

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DE PLANTAS



**“Estudio de la participación de las enzimas
4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa
(CMS) y 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol
cinasa (CMK) de la vía 2-C- metil-D-eritritol-4-
fosfato (MEP) en la síntesis de precursores de
isoprenoides plastídicos en *Arabidopsis
thaliana.*”**

TESIS
que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Bioquímicas
presenta:

Ma. de los Angeles Cancino Rodezno

Cuernavaca, Morelos.

Abril de 2004



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.

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Patricia León por dirigir esta tesis de Maestría.

Al Comité Tutorial: Dr. Mario Soberón, Dr. Mario Rocha y Dra. Patricia León por su crítica, contribución y asesoría.

Al Jurado: Dra. Rosario Vera, Dr. Joseph Dubrovsky, Dr. David Romero, Dr. Enrique Merino y Dra. Patricia León por revisar detalladamente esta tesis y aportar correcciones, ideas y sugerencias. Extiendo este agradecimiento a los revisores “extra oficiales”, Dr. Arturo Guevara, Analilia Arroyo y Luis Lozano.

Por colaborar con este proyecto en diversos aspectos agradezco a la M. en C. Carolina San Román (obtención de anticuerpos y la enseñanza de protocolos), al Dr. Rafael Vazquez-Duhalt (extracción de pigmentos), al Dr. Alejandro Garcarrubio y a Luis Lozano (bioinformática), al M. en C. Baldemar Sepúlveda (estadística), al Dr. Francisco Campos (semillas), al Dr. Juan Estévez, a Analilia Arroyo, al Dr. Arturo Guevara y a Cynthia Romero (asesoría académica en general).

A la gente de los laboratorios León/Rocha por su amabilidad y por hacer un ambiente de trabajo agradable.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Durante la realización de este trabajo se contó con una beca de Maestría (2001-2003) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

INDICE.

RESUMEN.....	I
ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCION.....	2
Generalidades de los isoprenoides.	2
Funciones y aplicaciones biotecnológicas de los isoprenoides de origen vegetal.	5
Biosíntesis del IPP y del DMAPP: La vía Mevalónica.	6
Biosíntesis del IPP y del DMAPP: la vía del 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), sus genes y sus enzimas.....	8
Distribución taxonómica de las rutas Mevalónica y MEP.	14
Compartimentación e intercomunicación de las vías Mevalónica y MEP en la célula vegetal.	16
ANTECEDENTES.....	18
JUSTIFICACION.....	21
OBJETIVOS.	22
METODOLOGIA.	23
• Material y condiciones de crecimiento vegetales.....	23
• Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
• Análisis tipo Northern Blot.	24
• Análisis tipo Western Blot.	25
• Obtención de anticuerpos específicos contra la CMS y la CMK.....	27
• Cuantificación de pigmentos.	28
RESULTADOS.	29
DISCUSION.	53
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.	60
APENDICE (BIOINFORMATICA).....	62
REFERENCIAS.	71

RESUMEN.

Los isoprenoides son uno de los grupos más extensos de moléculas orgánicas que existen. Estos compuestos se encuentran en todos los seres vivos, donde cumplen con diversas funciones. Algunos ejemplos de productos de origen isoprenoide son las hormonas ecdisona, testosterona y giberelinas; los pigmentos fotosintéticos clorofilas y carotenoides; los químicos que intervienen en interacciones ecológicas tales como tricodienos, geraniol, limoneno, capsidiol, etc. Cabe mencionar, que algunos isoprenoides poseen el valor agregado de tener aplicaciones biotecnológicas. Pese a su diversidad estructural y funcional, todos los isoprenoides tienen por precursores a dos moléculas isómeras Isopentenil difosfato (IPP) y Dimetilalil difosfato (DMAPP), las cuales son sintetizadas por la vía Mevalónica o la recientemente descubierta vía del 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP). Numerosos estudios en los últimos años se han enfocado a comprender a la vía MEP; actualmente se tiene información sobre todos los pasos enzimáticos que conducen hacia la formación del IPP y del DMAPP. Sin embargo los avances sobre la caracterización de la vía MEP son en muchos sentidos incipientes, quedando todavía mucho por entender sobre la regulación y participación de la mayoría de las 7 enzimas involucradas en esta ruta, como es el caso de la enzimas 4-difosfoctidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa (CMS) y 4-difosfoctidil-2C-metil-D-eritritol cinasa (CMK) en las que se enfoca este estudio. Los patrones de expresión espacial y temporal de las enzimas CMS y CMK resultaron muy parecidos y mostraron que la abundancia de estas proteínas es constante durante el desarrollo vegetativo y que ambas se acumulan preferencialmente en los tejidos fotosintéticos de la planta. Por otro lado, la adecuada caracterización de una ruta metabólica, además de la identificación de los pasos enzimáticos, requiere del conocimiento de los pasos limitantes de la vía, con este fin se atendió al modelo de Furbank y Taylor el cual permite señalar si una proteína presenta un comportamiento de enzima limitante, co-limitante o no limitante. Este modelo se basa en la correlación entre la acumulación de una enzima y la abundancia en los productos finales de la vía en

la que la enzima participe. Una enzima limitante presenta una relación lineal con los niveles de los productos finales. Los cambios en la acumulación de una enzima co-limitante, generan cambios no proporcionales en los productos finales. Por su parte cambios significativos en los niveles de una enzima no limitante, no tienen efecto en el contenido de los productos finales (Furbank y Taylor, 1995) Con el objetivo de evaluar si CMS y CMK son enzimas limitantes para la biosíntesis de isoprenoides plastídicos, los niveles de esta enzima fueron elevados o disminuidos en plantas transgénicas de *A. thaliana*. Las plantas transgénicas cuyos niveles de CMS o de CMK eran elevados, produjeron una cantidad similar de clorofilas y carotenoides (isoprenoides plastídicos) que las plantas silvestres. Las plantas transgénicas con niveles reducidos de una u otra enzima produjeron cantidades de clorofilas y carotenoides sin diferencias significativas con las plantas control. De este estudio se concluyó que la modulación de los niveles de CMS o CMK no repercute en los niveles de isoprenoides plastídicos y puede considerarse a ambas enzimas no limitantes en la vía MEP, por lo menos bajo las condiciones estudiadas. Finalmente en esta tesis, se realizó una aproximación inicial, utilizando herramientas bioinformáticas, al conocimiento de las posibles relaciones funcionales que sostienen las 7 enzimas de la vía MEP con otras proteínas en procariontes.

ABREVIATURAS.

- AACT.** Acetoacetil-CoA tiolasa.
- AD.** Líneas transgénicas *ISPD* antisentido.
- AE.** Líneas transgénicas *ISPE* antisentido.
- a/v.** Agua sobre volúmen.
- °C.** Grados centígrados.
- CaMV35S.** Promotor del virus de mosaico coliflor.
- cDNA.** DNA complementario.
- CMK.** 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol cinasa.
- CMS.** 4-difosfoctidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa.
- Col.** Ecotipo Columbia.
- CTP.** Citidina trifosfato.
- DMAPP.** Dimetilalil difosfato.
- DPMC.** 5-difosfomevalonato descarboxilasa.
- DXP.** 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato.
- DXR.** DXP reductoisomerasa.
- DXS.** 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa.
- EDTA.** Tetraacetato de etilendiamina.
- G3P.** Gliceraldehído 3-fosfato.
- GM.** Medio de germinación.
- GST.** Proteína glutatión S- transferasa.
- h.** Hora/ horas.
- HDS.** Hidroximetilbutenil4-difosfato sintasa.
- HMBPP.** Hidroximetilbutenil4-difosfato.
- HMGR.** 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa.
- HMGR.** 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa.
- HMGS.** 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa.
- IPP.** Isopentenil difosfato.
- IPPI.** Isopentenil difosfato isomerasa.
- IPTG.** Isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido.
- KDa.** Kilo daltones.
- KM.** Kanamicina.
- LB.** Borde izquierdo del T-DNA.
- MC.** Mevalonato cinasa.
- ME.** 2C-metileritritol.
- ME-cPP.** Metileritritol 2, 4-ciclodifosfato.
- MECS.** 2-C-metil-D-eritritol-2-4-ciclodifosfato sintasa.
- MEP.** 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato.
- MES.** ácido 4-morfolinetanesulfónico.
- NaOH.** Hidróxido de sodio.
- nm.** Nanómetros
- NOS.** Señal-término de poliadenilación nopalina sintasa.
- NPTII.** Gen de la neomicina fototransferasa II.
- pb.** Pares de bases.
- PCR.** Reacción en cadena de la polimerasa.
- PMC.** 5-fosfomevalonato cinasa.
- RB.** Borde derecho del T-DNA.
- SD.** Líneas transgénicas *ISPD* sentido.
- SE.** Líneas transgénicas *ISPE* sentido.
- SDS.** Dodecil sulfato de sodio.
- T-DNA.** Plásmido inductor de tumor en *Agrobacterium*.
- Tris.** Hidroximetil aminometano.
- v/v.** Volúmen sobre volúmen.
- Wt.** Versión silvestre.

INTRODUCCION.

Generalidades de los isoprenoides.

Los isoprenoides (también llamados terpenoides) constituyen uno de los grupos más extensos de moléculas orgánicas. Estas moléculas son producidas por todos los seres vivos, en los cuales cumplen numerosas funciones (Eisenreich et al., 2001); algunas de ellas están enlistadas más adelante. Actualmente, la suma de compuestos isoprenicos sintetizados por todos los organismos asciende a más de 30,000 productos reportados (Sacchettini y Poulter, 1997; McGarvey y Croteau, 1995).

Wallach en 1914 notó que la mínima unidad en la que se puede disectar un producto isoprenoide funcional es una molécula de 5 carbonos (Figura 1). Esto le permitió establecer que todos los isoprenoides se generan por fusiones repetitivas de moléculas de 5 carbonos, conocidas como unidades isopreno. Posteriormente Ruzicka acuñó el término "Regla del Isopreno" para designar este fenómeno (Ruzicka, 1953).

Actualmente se sabe que son dos los precursores de todos los isoprenoides: el isopentenil difosfato (IPP) y su isómero, el dimetilalil difosfato (DMAPP) (Figura 1).

Estas dos moléculas de 5 carbonos son los bloques estructurales de todos los isoprenoides. Además de tener la capacidad de fusionarse reiteradamente, pueden acoplarse a reacciones de reducción, de fosforilación, de ciclización, etc. y potencialmente sufrir rearrreglos de su esqueleto carbonado, provocando así la gran diversidad estructural de los productos isoprenoides (Rodríguez-Concepción et al., 2001).

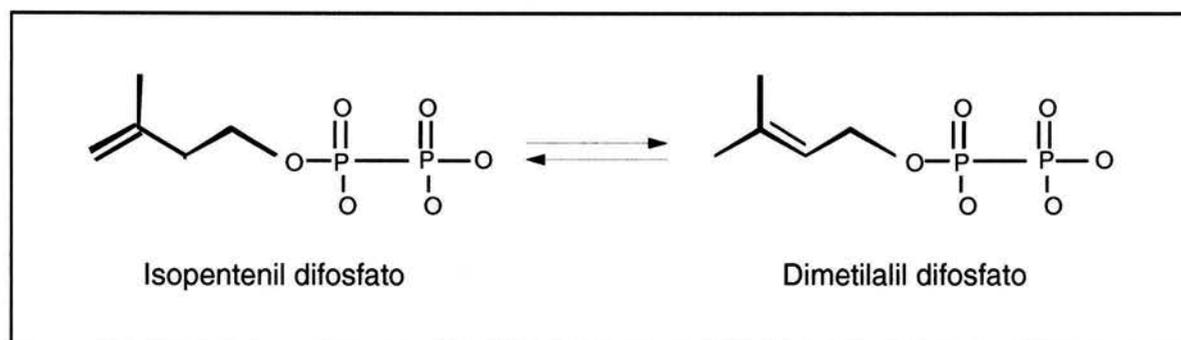


Figura 1. Isopentenil difosfato (IPP) y su isómero, el dimetilalil difosfato (DMAPP)

Una manera de clasificar a los isoprenoides es por el número de unidades de 5 carbonos que los constituyen (Barkovich y Liao ,2001) (Tabla 1) :

Tabla 1.- Composición y nomenclatura de los isoprenoides.

UNIDAD ISOPRENO	# UNIDADES ISOPRENO	NOMBRE
	C₅	Hemiterpeno
	C₁₀	Monoterpeno
	C₁₅	Sesquiterpenos
	C₂₀	Diterpenos
	C₄₀	Tetraterpenos
	C_{40+ n}	Politerpenos

Una consecuencia de la enorme diversidad de los compuestos isoprénicos es la gran variedad de funciones que desempeñan en los organismos vivos. Igualmente, su versatilidad los convierte en excelentes candidatos para su explotación biotecnológica. Algunas de sus actividades biológicas y sus aplicaciones biotecnológicas se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Actividades biológicas y aplicaciones biotecnológicas de los isoprenoides.

ISOPRENOIDES			
FUNCIONES BIOLÓGICAS		APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS	
Hormonas		Medicina	
En insectos	Feromonas, ecdisona	Antioxidantes	α tocopherol (vitamina E)
En mamíferos	Testosterona, progesterona	Anticancerígenos	Taxol
En plantas	Giberelinas, ácido abscísico, brasinoesteroides	Antibióticos	Pentaleno, casbeno
Estabilizadores de membrana celular		Industria	
En bacterias	Hopanoides	Producción de polímeros	Hule (cis-1,4-polisopreno)
En eucariotes	Esteroles	Producción de fragancias y saborizantes	Mentol, citronelol
Transportadores de electrones		Producción agrícola	Giberelinas
En mitocondrias y bacterias púrpuras	Ubiquinona	Alimentación humana	β -caroteno (pro-vitamina A)
En cloroplastos y eubacteria	Plastoquinona	Producción de colorantes	Astaxantina
Químicos ecológicos			
Toxinas de hongos	Tricodienos		
Atrayentes de polinizadores en plantas	Geraniol, limoneno, carotenos		
Control de parásitos en plantas	Capsidiol (Fitoalexina)		
Moduladores de la transcripción génica			
Regulación de la división celular, migración, apoptosis	Retinoides		
Cambios traduccionales			
Prenilación de proteínas	Grupo farnesil, grupo geranil geranil		
Glicosilación de proteínas	Dolicoles		

Funciones y aplicaciones biotecnológicas de los isoprenoides de origen vegetal.

Cerca del 80% de la diversidad de los isoprenoides conocidos son sintetizados por las plantas. Su plasticidad metabólica les permite sintetizar a partir del IPP, una diversidad impresionante de productos. En las plantas, los isoprenoides participan como metabolitos primarios fungiendo como moléculas involucradas en la respiración, la fotosíntesis, la regulación del crecimiento y el desarrollo, etc. o como metabolitos secundarios con funciones ecológicas para los organismos, es decir, productos naturales involucrados en la protección contra herbívoros o patógenos, la atracción de animales dispersores de semillas, la alelopatía, etc. (Chappell, 2002).

Algunos ejemplos de los isoprenoides producidos por las plantas incluyen:

El isopreno: Hemiterpeno que protege a los tilacoides de daño por altas temperaturas.

El geraniol: Monoterpeno que funciona atrayendo polinizadores.

El ácido abscísico: Sesquiterpeno con función de fitohormona.

El fitol: Diterpeno que conforma la cadena lateral de la clorofila (Croteau et al., 2000), la clorofila, no sólo es el pigmento orgánico más abundante que existe, también es una molécula con gran relevancia biológica, debido a que es indispensable para el funcionamiento del aparato fotosintético de los organismos que lo poseen (Reinbothe y Reinbothe, 1996).

Los fitoesteroles: Triterpenos componentes esenciales de las membranas celulares.

Los carotenoides: Tetraterpenos muy abundantes. Estas moléculas se subdividen en licopenos, carotenos α y β y xantofilas. Los carotenos proporcionan una gama de colores que van desde el amarillo hasta el naranja intenso en frutos y flores, actuando como atrayentes de polinizadores (Ronen et al., 1999). En el cloroplasto los carotenoides actúan como captadores de luz y protegen al aparato fotosintético de la luz excesiva (Ma et al., 2003).

La plastoquinona: Politerpeno implicado en el transporte de electrones durante la fotosíntesis (McGarvey y Croteau, 1995).

Muchos compuestos de origen isoprenoide tienen actualmente un importante valor comercial. Estos compuestos son usados como saborizantes, colorantes, polímeros,

fibras, pegamentos, ceras, fármacos y agroquímicos (Tabla 2). La posibilidad de su producción masiva, encuentra en la ingeniería genética una herramienta poderosa para dirigir la producción biotecnológica de productos isoprenoides (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2001, Barkovich y Liao, 2001).

Las proteínas de la llamada vía 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) son blancos potenciales para desarrollar fármacos antimicrobiales, así como herbicidas cuyo mecanismo carezca de toxicidad para humanos, puesto que el conocimiento que se tiene hasta la fecha sobre la distribución natural de las rutas Mevalónica y MEP ha permitido señalar que las enzimas de la vía MEP no tienen homología con proteínas de mamíferos y que algunas especies patógenas para el hombre si utilizan la vía MEP para sintetizar sus isoprenoides, como *Mycobacterium tuberculosis*, que produce tuberculosis, *Plasmodium falciparum*, el parásito que causa la malaria y *Toxoplasma gondii* causante de toxoplasmosis (Zeidler, et al., 2000).

Biosíntesis de IPP y DMAPP: La vía Mevalónica

En 1950, mediante investigaciones realizadas en animales y levaduras, llevadas a cabo por los grupos de Bloch, Cornforth, Lynen, se descubrió una ruta para la síntesis del IPP y del DMAPP, que por emplear mevalonato fue denominada vía Mevalónica (Bloch, 1992; Bochar et al., 1999).

Desde entonces, una gran cantidad de investigaciones se enfocaron a dilucidar las reacciones de la vía del Mevalonato. Se encontró que en esta vía el precursor inicial es la Acetil Coenzima A (acetil-CoA) y que a partir de este compuesto se origina una serie de siete reacciones enzimáticas para formar los productos IPP y DMAPP (Tabla 3). Durante mucho tiempo se asumió a la vía Mevalónica como ruta universal para la síntesis del IPP y de su isómero, y por ende, se le consideró la vía precursora de todos los isoprenoides. Sin embargo, los resultados de algunos experimentos de marcaje obtenidos a partir de plantas y bacterias no podían ser explicados satisfactoriamente mediante esta vía. Uno de los experimentos que dieron evidencia de la existencia de otra ruta y permitieron cuestionar al mevalonato como único precursor del IPP y del DMAPP, fue realizado en células vegetales, con mevalonato marcado. En dicho experi-

Tabla 3. Sustratos y enzimas de la vía Mevalónica.

Sustratos de la vía Mevalónica	Enzimas de la vía Mevalónica
Acetil -CoA	AACT
Acetoacetil - CoA	HMGS
3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA	HMGR
Mevalonato	MC
5-Fosfomevalonato	PMC
5-Difosfomevalonato	DPMC
Isopentenil difosfato y Dimetilalil difosfato	

Las enzimas involucradas en esta vía, en orden secuencial son: **AACT**, acetoacetil-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.

mento se encontró que el ^{14}C -mevalonato era incorporado pobremente en isoprenoides ubicados en plástidos, pero se incorporaba eficientemente en isoprenoides localizados en el citoplasma (Brainthwaite y Goodwin, 1960). Estudios posteriores hechos con varias especies de plantas, mostraron que la mevinolina, un inhibidor específico de la HMG reductasa (Tabla 3), impedía la biosíntesis de fitoesteroles (isoprenoides citoplásmicos), pero no afectaba la formación de isoprenoides sintetizados en los plástidos (Bach y Lichtenthaler, 1982). La interpretación que se le dió por mucho tiempo a los resultados antes mencionados, fue que tanto los precursores marcados, como la mevinolina, no podían penetrar en los plástidos.

Actualmente todos los resultados que parecían incongruentes, son explicados a través de la existencia de una ruta independiente para la biosíntesis del IPP y del DMAPP: la denominada vía del 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP).

Biosíntesis del IPP y del DMAPP: la vía del 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), sus genes y sus enzimas.

Varios grupos de investigación, de manera simultánea, fueron pioneros en acumular evidencias sobre la existencia de una vía alterna para la síntesis del IPP y del DMAPP distinta a la Mevalónica (Flesch y Rohmer, 1988).

Los primeros datos relevantes que condujeron al descubrimiento de la vía MEP, se obtuvieron de las investigaciones realizadas sobre la biosíntesis de los isoprenoides denominados hopanoides, los cuales tienen una función estructural en la membrana de las eubacterias (Flesch y Rohmer, 1988; Rohmer et al., 1993). En estos experimentos hechos con isótopos radioactivos, se encontró un mismo patrón de marcaje en los distintos compuestos isoprénicos analizados, estableciéndose así que los carbonos C-3 y C-5 del IPP provienen del piruvato, mientras que los carbonos C-1, C-2 y C-4 provienen del gliceraldehído 3-fosfato (G3P). De esta manera se concluyó que ambos compuestos son los precursores iniciales de la vía MEP (también denominada vía No Mevalónica, vía de la Deoxixilulosa fosfato o ruta del Gliceraldehído3 fosfato/Piruvato) (Rohmer, 1993; Rohmer, 1996; Eisenreich, 2001).

Actualmente se tiene información sobre todos los pasos enzimáticos subsecuentes que conducen hacia la formación del IPP y del DMAPP, así como de los genes que codifican para las 7 proteínas involucradas en su biosíntesis en la vía MEP (Rodríguez Concepción et al., 2000); un esquema general de esta ruta se presenta en la figura 2 y se resume a continuación :

El primer paso: Estudios realizados por Rohmer (Rohmer, et al., 1996) revelaron que el piruvato y el G3P son transformados en 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP), mediante una reacción donde participaba una enzima tipo transcetolasa. La búsqueda de la enzima específica capaz de llevar a cabo dicha reacción, se realizó mediante la identificación de secuencias homólogas a transcetolasas en las bases de datos de *Escherichia coli*. Los resultados de este estudio revelaron un marco de lectura abierto (ORF) de función desconocida en el genoma de la bacteria localizado justo a un lado del gen *ispA*, que codifica para la enzima farnesil difosfato, necesaria en la biosíntesis

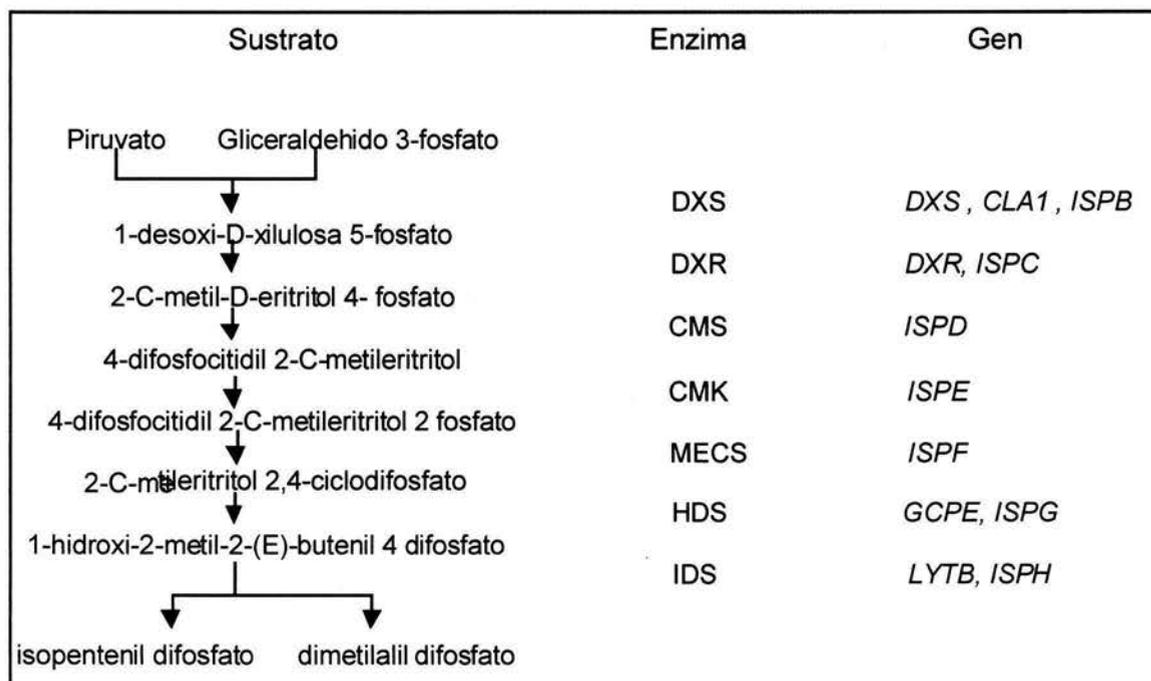


Figura 2. Vía MEP: los sustratos, las proteínas que participan en los pasos enzimáticos y las nomenclatura de los genes en *A. thaliana*.

de algunos isoprenoides. La presencia de este ORF junto al gen *ispA* formando parte de un mismo operón, sugirió que la proteína de función desconocida también podría estar involucrada en la biosíntesis del IPP y del DMAPP. Dicho marco de lectura abierto se denominó *ispB* y fue expresado en *E. coli* y como se esperaba, la proteína recombinante catalizó la formación del DXP a partir del piruvato y el G3P (Sprenger, 1997; Lois et al., 1998). Actualmente, esta proteína es llamada 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS). Se sabe que esta enzima también participa en la biosíntesis de las vitaminas tiamina (B1) y piridoxal (B6) en diferentes organismos (David et al., 1981; Lois et al., 1998) por lo que se considera que la DXS no es una enzima exclusiva de la ruta MEP (Kuzuyama, 2002). Se han encontrado secuencias ortólogas de la DXS en otras bacterias y plantas pero no en genomas de animales ni de levaduras; por lo que se especuló que la vía MEP sólo operaba en algunos organismos. Esta distribución fue crucial en la búsqueda del resto de los genes y enzimas de la vía MEP.

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se ha logrado establecer que existe más de un gen para la enzima DXS (Rodríguez Concepción, 2002). El hecho de que las plantas mutantes de DXS presentaran una acumulación muy baja de clorofilas y carotenoides, sugirió la existencia de enzimas redundantes de DXS o el intercambio de precursores de isoprenoides entre el citoplasma y los plástidos (Araki et al., 2000). El primer supuesto provocó la predicción de 2 proteínas, las que fueron nombradas DSX2 y DXS3, ambas fueron sometidas a estudios de expresión que permitieron saber las dos tienen una expresión baja y restringida a ciertos tejidos o estadios de desarrollo. Además ninguna de las dos nuevas isoformas pudo rescatar el fenotipo de la mutante deficiente de DXS. Aún no es muy claro el papel que juegan las proteínas DXS2 y DXS3 en la vía MEP, pero cabe decir que el resto de las enzimas de la vía MEP son codificadas por genes únicos, al menos en *A. thaliana* (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2001).

El segundo paso: Rohmer y colaboradores propusieron que a partir del DXP se formaba el compuesto 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) por un proceso de reducción (Rohmer et al., 1996). Otros experimentos mostraron que el 2C-metil eritritol (ME) sintetizado químicamente era directamente incorporado en isoprenoides de *E. coli* (Duvold et al., 1997).

Takahashi reportó el aislamiento de mutantes de *E. coli* que eran capaces de crecer en medio suplementado con ME pero no en la ausencia de este compuesto, logrando identificar al gen *yaeM* (ahora designado *ispC* en bacteria e *ISPC* en *A. thaliana*), como el gen cuyo producto era capaz de complementar las mutantes que no producían MEP (Takahashi et al., 1998).

El gen silvestre *yaeM* fue sobre expresado en *E. coli* y con la proteína recombinante 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa (DXR) purificada se demostró la formación de MEP a partir de DXP. Posteriormente se han identificado enzimas ortólogas en plantas, incluyendo a *A. thaliana* (Schwender et al., 1999).

El tercer paso: Para la identificación del siguiente gen de la vía MEP, Rohdich (Rohdich et al., 1999) incubó el producto MEP marcado radiactivamente con extractos

de *E. coli*, y después purificó las fracciones enzimáticas en las que se observó un compuesto nuevo que se producía cuando la reacción contenía citidina trifosfato (CTP). Estos resultados condujeron a la búsqueda en la base de datos de enzimas que utilizaran CTP. Los resultados obtenidos permitieron proponer al gen *ygbP* de *E. coli*, cuya función era desconocida, como posible candidato. Además los ortólogos de *ygbP* solamente fueron encontrados en los genomas de organismos, donde se había reportado la presencia de los genes que codifican para la DXS y la DXR, sugiriendo la participación del gen *ygbP* en la vía MEP. Para confirmar esta hipótesis, el gen *ygbP* (ahora llamado *ispD* en bacteria e *ISPD* en *A. thaliana*) se sobre expresó en *E. coli*; después se comprobó que la proteína recombinante purificada podía convertir el compuesto MEP en presencia de la CTP en 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol (CDP-ME) (Rohdich et al., 1999). También se confirmó que el CDP-ME es un intermediario de la vía MEP, esto se realizó mediante la incubación de este sustrato marcado radiactivamente en cromoplastos de *Capsicum annuum*, donde se observó una notoria incorporación radiactiva en los carotenoides (Rohdich et al., 1999). Basado en su actividad enzimática se le dió el nombre de 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa (CMS) a la proteína que lleva a cabo el tercer paso enzimático de la vía MEP. La misma proteína presenta igual función en *A. thaliana* que en *E. coli* (Rohdich et al., 2000). Un experimento adicional confirmó que *ispD* es un gen implicado en la síntesis del IPP y del DMAPP. Esta prueba se diseñó para rescatar mutantes letales de la vía MEP en *E. Coli*, utilizando cepas modificadas genéticamente con 3 enzimas de la vía Mevalónica capaces de tomar mevalonato del medio de crecimiento y usarlo como fuente alterna para la producción del IPP y de su isómero. Este experimento además permitió concluir que la supresión de este gen es letal para la bacteria (Kuzuyama et al., 2000). La identificación de varios de los siguientes genes de la vía MEP también ha ocupado el sistema del operón sintético que emplea al mevalonato como precursor del IPP y del DMAPP en *E. Coli* (Campos N. et al., 2001).

El cuarto paso: El análisis bioinformático de las secuencias de los organismos cuyo genoma estaba secuenciado totalmente, confirmó un mismo patrón de distribución para los genes ya descritos de la vía MEP, es decir que los genes encontrados en *E. coli*,

ispB, *ispC* e *ispD*, que están ausentes en las arqueobacterias, las levaduras y los animales (los cuales sintetizan sus isoprenoides exclusivamente por la vía Mevalónica) pero están conservados en la mayoría de las eubacterias y las plantas. Esta evidencia indicó que la búsqueda de otros genes de la vía MEP debería restringirse a los genomas eubacterianos y vegetales. El resultado de la comparación de varios de estos genomas, mostró a un gen de función desconocida, como un posible candidato de gen de la vía MEP y se le nombró *ychB* (ahora nombrado *ispE* en bacteria e *ISPE* en *A. thaliana*). El análisis de la secuencia de *ispE* mostró sitios de unión para ATP. El gen *ispE* de *E. coli* fue sobre expresado para obtener la proteína recombinante denominada 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol cinasa (CMK). Esta enzima fue capaz de realizar la fosforilación (dependiente de ATP) del compuesto CDP-ME y formar producto intermediario 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 2-fosfato (CDP-MEP) (Lüttgen et al., 2000).

El quinto paso: Para la identificación del gen codificante de la siguiente enzima de la vía MEP, se usó la misma estrategia empleada para encontrar el gen *ychB*, es decir, se buscó el mismo patrón de distribución que existe con los genes *ispB*, *ispC*, *ispD* e *ispE* y así se identificó el gen *ygbB* (ahora llamado *ispF* en bacteria e *ISPF* en *A. thaliana*) (Herz et al., 2000). El gen *ispF* de *E. coli* fue sobre expresado y la proteína recombinante resultó ser la 2-C-metil-D-eritritol-2-4-ciclodifosfato sintasa (MECS) ya que participa en la formación de 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato (ME-cPP) a partir del CDP-MEP. Los ortólogos en plantas de la MECS mostraron péptidos putativos con señal de transporte a plástido, al igual las enzimas DXS, DXR, CMS y CMK. Esta es una característica distintiva de las enzimas pertenecientes a una ruta biosintética que funciona en el interior de los plástidos (Herz et al., 2000; Lüttgen et al., 2000).

El sexto paso: El gen de *E. coli* al que se nombró *gcpE* (*ispG*) fue propuesto como miembro de los genes de la vía MEP porque estaba conservado en las plantas y en las eubacterias, pero ausente en los genomas las arqueobacterias, las levaduras, y los animales. Esta posibilidad fue apoyada por que los productos génicos correspondientes de plantas, contenían péptidos con señal de transporte a plástido en su dominio amino-

terminal (Querol et al., 2002). Además, el gen *ispG* fue mutado en una cepa de *E. coli*, la cual fue previamente modificada para utilizar mevalonato para la síntesis del IPP y del DMAPP (Altincicek et al., 2001a; Campos et al., 2001). Esta estrategia por un lado permitió evaluar si la mutación de este gen resulta letal para la bacteria, y por otro, abrió la posibilidad de restaurar el crecimiento de las bacterias deficientes de *ispG* tanto por la aplicación exógena de mevalonato, como por la complementación con el gen silvestre. Actualmente, está demostrado que el intermediario ME-cPP es convertido en 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato (HMB-PP) en *E. coli* por la enzima denominada 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato sintasa (HDS) (Wolff et al., 2002). En el genoma de *A. thaliana* se identificó un gen capaz de complementar la mutante de *E. coli* deficiente en *ispG*, se le llamó *ISPG* (Querol et al., 2002).

El séptimo paso. Desde el inicio de su estudio en *E. coli*, se asumió que el papel del entonces denominado gen *lytB* podría circunscribirse a la vía MEP, debido a que la distribución taxonómica que presenta es similar a la encontrada en el resto de los genes de esta ruta metabólica. Estudios subsecuentes mostraron que una cepa de *E. coli* deficiente en el gen *lytB* (ahora denominado *ispH* en bacteria e *ISPH* en *A. thaliana*) acumulaba grandes cantidades del compuesto HMB-PP y que la mutación en el gen *lytB* de *Synechocystis sp.* es letal para esta cianobacteria (Cunningham et al., 2000). La función del gen *LytB* se confirmó ya que su delección en cepas de *E. coli* a las que se les había insertado previamente un operón que permite a la bacteria usar al mevalonato para la producción del IPP y de su isómero, sólo eran capaces de crecer en medio adicionado con mevalonato (Altincicek y Kollas, 2001b). A su vez, se demostró que el crecimiento de la bacteria mutante se restaura con la aplicación exógena de análogos del IPP y del DMAPP, demostrándose así que este gen es requerido específicamente para la biosíntesis de ambos precursores de isoprenoides en *E. coli* (Altincicek y Kollas, 2001b). En *E. coli*, *lytB* codifica para la enzima (E)-4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa (IDS) que convierte al HMBPP en una mezcla 5:1 de IPP y DMAPP (Rohdich et al., 2003). La actividad de esta enzima ha sido identificada como responsable de la síntesis simultánea del IPP y su isómero (Rodríguez-Concepción et al., 2000).

Distribución taxonómica de la ruta Mevalónica y la ruta MEP.

Se piensa que las rutas metabólicas involucradas en la síntesis de isoprenoides fueron adquiridas por los organismos muy tempranamente en la evolución. De hecho, los isoprenoides son uno de los grupos de biomoléculas más antiguos que se conocen. Por ejemplo, los hopanoides (derivados de triterpenos asociados a membranas de bacterias) han sido encontrados en sedimentos fósiles de 2.5 miles de millones de años de antigüedad (Summons y Jahnke, 1999). La distribución filogenética de los genes y las enzimas de las rutas Mevalónica y MEP, sugieren que la vía del mevalonato tuvo su origen en las arqueobacterias, que la ruta MEP se originó en las eubacterias, y que los eucariotes heredaron una o ambas vías para sintetizar al IPP y al DMAPP. El hecho de que las enzimas de la ruta MEP en los eucariotes esté restringida a los organismos que presentan plástidos, sugiere que los genes respectivos fueron adquiridos a partir del ancestro cianobacterial de los plástidos (Lange et al., 2000). Sin embargo, la filogenia individual de los genes que conforman ambas rutas no puede ser explicada con un simple modelo de transmisión vertical. La transferencia horizontal de genes es crucial en la evolución de los microorganismos (Lawrence, 1999). Se tienen evidencias de que los genes involucrados en la síntesis del IPP y del DMAPP, también estuvieron sujetos al proceso de transferencia lateral (Boucher y Doolittle, 2000). Esto explica porque en la síntesis de isoprenoides de algunos procariotes están implicados genes de ambas vías, o porque se considera que las actuales enzimas de la vía MEP en las plantas fueron adquiridas posteriormente al origen de los plástidos (Lange et al., 2000). Existe un esquema general de la distribución en la naturaleza de las vías metabólicas Mevalónica y MEP (Tabla 4). La vía Mevalónica parece operar como ruta única en las arqueobacterias, en la mayoría de los organismos eucariotes y en el citosol de las plantas superiores (Figura 3).

Tabla 4. Distribución de las vías MEP y Mevalónica en los diferentes organismos.

	VIA MEVALONICA	VIA MEP
Arqueobacterias	✓	
Eubacterias		✓
Levaduras	✓	
Hongos	✓	
Algas verdes		✓
Animales	✓	
<i>Plasmodium falciparum</i>		✓
Plantas superiores	✓	✓

Aunque existen excepciones, la ruta MEP está restringida a las eubacterias y a los eucariotes con plástidos, incluidas las plantas (Kuzuyama, 2002; Putra et al., 1998) (Figura 3). El género *Apicomplexa* es un ejemplo de organismos que presentan plástidos, estos protozoarios sintetizan sus isoprenoides en una reliquia de plástido no fotosintético llamado apicoplasto (Schwende et al., 1999). Por otro lado las algas verdes producen al IPP y su isómero en cloroplastos similares bioquímica y fisiológicamente a los cloroplastos de las plantas (Lichtenthaler, 1997). Las plantas superiores producen en los plástidos sólo una fracción del total de los isoprenoides que requieren (Schulte, 2000). Es importante remarcar que de los organismos que no se ajustan al esquema de distribución propuesto en la tabla 3, algunas excepciones están dadas por eventos de especiación ecológica que presumiblemente provocaron la modificación o incluso la desaparición de una o ambas vías de síntesis del IPP y del DMAPP; tal es el caso de *Rickettsia prowazekii*, *Mycoplasma genitalium* y *Borrelia burgdorferi*. Estas 3 especies de eubacterias son parásitos obligados que han perdido todas las enzimas de la ruta MEP.

Compartimentación e Intercomunicación de las rutas Mevalónica y MEP en la célula vegetal.

En las plantas, las proteínas de la vía Mevalónica se localizan en el citoplasma, a diferencia de las enzimas involucradas en la vía MEP, las cuales se importan desde el citoplasma hacia los plástidos donde llevan a cabo su función (Lois et al., 2000).

Experimentos de marcaje radioactivo llevados a cabo en las plantas, han mostrado que la síntesis de sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos se realiza en el citoplasma por la vía Mevalónica. En contraste los monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos son formados mayoritariamente en los plástidos por la vía MEP (Figura 3). Por lo tanto existe una compartimentación clara de ambas vías en las plantas. En las plantas existen algunas evidencias de intercomunicación entre ambas rutas metabólicas que sugieren que existe intercambio de algún(os) intermediario(s) entre el citoplasma y los plástidos vegetales. Experimentos de marcaje hechos con ^{13}C -mevalonato en embriones de la planta *Ginkgo biloba*, mostraron que cerca del 98% de los ginkgólidos, que son diterpenos, son formados a través de la vía MEP, y entre el 1 y el 2% restantes provienen de la vía Mevalónica (Arigoni et al., 1997). Otros experimentos también han sugerido el aporte de la vía MEP hacia la vía Mevalónica. La vía MEP es la ruta principal para la biosíntesis de ent-kaureno (precursor para la biosíntesis de giberelinas) en *A. thaliana*; sin embargo, se ha demostrado una contribución parcial de la vía del mevalonato para la biosíntesis del ent-kaureno (Kasahara et al., 2002). Por su parte Nagata y colaboradores publicaron que el ácido mevalónico restaura de manera parcial la producción de algunos isoprenoides plastídicos cuando la vía MEP se encuentra bloqueada. Sin embargo, bajo condiciones normales el drenado de una vía hacia la otra parece ser mínimo (Nagata, 2002). Además, recientemente Bick y Lange publicaron datos que sugieren que las membranas de los plástidos tienen un sistema unidireccional de vesículas para exportar al IPP de manera eficiente hacia el citoplasma vegetal (Bick y Lange, 2003). El grupo de Boronat recientemente dió a conocer un modelo sobre la regulación del intercambio de los precursores de los isoprenoides entre el citoplasma y los plástidos en *A. thaliana*. Propuso que cuando la vía Mevalónica presenta una sobre expresión de su enzima limitante (HMGR), esto resulta en un

suministro de precursores de isoprenoides derivados de la vía citosólica hacia los plástidos, sin embargo, este aporte es insuficiente para restituir el flujo de la vía MEP cuando esta ha sido previamente bloqueada por un inhibidor específico (Rodríguez-Concepcion et al., 2004). Estos resultados apoyan la idea de que existe comunicación entre ambas vías dentro de la célula de las plantas; sin embargo, el intercambio entre las vías Mevalónica y MEP aún falta por ser entendido en su totalidad.

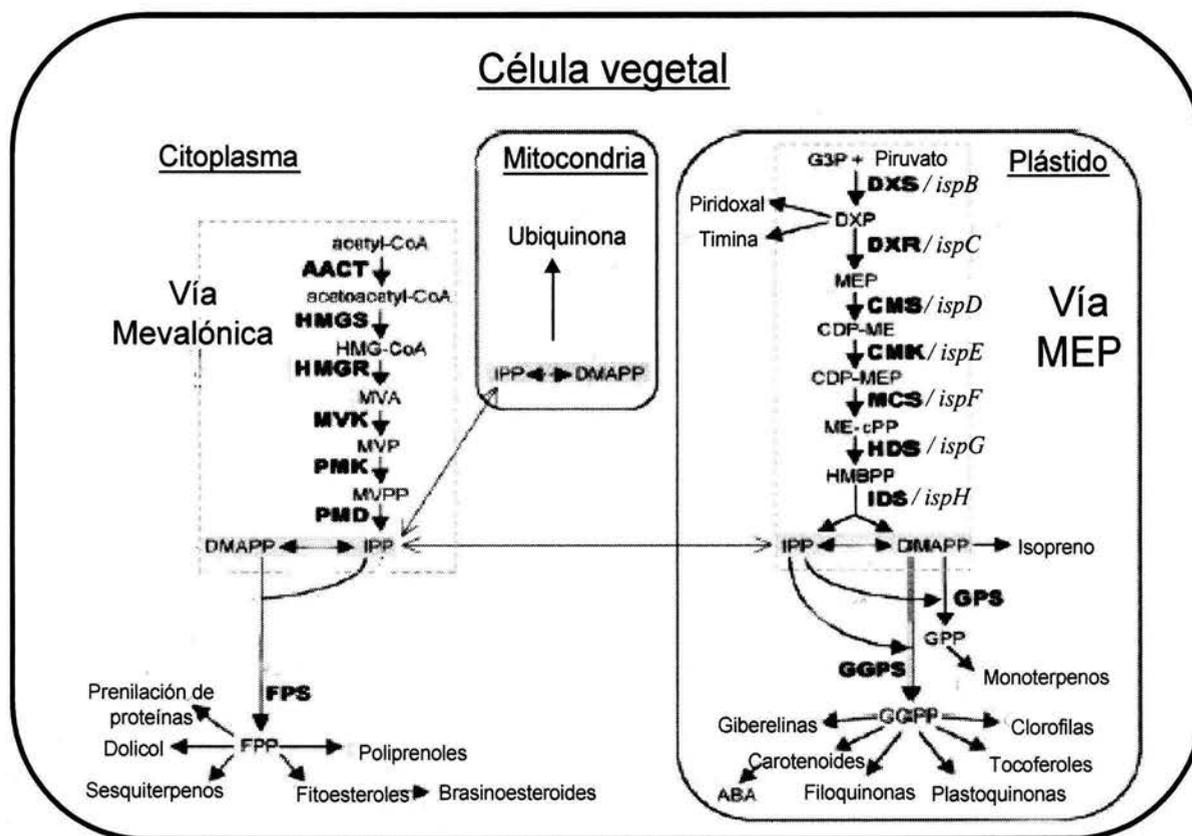


Figura 3. Compartimentación de la vía MEP y la vía Mevalónica dentro de la célula vegetal y algunos de los productos finales de ambas vías. Vía Mevalónica. HMG-CoA, Hidroximetilglutaril Coenzima A; MVP, 5-fosfomevalonato; MVPP, 5-difosfomevalonato; HMBPP, hidroximetilbutenil 4-difosfato; FPP, farnesil difosfato; ABA, ácido abscísico. Las enzimas están indicadas con negritas: **AACT**, acetoacetyl CoA tiasa; **HMGS**, HMG-CoA sintasa; **HMGR**, HMG-CoA reductasa; **MVK**, MVA cinasa; **PMK**, MVP cinasa; **PMD**, MVPP decarboxilasa; **GPS**, GPP sintasa; **FPS**, FPP sintasa; **GGPS**, GGPP sintasa. La vía MEP: G3P, gliceraldehido 3-fosfato; DXP, deoxixilulosa 5-fosfato; MEP, metileritritol 4-fosfato; CDP-ME, 4-difosfocitidil-metileritritol; CDP-MEP, 4-difosfocitidil-metileritritol 2-fosfato; ME-cPP, metileritritol 2,4-ciclodifosfato; HMBPP, hidroximetilbutenil 4-difosfato; IPP, isopentenil difosfato; y DMAPP, dimetilalil difosfato. Las enzimas están escritas en negritas: **DXS**, DXP sintasa; **DXR**, DXP reductoisomerasa; **CMS**, CDP-ME sintasa; **CMK**, CDP-ME cinasa; **MCS**, ME-cPP sintasa; **HDS**, HMBPP sintasa; **IDS**, HMBPP reductasa. Los genes correspondientes se muestran en letra *cursiva*. (Figura basada en Rodríguez-Concepcion et al., 2004)

ANTECEDENTES.

Nuestro grupo publicó el aislamiento de una mutante albina de *A. thaliana* que presentaba una notable disminución en los niveles de acumulación de clorofilas y carotenoides, así como alteraciones en la morfología de los cloroplastos, por lo cual se le denominó *cla1-1* (por Cloroplastos Alterados) (Mandel, et al., 1996). La alta similitud de secuencia entre la primera enzima de la vía MEP (DXS) identificada en *E. Coli* y el producto del gen *CLA1*, sugirieron que este gen podría codificar para la proteína ortóloga en *A. thaliana*. La complementación *in vivo* de la mutante *cla-1-1* con el compuesto 1-desoxi-D-xilulosa (DX) confirmó que *CLA1* codifica para la enzima DXS (Mandel et al., 1996; Estévez et al., 2000; Araki et al., 2000).

En el laboratorio se han aportado resultados relevantes en la caracterización del gen *CLA1/DXS* y su producto en *A. thaliana*. El análisis del patrón de expresión espacial y temporal de la DXS, permitieron concluir que esta proteína se expresa de manera diferencial a lo largo de todo el ciclo de desarrollo, así como en la mayoría de los tejidos y que los requerimientos de la DXS son mayores en estadios tempranos del desarrollo y en tejidos jóvenes de la planta (Estévez, 2000).

Con respecto a la caracterización de las rutas metabólicas, resulta fundamental la identificación tanto de los pasos enzimáticos, como la de los pasos limitantes de la vía. Para definir experimentalmente a las enzimas limitantes en la biosíntesis de isoprenoides a través de la vía MEP tanto en bacterias como en plantas, se han usado principalmente dos estrategias: una de ellas se basa en el análisis de parámetros cinéticos, tales como la eficiencia catalítica definida por la relación K_{cat}/K_m (Voet y Voet, 1990). Otra estrategia consiste en modular los niveles de una proteína de la vía para analizar su efecto en el contenido de los productos finales. De esta manera y en base al modelo de Furbank y Taylor se puede determinar si la proteína presenta un comportamiento de enzima limitante, co-limitante o no limitante. La magnitud de la alteración de los niveles de una enzima limitante presenta una relación lineal con los niveles de los productos finales. Los cambios en la acumulación de una enzima co-limitante, generan cambios no proporcionales en los productos finales. Por su parte

cambios significativos en los niveles de una enzima no limitante, no tienen efecto en el contenido de los productos finales (Furbank y Taylor, 1995). En nuestro laboratorio se optó por esta última estrategia, con la finalidad de evaluar si la DXS es una enzima limitante para la biosíntesis de isoprenoides plastídicos, los niveles de esta enzima fueron elevados o disminuidos en plantas transgénicas de *A. thaliana* (Estévez et al., 2001). En comparación con las plantas silvestres, las plantas transgénicas cuyos niveles de DXS eran elevados produjeron una mayor cantidad de isoprenoides plastídicos tales como clorofilas, carotenoides, tocoferoles, ácido abscísico y giberelinas. En contraste, las plantas transgénicas con niveles reducidos de la misma enzima produjeron cantidades menores de estos mismos isoprenoides. De este estudio se concluyó que la modulación de los niveles de DXS repercute en los niveles de isoprenoides plastídicos producidos, y en base al modelo propuesto por Furbank y Taylor, la DXS puede considerarse una enzima limitante en la vía MEP (Estévez et al., 2001).

Por su parte, Kuzuyama analizó el efecto de la sobre expresión de las primeras dos proteínas de la vía MEP en el rendimiento final del isoprenoide ubiquinona en *E. coli*, encontrando que mientras la sobre expresión de la DXS conduce a un incremento en los niveles de ubiquinona en bacterias, esto no se obtiene con la sobre expresión de la DXR (Kuzuyama et al., 2000). Estos datos apoyan el que la enzima DXS funciona como una enzima limitante en la vía MEP tanto en bacterias como en plantas; y muestran que la DXR, por lo menos en bacterias y bajo las condiciones analizadas, no parece ser una enzima limitante para la ruta MEP.

El análisis de los RNA mensajeros tanto de la DXS como de la DXR en *Lycopersicon esculentum* mostraron que la acumulación del transcrito para la DXS incrementa considerablemente durante la maduración del fruto, este aumento correlaciona con la transición de fruto verde a fruto anaranjado, no así para la DXR. Estos resultados sugirieron que la inducción de la DXS está asociada con la activación de la biosíntesis de carotenoides y también apoyan la función limitante de la DXS en la biosíntesis de carotenoides (Lois et al., 2000). La observación de que durante la acumulación masiva de carotenoides en el jitomate no se requieren niveles elevados de expresión ni del

mensajero ni de la proteína, apoya la idea de que la DXR tiene un papel no limitante en la carotenogénesis en el fruto del jitomate (Rodríguez-Concepción et al., 2001).

Otro gen que ha sido recientemente estudiado en cuanto a su participación en la vía es el gen *ispD* que codifica para la enzima CMS. Inicialmente fue identificado en *E. coli*, donde se observó que su inactivación resulta letal para la bacteria (Rohdich et al., 2000). Posteriormente, otro grupo de trabajo reportó un gen ortólogo a *ISPD* en *A. thaliana*. Okada, con la finalidad de evaluar si existía correlación entre la producción del isoprenoide ent-kaureno (el precursor de las giberelinas) y la disminución de la enzima codificada por *ISPD*, obtuvo plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresaban versiones de una construcción antisentido del gen *ISPD*. Los resultados mostraron una clara disminución en la acumulación de ent-kaureno, similar a la provocada por la fosmidomicina (un inhibidor específico de la DXR). Esta observación demostró la importancia de la CMS en la síntesis de ent-kaureno y por consiguiente de su precursor el IPP y el DMAPP (Okada, 2002). Así mismo, reportó que las mismas plantas transgénicas presentaron una marcada reducción tanto en la generación de clorofilas a y b, como de carotenoides (Okada et al, 2002).

Los estudios de la vía MEP son diversos, pero como puede deducirse de los datos referidos, los avances sobre la caracterización de la vía MEP son en muchos sentidos incipientes, quedando todavía mucho por conocer sobre la regulación y participación de la mayoría de las enzimas involucradas en esta ruta, como es el caso de la enzima CMS y la enzima CMK (Figura 2), a las cuales se enfoca este trabajo.

JUSTIFICACION.

El estudio de la vía MEP resulta muy importante e interesante tanto por su contribución al conocimiento de la síntesis de isoprenoides indispensables para el desarrollo y crecimiento normal de las plantas, como por la producción de compuestos de gran interés comercial con alto potencial biotecnológico. Sin embargo, por tratarse de una ruta metabólica recientemente descubierta, la caracterización funcional y molecular de varios de sus componentes está aún en sus inicios. En este trabajo usamos a *A. thaliana* como modelo de estudio para realizar con un enfoque molecular, la caracterización funcional de las enzimas responsables de los pasos 3 y 4 de la vía MEP.

OBJETIVO GENERAL.

Analizar la participación de las enzimas 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol-2-fosfato sintasa (CMS) y 4-difosfoctidil-2-C-metil-D-eritritol-2-fosfato cinasa (CMK) de *A. thaliana* en la vía 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP).

OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1) Analizar los patrones de expresión espaciales y temporales de las enzimas CMS y CMK en plantas silvestres de *A. thaliana*.
- 2) Generar y seleccionar plantas transgénicas de *A. thaliana* con niveles alterados de las proteínas CMS o CMK .
- 3) Analizar la acumulación de algunos productos finales de la vía MEP como clorofilas y carotenoides en las líneas transgénicas seleccionadas .

METODOLOGÍA.

Material y condiciones de crecimiento vegetales.

Las plantas silvestres de *A. thaliana* ecotipo Columbia (Col) fueron crecidas *in vitro* en medio de germinación (GM) bajo condiciones de esterilidad. El GM está compuesto por una mezcla basal de sales de Murashige y Skoog suplementado con vitaminas B5, 0.05% de ácido 4-morfolinetanesulfónico (MES), 1% de sacarosa y 0.8% de fitoagar. Estas plantas se crecieron en condiciones estándar (temperatura de 24°C y fotoperiodo de 16:8 h luz: oscuridad).

Las plantas transgénicas empleadas en este estudio se identificaron por su capacidad para desarrollar raíces y hojas verdes en GM adicionado con 50 µg/ml de kanamicina (KM). El material vegetal de las líneas transgénicas seleccionadas se obtuvo de plántulas crecidas en las mismas condiciones descritas para las plantas silvestres.

Para la producción de semilla y para la recolección de tejido de plantas adultas, se sembraron semillas silvestres y de las líneas transgénicas en el sustrato Metro-Mix 200, manteniéndose en condiciones controladas de temperatura y fotoperiodo (24°C, 16:8 h luz: oscuridad).

Transformación de *A. thaliana* .

Para la obtención de plantas transgénicas tanto de *ISPD* como de *ISPE*, las regiones codificantes de ambos genes, fueron recuperadas por PCR a partir de DNA de *A. thaliana* y se clonaron independientemente en el vector PCR-TOPO.

La región codificante de *ISPD* consiste en 909 pares de bases (pb) desde el inicio de la traducción (ATG) hasta el codón de terminación y el cDNA completo del gen *ISPE* consiste en 1152 pb desde el ATG hasta el codón de terminación.

Las dos regiones codificantes de interés, se insertaron en el vector binario de *Agrobacterium tumefaciens* pBin19, tanto en orientación sentido como en antisentido. Cada construcción estuvo bajo la regulación de un promotor de expresión fuerte y

constitutiva (CaMV35S) junto con el gen de neomicina fosfotransferasa II (NPTII) que se incluyó como un marcador de selección con resistencia a KM.

Previamente a la transformación, las construcciones se verificaron por PCR en las cepas de *A. tumefaciens*. La transformación se llevó a cabo en plantas de *A. thaliana* (ecotipo Columbia) por el sistema de transformación *in planta* mediada por *A. tumefaciens*. Una vez obtenida la generación transgénica 1(T1) de cada una de las 4 construcciones en estudio (*ISPD* versión sentido "SD", *ISPD* versión antisentido "AD", *ISPE* versión sentido "SE", *ISPE* versión antisentido "AE") se seleccionaron al menos 10 individuos resistentes a KM, de 15 días de edad para cada una de las construcciones correspondientes a SD, AD, SE y AE. Estos candidatos transgénicos se transfirieron desde la caja de selección hacia tierra y a partir de cada uno de ellos se obtuvo la semilla correspondiente a la generación (T2). Con extractos de proteínas totales de plántulas de 15 días de la generación T2 correspondientes a las líneas seleccionadas, se determinaron los niveles de proteína de la CMS o de la CMK. Dicha cuantificación permitió hacer una selección de líneas transgénicas representativa basada en la abundancia de una u otra proteína de interés. Con estas líneas se buscó el estado homocigo en la generación T3. De esta búsqueda, se encontraron líneas homocigas (100% resistentes a KM), aunque en algunas construcciones ésto no fue posible, como se describe en la sección de resultados.

Análisis tipo Northern Blot.

Para el análisis de los niveles de transcrito en las plantas, el RNA total se aisló a partir de tejido vegetal de 15 días de edad por el método de Trizol (Gibco BRL Life Technologies Inc., Grand Island NY), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se usaron 20 µg de RNA total fraccionado por electroforesis en un gel de agarosa 1.2% con 1.5% de formaldehído. Posteriormente este gel fue transferido por capilaridad y fijado a una membrana de nylon Hybond N1 (Amersham Pharmacia Biotech). El RNA se fijó con una solución 0.05 M de NaOH, y posteriormente se neutralizó con una solución de SSC 2X.

La membrana de nylon con el RNA transferido se incubó al menos por 2 h. a 65°C en un buffer de prehibridación (20% dodecil sulfato de sodio (SDS), 2M NaH₂PO₄ [pH 7.2], 0.5 de tetraacetato de etilendiamina (EDTA) [pH 8], H₂O tridestilada). Posteriormente se adicionó la sonda marcada radiactivamente (³²P) y se incubó a 65°C durante 12 h. Finalmente la membrana se lavó con una solución 0.1 SSC , SDS 1% A 55°C en repetidas ocasiones para remover la marca no incorporada y se expuso a una película X OMAT a -70°C, el tiempo necesario para detectar la señal.

Análisis Western Blot.

Extracción de proteínas totales.

Los extractos de proteínas totales se obtuvieron a partir de tejido de plantas de 15 días. El tejido fue congelado en nitrógeno líquido. Cada muestra se trituró y se resuspendió en una proporción de 1:1 v/v en un buffer desnaturizante de tipo Laemmli [0.125 M Tris-Cl, pH 6.8, 20% v/v glicerol, 4% a/v SDS, 2% v/v 2-mercaptoetanol y SDS 2X (Laemmli, 1970). La cantidad de proteína en cada extracto se cuantificó con el método de Bradford (Bradford, 1976) con el respectivo reactivo (Bio-Rad, México). Los extractos de proteína total se hirvieron durante 5 minutos antes de ser separados por electroforesis de la manera que a continuación se describe.

Electroforesis de proteínas.

Para los experimentos realizados en este trabajo, se usaron 10 µg de proteínas totales de cada una de las muestras. Estas proteínas se separaron en geles desnaturizantes de SDS-poliacrilamida al 12% mediante electroforesis en un buffer de Tris-glicina (25mM Tris-HCl, 250mM glicina, 0.1% SDS). También se cargó un carril de cada gel con un marcador de peso molecular preteñido (Bio Rad, México) como indicador. Los geles se corrieron a 120 volts durante 2 h.

Para emplearse como referencia de la cantidad de carga de la proteína, se corrieron simultáneamente dos geles bajo las mismas condiciones. Uno de los geles se tiñó con

Azul brillante Coomassie R-250 y posteriormente se destiñó con la finalidad de ver el patrón de las bandas y las cantidades de proteína por carril. El otro gel se empleó para el ensayo de Western blot o inmunodetección.

Electro transferencia.

Las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond C, Amersham Pharmacia Biotech) empleando una cámara de transferencia con un buffer de Tris-glicina (25 mM de Tris, 0.2 M de glicina, y 20% a/v metanol) y aplicando una corriente constante de 200 mA durante 1 h.

Inmunodetección.

Con el propósito de cuantificar la cantidad de las proteínas de interés, las membranas de nitrocelulosa con las proteínas transferidas fueron incubadas en una solución de bloqueo PBS-T (5% leche descremada, 0.05% Tritón X-100 y 140 mM NaCl, 2.8 mM NaH_2PO_4 , 7.2 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4), y se mantuvieron en agitación durante 1 h. a 50°C. Posteriormente las membranas se incubaron en presencia del anticuerpo policlonal correspondiente (anti-CMS o anti-CMK) en la dilución adecuada previamente establecida durante 2 h. a temperatura ambiente. Después se procedió a lavar reiteradamente las membranas con PBS-T para quitar el exceso de anticuerpo primario y añadirles el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con la enzima peroxidasa (Amersham Pharmacia Biotech) en la dilución sugerida por el proveedor; se incubaron durante 2 h. a temperatura ambiente y transcurrido el tiempo determinado, se lavaron nuevamente con PBS-T en 3 ocasiones.

El revelado de la membrana se hizo a través de la reacción de peroxidasa alcalina (Amersham Pharmacia Biotech). Las bandas se cuantificaron usando un procesador de imágenes (NIH Image software, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda).

Obtención de anticuerpos específicos dirigidos contra CMS y CMK.

Para inmunodetectar las proteínas de interés, se emplearon anticuerpos policlonales generados contra las proteínas recombinantes de CMS y de CMK. Los anticuerpos se obtuvieron inyectando por separado a 2 conejos con las proteínas CMS o CMK. Dichas proteínas fueron obtenidas de la sobre expresión de la región codificante de *ISPD* e *ISPE* en vectores de expresión. En este caso, se clonaron en el vector de expresión pGEX1 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK), fusionadas con la proteína glutatión S-transferasa (GST), lo que facilitó la estabilización y la purificación de las proteínas recombinantes debido a la afinidad que tiene la GST por el glutatión en estado reducido.

Las construcciones se verificaron por análisis de restricción de las proteínas recombinantes. La sobre expresión de GST-CMS y de GST-CMK se indujo por la adición de isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido (IPTG) a cepas de *E. coli*. Las proteínas de fusión recombinantes se purifican usando la resina Glutatión Sefarosa 4B (Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo al protocolo de Ausubel (Ausubel et al., 1989). Para asegurar la pureza de los extractos de la columna, las proteínas purificadas se separaron en geles de poliacrilamida, las bandas correspondientes al peso molecular de las proteínas de interés se obtuvieron recortando directamente el gel a la altura del peso molecular esperado. Las proteínas incluidas en la poliacrilamida se usaron directamente en las 2 primeras inoculaciones de cada conejo, los cuales fueron sometidos a un esquema de inmunización de 7 inyecciones, a intervalos de 10 días. Para monitorear ambos anticuerpos se tomaron muestras del suero pre inmune y de los sueros posteriores a las inoculaciones 3, 5 y 7. La especificidad y el título de los anticuerpos se evaluaron inicialmente sobre extractos de proteína total de las cepas bacterianas sobre expresas, y finalmente sobre extractos de proteína total provenientes de plantas crecidas en las condiciones experimentales descritas.

Determinación del contenido de clorofilas y carotenoides.

Para cuantificar los niveles de clorofilas y carotenoides presentes en las plántulas de nuestras líneas transgénicas, se obtuvieron los extractos correspondientes utilizando una solución 1:2 diclorometano: metanol, siguiendo el método reportado por Vázquez-Duhalt (Vázquez-Duhalt y Greppin, 1986) a partir de tejido fresco de *A. thaliana* de 15 días de edad. La cuantificación de pigmentos se hizo en un espectrofotómetro (Beckman DUR 650). Las lecturas se hicieron de la siguiente forma: La clorofila a se cuantificó a 645 nanómetros (nm), la clorofila b a 663 nm y los carotenoides totales a 450 nm. Las cifras leídas en las anteriores longitudes de onda, fueron sometidas a las fórmulas que incluyen los coeficientes de absorción correspondientes a clorofilas totales, clorofila a, clorofila b o carotenoides (Mackinney G., 1941). Los valores se obtuvieron en unidades de mg de pigmento / l de solvente :

Clorofilas totales = 20.2 (valor de absorbancia a 645nm) + 8.02 (valor de absorbancia a 663nm)

Clorofila a = 12.7 (valor de absorbancia a 663nm) – 2.69 (valor de absorbancia a 645nm)

Clorofila b = 22.9 (valor de absorbancia a 645nm) – 4.64 (valor de absorbancia a 663nm)

Carotenoides totales = 4 (valor de absorbancia a 450nm)

Posteriormente, las cifras conseguidas se convirtieron a μg de pigmento/ml de solvente, y a μg de pigmento/mg peso fresco de tejido. De este último valor , se consideró al del control el 100% de concentración de pigmento relativa. Todos los demás valores de ajustaron en relación al control.

RESULTADOS.

Análisis del patrón de expresión temporal de las enzimas CMS y CMK en plantas silvestres de *A. thaliana*.

Los patrones de expresión temporal de la enzima CMS (Figura 4, panel B) y de la enzima CMK (Figura 5, panel B) de *A. thaliana* se evaluaron en extractos de proteínas totales de plántulas de distintas edades crecidas *in vitro* bajo condiciones estándar.

El patrón de expresión de la CMS se analizó en extractos de plantas de 3, 7, 14, 21 y 28 días de edad. De cada muestra, se usaron por carril 10 μ g de proteínas totales y se corrieron simultáneamente 2 geles bajo las mismas condiciones (descritas en la sección de material y métodos). Uno de ellos se tiñó para ver el patrón electroforético de proteínas y verificar la equidad en las cantidades de proteína por carril (Figura 4, panel A). El otro gel se empleó para transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa sobre la cual se llevó a cabo la inmunodetección de la enzima con el anticuerpo policlonal específico correspondiente. Las bandas correspondientes al peso molecular de la CMS (30KDa) (Figura 4, panel B) fueron cuantificadas usando un programa de densitometría (NIH Image software). En el panel C de la Figura 4 se muestra un análisis densitométrico representativo de las bandas observadas en la inmunodetección. Se realizó un análisis densitométrico de 3 experimentos independientes y los resultados fueron promediados, graficados y analizados estadísticamente (Figura 4, panel D). Tomando como 100% la cantidad de la proteína CMS encontrada en plantas de 3 días de edad, los porcentajes relativos, que se encontraron para los otros estadios de desarrollo fueron los siguientes: 7 días, 83%; 14 días, 93%; 21 días, 96% y 28 días, 95%. Empleando un análisis de varianza a un nivel de confiabilidad de $\alpha= 0.05$ se determinó que no hay diferencias significativas en la acumulación de la CMS en ninguna de las edades evaluadas. De estos resultados se puede concluir que los niveles de la CMS no varían significativamente en los estadios de desarrollo examinados.

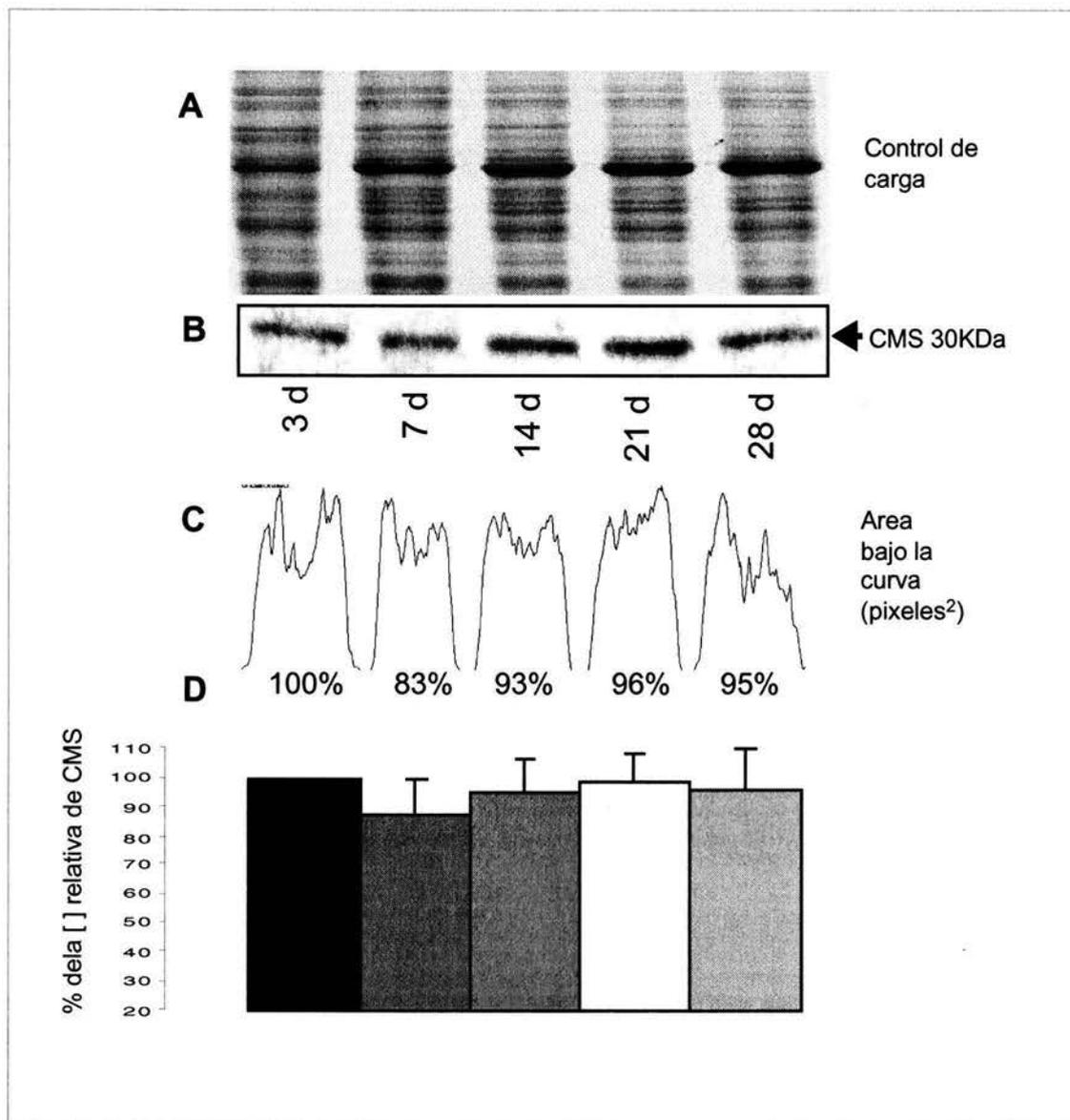


Figura 4. Patrón de expresión temporal de la proteína CMS de *A. thaliana*. A, patrón electroforético de proteínas totales de plántulas de 3, 7, 14, 21 y 28 días (d) según se indica, 10 μ g de proteína total por carril. B, ensayo de inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales contra la CMS, hecho sobre las muestras antes referidas. C, análisis densitométrico representativo de la acumulación de la CMS en dichas muestras. D, gráfica del porcentaje relativo de acumulación de la proteína CMS en 3 experimentos independientes. Las barras representan la desviación estándar.

El patrón de expresión durante el desarrollo de *A. thaliana* de la enzima CMK se analizó siguiendo el mismo proceso descrito para la proteína CMS. En la Figura 5 se

incluye el gel que se usó como control de carga (Panel A), la inmunodetección contra la CMK (Panel B), un análisis densitométrico representativo (Panel C) y la gráfica (Panel D) de la concentración relativa de la proteína CMK derivada de 3 experimentos independientes. Considerando como 100% la acumulación que presentan las plantas a los 3 días de edad, el análisis de varianza correspondiente indicó que los valores de cantidad relativa de la proteína CMK en las etapas de desarrollo analizadas fueron: 7 días (108%), 14 días (110%), 21 días (107%) y 28 días (102%). Estos resultados, de manera semejante a lo encontrado para la CMS, no presentaron diferencias significativas entre ninguna de las muestras. En base a lo anterior se concluye que los niveles de la CMK se mantienen relativamente constantes a través del desarrollo vegetativo de *A. thaliana* de forma parecida al comportamiento de la enzima CMS.

Análisis del patrón de expresión espacial de las enzimas CMS y CMK en plantas silvestres de *A. thaliana*.

Los patrones de expresión espacial de las proteínas CMS y CMK (Figuras 6 y 7 respectivamente) se obtuvieron a partir de extractos provenientes de los siguientes tejidos: tallo, hojas de la roseta, hojas caulinas, flores y silicuas; todos obtenidos de plantas silvestres adultas crecidas en tierra bajo condiciones estándar.

Usando anticuerpos específicos contra la CMS, se realizaron análisis tipo western blot. Para analizar la abundancia de esta enzima en los diferentes tejidos antes referidos, las muestras respectivas se resolvieron en 2 geles corridos paralelamente. Uno de los geles fue teñido y sirvió de referencia de carga (Figura 6, panel A), mientras que el otro se usó para la inmunodetección. El ensayo reveló una banda específica a la altura del peso molecular esperado para la CMS en las muestras de todos los tejidos examinados (Figura 6, panel B).

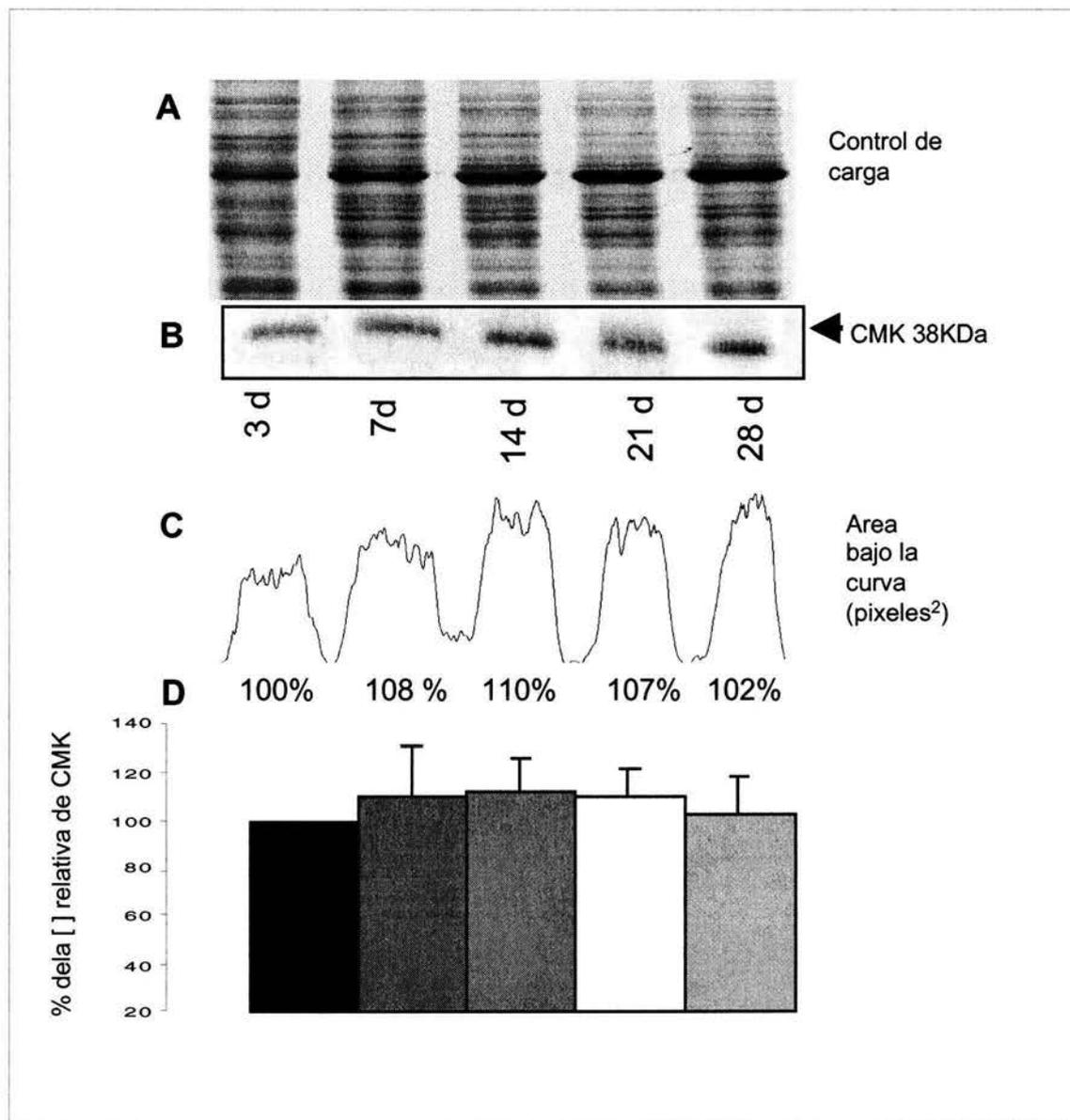


Figura 5. Patrón de expresión temporal de la proteína CMK de *A. thaliana*. A, patrón electroforético de proteínas totales de plántulas de 3, 7, 14, 21 y 28 días (d) según se indica, 10 µg de proteína total por carril. B, ensayo de inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales contra la CMK, hecho sobre las muestras antes referidas. C, análisis densitométrico representativo de la acumulación de la CMK en dichas muestras. D, gráfica del porcentaje relativo de acumulación de la proteína CMK de 3 experimentos independientes. Las barras representan la desviación estándar.

La cuantificación de la intensidad de la banda correspondiente a la CMS permitió establecer que la abundancia de esta proteína:

1) Es muy similar entre las muestras del tallo, de las hojas de roseta y de las hojas caulinas (tejidos fotosintéticos). 2) Es parecida entre las muestras extraídas de las flores y de las silicuas. 3) Es claramente mayor en los tejidos fotosintéticos que en las flores y las silicuas.

En el panel C de la Figura 6 se aprecia una lectura densitométrica representativa del patrón de expresión espacial encontrado para la CMS.

Los valores que se usaron para obtener el promedio, los histogramas y el análisis estadístico que se grafican en el panel D de la figura 6, provienen de 3 experimentos independientes. Los porcentajes relativos de acumulación de la CMS, considerando arbitrariamente como el 100% la acumulación en el tallo, fueron: las hojas de roseta 95%, las hojas caulinas 92%, las flores 25% y las silicuas 23% (Figura 6, panel D). La diferencia estadística entre los primeros 3 tejidos no resultó significativa ($p= 0.12$), y aunque tampoco existe diferencia significativa entre las flores y las silicuas ($p=0.1$), si hay diferencias significativas entre los los tejidos fotosintéticos que se analizaron y aquellos con baja tasa fotosintética ($p= 0.002$). Este resultado permite concluir que la acumulación del producto del gen *ISPD* de *A. thaliana* tiene un patrón de acumulación diferencial que está regulado de manera tejido específica.

El patrón de expresión espacial de la CMK, se determinó por western blot en los mismos tejidos y condiciones que la CMS, empleando la misma estrategia experimental. En la figura 7 se resumen los resultados del análisis de la expresión de la CMK en distintos tejidos. El panel A enseña el patrón de bandas de proteínas de los tejidos empleados a manera de control de carga. En el panel B aparece la inmunodetección de la CMK hecha sobre las distintas muestras tisulares. El panel C muestra un análisis densitométrico representativo. Como en el caso anterior, se consideró arbitrariamente la acumulación de la CMK encontrada en el tallo como el 100%, y las cantidades relativas encontradas en el resto de los tejidos fueron: las hojas de la roseta 93%, las hojas caulinas 88%, las flores 22% y las silicuas 30%. Finalmente, el panel D muestra una gráfica, con los datos de los diferentes experimentos y su análisis estadístico, de donde se deduce que no existen

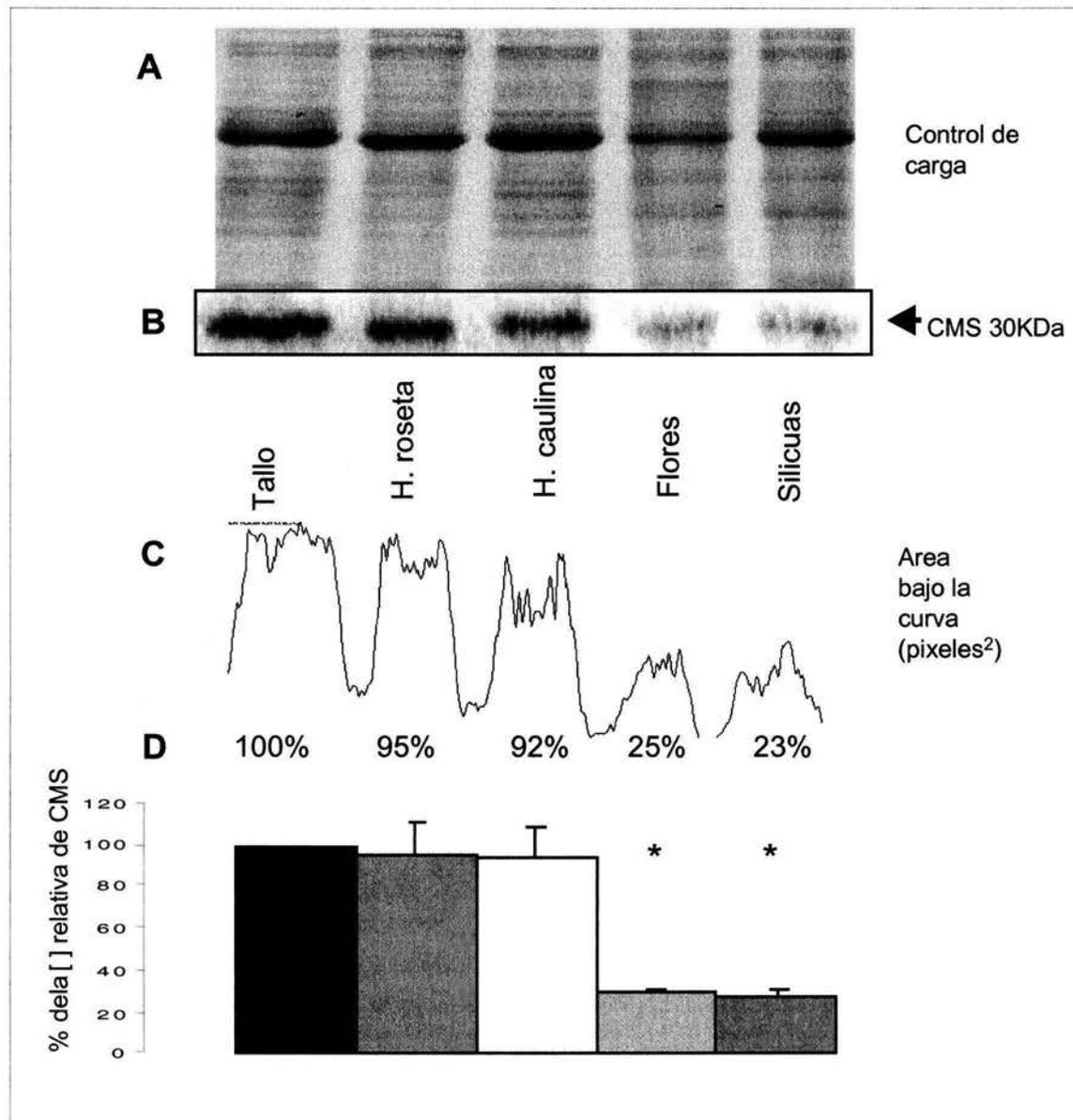


Figura 6. Patrón de expresión espacial de la proteína CMS de *A. thaliana*. A, patrón electroforético de proteínas totales de los tejidos indicados, obtenidos de plantas silvestres adultas. 10 μ g de proteína total por carril. B, ensayo de inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales contra la CMS, hecho sobre las muestras antes referidas. C, análisis densitométrico representativo de la acumulación de la CMS en dichas muestras. D, gráfica del porcentaje relativo de acumulación de la proteína CMS en 3 experimentos independientes. Las barras representan la desviación estándar y el asterisco (*) indica las diferencias significativas ($p=0.002$).

diferencias significativas entre el grupo conformado por el tallo, las hojas de la roseta y las hojas caulinas ($p= 0.2$); ni entre el grupo integrado por las flores y las silicuas ($p= 0.2$). Sin embargo, si existe una diferencia significativa entre ambos grupos ($p= 0.008$), esto permitió concluir que la CMK, al igual que la CMS, de *A. thaliana* tiene un patrón de acumulación diferencial, siendo ésta mayor, en los tejidos verdes o fotosintéticos y menor en los no fotosintéticos.

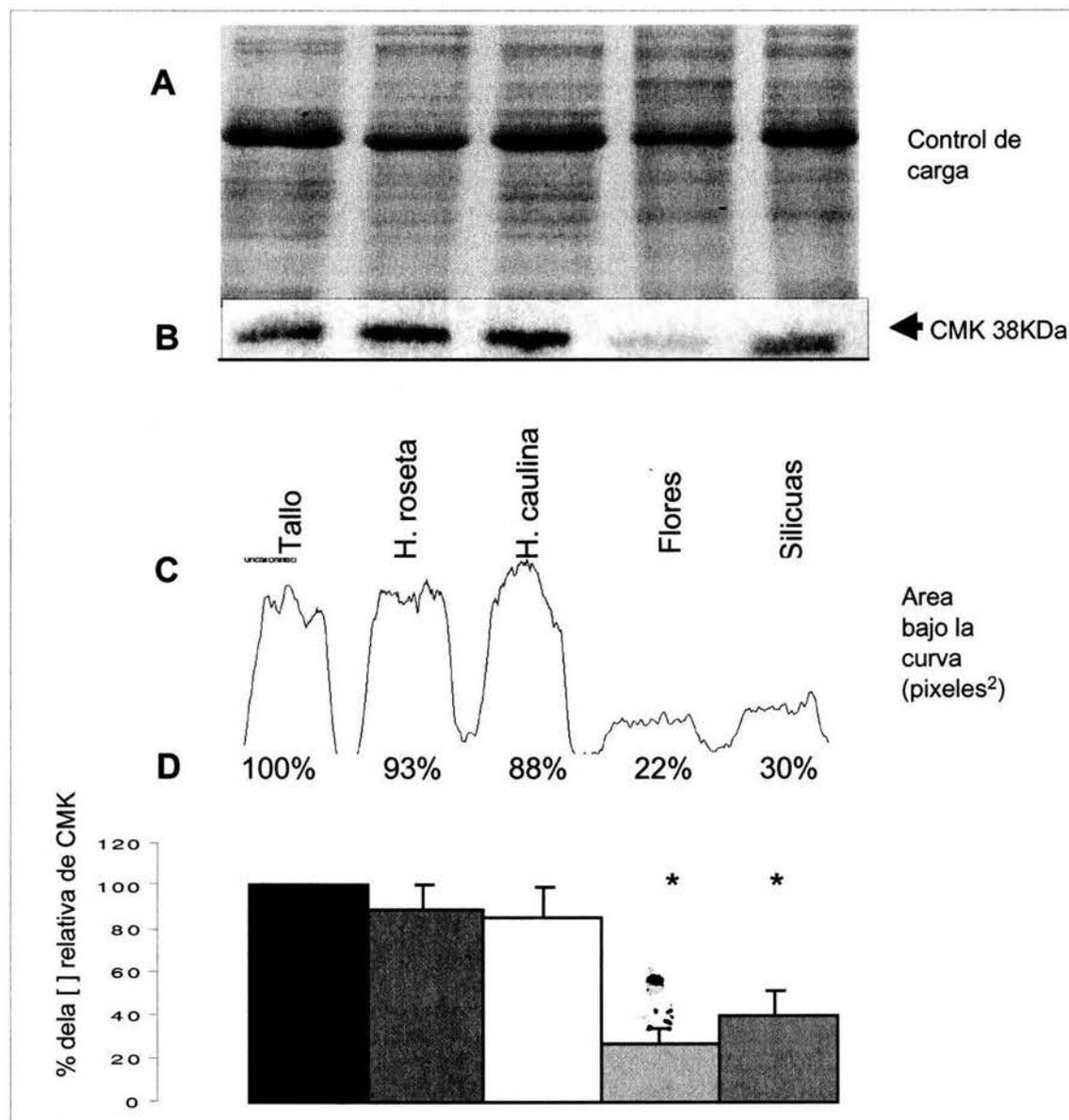


Figura 7. Patrón de expresión espacial de la proteína CMK de *A. thaliana*. A, patrón electroforético de proteínas totales de los tejidos indicados, obtenidos de plantas silvestres adultas. 10 μ g de proteína total por carril. B, ensayo de inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales contra la CMK, hecho sobre las muestras antes referidas. C, análisis densitométrico representativo de la acumulación de la CMK en dichas muestras. D, gráfica del porcentaje relativo de acumulación de la proteína CMK en 3 experimentos independientes. Las barras representan la desviación estándar y el asterisco (*) indica las diferencias significativas ($p= 0.008$).

Producción de líneas transgénicas de *A. thaliana* que expresen altos y bajos niveles de la CMS y la CMK.

Para examinar el impacto de la modulación de los niveles de las proteínas CMS y CMK en la síntesis de isoprenoides plastídicos en *A. thaliana*, se generaron plantas transgénicas portadoras de construcciones con versiones en sentido o en antisentido de los genes *ISPD* o *ISPE*, bajo la regulación de un promotor fuerte y constitutivo (Figura 8). Estas construcciones fueron introducidas de manera independiente en plantas silvestres de *A. thaliana* empleando el sistema transformación *in planta* por *A. tumefaciens* de la manera descrita en la sección de materiales y métodos.

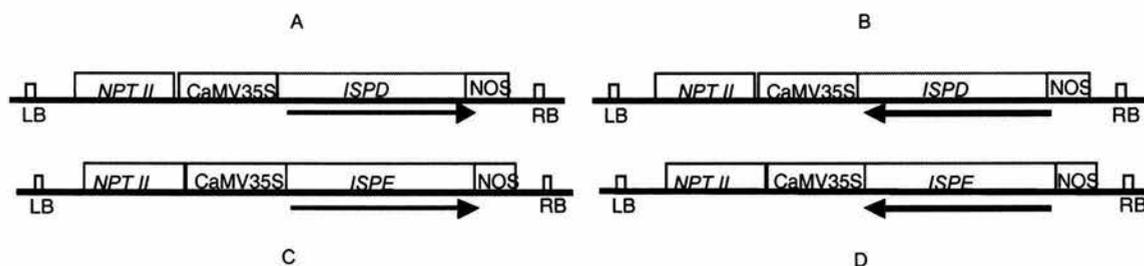


Figura 8. Construcciones usadas en la transformación de *A. thaliana*. A, diagrama de la construcción del gen *ISPD* versión sentido. B, diagrama de la construcción del gen *ISPD* versión antisentido. C, diagrama de la construcción del gen *ISPE* versión sentido. D, diagrama de la construcción del gen *ISPE* versión antisentido. Las construcciones contienen 909 y 1152 pb, correspondientes a los cDNAs, desde el ATG hasta el codón de término, de *ISPD* e *ISPE* respectivamente. LB, borde izquierdo del T-DNA. NPTII, gen de selección neomicin-fosfotransferasa II. CaMV35S, promotor del virus del mosaico de la coliflor. NOS, señal de término de la poliadenilación de la nopalina sintasa. RB, borde derecho del T-DNA.

Sobre la primera generación de semillas transgénicas (T1) se efectuó una selección representativa de líneas transgénicas que acumularan a la enzima CMS o a la enzima CMK en cantidades mayores y menores con respecto a las plantas silvestres. La selección se llevó a cabo separando al menos 10 plántulas resistentes a kanamicina de cada una de las 4 construcciones utilizadas. Cada una de estas plántulas representaron líneas transgénicas independientes (Figura 10).

Las plantas de la generación T1 fueron empleadas para la obtención de la siguiente generación, sin embargo, probablemente por el estrés que generó en las plántulas el traslado de condiciones *in vitro* a tierra, no todas sobrevivieron para tener descendencia. Es importante resaltar que las plántulas elegidas de la generación T1 correspondientes a las versiones sentido de *ISPD* e *ISPE*, presentaron un fenotipo indistinguible del fenotipo silvestre (Figura 9). En contraste, las plántulas correspondientes a las versiones antisentido para ambos genes mostraron una gama de fenotipos, dentro del rango de verde a amarillo pálido provocados presumiblemente por la disminución de la CMS y la CMK. Se seleccionaron plántulas representativas de cada uno de los fenotipos encontrados (Figura 9), para la obtención de la generación T2.

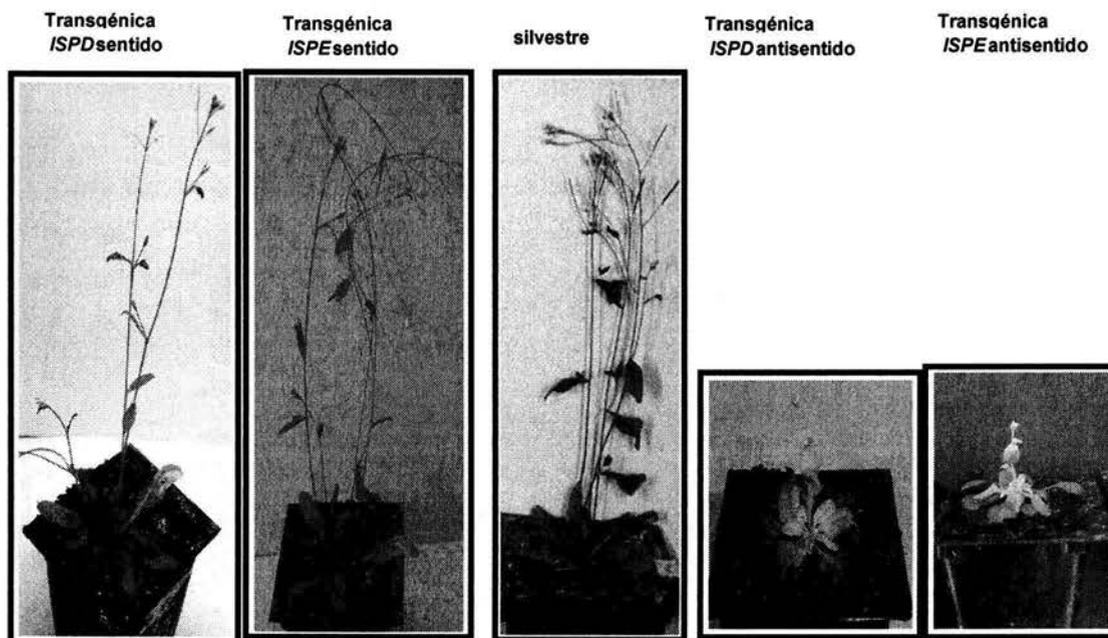


Figura 9. Fenotipos obtenidos en la generación T1 correspondientes a las construcciones bajo estudio.

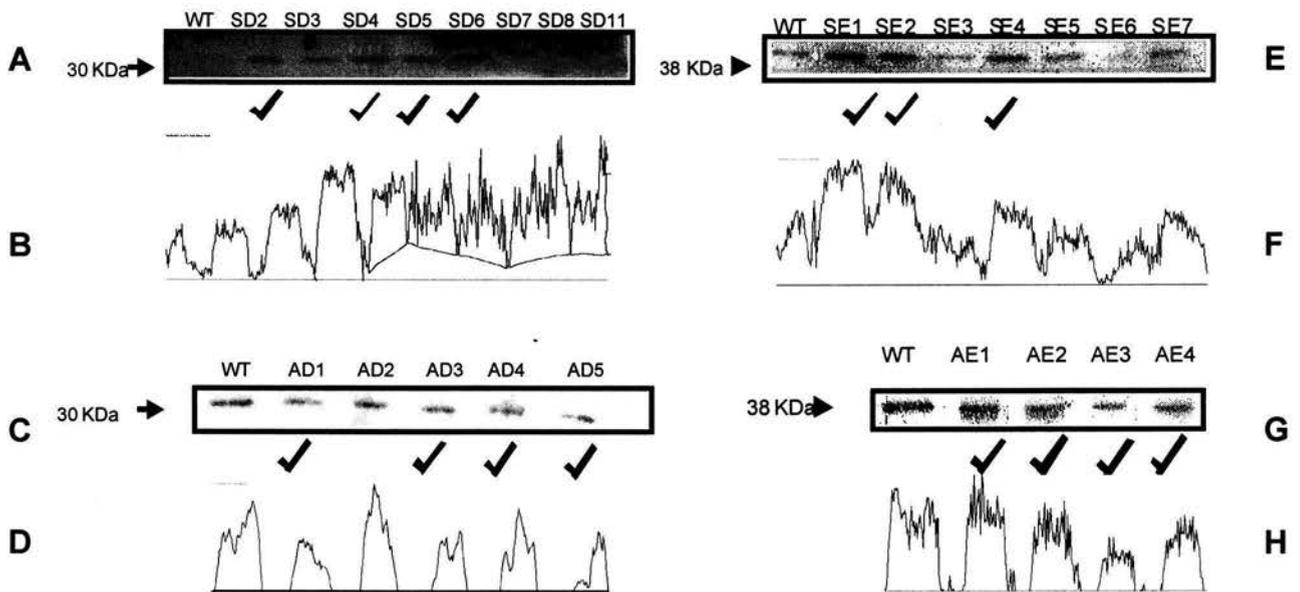
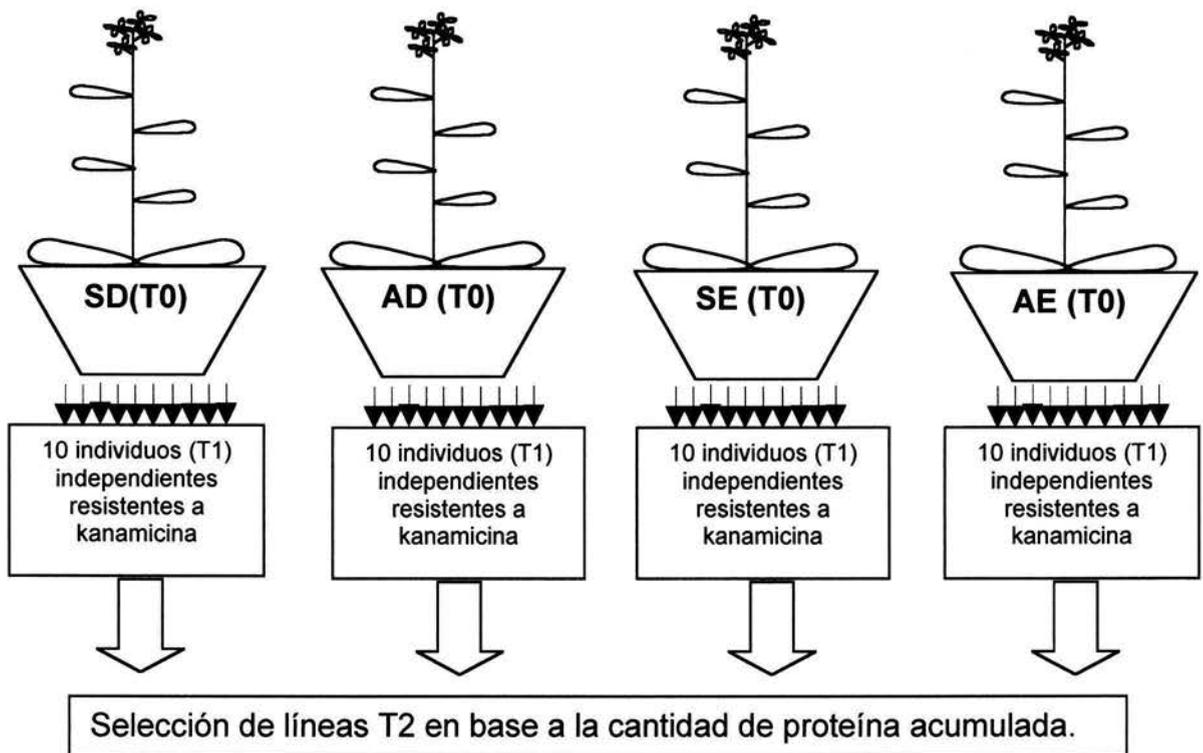


Figura 10. Estrategia para la selección de líneas representativas de la generación T2 con altos o bajos niveles de la CMS o la CMK. A partir de individuos de la generación T1 de las 4 construcciones bajo estudio, se obtienen líneas independientes en la generación T2. Se escogen las líneas representativas a partir de las densitometrías correspondientes a los western realizados con los extractos protéicos correspondientes a cada línea. A, C, E y G; inmunodetecciones correspondientes a las líneas SD, AD, SE y AE. B, D, F y H; cuantificación de la densidad las bandas respectivas.

En la generación T2 se obtuvieron 8 líneas SD, 5 líneas AD, 7 líneas SE y 4 líneas AE.

Los niveles de acumulación de las proteínas correspondientes en cada una de las líneas transgénicas aisladas, se analizaron por western blot en plántulas de 15 días de edad (Figura 10). El análisis densitométrico de los ensayos de inmunodetección se empleó para determinar variaciones en los niveles de acumulación de las enzimas CMS y CMK, de esta manera se seleccionaron 4 líneas representativas *sobre* expensoras de la CMS: SD2, SD4, SD5 y SD6 (Figura 10, Panel A). 4 líneas sub expensoras de la CMS: AD1, AD3, AD4 y AD5 (Figura 10, panel C). 3 líneas sobre expensoras de la CMK: SE1, SE2 y SE4 (Figura 10, panel E). Y 4 líneas sub expensoras de la CMK: AE1, AE2, AE3 y AE4 (Figura 10, panel G). Los niveles de expresión del transgén de las líneas sobre expensoras de *ISPD* también mostraron mediante análisis tipo northern blot que el RNA mensajero del transgén se expresa a niveles mucho mayores que en la línea silvestre (Figura 11).

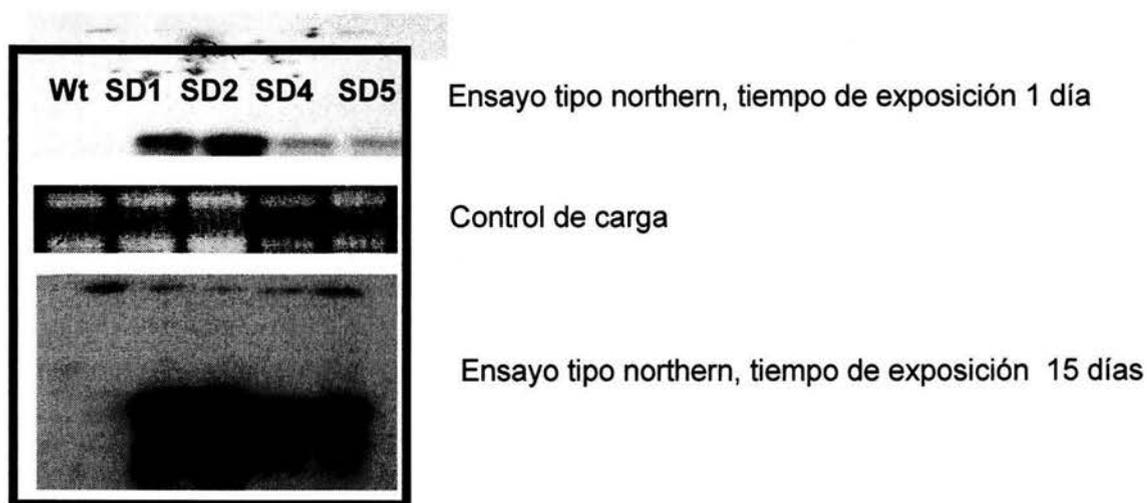


Figura 11. Northern blot de 4 líneas sobre expensoras de la CMS (SD1, SD2, SD4 y SD5) y de la planta silvestre (wt). En cada carril se cargaron 20 μ g de RNA.

Con la meta de aislar líneas homocigas (100% resistentes a kanamicina) en la generación T3, se aislaron al menos 12 individuos de cada una de las líneas

seleccionadas de la generación T2 (Figura 12). A partir de estos individuos, se obtuvo la siguiente generación.

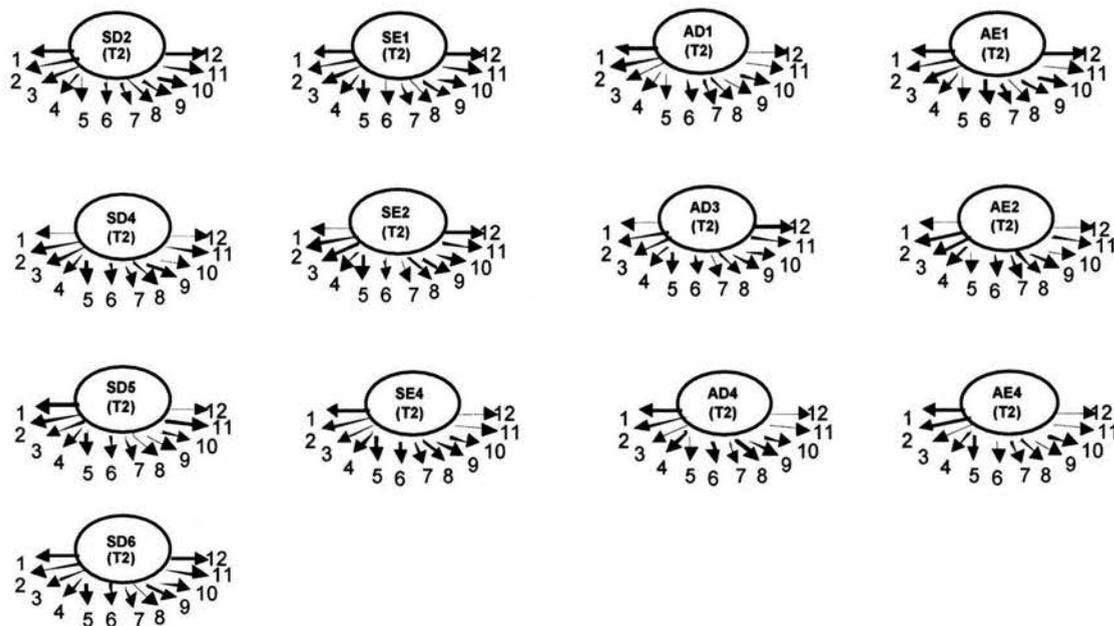


Figura 12. Estrategia para buscar descendencia homociga en la generación T3, a partir de las líneas independientes SD, SE, AD y AE generación T2.

El análisis de la progenie (T3) de las líneas transgénicas representativas de *ISPD* e *ISPE* versión sentido, permitió detectar líneas homocigas en las proporciones mendelianas esperadas. Fue notable, que ninguna de las plantas sobre expresoras de la CMS o la CMK examinadas, rindió un fenotipo distinto al de las plantas silvestres de *A. thaliana* ni en la generación T2 ni en la generación T3, ni incluso en el estado homocigo, por lo menos bajo las condiciones de crecimiento utilizadas.

En contraste, algunas de las líneas transgénicas seleccionadas de *ISPD* e *ISPE* versión antisentido de la generación T2, presentaron fenotipos pálidos que fluctuaron desde el verde pálido, hasta el amarillo, acompañados de una disminución en la talla general y en la presencia de flores. La gran mayoría de las plantas con esta descripción no sobrevivieron hasta la etapa reproductiva, o en su defecto, generaron una descendencia pobre e infértil. Incluso hubo líneas

con versiones antisentido para ambos genes (específicamente la AD5 y la AE3) que se perdieron completamente en su fase de adaptación a tierra, al parecer por su ineficiencia fotosintética. Por esta razón se intentó obtener a la generación T3 de las líneas antisentido, aislando varios individuos con fenotipos no tan afectados. Usando este criterio fue posible la obtención de las semillas correspondientes a la generación T3 de las líneas AD y AE, sin embargo resultó imposible encontrar estas líneas en estado homócigo. Esta observación sugirió que la condición homóciga fue letal para ambos genes, apoyando que las 2 proteínas estudiadas son indispensables para el crecimiento normal de las plantas.

La cuantificación de los niveles de la CMS y de la CMK en plántulas silvestres de 15 días, permitió hacer una comparación con la abundancia de una u otra enzima encontrados en las respectivas líneas generación T3. Cabe decir que los individuos control fueron, tanto plántulas silvestres como individuos transformados con construcciones idénticas a las usadas en la transgénesis pero con el vector vacío. Estos dos tipos de control presentaron entre sí una acumulación igual de la CMS y de la CMK; por lo que en los resultados, ambos se reportan indistintamente como controles experimentales.

El aumento o la reducción de las enzimas CMS y CMK en las líneas T3 se determinó mediante detecciones tipo western blot (Figuras 13, 14, 15 y 16; paneles B). Los patrones electroforeticos de proteínas totales correspondientes se muestran en el panel A de las figuras 13, 14, 15, y 16 respectivamente. Mediante los análisis densitométricos (Figuras 13, 14, 15 y 16; paneles C) de las bandas obtenidas por inmunodetección se pudo establecer que:

Las líneas homócigas versión sentido de *ISPD* presentaron aumentos significativos en los niveles de acumulación de la CMS con respecto a la planta silvestre (p , 0.009).

Como se aprecia en la gráfica de la figura 13 panel D, considerándose el control el 100% de acumulación relativa, la línea SD2 mostró una expresión del 190%, la línea SD4 del 122%, la línea SD5 del 156% y la línea SD6 del 125%.

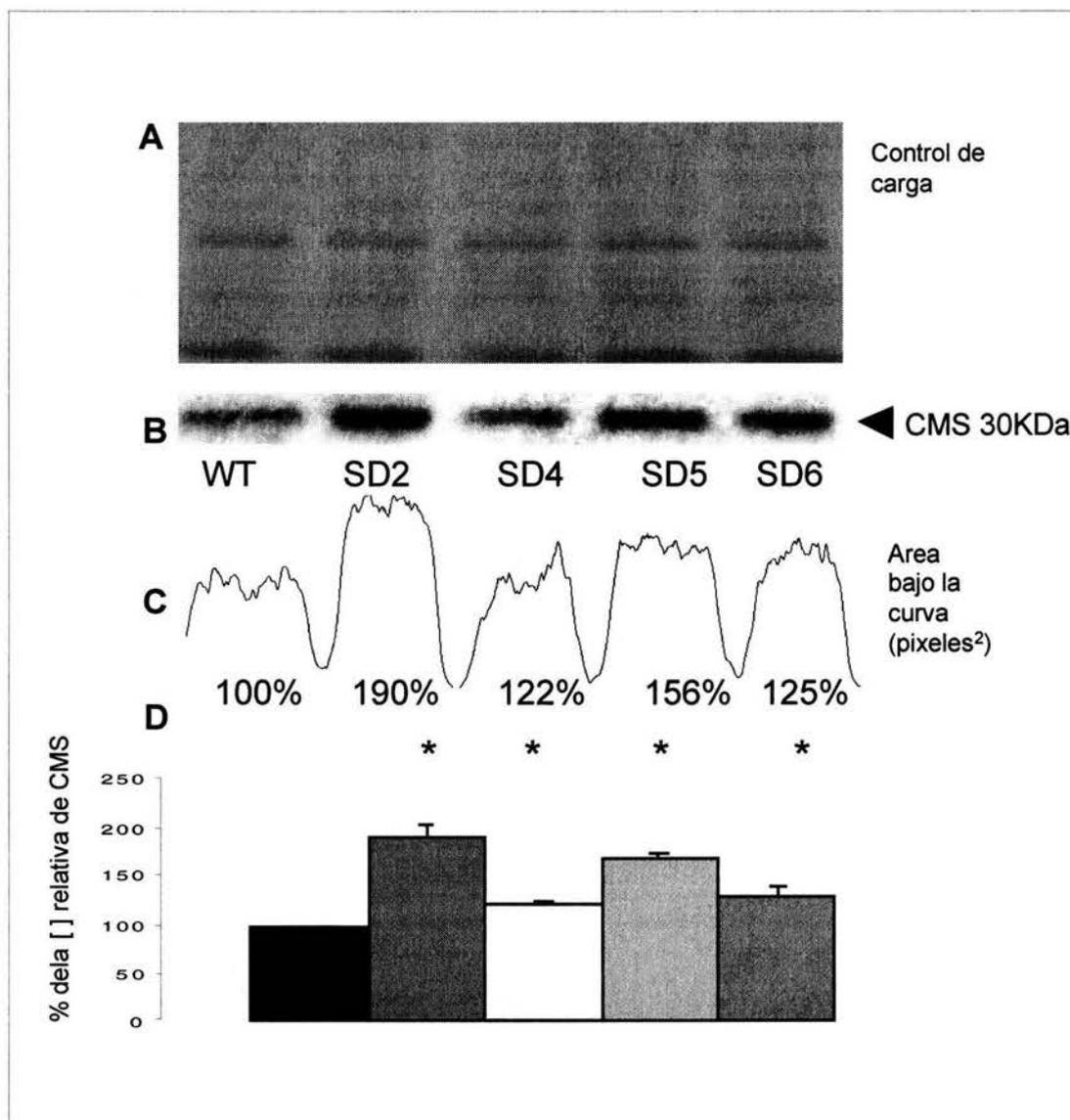


Figura 13. Expresión de la CMS en plantas transgénicas sobre expresoras (SD2, SD4, SD5 y SD6) y en plantas silvestres (Wt) de *A. thaliana*. A, patrón electroforético de proteínas totales de las líneas indicadas, 10 μ g de proteína total por carril. B, ensayo de inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales contra la CMS, hecho sobre las muestras antes referidas. C, análisis densitométrico representativo de la acumulación de la CMS en dichas muestras. D, gráfica del porcentaje relativo de acumulación de la proteína CMS en 3 experimentos independientes. Las barras representan la desviación estándar y el asterisco (*) indica las diferencias significativas ($p = 0.009$).

Las líneas heterocigas versión antisentido del gen *ISPD* analizadas presentaron disminuciones significativas en los niveles de acumulación de la CMS con respecto a la planta silvestre (p , 0.01). Como se observa en la figura 14 panel D, las líneas AD1 AD3 y AD4 acumularon a la CMS en un 77, 70 y 39% respectivamente, con respecto al 100% del control.

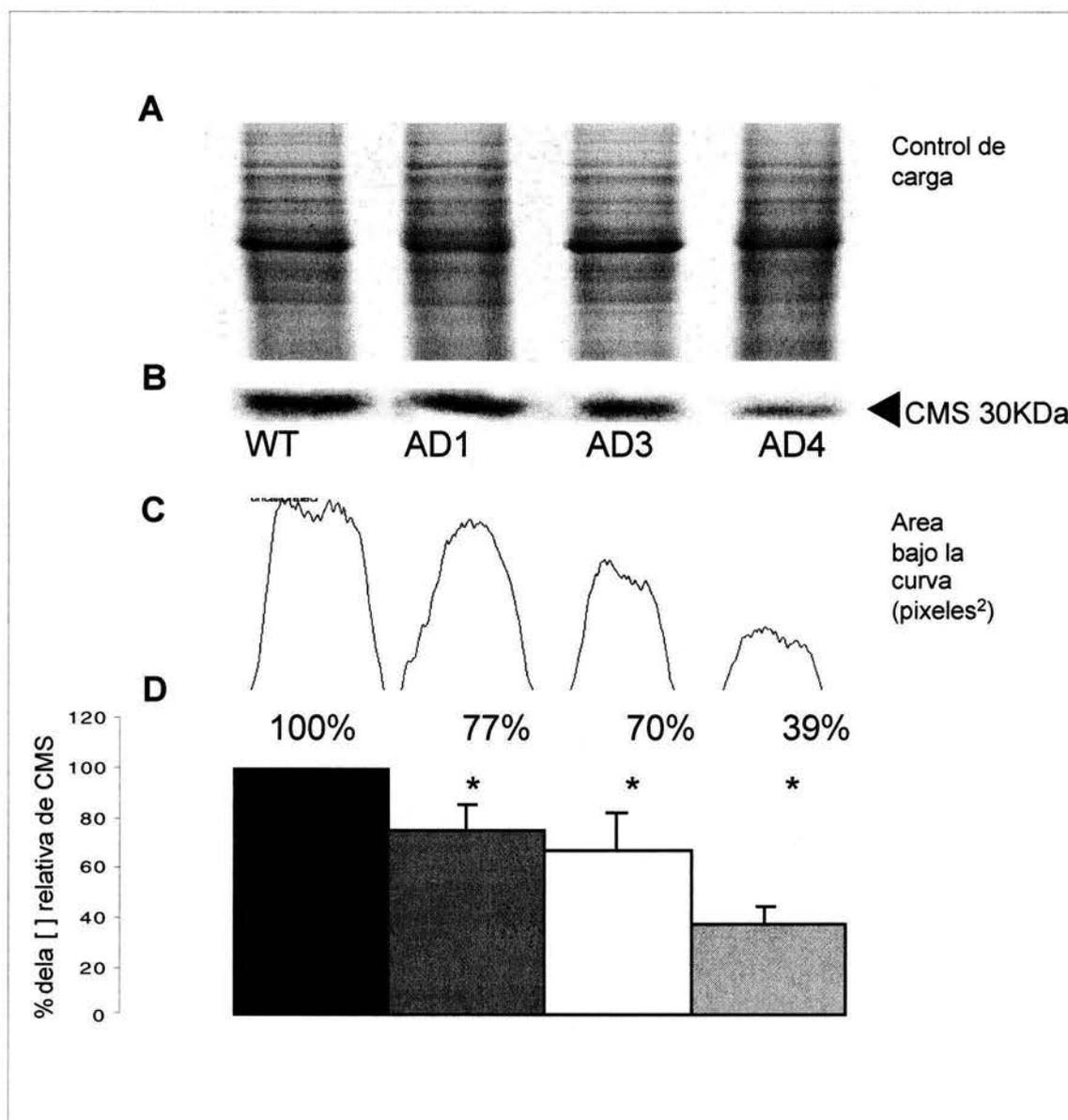


Figura 14. Expresión de la CMS en plantas transgénicas sub expresoras (AD1, AD3 y AD4) y en plantas silvestres (Wt) de *A. thaliana*. A, patrón electroforético de proteínas totales de las líneas indicadas, 10 μ g de proteína total por carril. B, ensayo de inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales contra la CMS, hecho sobre las muestras antes referidas. C, análisis densitométrico representativo de la acumulación de la CMS en dichas muestras. D, gráfica del porcentaje relativo de acumulación de la proteína CMS en 3 experimentos independientes. Las barras representan la desviación estándar y el asterisco (*) indica las diferencias significativas ($p=0.01$).

Por su parte las 3 líneas homocigas sobre expresas de *ISPE* presentaron aumentos significativos en los niveles de acumulación de la CMK con respecto a las plantas control ($p= 0.006$). En la Figura 15 panel D se esquematizan los porcentajes relativos de concentración de la enzima CMK en las líneas SE1, SE2 y SE4 que corresponden respectivamente al 195, 280 y 165% .

Por su parte, las líneas heterocigas antisentido de *ISPE* también presentaron cambios significativos ($p= 0.014$) en los niveles de acumulación de la CMK con respecto a la silvestre. En la Figura 16 panel D se muestra la expresión de la CMK. Se encontró que las líneas AE1, AE2 y AE3 acumularon el 85, 75 y 55% respectivamente al ser comparadas con el 100% del control.

Una vez que corroboramos que las líneas transgénicas que seleccionamos tuvieran un incremento o una disminución significativos en los niveles de acumulación de la CMS o la CMK con respecto a las plantas silvestres, se analizó si existía una correlación entre dichos cambios y la producción de algunos isoprenoides plastídicos.

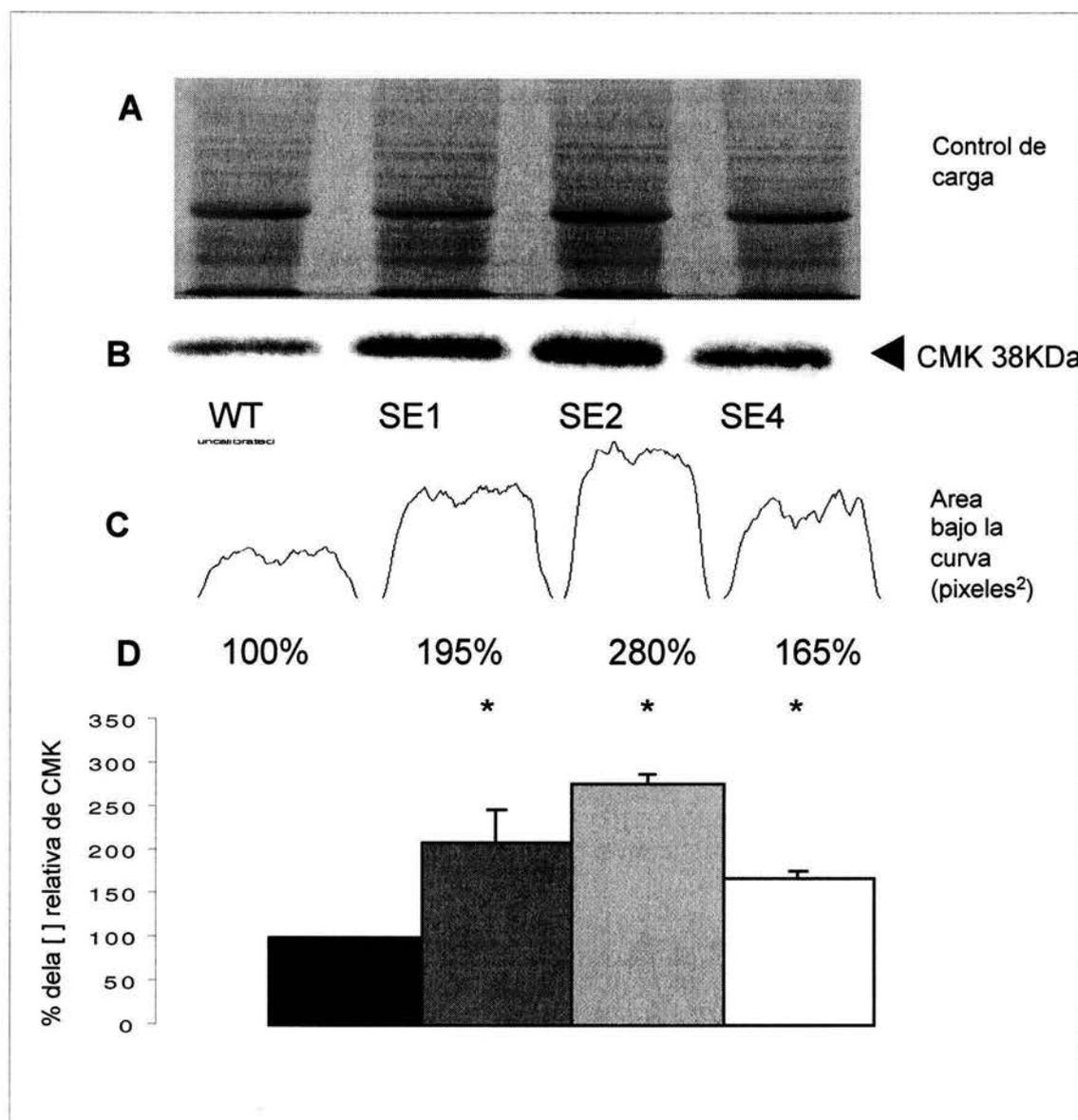


Figura 15. Expresión de la CMK en plantas transgénicas sobre expresas (SE1, SE2 y SE4) y en plantas silvestres (Wt) de *A. thaliana*. A, patrón electroforético de proteínas totales de las líneas indicadas, 10 μ g de proteína total por carril. B, ensayo de inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales contra la CMK, hecho sobre las muestras antes referidas. C, análisis densitométrico representativo de la acumulación de la CMK en dichas muestras. D, gráfica del porcentaje relativo de acumulación de la proteína CMK en 3 experimentos independientes. Las barras representan la desviación estándar y el asterisco (*) indica las diferencias significativas ($p=0.006$).

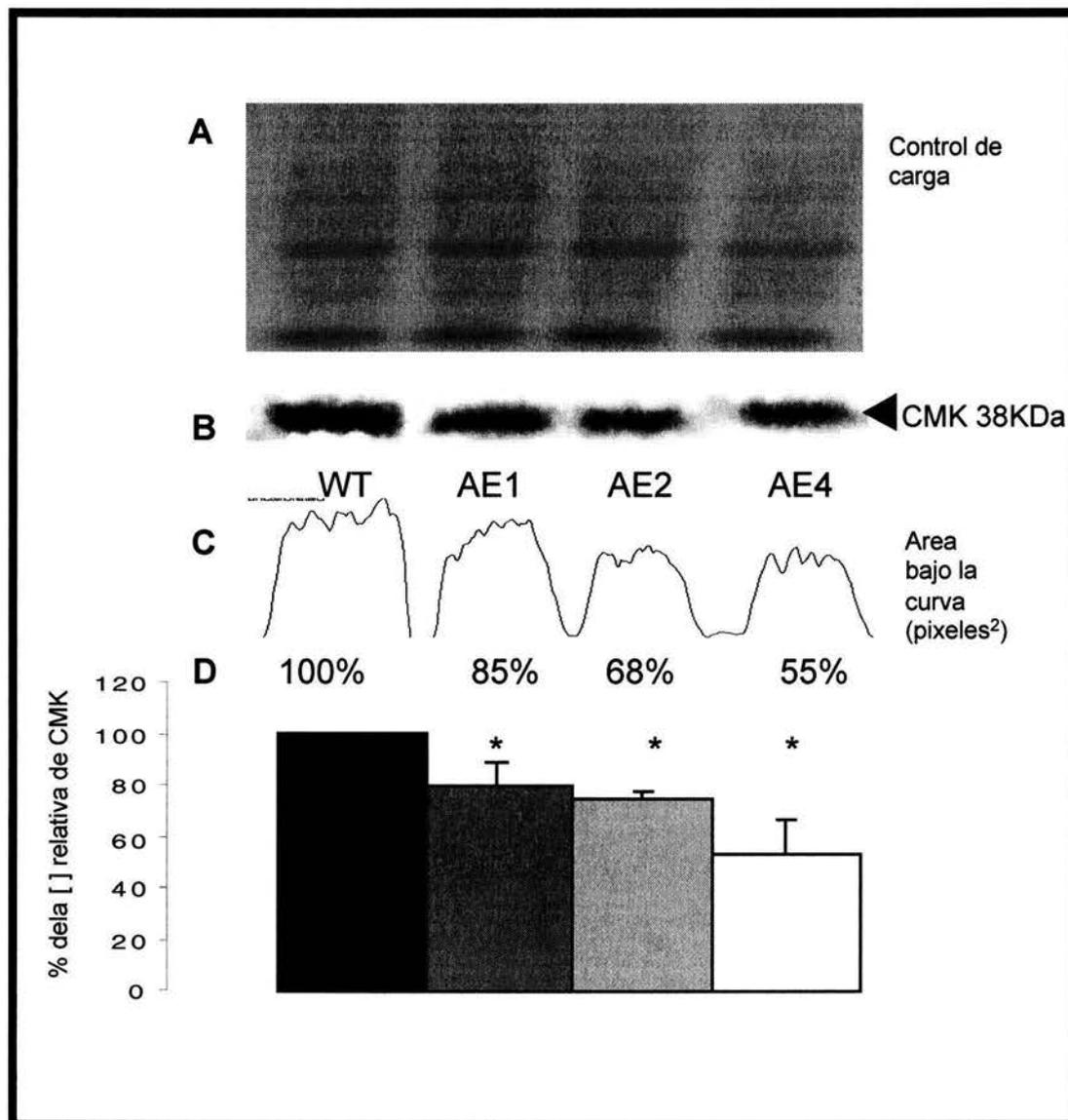


Figura 16. Expresión de la CMK en plantas transgénicas sub expresoras (AE1, AE2 y AE4) y en plantas silvestres (Wt) de *A. thaliana*. A, patrón electroforético de proteínas totales de las líneas indicadas, 10 μ g de proteína total por carril. B, ensayo de inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales contra la CMK, hecho sobre las muestras antes referidas. C, análisis densitométrico representativo de la acumulación de la CMK en dichas muestras. D, gráfica del porcentaje relativo de acumulación de la proteína CMK en 3 experimentos independientes. Las barras representan la desviación estándar y el asterisco (*) indica las diferencias significativas ($p= 0.014$).

Cuantificación de isoprenoides plastídicos en plantas sobre y sub expresoras de la proteína CMS o la proteína CMK.

Con la intención de definir si la CMS y la CMK son enzimas limitantes, co-limitantes o no limitantes en la vía MEP en *A. thaliana*, analizamos las cantidades de 2 productos finales de origen isoprenoide en las plantas transgénicas con niveles alterados de una u otra enzima. Las clorofilas y los carotenoides fueron los pigmentos fotosintéticos seleccionados para este trabajo tanto por su abundancia en los tejidos vegetales como por su facilidad y reproducibilidad de cuantificación. Estos se extrajeron a partir del tejido fresco de plántulas de 15 días correspondientes a las líneas de la generación (T3). La cuantificación de los dos pigmentos que arrojó el espectrofotómetro fue analizada por el método reportado por Vázquez y Greppin; y Mackinney (ver material y métodos). Cabe señalar que inicialmente se midieron por separado las clorofilas a y las clorofilas b de todas las muestras; sin embargo los resultados de una y otra no mostraron diferencias significativas, por lo que se prefirió englobar ambos resultados y reportar únicamente clorofilas totales. Para cada una de las cuantificaciones se llevaron a cabo un mínimo de 3 experimentos independientes.

Efecto de la manipulación de la expresión de la CMS en el contenido de clorofilas totales.

El contenido de clorofilas totales en las plantas que sobre expresan a la CMS (SD2, SD4, SD5 y SD6), como se ve en la figura 17, no fue significativamente distinto del presentado por la planta silvestre (p , 0.09). De la misma forma, las plantas que tienen suprimida la expresión de la CMS (AD1, AD2 y AD4) mostraron que su acumulación de clorofilas totales no está afectada con respecto al control (p , 0.12).

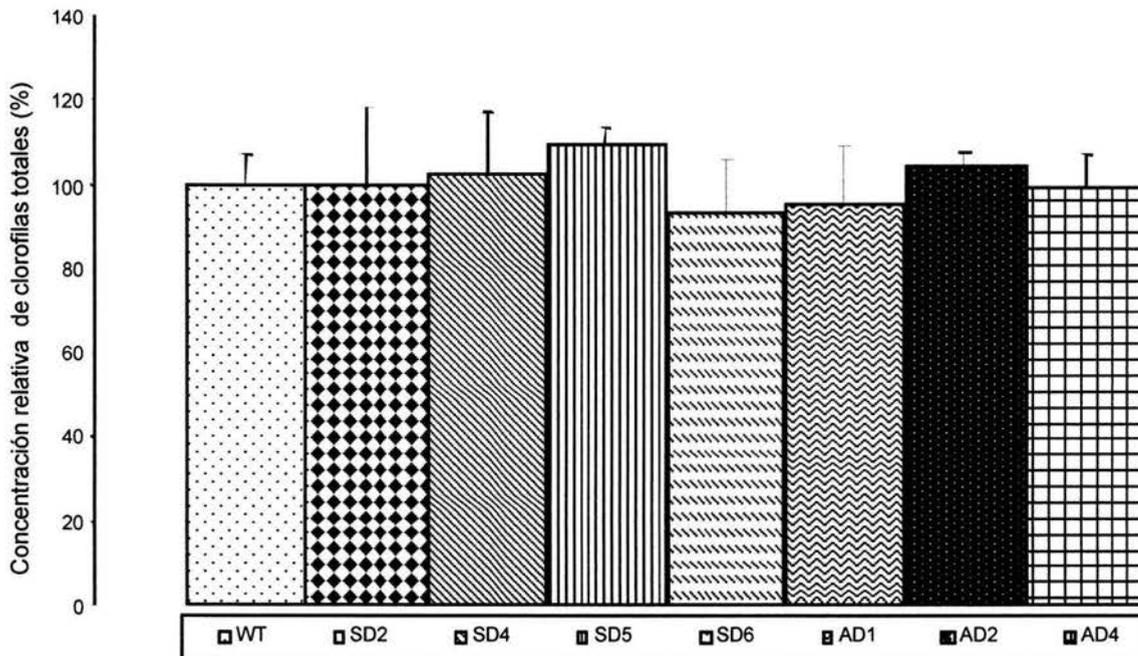


Figura 17. Clorofilas totales de plántulas de 15 días. Cada columna representa el promedio de tres experimentos independientes en porcentaje con respecto al control considerado como el 100% de concentración relativa de clorofila. Las barras representan la desviación estándar. SD2, SD4, SD5, SD6 (líneas transgénicas sobre expresoras de la CMS, homocigas). AD1, AD2, AD4 (líneas transgénicas sub expresoras de la CMS, heterocigas). WT (plantas silvestres) .

Efecto de la manipulación de la expresión de la CMS en el contenido de carotenoides totales.

La cantidad de carotenoides que se acumuló en el tejido de las plántulas correspondientes a líneas sobre expresoras de la CMS (SD2, SD4, SD5 y SD6) tampoco presentó diferencias significativas con los niveles acumulados en la planta silvestre (p , 0.2). Las líneas con un decremento en los niveles de la CMS (AD1, AD2 y AD4) también mostraron niveles similares de carotenoides que las plantas control (p , 0.2) (Figura 18).

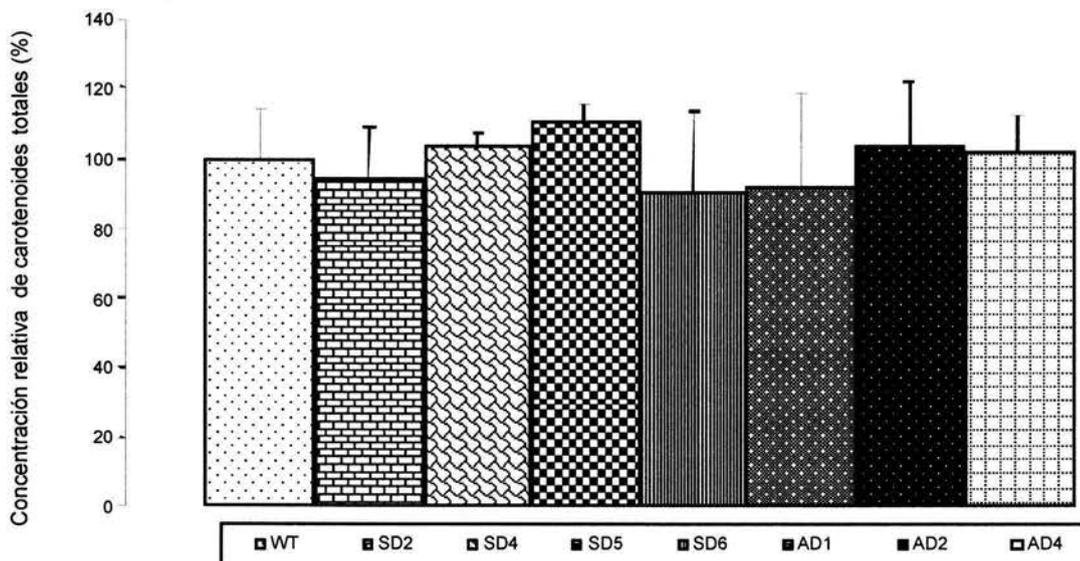


Figura 18. Carotenoides totales de plántulas de 15 días. Cada columna representa el promedio de tres experimentos independientes en porcentaje con respecto al control considerado como el 100% de concentración relativa de carotenoides. Las barras representan la desviación estándar. SD2, SD4, SD5, SD6 (líneas transgénicas sobre expresoras de la CMS, homocigas). AD1, AD2, AD4 (líneas transgénicas sub expresoras de la CMS, heterocigas). WT (plantas silvestres) .

Efecto de la manipulación de la expresión de la CMK en el contenido de clorofilas totales.

En cuanto a las líneas que presentan sobre expresión de la enzima CMK, no se detectaron un cambio significativo ($p, 0.1$) en su producción de clorofilas totales, lo cual también es cierto para las plantas que tienen disminuida la expresión de la CMK, las cuales no mostraron cambios en la acumulación de clorofilas totales con respecto al control ($p, 0.2$) (Figura 19).

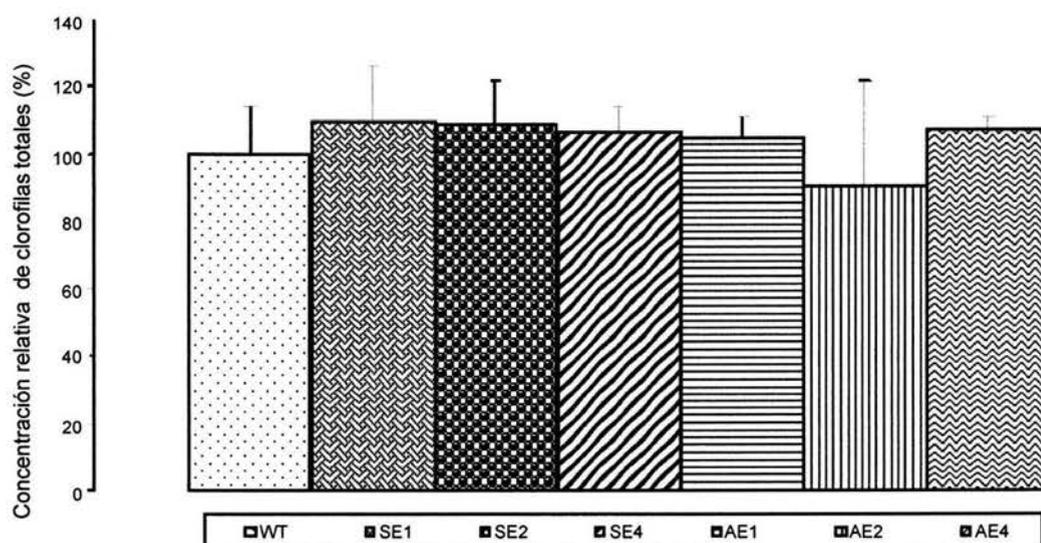


Figura 19. Clorofilas totales de plántulas de 15 días. Cada columna representa el promedio de tres experimentos independientes en porcentaje con respecto al control considerado como el 100% de concentración relativa de clorofila. Las barras representan la desviación estándar. SE1, SE2, SE4 (líneas transgénicas sobre expresoras de la CMK, homócigas). AE1, AE2, AD4 (líneas transgénicas sub expresoras de la CMK, heterócigas). WT (plantas silvestres).

Efecto de la manipulación de la expresión de la CMK en el contenido de carotenoides totales.

La cuantificación de carotenoides realizada sobre el tejido de plántulas correspondientes a líneas sobre expresas de la CMK (SE1, SE2 y SE4), mostró que no hay diferencias significativas entre la acumulación de carotenoides que dichas líneas presentan y la de la planta silvestre (p , 0.9). Finalmente las líneas con niveles de la CMS disminuidos (AE1, AE2 y AE4) mostraron cantidades similares de carotenoides que las plantas control que determinaron que no existen diferencias significativas entre ellas (p , 0.8) (Figura 20).

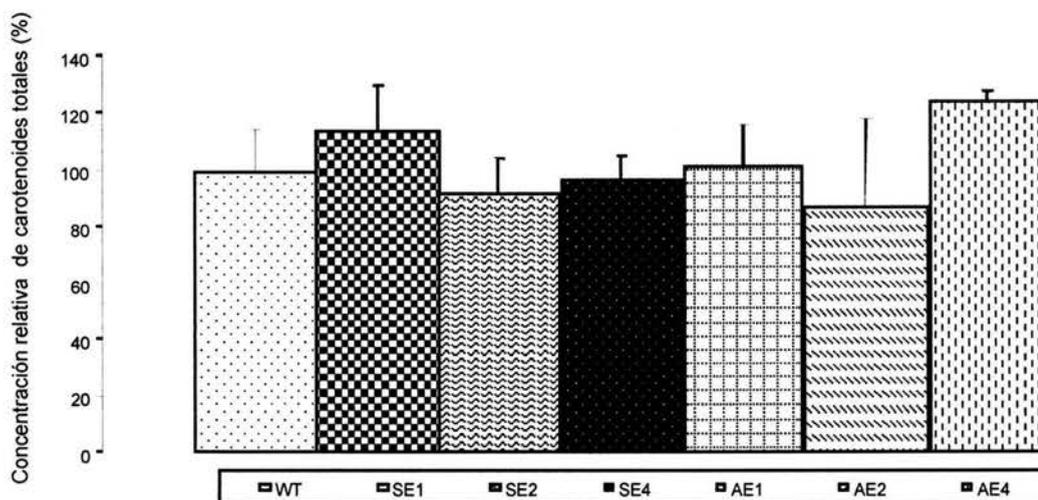


Figura 20. Carotenoides totales de plántulas de 15 días. Cada columna representa el promedio de tres experimentos independientes en porcentaje con respecto al control considerado como el 100% de concentración relativa de carotenoides. Las barras representan la desviación estándar. SE1, SE2 y SE4 (líneas transgénicas sobre expresas de la CMK, homocigas). AE1, AE2, y AE5 (líneas transgénicas sub expresas de la CMK, heterocigas). WT (plantas silvestres) .

En resumen, de los resultados presentados podemos concluir que: las plantas transgénicas con niveles incrementados o reducidos tanto de la CMS como de la CMK no presentan cambios significativos en las cantidades correspondientes a clorofilas y carotenoides con respecto a las que se observan en la planta silvestre. De tal manera, que en base al modelo propuesto por Furbunk y Taylor (Furbunk y Taylor, 1995), la CMS y la CMK tienen el comportamiento de enzimas no limitantes de la vía MEP, por lo menos bajo las condiciones analizadas.

DISCUSION.

El IPP y su isómero DMAPP, sintetizados a través de las vías Mevalónica y MEP, son los precursores universales de todos los isoprenoides producidos por los seres vivos. Por lo esenciales y versátiles que son los isoprenoides en todos los organismos, resulta muy importante el estudio de las dos rutas de biosíntesis de sus sustratos iniciales.

La caracterización de la vías metabólicas Mevalónica y MEP se ha enfocado tanto en la identificación de los pasos enzimáticos que conducen a la formación del IPP y del DMAPP, como al conocimiento de los pasos limitantes en la síntesis de estos compuestos. Adicionalmente, resulta de gran relevancia conocer cómo se regulan los niveles y los patrones de expresión de las proteínas participantes en una ruta metabólica, puesto que aportan datos importantes sobre el desempeño fisiológico de las enzimas examinadas.

La ruta Mevalónica, descubierta desde los años 50s, ha sido ampliamente estudiada; la ruta MEP, aunque fue descubierta la década pasada, ha sido rápidamente elucidada. Gracias a las innovaciones tecnológicas en las áreas de la química orgánica, la genética, la bioquímica, la biología molecular y la bioinformática, actualmente se conocen los 7 genes y las 7 enzimas implicados en esta vía. Los estudios que han permitido la caracterización de la vía MEP, inicialmente se hicieron usando a *E. coli* como modelo de estudio; sin embargo, la creciente disponibilidad de los genomas completos de un mayor número de especies, ha permitido ampliar el conocimiento sobre esta ruta mediante la identificación de los genes y las enzimas ortólogos en otros organismos además de *E. coli* (Boronat, 2003).

Sin embargo, el conocimiento de la vía MEP es aún incipiente en muchos sentidos. Con la finalidad de ampliarlo, en nuestro laboratorio se tiene el objetivo de analizar la participación de las enzimas de la vía MEP en plantas utilizando a *A. thaliana* como modelo de estudio.

Nuestro grupo ha examinado las 7 proteínas que conforman la ruta MEP abordándolas desde distintos puntos de vista. Por ejemplo, se han estudiado los patrones de expresión a nivel espacial y temporal de la proteína DXS, que es la primer enzima de la ruta MEP. Respecto a esta enzima, se encontró que se acumula preferencialmente en

los tejidos jóvenes que en los adultos, así como en las edades mas tempranas que se estudiaron en el rango de 8 a 28 días (Estévez et al., 2000). El transcrito de la DXS mostró patrones muy similares a los presentados por su proteína.

En este trabajo se realizó un análisis de los patrones de expresión de la CMS y la CMK, durante el desarrollo y en diferentes tejidos de *A. thaliana*. Este es el primer reporte que contempla el análisis de los patrones de expresión a nivel tisular y durante el desarrollo de esta planta de las enzimas que corresponden al tercer y cuarto paso de la ruta MEP. La expresión espacial de la CMS reveló que las silicuas y las flores, analizados en este trabajo, contienen niveles menores (aproximadamente del 30%) de esta proteína con respecto a los tejidos altamente fotosintéticos como el tallo, las hojas rosetas y las hojas caulinas, en los que la acumulación de la CMS fue muy similar. En este trabajo el nivel de expresión de esta proteína en el tallo fue considerado arbitrariamente como el 100% de acumulación. Adicionalmente, el análisis de expresión de la CMK, reveló un patrón de espacial muy parecido al de la CMS, es decir, los tejidos verdes presentan una abundancia de la proteína CMK significativamente mayor a la encontrada tanto en las flores como en las silicuas.

Anteriormente a este trabajo, otro grupo de investigación reportó el patrón de expresión espacial del transcrito *ISPD* correspondiente a la proteína CMS en *A. thaliana* (Okada et al., 2002). Dicho patrón de expresión mostró que el mensajero esta enriquecido en las flores, los tallos y las hojas, esto no correlacionó con el patrón de expresión de la CMS obtenido en nuestro trabajo; dónde se observó que la acumulación de la proteína es mayor en los tejidos fotosintéticos que en las flores y las silicuas. Esto sugiere la participación de mecanismos postranscripcionales y/o postraduccionales, que por ejemplo, regularan la acumulación del mensajero o de la proteína mediante una degradación diferencial tejido específica.

A diferencia del patrón reportado para la DXS, en donde en el estadio temprano, la DXS se encuentra enriquecida y disminuye sus niveles en edades mas tardías, las enzimas CMS y CMK mostraron una acumulación homogénea en todas las muestras de las edades analizadas. El hecho de que la CMS y la CMK presenten patrones

espaciales y temporales comunes y reproducibles, sugiere una expresión coordinada entre ambas proteínas.

Otra de las estrategias experimentales usadas en nuestro grupo consistió en manipular los niveles de acumulación de las enzimas de la vía MEP mediante genética reversa para hacer cambios en pasos enzimáticos específicos de la vía y monitorear si estas alteraciones provocan cambios en las cantidades de isoprenoides. Aunque la vía MEP finaliza en la síntesis del IPP y del DMAPP plastídicos, se sabe que la medición de ambos precursores resulta experimentalmente difícil. Una manera indirecta pero eficaz de estimar la producción del IPP y de su isómero es la cuantificación de la abundancia de los isoprenoides. Su medición, además de ser técnicamente más fácil, es un indicador bastante confiable, ya que un incremento de un isoprenoide específico requiere de un aumento simultáneo en la producción del IPP y del DMAPP. De igual forma, la disminución en la acumulación de algún isoprenoide plastídico, apunta a una disminución en la tasa de producción general de ambos precursores. Además, conocer el impacto de las modificaciones en el flujo de la vía MEP en los isoprenoides es de suma importancia, en virtud de la gran relevancia industrial y económica que por su potencial biotecnológico tienen este tipo de productos. Los experimentos realizados en este trabajo pretendieron monitorear la correlación entre el aumento o disminución de los niveles de las enzimas CMS y CMK y la consecuente acumulación de las clorofilas y los carotenoides totales. Es necesario hacer notar que este proyecto de maestría es el primero en abordar mediante esta metodología a las enzimas CMS y CMK en *A. thaliana*.

Como una caracterización inicial, se hizo una descripción del fenotipo de las plantas transgénicas que contenían niveles alterados de la CMS o la CMK, con respecto al de las plantas control para evaluar los posibles efectos de la alteración dichas enzimas. Se observó que las plantas transgénicas sobre expresas de la CMS y de la CMK presentaron fenotipos semejantes a los de las plantas silvestres. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Estévez y colaboradores sobre el fenotipo de las plantas sobre expresas de la primera enzima de la vía MEP (Estévez et al., 2001). Aunque las plantas sobre expresas de la DXS presentaron aumentos significativos en la abundancia de sus productos isoprenoides, tales como pigmentos fotosintéticos y

fitohormonas, esto no se vió reflejado en el fenotipo de las plantas, ni siquiera en su estado homócigo (Estévez et al., 2001). Estos datos sugirieron que tener un aumento en la acumulación de isoprenoides no afecta de manera dramática el fenotipo de la planta. En el caso de las plantas sobre expresas de la CMS y de la CMK, incluso en el estado homócigo del transgene, tampoco se encontraron diferencias fenotípicas con las plantas silvestres. El antecedente de la DXS, sugirió la posibilidad de que los niveles de las clorofilas y los carotenoides podrían estar aumentados en las plantas sobre expresas de la CMS o de la CMK. Por su parte, los individuos de la generación T1, provenientes de las plantas transformadas con las versiones antisentido de los genes *ISPD* e *ISPE*, presentaron una diversidad de fenotipos; desde un fenotipo igual al de la planta silvestre, hasta fenotipos con notorias disminuciones en su pigmentación y talla. Estas características sugirieron fuertemente una disminución significativa en las enzimas correspondientes. Consecuentemente se seleccionaron de la generación T1 varios individuos con fenotipos amarillos y verdes pálido, pues estos eran los mejores candidatos a individuos con afectación en los niveles de las enzimas 3 o 4 de la vía MEP, las cuales sobrevivieron en su mayoría hasta la generación T2. Esta es una diferencia notable con respecto al trabajo con la enzima DXS, ya que en este caso los transgénicos que mostraron fenotipos pálidos de la generación T1, no sobrevivieron hasta la etapa reproductiva. Esta diferencia podría explicarse teniendo en cuenta el patrón de expresión temporal de las 3 enzimas. El hecho de que la abundancia de DXS es mucho mayor en etapas tempranas que en edades tardías, sugiere que esta enzima se requiere en grandes cantidades en los primeros estadios de desarrollo. Esto no es así para la CMS ni la CMK cuyo patrón de expresión apuntó a que estas enzimas no tienen una demanda mayor en algún estadio de desarrollo vegetativo en particular.

Es interesante mencionar que un trabajo realizado por otro grupo de investigación, en el que se generaron y analizaron plantas transgénicas versión antisentido correspondientes a *ISPD*, reportó que un 30% de la población en la primera generación transgénica fue albino e incapaz de llegar a la etapa reproductiva (Okada et al., 2002). En contraste, las plantas transgénicas versión antisentido de *ISPD* obtenidas en nuestro laboratorio no mostraron fenotipos tan drásticos, ni tampoco las plantas transgénicas versión antisentido de *ISPE* manifestaron fenotipos albinos. En su trabajo Okada y

colaboradores (Okada et al., 2002) hicieron una distinción entre los fenotipos con disminución de pigmentos en la generación T2; clasificando como severas a aquellas líneas con un contenido de clorofila total aproximado del 7% y de carotenoides del 14% en relación al 100% de acumulación en las plantas silvestres y como moderadas a las líneas que denotaron el 38% de clorofilas totales y el 53% carotenoides con respecto al contenido de las plantas silvestres. En este reporte la descendencia a partir de ambas clases de transgénicas, incluso en su estado homócigo, fue viable. Contrariamente a esto, nuestras líneas transgénicas disminuidas en pigmentos no lograron alcanzar la etapa reproductiva, o bien algunos tuvieron descendencia infértil y como consecuencia estas líneas se perdieron. Para resolver este problema, se decidió elegir individuos con un fenotipo menos severo, y de estas plantas si se logro conseguir progenie T3. Estas observaciones fueron interpretadas como que existe un nivel mínimo de expresión para los genes *ISPD* e *ISPE*, debajo del cual, el estado homócigo resulta letal.

El criterio que se ha utilizado en nuestro laboratorio para definir el papel de las enzimas de la vía MEP, como se mencionó anteriormente, ha sido el propuesto por Furbunk y Taylor (Furbunk y Taylor, 1995). En un trabajo previo de nuestro laboratorio, se manipularon las cantidades de la DXS en *A. thaliana*. Las plantas generación T3 (homócigas) de DXS mostraron un máximo del 172% y un mínimo del 38% de acumulación de la enzima, estos cambios a su vez provocaron modificaciones significativas (máximas y mínimas) en las cantidades de isoprenoides como: clorofilas totales 65 y 142%, tocoferoles 43 y 215%, carotenoides 75 y 131% y ácido abscísico 44 y 397%. Basados en esos resultados se concluyó que la DXS tiene el comportamiento de una enzima limitante en la vía MEP, ya que tanto los aumentos como las disminuciones en los niveles de la proteína tuvieron un efecto significativo en el contenido de productos finales. Sin embargo, ya que la relación entre los cambios de la enzima y los cambios de los productos finales no es lineal, se concluyó que la DXS tiene el perfil de una enzima co-limitante. Bajo el supuesto de que la existencia de enzimas limitantes adicionales en la vía MEP puede explicar las diferencias no lineales observadas, se sustentó el planteamiento del presente trabajo. Sin embargo, no hay que perder de vista, que la causa de que la cantidad de isoprenoides no sea

directamente proporcional a la cantidad de enzima, también puede implicar a enzimas involucradas en los pasos biosintéticos posteriores a la formación del IPP y su isómero. En las plantas generadas en este trabajo, el nivel de acumulación mas bajo para la CMS fue de 39% y el mas alto de 190%. Para el caso de la CMK el nivel mas bajo fue de 55% y el nivel mas alto fue de 280%. Las alteraciones conseguidas en los niveles enzimáticos de la CMS y la CMK en nuestras plantas transgénicas, fueron similares o incluso mayores, a los alcanzados para la DXS. Teniendo en cuenta lo anterior, el hecho de que no se hayan detectado cambios significativos en la abundancia de ninguno de los dos isoprenoides cuantificados permite concluir que la CMS y la CMK son enzimas no limitantes para la producción de clorofilas y carotenoides por lo menos bajo las condiciones experimentales analizadas.

Hay que enfatizar que en el análisis hecho con líneas transgénicas de la DXS, las clorofilas y los carotenoides fueron los productos finales que tuvieron los cambios más restringidos de todos los isoprenoides que se probaron. Es importante resaltar, que si bien ninguno de los dos pigmentos isoprenoides cuantificados en el presente trabajo tuvo cambios significativos, los niveles de otros isoprenoides si podrían estar alterados. En particular resultaría interesante cuantificar los niveles del ABA, ya que en el caso de la DXS, los mayores cambios registrados, fueron los de la abundancia de esta hormona. Con el conocimiento de que el ABA está implicado en la germinación de semillas, haciéndola lenta cuando se encuentra en grandes concentraciones, y rápida cuando su acumulación es pobre; en el laboratorio se realizó un ensayo preliminar de germinación sobre las semillas transgénicas de la CMS y de la CMK. Los resultados mostraron que las plantas sobre expresas tanto de la CMS y como de la CMK germinaron mas lentamente que las plantas silvestres. Así mismo las semillas sub expresas de ambas enzimas presentaron una germinación mas rápida que las plantas control (Comunicación personal Ana Lilia Arroyo). Lo anterior, es un indicio de que los niveles de ABA si podrían estar afectados debido a los cambios producidos en la abundancia de las enzimas 3 y 4 de la vía MEP. Este resultado preliminar deberá corroborarse en futuros estudios que representan perspectivas del presente trabajo.

Además es necesario hacer notar para el caso de la DXR, que mientras ha sido reportada como enzima no limitante de la vía MEP en *E. coli* y en *A. thaliana* (Miller et

al., 2000; Rodríguez-Concepción et al., 2001), también ha sido propuesta como enzima limitante en la planta de menta (Mahmoud and Croteau, 2001). Estos resultados, apuntan a que la DXR u otras enzimas de la ruta MEP, como los son la CMS y la CMK, podrían tener identidad de enzimas limitantes, co-limitantes o no limitantes dependiendo de la especie, el tejido o el estado de desarrollo donde sean analizadas (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002). Futuros estudios deben abundar sobre en estas observaciones.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

Las conclusiones de este trabajo de maestría son:

- * Los niveles de CMS y CMK se regulan de manera diferencial en distintos tejidos de *A. thaliana*, acumulándose en menor cantidad en primordios florales y silicuas. La mayor acumulación de ambas proteínas se observó en tejidos fotosintéticos.
- * Los niveles de las dos enzimas estudiadas se mantienen constantes a través del desarrollo vegetativo.
- * Se obtuvieron líneas transgénicas de *A. thaliana* homocigas con niveles aumentados de las enzimas CMS y CMK. La sobreexpresión de estas enzimas no generó un fenotipo diferente al silvestre bajo condiciones estándar de crecimiento.
- * Se obtuvieron líneas transgénicas de *A. thaliana* con niveles disminuidos de las enzimas CMS y CMK solo en estado heterocigo dado que la condición homociga fue letal, confirmando que las proteínas estudiadas son indispensables para el crecimiento normal de las plantas.
- * Las alteraciones en los niveles de acumulación de la CMS y la CMK no se reflejaron en la abundancia de clorofilas y carotenoides totales. Bajo las condiciones experimentales analizadas puede decirse que estas dos proteínas representan enzimas no limitantes para la producción de dichos isoprenoides por la vía MEP.

Adicionalmente al análisis hecho en este trabajo sobre la CMS y la CMK, vale la pena evaluar en nuestras líneas transgénicas:

Si existen alteraciones en las semillas durante la germinación o en otras etapas.

Si se presentan efectos relativos en el cambio de niveles de otras enzimas de la misma ruta, etc.

La expresión de la CMS y la CMK en distintos tejidos, bajo diferentes condiciones de crecimiento (luz, estrés, etc) y en otras edades.

La acumulación clorofilas y carotenoides en diferentes condiciones de crecimiento y distintos tejidos, así como de otros productos finales de la vía MEP.

El resultado de obtener dobles transgénicas (*ISPD* e *ISPE*) para posteriores análisis de la regulación de la vía.

El potencial biotecnológico del incremento y el decremento de las enzimas de la ruta MEP.

APENDICE (BIOINFORMATICA)

Interacciones funcionales entre proteínas.

El enfoque clásico que se le daba al concepto de "función de una proteína" consistía en asignar una actividad concreta a una molécula protéica individual. Actualmente, la manera de ver la "función de una proteína" se ha ampliado y ya no está restringido a una "función molecular" exclusiva, sino que se considera mas apropiado analizarla dentro de una "función contextual", que englobe las interacciones funcionales que dicha proteína tenga con otras moléculas (Figura 21) (Eisemberg et al., 2000). Los estudios hechos a las 7 enzimas implicadas en la vía MEP, han permitido otorgares una función particular a cada una de ellas; sin embargo, a la fecha, no se ha reportado información sobre las posibles interacciones funcionales que DXS, DXR, CMS, CMK, MECS, HDS e IDS pudieran tener con otras proteínas.

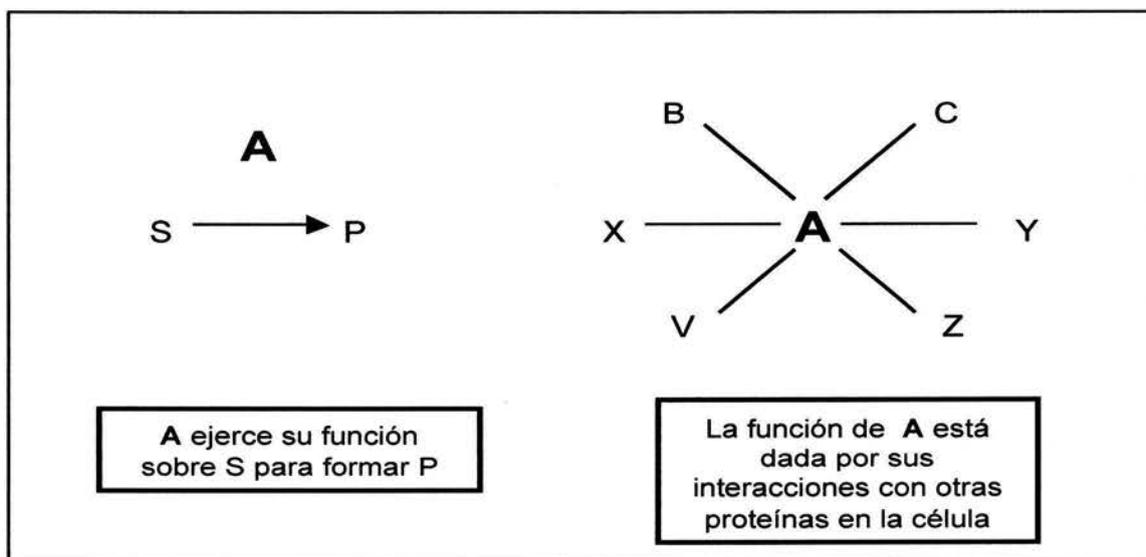


Figura 21. La evolución del concepto de "función de una proteína". El punto de vista clasico esta islustrado a la izquierda y un concepto mas reciente se muestra a la derecha (tomada de Eisemberg et al., 2000).

Evaluación de vínculos funcionales entre proteínas.

Las interacciones funcionales entre proteínas usualmente se han estimado mediante homología de secuencia de aminoácidos, pues a las secuencias compartidas se les asigna de manera común, una misma función (Tatusov et al., 2000) También el análisis de perfiles filogenéticos, de los genes adyacentes conservados y de los patrones de expresión permiten predecir muchas interacciones funcionales entre proteínas. El método del perfil filogenético describe un patrón en cuanto a presencia o ausencia de una proteína particular a través de varios genomas lo suficientemente distanciados. Si dos proteínas tienen el mismo perfil en los genomas analizados, se infiere que ambas proteínas tienen una alta probabilidad de estar vinculadas funcionalmente dentro de una misma ruta o complejo (Eisenberg y cols., 2000). De hecho, este método fue crucial para descubrir a los genes de la vía MEP.

Otra manera de buscar vínculos funcionales es el método del gen vecino, que se basa en la posición de los genes en los cromosomas (Figura 22). En procariontas, suele asumirse que los genes relacionados funcionalmente están circunscritos a un mismo operón, por lo son vecinos. Además, muchos de los genes adyacentes aunque se insinúen funcionalmente irrelevantes, con un análisis detallado, pueden mostrar nuevas conexiones funcionales entre ellos (Galperin y Koonin, 2000). Sin embargo los genes procariontas relacionados no siempre se sitúan contiguamente.

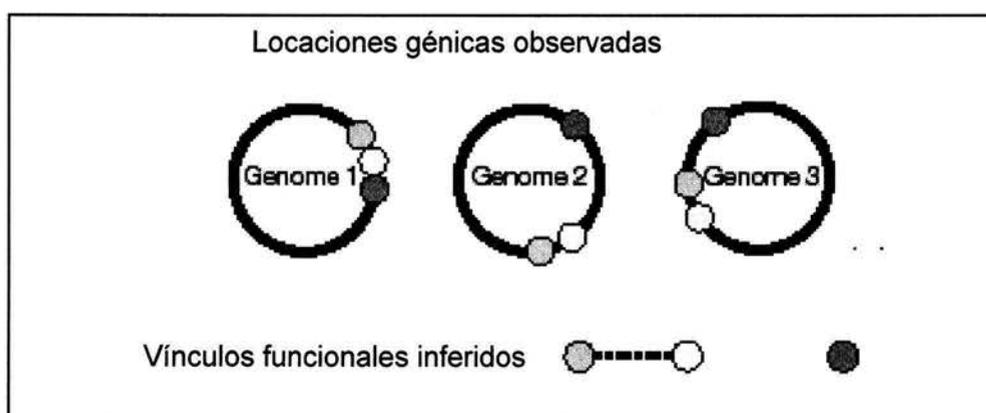


Figura 22. Si dos genes se encuentran adyacentes en distintos genomas, una relación funcional puede inferirse entre las proteínas que ambos codifican. Este método es válido principalmente en genomas procariontes. (Tomado de Eisenberg et al., 2000)

Análisis de vecindad génica.

Con el fundamento de que a partir de dos genes que se encuentran juntos, en varios genomas diferentes, puede inferirse que existe un vínculo funcional entre las proteínas que codifican, y sabiendo que este método es mas indicado para genomas microbianos, realizamos una búsqueda entre los genomas procariotas de genes vecinos a *ispB*, *ispC*, *ispD*, *ispE*, *ispF*, *ispG* e *ispH* que estuvieran conservados al menos en 2 distintos linajes eubacterianos.

Para hacer mas eficiente esta búsqueda, se utilizó el número de grupo de proteínas ortólogas (COG) (Tatusov et al., 1997) de cada uno de los genes de la vía MEP. Con los números de COG indicados y utilizando el programa Gene Contex Tool (www.ibt.unam.mx) (Figura 23) encontramos la presencia de distintos COGs adyacentes en los 7 genes de la via MEP conservados en al menos 2 de los 12 linajes eubacteriales (Actinobacterias, Aquificales, Bacteroides, Clamidias, Clorobias, Cianobacterias, Deinococcus, Firmicutes, Fusobacterias, Proteobacterias, Espiroquetas y Termotogales) considerados para este análisis. Al hecho de que dos COGs estén representados en linajes distintos se le llama co-ocurrencia.

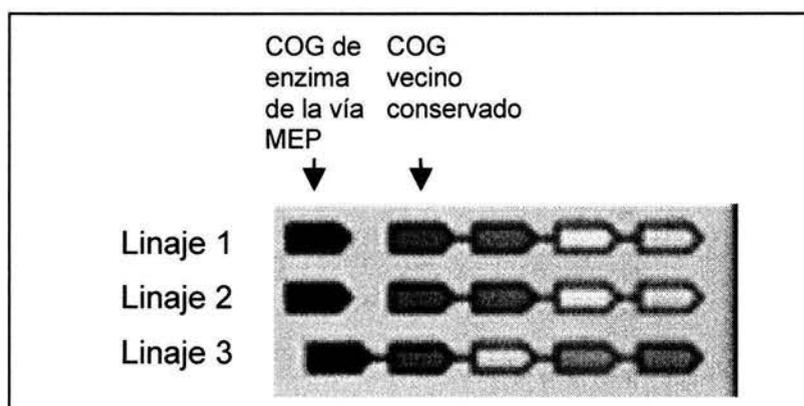


Figura 23. Análisis de vecindad génica utilizando COGs.

Teniendo la referencia de que la comparación entre la secuencia de genomas procariontes completos, ha mostrado que los operones durante la evolución presentan rearrreglos, y esto conlleva a tener poca conservación en el orden entre genes del mismo operón (Rogozin et al., 2002), se consideraron arbitrariamente como vecinos a los genes que aparecen hasta 3 posiciones por encima (up stream) y 3 posiciones por abajo (down stream) del gen de interés. Una vez encontrados los COGs vecinos conservados, resultó de mucho interés conocer su función. En algunos casos la función solamente es una predicción. El número de linajes donde se encuentran conservados y contiguos dos COGs, nos pareció como primera aproximación un buen indicador de interacción funcional, teniendo en cuenta que las proteínas vinculadas funcionalmente, suelen ser heredadas en conjunto (Koonin et al., 1998), pensando que mientras más alta fuera esta co-ocurrencia de dos genes vecinos, más vinculadas estarían las proteínas que codificadas.

Tabla 5. COGs de las enzimas de la vía MEP, COGs vecinos y número de linajes eubacteriales donde la vecindad se conserva.

COG/Enzimas vía MEP	COG vecino (+3, -3) / Función	Vecindad conservada
1154/ DXS (sintasa)	0142/ Geranilgeranil pirofosfato sintasa	3 linajes
	1570/ Subunidad de Exonucleasa	3 linajes
	1189/ RNA metilasa	3 linajes
	0061/ Azúcar cinasa	3 linajes
	1267/ Fosfatidil Glicerol sintasa	2 linajes
0743/DXR (reductoisomerasa)	0750/ Proteasa asoc. a membrana	10 linajes
	0575/ Diglicerido sintasa	7 linajes
	0233/ Factor reciclador ribosomal	6 linajes
	0020/ Undecaprenil pirofosfato sintasa	4 linajes
	0821/ HDS (sintasa, vía MEP)	3 linajes
1211/CMS (sintasa)	0245/ MCS (sintasa, vía MEP)	4 linajes
	1066/ Proteasa ATP dependiente	2 linajes
1947/CMK (cinasa)	2088/ Proteína de pared celular	3 linajes
	0030/ Biogénesis del ribosoma	3 linajes
	1121/ Proteína de transporte	2 linajes
	1825/ Proteína ribosomal	2 linajes
0245/ MCS (sintasa)	1211/ CMS (sintasa, vía MEP)	4 linajes
	0008/ tRNA sintetasa	2 linajes
0821/ HDS (sintasa)	0743/ DXR (reductoisomerasa, vía MEP)	3 linajes
	0442/ tRNA sintetasa	2 linajes
	1197/ Helicasa	2 linajes
0761/ IDS (reductasa)	0597/ Lipoproteína	2 linajes
	1570/ Subunidad de Exonucleasa VII	2 linajes

Estos resultados indican que el gen vecino a un gen de la vía MEP que se conserva en un mayor número de linajes es una proteasa asociada a membrana, seguida de una diglicerido sintasa, ni siquiera los COGs propios de la vía MEP presentaron una vecindad tan conservada a lo largo de los diferentes taxones eubacteriales. Esto sugiere que no hay una correlación clara entre la conservación filogenética de COGs vecinos y la asociación funcional entre ambos, puesto que incluso los COGs correspondientes a enzimas de la vía MEP (que están ampliamente relacionados funcionalmente) no parecen tener una vecindad co-ocurrente.

Por otra parte, aunque se sabía que la búsqueda en genomas procariotes de COGs vecinos a los COGs de enzimas de la vía MEP, restringiría la búsqueda a genomas eubacteriales (exceptuando a la enzima CMS que esta presente en una arqueobacteria por transferencia horizontal). Esto implicaría que los COGs hallados presentarían un perfil filogenético similar. Este perfil apuntaría a una mayor posibilidad de relación funcional, pero...¿y viceversa? ¿esta co-ocurrencia se mantendría si la búsqueda se realizara a partir de los COGs correspondientes a los genes "vecinos"? Los resultados que obtuvimos (Tabla 6), permitieron distinguir que la distribución de varios de los genes vecinos a los genes de la vía MEP en los genomas de procariotas no está necesariamente comprometida puesto que también están presentes en genomas arqueobacteriales. Los COGs que mantienen la misma distribución filogenética (señalados en gris) que los COGs de las enzimas MEP corresponden a sub unidades de exonucleasa, factor reciclador ribosomal, proteína ribosomal, helicasa y lipoproteína.

Tabla 6 .Presencia en genomas arqueobacteriales de los “COGs vecinos” a los COGs de las enzimas de la vía MEP.

COG/Enzimas vía MEP	COG vecino (+3, -3) / Función	Presencia en Arqueobacteria
1154/ DXS (sintasa)	0142/ Geranilgeranil pirofosfato sintasa	si
	1570/ Subunidad de Exonucleasa	no
	1189/ RNA metilasa	si
	0061/ Azúcar cinasa	si
	1267/ Fosfatidil Glicerol sintasa	si
0743/DXR (reductoisomerasa)	0750/ Proteasa asoc. a membrana	si
	0575/ Diglicerido sintasa	si
	0233/ Factor reciclador ribosomal	no
	0020/ Undecaprenil pirofosfato sintasa	si
	0821/ HDS (sintasa, vía MEP)	no
1211/CMS (sintasa)	0245/ MCS (sintasa, vía MEP)	no
	1066/ Proteasa ATP dependiente	si
1947/CMK (cinasa)	2088/ Proteína de pared celular	si
	0030/ Biogénesis del ribosoma	si
	1121/ Proteína de transporte	si
	1825/ Proteína ribosomal	no
0245/ MCS (sintasa)	1211/ CMS (sintasa, vía MEP)	si
	0008/ tRNA sintetasa	si
0821/ HDS (sintasa)	0743/ DXR (reductoisomerasa, vía MEP)	no
	0442/ tRNA sintetasa	si
	1197/ Helicasa	no
0761/ IDS (reductasa)	0597/ Lipoproteina	no
	1570/ Subunidad de Exonucleasa VII	no

Atendiendo a la premisa de si dos proteínas tienen un idéntico o muy similar patrón pueden adjudicarse a una misma ruta o complejo funcional (Eisenberg y cols., 2000), ¿Se pueden descartar posibilidades de vínculos funcionales si los COGs de la vía MEP tienen vecinos COGs promiscuos con quienes no comparten un claro perfil filogenético como se muestra en la tabla 6?

Operones

Los operones que particularmente codifican subunidades de complejos multiprotéicos, están muy conservados en genomas procariotas, incluso en taxones filogenéticamente distantes. De los genes de la vía MEP y de los genes

vecinos conservados encontrados en los análisis anteriores ¿Cuales están conservados dentro de operones? Utilizando el programa REGULON DB (www.cifn.unam.mx) hecho con el genoma de *E. coli* se encontraron los siguientes resultados (la parte sombreada indica los genes que correlacionan con la coocurrencia vecinal) :

- El gen que codifica para la DXS, esta localizado dentro del operón.

<i>XseB</i> Subunidad de la Exonucleasa VII	<i>IspA</i> Geranilgeranil pirofosfato sintasa	<i>Dxs</i> DXS sintasa	<i>yajO</i> Xilosa reductasa
--	---	----------------------------------	--

- El gen que codifica para la DXR, no está localizado dentro de operón.
- El gen que codifica para la CMS, está localizado dentro del mismo operón que MECS, en *E.coli* la nomenclatura para los genes respectivos es *ygbP* e *ygbB*.

<i>YgbO</i> MECS	<i>YgbB</i> Subunidad de PP hidrogenasa	<i>YgbP</i> CMS	<i>YgbQ</i> Proteína hipotética
----------------------------	--	---------------------------	--

- El gen *ychB* que codifica para CMK esta en el operón de *E.coli*

<i>YchB</i> CMK	<i>hemM</i> tRNA deshidrogenasa
---------------------------	--

- El gen *gcpE* que codifica para HDS, esta en un operón de *E. coli*

<i>gcpE</i> HDS	<i>yfgA</i> Proteína membranal
---------------------------	---

- El gen *LytB* que codifica para la enzima IDS está en el operón

<i>ribF</i> Flavocinasa	<i>lleS</i> tRNA sintasa	<i>IspA</i> peptidasa	<i>slpA</i> rotamasa	<i>LytB</i> IDS
-----------------------------------	------------------------------------	---------------------------------	--------------------------------	---------------------------

Además de que no todos los genes de la vía MEP, por lo menos para *E. coli*, están agrupados en operones, los genes junto con los que conforman una unidad transcripcional no aparecieron como COGs vecinos conservados. Debido a que este análisis no mostró una tendencia clara, convendría hacer un análisis que involucrara operones de varias especies.

Predicción de asociación funcional entre proteínas.

Aunque la vecindad génica es relevante para la vinculación funcional entre dos proteínas, existen otros factores de peso para predecir las interacciones funcionales. STRING (www.string.embl.de) es una base de datos tanto de proteínas conocidas como de proteínas hipotéticas, que predice interacciones proteína-proteína. Algunas de los elementos que utiliza STRING para predecir asociación funcional son la vecindad y la co-ocurrencia.

Con el COG designado para las proteínas conservadas en contigüedad a cada las enzimas de la vía MEP nos remitimos a la base de datos de STRING para averiguar si estaban predichas las asociaciones funcionales con los COGs de la vía MEP. El programa STRING arroja únicamente los resultados de las 10 predicciones mas probables. Dichas predicciones no correlacionaron con las que anteriormente obtuvimos del Gene Context Tool, como se muestra en la tabla 7. La explicación para la inexistencia de correlación esta dada, por lo menos en parte, por los criterios que utiliza STRING para sus predicciones, puesto que toma en cuenta publicaciones científicas que involucren pares de proteínas, bases de datos, experimentos, etc.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Tabla 7. Existencia de predicción funcional para los COGs de la vía MEP y los COGs vecinos encontrados con el programa Gene Context Tool.

COG/Enzimas vía MEP	COG vecino (+3, -3) / Función	Asociación funcional predicha (STRING) con proteínas de la vía MEP
1154/ DXS (sintasa)	0142/ Geranilgeranil pirofosfato sintasa	no
	1570/ Subunidad de Exonucleasa	no
	1189/ RNA metilasa	no
	0061/ Azúcar cinasa	no
	1267/ Fosfatidil Glicerol sintasa	no
0743/DXR (reductoisomerasa)	0750/ Proteasa asoc. a membrana	si
	0575/ Diglicerido sintasa	si
	0233/ Factor reciclador ribosomal	
	0020/ Undecaprenil pirofosfato sintasa	si
	0821/ HDS (sintasa, vía MEP)	si
1211/CMS (sintasa)	0245/ MCS (sintasa, vía MEP)	si
	1066/ Proteasa ATP dependiente	si
1947/CMK (cinasa)	2088/ Proteína de pared celular	no
	0030/ Biogénesis del ribosoma	no
	1121/ Proteína de transporte	no
	1825/ Proteína ribosomal	no
0245/ MCS (sintasa)	1211/ CMS (sintasa, vía MEP)	si
	0008/ tRNA sintetasa	no
0821/ HDS (sintasa)	0743/ DXR (reductoisomerasa, vía MEP)	si
	0442/ tRNA sintetasa	no
	1197/ Helicasa	no
0761/ IDS (reductasa)	0597/ Lipoproteína	no
	1570/ Subunidad de Exonucleasa VII	no

El análisis bioinformático realizado sobre las posibles relaciones funcionales que sostienen las enzimas de la vía MEP con otras proteínas en procariontes nos pareció de gran relevancia, puesto que (exceptuando a DXS) solamente se conoce que las proteínas de la ruta MEP participan en la síntesis de precursores de isoprenoides. Este apéndice fue sugerido durante la revisión de este trabajo. Es breve puesto que inicialmente no formaba parte del proyecto, pero resultó interesante tener en este trabajo un enfoque bioinformático no solamente de las enzimas CMS y CMK, sino de las 7 proteínas de la vía MEP. A partir de este apéndice surgen mas preguntas, sobre las que podrían surgir nuevas perspectivas de investigación para entender a la vía MEP desde un punto de vista más global.

REFERENCIAS.

Altincicek B., Kollas, A.K., Sanderbrand S., Wiesner J., Hintz M., Beck E. and Jomaa J. (2001a) GcpE is involved in the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 183, 2411-2416.

Altincicek, B. and Kollas, A.K. (2001b) *LytB*, a novel gene of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. FEBS 37-40.

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. Sep 30;94(20):10600-5.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Smith JA, Seidman JG, Struhl K (1989). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York.

Bach T. J. (1995) Some aspects of isoprenoid biosynthesis in plants. A review. Lipids 30, 191-202.

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.

Barkovich R. and Liao, J. C. (2001) Metabolic Engineering of isoprenoids. Metabolic Engineering. 3, 27-39.

Bick, J.A. and Lange, M. (2003) Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. Archives of Biochemistry and Biophysics 415 146–154.

Bloch K. (1992) Sterol molecule: structure, biosynthesis and function. Steroids 57, 378-382.

Bochar, D. A., Friesen, J. A., Stauffacher, C. V. and Rodwell, V. W. (1999) Comprehensive Natural Products. Chemistry, ed. Cane, D. (Pergamon, Oxford).

Boucher Y. and Doolittle W.F. (2000) The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways. Mol Microbiol. Aug;37(4):703-16.

Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248.

Brainthwaite G. D. y Goodwin, T. W. (2001) 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. *Trends Plant Sci.* Feb;6(2):78-84.

Campos N., Rodriguez-Concepcion M., Sauret-Gueto S., Gallego F., Lois L.M. and Boronat A. (2001) *Escherichia coli* engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate: a novel system for the genetic analysis of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. *Biochem J.* Jan 1;353:59-67.

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.

Chappell J. (2002) The genetics and molecular genetics of terpene and sterol origami. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 151–157.

Cunningham F.X. Jr, Lafond T.P. and Gantt E. (2000) Evidence of a role for *LytB* in the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J. Bacteriol.* Oct; 182(20): 5841-8.

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.

Duvold T., Cali P., Bravo J.M. and Rohmer M. (1997) Incorporation of 2-C-methyl-D-erythritol, a putative isoprenoid precursor in the mevalonate-independent pathway, into ubiquinone and menaquinone of *Escherichia coli*. *Tetrahedron Lett* 38: 6181–6184.

Eisenberg D., Marcotte M, Xenarios I, Yeates T. (2000) Protein function in the post-genomic era

Eisenreich W., Rohdich F. and Bacher A. (2001) Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends. Plant. Sci.* 6, 78-84.

Estévez J.M., Cantero A., Romero C., Kawaide H., Jimenez L.F., Kuzuyama T., Seto H., Kamiya and León 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.* Sep;124(1):95-104.

Estévez J.M., Cantero A., Reindl A., Reichler S. and León P. (2001) 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J Biol. Chem.* Jun 22;276(25):22901-9.

Flesch G. and Rohmer M. (1988) 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* Aug 1; 175 (2): 405-11.

Furbank R.T. and Taylor W.C. (1995) Regulation of Photosynthesis in C3 and C4 Plants: A Molecular Approach. *Plant Cell*. Jul;7(7):797-807.

Galperin M.Y. and Koonin E.V.(1999) Who's your neighbor? New computational approaches for functional genomics. *Nature Biotechnology* vol 18 june 2000 609.

Herz S., Wungsintaweekul J., Schuhr C. A., Hecht S., Luttmgen 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.

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*. *J. Biol. Chem.* 2002 Nov 22; 277(47): 45188-94.

Koonin E.V., Tatusov R.L. and Galperin M.Y. (1998) Beyond complete genomes: from sequence to structure and function. *Curr Opin Struct Biol*. Jun;8(3):355-63. Review.

Kuzuyama T. and Seto H. (2003) Diversity of the biosynthesis of the isoprene units. *Apr*; 20(2): 171-83. Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032.

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*. Jun 30; 275(26): 19928-32.

Kuzuyama T. (2002) Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. *Biosci Biotechnol Biochem*. Aug;66(8):1619-27. Review.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lange B. M., Rujan T., Martin W. and Croteau R. (2000) Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 24, 13172-13177.

Lawrence, J.G. (1999) Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. *Curr Opin Microbiol* 2: 519-523.

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.

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. Mar 3;95(5):2105-10.

Lois L.M., Rodríguez-Concepción 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. Jun; 22(6): 503-13.

Lüttgen H., Rohdich F., Herz S., Wungsintaweekul J., Hecht S., Schuhr C.A., Fellermeier M., Sagner S., Zenk M.H. and Bacher A. (2000) Biosynthesis of terpenoids: YchB protein of *Escherichia coli* phosphorylates the 2-hydroxy group of 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-d-erythritol. Proc Natl Acad Sci USA 97: 1062–1067.

Ma Y.Z., Holt N.E., Li X.P., Niyogi K.K. and Fleming G.R. (2003) Evidence for direct carotenoid involvement in the regulation of photosynthetic light harvesting. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2003 Apr 15;100(8):4377-82.

Mackinney G. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. J. Biol. Chem. 140: 315-322.

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: 8915–8920.

Mandel M. A., Feldmann K. A., Herrera-Estrella L., Rocha-Sosa M. and León 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. Jul;7(7):1015-26.

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

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.

Murashige, T. and SkoogF. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15,473-497.

Nagata N., Suzuki M., Yoshida S. and Muranaka T. (2002) Mevalonic acid partially restores chloroplast and etioplast development in *Arabidopsis* lacking the non-mevalonate pathway. *Planta*. Dec;216(2):345-50.

Okada K., Kawaide H., Kusuyama T., Seto H., Curtis, I. and Kamiya Y. (2002) Antisense and chemical suppression of the nonmevalonate pathway affects entkaurene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Planta*, 215:339-344.

Putra S.R., Disch A., Bravo J.M. and Rohmer M. (1998) Distribution of mevalonate and glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate routes for isoprenoid biosynthesis in some gram-negative bacteria and mycobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* Jul 1;164(1):169-75.

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., Campos N., Maria Lois L., Maldonado C., Hoeffler J.F., Grosdemange-Billiard C., Rohmer M. and Boronat A. (2000) Genetic evidence of branching in the isoprenoid pathway for the production of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* May 19;473(3):328-32.

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 fruit ripening. *Plant J.* Aug;27(3):213-22.

Rodríguez-Concepción M. and Boronat A. (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol.* Nov;130(3):1079-89.

Rodríguez-Concepción M., Fores O., Martínez-García J.F., González V., Phillips M.A., Ferrer A. and Boronat A. (2004) Distinct light-mediated pathways regulate the biosynthesis and exchange of isoprenoid precursors during *Arabidopsis* seedling development. *Plant Cell.* Jan;16(1):144-56. Epub 2003 Dec 05. Reinbothe S. and Reinbothe C. (1996) The regulation of enzymes involved in chlorophyll biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* Apr 15; 237(2): 323-43. Zurich (ETH), Switzerland.

Rohdich F., Eisenreich W., Wungsintaweekul J., Hecht S., Schuhr C.A. and Bacher A. Biosynthesis of terpenoids. (2001) 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF) from *Plasmodium*. *Eur. J. Biochem.* Jun; 268(11): 3190-7.

Rohdich F., Kis K., Bacher A. and Eisenreich W. (2001) The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates. *Curr. Opin. Chem. Biol.* Oct;5(5):535-40.

Rohdich F., Wungsintaweekul J., Eisenreich W., Richter G., Schuhr C.A., Hecht S., Zenk M.H., Bacher A. (2000) Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase of *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. Jun 6;97(12):6451-6.

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. Oct 12;96(21):11758-63.

Rohdich F., Zepeck F., Adam P., Hecht S., Kaiser J., Laupitz R., Grawert T., Amslinger S., Eisenreich W., Bacher A. and Arigoni D. (2003) The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by IspG and IspH protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. Feb 18; 100(4): 1586-91.

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.

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. (1999) The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. Nat. Prod. Rep. Oct;16(5):565-74.

Rohmer M., Seeman M., Horbach S., Bringer-Meyer 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.

Rogozin I.B., Makarova K.S., Murvai J., Czabarka E., Wolf Y.I., Tatusov R.L., Szekely L.A. and Koonin E.V. (2002) Connected gene neighborhoods in prokaryotic genomes. Nucleic Acids Res. May 15;30(10):2212-23.

Ronen G., Cohen M., Zamir D. and Hirschberg J. (1999) Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. Plant J. feb; 17(4):341-51.

Ruzicka L. (1953) The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia* 9, 357-367.

Sacchettini, J. C. and Poulter, C. D. (1997) Creating isoprenoid diversity. *Science* 277, 1788-1789.

Schulte A.E., van der Heijden R. and Verpoorte R. (2000) Purification and characterization of mevalonate kinase from suspension-cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Arch Biochem Biophys.* Jun 15;378(2):287-98.

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.* Jul 16; 455(1-2): 140-4.

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.

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.

Sprenger G.A., Schorken U., Wiegert T., Grolle S., de Graaf A.A., Taylor S.V., Begley T.P., Bringer-Meyer S. and Sahm 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 U S A.* Nov 25;94(24):12857-62.

Summons R.E. and Jahnke L.L. (1990) Identification of the methylhopanes in sediments and petroleum. *Geochim Cosmochim Acta.*;54:247-51.

Takahashi S., Kuzuyama T., Watanabe H. and 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. *PNAS* Vol. 95, Issue 17, 9879-9884, August 18.

Tatusov R. L., Galperin M. Y., Natale D. A. and Koonin, E. V. (2000) The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res.* 28, 33-36

Vázquez-Duhalt R. and Greppin, H. (1987a). Growth and production of cell constituents in batch cultures of *Botryococcus sudeticus*. *Phytochem.* 26: 885-889.

Voet D. and Voet J.G. (1999) *Fundamentals of Biochemistry*. University of Pennsylvania.

Wolff M., Seemann M., Grosdmange-Billiard C., Tritsch D., Campos N., Rodriguez-Concepcion M., Boronat A. and Rohmer M. (2002) Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway. (E)-4-Hydroxy-3-methyl but-2-enyl diphosphate: chemical synthesis and formation from methylerythritol cyclodiphosphate by a cell-free system from *Escherichia coli*. *Tetrahedron Lett* 43: 2555–2559.

Zeidler J., Schwender J., Muller C. and Lichtenthaler H.K. (2000) The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis of plants as a test system for drugs against malaria and pathogenic bacteria. *Biochem Soc Trans* 28: 796–798.

Zeidler J., Schwender J., Muller C., Wiesner J., Weidemeyer C., Beck E., Jomaa H. and Lichtenthaler H.K. (1998) Inhibition of the non-mevalonate 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate pathway of plant isoprenoid biosynthesis by fosmidomycin. *Z. Naturforsch.* 3c: 980–986.