructura del gas isopreno fueron llamados unidades isopreno (Figura #1). Por esta razón los terpenoides son comunmente llamados isoprenoides, aunque cabe destacar que el isopreno *per se* no es precursor biológico de los terpenoides.

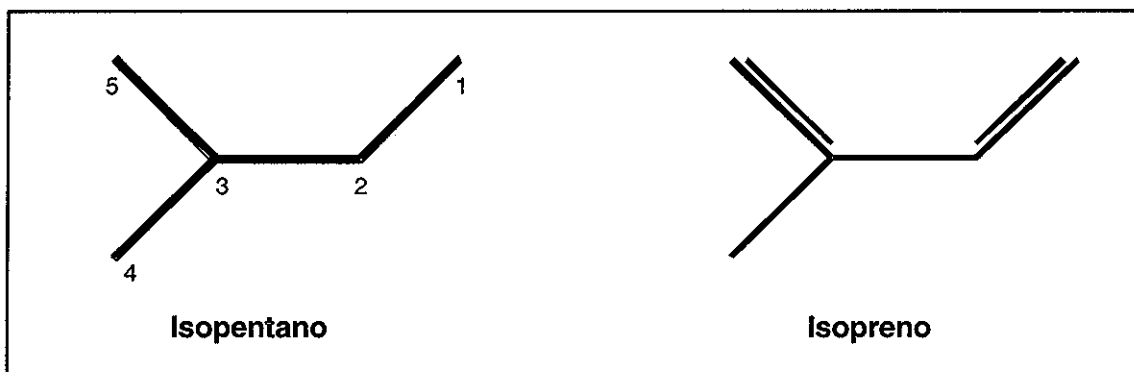


Figura #1. Estructura del isopentano e isopreno. Estas estructuras representan la unidad básica de los isoprenoides. Los números indican la posición de los carbonos.

Estudios posteriores sobre la estructura de los terpenoides condujeron a Wallach y Ruzicka a formular la "regla del isopreno", la cual establece que todos los terpenoides son formados estructuralmente por fusiones repetitivas de unidades isopreno (Ruzicka, 1953). Con el establecimiento de la "regla del isopreno", los isoprenoides fueron clasificados en base al número de unidades isopreno presentes en su estructura (Tabla #1). Cabe señalar que algunos isoprenoides no cumplen con la "regla del isopreno". Por ejemplo, existen esteroides (triterpenos) con 27, 28 o 29 carbonos en su estructura. Algunas giberelinas (diterpenos) son formadas por 19 carbonos. La modificación en el número de carbonos es debido a que el esqueleto original de la unidad isopreno puede presentar rearrreglos.

Los isoprenoides están presentes en todos los organismos. Estos compuestos constituyen uno de los grupos más grande de productos naturales, agrupando actualmente alrededor de 30,000 compuestos diferentes en estructura y función (Sacchettini y Poulter, 1997; McGarvey y Croteau, 1995). De todos los organismos, las plantas producen la mayor diversidad de isoprenoides (aproximadamente 25,000).

Muchos de estos compuestos, además de ser centrales para su crecimiento y desarrollo, tienen un valor importante por sus aplicaciones biotecnológicas (Barkovich y Liao, 2001). En la tabla#1 se muestran ejemplos de las funciones y aplicaciones biotecnológicas de los isoprenoides.

Tabla#1. Clasificación, funciones y aplicaciones biotecnológicas de los isoprenoides.

ISOPRENOIDES

HEMITERPENOS (C₅)

El **isopreno** es un gas emitido por algunas especies de árboles. Se ha propuesto que el isopreno protege a los tilacoides del daño provocado por condiciones de altas temperaturas (Logan y cols., 2000).

MONOTERPENOS (C₁₀)

La mayoría de los monoterpenos son producidos por plantas con aromas (Mahmoud y Croteau, 2002). Estos compuestos están involucrados en la atracción de polinizadores (ej. **linalool**), alelopatía y en defensa de las plantas (ej. **Limoneno**, **pineno** y **mircenol**) y en la interacción planta-planta (Mahmoud y Croteau, 2002). En la industria los monoterpenos son usados como saborizantes y fragancias (ej. **limoneno**, **mentol**, **geraniol** y **citronelol**). El **farnesol**, el **geraniol** y el **limoneno** son considerados como posibles agentes contra el cáncer (Crowell, 1999).

SESQUITERPENOS (C₁₅)

El **capsidiol** es una fitoalexina (solo algunas fitoalexinas son de origen isoprenico) sintetizada por algunas plantas en respuesta al ataque de patógenos (Whitehead y cols., 1989). El **Ácido abscísico (ABA)** es una hormona producida en todos los organismos fotosintéticos y en algunas especies de hongos patógenos de plantas. En plantas superiores, el ABA está involucrado en el desarrollo y maduración de la semilla, así como en la respuesta al estrés ambiental (Cutler y Krochko, 1999). La **Artemisinina** (producido por la planta *Artemisia annua*) ha sido considerada en la medicina por tener actividad antimalárica (Frederich y cols., 2002).

DITERPENOS (C₂₀)

El **Fitol** es componente estructural de las clorofilas y los tocoferoles. Estas moléculas son constituyentes esenciales del aparato fotosintético en todos los organismos fototróficos (Bramley y cols., 2000). Las **giberelinas (GAs)** son hormonas producidas por plantas y algunas especies de hongos y bacterias. En plantas, las GAs juegan un papel importante en la germinación de la semilla, en la elongación del tallo y en el desarrollo de la flor (Yamaguchi y Kamiya, 2000; Yamaguchi y Kamiya, 2001). Las GAs tienen una aplicación en la agricultura, ya que el crecimiento de algunos cultivos es manipulado mediante inhibidores de la biosíntesis de giberelinas, o a través de GAs que promueven el crecimiento. La manipulación genética de las GAs ha sido un punto importante para modificar el crecimiento de plantas de importancia agronómica (Eriksson y cols., 2000). El **casbeno** (producido por la planta *Ricinus*

communis) tiene actividad antibacteriana y antifúngica (Barkovich y Liao, 2001). El **paclitaxol o taxol** (obtenido de árboles del género *Taxus*) es utilizado como una de las principales drogas contra el cáncer (Blagosklonny y Fojo, 1999). El **α -tocoferol (vitamina E)** es importante en la alimentación humana ya que previene al tejido del daño provocado por radicales libres, involucrados en varias enfermedades degenerativas. Dada su importancia, se están desarrollando estrategias para aumentar el contenido de vitamina E en plantas (Shintani y DellaPenna 1998; Hirschberg, 1999).

TRITERPENOS (C₃₀)

Los **brasioesteroides** son hormonas involucrados en procesos fisiológicos y de desarrollo de las plantas (Bishop y Koncz, 2002). Los **esteroles** actúan como estabilizadores de la membrana celular en la mayoría de los organismos eucariotes, además son precursores para hormonas esteroideas y ácidos biliares en vertebrados (Edwards y Ericsson, 1999). Los **hopanoides** actúan como estabilizadoras de la membrana celular en la mayoría de las bacterias (Jürgens y col., 1992).

TETRAITERPENOS (C₄₀)

Los tetraterpenos mejor conocidos son los carotenoides (Hirschberg, 2001). Los carotenoides son sintetizados por plantas y algas, así como algunas especies de bacterias y hongos. En plantas, su función es actuar en la captación de luz y en la prevención del daño fotooxidativo de los cloroplastos (ej. **xantofilas**). También estos compuestos están implicados en la atracción de polinizadores. En la industria los carotenoides son utilizados como colorantes para alimentos y como cosméticos. Los carotenoides son importantes para la salud humana. El **β -caroteno (pro-vitamina A)** es crucial para la visión. Dada su importancia, los niveles de este compuesto han sido incrementados por ingeniería genética en semillas de arroz y canola, y en frutos de jitomate (Ye y cols., 2000; Shewmaker y cols., 1999; Rohmer y cols., 2000). También el **β -caroteno** y el **Licopeno** están asociados con la prevención de varias enfermedades degenerativas, incluyendo el cáncer (Giovannucci, 1999). La expresión del gen *crtl* (involucrado en la biosíntesis de carotenoides de la bacteria *Erwinia uredovora*) en plantas conduce a la tolerancia del herbicida norflurazon (Misawa y cols., 1994).

POLITERPENOS (C_{40+n})

La **plastoquinona** y la **ubiquinona** funcionan como acarreadores para el transporte de electrones en la fotosíntesis y respiración respectivamente (McGarvey y Croteau, 1995). Los **dolicoles** participan como acarreadores de azúcares en la glicosilación de proteínas en organismos eucariotes (Chojnacki y cols., 2001). Los **undecaprenoles** funcionan como acarreadores de lípidos en la síntesis de la pared celular en bacterias (Chojnacki y cols., 2001). El **hule** (obtenido de la planta *Hevea brasiliensis*) es un polímero utilizado en la industria para la elaboración de más de 40,000 productos diferentes (Mooibroek y Cornish, 2000)

BIOSÍNTESIS DE LOS ISOPRENOIDES

Todos los isoprenoides hasta ahora conocidos, comparten en su biosíntesis dos moléculas de cinco carbonos (Figura #2), el isopentenil difosfato (IPP) y su isomero el dimetilalil difosfato (DMAPP). El número de unidades isopreno, diferentes tipos de reacciones enzimáticas (ej. ciclizaciones, oxidaciones reducciones, isomerizaciones e hidroxilaciones) y rearrreglos del esqueleto carbonado, son responsables de la gran diversidad de estructuras que presentan los isoprenoides. El uso de técnicas bioquímicas, moleculares y genómicas han permitido establecer claramente que el IPP, el DMAPP y la diversidad de isoprenoides son formados a través de dos vías metabólicas completamente diferentes: la vía del mevalonato (Mev) y la recientemente identificada vía del 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP).

LA VIA DEL MEVALONATO

Descubrimiento de la vía del mevalonato

El papel central de los isoprenoides, así como su diversidad estructural fueron razones importantes para iniciar las primeras investigaciones sobre la biosíntesis de estos compuestos. El año de 1956 marca el descubrimiento de la vía del mevalonato, cuando se identificó el ácido mevalónico (o mevalonato) y al mismo tiempo se demostró que este compuesto es incorporado en la biosíntesis de colesterol y ergosterol en células de hígado de rata y levaduras respectivamente. Estos resultados sugirieron que las unidades isopreno son formadas a partir del ácido mevalónico (Folkers y Wolf, 1956; Wolf y cols., 1956; Tavormina y cols., 1956a; Tavormina, y Gibbs, 1956b). Estudios subsecuentes sobre la biosíntesis de esteroides y triterpenos en células animales, levaduras y plantas permitieron elucidar las moléculas intermediarias en la formación de IPP y DMAPP (Bloch, 1992; Bach, 1995). Este nuevo esquema ahora es conocido como la vía del mevalonato (Figura #3).

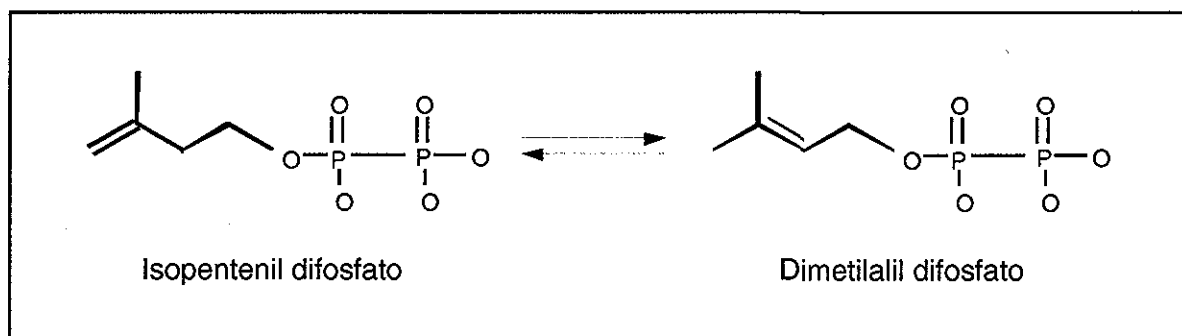


Figura #2. Estructura del isopentenil difosfato (IPP) y el dimetilalil difosfato (DMAPP). Intermediarios comunes en la biosíntesis de isoprenoides. Las flechas indican que el IPP y el DAMPP pueden interconvertirse.

Incongruencias de la vía del mevalonato

Desde su descubrimiento la vía mevalonato fue aceptado universalmente como la vía de biosíntesis de todos los isoprenoides en los diferentes organismos. Sin embargo, el papel del mevalonato como precursor de todos los isoprenoides fue cuestionado, ya que varios resultados obtenidos de experimentos hechos con células vegetales no podían ser explicados con las bases de la vía del mevalonato. Las primeras incongruencias reportadas fueron observadas en protoplastos de maíz, zanahoria y tomate, donde se encontró que el [¹⁴C]-mevalonato era incorporado pobremente en isoprenoides plastídicos como β-caroteno, fitol y plastoquinona-9. En contraste, el [¹⁴C]-MEV era incorporado eficientemente en esteroides, los cuales son formados en el citoplasma (Goodwin, 1958a; Goodwin, 1958b; Braithwaite y Goodwin, 1960a; Braithwaite y Goodwin, 1960b). Estudios posteriores hechos con varias especies de plantas, mostraron que el antibiótico mevinolina (inhibidor específico de la HMG reductasa, enzima que forma el mevalonato) inhibía eficientemente la biosíntesis de fitoesteroides, pero no afectaba la formación de las clorofilas y carotenoides (Bach y Lichtenthaler, 1982). Otros experimentos también mostraron que los compuestos [¹⁴C]-MEV, [¹⁴C]-MEV fosfato y [¹⁴C]-MEV difosfato, no fueron incorporados en la biosíntesis de isoprenoides plastídicos, cuando estos fueron aplicados exógenamente en preparaciones de plástidos. También se observó que en los plástidos no hay actividad de la enzima HMG reductasa (Kreuz y Kleining, 1984). Los resultados antes mencionados sugirieron que los precursores marcados, así como la mevinolina no podían penetrar en los plástidos. Aunque, también se especuló que los plástidos podrían utilizar una vía independiente de mevalonato para la biosíntesis de isopentenil difosfato y de sus isoprenoides. Actualmente todos los resultados incongruentes, son fácilmente explicados a través de la nueva ruta para la biosíntesis de isoprenoides, la vía del 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP). La vía MEP fué descubierta por primera vez en bacterias (y Flesch y Rohmer, 1988; Rohmer y cols., 1993) y posteriormente se encontró que está ampliamente distribuida entre eucariotes fototróficos.

Intermediarios, enzimas y genes en la vía del mevalonato

En esta vía el precursor inicial es el compuesto Acetil Coenzima A. A partir de este compuesto, una serie de siete reacciones enzimáticas forman el IPP y DMAPP (Figura #3), los cuales son precursores para la biosíntesis de sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos. Los genes involucrados en esta ruta han sido identificados en el genoma de arqueobacterias, levaduras, animales y plantas (Lange y cols., 2000). La mayoría de estos genes forman familias mutigénicas. En la vía del mevalonato se ha determinado que la conversión de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA a mevalonato, catalizada por la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa es un paso limitante (Goldstein y Brown, 1990; Schaller y cols., 1995). En el caso de plantas, los genes de la vía están presentes en el genoma nuclear y las enzimas son localizadas en el citoplasma.

A continuación se enlistan las enzimas involucradas en la vía y su función

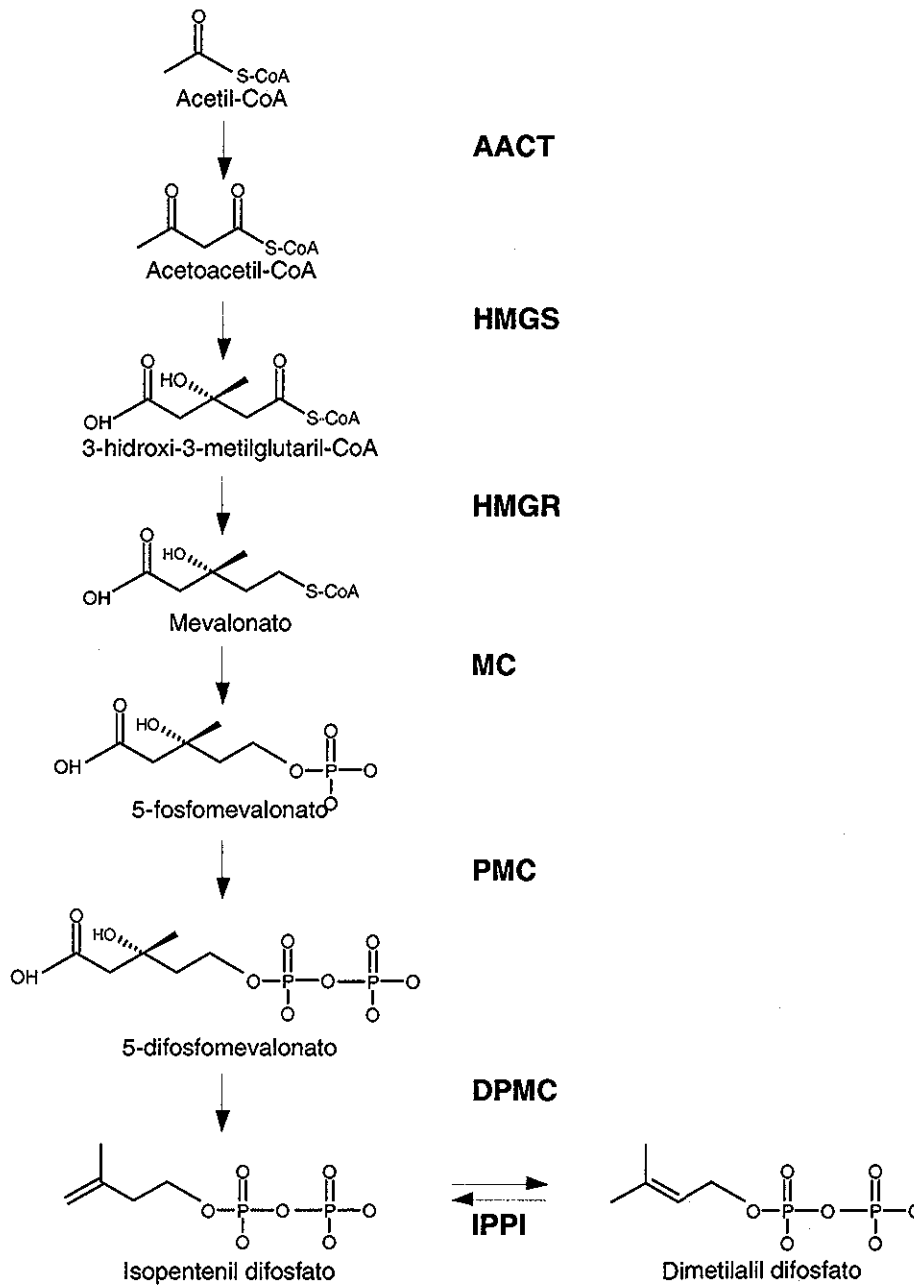


Figura #3. Vía mevalonato. Las enzimas involucradas en esta vía son: **AACT**, acetoacetyl-CoA tiolasa; **HMGS**, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa; **HMGR**, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa; **MC**, mevalonato cinasa; **PMC**, 5-fosfomevalonato cinasa; **DPMC**, 5-difosfomevalonato descarboxilasa; **IPPI**, isopentenil difosfato isomerasa.

(información tomada de Lange y cols., 2000).

- Acetoacetil-Coenzima A tiolasa (AACT)

Esta enzima cataliza la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para producir el intermediario acetoacetil-CoA. LA AACT pertenece a una familia de enzimas que metabolizan acil-Coenzima A.

- 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMGS)

La HMGS cataliza la condensación de acetoacetil-CoA con acetil-CoA para generar el intermediario 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA. La HMGS pertenece a una familia de enzimas que condensan acetil-CoA. En plantas, se ha observado que la expresión del gen *HMGS* es regulada por desarrollo y en respuesta al ataque por patógenos.

- 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR)

Esta enzima lleva a cabo la reducción de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA para producir mevalonato, en una reacción dependiente de NADPH. En animales y plantas, la HMGR cataliza el paso limitante en la biosíntesis de colesterol y fitoesterol respectivamente (Goldstein y Brown, 1990; Schaller y cols., 1995). En plantas, se ha reportado que la HMGR es regulada por desarrollo y por factores externos como la luz a nivel postraduccional.

- Mevalonato cinasa (MC)

La MC fosforila el mevalonato para producir el compuesto 5-fosfomevalonato. Esta enzima pertenece a la familia llamada GHMP, en la cual se incluyen las enzimas galactocinasa, homoserina cinasa, mevalonato y fosfomevalonato cinasa.

- 5-fosfomevalonato cinasa (PMC)

La PMC realiza una segunda fosforilación al mevalonato para generar el intermediario 5-difosfomevalonato. A diferencia de las enzimas anteriores, la PMC está pobremente conservada en el genoma de varios organismos.

- 5-difosfomevalonato descarboxilasa (DPMC)

Esta enzima convierte el 5-difosfomevalonato a isopentenil difosfato. La DPMC también está poco conservada en diferentes organismos.

- Isopentenil difosfato isomerasa (IPPI)

La IPPI cataliza la transformación reversible de isopentenil difosfato a dimetilalil difosfato. En el genoma de varias plantas existen dos genes *IPPI*, este hecho ha sugerido que una de ellas es localizada en el citoplasma y la otra es importada a plástidos, donde podría participar en la síntesis de isoprenoides plástídicos (Cunningham y Grantt, 2000).

LA VIA DEL 2C-METIL-D-ERITRITOL 4-FOSFATO (MEP)

Descubrimiento de la vía MEP en eubacterias

Los primeros datos importantes que permitieron el descubrimiento de la vía MEP en bacterias fueron obtenidos de las investigaciones realizadas sobre la

biosíntesis de triterpenos de la serie hopanoide (Flesch y Rohmer, 1988; Rohmer y cols., 1993). Los hopanoides son producidos por la mayoría de las bacterias. Las similitudes estructurales entre los hopanoides y esteroides sugieren funciones similares, es decir, como estabilizadores de la membrana. La abundancia de los hopanoides en las eubacterias (más de 30 mg/g de bacteria), la facilidad para aislarlos y su alta estabilidad química fueron factores importantes para realizar los primeros experimentos de marcaje y localizar mediante resonancia magnética nuclear los átomos marcados en los hopanoides.

Los triterpenos de la serie bacteriohopanoide (C_{35}) son caracterizados por una cadena polihidroxilada (C_5) unida al esqueleto triterpénico (C_{30}). Para determinar el origen de los hopanoides, Flesch y Rohmer (1988) realizaron los primeros experimentos de marcaje usando [^{13}C]-acetato como fuente única de carbono en cultivos de *Methylobacterium organophilum*, *Rhodopseudomonas palustris* y *Rhodopseudomonas acidophila*. Los resultados mostraron claramente que la cadena C_5 proviene de un derivado de la D-pentosa, formado por la vía no oxidativa de las pentosas fosfato. Sorprendentemente se encontró que el patrón de marcaje de la parte triterpénica, era totalmente diferente al esperado por la incorporación directa del acetato a través de la vía mevalonato (Figura #4). Posteriormente se realizaron experimentos de marcaje utilizando [^{13}C]-acetato en cultivos de *E. coli* (bacteria que no produce hopanoides) para analizar el origen de la ubiquinona (Rohmer y cols., 1993). Los resultados también mostraron un patrón de marcaje diferente al esperado, siendo éste similar al encontrado en las unidades isopreno de los hopanoides. Estos resultados fueron interpretados en el marco de la vía mevalonato, suponiendo una compartimentalización del metabolismo del acetato y la presencia de dos pozas de acetato diferentes e interconvertibles entre sí. Aunque también se especulaba la existencia de una ruta completamente diferente para la biosíntesis de isoprenoides bacterianos.

Origen de los átomos de carbono de las unidades isopreno

Las evidencias experimentales acumuladas apoyaban la existencia de una ruta independiente de mevalonato para la biosíntesis de isoprenoides en eubacterias. Por esta razón las investigaciones se enfocaron a dilucidar la nueva ruta, que ahora ha sido llamada vía del 2C-metil-D-eritritol 4-difosfato (MEP).

Los primeros datos que permitieron conocer el origen de los carbonos de las unidades isopreno (IPP) en bacterias, fueron obtenidos con la incorporación de [^{13}C]-glucosa en la biosíntesis de hopanoides de *Z. mobilis* (Rohmer y cols., 1993). Esta bacteria utiliza esencialmente glucosa como fuente de carbono, la cual es metabolizada a través de la vía Entner-Doudoroff. Isotopos de glucosa marcados en los carbonos C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 o C-6 fueron agregados a cultivos de *Z. mobilis*. Los resultados mostraron que los carbonos C-3 y C-5 de la unidad isopreno (IPP) tuvieron un doble origen: el carbono C-3 del IPP proviene de los carbonos C-2 o C-5 de la glucosa, mientras que el carbono C-5 del IPP deriva de los carbonos C-3 o C-6 de la glucosa. Los carbonos C-1, C-2 y C-4 del IPP provienen de los carbonos C-6, C-5

y C-4 de la glucosa respectivamente. Paralelamente experimentos de marcaje hechos en cultivos de *Methylobacterium fujisaense* (utiliza glucosa vía Entner-Doudoroff), mostraron que el patrón de marcaje en la unidad isopreno era similar al observado en *Z. mobilis*. Estos resultados llevaron a proponer una hipótesis para

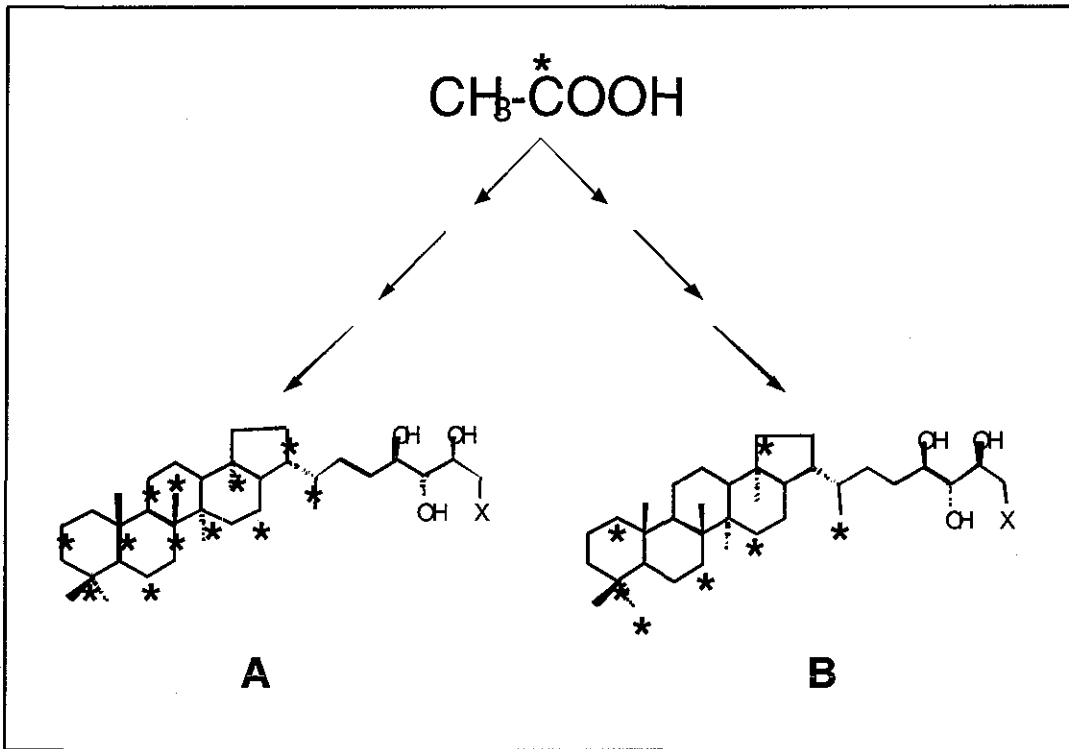


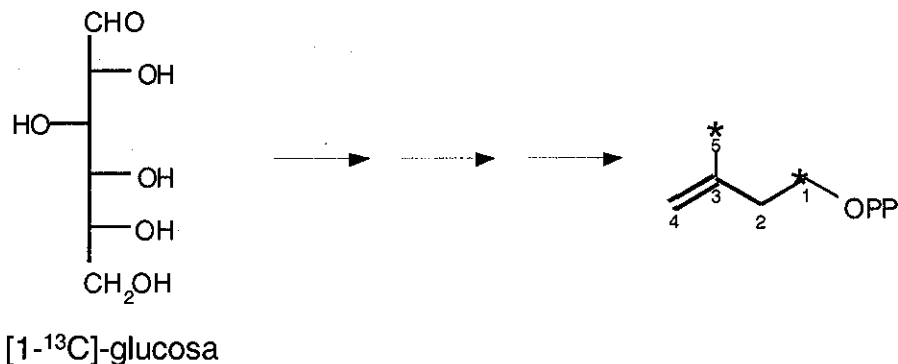
Figura #4. Patrón de marcaje en el bacteriohopanoide obtenido de la incorporación de [1-¹³C] acetato. A, esperado de la vía mevalonato y B, observado. * , indica los carbonos marcados.

explicar la formación del IPP, en la cual se propuso al piruvato como precursor de una subunidad de C₂, mientras que a un derivado de triosa fosfato como precursor de una subunidad de C₃.

El origen de los átomos de carbono también fué analizado en bacterias que metabolizan glucosa vía glucólisis (Rhommer y cols., 1993). La incorporación de [1-¹³C] o [6-¹³C]-glucosa en la biosíntesis de ubiquinona y hopanoideos de *E. coli* y *Alicyclobacillus acidoterrestris* respectivamente, mostró que únicamente los carbonos C-1 y C-5 del IPP eran marcados (Figura #5). Cabe mencionar que si la vía mevalonato estuviera presente en estas bacterias, la incorporación de [1-¹³C] o [6-¹³C]-glucosa en la biosíntesis de isoprenoides daría como resultado el marcado de los carbonos C-2, C-4 y C-5 de las unidades isopreno (Figura #5).

La hipótesis propuesta también implicaba un rearrreglo de las subunidades C₂ y C₃ para formar una molécula de 5 carbonos, el IPP. Si un derivado de la triosa

Vía Entner-Doudoroff



Glucolisis

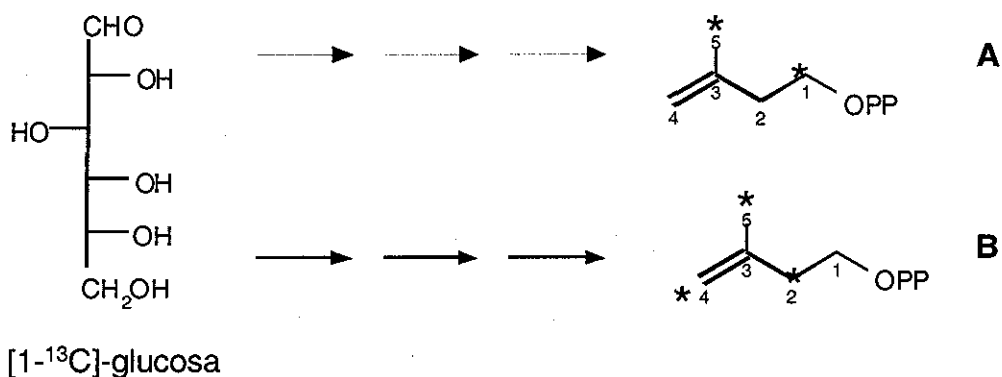


Figura #5. Incorporación de glucosa en isopentenil difosfato (unidad isopreno). El metabolismo de la $[1-^{13}\text{C}]$ -glucosa vía Entner-Doudoroff incorpora carbonos marcados en la posición 1 y 5 del IPP. Metabolismo de la $[1-^{13}\text{C}]$ -glucosa a través de glucólisis: A) los carbonos 1 y 5 son marcados vía MEP, B) los carbonos 2, 4 y 5 son marcados vía mevalonato

fosfato es precursor para los carbonos C-1, C-2 y C-4 de IPP, entonces el rearrreglo debería permitir la inserción de la subunidad de C_2 derivada de piruvato (que corresponderá a los carbonos C-3 y C-5 del IPP) entre los carbonos C-1 y C-2 de la subunidad C_3 (que corresponderá a los carbonos C-2 y C-4 del IPP). El rearrreglo propuesto fue analizado por la incorporación de $[4,5-^{13}\text{C}]$ -glucosa en hopanoides y ubiquinona de *M. fujisawaense* así como por la incorporación de $[1-^{13}\text{C}]$ y $[6-^{13}\text{C}]$ -glucosa en ubiquinona de *E. coli* y en hopanoides de *A. acidoterrestis*. Los resultados mostraron que solamente los carbonos C-2 y C-4 de las unidades isopreno fueron marcados. La constante de acoplamiento ($^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$) observada entre los carbonos correspondientes al C-2 y C-4 del IPP, indicaron que los carbonos C-4 y C-5 (incluye

C-6) de la glucosa son simultáneamente introducidos en las unidades isoprenicas (Rohmer y cols., 1993; Horbach y cols., 1993).

Los datos obtenidos con estos experimentos llevaron a establecer que los átomos de carbono C-3 y C-5 de la unidad isoprenica (IPP) provienen del piruvato, mientras que los carbonos C-1, C-2 y C-4 provienen de un derivado del metabolismo de triosa fosfato. Además este descubrimiento indicaba que la biosíntesis de isoprenoides en bacterias era a través de una vía completamente diferente a la vía del mevalonato.

Gliceraldehído 3-fosfato y piruvato como precursores iniciales en la vía 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato

Aunque ya se tenía evidencia de la participación del piruvato como precursor de la subunidad de C₂, la incorporación de [3-¹³C]-piruvato en la biosíntesis de hopanoides y ubiquinona de la bacteria *Methylobacterium fujisawaense* reveló que únicamente el carbono C-5 del IPP fue marcado. Esto permitió establecer el papel directo del piruvato como precursor en la biosíntesis del IPP (Rohmer y cols., 1993).

Para conocer la identidad del precursor de la subunidad C₃, se realizaron experimentos con mutantes de *E. coli* deficientes en enzimas del metabolismo de triosa fosfato: glicerol cinasa, glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato cinasa y enolasa (Rohmer y cols., 1996). Las bacterias mutantes fueron crecidas en un medio mínimo, que contenía glicerol y piruvato como fuente de carbono. Se hicieron dos tipos de experimentos de marcaje con cada una de las mutantes: uno con [2-¹³C]-glicerol y piruvato no marcado y otro con [2-¹³C] o [3-¹³C]-piruvato y glicerol no marcado. Los patrones de marcaje fueron observados en la cadena prenil de la ubiquinona Q8. Los resultados mostraron que el [¹³C]-piruvato era incorporado por todas las mutantes en la subunidad C₂, correspondiente a los carbonos C-3 y C-5 de la unidad isopreno (esto confirmó nuevamente que la subunidad C₂ proviene de la descarboxilación del piruvato), mientras que ninguna de las mutantes incorporó ¹³C derivados del [¹³C]-glicerol en las posiciones C-3 y C-5 de la unidad isopreno. La incorporación de ¹³C del [¹³C]-piruvato en la subunidad C₃ (correspondiente a los carbonos C-1, C-2 y C-4 de la unidad isopreno) sólo ocurrió en mutantes deficientes en las enzimas glicerol cinasa, glicerol fosfato deshidrogenasa y triosa fosfato isomerasa. Por otro lado, la incorporación de ¹³C del [¹³C]-glicerol en la C₃ sólo se observó en las bacterias deficientes en las enzimas enolasa, fosfoglicerato isomerasa y gliceraldehído fosfato deshidrogenasa. Estos resultados apuntaron a que el gliceraldehído 3-fosfato era el único precursor de los carbonos C-1, C-2 y C-4 de la unidad isopreno, excluyendo algún otro compuesto de C₃ derivado del metabolismo de triosa fosfato como precursor.

Descubrimiento de la vía del 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato en algas y plantas

Los progresos en la dilucidación de la vía MEP en eubacterias dieron la pauta para iniciar en algas y plantas, una serie de experimentos de marcaje similares a los

realizados en bacterias. Estudios sobre la biosíntesis de isoprenoides en el alga verde *Scenedesmus obliquus*, permitieron obtener evidencias concretas que demostraron el funcionamiento de la vía MEP en células vegetales (Schwender, 1996). Cultivos de *S. obliquus* fueron crecidos heterotróficamente en presencia de [1-¹³C]-glucosa, como fuente única de carbono. Una vez más, el patrón de marcaje en los isoprenoides β-caroteno, luteína, fitol y plastoquinona-9, mostró que la incorporación de la glucosa en los isoprenoides plastídicos no era a través de la vía mevalonato. Inesperadamente los fitoesteros mostraron el mismo patrón de marcaje que los isoprenoides plastídicos (Schwender, 1996). Posteriormente, este hecho se explicó por la ausencia de la vía mevalonato en *S. obliquus*.

En plantas superiores, los estudios de marcaje se hicieron en cultivos de células de cebada, zanahoria y lenteja, los cuales fueron crecidos heterotróficamente en presencia de [1-¹³C]-glucosa. Los resultados mostraron que las unidades isopreno del β-caroteno, luteína, fitol y plastoquinona-9 eran marcadas de acuerdo a la vía MEP. En contraste, los esteroides (sitoesterol, estigmaesterol y campesterol) eran marcados según la vía mevalonato (Lichtenthaler y cols., 1997). Estos datos revelaron que las plantas poseen dos vías diferentes para la biosíntesis de sus isoprenoides (Figura #7).

Origen de los átomos de carbono de las unidades isopreno

Para confirmar el origen de los átomos de carbono en las unidades isopreno de algas y plantas, inicialmente se realizaron experimentos de marcaje en cultivos del alga *S. obliquus*. Los resultados de experimentos con [1-¹³C]-acetato mostraron que las unidades isopreno eran marcadas únicamente en los carbonos C-4 de las unidades isopreno. En experimentos con [1-¹³C] y [6-¹³C]-glucosa sólo se observó marca en los carbonos C-1 y C-5. La incorporación de [4,5-¹³C]-glucosa dió como resultado la incorporación de ¹³C en los carbonos C-2, C-3 y C-4 del IPP. Los patrones de marcaje encontrados en *S. obliquus* también se observaron en las algas verdes *Chlorella fusca* y *Chlamydomonas reinhardtii* (Schwender y cols., 1997; Disch y cols., 1998).

Al igual que en eubacterias, la señal de los ¹³C analizada por resonancia magnética nuclear mostró que dos subunidades son formadas a partir de glucosa e incorporadas en las unidades isoprénicas: una subunidad de C₂ produce los carbonos C-3 y C-5 de las unidades isoprénicas, mientras que otra subunidad de C₃ produce los carbonos C-1, C-2 y C-4 de las unidades isoprénicas. También se demostró que la subunidad C₂ es insertada entre dos carbonos de la subunidad C₃ correspondientes a los carbonos C-2 y C-4 de la unidad isoprénica.

Gliceraldehído 3-fosfato y piruvato como precursores iniciales en la vía 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato

Los experimentos hechos con *S. obliquus* mostraron el mismo patrón de marcaje en las unidades isoprénicas observado en eubacterias, esto indicó que los carbonos C-3 y C-5 de la unidad isoprénica (IPP) provienen del piruvato, mientras que los carbonos C-1, C-2 y C-4 provienen de un derivado de triosa fosfato, producto

del metabolismo de la glucosa vía glucólisis. Estos datos sugirieron que también en células vegetales el piruvato y gliceraldehído son los precursores de la vía del 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (Lichtenthaler y col., 1997).

Intermediarios, enzimas y genes en la vía del 2C-metil-d-eritritol 4-fosfato

Como ya se ha mencionado los precursores iniciales en esta vía son el piruvato y gliceraldehído 3-fosfato. Actualmente sólo se han identificado los primeros 5 pasos enzimáticos que conducen a la formación de IPP y DMAPP (Eisenreich y col., 2001). Los genes involucrados en esta vía están presentes en los genomas de eubacterias, algas y plantas (Lange y col., 2000). Se ha reportado que en algunas especies de bacterias y plantas, existen dos genes codificantes para la primera enzima requerida en la ruta, la DXS (Hahn y cols., 2001; Cane y col., 2001; Walter y cols., 2000; Walter y cols., 2002). Los genes subsiguientes han sido reportados como únicos en genomas completamente secuenciados.

En plantas, los genes descritos para la vía MEP están contenidos en el genoma nuclear. Las proteínas codificadas por dichos genes tienen en su amino terminal características de péptido señal a plástido, lo que sugiere que estas enzimas son importadas a plástidos. A través de esta vía se sintetizan isoprenoides tales como: fitol (componente estructural de las clorofilas y tocoferoles), carotenoides, isopreno, ácido abscísico, *Ent*-kaureno (precursor para la biosíntesis de giberelinas), monoterpenos, etc.

Hasta el momento ha sido difícil determinar los pasos limitantes para la biosíntesis de IPP por la vía MEP, debido a que aún se desconocen los pasos finales de la vía. No obstante, la modulación de los niveles de las enzimas DXS y DXR de bacterias, han permitido concluir que la DXS es una enzima limitante en esta vía (Kuzuyama y col., 2000).

A continuación se mencionan algunas características de las enzimas involucradas en la vía MEP (Figura #6).

- 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS)

Los estudios realizados por Rohmer y cols., (1993; 1996) establecieron que el piruvato y el gliceraldehído 3-fosfato son los precursores iniciales en la vía MEP. A partir de estos datos, se planteó un mecanismo hipotético para la biosíntesis de IPP (Arigoni, 1997). En este modelo se propuso que la condensación de D-gliceraldehído 3-fosfato y "acetaldehído activado" derivado de piruvato, daría como resultado la formación del compuesto 1-desoxi-D-xilulosa 5 fosfato (DXP). Una de las primeras evidencias en favor de esta hipótesis, fue la incorporación eficiente del compuesto ²H-1-desoxi-D-xilulosa ([²H]-DX) en la parte isoprénica de la ubiquinona de *E. coli*, así como en diterpenos de *Ginkgo biloba* y *Salvia miltiorrhiza* (citado en Arigoni, 1997). Posteriormente, la incorporación de DX marcado también fue demostrada en la biosíntesis de carotenos y fitol en *Catharanthus roseus* (Arigoni y cols., 1997), de mentol en *Mentha x piperita* (Sagner y cols., 1998), de ubiquinona en *E. coli* (Putra y cols., 1998), de isopreno en *Populus nigra*, *Chelidonium majus* y *Salix viminalis* y de fitol en *Lemna*

gibba, *Cyanidium caldarium*, *S. obliquus* y *Chlamydimonas reinhardtii* (Schwender y cols., 1997). Previo a los experimentos realizados por Arigoni y cols. (1997), ya se había demostrado que el compuesto 1-desoxi-D-xilulosa es utilizado como precursor para la biosíntesis de las vitaminas tiamina (B₁) y piridoxal (B₆) en *E. coli* (David y cols., 1981; Hill y cols., 1989). Además, Yokoto y Sasajima (1986), reportaron que los compuestos 1-desoxixilulosa o 1-desoxixilulosa 5-fosfato podían ser sintetizados *in vitro* a partir de piruvato y gliceraldehído 3-fosfato, en una reacción dependiente de tiamina difosfato (TPP) llevada a cabo por la enzima piruvato deshidrogenasa de *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Sin embargo, esta reacción no fue específica ya que se produjeron 1-desoxicetosas con esqueletos de C₅, C₆ ó C₇.

Todo indicaban que el compuesto 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato era un intermediario en la vía MEP y que éste era formado a partir de piruvato y gliceraldehído 3-fosfato por una enzima tipo transcetolasa dependiente de tiamina difosfato (TPP). Para indentificar la enzima específica capaz de realizar dicha reacción, se hicieron búsquedas en las bases de datos con el propósito de encontrar secuencias homólogas a la subunidad E1 de la piruvato deshidrogenasa y transcetolasas de *E. coli* (ambas enzimas requieren TPP para su actividad). Los resultados revelaron un marco de lectura abierto (ORF) de función desconocida en el genoma de *E. coli*, localizado justo a un lado del gen *ispA* que codifica para la enzima farnesil difosfato, requerida en la biosíntesis de isoprenoides. La presencia de este ORF junto al gen *ispA* en un mismo operón, sugirió que ambas proteínas estaban involucradas en la biosíntesis de isoprenoides. El marco de lectura abierto (ahora llamado gen *DXS*) fue expresado en *E. coli* por dos grupos diferentes (Sprenger 1997; Lois y cols., 1998). La proteína recombinante catalizó la formación de 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato a partir de piruvato y gliceraldehído 3-fosfato, en una reacción dependiente de tiamina difosfato (Tabla #2).

Actualmente se han caracterizado genes para la DXS en *Mentha piperita* (Lange y cols., 1988), *Capsicum annum* (Bouvier y cols., 1998), *Arabidopsis thaliana* (Mandel y cols., 1996; Estévez y cols., 2000; Araki y cols., 2000), *Lycopersicon esculentum* (Lois y cols., 2000), *Streptomyces sp.* (Kuzuyama y cols., 2000), *Synechococcus leopoliensis* (Miller y cols., 1999) y *Bacillus subtilis* (Harker y cols., 1999). *Streptomyces coelicolor* (Cane y cols., 2001) y *Rhodobacter capsulatus* (Hahn y cols., 2001). En todos estos casos las proteínas recombinantes requieren tiamina difosfato y cationes divalentes como Mg²⁺ o Mn²⁺ para su actividad (Tabla #2). Se ha reportado que las enzimas DXS de *Streptomyces sp.*, *S. coelicolor* y *R. capsulatus* forman homodímeros. Esto ha sugerido que las otras DX sintasas podrían funcionar como homodímeros (Kuzuyama y cols., 2000; Cane y cols., 2001; Hahn y cols., 2001). El análisis comparativo de las secuencia de DX sintasas, ha revelado que la Histidina ubicado en la posición 49 (H-49) está altamente conservada. La mutación de la H-49 en la DXS de *E. coli* resulta letal para la bacteria. Estos datos sugieren que la H-49 es esencial para la actividad de estas enzimas.

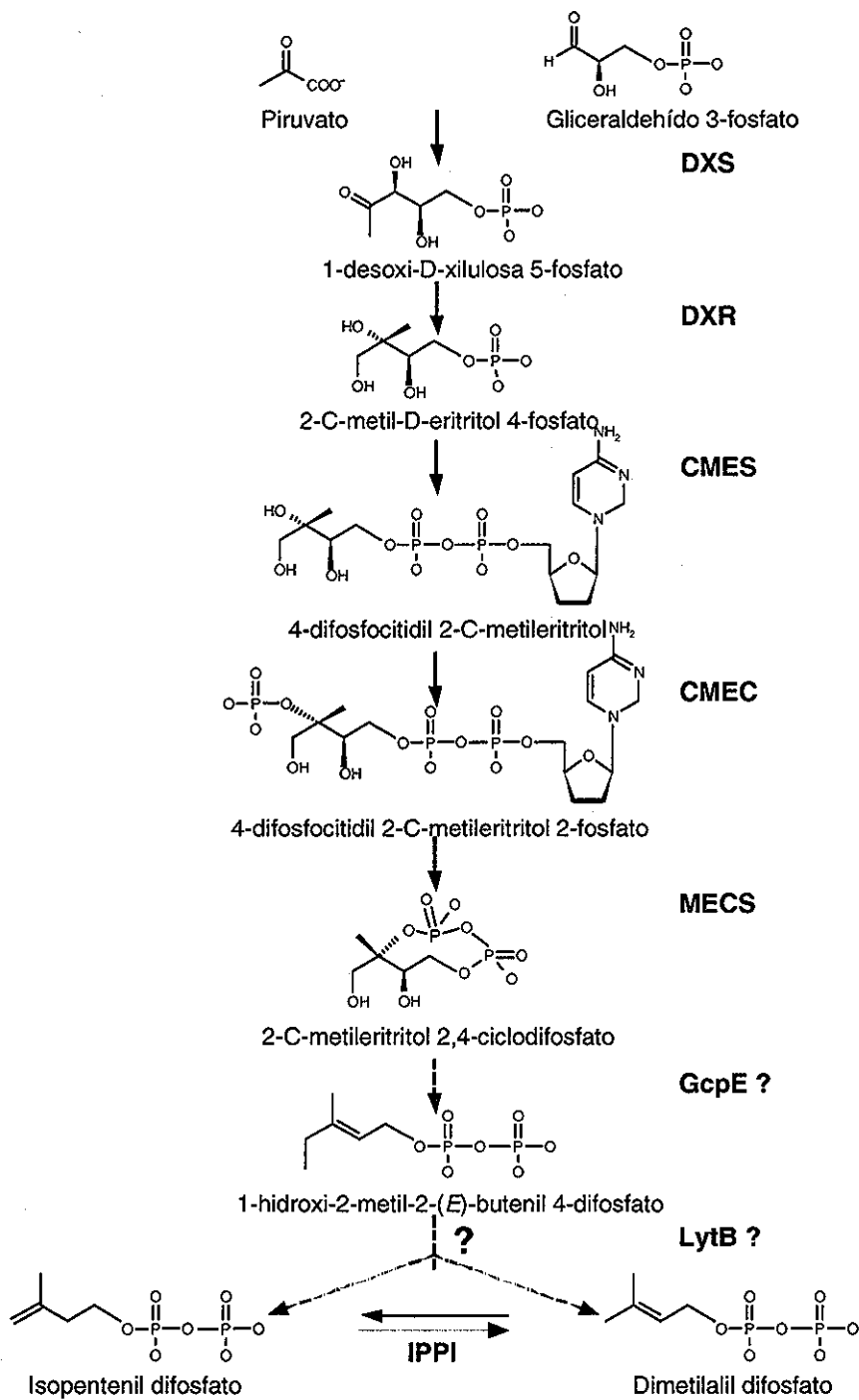


Figura #6. Vía del 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP). Las enzimas de la vía son: **DXS**, 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa; **DXR**, 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa; **CMES**, 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato sintasa; **CMEC** 4-difosfocitidil 2C-metileritritol cinasa; **MECS**, 2C-metileritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa; **IPPI**, isopentenil difosfato isomerasa. Las proteínas **GcpE** y **LytB** probablemente están involucradas en la vía. La línea discontinua indica pasos no identificados.

- 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXR)

Para formar isopentenil difosfato a partir de 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato, se propuso que el DXP debería sufrir un rearrreglo intramolecular para formar el intermediario 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) por un proceso de reducción. Esta especulación condujo a Takahashi y cols (1998) a identificar mutantes de *E. coli* con requerimientos de 2C-metileritritol (ME) para crecer. Las mutantes identificadas fueron deficientes en el gen *yaeM*. El gen silvestre *yaeM* (ahora llamado DXR o *ispC*) fue expresado en *E. coli*. Con la proteína recombinante se demostró que la formación de 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato a partir únicamente del compuesto DXP, es una reacción dependiente de NADPH (Tabla #2).

Otras enzimas recombinantes DXR han sido aisladas de *Synechocystis* (Proteau y cols., 1999), *A. thaliana* (Schwender y cols., 1999), *M. piperita* (Lange y cols., 1999), *Plasmodium falciparum* (Jomaa y col., 1999), *Synechococcus leopoliensis* (Miller y cols., 2000) y *Zymomonas mobilis* (Grolle y cols., 2000). Todas ellas requieren para su actividad los iones divalentes Mn^{2+} , Co^{2+} o Mg^{2+} y utilizan como cofactor el NADPH (Tabla #2). La actividad de la DXR es inhibida por el antibiótico fosmidomicina (Kuzuyama y cols., 1998; Jomaa y cols., 2000). Mutagenesis sitio dirigida de la proteína recombinante DXR de *E. coli*, reveló que el aminoácido glutámico en la posición 23 está involucrado en la catálisis y que las histidinas 153, 209 y 257 pudieran estar involucradas con la unión del sustrato DXP (Kuzuyama y cols., 2000). En *P. falciparum* la DXR esta localizada en el apicoplasto (Jomaa y cols., 2000).

- 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintasa (CMES)

Rohdich y cols., (1999) reportaron que extractos proteicos de *E. coli* convertían el compuesto 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol (MEP) en un nuevo producto, a través de una reacción dependiente de citidina trifosfato (CTP). Estos resultados condujeron a una búsqueda en la base de datos de enzimas que utilizaran CTP. Los resultados mostraron al gen *ygbP* de *E. coli* cuya función era desconocida, como posible candidato. Además, genes homólogos a *ygbP* se encontraron solamente en eubacterias y plantas, organismos que contienen los genes *DXS* y *DXR*. Esto sugirió la posible participación del gen *ygbP* en la vía MEP. Para confirmar esta hipótesis, el gen *ygbP* (ahora llamado *ispD*) fue sobreexpresado en *E. coli* (Rohdich y cols., 1999). La proteína recombinante convirtió el compuesto MEP y CTP en 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol (Figura #6). También se demostró que el compuesto 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol era incorporado eficientemente en la biosíntesis de carotenoides de *Capsicum annun* (Rohdich y cols., 1999). La mutación en el gen *ispD* de una cepa de *E. coli*, modificada para utilizar parte de la vía mevalonato, mostró que esta es letal para la eubacteria. La bacteria recombinante pudo ser rescatada por aplicación exógena de mevalonato. Esto confirmó que esta enzima es requerida para la biosíntesis de IPP (Kuzuyama y cols., 2000). La proteína recombinante *ispD* de *A. thaliana* cataliza la misma reacción que *ispD* de *E. coli* (Rohdich y cols., 2000). En ambos casos, la proteína requiere cationes divalentes preferentemente Mg^{2+} y CTP para su actividad (Tabla #2).

Tabla 2. Características de las enzimas descritas de la vía MEP

Enzima/ organismo	Cofactor	Catión	KDa	Subunidades
1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa				
<i>Escherichia coli</i>	TPP	Mg ²⁺	65	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	TPP	Mg ²⁺	70	
<i>Bacillus subtilis</i>	TPP	Mg ²⁺		
<i>Capsicum annuum</i>	TPP	Mg ²⁺	70	
<i>Lycopersicon esculentum</i>	TPP	Mg ²⁺		
<i>Mentha piperita</i>	TPP	Mg ²⁺	71	
<i>Streptomyces sp</i>	TPP	Mg ²⁺	70	homodímero
<i>Streptomyces coelicolor</i>	TPP	Mg ²⁺	71	homodímero
<i>Synechococcus leopoliensis</i>	TPP	Mg ²⁺	69	
<i>Synechocystis sp</i>	TPP	Mg ²⁺		
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	TPP	Mg ²⁺	68	homodímero
1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa				
<i>Escherichia coli</i>	NADPH	Mn ²⁺ , Mg ²⁺	42	homotetramero
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NADPH	Mn ²⁺ , Mg ²⁺	46	
<i>Mentha piperita</i>	NADPH	Mn ²⁺ , Mg ²⁺	43	
<i>Plasmodium falciparum</i>	NADPH	Mn ²⁺ , Mg ²⁺		
<i>Synechocystis sp</i>	NADPH	Mn ²⁺ , Mg ²⁺		
<i>Synechococcus leopoliensis</i>	NADPH	Mn ²⁺ , Mg ²⁺	44	
<i>Zymomonas mobilis</i>	NADPH	Mn ²⁺ , Mg ²⁺	39	homodímero
2C-metil-D-eritritol 4-fosfato sintasa				
<i>Escherichia coli</i>	CTP	Mn ²⁺ , Mg ²⁺	25	homodímero
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CTP	Mn ²⁺ , Mg ²⁺		
2C-metil-D-eritritol 4-fosfato cinasa				
<i>Escherichia coli</i>	ATP	Mg ²⁺	30	
<i>Lycopersicon esculentum</i>	ATP	Mg ²⁺		
<i>Mentha piperita</i>	ATP	Mg ²⁺		
2C-metileritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa				
<i>Escherichia coli</i>		Mn ²⁺ , Mg ²⁺	16	
<i>Plasmodium falciparum</i>		Mn ²⁺ , Mg ²⁺	22	

La información puesta en esta tabla, ha sido obtenida de la caracterización de proteínas recombinantes. TPP, Tiamina difosfato; NADPH, Dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato; CTP, Citidil trifosfato; ATP, Adenosin trifosfato; Mg²⁺, Magnesio; Mn²⁺, manganeso.

- 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol cinasa (CMEC)

Análisis genómicos mostraron que genes homólogos a *DXS*, *ispC* e *ispD* solo eran encontrados en eubacterias y plantas, pero no en organismos que utilizan la vía mevalonato. Esto sugirió que otros genes involucrados en la vía MEP podrían tener el mismo patrón de distribución que los genes descritos en la vía MEP. El resultado de la comparación de varios genomas, mostró al gene *yhbB* (ahora llamado *ispE*) de función desconocida, como posible miembro de la vía MEP. El análisis de la secuencia de *ispE* mostró sitios putativos de unión para ATP.

El gen *ispE* de *E. coli* fue sobreexpresado (Lüttgen y cols., 2000). La proteína recombinante *ispE* catalizó la fosforilación (dependiente de ATP) del compuesto 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol para producir el intermediario 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 2-fosfato (Figura #6). La enzima recombinante *ispE* de tomate cataliza la misma reacción (Rohdich, F. y cols., 2000). La enzima recombinante CMEC tanto de *E. coli* como tomate requieren de Mg^{2+} para su actividad.

- 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa (MECS)

Usando la misma estrategia para encontrar el gen *yhbB*, se identificó el gen *ygbB* (Herz y cols., 2000). Genes homólogos a *ygbB* (ahora llamado *ispF*) mostraron el mismo patrón de distribución que los genes *DXS*, *ispC*, *ispD* e *ispE*. El gen *ispF* de *E. coli* fue sobreexpresado y la proteína recombinante catalizó la formación de 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato a partir de 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 2-fosfato (Figura #6). La proteína recombinante *ispF* de *Plasmodium falciparum* catalizó la misma reacción (Rohdich y cols., 2001). En ambos casos las enzimas MECS requieren Mg^{2+} o Mn^{2+} para su actividad (Tabla #2). Se observó que el compuesto 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato marcado es incorporado en la biosíntesis de carotenoides en cromoplastos de *C. annuum*, estos datos también confirman su función como un intermediario en la vía MEP para la biosíntesis de isoprenoides (Herz y cols., 2000). Se ha reportado que el compuesto 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato se acumula en algunas bacterias bajo condiciones de estrés oxidativo (Fellermeier y cols., 2001).

Proteínas e intermediarios probables en la vía MEP

Nuevos análisis genómicos mostraron que los genes *lytB* y *gcpE* tienen una distribución semejante que los genes establecidos como participantes en la vía MEP. Estos datos han sugerido que ambos genes también podrían estar involucrados en la vía MEP. Con el propósito de analizar esta posibilidad se han realizado los siguientes estudios.

- El gen *lytB*

Los primeros datos mostraron que la mutación en el gen *lytB* de *Synechocystis* sp es letal para la cianobacteria (Cunningham y cols., 2000). A su vez, se demostró que el crecimiento de la cianobacteria mutante fue restaurado con la aplicación exógena de análogos de IPP y DMAPP. La sobreexpresión del gen *lytB* de *Synechocystis*, así como el gen *lytB* de la planta *Adonis aestivalis* aumentan la

producción de carotenoides en bacterias de *E. coli* modificadas para producir carotenoides (Cunningham y cols., 2000). Estos datos han sugerido que el producto del gen *lytB* podría estar involucrado en la biosíntesis de isoprenoides, formados a través de la vía MEP.

- El gen *gcpE*

Inicialmente el gen *gcpE* (*ispG*) fue mutado en una cepa de *E. coli* modificada genéticamente para utilizar mevalonato (Altincicek y cols., 2001; Campos y cols., 2001). Esta mutación da como resultado una condición letal para la bacteria. El crecimiento de estas bacterias fue restaurado con la aplicación exógena de mevalonato al medio de crecimiento o cuando la cepa fue complementada con el gen *gcpE* silvestre. Estos datos sugieron que el gen *ispG* es necesario para producir IPP. Estudios subsecuentes, han mostrado que la cepa de *E. coli* deficiente en el gen *ispH* acumula grandes cantidades del compuesto 1-hidroxi-2-metil-2-(*E*)-butenil 4-difosfato (HMB-PP). En contraste, la cepa de *E. coli* mutada en el gen *gcpE* acumula menores cantidades de HMB-PP. También se ha demostrado que *E. coli* que sobreexpresa simultáneamente los genes *xylB* (D-xilulosa cinasa), *ispC*, *ispD*, *ispE*, *ispF* e *ispG* incorporan el compuesto [¹³C]-desoxi-D-xilulosa en un nuevo intermediario, el 1-hidroxi-2-metil-2-(*E*)-butenil 4-difosfato (¹³C-HMB-PP). El ¹³C-HMB-PP no se forma cuando el gen *ispG* no es sobreexpresado (Hecht y cols., 2001). Recientemente, se ha demostrado que el intermediario 2C-metil-D-eritritol ciclodifosfato es convertido en el compuesto HMB-PP en bacterias de *E. coli* que sobreexpresan el gen *ispG* (Wolff y cols., 2002). Estos datos han sugerido que el HMB-PP es un intermediario en la vía MEP y que la proteína *ispG* realiza la formación del intermediario.

En el genoma de *A. thaliana* se ha identificado un gen homólogo a *ispG*. Este gen es capaz de complementar la mutante de *E. coli* deficiente en *ispG*. Además, la proteína *ispG* es importada a los plástidos. Hecho congruente con la localización de la vía MEP en plantas (Querol y col., 2002).

- D-xilulosa cinasa (XC)

Estudios realizados en *E. coli* mostraron que el compuesto 1-desoxi-D-xilulosa (DX) es incorporado eficientemente en la biosíntesis de ubiquinona. Posteriormente se demostró que el producto del gen *xylB* de *E. coli* catalizó la fosforilación del compuesto 1-desoxi-D-xilulosa (Wungsintaweekul y cols., 2001). Recientemente se demostró que la incorporación de ¹³C-1-desoxi-D-xilulosa en *E. coli* que sobreexpresa el gen *xylB* genera el producto ¹³C-1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (Hecht y cols., 2001). Estos datos han sugerido que la XC es importante para generar DXP a partir de DX endógeno o exógeno.

BIOSÍNTESIS DE ISOPRENOIDES EN PLANTAS

Localización de la vía MEP en los plástidos

Varias evidencias han apoyado la localización de la vía MEP en los plástidos (Figura #7). Experimentos de marcaje han mostrado que las clorofilas, los carotenoides, los tocoferoles, la plastoquinona-9 y el isopreno son formados a través de la vía MEP, mientras que los fitoesteroles son sintetizados mediante la vía mevalonato. La biosíntesis de las vitaminas piridoxal y tiamina en plantas también apoyan esta idea. El compuesto 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato es precursor para la biosíntesis de las vitaminas antes mencionadas, proceso que tiene lugar en los plástidos (Julliard y Douce., 1991). Otra evidencia esta basada en la teoría endosimbiótica. La cianobacteria *Synechocystis* utiliza únicamente la vía MEP para la biosíntesis de sus isoprenoides (Disch, 1998). Las cianobacterias se han postulado como los antecesores de los plástidos endosimbióticos, entonces muy probablemente los plástidos conservaron la vía MEP durante el proceso de endosimbiosis.

Datos nuevos que apoyan la localización de la vía MEP en los plástidos, han sido obtenidos con el análisis de las proteínas descritas para la vía MEP. Las proteínas tienen en su amino terminal características de péptidos señal a plástido. Esto ha sugerido que las proteínas son transportadas a los plástidos donde realizan su función. Hasta el momento se ha demostrado experimentalmente que la enzima DXS de tomate (Lois y cols., 2000) y de *Arabidopsis* (datos de esta tesis) son importadas a plástidos.

Comunicación entre las vías mevalonato y MEP

Varios datos experimentales han sugerido que existe intercambio de algún intermediario(s) entre ambas vías (Figura #7). Experimentos de marcaje hechos con [^{13}C]-glucosa o [^{13}C]-mevalonato en embriones de *Ginkgo biloba*, mostraron que entre el 98 y 99 % de los ginkgolidos (diterpenos) fueron formados a través de la vía MEP, mientras que entre 1 y 2 % de los ginkgolidos fueron marcados de acuerdo a la vía del mevalonato (citado en Arigoni y cols., 1997). Datos similares se obtuvieron en la biosíntesis de fitol en cultivos celulares de *Heteroscyphus planus* (Nabeta y cols., 1995). Estos datos sugirieron que existe comunicación entre ambas vías Mev y MEP. Otros experimentos han sugerido el intercambio de la vía MEP hacia la vía mevalonato. Cultivos celulares de *Catharanthus roseus* fueron incubados con [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-1-DX y [$2,3,4,5\text{-}^{13}\text{C}_4$]-1-DX. En este caso, la mayoría del compuesto [^{13}C]-DX fue incorporado en la biosíntesis de fitol y carotenoides y alrededor de un 6% del [^{13}C]-DX fue incorporado en la biosíntesis de fitoesterol, el cual se sintetiza a través de la vía mevalonato (Arigoni y cols., 1997).

Recientemente se ha demostrado que la vía MEP es la ruta principal para la biosíntesis de *ent*-kaureno (precursor para la biosíntesis de giberelinas) en *Arabidopsis*. Pero también se demostró que hay una parcial contribución de la vía del mevalonato para la biosíntesis del *ent*-kaureno (Kasahara y cols., 2002). Paralelamente se observó que el compuesto [$2\text{-}^{13}\text{C}$]-DX fue incorporado en la biosíntesis de campesterol (fitoesterol), esto ha indicado que hay una menor contribución de la vía MEP hacia la ruta del mevalonato (Kasahara y cols., 2002).

Biosíntesis de isoprenoides en plantas

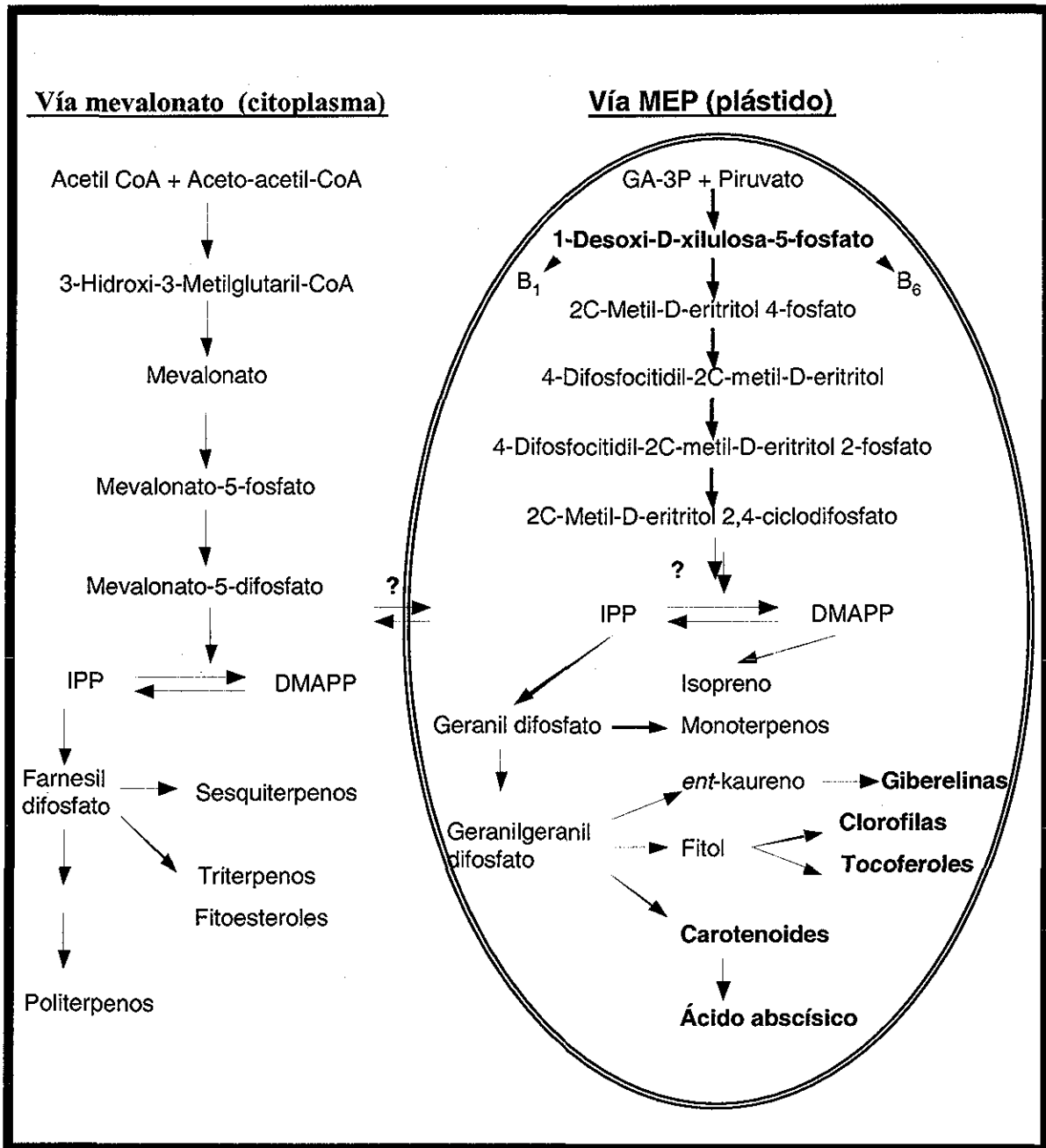


Figura #7. Representación esquemática de la biosíntesis de IPP e isoprenoides en plantas. Las flechas ubicadas en el plástido indican la probable comunicación entre las vías mevalonato y MEP. ? denota pasos no definidos en la vía MEP. GA-3P, gliceraldehído 3-fosfato; B₁ tiamina; B₆ piridoxol; IPP, isopentenil difosfato; DMAPP, dimetilalil difosfato.

Aunque se ha demostrado que existe comunicación entre ambas vías, aún se desconoce la naturaleza de el o los intermediario(s). Se propone que IPP podría ser una molécula compartida. Esto debido a que el IPP es un precursor común en ambas vías.

DISTRIBUCION DE LAS VIAS MEVALONATO Y 2C-METIL-D-ERITRITOL 4-FOSFATO EN LA NATURALEZA

En la tabla #3 se muestra la distribución de los genes involucrados en la biosíntesis de isoprenoides en 35 genomas secuenciados (Información tomada de Lange y cols., 2000).

- ARQUEOBACTERIAS. En los seis genomas secuenciados de arqueobacterias se han encontrado genes de la vía mevalonato, pero no de la vía MEP (Tabla #3). Además, experimentos de marcaje realizados en *Caldariella acidophilus* y *Halobacterium cutirubrum*, han permitido demostrar que estos organismos utilizan la vía mevalonato para la biosíntesis de sus isoprenoides.

- EUBACTERIAS. En el genoma de varias eubacterias de vida libre, únicamente se han encontrado genes de la vía MEP (Tabla #3). También varios estudios sobre la biosíntesis de isoprenoides han establecido que la mayoría de las eubacterias utilizan exclusivamente la vía MEP. La δ -protobacteria *Myxococcus fulvus* y la eubacteria fototrófica *Chloroflexus aurantiacus* son las excepciones, ya que éstas usan la vía mevalonato para la biosíntesis de sus isoprenoides.

- EUBACTERIAS PARÁSITAS. En el genoma de *Rickettsia prowazekii*, *Mycoplasma genitalium* y *Borrelia burgdorferi* no se han encontrado genes de la vía MEP (Tabla #3). Aunque también *R. prowazekii* y *M. genitalium* carecen de genes de la vía mevalonato (Tabla #3). Se ha observado que *R. prowazekii* no sintetiza IPP, pero tiene enzimas para condensar IPP. Posiblemente este precursor es tomado de la célula hospedera para la biosíntesis de quinonas requeridas en la respiración. En el genoma de *B. burgdorferi* se han encontrado genes de la vía mevalonato, pero su función no ha sido determinada.

- LEVADURAS Y HONGOS. En el genoma de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* solo están presentes los genes de la vía mevalonato (Tabla #3). Estudios de marcaje realizados en levaduras y hongos han confirmado que la biosíntesis de sus isoprenoides es realizada exclusivamente a través de la vía mevalonato.

- ANIMALES. En el genoma de *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y *Homo sapiens* solo existen genes para enzimas de la vía mevalonato (Tabla #3).

- EUCARIOTES FOTOSINTÉTICOS. Se ha observado que clorofitas como *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella fusca* usan exclusivamente la vía MEP para la biosíntesis de sus isoprenoides. En contraste, la rodofita *Cyanidium caldarum* y la heterocontofita *Ochromonas danica* utilizan la vía mevalonato y la vía MEP. *Euglena gracilis* es una excepción entre los eucariotes fotosintéticos, ya que al parecer usa la vía mevalonato para la biosíntesis de todos sus isoprenoides.

Tabla #3. Distribución de los genes involucrados en la biosíntesis de IPP e isoprenoides en organismos secuenciados (información tomada de Lange y cols., 2000).

ORGANISMO	VIA MEVALONATO						VIA MEP				
	AACT	HMGS	HMGR	MC	PMC	PMDC	DXS	DXR	CMES	CMEC	MECS
Arqueobacterias											
<i>Aeropyrum pernix</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Methanobact. Thermoautotr.</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Methanococcus jannashii</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pyrococcus abyssi</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Eubacterias											
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Chlamydia muridarum</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Chlamydia trachomatis</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Deinococcus radiodurans</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Haemophilus influenzae</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Helicobacter pylori</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Mycobacterium leprae</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Neisseria meningitidis</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Synechocystis</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Treponema pallidum</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Xylella fastidiosa</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Eubacterias parásitas											
<i>Borrelia burgdorferi</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rickettsia prowazekii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Levaduras											
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Schizosacch. pombe</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Animales											
<i>Caenorhabditis elegans</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Drosophila melanogaster</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Homo sapiens</i> Å	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Plantas											
<i>Arabidopsis thaliana</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Glycine max</i> Å	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Lycopersicon esculentum</i> Å	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Oryza sativa</i> Å	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Zea mays</i> Å	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+

EL signo + indica que un gen es detectado en el genoma. El - representa la ausencia de un gen. Å genomas parcialmente secuenciados.

En el genoma de las plantas superiores *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum* (tomate), *Glycine max* (soya), *Oryza sativa* (arroz) y *Zea mays* (maíz) están presentes genes tanto de la vía MEP como de la vía mevalonato.

En resumen, estudios bioquímicos, moleculares y genómicos han permitido conocer la distribución de las vías mevalonato y MEP en los diferentes grupos taxonómicos: las arqueobacterias, algunas bacterias, levaduras, hongos, algunos protozoarios y animales usan la vía mevalonato. La gran mayoría de las eubacterias, algas verdes y *Plasmodium falciparum* utilizan la vía MEP. Streptomycetes, algunas algas, musgos y hepáticas, diatomeas y plantas superiores utilizan ambas vías.

ANTECEDENTES

La mutante *cla1-1*

La caracterización de organismos mutantes, es una herramienta poderosa para identificar genes que desempeñan funciones importantes en procesos biológicos complejos, como lo es la biosíntesis de isoprenoides. A partir de una colección de plantas mutantes de *Arabidopsis* generada por la inserción del T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens*, se aisló la mutante albina denominada *cla1-1* (Mandel y cols., 1996) (Figura #8A). La caracterización inicial de *cla1-1*, mostró que la mutación provoca alteraciones en la morfología de los cloroplastos. En estas plantas los cloroplastos se caracterizan por la ausencia de membranas tilacoideas y la formación de espacios en forma de vesículas (Figura #8B). También, se observó que la producción de clorofilas y carotenoides está fuertemente disminuída (Figura #8C).

El gen *CLA1*

La caracterización molecular y genética de la mutante albina *cla1-1* mostró que el T-DNA interrumpió la secuencia codificante de un gen aún no descrito, el cual fue denominado *CLA1* (Mandel y cols., 1996). A su vez, análisis tipo Southern sugirieron que el gen *CLA1* era único en el genoma de *A. thaliana*. Mientras que análisis tipo northern mostraron que la acumulación del transcrito *CLA1* es regulada positivamente por la luz.

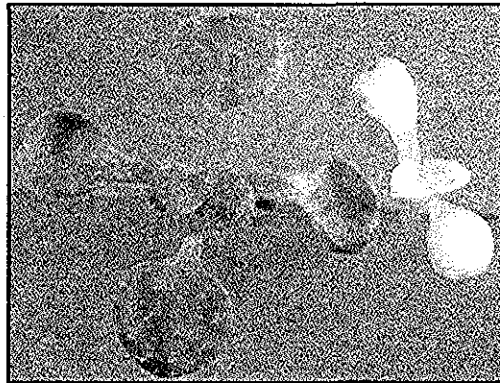
La secuencia de aminoácidos deducida del gen *CLA1* fue comparada en la base de datos. Inicialmente se encontró que la proteína *CLA1* tenía homología con enzimas transcetolasas. La comparación entre *CLA1* y una secuencia consenso obtenida del alineamiento de varias transcetolasas mostró un 23% de identidad. Además, se observó que la proteína *CLA1* conserva secuencias características de las transcetolasas, tales como el sitio de unión a tiamina difosfato (TPP) y el motivo transcetolasa. También se encontró que el amino terminal de la proteína *CLA1* tiene características de un péptido de transporte a plástidos. Esto sugirió que el producto del gen *CLA1* podría ser importado a los plástidos.

Análisis posteriores revelaron que la proteína *CLA1* presentaba mayor homología con un nuevo tipo de transcetolasa, la 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS). La DXS de *E. coli*, fue la primera enzima reportada para la recientemente identificada vía MEP (Sprenger y cols., 1997; Lois y cols., 1998). El alineamiento entre la proteína *CLA1* y la DXS de *E. coli* mostró un 63% de identidad. Además, se observó que en ambas proteínas el sitio de unión a TPP y el motivo transcetolasa estaban conservados (Figura #9).

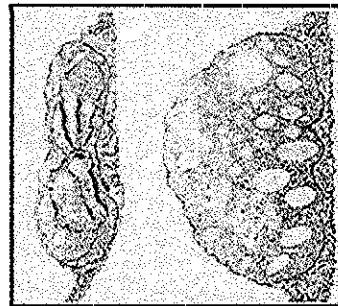
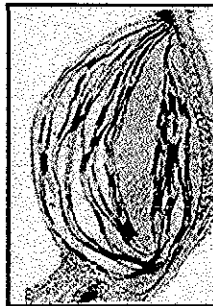
Las características fenotípicas de la mutante *cla1-1*, así como la alta similitud entre la enzima DXS y el producto del gen *CLA1*, sugirieron que este último podría codificar la 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa de *A. thaliana*.

A

silvestre

cla1-1**B**

silvestre

cla1-1**C**

	Chla	Chlb	Chl total	Carotenoides
Silvestre	818.0	324.0	1142.0	133.0
<i>cla1-1</i>	1.1	0.7	1.7	3.5
<i>CLA1/cla1</i>	520.0	193.0	713.0	118.0

Figura #8. Fenotipo de la mutante *cla1-1*. **A**, plantas de 8 días de edad crecidas en medio de germinación (MG). **B**, cloroplastos de células del mesófilo. **C**, contenido de clorofilas y carotenoides totales en plantas silvestres, mutante *cla1-1* y heteróciga *CLA1/cla1*. Los pigmentos fueron extraídos de plantas de 15 días de edad, crecidas en MG. La concentración de pigmentos está expresada como μg de pigmento por gramo de tejido fresco.

```

AtCLA1      MASSAFAPPSYIITKGLSTDCKSTSLSSSRSLVTDLPSCLKPNMNSHSNRRRAKVCAS 7
EcDXS      -----
AtCLA1      LAEKGEYVSNRPPTPLLDITINYPIMHKNLVSKELKQLSDELRSDFVIFNVSKIGGHLGSSL 120
EcDXS      -----MSFDIAKYPTLAIVDSTQEI RLLPKESL PKLCDELRRYLIDSVSRSSGHFASGL 54
           * *  :  :  :  *  :  *  :  *  *  *  :  :  *  :  :  *  :  :  *  :  :  *  :  :  *
AtCLA1      GVVELIVALHYIFNTPDQDKILWDVGHQSYPHKILIGRRGKMPTRQTNGLSGFTKRGES 180
EcDXS      GTVELTVALHYVYNTPPDQLIWDVGHQAYPHKILTGRRDKIGTIRQKGLHPFPWRGSE 114
           *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
                                           Sitio de unión a TPP
AtCLA1      HDCFGTGHSSSTTISAGLGMVGRDLKGNMNVVAVIGDGAMTAGQAYEAMNAGYLDSDM 240
EcDXS      YDVLVSGHSSTTISAGIGIAVAEKEKGNRRRTVCVIGDGAIITAGMAFEAMNHAGDIRPDM 174
           :  *  :  :  *  *  *  :  :  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
                                           GDGXXXEGXXXEXXXAXXXLXX
AtCLA1      IVILNDNKQVSLPTATLDGPSPPV GALSALSR LQSNPALREIREVAKGMIKQIGGPMHQ 300
EcDXS      LVVLNDN-EMSISEN-----VGAINNHI AQLLSGKLYSSLREGGKRVSGVP-PIKE 224
           :  *  :  *  *  :  :  *  *  *  *  :  *  *  *  *  :  *  *  *  *  :  :  *  *  :  :  *  *  :  :  *  *  :  :  *  *  :  :  *  *  :  :  *  *  :  :  *  *
           LVXXXDXN
AtCLA1      LAAKVDEYARGMISGTGSSLF EELGLYYIGPVDGHNIDDLVAILKEVKSIRITGPVLIHV 360
EcDXS      LLKRIEEHIKGMVVPG--TIF EELGFNYIGPVDGHDVLGLITTKNMRDLK--GPQFLHI 280
           *  :  :  *  :  :  *  *  :  :  *  *  *  *  :  *  *  *  *  :  *  *  *  *  :  *  *  *  *  :  *  *  *  *  :  *  *  *  *  :  *  *  *  *  :  *  *  *  *  :  *  *  *  *
AtCLA1      VTEKGRGYPYAEARADKVVHGVKFDPATGRQFKTINKIQSYTTYFAEALVAEAEVDKDVV 420
EcDXS      MIKKGREGYPAEKDPI TFHAVPKFDPSSGCLPKSSGGI PSYSKIFGDWLCETAAKDNKILM 340
           :  *  :  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
AtCLA1      AIHAAMGGGIGLNLFQRRFPTRCFDVGIAEQHAVIFAAGLACEGLKPFCAIYSSFMQRAY 480
EcDXS      AITPAMREGSGMVEFSRKFPDRYFDVAIAEQHAVTFAAGLAIGGYKPIVAIYSTFLQRAY 400
           **  *  *  *  *  :  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
                                           Motivo transcetolasa
AtCLA1      DQVVDVLDLQKLPVRFAMDRAGLVGADGPTHC GAFDVTFMACLPNMIVMAPSDEADLFNM 540
EcDXS      DQVLHDVAIQKLPVLFALDRAGIVGADGQTHQGAFDLSYLRCIPEMIVMFPDENECROM 460
           **  *  :  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
           THDSVGI GEDGPSQMALEXXXXRXPXXXXXPXD
AtCLA1      VATAVAIDDRPSCFRYPFRNGIGVALPPGNKGVPIEIGKGRILKEGERVAL LGYGSVAVQS 600
EcDXS      LYTGYYNDGPSAVRYPRGNAVGVETPLEK---LPIGKIVKRRGEKLAII NFRTLMP- 516
           :  *  :  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
AtCLA1      CLGAAVMLEERGLNVTADARFCKPLDRALIRSLAKSHEVLITVEE-GSIGFGFSHVVQF 659
EcDXS      --EAAKVAES--LNAILVDMRFVKPIDETIILEMAASHEALVTVENAIMGAGSGVNEV 572
           **  :  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
AtCLA1      LALDGLLDGKLRPVMVLPDRYIDHGAPADQLAEAGLMPSHIAATLNLIGAPREALF 717
EcDXS      LMAHRKVPVILNIG---LPDFFI PQGIQEEMRAELGLDAAGMEAKIKAWLA----- 620
           *  :  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

Figura # 9. Alineamiento entre la proteína codificada por el gen *CLA1* (*AtCLA1*) y la 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa de *E. coli* (*EcDXS*). En ambas secuencias se indica el sitio de unión a tiamina difosfato y el motivo transcetolasa, así como la secuencia consenso obtenida del alineamiento de 22 transcetolasas (Schenk y cols., 1998). La secuencia subrayada indica el posible péptido de transporte a cloroplasto de la proteína CLA1. TPP, tiamin difosfato

Estudios sobre la 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa

Aunque la enzima DXS ha sido caracterizada en algunas especies de bacterias y plantas, aún se desconocen aspectos relacionados con su expresión y regulación. A continuación se mencionan los avances que se han logrado al respecto:

- DXS de *Bacillus subtilis*

El gen *DXS* de *B. subtilis* (*BsDXS*) fué expresado en una cepa de *E. coli* genéticamente modificada para producir licopeno. Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de la DXS en la biosíntesis de isoprenoides, se analizó la actividad de DXS, así como el contenido de licopeno y ubiquinona-8 (Harker y Bramley, 1999). En comparación con las bacterias control, las bacterias que sobreexpresan el gen *BsDXS* aumentaron 2 veces la actividad de DXS. Este incremento en la actividad se reflejó en un aumento de 2 y 1.5 veces en los niveles de licopeno y ubiquinona respectivamente.

- DXS de *Synechocystis* sp

La expresión del gen *DXS* de *Synechocystis* sp 6803 en una cepa de *E. coli* productora de licopeno, provocó un incremento de 1.8 veces en la actividad de DXS, así como un aumento de 1.5 veces en los niveles de licopeno y ubiquinona (Harker y Bramley, 1999).

- DXS de *Synechococcus leopoliensis*

El gen *DXS* de *S. leopoliensis* SAUG 1402-1 (cianobacteria unicelular) fué expresado en *E. coli*. El efecto de dicha sobreexpresión fué evaluado a través de la producción de dimetilalil difosfato (DMAPP) (Miller y cols., 2000). En comparación con bacterias silvestres, las bacterias recombinantes aumentaron entre 5 y 8 veces su contenido de DMAPP. Estos resultados sugirieron que la DXS es una enzima limitante en la biosíntesis de isoprenoides, al menos en bacterias (Miller y cols., 1999). Paralelamente se comparó el efecto de la sobreexpresión de la enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXR) de *S. leopoliensis*. Los resultados mostraron que la sobreexpresión de la DXR no elevaba los niveles de DMAPP. Estos datos permitieron concluir que al menos en bacterias la DXR no es una enzima limitante en la vía MEP (Miller y cols., 1999).

- DXS de *Streptomyces* sp

Las enzimas DXS y DXR de *Streptomyces* sp CL190 fueron expresadas paralelamente en *E. coli* (Kuzuyama y cols., 2000). El efecto de la sobreexpresión de DXS y DXR fué analizado a través de la producción de ubiquinona. Los resultados mostraron que la sobreexpresión de la DXS conduce a un incremento en los niveles de ubiquinona. Este incremento no se observó en la sobreexpresión de la DXR. Estos datos también sugirieron que la enzima DXS funciona como una enzima limitante en la vía MEP. Esta idea fué apoyada cuando se determinaron parámetros cinéticos de ambas enzimas, tales como la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m). La k_{cat}/K_m de DXS se estimó en $2.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$, mientras que la k_{cat}/K_m de DXR fué estimada en

$2,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$. Así, este valor para la DXS fue menor que para la DXR por un factor de 8. Esta diferencia apoyó que la DXS es una enzima limitante en la vía MEP, al menos en *E. coli*.

- DXS de *Rhodobacter capsulatus*

R. capsulatus es una bacteria purpúrea no sulfurosa que puede crecer en un ambiente aeróbico o utilizar su maquinaria fotosintética para crecer anaeróbicamente. En el genoma de *R. capsulatus* existen dos genes DXS (*DXS-A* y *DXS-B*), los cuales codifican DX sintetas funcionales (Hahn y cols., 2001). El gen *DXS-A* está localizado en el operón fotosintético, mientras que el gen *DXS-B* está localizado en otra parte del genoma. Entre las proteínas DXS-A y DXS-B existe un 64.3% de identidad. Hahn y cols., (2001), también reportaron el alineamiento múltiple entre DXS-A y 10 enzimas DXS descritas en otras especies. Los resultados mostraron que en todos los casos el sitio de unión a TPP y el motivo transcetolasa están conservados. A diferencia de las transcetolasas típicas, las DXS presentan cuatro aminoácidos diferentes al inicio del motivo transcetolasa. Las transcetolasas tienen la secuencia THDS, la cual es reemplazada por la secuencia DRAG en las DXS. Estos datos han llevado a proponer que las DXS pueden ser identificadas por la secuencia DRAG. Sin embargo, una excepción encontrada hasta el momento es la proteína putativa DXS de *Plasmodium falciparum*, la cual tiene los aminoácidos GRSG en lugar de la secuencia DRAG. Además, esta proteína carece del residuo Histidina (THDS) conservado en todas las transcetolasas típicas.

- DXS de *Streptomyces coelicolor*

Streptomyces es una bacteria filamentosa gram positiva que utiliza la vía MEP en los primeros estadios de su crecimiento. Esta es reemplazada por la vía mevalonato durante estadios de fermentación. La búsqueda de secuencias similares a genes de la vía MEP en el genoma de *S. coelicolor*, mostró la presencia de dos genes para DXS (*DXS1* y *DXS2*). Ambos genes codifican DX sintetas funcionales. La identidad entre ellas es 80 % (Cane y col., 2001).

- DXS de *Lycopersicon esculentum*

En tomate fue aislado e identificado un gen con similitud para DXS. Para demostrar su función bioquímica, el gen *LeDXS* fue expresado en una mutante de *E. coli* deficiente en DXS. Los ensayos de complementación mostraron que el gen *LeDXS* codifica una DXS funcional (Lois y cols. 2000).

El patrón de expresión del gen *LeDXS* fue analizado a través de ensayos tipo northern blot. La acumulación del transcrito DXS fue detectada en hojas, tallo, inflorescencias, frutos y raíces. En el caso particular del fruto, los niveles del transcrito de DXS incrementaron considerablemente durante su maduración. Estos datos mostraron que la acumulación del transcrito DXS en el tomate es regulada por señales órgano-específicas y de desarrollo. Cabe señalar que el incremento en los niveles de mensajero DXS correlacionaron con la transición de fruto verde a fruto

anaranjado, lo cual sugirió que la inducción de *DXS* está asociada con la activación de la biosíntesis de carotenoides. Estos resultados apoyan la función limitante de la *DXS* en la biosíntesis de carotenoides durante el desarrollo del fruto (Lois y cols. 2000). En comparación, se ha demostrado que los niveles de mensajero y proteína de la *DXR* de tomate, se mantuvieron constantes durante la transición de fruto verde a fruto anaranjado (Rodríguez-Concepción y cols., 2001). Estos resultados sugieren que la acumulación masiva de carotenoides no parece requerir niveles elevados de expresión de la *DXR*, datos que apoyan un papel no limitante de esta enzima durante la biosíntesis de isoprenoides plastídicos.

- *DXS* de *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Oryza sativa* y *Medicago truncatula*

La infección de raíces de maíz (*Zea mays*), cebada (*Triticum aestivum*) y arroz (*Oryza sativa*) con el hongo *Glomus intraradices* (simbiosis micorrizal), provoca un incremento en los niveles de los transcritos *DXS* (Walter y cols., 2000). Esta inducción, correlaciona temporal y espacialmente con la acumulación de dos clases de apocarotenoides. En el caso particular de maíz, las raíces no infectadas acumulan un transcrito de 2.8 kb. Pero cuando las raíces son infectadas con el hongo, se induce la acumulación de un nuevo transcrito de 2.9 kb. Esto sugiere la presencia de dos genes para la *DXS* y que sus mensajeros están regulados diferencialmente. Los datos obtenidos de este trabajo, también sugieren que la expresión de genes de la vía MEP, tales como *DXS* pueden ser inducidos por hongos simbiotes. Recientemente se reportó que alfalfa (*Medicago truncatula*) tiene dos genes *DXS*, los cuales codifican proteínas *DXS* funcionales. Estas proteínas muestran 70 % de identidad y un peso molecular de alrededor de 70 kDa (Walter y cols., 2002)

OBJETIVO GENERAL

- Estudiar la participación del gen *CLA1* en la biosíntesis de isoprenoides plastídicos en *Arabidopsis thaliana*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la función bioquímica de la proteína codificada por el gen *CLA1*.

- Analizar el patrón de expresión espacial y temporal del gene *CLA1* en *A. thaliana*.

- Modular los niveles de la proteína codificada por el gen *CLA1* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* y analizar su efecto en la biosíntesis de isoprenoides plastídicos.

METODOLOGÍA ADICIONAL

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Plantas de *Nicotiana tabacum* (ecotipo W38) y *Arabidopsis thaliana* (ecotipo columbia) fueron crecidas en el sustrato Metro-Mix 200 (Grace Sierra, Milpitas, CA). Las plantas fueron mantenidas en condiciones controladas (24°C, 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad).

Expresión transitoria en protoplastos

- Construcción de la fusión PTPCLA-GFP.

Un fragmento de 210 pb de la región 5' del cDNA *CLA1* fue amplificado por PCR, utilizando los oligos PTC-BamH (GCGGATCCAATGGCTTCTTCIGC) y PTC-NcoI (TTGTCTGGTGGTTGAGGIACCGCG). Estos contienen los sitios de restricción BamHI y NcoI respectivamente. El fragmento amplificado fue insertado entre la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente (GFP) y el promotor CaMV 35S, en el plásmido pHBT/sGFP-TYG-nos (Chiu W. y cols., 1996). La construcción generada fue llamada pHBT/PTPCLA-GFP.

- Obtención y transformación de protoplastos.

Los protoplastos fueron aislados de hojas de tabaco. Hojas de 5 ó 6 semanas de edad fueron cortadas en pedazos de aproximadamente 0.5 cm². Estos se incubaron en una solución de digestión (2.5% de celulasa R-10, 0.5% de macerosima R-10, 400 mM de manitol, 0.1% de BSA y 10 mM de MES) durante 3 ó 4 horas en condiciones de oscuridad y una temperatura de 24°C. Posteriormente los protoplastos fueron filtrados a través de una malla con poros de 140 µ, y lavados dos veces con 20 ml de una solución de lavado (500 mM de manitol, 154 mM de NaCl, 125 mM de CaCl₂, 5 mM de KCl, 5 mM de glucosa y 1.5 mM de MES). Los protoplastos fueron resuspendidos en la solución de incubación (400 mM de manitol, 15 mM de MgCl₂ y 5 mM de MES) y finalmente cuantificados en un hematocitómetro.

Aproximadamente 5 X 10⁵ protoplastos fueron incubados con 30 µg del plásmido de interés, 50 µg de DNA de esperma de salmón y un volumen de la solución de transformación (400 mM de manitol, 100 mM de Ca(NO₃)₂, 40% de polietilenglicol #4000) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la solución de transformación fue retirada mediante diluciones hechas con la solución de lavado. Los protoplastos fueron colectados por centrifugación, resuspendidos en 3 ml de medio de cultivo para protoplastos (400 mM de manitol, 1X de sales de Murashige and Skoog, 400 mM de glucosa, vitaminas B5, pH 5.8) e incubados en oscuridad durante 24 horas antes de ser analizados.

- Localización de la proteína verde fluorescente. La señal de la GFP fue observada a través de un microscopio Zeiss Axioskop equipado con el condensador de epi-fluorescencia III. Como fuente de luz se utilizó un bulbo de mercurio de alta presión HBO 50W. Al microscopio se le adicionó un filtro de interferencia para bloquear la

autofluorescencia de la clorofila. Las fotografías fueron tomadas con película de color asa 400.

Determinación de ABA en semillas

La cuantificación de ABA fué hecha con semillas que nunca fueron expuestas a condiciones de frío. 10 mg de semillas fueron utilizados para obtener los extractos, con éstos se hizo una dilución al 50%. El protocolo de extracción y cuantificación de ABA fué realizado como se reporta en Estévez y cols., 2001.

Análisis de secuencias

Los alineamientos de secuencias fueron hechos con el programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). La búsqueda de genes homólogos de la vía MEP en el genoma de *A. thaliana* fué realizada en la base de datos MIPS-A. thaliana genome project (<http://www.mips.biochem.mpg.de/proj/thal/>) y TAIR (<http://www.arabidopsis.org>).

RESULTADOS

• ARTÍCULOS PUBLICADOS

- Estévez y cols. (2000) *Plant Physiol.* 124. 95-103.
- Estévez y cols. (2001) *J. Biol. Chem.* 276 (25), 22901-22909.

Analysis of the Expression of *CLA1*, a Gene That Encodes the 1-Deoxyxylulose 5-Phosphate Synthase of the 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphate Pathway in *Arabidopsis*¹

Juan M. Estévez, Araceli Cantero, Cynthia Romero, Hiroshi Kawaide, Luis F. Jiménez, Tomohisa Kuzuyama, Haruo Seto, Yuji Kamiya, and Patricia León*

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001 Chamilpa, Apdo Postal 510-3 Cuernavaca Morelos 62271, México (J.M.E., A.C., C.R., P.L.); Frontier Research Program, Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Hirosawa 2-1, Wako-shi, Saitama, 351-0198, Japan (H.K., Y.K.); Laboratorio de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México (L.F.J.); and Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan (T.K., H.S.)

The discovery of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway for the biosynthesis of isoprenoids raises the important question of the nature and regulation of the enzymes involved in this pathway. *CLA1*, a gene previously isolated from *Arabidopsis*, encodes the first enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway, 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase. We demonstrate this enzyme activity by complementation of the *cla1-1* mutant phenotype and by direct enzymatic assays. Based on mRNA and protein expression patterns this enzyme is expressed mainly in developing photosynthetic and non-photosynthetic tissues. The β -glucuronidase expression pattern driven from the *CLA1* gene regulatory region supports the northern and protein data while also showing that this gene has some level of expression in most tissues of the plant. A mutation in the *CLA1* gene interferes with the normal development of chloroplasts and etioplasts, but does not seem to affect amyloplast structure. Microscopic analysis also shows a pleiotropic effect of the *CLA1* gene mutation in mesophyll tissue formation.

In higher plants isoprenoids are derived from isopentenyl diphosphate (IPP) and synthesized in at least two different compartments, the cytoplasm and the chloroplast. For a long time it was assumed that IPP was synthesized exclusively by the mevalonate pathway in all organisms (Spurgeon and Porter, 1981; Goldstein and Brown, 1990). However, independent studies have demonstrated that in eubacteria, green algae, and plants, IPP is also synthesized by a non-mevalonate pathway designated as the 2-C-methyl-D-erythritol-4-P (MEP) pathway (for review, see Rohmer, 1998, 1999; Lichtenthaler, 1999). Thus in plants cytosolic IPP is synthesized by the mevalonate pathway and plastidic IPP is synthesized by the MEP pathway (Lichtenthaler, 1999). In the MEP pathway IPP is synthesized from pyruvate and glyceraldehyde-3-P via novel intermediates (Rohmer et al., 1993; Eisenreich et al., 1996; Schwender et al., 1996; Lichtenthaler et al., 1997). Labeling and nuclear magnetic resonance studies showed that 1-deoxyxylulose 5-P

(DXP) is the first intermediate in this pathway (Rohmer et al., 1996; Arigoni et al., 1997). Genes encoding for the first enzyme in this pathway, DXP synthase, were isolated from several organisms and the enzymatic activity of their encoded proteins has been corroborated (Sprenger et al., 1997; Bouvier et al., 1998; Lange et al., 1998; Lois et al., 1998; Lichtenthaler, 1999). In addition to its role in IPP synthesis the DXP synthase in plants, as in *Escherichia coli*, seems also to be required for the synthesis of thiamin and pyridoxol (Julliard and Douce, 1991; Hill et al., 1996). The next gene involved in the MEP pathway has been isolated from *E. coli*, peppermint, and *Arabidopsis* (Takahashi et al., 1998; Lange and Croteau, 1999; Schwender et al., 1999). It encodes an enzyme that converts DXP to MEP (Takahashi et al., 1998). Finally a third intermediate product has been recently postulated, as 4-(cytidine-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol. This product is synthesized from MEP by an enzyme encoded by the *ygbP* gene from *E. coli* (Rohdich et al., 1999). Independently of this study we have proved that the latter intermediate is essential for the formation of IPP (Kuzuyama et al., 2000a).

The production of specific chloroplastic isoprenoids such as carotenoids and phytol has now been demonstrated to depend on the MEP pathway (Eisenreich et al., 1996; Arigoni et al., 1997; Knöss et

¹ This work was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and Dirección General de Asuntos para el Personal Académico (grant nos. 110P-N9506 and IN205697) and by the Pew Charitable Trust.

*Corresponding author; e-mail: patricia@ibt.unam.mx; fax: 52-73-139988.

al., 1997; Lichtenthaler et al., 1997; Zeidler et al., 1997). Thus the analysis of the regulation of the enzymes in the MEP pathway is important in understanding the biosynthesis and possible manipulation of such terpenoids in plants. The isolation of albino plant mutants in *Arabidopsis* resulted in the identification of a gene required for the synthesis of both chlorophyll and carotenoids, named *CLA1* (Mandel et al., 1996). In the *cla1-1* mutant plastid development is impaired at an early stage resulting in almost no thylakoid membrane proliferation; the plastids resemble an early proplastid stage. *CLA1* is a single gene in the *Arabidopsis* genome and its disruption affects the expression of both nuclear- and chloroplast-encoded photosynthetic genes (Mandel et al., 1996). The *CLA1* protein sequence has extensive identity with other reported DXP synthases.

In this report we demonstrate that the *CLA1* gene encodes a functional DXP synthase. To understand the regulation of this gene, we performed a detailed analysis of the *CLA1* gene mRNA expression and protein patterns. We show that the *CLA1* gene transcripts and protein preferentially accumulate in young developing tissues. The microscopic analysis of dif-

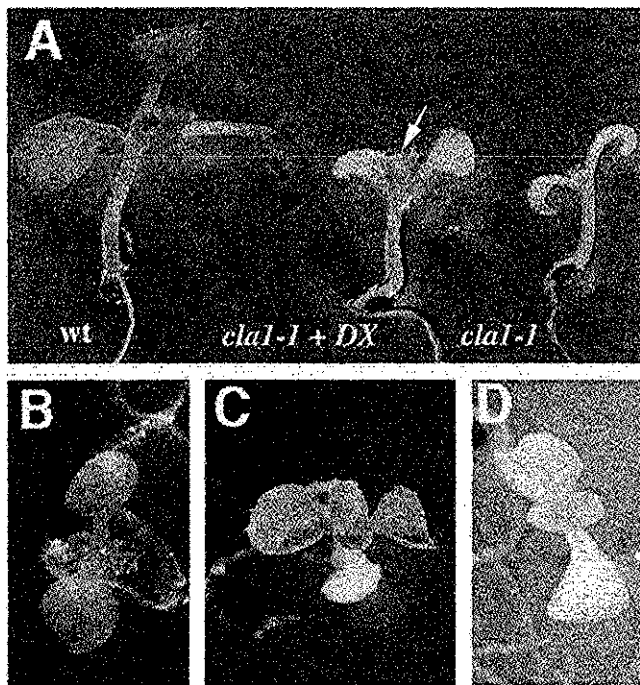


Figure 1. In vivo complementation of the albino phenotype in the *cla1-1* seedlings by DX. A, Phenotypic analysis of 10-d-old seedlings of wild type grown on GM medium (left); *cla1-1* grown on GM medium supplemented with 0.02% (w/v) of DX (center); and *cla1-1* grown on GM medium (right). The arrow indicates the first pair of leaves on the DX supplemented mutant plant, where a green phenotype is clearly visible. An upper view is shown for a wild-type plant grown on GM medium (B), a 15-d-old *cla1-1* seedling grown on GM medium supplemented with 0.02% (w/v) DX (C) in which the two pairs of true leaves can be seen, and a 15-d-old *cla1-1* seedling grown on GM medium (D).

Table I. Pigment quantification

Pigments were extracted from 15-d-old plants grown in GM or GM supplemented during 10 d with 0.02% DX.

Sample	Chl a	Chl b	Chl Total	Carotenoids
	<i>mg pigment g⁻¹ fresh wt</i>			
Wild type	590	242	832	130
<i>cla1-1</i> DX	170	108	278	61
<i>cla1-1</i>	11	19	30	10

ferent plastids in the *cla1-1* mutant demonstrates that the disruption of the *CLA1* gene affects the morphology of chloroplasts and etioplasts and alters the final stages of cellular morphogenesis in mesophyll tissue formation.

RESULTS

The Albino Phenotype of the *cla1-1* Plant Can Be Rescued by the Addition of 1-Deoxy-D-Xylulose (DX)

The extensive amino acid similarity of the *CLA1* gene to the published DXP synthases (Sprenger et al., 1997; Bouvier et al., 1998; Lange et al., 1998; Lois et al., 1998; Lichtenthaler, 1999) suggested that the *CLA1* gene could encode a DXP synthase. To test whether the *CLA1* protein functions as a DXP synthase we took advantage of the albino phenotype in the *cla1-1* mutant. Synthetic DX, a non-phosphorylated version of the product of the DXP synthase, was supplemented on the growth medium of *cla1-1* plants. This product was used to ensure penetration into the plant cells, as it was demonstrated to be efficiently incorporated into plastidic isoprenoids (Arigoni et al., 1997; Zeidler et al., 1997). As the *cla1-1* mutation is lethal on soil, seed stocks are maintained as heterozygotes. Upon selfing, one-quarter of the progeny are albino on medium. After germination, such albino homozygous mutant plants were selected and transferred to plates containing 0.02% (w/v) DX. The development of these plants was assessed by visual inspection and their pigment content was quantified.

As shown in Figure 1, the first true leaves of the *cla1-1* plants grown in germination media (GM) media developed the albino phenotype characteristic of this mutant (Fig. 1, A, right side and D). In contrast, *cla1-1* plants grown on the same media supplemented with DX turned green (Fig. 1, A [middle plant] and C). For comparison, a Wassilewskija (WS) wild-type plant grown in GM media is shown in the left side of Figure 1, A and B. This green phenotype correlates with a substantial increase in chlorophyll and carotenoid content of the *cla1-1* plants supplemented with DX compared with the ones grown in GM media (Table I). Greening observed in the leaves of the *cla1-1* plants supplemented with DX is specific for this mutant, as other unrelated albino plants such as *alb1-1* and *alb2-1* (van der Veen and Blankenstijn de Vries, 1973; Relichova, 1976) remain albino (data not shown). The *cla1-1* cotyledons have the capacity

to respond to DX, but only upon direct exposure to this chemical during seed imbibition. We noticed however that DX at the concentration used in these experiments (0.02%) has a toxic effect in the early stages of development, as we detected yellowish seedlings in *cla1-1* and wild-type plants when this compound was present during germination (data not shown).

The biochemical function of the recombinant CLA1 protein was also examined *in vitro*. The GST-CLA1 fusion protein expressed in *E. coli* was used to test for DXP synthase activity. The product obtained after incubation of pyruvate and glyceraldehyde-3-P with the CLA1 protein was treated with alkaline phosphatase and its identity was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) as the trimethylsilylated derivative. As shown in Table II the product obtained from this reaction were determined to be DX and are in agreement with the previously reported for peppermint DXP synthase (Lange et al., 1998).

Tissue- and Organ-Specific Expression of the CLA1 Gene in Arabidopsis

Although considerable information has been accumulated recently on the MEP pathway in plants, the expression pattern and regulation of the enzymes participating in this pathway are presently unknown. We decided to study the CLA1 gene expression pattern at the mRNA and protein levels. The RNA-blot hybridization data presented in Figure 2A demonstrate that the CLA1 mRNA is detected in all tissues examined, including non-photosynthetic tissues such as roots. CLA1 gene transcripts are especially abundant in seedlings (Fig. 2A, lanes 1 and 7) and in flower buds compared with the other organs analyzed (Fig. 2A, lane 5).

To obtain more insight into the participation of this gene in Arabidopsis development we investigated its expression pattern using a β -glucuronidase (GUS) reporter gene construct. A 14-kb upstream region from the CLA1 gene initiation codon was used to generate a translational fusion with the GUS reporter gene *uidA*. Eight independent transgenic plants from the T₂ generation were analyzed for GUS expression. Although some variation in the intensity of staining

was observed among the lines carrying this construct, all of them showed the same GUS staining pattern. According to the pattern observed the CLA1 gene is expressed very early in germinating seeds. As shown in Figure 3A, GUS activity was detected in the protruding root (with the exception of the root cap) 48 h after water imbibition. In 3-d-old seedlings (Fig. 3B), GUS is detected primarily in the hypocotyl and in the emerging cotyledons with faint staining in the root. In 5-d-old seedlings, GUS activity is detected in most of the plant, the cotyledons, the hypocotyl, and the root (Fig. 3C). In older seedlings, GUS staining is especially strong in the expanding leaves, including vascular tissue and trichomes (Fig. 3D), but a faint staining in the hypocotyl and root is also present. A transverse section of the inflorescence showed GUS activity in most of the cells: in the epidermis, including the trichomes, and in the cortex, vascular tissue, and pith (Fig. 3F). In the silique, GUS staining is observed in the locules and in the funiculus, but there is no expression detected in immature seeds (Fig. 3E). In the flower, GUS staining is intense in the sepals and the stamens (Fig. 3G), whereas in the petals, GUS activity is faint. Within carpels, staining is mostly restricted to the upper part of the stigma and in the stigmatic papillae (Fig. 3, G and H).

Based on these two analyses we can conclude that the CLA1 gene is widely expressed throughout the Arabidopsis plant and that higher expression levels are found in the young tissues of the plant.

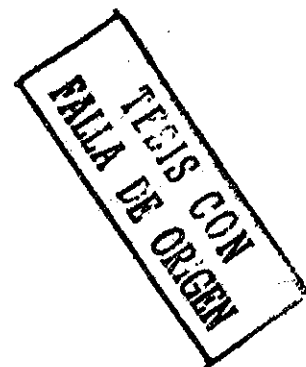
Characterization of the CLA1 Protein

To characterize the CLA1 gene product we performed western-blot analysis using polyclonal antibodies raised against a fusion protein between an *E. coli* glutathione S-transferase (GST) and most of the CLA1 protein. We detected a 70-kD protein in total extracts of 15-d-old wild-type seedlings (Fig. 2B, lane 2) that is not detected in extracts from *cla1-1* plants (Fig. 2B, lane 1). The accumulation pattern of the CLA1 protein was analyzed in total protein extracts from different Arabidopsis tissues. As shown in Figure 2B, the CLA1 protein is detected in most plant tissues except in 24-h-water-imbibed seeds (Fig.

Table II. Identification of DX obtained by incubation of pyruvate/glyceraldehyde-3-P with CLA1 protein

Sample	HPLC	GC	MS <i>m/z</i> (relative intensity)
	<i>min</i>		
Product ^a	8.6	7.33	307 (21), 218 (100), 204 (27), 147 (91), 73 (57)
DX ^b	8.5	7.30	307 (14), 218 (100), 204 (31), 147 (85), 73 (73)

^a The data presented in this row correspond to those values obtained after the samples were treated with alkaline phosphatase in both crude enzyme extracts and an affinity-purified enzyme protein. The values are compared with those published for peppermint (Lange et al., 1998). ^b DX corresponds to the authentic DX molecule. Molecular ion peaks of trimethylsilyl ether products (calculated as *m/z* 350) were not observed.



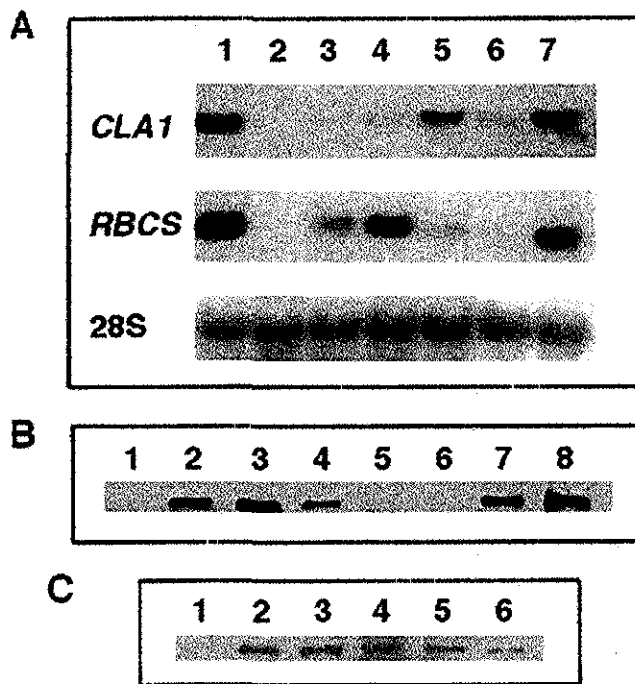


Figure 2. Analysis of *CLA1* gene transcript and protein accumulation in Arabidopsis plants. **A**, RNA-blot analysis of the *CLA1* transcript. Five micrograms of total RNA was purified from 15-d-old wild-type seedlings (lane 1), *cla1-1* plants (lane 2), and different tissues of wild-type plants including mature leaves (lane 3), cauline leaves (lane 4), buds (lane 5), roots (lane 6), and 5-d-old seedlings (lane 7). The probes used were *CLA1* and *RBCS*, as well as rRNA as an RNA-loading control as indicated in the left side of the panel. **B**, *CLA1* protein accumulation in different tissues. Western-blot analyses were performed using total protein extracts obtained from 15-d-old *cla1-1* seedlings (lane 1), 15-d-old wild-type seedlings (lane 2), young rosette leaves (lane 3), mature rosette leaves (lane 4), roots (lane 5), 24-h-imbibed seeds (lane 6), flowers (lane 7), and immature siliques (lane 8). Fifteen micrograms of total protein extracts was loaded in each lane except for roots and seeds, where 30 and 45 μ g was used, respectively. **C**, *CLA1* protein developmental expression. Western-blot analysis shows *CLA1* protein accumulation in 15-d-old *cla1-1* seedlings (lane 1), 5-d-old (lane 2), 8-d-old (lane 3), 15-d-old (lane 4), 20-d-old (lane 5), and 25-d-old (lane 6) wild-type seedlings. In each lane, 15 μ g of total protein was loaded.

2B, lane 6). *CLA1* is particularly abundant in young leaves, in buds, and in immature siliques, but barely detectable in roots. These results contrast with the northern and transgenic plant analyses in which the *CLA1* gene is expressed at similar levels in both roots and mature leaves (Fig. 2A, lanes 3 and 6). The *CLA1* protein accumulates most predominately in the young tissues of the plant (Fig. 2B, lanes 3 versus 4). When we compared the levels of *CLA1* protein in extracts from seedlings of different ages we found that this protein increases as organs mature, reaching a maximum in 15-d-old plantlets as shown in Figure 2C, lane 4. After this stage the amount of *CLA1* protein decreases in relation to the age of the plant (Fig. 2C).

Organelle and Tissue Morphology in the *cla1-1* Plant

Our initial analysis demonstrated that the *CLA1* protein in Arabidopsis is required for normal chloroplast differentiation (Mandel et al., 1996). Based on the *CLA1* function and its mRNA and protein expression patterns we decided to re-analyze the structure of other plastid types in *cla1-1* plants. Using transmission electron microscopy the morphology of etioplasts from the cotyledons of dark-adapted *cla1-1* seedlings was analyzed. As *cla1-1* seed stocks are heterozygous, seeds were initially germinated on Murashige and Skoog basal salt mixture media with light for 6 d and the albino homozygous mutant plants were transferred and kept in the dark during an additional 8 d. The same treatment was followed with wild-type plants to be used as controls. As shown in Figure 4B, the ultrastructure of the dark-adapted etioplasts in *cla1-1* plant is altered in comparison with wild-type plastids (Fig. 4A). The prolamellar body in these organelles is absent and vesicles

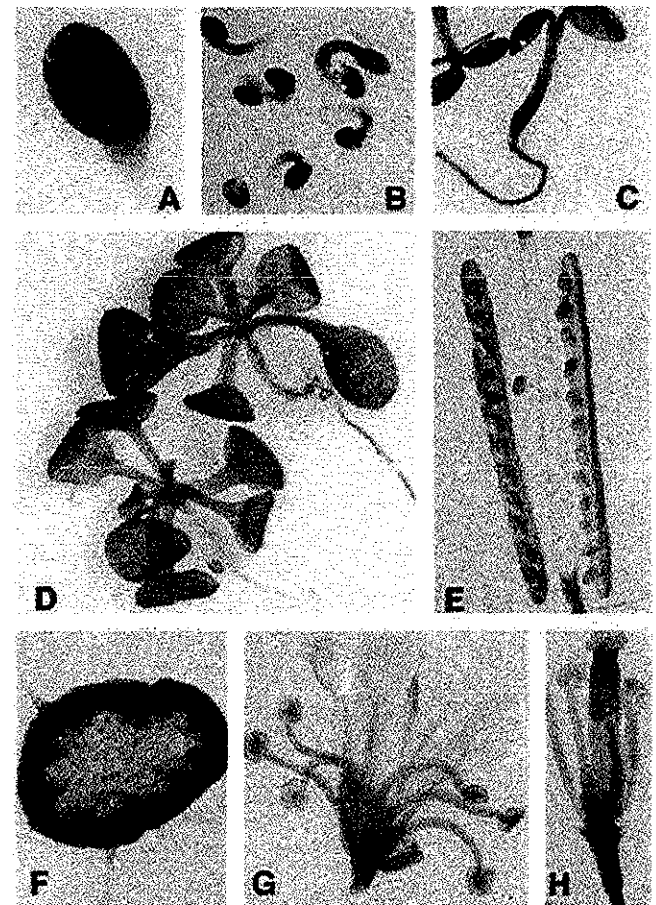


Figure 3. Histochemical analyses of GUS activity in Arabidopsis plants expressing the GUS gene under the control of the *CLA1* gene promoter. **A**, Water-imbibed (48-h) germinating seeds; **B**, 3-d-old seedlings; **C**, 5-d-old seedlings; **D**, 15-d-old seedlings; **E**, immature seeds and siliques from Arabidopsis; **F**, transverse section of the inflorescence; **G**, fully developed Arabidopsis flower; and **H**, individual stigma and anthers from a fully developed Arabidopsis flower.

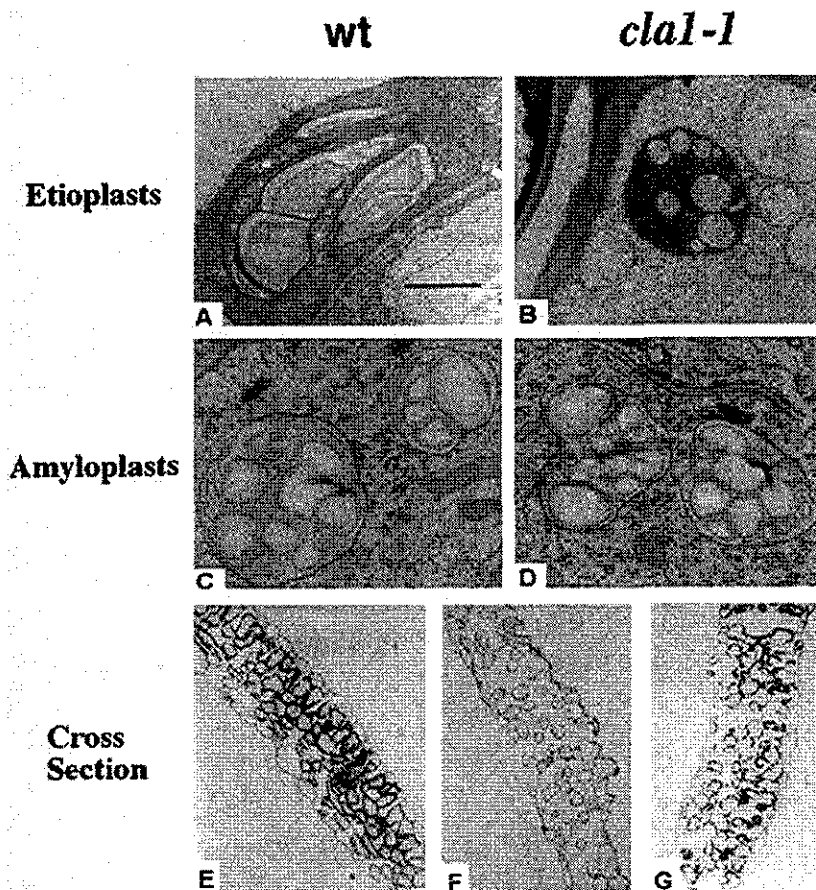


Figure 4. Microscopic analysis of the plastids and mesophyll tissue of the *cla1-1* mutant. Transmission electron microscopic examination of plastids of wild-type (A and C) and *cla1-1* (B and D) seedlings. Etioplasts were analyzed from cotyledons of seedlings that were dark-adapted for 4 d of wild type (A) and homozygous (B) *cla1-1* mutants. Amyloplasts were analyzed from 10-d-old root seedlings of wild type (C) and *cla1-1* (D) mutant. Transverse sections of the 10-d-old first leaf from plants of wild type (E), *cla1-1* (F), and *cla1-1* (G) mutant supplemented with 0.02% (w/v) DX.

are present which seem to be associated with internal membranes. We also investigated the amyloplast structure in 10-d-old roots of the *cla1-1* plant. It is interesting that as shown in Figure 4D, the morphology of this organelle does not seem to be altered compared with wild-type plants. Normal starch granules, characteristic of this plastid type, can be detected in the plastids of both wild-type and mutant plants.

A well-known event during leaf differentiation in dicot plants is the coordination with chloroplast development (Chory, 1992). Mutants have been isolated that partially uncouple such coordination, demonstrating that these processes can be separable (Mochizuki et al., 1996). We therefore asked if mutations in *CLA1* have an effect on leaf cellular morphology. As shown in Figure 4F, the transverse leaf section of the *cla1-1* plant shows an anomalous development of the mesophyll tissue compared with similar sectors from a wild-type plant (Fig. 4E). The proportion of air space compared with the mesophyll tissue is larger in the *cla1-1* mutant than in the wild-type plant. Also for the *cla1-1* mutant, the cells of the mesophyll tissue remain round and small; few palisade cells are present. This phenotype is unlikely to be the result of carbon or vitamin (thiamin or pyridoxol) deficiency as these are supplemented in the

medium. The morphological abnormalities are reversible as soon as the plastid proceeds through its differentiation pathway. When *cla1-1* plants are grown on Murashige and Skoog basal salt mixture media supplemented with DX they show a seminormal morphology of the mesophyll tissue including the presence of palisade cells (Fig. 4G).

DISCUSSION

In this report we demonstrate that the *CLA1* gene encodes the previously reported DXP synthase (Sprenger et al., 1997; Bouvier et al., 1998; Disch et al., 1998; Lange et al., 1998; Lois et al., 1998; Lichtenthaler, 1999). Early work by Arigioni and coworkers (1997) showed that DX is an effective compound for phytol and carotenoid production in culture cells of *Catharantus roseus*. We also observed that DX has a striking capacity to restore pigment biosynthesis in the *cla1-1* albino mutant. DX was efficiently absorbed by the root and transported into the leaves. It is still an open question whether DX is phosphorylated before it is converted to MEP.

The existence of two biosynthetic pathways for IPP production raises questions about the participation of each pathway in the synthesis of specific isoprenoid

compounds and inter-pathway communication. Some exchange between the cytoplasmic and chloroplastic IPP pools has been suggested (Bach and Lichtenthaler, 1982; Arigoni et al., 1997; Nabeta et al., 1997). It is interesting that despite the albino phenotype of *cla1-1* plants, low chlorophyll and carotenoid levels are detectable in this mutant (Table I). As this seems to be a null mutation, our interpretation is that cytosolic IPP probably moves into the plastids, resulting in limited pigment levels. However, this supply of cytosolic IPP is far too small to fulfill normal pigment biosynthesis requirements. Whether the supply of cytosolic IPP could be sufficient for the biosynthesis of other chloroplastic isoprenoids under specific physiological or developmental conditions needs to be defined.

This work is the first detailed characterization of DXP synthase expression patterns in plants. The *CLA1* gene is widely expressed in photosynthetic and non-photosynthetic tissues and its expression is clearly modulated throughout plant development. The maximum mRNA levels of *CLA1* correlate with the maturation stage of the leaves when there are massive requirements for chlorophylls and carotenoids. In non-photosynthetic tissues the *CLA1* expression pattern supports the participation of the MEP pathway in the production of a variety of isoprenoids. It is interesting to note that even though substantial *CLA1* mRNA levels were detected in roots by northern analysis and GUS staining of transgenic plants, the *CLA1* protein levels in roots extracts were barely detectable. A potential post-transcriptional regulation mechanism for the *CLA1* transcript might be operating in roots.

We demonstrated previously that *CLA1* is required for proper chloroplast development (Mandel et al., 1996). The data presented here further substantiate the requirement for *CLA1* to ensure development of etioplasts, but *CLA1* does not seem to be required for amyloplast differentiation. It is apparent that expression of the *CLA1* gene is not required for starch accumulation because the size and number of starch granules in the amyloplasts is similar in *cla1-1* and wild-type plants. We have observed that the mesophyll tissue of *cla1-1* is altered in comparison with wild-type plants. Similar phenotypes have been reported in other mutants that affect chloroplast development at an early stage such as *Dcl-m* and *GHOST* in tomato, *Dag* in *Antirrhinum* (Scolnik et al., 1987; Chatterjee et al., 1996; Keddie et al., 1996), and *PAC* and *ATD* in *Arabidopsis* (Reiter et al., 1994; van der Graaff, 1997). The common denominator in all is that the plastids are arrested early in development. One possibility is that early arrest interferes with production of a chloroplast signal to the cytoplasm and nucleus that directly influences the last stages of mesophyll differentiation (Susek and Chory, 1992; León et al., 1998).

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Growth Conditions

Arabidopsis ecotypes Columbia or WS seeds were grown in Metromix 200 (Grace Sierra, Milpitas, CA) in controlled growth chambers at 24°C using a 16-h light/8-h dark photoperiod with cool-white illumination ($20 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 3 to 4 weeks. Plants under sterile conditions were grown in Murashige and Skoog basal salt mixture supplemented with Gamborg's vitamins, 0.5% (w/v) MES [2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid], 1% (w/v) Suc (GM media), and 0.7% (w/v) of phytoagar in the case of solid medium. Determination of total carotenoids and chlorophylls was conducted following the protocol reported by Lichtenthaler and Wellburn (1983).

In Vivo Complementation of the *cla1-1* Albino Phenotype

The recessive albino *cla1-1* mutant is lethal on soil (Mandel et al., 1996), thus seed stocks are maintained as heterozygotes. The *cla1-1* heterozygous plants were germinated in GM media for 6 d. Homozygous albino *cla1-1* plants were transferred to GM medium or GM supplemented with 0.02% (w/v) DX. As a control, WS wild-type plants were incubated in the same type of media.

Molecular Biology Techniques

Total RNA was isolated from different plant tissues using the procedure of Logemann et al. (1987) with minor modifications. For northern blots, RNA was fractionated by electrophoresis in 1.2% (w/v) agarose gels and transferred onto Hybond N⁺ nylon membranes (Amersham Corporation, Arlington Heights, IL). Hybridizations and washes were done at high stringency conditions according to standard procedures using ³²P-radiolabeled probes (Church and Gilbert, 1984).

Production of the GSI-*CLA1* Fusion Protein and Antibody Preparation

To generate a fusion protein containing the *CLA1* gene, a 2-Kb *SspI-EcoRI* fragment of the *CLA1* cDNA was cloned downstream of the GST from the pGEX1 vector (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). This fragment contains most of the *CLA1* coding region with the exception of 197 bp of the putative chloroplast transit peptide. The generated plasmid, pGEX-*CLA1*, codes for the GST-*CLA1* fusion protein without the putative chloroplast transit peptide. The integrity of the chimeric gene was verified by direct sequencing. The isopropylthio- β -D-galactoside-induced GST-*CLA1* fusion protein was produced in *Escherichia coli* and purified by affinity chromatography using Glutathione Sepharose 4B resin (Amersham Pharmacia Biotech) according to the protocol published (Ausubel et al., 1989). For polyclonal antibody generation, purified GSI-*CLA1* protein (10 μg in 20 μL of phosphate-buffered saline) and complete Freund's adjuvant was injected intraperitoneal as

1:9 emulsion in a BALB/c mice (Harlow and Lane, 1988). Three additional injections (10 μ g each), were administered every 8 d starting 14 d after the initial injection. The ascites was collected 8 d later and titer was determined. In addition to recognizing the 70-kD CLA1 protein, this ascites fluid recognizes one abundant protein that is also present in the *cla1-1* mutant plant.

Functional Assay of CLA1 Protein

DXP synthase activity was measured using 50 μ g of the purified GST-CLA1 fusion protein. The reaction was done according to Kuzuyama et al (2000b), in 100 mM Tris [tris(hydroxymethyl)aminomethane]-HCl (pH 8.0), 1 mM $MgCl_2$, 2 mM dithiothreitol, 0.075 mM thiamine diphosphate, 20 mM glyceraldehyde-3-P, and 10 mM pyruvate at 37°C for 1 h and terminated by heating. Denatured proteins were removed by centrifugation at 15,000 rpm for 10 min. The supernatant was treated with 1 unit of bacterial alkaline phosphatase at 50°C for 1 h. The reaction mixture was treated with activated charcoal powder and filtered. The filtrate was subject to HPLC-connected Shodex SUGAR KS-801 column (8 \times 300 mm, SHOWA DENKO, Tokyo) heated at 80°C. The flow rate of water was 1 mL min^{-1} . DX was detected at 8.6 min of refractive index detector. For comparison, authentic DX was detected at 8.5 min under the same condition consistent with that previously reported by Lange, et al. (1998).

To determine the product generated by the GST-CLA1 fusion protein, eluates after HPLC separation were collected, dried, and then derivatized with *N,O* bis(trimethylsilyl)acetamide:trimethylchlorosilane:*N*-trimethylsilylimidazole (2:3:2, v/v) in pyridine at 80°C for 20 min. GC-MS analysis was performed by using Finnigan MAT GCQ ion-trap GC-MS system (Thermoquest, San Jose, CA) equipped with a 30-m \times 0.25-mm diameter fused silica capillary column coated with 0.25- μ m film thickness of DB-5MS (J&W Scientific, Folson, CA). The oven temperature was programmed from 90°C (2-min hold) at 20°C min^{-1} to 150°C, at 10°C min^{-1} to 250°C, and then at 30°C min^{-1} to 300°C with a constant velocity at 40 cm min^{-1} He.

Western-Blot Analysis

Protein samples were quantified with Bradford reagent (Bio-Rad, Hercules, CA). Samples were separated by PAGE. To verify equal protein loading a parallel gel was run and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. The proteins were transferred onto nitrocellulose (Hybond C, Amersham Pharmacia Biotech) by electroblotting for 1 h at 200 mA in 25 mM Tris, 0.2 M Gly, and 20% (w/v) methanol. Immunodetection was done using a 1:1,000 dilution of the GST-CLA1 fusion protein polyclonal antibody. An anti-mouse immunoglobulin horseradish peroxidase-conjugate was used as a secondary antibody (Amersham Pharmacia Biotech), and detection was done with an enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham Pharmacia Biotech).

Plasmid Construction

A CLA1-GUS translational fusion was constructed using a 1.4-kb fragment of the CLA1 5'-regulatory region (contained in the ESSA I FCA contig fragment no. 4, accession no. Z97339). Initially, a fragment of approximately 9 kb capable of complementing the *cla1-1* mutant phenotype (Mandel et al., 1996) was subcloned into the pBluescript II vector and subjected to Exonuclease III/Mung Bean deletions. One of such deletions, containing approximately 1.4 kb upstream of the ATG codon from the CLA1 gene was PCR-amplified and used for expression analysis. The primers used for the PCR were: ATG-Nco ($5'$ GCAGAAGAAGCCATGGGAGGTAC $3'$) that includes the CLA1 ATG codon, and BS-Hind ($5'$ GGCCAAGCTTACGCCAAGCGCGCAAT $3'$) from the flanking vector sequence, plus a HindIII site at its end. The PCR fragment generated was first cloned as a translational fusion into a vector derived from pBluescript II KS(-) plasmids (Stratagene, La Jolla, CA) containing the *uidA* (GUS) gene followed by the nopaline synthase 3' terminator from the pBin19 plasmid (Bevan, 1984), termed pBlueGUS. The entire fragment (CLA1 promoter:GUS and nopaline synthase-3') was subcloned into the binary vector pBin19 (Bevan, 1984) generating the pBin/1458-G plasmid that was used for transformation into Arabidopsis.

Plant Transformation and Histochemical Analysis

Transgenic lines (Columbia) were constructed using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation by the vacuum infiltration method (Bechtold et al., 1993). Transgenic plants were identified by their capacity to develop roots and maintain green leaves in the presence of 50 μ g mL^{-1} of kanamycin. They were then transferred to soil to get the transgenic seed and the following generations. GUS histochemical analysis was carried out according to a protocol previously described (Jefferson, 1987). The tissue was incubated at 37°C overnight (12 h). Destaining was accomplished by 30 min incubations with 3:1 (v/v) acetone:methanol solution. Whole tissues or sections were observed under bright-field microscopy (Type 104, Nikon, Tokyo).

Microscopy Techniques

For transmission electron microscopy, tissues were fixed with 6% (w/v) glutaraldehyde in phosphate-buffered saline (pH 7.2) for 10 h and post-fixed in 1% (w/v) osmium tetroxide in the same buffer for several hours. After dehydration in a graded series of ethanol and propylene oxide, samples were embedded in Epoxy resin. For electron microscopy, 60-nm thin sections were obtained and mounted on formvar-coated copper grids (Electron Microscopy Science, Fort Washington, PA). For contrast, 3% (w/v) uranyl acetate and 0.3% (w/v) lead citrate were used. Grids were observed with a transmission electron microscope (EM-10, Carl Zeiss, Jena, Germany) operating at 80 kV. For light microscopy, samples were treated as described above and 0.5- μ m semi-thin sections were obtained. The sections were

stained with 1% (w/v) toluidine blue and observed in bright field with a light microscope (Standard, Carl Zeiss).

ACKNOWLEDGMENTS

We want to thank Elizabeth Mata and Carlos González for their help in raising antibody and Paul Gaitan and Eugenio López for the synthesis of oligos. We thank Drs Virginia Walbot, Analilia Arroyo, Helena Porta, Marcela Treviño, and Stuart Reichler for helpful comments on the manuscript.

Received January 5, 2000; accepted May 9, 2000

LITERATURE CITED

- Arigoni D, Sagner S, Latzel C, Eisenreich W, Bacher A, Zenk MH (1997) Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 10600–10605
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Siedman JG, Smith JA, Struhl K (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York
- Bach IJ, Lichtenthaler HK (1982) Inhibition of mevalonate biosynthesis and plant growth by the fungal metabolite mevlinolin. In JFGM Wintermanns, PJC Kuiper, eds, *Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids*. Elsevier, Amsterdam, pp 515–521
- Bechtold N, Ellis J, Pelletier G (1993) In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *CR Acad Sci Ser III Sci Vie* **316**: 1194–1199
- Bevan M (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acid Res* **12**: 8711–8721
- Bouvier F, d'Harlingue A, Suire C, Backhaus RA, Camara B (1998) Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits. *Plant Physiol* **117**: 1423–1431
- Chatterjee M, Sparvoli S, Edmunds C, Garosi P, Findlay K, Martin C (1996) *DAG*, a gene required for chloroplast differentiation and palisade development in *Antirrhinum majus*. *EMBO J* **15**: 4194–4207
- Chory J (1992) A genetic model for light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. *Development* **115**: 337–354
- Church GM, Gilbert W (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 1991–1995
- Disch A, Schwender J, Müller C, Lichtenthaler HK, Rohmer M (1998) Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. *Biochem J* **333**: 381–388
- Eisenreich W, Menhard B, Hylands P, Zenk MH, Bacher A (1996) Studies on the biosynthesis of taxol: the taxane carbon skeleton is not of mevalonoid origin. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 6431–6436
- Goldstein JL, Brown MS (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**: 425–430
- Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 53–138
- Hill RE, Himmeldrik K, Kennedy IA, Paulosky RM, Sayer BG, Wolf E, Spenser ID (1996) The biogenetic anatomy of vitamin B6: a ¹³C NMR investigation of the biosynthesis of pyridoxol in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **271**: 30426–30435
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Report* **5**: 387–405
- Julliard JH, Douce R (1991) Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B₁) in higher plant chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 2042–2045
- Keddie JS, Carroll B, Jones JDG, Grissem W (1996) The *DCI* gene of tomato is required for chloroplast development and palisade cell morphogenesis in leaves. *EMBO J* **15**: 4208–4217
- Knöss W, Reuter B, Zapp J (1997) Biosynthesis of the labdane diterpene marrubium in *Marrubium vulgare* via a non-mevalonate pathway. *Biochem J* **326**: 449–454
- Kuzuyama T, Takagi M, Kaneda K, Daii I, Seto H (2000a) Formation of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol from 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate by 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase, a new enzyme in the nonmevalonate pathway. *Tetrahedron Lett* **41**: 703–706
- Kuzuyama T, Takagi M, Iakahashi S, Seto H (2000b) Cloning and characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Streptomyces* sp. strain CI190, which uses both the mevalonate and nonmevalonate pathways for isopentenyl diphosphate biosynthesis. *J Bacteriol* **182**: 891–897
- Lange BM, Croteau R (1999) Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphatereductoisomerase from peppermint. *Arch Biochem Biophys* **365**: 170–174
- Lange BM, Wildung MR, McCaskill D, Croteau R (1998) A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 2100–2104
- León P, Arroyo A, Mackenzie S (1998) Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 453–480
- Lichtenthaler HK (1999) The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 47–65
- Lichtenthaler HK, Schwender J, Disch A, Rohmer M (1997) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett* **400**: 271–274
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR (1983) Determination of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Trans* **11**: 591–592
- Logemann J, Schell J, Willmitzer I (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem* **163**: 16–20
- Lois LM, Campos N, Rosa Putra S, Danielsen K, Rohmer M, Boronat A (1998) Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thia-

- min, and pyridoxol biosynthesis Proc Natl Acad Sci USA 95: 2105-2110
- Mandel MA, Feldmann KA, Herrera-Estrella I, Rocha-Sosa M, León P (1996)** *CLAI*, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. Plant J 9: 649-658
- Mochizuki N, Susek R, Chory J (1996)** An intracellular signal transduction pathway between the chloroplast and nucleus is involved in de-etiolation. Plant Physiol 112: 1465-1469
- Nabeta K, Kawae I, Saitoh I, Kikuchi I (1997)** Synthesis of chlorophyll α and β -carotene from ^2H and ^{13}C -labeled mevalonates and ^{13}C -labeled glycine in cultured cells of liverworts *Heteroscyphus planus* and *Lophocolea heterophylla*. J Chem Soc Perkin Trans 1: 261-267
- Reiter RS, Coomber SA, Bourett IM, Bartley GE, Scolnik PA (1994)** Control of leaf and chloroplast development by the Arabidopsis gene *pale cress*. Plant Cell 6: 1253-1264
- Relichova J (1976)** Some new mutants. Arab Inf Serv 13: 25-28
- Rohdich F, Wungsintaweekul J, Fellermeier M, Sagner S, Herz S, Kis K, Eisenreich W, Bacher A, Zenk M (1999)** Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol. Proc Natl Acad Sci USA 96: 11758-11763
- Rohmer M (1998)** Isoprenoid biosynthesis via the mevalonate-independent route, a novel target for antibacterial drugs? In E Jucker, ed, Progress in Drug Research, Vol 50. Birkhäuser Verlag, Basel, pp 135-154
- Rohmer M (1999)** A mevalonate-independent route to isopentenyl diphosphate. In D Cane, ed, Comprehensive Natural Product Chemistry, Isoprenoids including Steroids and Carotenoids, Vol 2 Pergamon Press, Oxford, pp 45-68
- Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahn H (1993)** Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. Biochem J 295: 517-524
- Rohmer M, Seemann M, Horbach S, Bringer-Meyer S, Sahn H (1996)** Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. J Am Chem Soc 118: 2564-2566
- Schwender J, Müller C, Zeidler J, Lichtenthaler HK (1999)** Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett 455: 140-144
- Schwender J, Seemann M, Lichtenthaler HK, Rohmer M (1996)** Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. Biochem J 316: 73-80
- Scolnik PA, Hinton P, Greenblatt IM, Giuliano G, Delano MR, Spector DL, Pollock D (1987)** Somatic instability of carotenoid biosynthesis in the tomato *ghost* mutant and its effect on plastid development. Planta 171: 11-18
- Sprengr GA, Schörken U, Wiegert I, Grolle S, de Graaf AA, Taylor SV, Begley TP, Bringer-Meyer S, Sahn H (1997)** Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. Proc Natl Acad Sci USA 94: 12857-12862
- Spurgeon SL, Porter JW (1981)** Introduction. In JW Porter, SL Spurgeon, eds, Biosynthesis of Isoprenoid Compounds. John Wiley & Sons, New York, pp 1-46
- Susek R, Chory J (1992)** A tale of two genomes: role of a chloroplast signal in coordinating nuclear and plastid genome expression. Aust J Plant Physiol 19: 387-399
- Takahashi S, Kuzuyama I, Watanabe H, Seto H (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 USA 95: 9879-9884
- van der Graaff E (1997)** Developmental mutants of *Arabidopsis thaliana* obtained after T-DNA transformation. PhD thesis. Leiden University, The Netherlands
- van der Veen JH, Blankenstijn de Vries H (1973)** Double reduction in tetraploid *Arabidopsis thaliana*, studied by means of chlorophyll mutant with a distinct simplex phenotype. Arab Inf Serv 10: 11-12
- Zeidler JG, Lichtenthaler HK, May HU, Lichtenthaler FW (1997)** Is isoprene emitted by plants synthesized via novel isopentenyl pyrophosphate pathway? Z Naturforsch 52c: 15-23



1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Synthase, a Limiting Enzyme for Plastidic Isoprenoid Biosynthesis in Plants*

Received for publication, January 30, 2001, and in revised form, March 19, 2001
Published, JBC Papers in Press, March 22, 2001, DOI 10.1074/jbc.M100854200

Juan M. Estévez^{‡§}, Araceli Cantero[‡], Andreas Reindl[¶], Stuart Reichler[‡], and Patricia León^{‡||}

From the [‡]Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001 Chamilpa Apartado Postal 510-3 Cuernavaca, Morelos 62271, México and [¶]BASF AG Crop Protection Research, A30, 67056 Ludwigshafen, Germany

The initial step of the plastidic 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway that produces isopentenyl diphosphate is catalyzed by 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase. To investigate whether or not 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase catalyzes a limiting step in the MEP pathway in plants, we produced transgenic *Arabidopsis* plants that over- or underexpress this enzyme. Compared with non-transgenic wild-type plants, the transgenic plants accumulate different levels of various isoprenoids such as chlorophylls, tocopherols, carotenoids, abscisic acid, and gibberellins. Phenotypically, the transgenic plants had slight alterations in growth and germination rates. Because the levels of several plastidic isoprenoids correlate with changes in 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase levels, we conclude that this enzyme catalyzes one of the rate-limiting steps of the MEP biosynthetic pathway. Furthermore, since the product of the MEP pathway is isopentenyl diphosphate, our results suggest that in plastids the pool of isopentenyl diphosphate is limiting to isoprenoid production.

Isoprenoids are a group of biologically active molecules that number in the tens of thousands. Members of this diverse group of natural products are found in all organisms. In higher plants, isoprenoids participate in a wide variety of biological functions such as photosynthesis, respiration, growth, cell cycle control, plant defense, and adaptation to environmental conditions. Specific examples include photosynthetic pigments (chlorophylls and carotenoids), hormones (abscisic acid (ABA),¹ gibberellins (GA), cytokinins, and brassinosteroids), a side chain of the electron transporter (plastoquinone), structural components of membranes (phytosterols), and antimicrobial agents (phytoalexins). Beyond these plant-specific functions, many plant isoprenoids have been shown to have industrial and medical importance. The plant-produced isoprenoids β -caro-

tene (provitamin A) and α -tocopherol (vitamin E) are both basic nutrients required for the maintenance of human health (1–4). Another plant-produced isoprenoid, Taxol, is used as a chemotherapeutic agent in the treatment of cancer (5). Moreover, drugs that block isoprenoid production in *Plasmodium falciparum* are being evaluated as anti-malarial agents (6). Industrial uses of isoprenoids include products such as colorants, fragrances, and flavorings (7). A detailed understanding of isoprenoid biosynthetic pathways and their regulation is essential to fully exploit these and future uses of isoprenoids.

Isoprenoids are derived by consecutive condensations of five-carbon precursors, isopentenyl diphosphate (IPP) and its isomer dimethylallyl diphosphate (DMAPP). From these common precursors, the biosynthetic pathways of the various isoprenoids diverge. The work of several groups has demonstrated that in plants two distinct pathways synthesize IPP (Fig. 1). The acetate/mevalonate (MVA) pathway (8, 9), which is shared with animals and fungi (10), occurs in the cytoplasm where sesquiterpenes (C₁₅) and triterpenes (C₃₀) such as sterols are produced (Fig. 1). The more recently identified MEP pathway (named for the first committed molecule in the pathway, 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate) occurs in plastids and is also found in protozoa, most bacteria, and algae (6, 11–16). This plastidic pathway produces IPP that is used for the biosynthesis of isoprene, monoterpenes (C₁₀), diterpenes (C₂₀), carotenoids, plastoquinones, and phytol conjugates such as chlorophylls and tocopherols (16–18). Although there is evidence that some limited exchange occurs in plants between the cytoplasmic and plastidic pools of IPP, each pathway appears to produce unique isoprenoids (15, 19).

Whereas all of the genes involved in the MVA pathway have been identified, only the first genes of the plant MEP pathway have been published (Fig. 1). The first step in the MEP pathway involves a transketolase-type condensation reaction of pyruvate and glyceraldehyde 3-phosphate to yield 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP). This reaction is catalyzed by DXP synthase (DXS). Genes encoding DXS have been cloned and characterized in *Escherichia coli* (20, 21), *Mentha × piperita* (22), *Capsicum annuum* (23), *Synechococcus leopoliensis* (24), *Lycopersicon esculentum* (25), *Streptomyces* (26), and *Arabidopsis thaliana* (27, 28). In plants, the DXP produced by this reaction is utilized in plastidic IPP biosynthesis as well as in the production of thiamin and pyridoxol (29, 30). The subsequent steps of the MEP pathway have been shown to be specific for IPP production, and the genes coding for the next four steps have been identified in both bacteria and plants (Fig. 1). The first step specific for IPP production is the transformation of DXP to MEP by the enzyme DXP reductoisomerase (DXR) (6, 31–34). MEP is subsequently converted into 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate by the consecutive activities of three independent enzymes as shown in Fig. 1 (35–39). The

* This research was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Grant 31791-N, Dirección General de Asuntos del Personal Académico Grant IN205697, and by BASF. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Fellow from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

|| To whom correspondence should be addressed. Tel.: 52-5-6227856; Fax: 52-73-139988; E-mail: patricia@ibt.unam.mx.

¹ The abbreviations used are: ABA, abscisic acid; DXP, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate; DXS, 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase; IPP, isopentenyl diphosphate; DMAPP, dimethylallyl diphosphate; MVA, acetate/mevalonate; MEP, 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate; DXR, 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase; GA, gibberellins; PCR, polymerase chain reaction; RT-PCR, reverse-transcriptase-PCR; MES, 4-morpholineethanesulfonic acid.

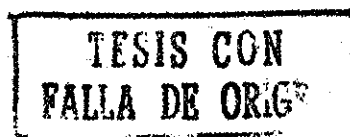
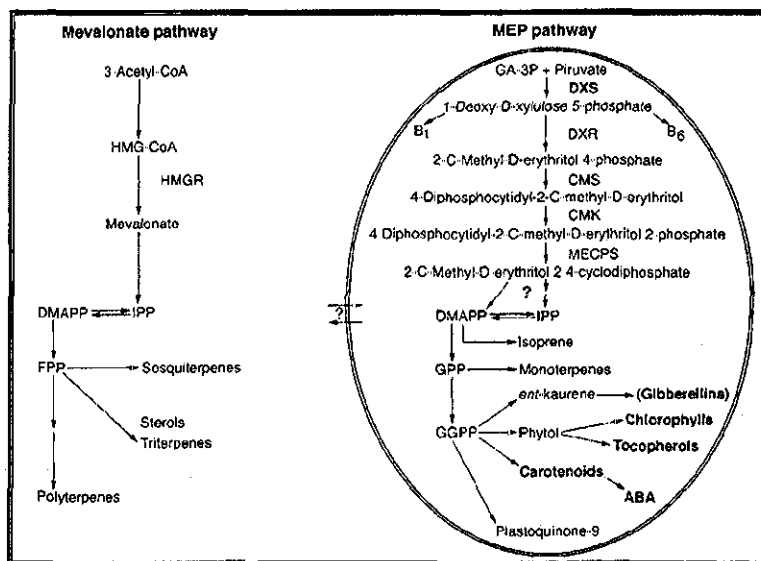


Fig. 1. IPP and isoprenoid biosynthetic pathways in plants. Diagrammatic representation of the cytoplasmic mevalonate and plastidic MEP pathways is shown. Arrows in and out of the plastid indicate the postulated limited exchange between the cytoplasmic and plastidic IPP pools. ? denotes unidentified steps in the MEP pathway (Gibberellins) indicates that the precursors for biosynthesis of gibberellins are formed in plastids. *HMG-CoA*, hydroxymethylglutaryl-CoA; *HMGR*, hydroxymethylglutaryl-CoA reductase; *DMAPP*, dimethylallyl diphosphate; *IPP*, isopentenyl diphosphate; *GA-3P*, glyceraldehyde 3-phosphate; *B₁*, thiamin; *B₆*, pyridoxol; *CMS*, 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol synthase; *CMK*, 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase; *MECPS*, 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase; *GPP*, geranyl diphosphate; *GGPP*, geranylgeranyl diphosphate; *FPP*, farnesyl diphosphate; *ABA*, abscisic acid



final steps leading to IPP remain unknown.

Identifying the different enzymes involved in the synthesis of IPP is only part of the work necessary to characterize such a complex biosynthetic pathway. Another fundamental aspect is the identification of the limiting steps in the pathway. Large changes in the level of a non-limiting enzyme can be made with little or no effect on the quantity of the final product; therefore, one of the most fruitful strategies for altering isoprenoid content will be those that focus on the rate-limiting enzymes (40). In the case of the MEP pathway, recent studies in bacteria (24, 26, 34) and tomato (25) suggest that DXS is a rate-limiting enzyme.

In this article we report on the effects of altering DXS levels, the first gene in plastidic isoprenoid synthesis in plants. Our previous work demonstrated that, in *A. thaliana*, DXS is encoded by the *CLA1* gene (28). In order to explore the participation of DXS in plastidic isoprenoid synthesis in plants, the enzyme levels were increased or decreased in *Arabidopsis* plants. Analysis of several transgenic lines showed that plants overexpressing DXS had increased levels of isoprenoids such as chlorophylls, tocopherols, carotenoids, ABA, and GA. Moreover, plants with suppressed levels of DXS had decreased amounts of all of these products. The fact that alterations in DXS levels lead to changes of various isoprenoid end products demonstrates that DXS is one of the limiting steps in the production of plastidic IPP and, therefore, of isoprenoids in higher plants. Each group of plastidic isoprenoids has a distinct biosynthetic pathway that could be manipulated; however, our findings indicate that the output of these pathways could be restricted by the amount of IPP that is produced in the plastids.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant Material and Growth Conditions.—*A. thaliana* plants were grown on Metro-Mix 200 soil (Grace Sierra, Milpitas, CA) in a controlled growth chamber (24 °C, 16:8 h light:dark photoperiod). Seeds under sterile conditions were surface-sterilized and plated on germination medium (GM) containing 1× Murashige and Skoog basal salt mixture supplemented with B5 vitamins, 0.05% MES, 1% sucrose, and 0.8% phytoagar. As *cla1-1* seed stocks are heterozygous, seeds were initially germinated on GM, and the albino homozygous mutant plants were selected for all of the subsequent analyses. To select heterozygous plants, seeds were germinated on kanamycin GM media. Plate-grown, 15-day-old plants were used for the Northern blots, Western blots and isoprenoid quantifications.

The analysis of seed dormancy was performed using seeds that were never exposed to cold treatment. Germination time was taken at the emergence of the root.

Arabidopsis Transformation.—*CLA1* cDNA consisting of either the ATG to the stop codon in a sense or 650 base pairs of the 3' region of the cDNA for the antisense orientation was inserted into the binary vector pBin19 (41) containing the neomycin phosphotransferase II gene as a selectable marker (Fig. 2A). For both constructs the *CLA1* cDNA is under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. The constructs were introduced into *Arabidopsis* via an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated root explant transformation (42). Transgenic plants were identified by their ability to develop leaves in the presence of 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ kanamycin. They were then transferred to soil to obtain seeds for the subsequent generations. Homozygous plants were identified by a 100% segregation of kanamycin-resistant plants in the progeny.

Northern Blot Analysis.—Total RNA was isolated from frozen tissue essentially as described (43). The RNA was fractionated by electrophoresis on 1.2% agarose gels and transferred onto Hybond N⁺ nylon membrane (Amersham Pharmacia Biotech). Hybridizations and washes were carried out at high stringency according to standard procedures using ³²P-radiolabeled probes (44).

Western Blot Analysis.—Total protein samples were obtained by snap-freezing the plants in liquid nitrogen and grinding them in the presence of SDS sample buffer (0.125 M Tris-Cl, pH 6.8, 20% v/v glycerol, 4% w/v SDS, 2% v/v 2-mercaptoethanol). Protein samples were quantified with Bradford reagent (Bio-Rad) and then separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. To verify equal protein loading, a parallel gel was run and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. The proteins were transferred onto nitrocellulose (Hybond C, Amersham Pharmacia Biotech) by electroblotting for 1 h at 200 mA in 25 mM Tris, 0.2 M glycine, and 20% (w/v) methanol. Immunodetection was performed using a 1:1,000 dilution of the polyclonal antibody raised against a GST-*CLA1* fusion protein (28). An anti-mouse immunoglobulin horseradish peroxidase conjugate was used as a secondary antibody (Amersham Pharmacia Biotech), and detection was carried out with an enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham Pharmacia Biotech). Bands were quantified using NIH Image software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda).

Determination of Chlorophyll and Carotenoid Content.—Determination of total carotenoids and chlorophylls was conducted as described elsewhere (45). Extracts were obtained in 100% acetone from 100 mg of fresh tissue from 15-day-old *Arabidopsis* seedlings. Spectrophotometric quantification was carried out in a Beckman DU⁶⁵⁰ spectrophotometer.

Determination of Tocopherol Content.—Extracts were obtained from 500 mg of 15-day-old plants, frozen in liquid N₂, and homogenized. To the pulverized material a mixture of chloroform/methanol (1:1 v/v) was added, and the solution was transferred into two 4-ml centrifuge flasks, followed by vortexing for 15 min at 4 °C. The homogenate was centrifuged, and the supernatant was transferred to a 25-ml measuring flask. The pellet was re-extracted with 2 ml of the chloroform/methanol mixture and dried completely in a rotary evaporator at 60 °C. To remove residual water, 2 ml of ethanol were added and then evaporated completely. The sample was resuspended in 1 ml of heptane, filtered, and loaded onto a Lichrosorb Si 60 column (5 μm 250 × 4 mm; Merck) with

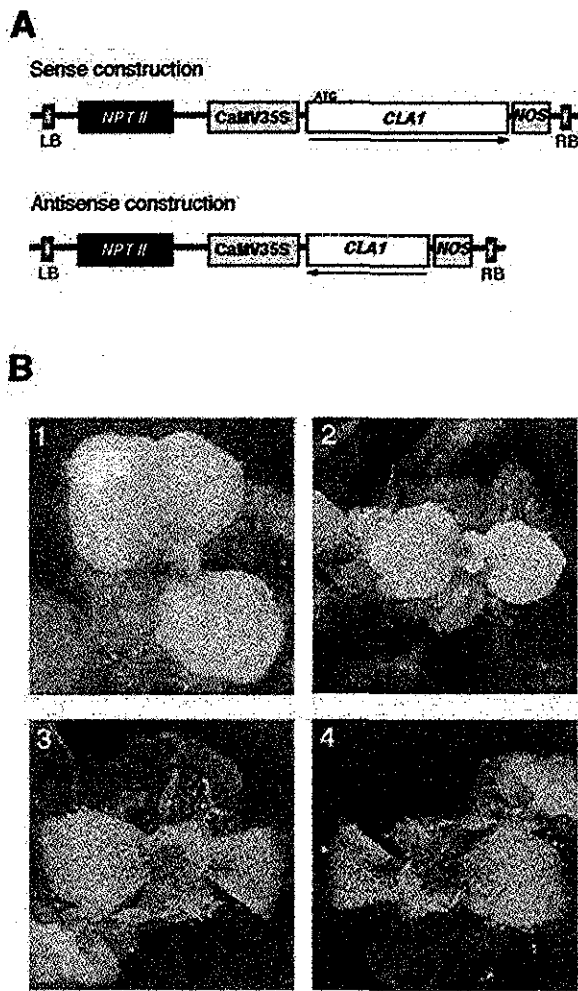


FIG. 2. *CLAI* constructs and their phenotypes. *A*, diagram of the constructs used in plant transformation. The sense construct contains 2.2 kilobase pairs of the *CLAI* cDNA including the complete coding region from the ATG to the stop codon. The antisense construct contains 0.65 kilobase pairs of the 3' end of the *CLAI* cDNA. *LB*, left T-DNA border; *RB*, right T-DNA border; cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter; *NOS*, polyadenylation signal from neomycin phosphotransferase II; *NPT II*, neomycin phosphotransferase II. *B*, representative phenotypes obtained in the antisense (1–3) and sense transgenic plants (4).

a mobile phase of heptane and dioxane (97:3) and a flow of 1 ml/min. The injected volume was 10 μ l at room temperature. Peaks were detected using a fluorescent detector with emission at 330 nm and excitation at 295 nm.

Determination of ABA Content—To quantify the ABA content of the transgenic and wild-type plants, 10 mg of fresh 15-day-old tissue were homogenized in 1 ml of ABA extraction buffer (10 mM HCl, 1% polyvinylpyrrolidone in methanol) and incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C with constant shaking. The supernatant was collected and neutralized with 15 μ l of 1 M NaOH as described (46). ABA was quantified with a Phytodetek-ABA-kit (Agdia Inc., Elkhart, IN) using the protocol provided but with the addition of TBS and 0.1% gelatin to all of the samples.

Determination of *GA4* Expression—Total RNA was isolated using the procedure of Logemann *et al.* (43). The cDNAs were synthesized from 5 μ g of total RNA by an oligo(dT)-primed reverse transcription using M-MLV reverse transcriptase (Life Technologies, Inc.). An aliquot of the first strand cDNA (10%) was used as template in a standard 50 μ l of PCR (with 0.25 mM dNTPs and 100 ng for each primer). Each PCR was checked to ensure that it was in the linear range by removal of a small sample (5 μ l) of the PCR at 18, 21, 24, and 30 cycles during the PCR program (1 min each at 94, 55, and 72 $^{\circ}$ C). The primers used and the corresponding products are as follows: 5'-CGATTCCGTAACCTTGGC-3' and 5'-ATCCATTGGATAGGATGTTGG-3' were used to amplify a 398-base pair fragment of *GA4* cDNA; and 5'-TCCAGAAATCGCTAAGATTGCC-3' and 5'-CCTTCCCTTAAGCTCTG-3' were used to am-

plify a 478-base pair fragment of *APT1* cDNA. PCR products were separated by electrophoresis, blotted, and hybridized using standard techniques (32 P]dCTP-labeled hybridization probes). RT-PCR products were quantified using NIH Image software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda).

RESULTS

Production of Transgenic *Arabidopsis*—DXS catalyzes the first step of the MEP pathway and has been proposed to be a limiting step for the production of IPP in bacteria and plants (24–26, 34). In earlier work we identified the *CLAI* gene as coding for the functional *Arabidopsis* version of DXS (28). To test the role of DXS in regulating the levels of plastidic isoprenoids in plants, constructs containing the *CLAI* open reading frame (27) under the control of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter were constructed in either a sense or an antisense orientation with a duplicated enhancer region at the 5' end (Fig. 2A). These constructs were inserted into pBin19, a T-DNA derived vector, and introduced into *Arabidopsis* via an *A. tumefaciens*-mediated root explant transformation (42). Transgenic T_0 lines were selected on kanamycin-containing medium. Sense plants showed a green phenotype, similar to wild-type plants, whereas antisense plants exhibited a range of phenotypes from albino to pale-green and fully green (Fig. 2B). Such phenotypes are in agreement with the previously reported essential role of the *CLAI* gene in *Arabidopsis* plants (27). Since albino and pale-green T_0 plants do not survive long enough to produce seeds, only seeds from the green kanamycin-resistant T_0 transgenic plants could be rescued and grown to generate subsequent generations. Thus, we know that our antisense selection scheme is limited to moderate DXS suppression levels that permit viable plants. These T_1 plants were then self-propagated to obtain a homozygous transgenic T_2 population for each independently transformed line. Several of the T_2 lines were analyzed for DXS levels (data not shown), and a few of those lines with the greatest differences in DXS levels were selected for further evaluation.

Molecular Characterization of the Transgenic Lines—In order to compare mRNA and protein steady-state levels for the *Arabidopsis* DXS (*CLAI* gene), 15-day-old seedlings from sense (S-2, S-17, S-14, and S-7), antisense (A-6 and A-18), wild-type plants, as well as homozygous *cla1-1* and heterozygous *CLAI/cla1* mutants (27) were analyzed by Northern and Western blots. As shown in Fig. 3A, the sense plants of the S-2, S-14, and S-17 lines had increased expression levels of the *DXS* mRNA compared with wild-type plants. Some of the sense plants such as the S-7 line contained very low levels of the *DXS* mRNA compared with wild-type plants. This may be attributable to gene silencing, a phenomenon commonly observed in transgenic plants (47). The Northern blot analysis also showed that the antisense plants of the A-6 and A-18 lines have reduced accumulation of the *DXS* transcript compared with wild-type plants, as do the *CLAI/cla1* heterozygous plants (Fig. 3A). Consistent with our data reported previously (28), no *DXS* mRNA expression was detectable in the *cla1-1* mutant. Notable in the Northern blot is the slightly smaller size of the mRNA bands in the overexpressing lines (S-2, S-14, and S-17). This is likely due to the smaller 3'- and 5'-untranslated regions of the sense constructs, which cause the mRNA of the sense constructs to be slightly smaller than wild-type mRNA (Fig. 3A).

Western blot analysis was then performed to check for the accumulation of the DXS protein in all of the selected plants (Fig. 3B). Transgenic plants expressing high levels of the *DXS* mRNA such as S-2, S-17, and S-14 also accumulated high levels of the DXS protein compared with wild-type levels. In contrast, the lines expressing low levels of the *DXS* mRNA (S-7, A-6, A-18, and *CLAI/cla1*) accumulated low levels of the DXS protein compared with the wild-type levels. As published previ-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

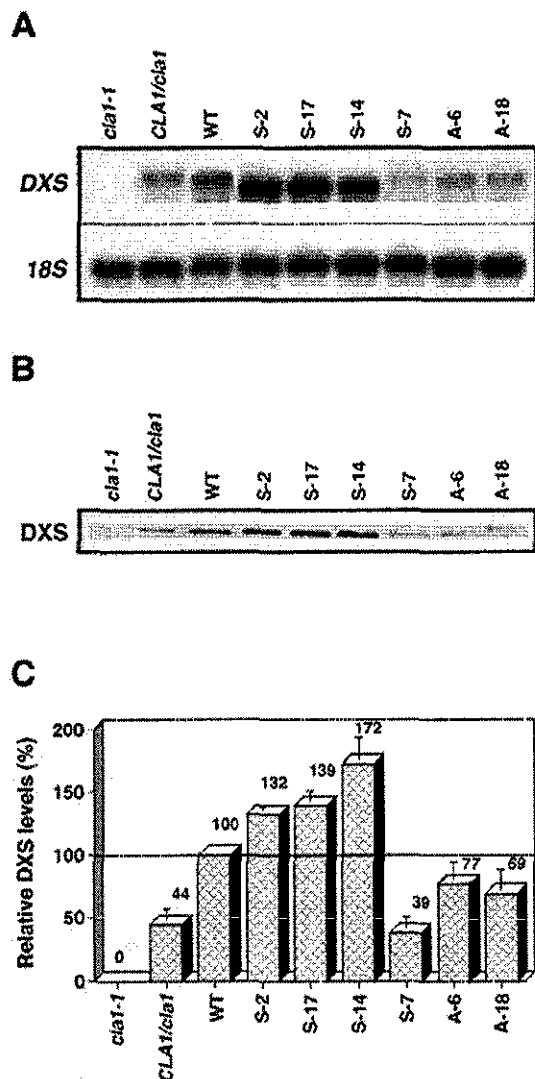


FIG. 3 Expression of DXS in transgenic and wild-type plants. *A*, RNA gel blot analysis. 5 μ g of total RNA was loaded in each lane isolated from 15-day-old seedling from DXS mutant (*cla1-1*), heterozygous (*CLA1/cla1*), wild type (WT), overexpressing (S2, S17, and S14), and suppressed (S7, A6, and A18) plants. The blot was hybridized with *CLA1* and 18 S rRNA probes. *B*, Western blot analysis. 15 μ g of total protein isolated from 15-day-old seedlings of each plant were loaded per lane and analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The blot was probed with a DXS-specific antibody. *C*, the intensity of the bands from the Western blot was determined quantitatively by densitometric analysis. Columns represent means as a percentage of wild-type levels of three individual experiments. Bars represent standard deviation.

ously for the *cla1-1* mutant (28), no DXS protein could be detected either. The densitometric quantification of the DXS protein level (Fig. 3C) showed that by a comparison to wild-type plants, lines S-2, S-17, and S-14 are overexpressing the DXS protein ranging from 132 to 172%. On the other hand, lines S-7, A-6, A-18, and *CLA1/cla1* contain between 38 and 77% of wild-type DXS protein levels, and *cla1-1* mutants show no detectable DXS protein.

Effects of Altered Expression of DXS on Plastidic Isoprenoid Content—Many isoprenoids are formed in plastids via the IPP produced by the MEP pathway. In order to determine the impact of altered DXS levels on isoprenoid content, the quantities of plastidic isoprenoids such as chlorophylls, tocopherols, carotenoids, ABA, and GA were measured in the selected transgenic lines and compared with the levels found in wild-type

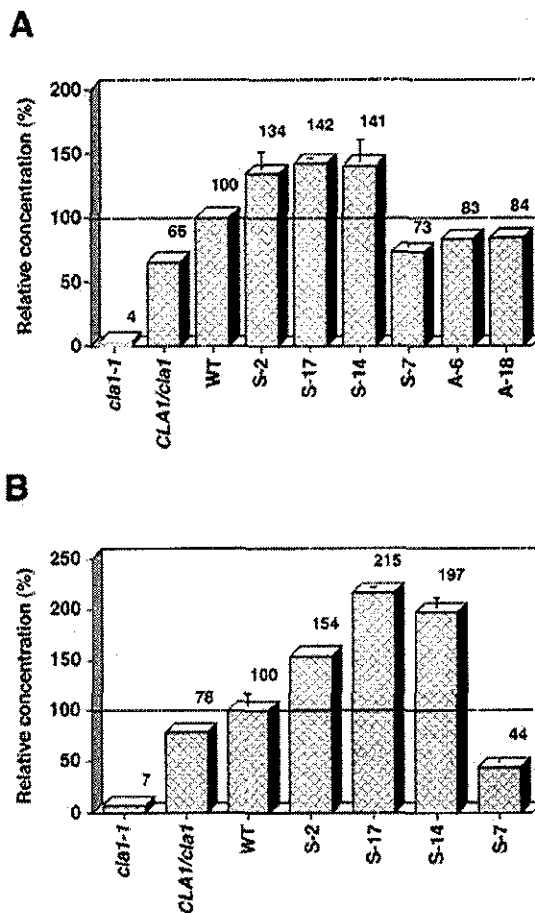


FIG. 4 Total chlorophyll and α -tocopherol content in transgenic and wild-type plants. *A*, total chlorophyll content; *B*, α -tocopherol content extracted from 15-day-old seedling. Each column represents the mean of three independent experiments expressed as a percentage relative to wild-type levels, which are marked as 100%. Standard deviation is shown by bars (sometimes smaller than the scale).

plants. These isoprenoids were chosen, in part, because they are formed from three pathways that diverge from the common plastidic IPP precursor (15, 19).

Total Chlorophyll and Tocopherol Content—Chlorophylls and tocopherols are two common plant isoprenoids that are formed, via IPP, from phytol. Chlorophyll consists of two moieties. Chlorophyllide, which is not an isoprenoid, is formed from the precursor molecule 5-aminolevulinic acid. The other moiety is the isoprenoid, phytol. As shown in Fig. 4A, in the DXS-overexpressing plants (S-2, S-14 and S-17) the total chlorophyll content increased with chlorophyll levels ranging from 134 to 142% of the wild-type levels ($p < 0.05$). In plants with suppressed levels of DXS (S-7, A-6, A-18, and *CLA1/cla1*), it was observed that the total chlorophyll content decreased between 65 and 84% of wild-type levels ($p < 0.003$). Additionally, in the *cla1-1* mutant plants, the total chlorophyll levels were only 4% of the wild-type levels, which agreed with the previously published (27) measurements for this mutant.

Phytol is also a precursor for the synthesis of tocopherols, and it is directed into the tocopherol-synthesizing pathway by condensation with homogentisic acid derived from the shikimate pathway (48). It is well established that several methylations and a cyclization step of the quinol intermediate lead to α -tocopherol, the major form of vitamin E (48). Plants with altered levels of DXS have changes in their α -tocopherol content (Fig. 4B). Similar to what we found with chlorophyll con-

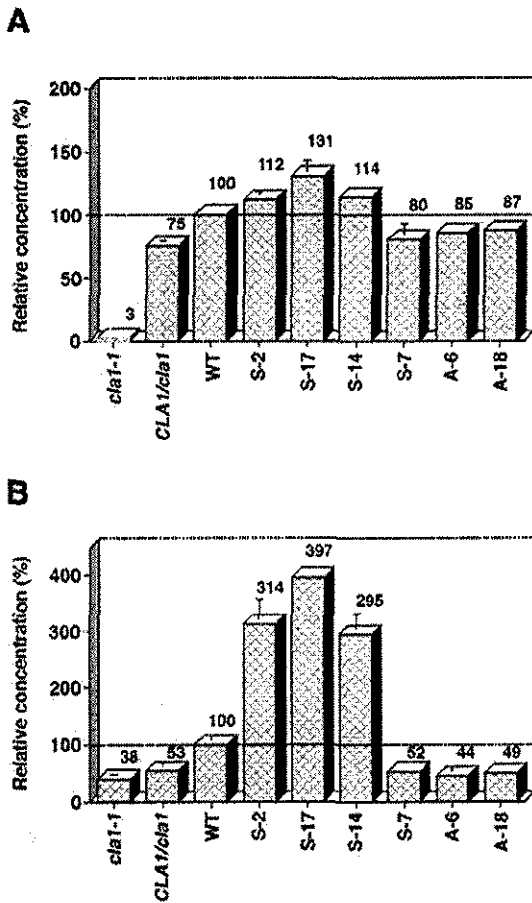


FIG. 5. Carotenoids and abscisic acid content in transgenic and wild-type plants. A, total carotenoid content; B, ABA content from 15-day-old seedling. In both cases columns represent means as a percentage relative to wild-type levels (100%). Bars represent standard deviation of three independent replicates (sometimes smaller than the scale)

tent, the transgenic plants with higher levels of the DXS protein (S-2, S-14, and S-17) have from 154 to 215% of the wild-type levels of α -tocopherol ($p < 0.01$), whereas plants with reduced levels of DXS (S-7 and *CLA1/c1a1*) have 43 and 78% of wild-type levels, respectively ($p < 0.01$). In this case the *cla1-1* mutant also produces very low levels of α -tocopherol at only 7% of the wild-type levels. Thus, modulations of DXS levels cause changes in the quantity of these two phyto-derived compounds, chlorophyll and α -tocopherol.

Carotenoids and Abscisic Acid Content—Carotenoids are formed in plastids via phytoene, a C_{40} precursor molecule (49). Experimental evidence has clearly demonstrated that carotenoids are one of the major products derived from the MEP pathway (15). Thus, we were interested in quantifying these compounds in our transgenic plants. As *Arabidopsis* plants do not contain chromoplast-accumulating tissues, our analysis was limited to the quantification of the carotenoids present in photosynthetic tissues. We found that altered levels of DXS also result in changes in the levels of total carotenoid content in the transgenic plants. Plants that are overexpressing DXS, such as S-2, S-14, and S-17, show increases in total carotenoids from between 112 and 131% relative to the wild-type levels ($p < 0.02$) (Fig. 5A). Plants with suppressed levels of DXS (S-7, A-6, A-18, and *CLA1/c1a1*) contain less total carotenoids, between 75 and 87% of wild-type levels ($p < 0.05$). As reported (27), the *cla1-1* mutant plants produced extremely low levels of

carotenoids, with only 3% of wild-type levels.

It has been shown that a major part of ABA biosynthesis is carried out in the plastids from a C_{40} carotenoid precursor (50). Thus, the level of DXS enzymatic activity might affect the levels of this hormone. In order to explore if ABA levels are dependent on changes in the levels of DXS, the endogenous ABA levels were measured in our transgenic plants. We observed that varying the quantity of DXS also affects ABA levels (Fig. 5B). The lines with more DXS, such as S-2, S-14, and S-17, accumulated substantially higher ABA levels (295–397%) compared with wild-type ($p < 0.0002$). On the other hand, in those transgenic plants with reduced DXS levels (S-7, A-6, A-18, and *CLA1/c1a1*), the relative ABA content is reduced with 44–53% ($p < 0.01$) of the wild-type levels (Fig. 5B). In the *cla1-1* null mutant, there is a further reduction in the amount of ABA to 38% compared with wild-type plants.

These results demonstrate that a second pathway that branches from IPP is similarly affected by differences in DXS levels. The levels of carotenoids are increased or reduced in concert with the level of DXS. Additionally, altered DXS levels likewise affect the synthesis of the hormone ABA. It is of particular interest that the changes in ABA were greater than those observed for total carotenoids. As shown in Fig. 5, the increase in total carotenoids is more restricted than for ABA. It is known that the carotenoid biosynthetic pathway is highly regulated, thus it is possible that additional limiting reaction steps for specific carotenoids exist. For example lutein, which plays a central role in the photosynthetic apparatus, is derived from α -carotene, whereas zeaxanthin, the direct precursor of ABA, is derived from β -carotene (49). It is possible that only specific carotenoid intermediates such as xanthoxin, a direct precursor of ABA, are more affected than others. As we have quantified total carotenoid content, an increase or decrease of a particular carotenoid might not be reflected in the total carotenoid levels in photosynthetic tissues. A similar situation has been reported with the reduction of phytyl synthase using antisense RNA in tomato plants, where a drastic reduction (97%) of carotenoid accumulation was found in fruits without a noticeable effect in leaf tissue (51). Also there is the case of DXS overexpression in bacteria where a differential accumulation of carotenoid and ubiquinone-8 was observed (52). On the other hand, the capacity of various tissues to make and/or degrade carotenoids may differ substantially. It would be of particular interest to explore the impact of an increase of DXS activity on the biosynthesis of carotenoids in chromoplast-containing tissues in plants such as tomato, where DXS has been suggested to be a limiting enzyme (25).

Gibberellins—GA constitute a large family of diterpenes that act as plant hormones and are involved in many developmental processes. It is known that these compounds are formed by converting geranylgeranyl diphosphate to *ent*-kaurene and that these initial steps are carried out in plastids (53). Even though important advances have been made in the understanding of the GA biosynthetic pathway, the origin of these compounds is still uncertain. Although it is likely that GA are derived from the MEP pathway, until now this has not been conclusively proven (54). We decided to explore the effect of altered DXS expression on GA levels. Due to the wide range of active and inactive GA and the inherent difficulty in accurately measuring them, we used the level of the *GA4* gene as an indirect marker for the level of GA (55). It has been shown that transcription of the *GA4* gene is controlled by a negative feedback mechanism regulated by the amount of active GA; therefore, the relative level of the *GA4* gene has an inverse relationship to the amount of active GA present in the plant (55). RT-PCR experiments using specific primers for *GA4* and *APT1*

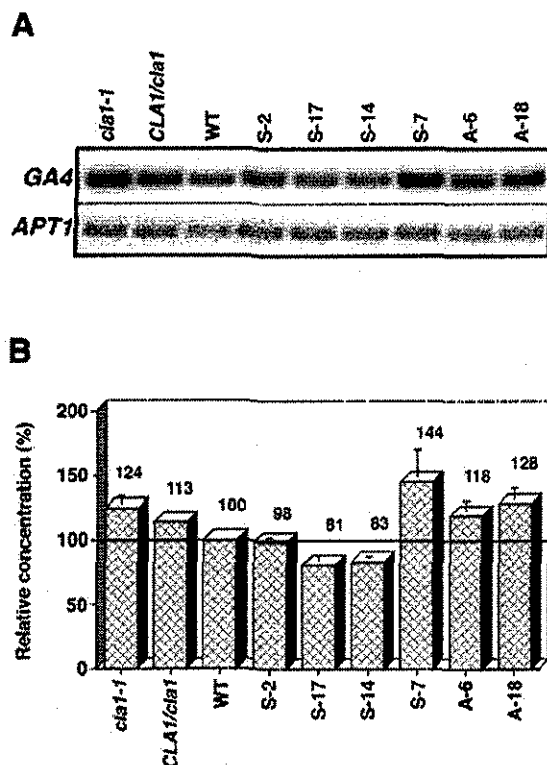


FIG. 6. Expression of *GA4* in transgenic and wild-type plants. A, representative gel from a RT-PCR expression analysis of the *GA4* and *APT1* (constitutive expressing control) transcripts in (*claf-1*) heterozygous (*CLA1/claf*), wild-type (*WT*), and overexpressing (S2, S17, and S14) and under-expressing (S7, A6, A18) plants. B, densitometric quantification of the *GA4* transcript levels corrected by the *APT1* transcript. Each column represents the *GA4/APT1* ratio expressed as a percentage relative to the wild-type levels. Bars represent standard deviation of two independent experiments (sometimes smaller than the scale)

(a constitutively expressed control) showed that alteration of DXS levels caused changes in *GA4* transcript accumulation (Fig. 6A). As shown in Fig. 6B, for those transgenic plants accumulating higher DXS (S-2, S-14, and S-17), there was less *GA4* transcript detected, ranging from 81 to 98% of wild-type levels. On the other hand, the transgenic plants with lower levels of DXS (S-7, A-6, A-18, and *CLA1/claf*), showed between 113 and 144% of the *GA4* transcript level compared with wild-type plants. The *claf-1* null mutant also accumulated higher levels of *GA4* transcript (124%) compared with wild-type plants. Because of the method used to quantify GA levels, the changes observed are not directly comparable to the changes in the other isoprenoids quantified in this work. But the general pattern found for the other isoprenoids remains true for GA. Raising the amount of DXS results in higher GA levels and lowering the amount of DXS lowered GA levels.

Phenotypes of Transgenic Plants—To determine if the observed changes in isoprenoid levels affect plant morphology, plants with wild-type, overexpressed, and suppressed levels of DXS were grown and their phenotypes compared. No appreciable difference in the general plant morphology was observed between our transgenic plants and the wild-type control, except for their size. In order to explore this phenotype more closely, the size of the transgenic plants was estimated in two developmental stages by the hypocotyl elongation at the seedling stage, 8 days old, and later, adult plants were measured for bolt length. We observed that at 8 days old (Fig. 7A), the wild-type plants had hypocotyl lengths averaging 3.8 cm, meanwhile the

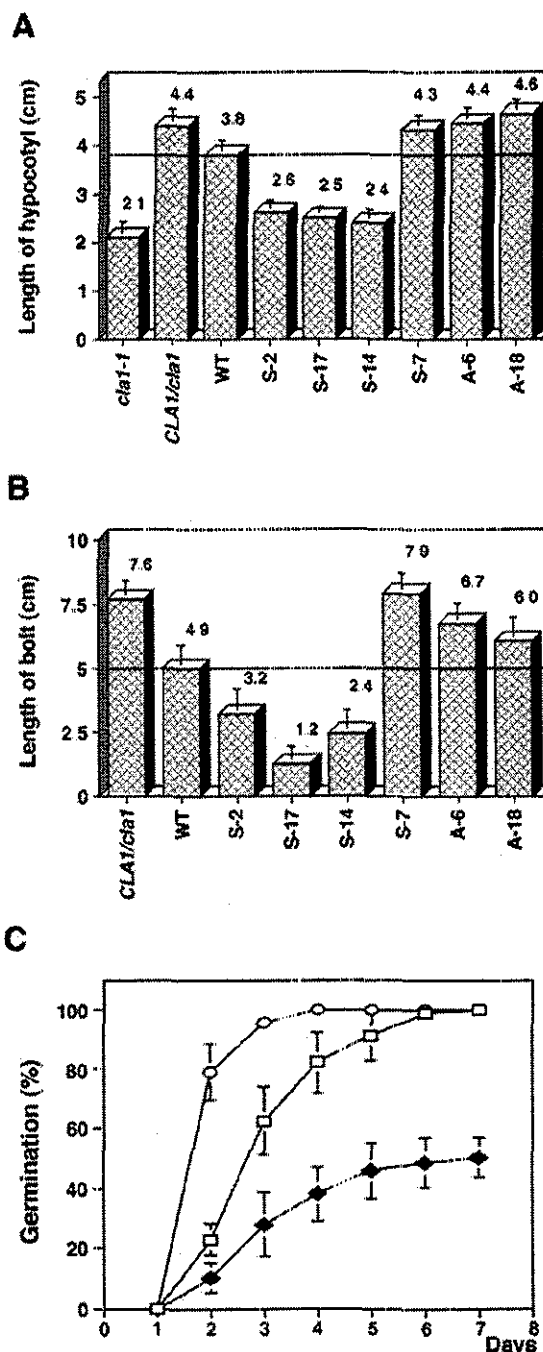


FIG. 7. Phenotype analysis. A, length of the hypocotyl of 8-day-old seedlings. The horizontal line represents the average size of wild-type plants. Columns represent the average size of 20 plants for each mutant, control, and transgenic line. B, bolt size of 26-day-old plants. Plants grown in soil were measured for the length of their bolt 26 days after imbibition. The horizontal line represents the size of the wild-type plants, and the columns are the mean of 15–20 plants for each line. The standard deviations in A and B are shown by bars. C, seed dormancy. Seeds from wild-type (open squares), over-expressing S-17 (close diamonds), and suppressed S-7 (open circles) plants were germinated without cold treatment. Germination was scored when the radicle tip had fully emerged from the seed coat. These data represent the average of three independent experiments evaluating 100 seeds each; the bars represent the standard deviation.

DXS-overexpressing plant lines (S-2, S-14, and S-17) had shorter hypocotyls (2.4 to 2.6 cm, $p < 0.0001$), and the DXS suppressed plants (S-7, A-6, A-18, and *Claf/claf*) had longer

hypocotyls (4.3 to 4.6 cm, $p < 0.0001$). As expected, the albino *cla1-1* mutant plants were the smallest of all the plants measured with an average of 2.1 cm (Fig. 7A).

The effect of various DXS levels was also determined for the length of the bolt in 26-day-old plants grown in soil. As shown in Fig. 7B the observed pattern was similar to the hypocotyl measurements in that the DXS-overexpressing plants were shorter (1.2–3.2 cm, $p < 0.0002$) than wild-type plants (4.9 cm), and plants with suppressed levels of DXS were taller (6.0 to 7.9 cm, $p < 0.008$) than wild-type plants. However, these unexpected differential growth phenotypes of the transgenic plants are a transient condition because at 30 days post-germination all of the plant lines reached approximately the same size (data not shown).

Since ABA levels had the biggest relative change of all isoprenoids that were measured (Fig. 5B), we decided to further substantiate its biological effect in our transgenic plants. It is well known that ABA plays an important role in mediating responses to environmental stresses as well as in other developmental processes such as the establishment of seed dormancy (56). When grown under controlled conditions, none of our underexpressing transgenic plants showed apparent phenotypes related to ABA deficiency such as a wilted phenotype (57). Similarly, none of the plants with higher ABA levels showed symptoms that have been related to high ABA content in tomato plants such as overguttation (58). However, we observed that seeds from our transgenic plants germinated at slightly different rates than wild-type plants; thus we tested for changes in seed dormancy. Fig. 7C shows the germination rates for non-cold-treated seeds from wild type, a DXS-overexpressing line (S-17) containing almost 4 times more ABA than wild type, and a DXS-suppressed line (S-7) with about one half of wild-type ABA levels. The results for these plant lines are representative of the other transgenic lines. At 2 days after imbibition, 79% of the DXS-suppressed plants have germinated compared with 10% for the DXS-overexpressing plants and 23% for the wild-type plants. At 5 days, 100% of the DXS-suppressed and wild-type plants have germinated, but only 46% of the DXS-overexpressing plants have germinated. In fact, throughout the 7 days that germination rates were followed, the DXS-overexpressing plants never reached 100% germination. Exposure to cold treatment prior to germination of S-17 and S-7 seeds substantially reduce such differences, suggesting that the effect observed is caused by the endogenous ABA levels in the seeds of those plants (data not shown). These results support the observation that changes in the endogenous ABA content of our transgenic plants correspond at least partially to an increment of a biologically active hormone that is reflected in one of the known physiological roles of ABA.

DISCUSSION

Because isoprenoids are such ubiquitous and essential compounds, there have been intensive efforts to understand the pathways that lead to their production. All isoprenoids are derived from the precursor molecules IPP and DMAPP, which are produced in plants by either the cytoplasmic MVA or plastidic MEP pathways (19, 59). There has been substantial progress in the identification of the biosynthetic steps of the MEP pathway in the past few years. However, knowing the reaction steps involved in the MEP pathway is only the first step to fully understanding it. Fundamental aspects that need to be addressed are the regulatory and control points of the pathway. If DXS is a limiting enzyme of the MEP pathway, then altering its level will affect the quantity of IPP. Analogously, if the amount of plastidic IPP is limiting in the production of isoprenoids, alterations in the IPP level will have an effect on overall isoprenoid levels. One way to define experimentally the rate-

limiting steps of a biosynthetic pathway is by using reverse genetics to make changes in specific sites of the pathway and then monitoring the corresponding changes in the end products (60). The experiments described in this article were designed to determine whether the first enzyme in the MEP pathway, DXS, is a limiting part of the production of plastidic IPP. Additionally, if DXS is limiting, we wanted to evaluate the effects of altering its level on seed germination, plant growth, and isoprenoid abundance.

The general finding for three divergent isoprenoid pathways is that by raising the level of DXS, the levels of isoprenoids are raised, and when the level of DXS is lowered, so are the levels of isoprenoids. Because the changes in DXS levels lead to changes in isoprenoid abundance, we propose that DXS is one of the limiting enzymes in the MEP pathway. It is likely that other co-limiting enzymes for each specific isoprenoid are present in the plant MEP pathway or further downstream, as we did not observe a linear relationship between changes in DXS and its end products. Additional limiting enzymes would also explain the differences observed in the relative increases among the isoprenoids monitored in this work. This is the case for chlorophyll and carotenoid content where increases in their levels are more restricted than others. To identify other limiting enzymes of the MEP pathway will require further analyses when the complete enzymatic steps are known and the relative effects of changing the levels of other MEP pathway enzymes have been evaluated. Recently, the MEP pathway has been intensively studied in bacteria where it was found that DXS also is as a limiting enzyme, and DXR is not (26, 34, 52). This conclusion is also supported by recent work on tomato fruit ripening. Lois *et al.* (25) found that DXS was limiting for carotenoid production over the previously identified limiting step of carotenoid biosynthesis (PSY1). They reasoned that DXS was limiting the amount of IPP available for carotenoid synthesis because even when there were increases in *PSY1* transcript levels, there were no increases in carotenoids without increases in DXS. The accumulated evidence indicates that DXS is one of the limiting steps in the MEP pathway of plants as well as in bacteria.

In this work we analyzed isoprenoids that are synthesized at very low levels such as hormones, and isoprenoids that are required in large quantities such as chlorophylls and carotenoids. In both cases a moderate change in the DXS level produced differences in the levels of the final isoprenoid products. Despite the fact that the biosynthetic pathway of GA has been intensively studied, there is no direct evidence that these hormones are actually synthesized via the MEP pathway. Our data suggest that GA biosynthesis depends, at least in part, on the IPP that comes from the MEP pathway. However, based on the expression of the *GA4* gene, the *cla1-1* mutant seems to contain active GA, which suggests that an additional source of IPP exists. Whether this IPP is the result of the import of cytosolic IPP (15) or if it comes from other sources remains to be established. Other groups have also looked at increasing or decreasing the levels of the hormones ABA (58, 61) and GA (62–64) by modulating the levels of enzymes in their individual post-IPP biosynthetic pathways. These studies have obtained relatively large changes in hormone levels with phenotypes complementing the proposed functions of these hormones, which demonstrate additional key regulatory steps in these biosynthetic pathways.

Much research has been devoted to increasing the levels of the isoprenoids α -carotene, β -carotene (3, 65, 66), and α -tocopherol (2) due, in part, to the importance of these molecules as precursors to vitamins needed by mammals. When total carotenoid content was increased (65, 66), there were concomitant

decreases in other isoprenoids. The results of these studies also support that the amount of IPP is limiting for isoprenoid production. In contrast, when only the relative quantity of isoprenoid end products was changed such as α -carotene to β -carotene (3) or γ -tocopherol to α -tocopherol (2), there were no other effects noted. By changing the amount of DXS and thus IPP levels, we are reporting the first instance in plants where a general increase or decrease in multiple plastidic isoprenoids was observed. Because moderate alterations in DXS levels (38–172%) lead to changes in all of the isoprenoids tested, it is apparent that the IPP from the MEP pathway is also limiting for the production of plastidic isoprenoids. The limiting role of IPP availability in isoprenoid production implies that to increase an individual isoprenoid without decreasing other isoprenoids requires a concurrent increase in IPP production.

Even though the levels of the different isoprenoids increase or decrease according to the level of DXS, the various isoprenoids do not change equally showing the complexity of the isoprenoid biosynthetic pathways that diverge from plastidic IPP. These results, together with the studies mentioned above wherein amounts of individual isoprenoids could be modulated through manipulation of genes in their post-IPP biosynthetic pathways, demonstrate that each of these post-IPP biosynthetic pathways has its own set of limiting and regulatory steps.

Aside from the measured changes in isoprenoid content, the DXS-overexpressing and -suppressed transgenic plants had close to normal phenotypes when grown in germination medium or in soil under optimal conditions. Significant differences were observed in the growth rates of the 8- and 26-day-old transgenic plants but not in the final plant size. These differences are not likely to be due solely to the observed changes in GA levels because changes of this hormone result in either dwarf or giant phenotypes (67). A possible explanation for the growth rate effects in the transgenic lines is that the plastidic IPP pathway receives its substrates directly from the Calvin cycle; therefore, changing the amount of IPP produced in these plants might have a direct effect on photosynthetic carbon availability to other pathways in the cell. Therefore, we hypothesized that the differences in growth rates are likely due to a pleiotropic effect of changes in carbon metabolism and hormone levels. On the other hand, the differences in germination rates can likely be directly correlated to the effects of either raised or lowered ABA levels. ABA plays a major role in setting and maintaining dormancy in seeds (56). The DXS-suppressed plants with less ABA content germinated rapidly whereas the DXS-overexpressing plants had poor germination rates. These results are very similar to those obtained for ABA mutants of the post-IPP biosynthetic pathway (58, 61). In addition to the germination rates, transgenic plants containing 4-fold more ABA do not display any other phenotypes when grown under normal conditions. In contrast to what was reported in tomato, we could not observe overguttation or chlorosis in the leaves of these plants, when grown under normal conditions (58). It is possible that the levels of ABA in the transgenic lines are not sufficient to generate these phenotypes in *Arabidopsis* or that a specific growth condition could be required to display these phenotypes. We believe that a more detailed analysis of these plants could provide additional information about ABA regulation and function in plants. For example, the proposed regulation between biosynthesis and catabolism of ABA seems insufficient to prevent the ABA increments observed in the overexpressing plants. These results are similar to what was found with the ectopic expression of the tomato 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase enzyme, involved in the ABA biosynthetic pathway (58). Altering DXS

levels, and hence IPP, manifested itself phenotypically in changes in growth rates, but not the final plant size, as well as having an effect on germination rates.

Varying the quantity of DXS may also lead to differences in the amounts of thiamin and pyridoxol because the product of DXS, DXP, is a precursor to these molecules as well as IPP. However, it is unlikely that either thiamin or pyridoxol deficiency gives rise to the observed phenotypes of these transgenic plants because the measurements of isoprenoid content and seedling size were performed in the presence of media containing vitamin supplements. As suggested in the initial studies of the *clal-1* mutant (27, 28), alterations in the quantity of vitamins cannot account for the phenotypes that were observed in the transgenic plants.

Finally, since many isoprenoids are useful in medical, nutritional, or industrial applications and our ability to manipulate successfully metabolic pathways in plants continues to improve, isoprenoids are becoming a prime target for the production of commercially viable transgenic plants. By having isolated and characterized DXS (27, 28), the first gene in the MEP pathway of plants, we wanted to know if DXS was one of the limiting enzymes of the MEP pathway as it is in bacteria (24, 26, 34). We tested this idea by manipulating DXS levels in transgenic plants. We observed changes in the levels of a wide variety of isoprenoids, and these increases or decreases in isoprenoid levels followed the levels of DXS. From these results we conclude that DXS catalyzes one of the limiting steps of the MEP pathway. Also, since changes in DXS levels exert their effect on isoprenoid levels through changing the levels of IPP, it would appear that plastidic isoprenoid production is limited by the availability of IPP. Although other studies have shown increases or decreases in single isoprenoids (2, 3, 58, 61–64) or increases in one isoprenoid with decreases in others (65, 66), this is the first report that shows changes in several plastidic isoprenoid levels by altering the levels of the first enzyme in the MEP pathway, DXS.

Acknowledgments—We thank Analilia Arroyo Becerra, Dr. Yuji Kamiya, and Dr. Kenneth Luhersen for their critical comments on the manuscript and Dr. Brigitte Nowakowsky for expert technical help. BASFAG contributed to the characterization of transgenic plants without any participation in their generation.

REFERENCES

- Hirschberg, J. (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 186–191
- Shintani, D., and DellaPenna, D. (1998) *Science* **282**, 2098–2100
- Römer, S., Fraser, P. D., Kiano, J. W., Shipton, C. A., Misawa, N., Schuch, W., and Bramley, P. M. (2000) *Nat. Biotechnol.* **18**, 666–669
- Ye, X., Al-Babili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., and Potrykus, I. (2000) *Science* **287**, 303–305
- Blagosklonny, M. V., and Fojo, T. (1999) *Int. J. Cancer* **83**, 151–156
- Jomaa, H., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemeyer, C., Hintz, M., Türbachova, I., Eberl, M., Zeidler, J., Lichtenthaler, H. K., Soldati, D., and Beck, E. (1999) *Science* **285**, 1573–1576
- Lange, B. M., and Croteau, R. (1999) *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 139–144
- Newman, J. D., and Chappell, J. (1999) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **34**, 95–106
- Bach, T. J., Boronat, A., Campos, N., Ferrer, A., and Vollaek, K.-U. (1999) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **34**, 107–122
- Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1990) *Nature* **343**, 425–430
- Disch, A., Schwender, J., Müller, C., Lichtenthaler, H. K., and Rohmer, M. (1998) *Biochem. J.* **333**, 381–388
- Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B., and Sahn, H. (1993) *Biochem. J.* **295**, 517–524
- Rohmer, M., Seemann, M., Horbach, S., Bringer-Meyer, S., and Sahn, H. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 2564–2566
- Rohmer, M. (1999) *Nat. Prod. Rep.* **16**, 565–574
- Lichtenthaler, H. K. (1999) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 47–66
- Schwender, J., Seemann, M., Lichtenthaler, H. K., and Rohmer, M. (1996) *Biochem. J.* **316**, 73–80
- Zeidler, J. G., Lichtenthaler, H. K., May, H. U., and Lichtenthaler, F. W. (1997) *Z. Naturforsch.* **52**, 15–23
- Eisenreich, W., Schwarz, M., Cartayrade, A., Arigoni, D., Zenk, M., and Bacher, A. (1998) *Chem. Biol.* **5**, 221–233
- Lichtenthaler, H. K., Rohmer, M., and Schwender, J. (1997) *Physiol. Plant.* **101**, 643–652
- Sprenger, G. A., Schörken, U., Wiegert, I., Grolle, S., De Graaf, A. A., Taylor,

- S. V. Bogley, T. P., Bringer-Moyer S and Sahn H (1997) *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 12857-12862
- 21 Lois, I. M., Campos, N., Putra, S. R., Danielsen, K., Rohmer M and Boronot A. (1998) *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 2105-2110
- 22 Lange, B. M., Wildung, M. R., McCaskill D and Croteau R (1998) *Proc Natl Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 2100-2104
- 23 Bouvier, F., d'Harlingue, A., Suire, C., Backhaus, R. A. and Camara B (1998) *Plant Physiol.* **117**, 1423-1431
- 24 Miller, B., Houser, T., and Zimmer, W (1999) *FEBS Lett.* **460**, 485-490
- 25 Lois L. M., Rodríguez-Concepción M, Gallego F, Campos N and Boronot A. (2000) *Plant J.* **22**, 503-513
- 26 Kuzuyama, T., Takagi, M., Takahashi S and Seto, H. (2000) *J Bacteriol* **182**, 891-897
- 27 Mandel, M. A., Feldmann K. A., Herrera-Estrella I., Rocha-Sosa M, and León P. (1996) *Plant J.* **9**, 649-658
- 28 Estévez, J. M., Cantera A., Romero, C., Kawaide, H., Jiménez, I. F., Kuzuyama, T., Seto, H., Kamiya Y and León, P. (2000) *Plant Physiol* **124**, 95-103
- 29 Julliard, J. H. (1992) *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **314**, 285-290
- 30 Julliard, J. H. and Douce R (1991) *Proc Natl Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 2042-2045
- 31 Takahashi, S., Kuzuyama, I., Watanabe H. and Seto, H. (1998) *Proc Natl Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 9879-9884
- 32 Lange, B. M., and Croteau R. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* **365**, 170-174
- 33 Schwender, J., Müller, C., Zeidler, J. and Lichtenthaler, H. K. (1999) *FEBS Lett* **455**, 140-144
- 34 Miller, B., Houser, T., and Zimmer, W. (2000) *FEBS Lett.* **481**, 221-226
- 35 Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Fellermeier, M., Sagner, S., Herz, S., Kis K., Eisenreich, W., Bacher, A. and Zenk M. H. (1999) *Proc Natl Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 11758-11763
- 36 Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Eisenreich, W., Richter, G., Schuhr, C. A., Hecht, S., Zenk M. H. and Bacher A. (2000) *Proc Natl Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 6451-6456
- 37 Lüttgen, H., Rohdich, F., Herz, S., Wungsintaweekul, J., Hecht, S., Schuhr, C. A., Fellermeier, M., Sagner, S., Zenk, M. H., Bacher, A. and Eisenreich W. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1062-1067
- 38 Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Lüttgen, H., Fischer, M., Eisenreich, W., Schuhr, C. A., Fellermeier, M., Schramek, N., Zenk, M. H. and Bacher A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8251-8256
- 39 Herz, S., Wungsintaweekul, J., Schuhr, C. A., Hecht, S., Lüttgen, H., Sagner, S., Fellermeier, M., Eisenreich, W., Zenk, M. H., Bacher, A. and Rohdich F. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 2486-2490
- 40 Kinney A. J. (1998) *Curr Opin Plant Biol.* **1**, 173-178
- 41 Bevan, M. (1984) *Nucleic Acids Res.* **12**, 8711-8721
- 42 Valvekens, D., Van-Montagu, M., and Van-Lijsebettens, M. (1988) *Proc Natl Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 5536-5540
- 43 Logemann, J., Schell J., and Willmitzer, L. (1987) *Anal Biochem* **163**, 16-20
- 44 Church, C. M., and Gilbert W. (1984) *Proc Natl Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 1991-1995
- 45 Lichtenthaler, H. K. (1987) *Methods Enzymol.* **148**, 350-382
- 46 Peña-Cortés, H., Sanchez-Serrano J., Martens, R., Willmitzer, I. and Pratt, S. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 9851-9855
- 47 Vaucheret, H., Beclin, C., Elmayan T., Fouerbach, F., Godon, C., Morel J. B., Mourrain P., Palauqui J. C. and Vernhettes S. (1998) *Plant J.* **16**, 651-659
- 48 Arango, Y., and Heise K.-P. (1998) *Biochem. J.* **336**, 531-533
- 49 Cunningham, F. X., and Gantt, E. (1998) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **49**, 557-583
- 50 Cutler, A. J., and Krochko J. E. (1999) *Trends Plant Sci.* **4**, 472-478
- 51 Bramley, P., Teulieres C., Blain I., Bird, C. and Schuch W. (1992) *Plant J.* **2**, 343-49
- 52 Harker, M., and Bramley, P. M. (1999) *FEBS Lett.* **448**, 115-119
- 53 Yamaguchi, S., and Kamiya, Y. (2000) *Plant Cell Physiol.* **41**, 251-257
- 54 Totté, N., Charon L., Rohmer M., Compagnolle, F., Babouef, I. and Geuns, J. M. C. (2000) *Tetrahedron Lett.* **41**, 6407-6410
- 55 Cowling, R. J., Kamiya Y., Seto H. and Harbord N. P. (1998) *Plant Physiol* **117**, 1195-1203
- 56 Koornneef, M., and Karssen G. M. (1994) in *Sced Dormancy and Germination* (Meyerowitz, E. M. and Somerville, C. R., eds) pp 313-334 Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, NY
- 57 MacRobbie, E. A. C. (1991) in *Abscisic Acid, Physiology and Biochemistry* (Davies W. J. and Jones H. G. eds) pp 23-35 BIOS Scientific Publishers, Oxford
- 58 Thompson, A. J., Jackson, A. C., Symonds, R. C., Mulholland, B. J., Dadswell, A. R., Blake P. S., Burbidge A. and Taylor I. B. (2000) *Plant J.* **23**, 363-374
- 59 Lange B. M., Rujan I., Martin, W. and Croteau R. (2000) *Proc Natl Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13172-13177
- 60 Furbank R. T., and Taylor, W. C. (1995) *Plant Cell* **7**, 797-807
- 61 Frey, A., Audran, C., Marin E., Sotta B. and Marion-Poll, A. (1999) *Plant Mol. Biol.* **39**, 1267-1274
- 62 Eriksson, M. E., Israelsson M., Olsson O. and Moritz T. (2000) *Nat Biotechnol* **18**, 784-788
- 63 Huang, S. S., Raman A. S., Ream, J. E., Fujiwara H., Cerny R. E. and Brown, S. M. (1998) *Plant Physiol.* **118**, 773-781
- 64 Coles, J. P., Phillips, A. L., Croker, S. J., Garcia-Lepe R., Lewis M. J. and Hedden, P. (1999) *Plant J.* **17**, 547-556
- 65 Shewmaker, C. K., Sheehy J. A., Daley M., Colburn S. and Ke D. Y. (1999) *Plant J.* **20**, 401-412
- 66 Fray, R. G., Wallace, A., Fraser, P. D., Valero, D., Hedden P., Bramley P. M., and Grierson, D. (1995) *Plant J.* **8**, 693-701
- 67 Ross J. J., Murfet I. C. and Reid, J. B. (1997) *Physiol Plant* **100**, 550-560

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS ADICIONALES

En esta sección se describen resultados adicionales que se obtuvieron durante los estudios doctorales. Los resultados forman parte de proyectos de investigación relacionados con la caracterización de la vía MEP en *A. thaliana*.

Caracterización del gen *CLA1* de *A. thaliana*

- La proteína DXS1 es importada a plástidos

Mandel y cols., (1996) reportaron que el amino terminal de la proteína CLA1 (DXS1) de *Arabidopsis* tenía características de péptido de transporte a plástidos (PTPCLA). Para confirmar la función del PTPCLA *in vivo*, 70 aminoácidos del amino terminal de la DXS fueron fusionados a la proteína verde fluorescente (GFP). La construcción generada pHBT/PTPCLA-GFP, así como las construcciones control pTH10 (conteniendo el PTP de la subunidad pequeña de la Rubisco fusionado a la GFP) y pHBT/sGFP-TYG (únicamente contiene la GFP) fueron expresadas transitoriamente en protoplastos de tabaco. Los análisis en protoplastos transformados con la construcción pHBT/PTPCLA-GFP mostraron que la proteína verde fluorescente se localizó en los cloroplastos (Figura #10A). En protoplastos transformados con pTH10 la señal de la GFP también fué ubicada en los cloroplastos (Figura #10B), mientras que en los protoplastos que expresan la construcción pHBT/sGFP-TYG, la GFP fue localizada homogéneamente en el citoplasma (Figura #10C). Estos datos confirman que la DXS1 de *Arabidopsis* es importada a plástidos, hecho congruente con la ubicación de la vía MEP en plantas.

Caracterización de la región regulatoria *CLA1*

Uno de los objetivos de este proyecto de investigación, es identificar regiones 5' importantes para la expresión espacial y temporal del gen *CLA1*. Para llevar a cabo este objetivo, se decidió emplear la siguiente estrategia: Realizar deleciones progresivas de la región regulatoria *CLA1* (RRCLA1). A su vez, generar fusiones traduccionales con el gen reportero GUS (RRCLA1::GUS), para luego ser probadas en plantas transgénicas de *Arabidopsis*.

En esta tesis se reporta la construcción de las fusiones y la obtención de plantas transgénicas. Los análisis histoquímicos de las líneas transgénicas generadas forman parte de la tesis de licenciatura de la estudiante Cynthia Romero Guido (2002).

- Construcción de fusiones traduccionales

Inicialmente, un fragmento de aproximadamente 2 kb de la región regulatoria del gen *CLA1* (incluido en la clona genómica L-19), fué incubado con las enzimas Exonucleasa III y Mung Bean para generar deleciones en el sentido 5' a 3'. Para un primer análisis se consideró probar fragmentos de 759 pb, 488 bp 330 pb y 170 pb (contando a partir del codón ATG). Los tres primeros fragmentos fueron amplificados por PCR usando los oligos ATG-Nco (GCAGAAGAAGCCATGGGAGGTAC) y BS-Hind (GGCCAAGCTTACGCCAAGCGCAAT), los cuales adicionan los sitios de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

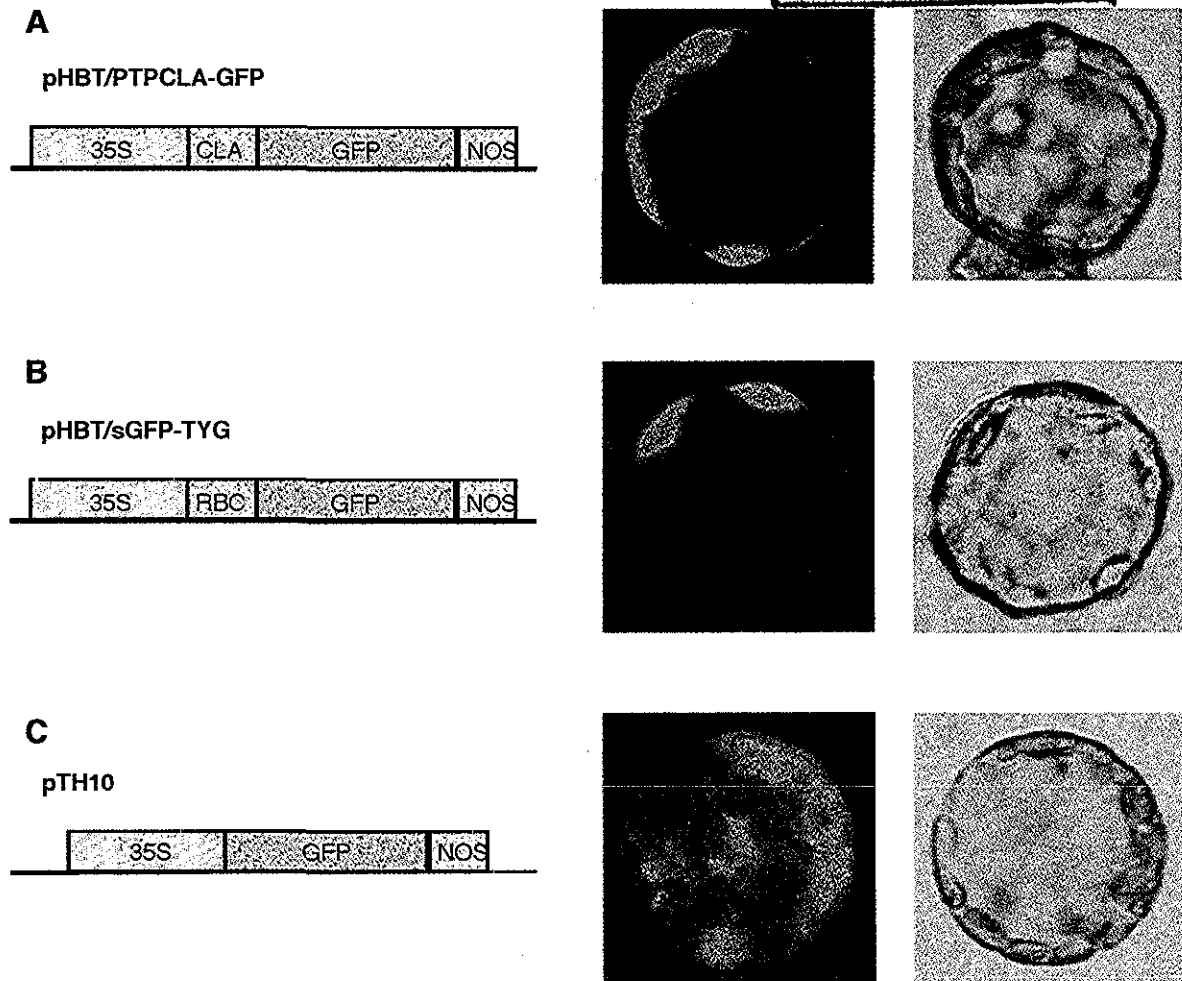


Figura #10. Localización de la proteína verde fluorescente (GFP) en protoplastos de tabaco. **A**, protoplasto transformado con la construcción pHBT/PTPCLA-GFP, la GFP está localizada en los cloroplastos. **B**, protoplasto que expresa pTH10, la GFP se observa en los cloroplastos. **C**, protoplasto transformado con pHBT/sGFP-TYG, la GFP está localizada en el citoplasma. Los protoplastos fueron observados en campo claro y la señal de la GFP fue detectada con epifluorescencia. 35S, promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor; CLA, péptido de señal de CLA1 (DXS1); RBC, péptido de transporte a plástidos de la Rubisco; NOS, sitio de poliadenilación del gen de la nopalina sintasa.

restricción NcoI y HindIII respectivamente. El fragmento de 170 pb también fué amplificado por PCR usando los oligos AIG-Nco y P-100 (CGGAAGCTTCACACACTTCACTTGTIAG), este último contiene el sitio de restricción HindIII. Los productos de PCR fueron digeridos y subclonados traduccionalmente a la secuencia codificante del gen *uid A* (GUS) en los sitios HindIII

y NcoI del vector pBlue/35S-GUS. Los plásmidos generados fueron nombrados pBlue/759-GUS, pBlue/488-GUS, pBlue/330-GUS y pBlue/170-GUS. A partir de las construcciones anteriores se obtuvieron las diferentes fusiones RRCLA1::GUS mediante digestión con HindIII y Eco RI, las cuales fueron clonadas en el vector binario pBin 19 (Bevan, 1984), en los sitios HindIII y NcoI. Las construcciones resultantes fueron llamadas pBin/759-GUS, pBin/488-GUS, pBin/330-GUS y pBin/170-GUS (Figura # 11)

- Generación de plantas transgénicas

Las fusiones RRCLA1::GUS fueron introducidas a plantas silvestres de *Arabidopsis*, (ecotipo Columbia), a través de la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando el método de infiltración por vacío (Bechtold y cols., 1993). Las plantas transgénicas (T₁) fueron identificadas por su capacidad para desarrollar raíces y mantener hojas verdes en presencia de 50µg/ml kanamicina.

Posteriormente, las plantas T₁ (considerando a cada planta como línea independiente) fueron transferidas a tierra para obtener las siguientes generaciones. Al menos 5 líneas independientes de cada construcción fueron seleccionadas para los análisis histoquímicos. Aunque en este trabajo no se muestran los análisis histoquímicos, cabe mencionar que los resultados sugieren que en la secuencia comprendida entre 488 y 759 pb de la región regulatoria CLA1 existen elementos de acción *in cis* importantes para la expresión espacial y temporal del gen CLA1.

Manipulación de los niveles de la enzima DXS1

- Contenido de ácido abscísico en semillas transgénicas

La modulación de los niveles de la enzima DXS1 en plantas de *Arabidopsis*, conduce a cambios en el contenido de isoprenoides formados a través de la vía MEP, por ejemplo el ácido abscísico (Estévez y cols., 2001). Para explorar tal efecto en otras estructuras de la planta, se consideró la semilla, ya que ésta acumula ABA durante su desarrollo y maduración (Koorneef y Karssen, 1994).

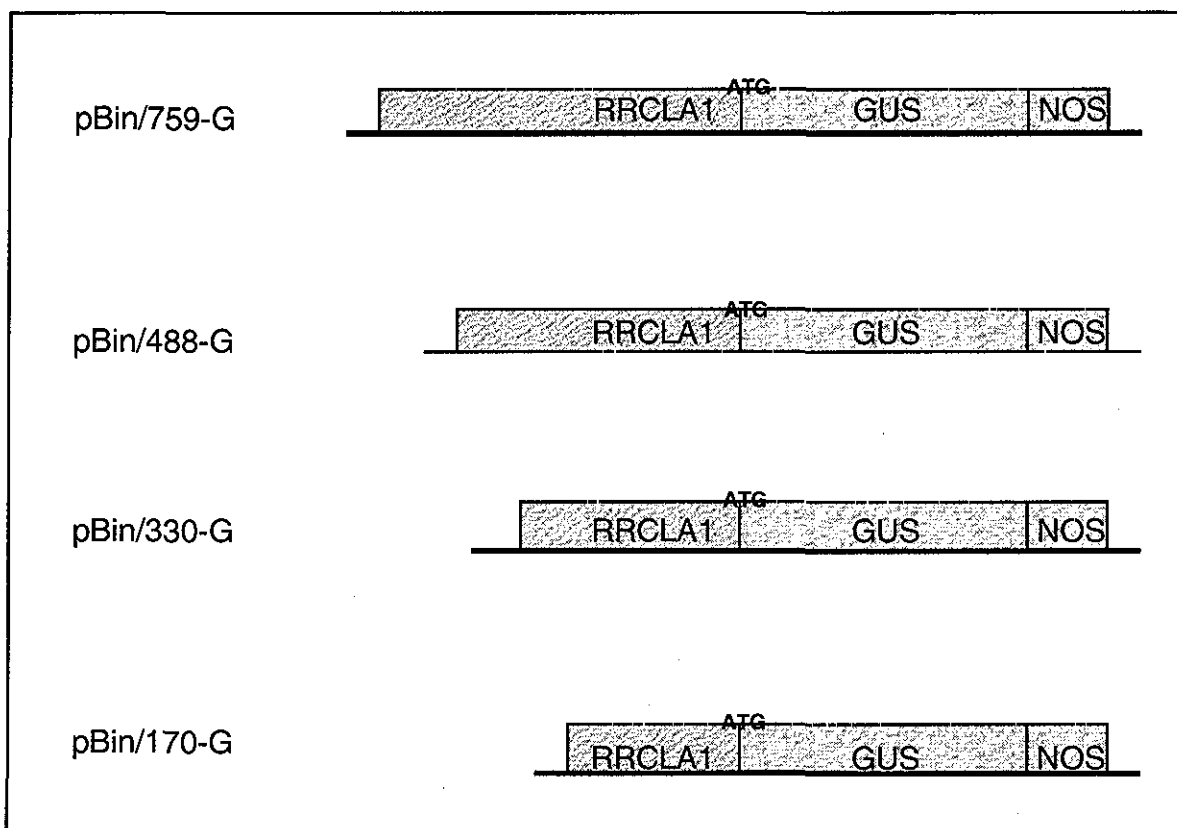


Figura #11. Representación esquemática de las construcciones RRCLA1::GUS. Las fusiones incluyen 759 pb (pBin/759-G), 488 pb (pBin/488-G), 330 pb (pBin/330-G) y 170 pb (pBin/170-G) respectivamente de la región reguladora del gen *CLA1* (RRCLA1). ATG, codón del inicio de la traducción; GUS, gene *uidA*; NOS, sitio de poliadenilación de la nopalino sintasa.

por ejemplo el ácido abscísico (Estévez y cols., 2001). Para explorar tal efecto en otras estructuras de la planta, se consideró la semilla, ya que ésta acumula ABA durante su desarrollo y maduración (Koorneef y Karssen, 1994).

La cuantificación de ABA se realizó utilizando semillas de plantas con niveles elevados de DXS1 (S-2, S-17 y S-14), semillas de líneas con niveles reducidos de DXS1 (S-7, A-6 y A-18) y semillas silvestres. Estas semillas fueron recién cosechadas y nunca expuestas a tratamientos de frío. Los resultados mostraron que los niveles alterados de DXS1, también conducen a cambios en el contenido de ABA en semillas transgénicas. En comparación con semillas silvestres, las semillas S-2, S-17 y S-14 incrementaron su contenido de ABA, entre 1700 y 2500% (Figura #12). En contraste, las semillas S-7, A-6 y A-18 acumularon cantidades menores de ABA que las semillas silvestres (Figura #12). El efecto observado como resultado de la acumulación de ABA en las semillas transgénicas, fue cambios en la tasa de germinación (Estévez y cols., 2001).

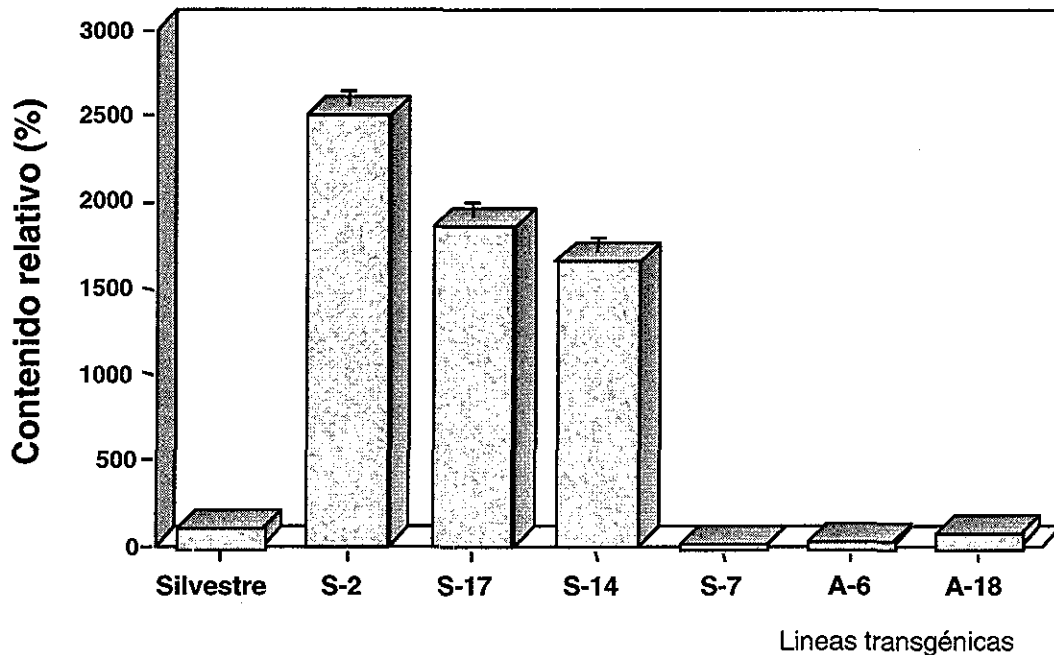


Figura #12. Contenido de ácido abscísico (ABA) en semillas transgénicas y silvestres. El ABA fué extraído de semillas silvestres, de líneas que sobreexpresan DXS1 (S-2, S-17 y S-14) y de líneas con niveles reducidos de DXS (S-7, A-6 y A-18). Las semillas nunca fueron tratadas con frío. Cada columna representa el promedio de dos mediciones expresado en porcentaje, considerando que la cantidad de ABA en semillas silvestres es 100 %.

Análisis de la vía MEP en el genoma de *A. thaliana*

- Secuencias homólogas al gen *CLA1*

Mandel y cols., (1996) sugirieron a través del análisis Southern, que el gen *CLA1* (*DXS1*) era único en el genoma nuclear de *Arabidopsis*. Sin embargo, esta idea cambió con la secuenciación completa de este genoma (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). La comparación del gen *CLA1* en el genoma de *Arabidopsis* reveló la presencia de dos secuencias adicionales con similitud a *DXS1*.

En este trabajo los genes identificados son llamados *DXS2* y *DXS3* (Figura #13). El alineamiento a nivel de aminoácidos entre *DXS1* y *DXS2* mostró 83% de identidad, mientras que entre *DXS1* y *DXS3* existe 56% de identidad. El análisis comparativo, también mostró que los genes putativos *DXS2* y *DXS3* se encuentran en los cromosomas 3 y 5 respectivamente (Tabla #4).

Ya que la secuencia *DXS1* contiene el sitio de unión al cofactor TPP y el motivo transcetolasa, se analizó si en *DXS2* y *DXS3* están conservadas estas secuencias. Los resultados mostraron que hacia al amino terminal de ambas proteínas existe una secuencia con características del sitio de unión al cofactor (Figura #13). Además, tanto la *DXS2* como la *DXS3* contienen hacia el carboxilo terminal una secuencia con

homología al motivo transcetolasa (Figura #13).

Tabla #4. Características de las enzimas de la vía MEP de *A. thaliana*

Gen	Enzima	Cromosoma	aa	KDa	PTP
<i>CLA1</i>	DXS1	4	717	76.8	68 aa
<i>DXS2</i>	DXS2 ^Å	3	628	65.3	46 aa
<i>DXS3</i>	DXS3 ^Å	5	700	76.6	68 aa
<i>ispC</i>	DXR	5	477	51.9	86 aa
<i>ispD</i>	CMES	2	278	31.0	61 aa
<i>ispE</i>	CMEC	2	383	42.0	41 aa
<i>ispF</i>	MECS	1	161	17.2	52 aa
<i>ispG</i>	GcpE ^Å	5	741	82.2	38 aa
<i>LytB</i>	LytB ^Å	4	452	51.3	38 aa
<i>xyIB</i>	XC	2	442	48.3	-

Los datos mostrados en esta tabla fueron tomados de la base de MIPS (<http://www.mips.biochem.mpg.de/proj/thal/>). DXS, 1-desoxy-D-xilulosa 5-fosfato sintasa; DXR, 1-desoxy-D-xilulosa 4-fosfato reductoisomerasa; CMES, 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintasa; CMEC, 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol cinasa; MECS, 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa; XC, D-xilulosa cinasa. Å proteínas de función desconocida; aa, número de amino ácidos; KDa, peso molecular; PTP, péptido de transporte a plástidos; el signo - indica que aún no se ha detectado un péptido señal a plástidos.

Estos datos sugieren que ambas proteínas podrían ser miembros de la familia de las transcetolasas y unir el cofactor TPP. Se ha propuesto que las enzimas DX sintetas contienen en el motivo transcetolasa la secuencia DRAG, que reemplaza la secuencia THDS presente en las transcetolasas típicas. Al igual que la DXS1, la DXS2 conserva la secuencia DRAG. En cambio la DXS3 contiene la secuencia TSAG, aunque esta secuencia carece de una histidina sumamente conservada (THDS) en las transcetolasas típicas (Figura #13). Otro aspecto importante es que en el N-terminal de la DXS2 y DXS3 existe una secuencia con características de péptido de transporte a plástidos, lo que indica que estas proteínas podrían ser importadas a los plástidos. Los datos mencionados en esta sección sugieren que la enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa de *Arabidopsis* podría ser codificada por más de un gen.

```

AtDXS1      MASSAFAPPSYIITKGGGLTDSCKSTSLSSRSIVTDLPSCLKFNNSHNSNR--RAKVC 58
AtDXS2      MALSVFAEPSYINRNP--SLKYLYKPSMSSTK-----YSKV--RATTF 39
AtDXS3      MGSASIGYQFGISARFYGNFNLSSDITVSSLPCCKLDVSIKSLFSAPSSSTHKEYSNRARC 60
          * : : : *                               : **               : : : *

AtDXS1      ASLAEKGEYYSNRPPPIPLDTINYPIHMKNISVKELKQISDELRSDFVFNVS-KTGGHLG 117
AtDXS2      S---EKGEYYSNRPPPIPLDTINHPMMMKNISIKELKVI SDELRSDFVFNVS-KTGGHLG 95
AtDXS3      S-LPNTDGYCDEKFETPILDSIEIPLQIKNLSVKELKILADEIRTEIHSVLWKKIQKSMN 119
          : : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

AtDXS1      SSLGVVEIIVALHYIFNIPQDKILWDVGHQSYPHKIIIGRRGKMPIMRQTNGISGFIKRG 177
AtDXS2      SNLGVVEIIVALHYIFNIPHDKILWDVGHQSYPHKIIIGRRGKMKIIRQTNGISGYIKRR 155
AtDXS3      PSFAAIEIIVALHYVFRAPVDNILLDAVEQTYAHKVIIRRWSAIPS-RQNSGISGVI SRI 178
          : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

          sitio de union a IPP
AtDXS1      ESEHDCFGIGHSSIIISAGLGMVGRDILKGNVNVVAVIGDGAMIAGQAYEAMNNAGYID 237
AtDXS2      ESEHDSFGTGHSSIIISAGLGMVGRDLKGMNNSVVSVIGDGAMIAGQAYEAMNNAGYIH 215
AtDXS3      ESEYDSFGTGHGNSISAGLGLAVARDMKGKRDVVAVIDNVTIAGQAYEAMSNAGYID 238
          * : * * * * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

AtDXS1      SDMIVIIINDNKQVSIPTAILDGPPSPVGAISSAISRLQSNPAIRELREVAKGMIKQIGGP 297
AtDXS2      SNMIVIIINDNKQVSIPTANLDGPTQPVGAISCAISRLQSN----- 255
AtDXS3      SNMIVIIINDSR-HSLHPNMEEGSKASISAISSIMSKIQSSKVFRRKREIAKAMIKRIGKG 297
          * : * * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

AtDXS1      MHQIAAKVDEYARGMISGIGSSI FEELGLYYIGPVDGHNIDDLVAIIEKVKSIIRIIGPVI 357
AtDXS2      -----CGMIRETSSITFEELGFHYVGPVDGHNIDDLVSIIEITIKSIKIIGPVI 303
AtDXS3      MYEWAAKVDEYARGMVGPTGSLFEELGLYYIGPVDGHNIEDLVCVLRVSSIDSMGPVL 357
          : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

AtDXS1      IHVVIKGRGYPYAEERADDKYHGVVCFDPAIGRQFKIINKIQSYIYFAEALVAEAEVDK 417
AtDXS2      IHVVIKGRGYPYAEERADDKYH-VLKFDPETGKQFKNISKIQSYISCFVEALIAEAEADK 362
AtDXS3      VHVIIEGNR-----DAETVKNIMVKDR-RTYSDCFVEALVMEAEKDR 398
          * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

AtDXS1      DVVAIHAAMGGGIGINIQRFPTRCFDVGIAEQHAVIFAAGIACEGLKPPCAIYSSFMQ 477
AtDXS2      DIVVAIHAAMGGGTMLNLFESRFPTRCFDVGIAEQHAVIFAAGIACEGLKPPCIYSSFMQ 422
AtDXS3      DIVVHAGMEMDPSLITFQERFPDRFFNVGMAEQHAVIFSAGLSSGGGLKPPCIIPSAFIQ 458
          * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

          Motivo transcetolasa
AtDXS1      RAYDQVVHDVLDLQKLPVRFAMDRAGLVGADGPTHCGAFDVFMACLPNMIVMAPSDEADI 537
AtDXS2      RAYDQVVHDVLDLQKLPVRFALDRAGLMGADGPTHCGAFDVFMACLPNMIVMAPSDEAEI 482
AtDXS3      RAYDQVVHDVDRQRKAVRFVITISAGLVGSDGVPVQCGAFDIAFMSSLPNMIAMAPADEL 518
          * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

AtDXS1      FNMVAIAVAIDDRPSCFRYPNGNGIGVALPPGNKGVPIEIGKGRILKEGERVALIGYGSA 597
AtDXS2      FNMVAIAAAIDDRPSCFRYHRGNGIGVSLPPGNKGVPLQIGRRIIRDGERVALIGYGSA 542
AtDXS3      VNMVAIAAYVIDRPVCFRFRPGSIVNMNYIVP-IGLPVIEIGRGRVIVEGQDVALLYGAM 577
          * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

AtDXS1      VQSCIGAAMVIEERGINVIVADARFCKPLDRAIIRSLAKSHEVIIVEEGSIGGFGSHV 657
AtDXS2      VQRCLAAASMLSERGLKIIIVADARFCKPLDVALIRSLAKSHEVIIVEEGSIGGFGSHV 602
AtDXS3      VQNCLEHAHSLSKLGLNVIIVADARFCKPLDIKLVRLDLCQNHKFLIIVEEGCVGGFGSHVA 637
          * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

AtDXS1      QFIALDGLLDGKI KWRPMVL PDRYIDHGAPADQIAEAGIMPSHIAAIALNLIGAPREALF 717
AtDXS2      QFIALDGLLDGKIKVY-----RIWIINGSIS----- 628
AtDXS3      QFIALDGLLDGNIKWRPIVLPDGYIEEASPREQIALAGLIGHHIAAIALSLGRIREALI 697
          * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

```

Figura #13. Alineamiento entre 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXS1) y dos DXS putativas de *A. thaliana*. Letras en negritas denotan el sitio de unión a tiamina difosfato (TPP) y el motivo transcetolasa.

- Los genes subsecuentes a DXS son secuencias únicas

Los genes descritos para la vía MEP fueron comparados en el genoma de *A. thaliana*. Los resultados de tales análisis mostraron que los genes *ispC*, *ispD*, *ispE*, *ispF*, *ispG*, *lytB* y *xylB*, son secuencias únicas en Arabidopsis, las cuales están ubicadas en diferentes cromosomas (Tabla #4). También se encontró que las proteínas conservan hacia el amino terminal características de péptido señal a plástido, esto sugiere que las proteínas podrían ser transportadas a los plástidos.

Excepto por el gen *xylB* (D-xilulosa sintasa), la presencia de los genes de la vía MEP como secuencias únicas en el genoma de Arabidopsis, indica que estos genes son esenciales para la sobrevivencia de la planta. La mutación en estos genes debería generar un fenotipo letal, como el observado en la mutante *cla1-1*.

DISCUSIÓN

La reciente identificación de la vía 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) para la formación de isopentenil difosfato y dimetilalil difosfato, ha llevado a replantear la biosíntesis de isoprenoides en muchos organismos. Los resultados de estudios bioquímicos, moleculares y genómicos han permitido conocer que las plantas superiores, varias especies de algas, bacterias, algunas cepas de *Streptomyces* y *Plasmodium falciparum* utilizan la vía MEP para la biosíntesis de sus isoprenoides. Muchos de estos isoprenoides desempeñan funciones importantes en procesos biológicos, tales como la fotosíntesis, desarrollo, respiración, etc. Así entonces, la vía MEP resulta ser esencial para la vida de los organismos que la contienen.

Aunque se han logrado importantes avances en la elucidación de la vía MEP, aún se desconocen varios aspectos sobre la naturaleza y regulación de las enzimas involucradas en la ruta. La información generada en esta tesis doctoral, ha contribuido de manera importante al conocimiento de la vía MEP en plantas. Los resultados publicados en el primer artículo, representan el primer reporte sobre la caracterización de una mutante afectada en la biosíntesis de IPP plastídico. En este artículo también se publicó por primera vez, el análisis del patrón de expresión espacial y temporal de un gen involucrado en la vía MEP. El segundo artículo, reporta por primera vez la modulación de los niveles de la enzima DXS en plantas. Dicho efecto conduce a cambios en el contenido de varios isoprenoides plastídicos. Esto llevó a establecer que la 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa es la primera enzima limitante en la producción de IPP plastídico y a su vez de isoprenoides en plantas.

• El gen *CLA1* codifica la enzima DXS1 de *A. thaliana*

La alta homología entre la proteína CLA1 y la DXS de *E. coli* y las características fenotípicas de la mutante *cla1-1*, sugirieron que el gen *CLA1* podría codificar la DXS de *Arabidopsis*. Mediante dos estrategias diferentes se ha demostrado que el gen *CLA1* codifica para la DXS de *A. thaliana* (Estévez y cols., 2000). Una de ellas ha sido a través de ensayos enzimáticos con la proteína recombinante CLA1. La caracterización bioquímica de la DXS de *Arabidopsis* (Estévez y cols., 2000), así como de otras especies de plantas y bacterias (Eisenreich y cols., 2001), ha mostrado que estas enzimas requieren del cofactor TPP y metales divalentes Mg^{2+} o Mn^{2+} para su actividad. La ausencia de alguno de ellos impide que se forme el compuesto DXP (Sprenger y cols., 1997; Kuzuyama y cols., 2000). Además este tipo de proteína tiene un peso molecular de alrededor de 70 KDa (Tabla #2) y muy probablemente forman homodímeros, como se observó en las DX sintasas de *Streptomyces sp* (Kuzuyama y cols., 2000), *S. coelicolor* (Cane y cols., 2001) y *R. capsulatus* (Hahn y cols., 2001). La presencia de aminoácidos conservados en las DXS de diferentes organismos, sugiere que éstos podrían ser importantes para su actividad enzimática. Por ejemplo, la alteración de los aminoácidos histidina y aspartato ubicados en las posiciones #49 y #627 de la DXS de *E. coli* y *A. thaliana*

respectivamente, afecta la actividad de la enzima (Querol y cols., 2001; Araki y cols., 2000).

Otra estrategia usada para demostrar la función de *CLA1*, fue la complementación *in vivo* de la mutante *cla-1-1* con el compuesto 1-desoxi-D-xilulosa (DX). Experimentos realizados en bacterias y plantas mostraron que al aplicar exógenamente DX, éste es incorporado en la biosíntesis de isoprenoides formados a través de la vía MEP (Arigioni y cols., 1997, Eisenreich y cols., 1998; Lichtenthaler, 1999). En este trabajo, también se ha mostrado que el DX es incorporado en la biosíntesis de clorofilas y carotenoides (Estévez y cols., 2000). Estos resultados han llevado a cuestionar si el DX es fosforilado antes de ser incorporado en la vía MEP. Recientemente se reportó que la proteína recombinante D-xilulosacinasas (XC), la cual es codificada por el gen *xylB* de *E. coli*, fosforila eficientemente el compuesto 1-desoxi-D-xilulosa, en una reacción dependiente de ATP (Wungsintaweeikul y cols., 2001). Además, la sobreexpresión de la enzima XC en *E. coli*, convirtió eficientemente el compuesto [¹³C]-1-desoxi-D-xilulosa en [¹³C]-1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (Hecht y cols., 2001). Estos datos indican que la XC es capaz de transformar DX exógeno en DXP, y a su vez éste es incorporado en la biosíntesis de isoprenoides. En *A. thaliana* existe un gen homólogo a *xylB* en el cromosoma 2. Este hecho sugirió que durante la complementación de la mutante *cla1-1* con el compuesto DX pudo ser fosforilado por la XC putativa para generar DXP, el cual es capaz de ser incorporado en la biosíntesis de clorofilas y carotenoides. Aunque la XC puede generar el intermediario DXP a partir de DX en bacterias y muy probablemente en plantas, los ensayos enzimáticos con las proteínas recombinantes DX sintetas, indican que el DXP es principalmente formado a partir del piruvato y GA3P.

Las características del amino terminal de la proteína DXS1 de *A. thaliana*, sugirieron que ésta podría ser transportada a los plástidos. A través de ensayos de expresión transitoria realizados con la fusión PTPCLA-GFP, en este trabajo se demostró que la región NH₂ terminal de la enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa de *Arabidopsis* es capaz de permitir transporte de la proteína a estos organelos. Ensayos similares, también demostraron que la DXS de tomate es importada a plástidos (Lois y cols., 2000). Al igual que las DX sintetas, la secuencia NH₂ terminal de las enzimas subsecuentes en la vía MEP, predice la existencia de péptidos señal a plástidos en dicha región. Estos datos sugieren que las proteínas de la vía son codificadas en el núcleo y transportadas a plástidos, corroborando la ubicación de la vía MEP en plantas.

• Expresión espacial y temporal del gen *CLA1*

Los análisis por northern, western e histoquímicos mostraron que el gen *CLA1* es expresado en la mayoría de los tejidos de *Arabidopsis*, así como durante diferentes etapas del ciclo de vida de la planta (Estévez y cols., 2000). El patrón de expresión espacial y temporal mostrado para el gen *CLA1*, apoya la participación de la vía MEP

en la producción de diversos isoprenoides. Esta idea también fue apoyada por los análisis de transcrito *DXS* en la planta de tomate (Lois y cols., 2000).

Los análisis moleculares también mostraron que la acumulación del transcrito y de proteína *DXS1* es mayor en estadios tempranos del desarrollo y en tejidos jóvenes de *A. thaliana* (Estévez y cols., 2000). Los niveles elevados de expresión de *DXS1* correlacionan con el incremento en la biosíntesis de isoprenoides, tales como pigmentos fotosintéticos, hormonas, vitaminas, etc. En otras plantas también se ha observado que la acumulación del transcrito *DXS* correlaciona con la producción masiva de isoprenoides. En *Menta piperita*, las hojas contienen glándulas secretoras especializadas para la producción de monoterpenos. En este caso los niveles de RNAm *DXS* incrementan durante los primeros estadios del desarrollo de la hoja, precediendo el pico máximo de la biosíntesis de monoterpenos (Lange y cols., 1998). En *Capsicum annuum* los niveles del mensajero de *DXS* incrementan durante la diferenciación de los cloroplastos a cromoplastos en el fruto de chile, proceso que involucra la biosíntesis masiva de carotenoides (Bouvier y cols., 1998). En tomate, durante la maduración del fruto, el incremento en los niveles de transcrito *DXS* correlaciona con la transición de un fruto verde a un fruto anaranjado, sugiriendo que la inducción está asociada con la activación de la biosíntesis de carotenoides (Lois y cols., 2000). Todos estos datos muestran que la expresión del gen *DXS* de plantas es regulado por desarrollo y de manera tejido específica.

En plantas, la vía MEP produce IPP para la biosíntesis de diversos isoprenoides plastídicos, los cuales desempeñan funciones específicas en diferentes procesos biológicos. Este hecho hace suponer que la vía MEP es regulada por diversos factores. Los análisis de expresión del primer gen involucrado en la vía apoyan esta idea. La acumulación del transcrito *DXS*, además de ser regulada por el desarrollo de la planta y de manera tejido específica (Estévez y cols., 2000; Lois y cols., 2000), también es regulada por factores como la luz (Mandel y cols., 1996), altas concentraciones de azúcares (Analilia Arroyo, comunicación personal) y por el establecimiento de micorrizas (Walter y cols., 2000).

- **La *DXS1* es una enzima limitante en la vía MEP.**

Las investigaciones bioquímicas y moleculares han sido importantes en la dilucidación de diferentes vías metabólicas complejas que operan en las células vegetales, tal es el caso de la biosíntesis de isoprenoides. Una parte importante en la caracterización de la vía del mevalonato y la vía MEP, ha sido la identificación de los diferentes pasos enzimáticos que conducen a la formación del IPP. Al respecto, todas las reacciones catalíticas de la vía del Mevalonato han sido identificadas. En contraste, solo se conocen los primeros cinco pasos de la vía MEP. Otro aspecto fundamental es la identificación de los pasos limitantes en la biosíntesis de IPP. En la vía del mevalonato se ha establecido que la conversión de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA a mevalonato, catalizada por la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa

(HMGR) es un paso limitante (Schaller y cols., 1995). Hasta el momento ha sido difícil identificar los pasos limitantes de la vía MEP, debido a que aún se desconocen los pasos catalíticos finales de la vía y porque solamente se ha estudiado con mayor detalle la expresión de las enzimas DXS y DXR. Sin embargo, los resultados de este trabajo han permitido concluir que la DXS1 es limitante en la producción de IPP plastídico y a su vez en la biosíntesis de isoprenoides en plantas (Estévez y cols., 2001).

Para definir experimentalmente enzimas limitantes en la biosíntesis de isoprenoides tanto de bacterias como de plantas, se han llevado a cabo dos estrategias. Una de ellas es el análisis de parámetros cinéticos, tales como la eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m). Bajo estas bases se ha propuesto que la enzima DXS y no la DXR es una enzima limitante en la vía MEP de bacterias (Kuzuyama y cols., 2000). Otra manera, ha sido modulando los niveles de una proteína de la vía, y a su vez analizando los cambios en el contenido de los productos finales. Furbunk y Taylor (1995) propusieron un modelo para explicar el comportamiento gráfico de una enzima limitante, de una enzima co-limitante y una no limitante en una vía metabólica (Figura #14). Este modelo explica que pequeños cambios en los niveles de una enzima limitante tiene un efecto importante en el contenido de los productos finales de una vía, mostrando una relación lineal entre los niveles de proteína y de productos finales. Pero cuando la relación no es lineal entre la cantidad de proteína y de productos finales, se describe el comportamiento de una enzima co-limitante. En contraste, grandes cambios en los niveles de una enzima no limitante, no conduce a cambios significativos en el contenido de productos finales. Utilizando la segunda estrategia, se ha establecido que la HMGR es una enzima limitante en la vía del mevalonato de plantas. De igual manera se ha propuesto que la DXS y no la DXR es una enzima limitante en la vía MEP de bacterias (Miller y cols., 1999; Miller y cols., 2000).

Para determinar si la DXS1 es una enzima limitante en la biosíntesis de isoprenoides plastídicos. Los niveles de esta enzima fueron elevados o disminuidos en plantas transgénicas de *Arabidopsis* (Estevez y cols., 2001). En comparación con plantas silvestres, las plantas transgénicas cuyos niveles de DXS1 son elevados (S-2, S-17 y S-14) producen mayores cantidades de isoprenoides plastídicos tales como clorofilas, carotenoides, tocoferoles, ácido absídico y giberelinas. En contraste, las plantas transgénicas con niveles reducidos de DXS (*cla1-1*, *CLA1/cla1*, S-7, A-6 y A-18) producen cantidades menores de los isoprenoides analizados. En base al modelo propuesto por Furbunk y Taylor (1995), la DXS1 presenta el comportamiento de una enzima limitante, porque los cambios en los niveles de la proteína tuvieron un efecto significativo en el contenido de productos finales de la vía MEP. Aunque cabe señalar que los resultados también sugieren la presencia de otras enzimas co-limitantes en la biosíntesis específica de cada isoprenoide, ya que no se observó una relación lineal entre los niveles de la proteína DXS1 y los productos finales. Al respecto, se reportó que la fitoeno sintasa (PSY1) es una enzima limitante en la producción de carotenoides (Bramley y cols., 1992; Fraser y cols., 1994).

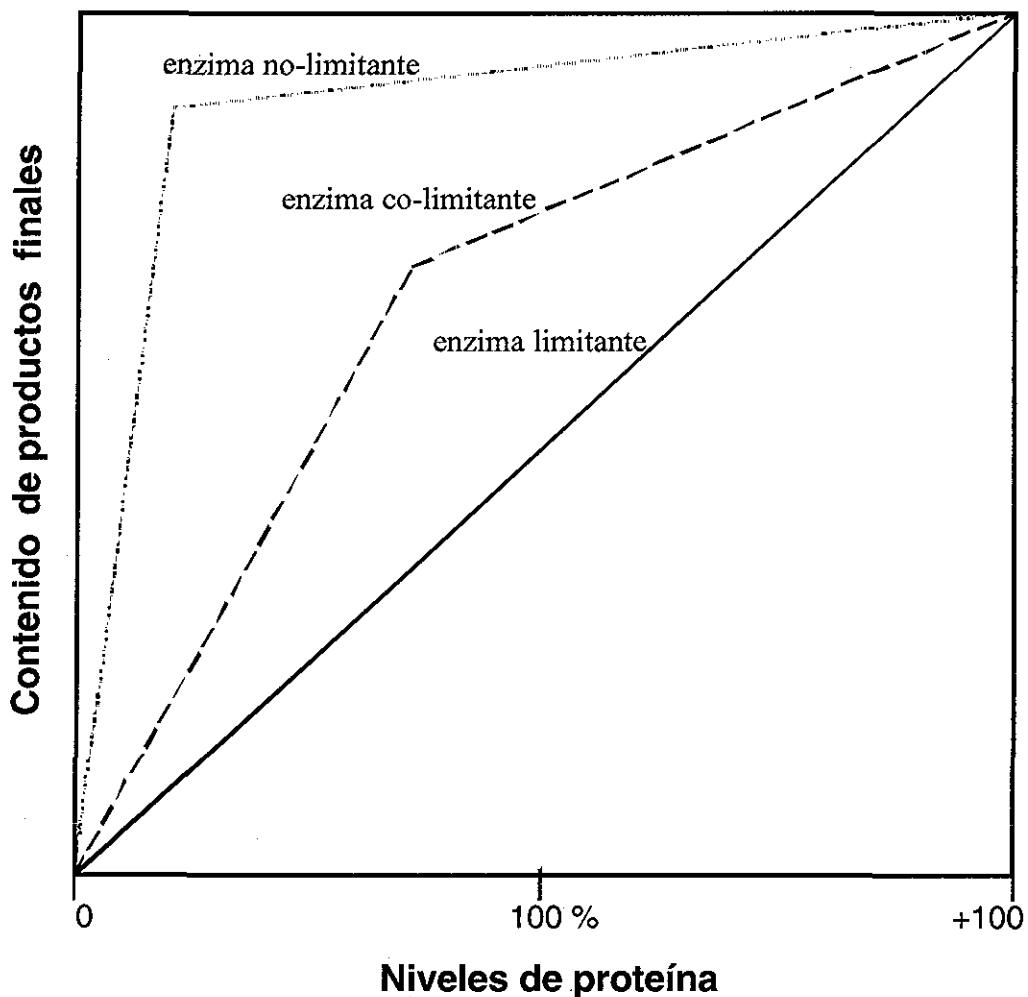


Figura #14. Representación gráfica del comportamiento de una enzima limitante, co-limitante y no limitante. En este modelo, el 100% representa contenido de proteína plantas silvestres. Las líneas transgénicas son colocadas en base al contenido de proteína DXS1 detectada.

En la biosíntesis de vitamina E, la γ -tocoferol metiltransferasa (γ -TMT) funciona como una enzima limitante (Shintani y DellaPena, 1998). Aunque hay evidencias de otras enzimas limitantes en la producción de isoprenoides plastídicos, los resultados generados en este trabajo demuestran que la DXS, es la primera enzima limitante en la producción de IPP y a su vez en la biosíntesis de isoprenoides plastídicos. Otros reportes que han sugerido el papel limitante de la DXS, son los análisis de expresión de los genes *DXS* y *DXR* de tomate (Lois y cols., 2000; Rodríguez-Concepción y cols., 2001) y la sobreexpresión de la enzima DXR en *M. piperita* (Mahmound y Croteau, 2001).

Varias evidencias apoyaron la participación del IPP plastídico en la formación del compuesto *ent*-kaureno, precursor para la biosíntesis de giberelinas (Sponsel, 2001). Sin embargo, no se había demostrado la conversión de un intermediario de la vía MEP en la biosíntesis de *ent*-kaureno y giberelinas. La manipulación de la proteína DXS1 mostró indirectamente que las giberelinas son formadas principalmente de intermediarios derivados de la vía MEP (Estévez y cols., 2001). Esta idea es ahora apoyada con los experimentos de marcaje realizados por Kasahara y cols. (2002). Ellos han demostrado que la aplicación exógena del compuesto [2-¹³C]-DX a la mutante *cla1-1*, es incorporado en el intermediario *ent*-kaureno y giberelinas mostrando que la vía MEP es la ruta principal para la biosíntesis de estos compuestos.

Desde los primeros estudios sobre la biosíntesis de isoprenoides, surgieron evidencias que indicaban la comunicación entre las vías mevalonato y MEP (Arigoni y cols. 1997). La cuantificación de isoprenoides plastídicos en la mutante *cla1-1* sugirió el paso de un intermediario de la vía del mevalonato hacia el plástido, para explicar la presencia de pequeñas cantidades de clorofilas, carotenoides, ABA, tocoferoles y giberelinas (Estévez y col., 2001). Recientes experimentos de marcaje han mostrado que el compuesto [2-¹³C]-DX fue incorporado en pequeñas cantidades en la biosíntesis de campesterol. Por el contrario, la aplicación de [2-¹³C]-mevalonato se incorporó pobremente en la biosíntesis de *ent*-kaureno (Kasahara y cols., 2002). Con estos resultados se demuestra la comunicación entre las vías para la biosíntesis de isoprenoides en plantas. Ahora, los trabajos están enfocados a descubrir el o los intermediarios involucrados en esta comunicación, así como caracterizar los genes involucrados en el transporte del intermediario.

- **Genes de la vía MEP en el genoma de *A. thaliana***

La secuenciación completa del genoma de *A. thaliana*, reveló la presencia de dos genes homólogos a *CLA1*, localizados en diferentes cromosomas. La homología entre la DXS2 putativa y DXS1 es de 83 % de identidad, mientras que la DXS3 putativa y DXS1 mantienen un 54 % de identidad. En la secuencia de la DXS2 y DXS3 putativas se conservan el sitio de unión a TPP y el motivo transcetolasa (Figura #13). Esto sugiere que dichas proteínas podrían ser miembros de la superfamilia de las transcetolasas. Hann y cols. (2000) reportaron que las DX sintasas de bacterias y plantas conservan la secuencia DRAG en el inicio del motivo transcetolasa, a diferencia de las transcetolasas típicas que conservan la secuencia THDS, en la cual la histidina es invariable. La gran homología entre la DXS2 putativa y DXS1, así como la presencia de la secuencia DRAG en el motivo transcetolasa, sugieren que la DXS2 es una enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa. La homología menor entre la DXS3 putativa y DXS1 y la ausencia de la secuencia DRAG, sugieren que la DXS3 es una transcetolasa típica codificada en el genoma nuclear y transportada a los plástidos. Los datos antes mencionados sugieren que en *A. thaliana* la enzima 1-desoxi-D-

xilulosa 5-fosfato sintasa está codificada por otros dos genes, al igual que en *R. capsulatus* (Hann y cols., 2000), *S. coelicolor* (Cane y cols., 2001) y *Zea mays* (Walter y cols., 2000).

Las características fenotípicas de la mutante *cla1-1* indican que la DXS1 tiene una función esencial en la biosíntesis de isoprenoides plastídicos. Si la DXS2 funciona como una DX sintasa, ésta no es capaz de contender con los requerimientos de IPP para la biosíntesis de isoprenoides en la mutante *cla1-1*. Esto hace suponer que la DXS2 es requerida en un estadio particular del desarrollo, en algún tejido específico de la planta o probablemente la expresión del gen *DXS2* sea inducida bajo ciertas condiciones de crecimiento, como se observó en maíz donde la acumulación de un transcrito DXS de 2.9 kb es inducido solamente cuando se establece la micorriza (Walter y cols., 2000).

La secuencia completa del genoma de *Arabidopsis*, también reveló que los genes *ispC*, *ispD*, *ispE* y *ispF* así como los putativos *GcpE*, *LytB* y *xylB* son genes únicos (Tabla #3). La mutación en el gen *ispC*, e *ispD* provoca un fenotipo albino (Levin y col., 2001). Esto indica que los genes involucrados en la vía MEP son esenciales para la vida de las plantas.

CONCLUSIONES

• El gen *CLA1*

- El gen *CLA1* es esencial para la biosíntesis de isoprenoides plastídicos. Además, la deficiencia de este gen afecta el desarrollo de los cloroplastos y etioplastos, así como la formación del mesófilo.
- El gen *CLA1* codifica la enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS1).
- La proteína DXS1 es importada a los plástidos donde realiza su función.
- La enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa de *A. thaliana* podría ser codificada por más de un gen.

• Expresión del gene *CLA1*

- El gen *CLA1* es expresado en la mayoría de los tejidos, así como durante el ciclo de vida de la planta.
- Los requerimientos del *CLA1* son mayores en estadios tempranos del desarrollo y en tejidos jóvenes de la planta.
- La expresión del gen *CLA1* es regulada por el desarrollo de la planta, así como por factores externos, por ejemplo la luz.

• La proteína DXS1 en plantas transgénicas

- La DXS1 cataliza el primer paso limitante en la vía del 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato de plantas.
- La modulación de los niveles de la proteína DXS1 provoca cambios en la producción de isoprenoides plastídicos (clorofilas, tocoferoles, carotenoides, ácido absísico y giberelinas).
- Los cambios en el contenido de DXS1 también se reflejan en la tasa de germinación y crecimiento de las plantas transgénicas.

PERSPECTIVAS

Este trabajo de tesis doctoral ha sido parte de un proyecto de investigación sobre la biosíntesis de isoprenoides plastídicos. Los resultados obtenidos contribuyeron a la caracterización de la enzima 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa, así como al entendimiento de la vía MEP en plantas. También la información generada en este trabajo da pauta para continuar investigando los siguientes puntos:

• CARACTERIZACIÓN DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS CON NIVELES ALTERADOS DE LA ENZIMA DXS1

- **Cuantificación de giberilinas.** La acumulación del transcrito *GA4* en las plantas transgénicas *DXS1*, sugirió que estas producen cantidades variables de giberelinas. Para confirmar estos datos, es importante cuantificar el contenido de GAs, así como analizar que tipo de giberelinas modificaron su contenido. Estos análisis podrían hacerse a través de cromatografía de gases, acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).
- **Cuantificación de piridoxal y tiamina.** El compuesto 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP), además de ser precursor para la biosíntesis de isoprenoides plastídicos lo es también para la biosíntesis de piridoxal (vitamina B₆) y tiamina (vitamina B₁). Para evaluar el efecto de la modulación de los niveles de proteína *DXS1*, se propone cuantificar el contenido de estas vitaminas en las plantas transgénicas *DXS1*.
- **Cuantificación de fitoesteroles.** Se ha demostrado que el compuesto DX tiene una pequeña contribución en la biosíntesis de fitoesteroles. Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de *DXS1* sobre la vía del mevalonato se propone analizar el contenido de campesterol en las plantas sobreexpresoras de *DXS1*.
- **Expresión de los genes subsecuentes a *DXS1*.** Con el propósito de explorar el efecto de la modulación de la proteína *DXS1* sobre la expresión de los genes de la vía MEP, se propone analizar la acumulación del mensajero de los genes subsecuentes a *DXS1* en las plantas transgénicas *DXS1*.
- **Determinación de la capacidad fotosintética.** Se ha observado que la capacidad fotosintética correlaciona con los niveles de clorofilas. En este trabajo se generaron plantas transgénicas con diferentes cantidades de clorofilas, por lo tanto sería interesante medir su capacidad fotosintética. Esto permitirá conocer si las plantas transgénicas *DXS1* alteran su fotosíntesis.
- **Evaluación de la tolerancia a sequía.** Se ha reportado que el ácido absísico está involucrado en la tolerancia a sequía. Las plantas transgénicas *DXS1* acumulan diferentes cantidades de ABA, por lo tanto es interesante evaluar la tolerancia a sequía en estas plantas.

- **Determinación de enzimas limitantes en la biosíntesis de isoprenoides plastídicos.** En este trabajo se ha demostrado que *DXS1* es una enzima limitante en la vía MEP. Para determinar si otras enzimas son limitantes, se propone modular los niveles de expresión de los genes subsecuentes a *CLA1* en plantas transgénicas. En las líneas transgénicas que se generen cuantificar el contenido de isoprenoides plastídicos para hacer un análisis comparativo.

- **Sobreexpresión de *DXS1* en plantas de interés alimenticio.** Los carotenoides y vitamina E son importantes en la alimentación humana. En este trabajo se ha demostrado que la sobreexpresión de *DXS1* conduce a un incremento en estos compuestos. Ahora se propone la sobreexpresión tejido específico (usando promotores semilla, fruto específicos) del gen *DXS1* en plantas de interés comercial, para elevar el contenido de carotenoides y vitamina E en frutos o semillas.

• **CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES PUTATIVOS *DXS2* Y *DXS3***

- **Expresión de los genes *DXS2* y *DXS3*.** Uno de los aspectos importantes es saber si estos genes se transcriben. A este respecto, se propone analizar la acumulación de mensajero de ambos genes en diferentes tejidos de la planta, así como en diferentes estadios del desarrollo de la misma.

- **Actividad bioquímica.** Para demostrar si estas enzimas putativas tienen actividad de DX sintasa, se propone generar las proteínas recombinantes *DXS2* y *DXS3* para analizar si estas tienen la capacidad de convertir el piruvato y GA-3P en DXP. También se propone realizar la complementación de la mutante de *E. coli*, deficiente en el gen *DXS* con los genes en cuestión.

- **Patrón de expresión especial y temporal.** Los análisis de mensajero mostrarían el patrón de expresión. Sin embargo, análisis histoquímicos permitirán analizar el patrón con mayor detalle. Al respecto se considera generar las fusiones entre los promotores *DXS2* y *DXS3* y el gen reportero GUS. Las construcciones generadas serán analizadas en plantas transgénicas de *Arabidopsis*.

- **Mutantes.** Aunque el gen *CLA1* (*DXS1*) tiene un papel esencial en la vía MEP, se considera importante analizar el efecto que provoca la mutación de los genes *DXS2* y *DXS3*.

BIBLIOGRAFIA

- Altincicek B., Ann-Kristin K., Sanderbrand S., Wiesner J., Hintz M., Beck E. and Jomaa J. (2001) GcpE is involved in the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 183, 2411-2416.
- Araki N., Kusumi K., Masamoto K., Niwa Y. and Iba K. (2000) Temperature sensitive *Arabidopsis* mutant defective in 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase within the plastid non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. Physiol. Plant. 108, 19-24.
- Arigoni D., Sagner S., Latzel C., Eisenreich W., Bacher A. and Zenk M. H. (1997) Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. Proc Natl Acad Sci U S A. 94, 10600-10605.
- Bach T. J. and Lichtenthaler H. K. (1982) Mechanisms of inhibition by mevinolin (MK 803) of microsome-bound radish and of partially purified yeast HMG-CoA reductase (EC.1.1.1.34). Z Naturforsch [C]. 38, 212-9.
- Bach T. J. (1995) Some aspects of isoprenoid biosynthesis in plants. A review. Lipids 30, 191-202.
- Bailey J. E. (1999) Lessons from metabolic engineering for functional genomics and drug discovery. Nat. Biotechnol. 17, 616-618.
- Balint G. A. (2001) Artemisinin and its derivatives: an important new class of antimalarial agents. Pharmacol Ther. 90, 261-265
- Barkovich R. and Liao, J. C. (2001) Metabolic Engineering of isoprenoids. Metabolic Engineering 3, 27-39.
- Bechtold N., Ellis J. and Pelletier G. (1993) In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. CR Acad Sci Ser III Sci Vie 316, 1194-1199.
- Bevan, M (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. Nucleic Acid Res. 12, 8711-8721.
- Bishop G. J. and Koncz C. (2002) Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling. Plant cell 14, 97-110.
- Blagosklonny M. V. and Fojo I. (1999) Molecular effects of paclitaxel: myths and reality (a critical review). Int. J. Cancer 83, 151-156.
- Bloch K. (1992) Sterol molecule: structure, biosynthesis and function. Steroids 57, 378-382.
- Bouvier F., d'Harlingue A., Suire C., Backhaus R. A. and Camara B. Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper

fruits1. *Plant Physiol.* 117, 1423-1431.

- Brainthwaite G. D. and Goodwin T. W. (1960a) Studies on carotenogenesis 27. Incorporation of (2-¹⁴C) acetate, dl-(2-¹⁴C) mevalonate and ¹⁴CO₂ into carrot-root preparations. *Bioche. J.* 76, 194-197.

- Brainthwaite G. D. and Goodwin, T. W. (1960b) Studies on carotenogenesis 25. The incorporation of (1-¹⁴C) acetate, (2-¹⁴C) acetate and ¹⁴CO₂ into lycopene by tomato slices. *Biochem. J.* 76, 1-5.

- Bramley P. M., Elmadfa I., Kafatos A., Kelly F. J., Manios Y., Roxborough H. E., Schuch W., Sheehy P. J. A. and Wagner K-H. (2000) Vitamin E. *J. Sci. Food Agric.* 80, 913-938.

- Bramley P., Teulieres C., Blain I., Bird C. and Schuch W. (1992) Biochemical characterization of transgenic tomato plants in which carotenoid synthesis has been inhibited through the expression of antisense RNA to pTOM5. *Plant J.* 105, 343-349.

- Campos N., Rodríguez-Concepción M., Seeman M., Rohmer M. and Boronat A. (2001) Identification of *gcpE* as a novel gene of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *FEBS lett.* 488, 170-173.

- Cane D. E., Chow C., Lillo A. and Kang I. (2001) Molecular cloning, expression and characterization of the first three genes in the mevalonate-independent isoprenoid pathway in *Streptomyces coelicolor*. *Bioorg. Med. Chem.* 9, 1467-1477.

- Chiu W., Niwa Y., Zeng W., Hiramoto T., Kobayashi H. and Sheen J. (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr. Biol.* 6, 325-330.

- Chojnacki T., Jankowski W. and Swiezewska E. (2001) Dolichols and Polyprenols; elements of membrane, coenzymes and secondary metabolites. *Cell Mol. Biol. Lett.* 6, 192-199.

- Crowell P. L. (1999) Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *J. Nutr.* 129, 775S-778S.

- Cunningham F. X. and Gantt 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.

- Cutler A. J. and Krochko J. E. (1999) Formation and breakdown of ABA. *Trends Plant Sci.* 4, 472-478.

- Edwards P. A. and Ericsson J. (1999) Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 157-185

-David S., Estramareix B. Fischer J. C. and Thérissod M. (1981) 1-Deoxy-D-threo-2-pentulose: precursor of the five-carbon chain of the thiazole of thiamine. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 7341-7342.

- Disch A., Schwender J., Muller C., Lichtenthaler H. K. and Rohmer M. (1998) Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. *Biochem J.* 333, 381-388.
- Edwards P. A. and Ericsson J. (1999) Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu Rev Biochem.* 68, 157-85.
- Eisenreich W., Rohdich F. and Bacher A. (2001) Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci.* 6, 78-84.
- Eriksson M. E. Israelsson M., Olsson O. and Moritz T. (2000) Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. *Nat. Biotechnol.* 18, 784-788.
- Estevez J. M., Cantero A., Romero C., Kawaide H., Jimenez L. F., Kuzuyama T., Seto H., Kamiya Y. and Leon P. (2000) Analysis of the expression of CLA1, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124, 95-104.
- Fellermeier M., Raschke M., Sagner S., Wungsintaweekul J., Schuhr C. A., Hecht S., Kis K., Radykewicz T., Adam P., Rohdich F., Eisenreich W., Bacher A., Arigoni D. and Zenk M. H. (2001) Studies on the nonmevalonate pathway of terpene biosynthesis. The role of 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate in plants. *Eur J Biochem.* 268, 6302-6310.
- Flesch G. and Rohmer M. (1998) Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. Formation of isoprenic units from two distinct acetate pools and a novel type of carbon/carbon linkage between a triterpene and D-ribose. *Eur J Biochem.* 175, 405-411.
- Folkers K., and Wolf D. E. (1956) Isolation of a new acetate-replacing factor. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 5273-5275.
- Frase P. D., Truesdale M. R. Bird C. R. Schuch W. Bramley P. M. (1994) Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development. *Plant Physiol.* 105, 405-413.
- Frederich M., Dogneacute J. M., Angenot L. and De Moluc P. (2002) New trends in anti-malarial agents. *Curr. Med. Chem.* 9, 1435-1456.
- Furbank R. T. and Taylor W. C. (1995) Regulation of Photosynthesis in C3 and C4 Plants: A Molecular Approach. *Plant Cell* 7, 797-807.
- Giovannucci E. (1999) Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 1225-1230.
- Giuliano G., Aquilani R. and Dharmapuri S. (2000) Metabolic engineering of plant carotenoids. *Trends Plant Sci.* 5, 406-409.

- Goldstein J. L. and Brown M. S. (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Science* 343, 425-430.
- Goodwin T.W. (1958a) Incorporation of $^{14}\text{C}\text{O}_2$, [2- ^{14}C] acetate and [2- ^{14}C]-mevalonic acid into β -carotene in etiolated maize seedlings. *Biochem. J.* 68, 26-27.
- Goodwin T.W. (1958b) Studies in carotenogenesis 25. The Incorporation of $^{14}\text{C}\text{O}_2$, [2- ^{14}C] acetate and [2- ^{14}C] mevalonic acid into β -carotene by illuminated etiolated maize seedlings. *Biochem. J.* 70, 612-617.
- Grolle S., Bringer-Meyer S. and Sahm H. (2000) Isolation of the *dxi* gene of *Zymomonas mobilis* and characterization of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase. *FEMS Microbiol Lett.* 191, 131-137.
- Hahn F. M., Eubanks L. M., Testa C. A., Blagg B. S. J., Baker J. A. and Poulter D. (2001) 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, the gene product of open reading frame (ORF) 2816 and ORF 2895 in *Rhodobacter capsulatus*. *J. bacteriol.* 183,1-11.
- Harker M. and Bramley P. M. (1999) Expression of prokaryotic 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphatase in *Escherichia coli* increases carotenoid and ubiquinone biosynthesis. *FEBS letters* 448, 115-119.
- Hecht S., Eisenreich W., Adam P., Amslinger S., Kis K., Bacher A., Arigoni D. and Rohdich F. (2001) Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: The role of the GcpE (IspG) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 14837-14842.
- Herz S., Wungsintaweekul J., Schuhr C. A., Hecht S., Luttmann H., Sagner S., Fellermeier M., Eisenreich W., Zenk M. H., Bacher A. and Rohdich F. (2000) Biosynthesis of terpenoids: YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphate to 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 2486-2490.
- Hill R. E., Sayer B. G. and Spenser I. D. (1989) Biosynthesis of vitamin B6: incorporation of D-1-deoxyxylulose. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 1916-1917.
- Hirschberg, J. (1999) Production of high-value compounds: carotenoids and vitamin E. *Curr. Opin Biotechnol.* 10,186-191.
- Hirschberg, J. (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 210-218.
- Horbach S., Sahm H. and Welle R. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: two different pathways?. *FEMS Microbiol Lett.* 111, 135-140.
- Jomaa H., Wiesner J., Sanderbrand S., Altincicek B., Weidemeyer C., Hintz M., Turbachova I., Eberl M., Zeidler J., Lichtenthaler H. K., Soldati D. and Beck E. (1999) Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial

- drugs. Science. 285, 1573-1576.
- Julliard J. H. and Douce R. (Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B1) in higher plant chloroplasts. Proc Natl Acad Sci U S A. 88, 2042-2045.
 - Jürgens U. J., Simonin P. and Rohmer M. (1992) Localisation and distribution of hopanoids in membrane systems of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. FEMS Microbiol. lett. 92, 285-288.
 - Kasahara H., Hanada A., Kuzuyama T., Takagi M., Kamiya Y. and Yamaguchi S., (2002) Roles of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways in the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis*. (articulo sometido en J. Biol. Chem.)
 - Koornneef M. and Karssen C. M. (1994) in seed dormancy and germination (
 - Kreuz K. and Kleinig H. (1984) Synthesis of prenyl lipids in cells of spinach leaf. Compartmentation of enzymes for formation of isopentenyl diphosphate. Eur J Biochem. 141, 531-535.
 - Kuzuyama T., Takagi M., Takahashi S. and Seto H. (2000) Cloning and characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Streptomyces* sp. Strain CL190, which uses both the mevalonate and nonmevalonate pathways for isopentenyl diphosphate biosynthesis. J Bacteriol. 182, 891-897.
 - Kuzuyama T., Takahashi S., Takagi M. and Seto H. (2000) Characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, an enzyme involved in isopentenyl diphosphate biosynthesis, and identification of its catalytic amino acid residues. J Biol Chem. 275, 19928-19932.
 - Lange B. M. and Croteau R. (1999) Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint. Arch Biochem Biophys. 365, 170-174.
 - Lange B. M., Rujan T., Martin W. and Croteau R. Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. Proc Natl Acad Sci U S A. 24, 13172-13177.
 - Lichtenthaler H.K., Schwender J., Disch A. and Rohmer M. (1997) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. FEBS Lett. 400, 271-274.
 - Logan B. A., Monson R.K. and Potosnak M. J. (2000) Biochemistry and physiology of foliar isoprene production. Trends Plant Sci. 5, 477-481.
 - Lois L. M., Campos N., Putra S. R., Danielsen K., Rohmer M. and Boronat A. (1998) Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis.

Proc Natl Acad Sci U S A. 95, 2105-2110.

- Lois L. M., Rodriguez-Concepcion M., Gallego F., Campos N. and Boronat A. (2000) Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J.* 22, 503-513.

- Luttgen H., Rohdich F., Herz S., Wungsintaweekul J., Hecht S., Schuhr C. A., Fellermeier M., Sagner S., Zenk M. H., Bacher A and Eisenreich W. (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 U S A.* 97, 1062-1067.

- Mahmoud S. S. and Croteau R. B. (2001) Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98 (15), 8915-8920.

- Mahmoud S. S. and Croteau R. B. (2002) Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* 7, 366-374.

- Mandel M. A., Feldmann K. A., Herrera-Estrella L., Rocha-Sosa M. and Leon P. (1996) CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant J.* 9, 649-658.

- McGarvey D. J. and Croteau R. (1995) Terpenoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1015-1026.

- Misawa, N., Masamoto, K., Hori, I., Ohtani, T., Boger, P. and Sandmann G. (1994) Expression of an *Erwinia* phytoene desaturase gene not only confers multiple resistance to herbicides interfering with carotenoid biosynthesis but also alters xanthophyll metabolism in transgenic plants. *Plant J.* 6, 481-489.

- Miller B., Heuser T. and Zimmer W. (1999) A *Synechococcus leopoliensis* SAUG 1402-1 operon harboring the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase gene and two additional open reading frames is functionally involved in the dimethylallyl diphosphate synthesis. *FEBS Lett.* 460, 485-90.

- Miller B., Heuser T. and Zimmer W. (2000) Functional involvement of a deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene harboring locus of *Synechococcus leopoliensis* in isoprenoid biosynthesis. *FEBS Lett.* 481, 221-226.

- Mooibroek H. and Cornish K. (2000) Alternative sources of natural rubber. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 355-365.

- Nabeta K., Ishikawa T. and Okuyama H. (1995) Sesqui- and di-terpene biosynthesis from ¹³C labeled acetate and mevalonate in cultured cells of *Heteroscyphus planus*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 3111.

- Proteau P. J., Woo Y. H., Williamson R. T., and Phaosiri C. (1999) Stereochemistry of the reduction step mediated by recombinant 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate

isomeroreductase. *Org Lett.* 1, 921-923.

- Putra S. R., Lois L. M., Campos N., Boronat A. and Rohmer M. (1998) Incorporation of [2,3-¹³C₂]- and [2,4-¹³C₂]-D-1-deoxyxylulose into ubiquinone of *Escherichia coli* via the mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* 39, 23-26.

- Querol J., Campos N., Imperial S., Boronat, A. and Rodríguez-Concepción M. (2002) Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* GCPE protein involved in plastid isoprenoid biosynthesis. *FEBS letters.* 514, 343-346.

- Rodríguez-Concepción M., Ahumada I., Diez-Juez E., Sauret-Gueto S., Lois L. M., Gallego F., Carretero-Paulet L., Campos N. and Boronat A. (2001) 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. *Plant J.* 27 (3), 213-222.

- Rohdich, F., Kis, K., Bacher, Bacher, A. and Eisenreich, W. (2001) The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates. *Current Opinion in Chemical Biological.* 5, 535-540

- Rohdich F., Eisenreich W., Wungsintaweekul J., Hecht S., Schuhr C. A. and Bacher A. (2001) Biosynthesis of terpenoids. 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF) from *Plasmodium falciparum*. *Eur J Biochem.* 268, 3190-3197.

- Rohdich F., Wungsintaweekul J., Eisenreich W., Richter G., Schuhr C. A., Hecht S., Zenk M. H. and Bacher A. (2000) Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 6451-6456

- Rohdich F., Wungsintaweekul J., Fellermeier M., Sagner S., Herz S., Kis K., Eisenreich W., Bacher A. and Zenk M. H. (1999) Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 11758-11763.

- Rohdich F., Wungsintaweekul J., Luttgen H., Fischer M., Eisenreich W., Schuhr C. A., Fellermeier M., Schramek N., Zenk M. H. and Bacher A. (2000) Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase from tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 8251-8256.

- Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B. and Sahn H. (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J.* 295, 517-524.

- Rohmer, M., Seeman, M., Horbach, S., Bringer-Meyer, S and Sahn, H. (1996) Glyceraldehyde 3-phosphate and piruvate as precursors of isoprenic units in an alternativa non-mevalonic pathway for terpenoids biosynthesis. *J. Amer. Soc.* 118, 2564-2568.

- Römer S., Fraser P. D., Kiano J. W., Shipton C. A., Misawa N., Schuch W. and Bramley P. M. (2000) Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants. *Nat. Biotechnol.* 18, 666-669.
- Ruzicka L. (1953) The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia* 9, 357-367
- Sagner S., Latzel C., Eisenreich W., Bacher A. and Zenk M. H. (1998) Differential incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into monoterpenes and carotenoids in higher plants. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 221-222.
- Sacchettini, J. C. and Poulter, C. D. (1997) Creating isoprenoid diversity. *Science* 277, 1788-1789.
- Schaller H., Grausem B., Benveniste P., Chye M.-L., Tan C.-T., Song Y.-H. and Chua N.-H. (1995) Expression of the *Hevea brasiliensis* (H.B.K.) Mull. Arg. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase1 in tobacco results in sterol overproduction. *Plant Physiol.* 109, 761-770.
- Schenk G., Duggleby R. G. and Nixon P. F. (1998) Properties and functions of the thiamin diphosphate dependent enzyme transketolase. *Int J Biochem Cell Biol.* 30, 1297-318.
- Schwender J., Muller C., Zeidler J. and Lichtenthaler H. K. (1999) Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 455, 140-144.
- Schwender J., Seemann M., Lichtenthaler H.K., and Rohmer M. (1996) Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochem J.* 316, 73-80.
- Schwender J., Zeidler J., Groner R., Muller C., Focke M., Braun S., Lichtenthaler F. W. and Lichtenthaler H. K. (1997) Incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into isoprene and phytol by higher plants and algae. *FEBS Lett.* 414, 129-134.
- Shewmaker C. K., Sheehy J. A., Daley M., Colburn S. and Ke D. Y. (1999) Seed specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J.* 20, 401-412.
- Shintani D. and DellaPenna D. (1998) Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science.* 282, 2098-2100.
- Sprenger G. A., Schorken U., Wiegert T., Grolle S., de Graaf A. A., Taylor S. V., Begley T. P., Bringer-Meyer S. and Sahn H. Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 12857-62.

- Takahashi S, Kuzuyama T, Watanabe H, Seto H. (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 U S A*. 95, 9879-9884.
- Tavormina, P. A., Gibbs, M. H. and Huff, J. W. (1956a) Utilization of β -Hydroxi- β -methyl- γ -valerolactone in cholesterol biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 4498-4499
- Tavormina, P. A. and Gibbs M. A. (1956b) The metabolism of γ , γ -dihydroxy- β -methylvaleric acid by liver homogenates. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 6210.
- The Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 408, 796-815.
- Walter M. H., Fester T. and Strack D. (2000) Arbuscular mycorrhizal fungi induce the non-mevalonate methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis correlated with accumulation of the 'yellow pigment' and the other apocarotenoids. *Plant J.* 21, 571-578.
- Walter M. H., Hans J., Strack D. (2002) Two distantly related genes encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. *Plant J.* 31, 243-254.
- Whitehead I. M. Threfall D. R. and Ewing D. F. (1989) 5-*epi*-Aristolochene is a common precursor of the sesquiterpenoid phytoalexins capsidiol and debneyol. *Phytochemistry* 28, 775-779.
- Wolf, D.E., Hoffmann, P.E., Aldrich, mH.R., Skeggs, Wright, L. D. and Folkers, K. (1956) β -Hydroxi- β -methyl- γ -dihydroxy- β -methylvaleric acid (divalonic acid), a new biological factor. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 4499.
- Wolf M., Seemann M., Grosdemange-Billiard C., Tritsch D., Campos N., Rodríguez-Concepción M., Boronat A. and Rohmer M. (2002) Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway. (*E*)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate: chemical synthesis and formation from methylerythritol cyclodiphosphate by a cell-free system from *Escherichia coli*. *Tetrahedron Lett.* 43, 2555-2559.
- Wungsintaweekul J., Herz S., Hecht S., Eisenreich W., Feicht R., Rohdich F., Bacher A. and Zenk M. H. (2001) Phosphorylation of 1-deoxy-D-xylulose by D-xylulokinase of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 268, 310-316.
- Yamaguchi S. and Kamiya Y. (2000) Gibberellin biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant Cell Physiol* 41, 251-257.
- Yamaguchi S. and Kamiya Y. (2001) Gibberellins and Light-Stimulated Seed Germination. *J Plant Growth Regul.* 20, 369-376.
- Ye X., Al babili S., Kloti A., Zhang J., Lucca P. and Potrykus I. (2000) Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthesis pathway into (carotenoid-free) rice

endosperm. *Science* 287, 303-305.

- Yokota A. and Sasajima K. (1986) Formation of 1-deoxy-ketoses by pyruvate dehydrogenase and acetic acid dehydrogenase. *Agric. Biol. Chem.* 50, 2517-2524.