



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**(Estudio de la familia génica que codifica a  
DXS en *Zea mays*)**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**LUIS MEDINA SÁNCHEZ**

**TUTORA:**

**DRA. PATRICIA LEÓN MEJÍA**

**(2009)**



**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM**



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.

## **Hoja de datos de jurado**

### **Datos del alumno:**

Medina  
Sánchez  
Luis

Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Licenciatura en Biología  
405062944

### **Datos Tutor**

Dra.  
Léon  
Mejía  
Patricia

### **Datos sinodal 1**

Dr.  
Valdés  
López  
Victor Manuel

### **Datos sinodal 2**

Dr.  
Cruz  
García  
Felipe

### **Datos sinodal 3**

Dra.  
Gómez  
Eichelmann  
María del Carmen del Socorro

### **Datos sinodal 4**

Dra.  
Porta  
Ducoing  
Helena

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi agradecimiento:

A mi tutora de Tesis, la Dra. Patricia León Mejía por su generosidad al brindarme la oportunidad de poder realizar la tesis de Licenciatura en su laboratorio.

Al Comité de sinodales: Dra. Carmen Gómez, Dra. Helena Porta, Dr. Felipe Cruz y Dr. Victor Valdés por el tiempo dedicado, críticas y contribuciones a este trabajo.

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Elizabeth Córdoba, la persona que más de cerca siguió mi trabajo diario en el laboratorio, de quien aprendí infinidad de cosas. Siempre estaré agradecido con ella por todo el tiempo dedicado a mi persona.

Por su constante ayuda en el conocimiento de los aspectos básicos del laboratorio así también por su infinita ayuda a la M. en C. Carolina San Román.

Por su colaboración y ayuda en distintos aspectos de este trabajo: A la Dra. Mónica Santos por su enseñanza en la transformación de protoplastos. Al M. en C. Andrés Saralegui, encargado de la Unidad de Microscopía Confocal del IBT, por su constante apoyo para la obtención de las imágenes.

A la Biol. Candy Ramírez por su gran ayuda en la revisión de ésta tesis.

A mis compañeros y amigos de los laboratorios León / Rocha por su amabilidad, enseñanzas, ayuda y buenos momentos que pasamos durante mi estancia en el Instituto de Biotecnología.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México (UNAM). Durante la realización de este trabajo se contó con una beca de Apoyo para Tesis de Licenciatura (Agosto 2007/ Junio 2009).

## **DEDICATORIAS**

A mis padres, quienes con sus consejos, apoyo incondicional y ejemplo, aprendí que para alcanzar las metas se necesita de trabajo diario, pasión y esfuerzo. A ellos principalmente les dedico esta tesis. Gracias a ustedes, mis hermanos y yo, tenemos la gran fortuna de poder seguir nuestro propio camino.

A mis hermanos, quienes también están luchando por seguir sus sueños.

A la memoria de mi tío el Sr. Rubén Romo quién junto con su hermosa familia me abrieron las puertas de su hogar y me permitieron formar parte de ella durante mi estancia en el DF. Gracias por todos sus cuidados, atenciones y sobre todo su cariño.

A toda mi familia en general, quienes siempre han estado al pendiente de mí y quienes me externalizan lo orgullosos que se sienten de mis logros.

A todos mis amigos (de Puebla, DF, Cuernavaca y sus alrededores), con quienes he compartido excelentes momentos. Va también por ustedes carnales ¡¡

## RESUMEN

Los isoprenoides son compuestos presentes en todos los organismos. Constituyen uno de los grupos más grandes de productos naturales. A pesar de ser tan diferentes en estructura y función, todos los isoprenoides comparten un componente estructural de 5 carbonos, el isopentenil difosfato (IPP) o su isomero el dimetilalil difosfato (DMAPP) los cuales constituyen los bloques o unidades básicas de los diferentes isoprenoides. En plantas, la biosíntesis de IPP o DMAPP se lleva a cabo a través de dos vías diferentes: la vía mevalónica (MVA) en el citoplasma y la recientemente identificada vía 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) en plástidos. Estas vías desempeñan un papel central en la vida de las plantas ya que a través de ellas se sintetiza una gran variedad de isoprenoides requeridos en diferentes procesos biológicos como: la fotosíntesis, el desarrollo, transporte de electrones así como de proteínas y azúcares, crecimiento, respuesta a patógenos, entre otros.

En la vía MEP, el primer paso es la formación del compuesto 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato catalizado por la enzima (DXS). En el laboratorio, estudios iniciales del patrón de expresión espacial y temporal de CLA/DXS1 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. Además, los requerimientos de la enzima DXS son mayores en estadios tempranos del desarrollo y en tejidos jóvenes de la planta. Por otro lado, análisis comparativos de expresión de los genes de la vía MEP bajo diferentes condiciones de crecimiento indican que la acumulación de los niveles del transcrito de estos genes está modulada por múltiples señales en *A. thaliana*, tales como la luz, el ritmo circadiano y/o por azúcares.

Hoy en día se sabe que los genes *dxs* son parte de una familia multigénica pequeña en plantas, tanto mono como dicotiledóneas. En nuestro grupo, se decidió ampliar los estudios para el caso de la DXS en *Zea mays* (maíz), debido a que esta planta es uno de los cultivos

agrícolas más importantes del mundo y en consecuencia, esta planta es de gran interés para su eventual manipulación genética. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo consistió en determinar la localización subcelular de los productos génicos de tres genes con homología a DXS, identificados en *Zea mays*. Para realizar esto, se realizaron fusiones traduccionales de los supuestos péptidos de tránsito para cada DXS con la proteína verde fluorescente (GFP), y posteriormente las construcciones generadas se expresaron en protoplastos de *A. thaliana* y *Zea mays*. Los resultados utilizando el microscopio confocal concluyeron que las proteínas DXS1 y DXS3 de *Zea mays* poseen un péptido de tránsito de importe a plástidos (PTP) y además éstas presentan una localización suborganelar. Por otro lado, DXS2 no es importado a cloroplastos, el extremo 5' utilizado en este estudio no permite observar una localización de ésta DXS en los cloroplastos.

## CONTENIDO

|  |    |
|--|----|
| <b>ABREVIATURAS</b>  |    |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>   | 7  |
| 1.1. Isoprenoides  | 7  |
| 1.1.1 Hemiterpenos (C <sub>5</sub> )   | 8  |
| 1.1.2 Monoterpenos (C <sub>10</sub> ).   | 8  |
| 1.1.3 Sesquiterpenos (C <sub>15</sub> )  | 8  |
| 1.1.4.Diterpenos (C <sub>20</sub> ).   |    |
| 1.1.5 Triterpenos (C <sub>30</sub> )   | 9  |
| 1.1.6 Tetraterpenos (C <sub>40</sub> )   | 9  |
| 1.1.7 Politerpenos (C <sub>40+n</sub> )  | 10 |
| 1.1.8 Los isoprenoides poseen gran interés biotecnológico  | 10 |
| 1.2 Biosíntesis de isoprenoides  | 13 |
| 1.3. Distribución de las vías MVA y MEP en la naturaleza.  | 13 |
| 1.3.1.Vía del Mevalonato (MVA)   | 14 |
| 1.4. Descubrimiento de una vía alternativa de biosíntesis de isoprenoides: la vía MEP  | 15 |
| 1.4.1.Los pasos biosintéticos de la vía MEP  | 16 |
| 1.5 Biosíntesis de isoprenoides en plantas   | 19 |
| 1.6 El importe de proteínas al cloroplasto   | 21 |
| 1.7 Origen de los plástidos  | 20 |
| 1.8 El importe a los plástidos   | 22 |
| 1.9. El péptido de tránsito  | 27 |
| 1.10.Compartimentalización del metabolismo vegetal   | 29 |
| 1.10.1. La proteína verde fluorescente (GFP): una metodología y aplicación para estudiar la compartimentalización celular en plantas | 29 |
| <b>2. ANTECEDENTES</b>   | 34 |
| 2.1 DXS es codificada por una familia génica en plantas  | 36 |
| 2.1.1. La vía MEP en plantas está sujeta a múltiples regulaciones  | 38 |
| 2.2. Antecedentes directos   | 40 |
| <b>3. JUSTIFICACION</b>  | 43 |
| <b>4. HIPOTESIS</b>  | 44 |
| <b>5.OBJETIVO GENERAL</b>  | 44 |
| 5.1 Objetivos particulares   | 44 |
| <b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b>   | 45 |
| 6.1. Material biológico  | 45 |
| 6.2. Obtención de ácidos nucleicos   | 45 |
| 6.2.1 Extracción de DNA genómico de maíz   | 45 |
| 6.2.2 Extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina (Miniprep)  | 46 |
| 6.2.3 Extracción de DNA por gradiente de Cloruro de Cesio, CsCl (Maxiprep)   | 46 |
| 6.2.4 Purificación de DNA a partir de gel de agarosa   | 48 |
| 6.2.5 Electroforesis en gel de agarosa   | 49 |
| 6.3 Procedimiento para células electrocompetentes  | 48 |
| 6.4 Amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: Polymerase Chain Reaction)              | 48 |
| 6.5. Alineamiento de secuencias  | 50 |
| 6.6. Diseño de oligonucleótidos  | 50 |

|            |  |    |
|------------|--|----|
| 6.7        | Clonación de DNA   | 51 |
| 6.7.1      | Clonación del extremo N-terminal de los genes <i>dxs</i> de maíz en el vector de entrada pENTR/D-TOPO  | 51 |
| 6.7.2      | Subclonación del extremo N-terminal de los genes <i>dxs</i> de maíz en el vector de expresión (pEarly Gate-103)  | 55 |
| 6.7.3      | Transformación de protoplastos (sistema de expresión transitoria)  | 55 |
| 6.7.4.     | Aislamiento y transformación de protoplastos del mesófilo de hoja de <i>A. thaliana</i>  | 57 |
| 6.7.5      | Aislamiento y transformación de protoplastos del mesófilo de hoja de maíz ( <i>Zea mays</i> )  | 58 |
| 6.7.6      | Microscopía Confocal   | 60 |
| <b>7.</b>  | <b>RESULTADOS</b>  | 61 |
| 7.1        | Alineamiento de las secuencias de DXS de maíz (análisis <i>in silico</i> )   | 61 |
| 7.2        | Clonación del extremo N-terminal de las DXS de <i>Zea mays</i>   | 63 |
| 7.3        | Localización subcelular de las fusiones en protoplastos de <i>A. thaliana</i> y <i>Zea mays</i> .  | 67 |
| 7.4        | Construcción CaS-YFP   | 73 |
| <b>8.</b>  | <b>DISCUSIÓN</b>   | 75 |
| 8.1        | La planta de maíz ( <i>Zea mays</i> ) posee una familia génica que codifica para la enzima DXS perteneciente a la vía MEP  | 75 |
| 8.2        | La fusión traduccional pEGZmDXS2-GFP no es importada hacia el cloroplasto  | 76 |
| 8.3        | Los genes <i>dxs1</i> y <i>dxs3</i> tienen una localización suborganelar dentro del cloroplasto. Posiblemente debido a que presentan un péptido de tránsito con señal bipartita. | 79 |
| <b>9.</b>  | <b>CONCLUSIONES</b>  | 82 |
| <b>10.</b> | <b>PERSPECTIVAS</b>  | 83 |
| <b>11.</b> | <b>APENDICE DE SOLUCIONES</b>  | 85 |
| <b>12.</b> | <b>REFERENCIAS</b>   | 88 |

## 1. IN TRODUCCIÓN

### 1.1. Isoprenoides

Los isoprenoides (o terpenos) forman uno de los grupos más grandes de productos naturales presentes en todos los organismos. Químicamente los terpenos son hidrocarburos (únicamente contienen en su estructura carbono e hidrógeno), clasificados como lípidos por su solubilidad en solventes no polares. De los más de 40,000 compuestos hasta ahora identificados, aproximadamente 25,000 se sintetizan en plantas (Buckingham, 2004), participando en diversos procesos biológicos tales como: división celular, desarrollo, crecimiento, adaptación a diversos tipos de estrés, fotosíntesis etc. (Croteau *et al.*, 2000).

Los isoprenoides son compuestos muy variados en estructura y función. Sin embargo, todos comparten una molécula común de 5 carbonos, el isopentenil difosfato (IPP) o su isomero el dimetilalil difosfato (DMAPP) (McGarvey y Croteau, 1995), la estructura de estas moléculas puede observarse en la Figura 1.

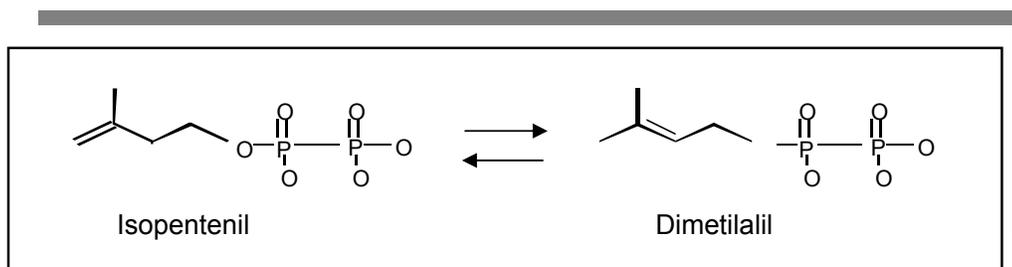


Figura 1. Estructura del isopentenil difosfato (IPP) y el dimetilalil difosfato (DMAPP). Las flechas indican la interconversión entre IPP a DMAPP.

Debido al número tan importante de isoprenoides conocidos, estos compuestos se han clasificado, de acuerdo al número de unidades isoprénicas que los forman, en base a la llamada “regla del isopreno”, la cual establece que todos los isoprenoides se forman estructuralmente por fusiones repetitivas de unidades de isopreno (Ruzicka, 1953). Además, los isoprenoides sufren diversas modificaciones como ciclizaciones, oxidaciones e hidroxilaciones a través de diferentes reacciones enzimáticas con las cuales dan lugar a una gran diversidad de compuestos (Croteau *et al.*, 2000; Sacchettini y Poulter, 1997) :

### 1.1.1. Hemiterpenos (C<sub>5</sub>).

Contienen una sola unidad isoprénica con 5 carbonos. El isoprenoide más sencillo es el isopreno (Figura 2). Este es un compuesto volátil producido en microorganismos y plantas, se considera el único hemiterpeno, aunque algunos investigadores también consideran como hemiterpenos a sus derivados como el prenol y el ácido isovalérico que contienen oxígeno. Este gas se emite por algunas especies de árboles. La función más aceptada de este compuesto es proteger a los tilacoides del daño provocado por altas temperaturas (Logan *et al.*, 2000)

### 1.1.2. Monoterpenos (C<sub>10</sub>).

Formados por dos unidades isoprénicas (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>). En este grupo se encuentran aceites esenciales que dan el aroma y sabor característico a muchas plantas (Mahmoud y Croteau, 2002). Algunos monoterpenos están involucrados en la atracción de polinizadores (linalol) y en la defensa de las plantas (limoneno, pineno y mircenol) (Mahmoud y Croteau, 2002). En la industria estos isoprenoides se usan como compuestos saborizantes y fragancias (limoneno, mentol, geraniol y citronelol). Mientras que en medicina se utilizan el farnesol, geraniol y limoneno como agentes anticancerígenos (Crowell, 1999).

### 1.1.3. Sesquiterpenos (C<sub>15</sub>).

Compuestos formados por tres unidades isoprénicas (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>). Dentro de este grupo se encuentra el capsidiol (fitoalexina de origen isoprénico) que participa en respuesta al ataque por patógenos (Whitehead *et al.*, 1989). En medicina, se ha considerado a la artemisina, otro sesquiterpeno, como un agente antimalárico (Frederich *et al.*, 2002). Dentro de este grupo también se encuentran varios aceites de plantas con funciones de defensa y atrayentes para insectos (Whitehead *et al.*, 1989). Uno de los sesquiterpenos más conocidos es el farnesol que además de ser un pesticida natural y funcionar como una feromona de insectos, se usa industrialmente como fijador en perfumes y saborizante de cigarrillos. También pertenece a este grupo el Ácido Abscísico (ABA) que es una hormona producida por todos los organismos fotosintéticos y que está involucrado en el desarrollo y maduración de la semilla, así como en la respuesta al estrés ambiental (Cutler y Krochko, 1999). A pesar de que esta hormona se considera estructuralmente un sesquiterpeno, su precursor (C<sub>15</sub>), la Xantoxina, no se sintetiza

directamente por tres unidades isopreno sino que se produce por un corte asimétrico de un carotenoide ( $C_{40}$ ) (Croteau *et al.*, 2000).

#### 1.1.4. Diterpenos ( $C_{20}$ ).

Constituidos por cuatro unidades isoprenicas ( $C_{20}H_{32}$ ). Entre los diterpenos se encuentra el *ent*-kaureno que es precursor de las hormonas giberelinas (GAs). En plantas, éstas hormonas participan en una variedad de funciones entre las cuales destacan el desarrollo de la semilla, la germinación, la elongación del tallo y el desarrollo floral (Yamaguchi y Kamiya, 2000; Yamaguchi y Kamiya, 2001). En agricultura, las giberelinas se usan para la manipulación del crecimiento de algunos cultivos (Eriksson *et al.*, 2000). Otro diterpeno importante es el fitol ya que es un componente estructural de las moléculas de clorofila y de los tocoferoles o provitamina E que son moléculas esenciales del sistema fotosintético (Suzuki *et al.*, 1997). Dos ejemplos de importancia médica de este grupo de isoprenoides es el casbeno con una actividad antibacteriana y antifúngica, y el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) por su capacidad de prevenir al tejido del daño oxidativo (Shintani y DellaPenna 1998; Hirschberg, 1999).

#### 1.1.5. Triterpenos ( $C_{30}$ ).

Formados por 6 unidades isoprenicas para dar la fórmula molecular de ( $C_{30}H_{48}$ ). Dentro de este grupo se encuentran los brassinosteroides que son hormonas involucradas en procesos fisiológicos y de desarrollo de las plantas (Bishop y Koncz, 2002). Otro tipo de triterpenos son los esteroides que actúan como estabilizadores y componentes estructurales de la membrana celular en la mayoría de los eucariotes, los hopanoides son los estabilizadores de membranas en la mayoría de las bacterias (Jürgens *et al.*, 1992). Un representante de los triterpenos es el escualeno, que al ser procesado a lanosterol, es el precursor estructural de todos los esteroides (Clayton y Bloch, 1955), incluyendo al colesterol y las hormonas esteroideas (estrógenos y andrógenos) que controlan la diferenciación sexual en humanos.

#### 1.1.6. Tetraterpenos ( $C_{40}$ ).

Con ocho unidades isoprenicas que forman compuestos de 40 carbonos. Los carotenoides son los compuestos mejor conocidos de este grupo de isoprenoides (Hirschberg, 2001). En plantas, su función es captar la luz y proteger del daño

fotooxidativo a los cloroplastos. Además, proporcionan color a los pétalos y frutos y están implicados en la atracción de polinizadores. Los tetraterpenos también tienen funciones importantes en el área médica; por ejemplo, el  $\beta$ -caroteno (precursor de la vitamina A) es crucial para la visión, para prevenir el envejecimiento y ciertos tipos de cáncer (Giovannucci, 1999).

#### 1.1.7. Politerpenos ( $C_{40+n}$ ).

Consisten de largas cadenas formadas por múltiples (en ocasiones miles) unidades isoprenicas. En este grupo se encuentran compuestos como la plastoquinona y ubiquinona que funcionan como acarreadores de electrones en la fotosíntesis y la respiración, respectivamente (McGarvey y Croteau, 1995). Los dolicoles son donadores de oligosacáridos en la glicosilación de proteínas y los undecaprenoles participan como acarreadores de lípidos (Chojnacki *et al.*, 2001). En la industria el politerpeno más utilizado es el hule, obtenido de la planta *Hevea brasiliensis* (Mooibroek y Cornish, 2000).

#### 1.1.8. Los isoprenoides poseen gran interés biotecnológico.

Una consecuencia de la enorme diversidad de los compuestos isoprenicos es la gran variedad de funciones biológicas que desempeñan en los seres vivos. Su versatilidad los convirtió en excelentes candidatos para su uso biotecnológico. Muchos compuestos de origen isoprenoide poseen actualmente un importante valor comercial, pues tienen aplicaciones industriales y biotecnológicas (algunos casos se mencionaron anteriormente en la descripción de los distintos grupos isoprenoides), ya que se utilizan como: resinas, solventes, colorantes, saborizantes, fragancias, polímeros, fibras, pegamentos, ceras, fármacos, antioxidantes, vitaminas, agroquímicos, entre muchos otros. (McGarvey y Croteau, 1995; Hirschberg, 2001; Frederich *et al.*, 2002).

Ante los requerimientos y necesidades actuales por este tipo de compuestos, la problemática se centra en que muchos isoprenoides se encuentran de forma natural en bajas cantidades, por lo que su explotación se vuelve limitada. Y también debido a la naturaleza compleja de estos compuestos, su síntesis química es compleja. Todo esto implica por lógica mayores costos. Una posibilidad para su producción masiva, se encuentra en la ingeniería genética como una herramienta poderosa para dirigir la

producción biotecnológica hacia productos isoprenoides. (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2001; Barkovich y Liao, 2001).

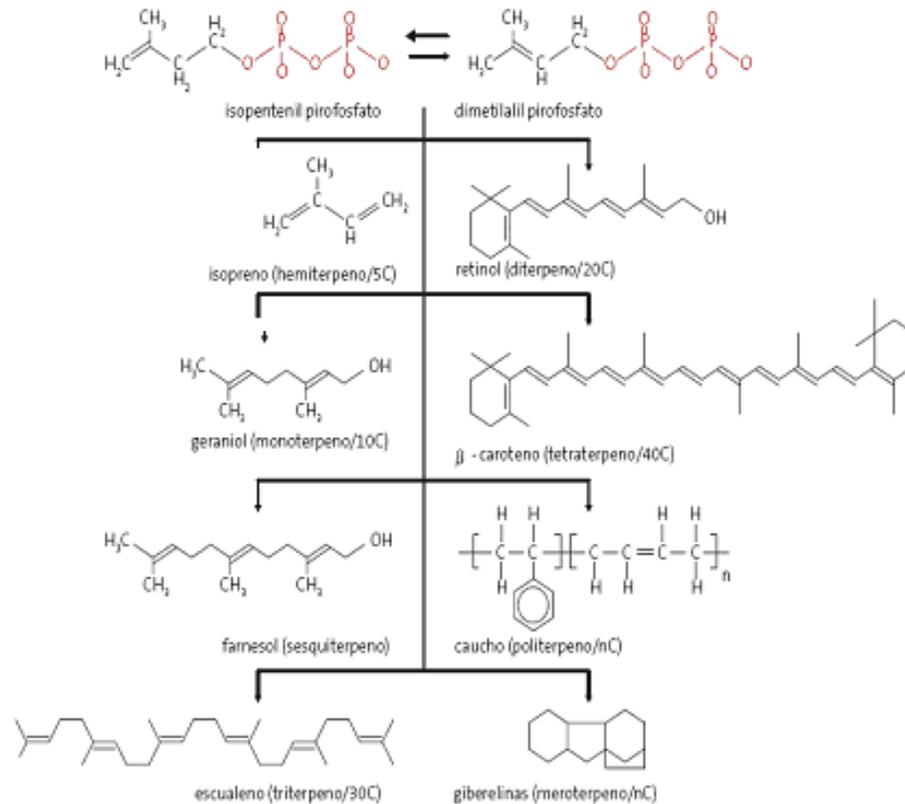


Figura 2. Estructura química de isoprenoides. Se muestra la estructura de los precursores universales (isopentenil pirofosfato) y ejemplos representativos de cada uno de los subgrupos de compuestos isoprenoides constituidos por diferentes números de carbonos. Tomado de León y Guevara., (2007).

En todo el mundo los fármacos del tipo de isoprenoides produjeron por concepto de ventas alrededor de \$12 billones de dólares en el año 2002 (Raskin *et al.*, 2002). Diversos sesquiterpenos se les halló una aplicación como agentes anticancerígenos y antiparasíticos. Por ejemplo, la artemisina, un sesquiterpeno extraído del ajeno (*Artemisia annua*), esta es una de las pocas drogas antimaláricas eficaces que se conocen a las cuales no se ha generado resistencia. Desafortunadamente su costo actual es de aproximadamente cien veces más que otras drogas comúnmente utilizadas como la sulfadoxina o cloroquina (Erkel y Anke., 1994; Tan et al., 1999). Una alternativa a los métodos tradicionales de extracción de estos compuestos bioactivos

de su fuente natural, es la introducción de los genes de la ruta biosintética de interés en un organismo hospedero nativo, hacia un organismo heterólogo bacteriano modificado genéticamente como lo serían las bacterias *Escherichia coli* o *Sacharomices cerevisiae* (Khosla y Keasling, 2003) (Figura 3).



Figura 3. Transplante de una ruta biosintética de un hospedero natural (planta), a uno microbiano. Los genes de la vía de interés en el hospedero nativo, son importados de manera heteróloga dentro del hospedero microbiano. El crecimiento en una fuente barata de carbono (azúcares) por parte del procarionte, esto permitiría la producción de pequeñas moléculas de interés farmacéutico o precursores, mediante fermentación. Modificado de Chang y Keasle (2006).

Otros posibles métodos para la producción de isoprenoides es mediante la ingeniería genética y los cultivos de tejidos vegetales. Esta técnica posibilita la propagación de clones transformadas y tiene ventajas tales como el manipular las condiciones del crecimiento celular, la regulación y extracción de los productos metabólicos. Un resumen de este método y sus posibles aplicaciones se abordan en (Vanisree *et al.*, 2004). En contraste a la producción de terpenoides en cultivos, otras alternativas son la obtención de plantas transgénicas para la producción y síntesis de terpenos (Aharoni *et al.*, 2003).

## 1.2. Biosíntesis de isoprenoides

Por mucho tiempo se creyó que la síntesis de IPP y DMAPP se llevaba a cabo a través de una ruta, conocida como la vía Mevalónica (MVA). Sin embargo, investigaciones bioquímicas, moleculares y genéticas demostraron recientemente que el IPP y DMAPP se sintetizan también a través de una vía totalmente diferente a la vía MVA, a la que se conoce como vía del 2C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) (Eisenreich *et al.*, 2004; Rohmer, 1999). Es notable destacar que estas dos rutas metabólicas son independientes a pesar de que sintetizan los mismos precursores, esto es un ejemplo de evolución convergente, ya que no parece existir relación evolutiva alguna entre las enzimas que participan en cada una de estas vías. Las dos rutas son exitosas para la síntesis de isoprenoides y al parecer se seleccionaron independientemente durante la evolución. La distribución filogenética de los genes y las enzimas de ambas rutas, postulan que el origen de la vía MVA proviene del grupo procariote ancestral relacionado con las arqueobacterias, que más tarde al parecer dieron lugar a las células eucariotes. La vía MEP por su parte parece tener un origen en organismos del tipo de las eubacterias, algunas de las cuales dieron su origen a 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. Se tienen evidencias de que los genes involucrados en la síntesis del IPP y del DMAPP, también estuvieron sujetos al proceso de transferencia horizontal (Boucher y Doolittle, 2000). Esto explica porqué en la síntesis de isoprenoides de algunos procariotes, están implicados genes de ambas vías, o porqué se considera que las actuales enzimas de la vía MEP en plantas fueron adquiridas posteriormente al origen de los plástidos (Lange *et al.*, 2000).

## 1.3. Distribución de las vías MVA y MEP en la naturaleza.

La vía denominada (MVA) opera en el citoplasma de prácticamente todos los eucariotes, y la denominada (MEP) está presente en la mayoría de las bacterias (eubacterias) y en organismos fotosintéticos como algas y plantas superiores (Lichtenthaler, 1999). La vía MEP también opera en algunos protozoarios que contienen organelos derivados de plástidos del género apicomplexa, como: *Plasmodium*, *Toxoplasma* y *Leishmania*, que son agentes causales de enfermedades importantes en humanos (Eisenreich *et al.*, 2001). Los organismos se dividen conforme a la vía que usan para sintetizar IPP en tres grupos: 1) los que utilizan únicamente la vía

mevalonato (arqueobacterias, algunos protozoarios, Euglenophytas, hongos, levaduras y animales); 2) los que solo presentan la vía MEP (la mayoría de las eubacterias y Chlorophytas) y 3) aquellos organismos que usan tanto la vía del Mevalonato como la vía MEP (Rhodophytas, algas y plantas superiores) para la biosíntesis de sus isoprenoides (Lange *et al.*, 2000; Lichtenthaler, 2000; Eisenreich *et al.*, 2001).

| Ruta de biosíntesis |     |     |
|---------------------|-----|-----|
| Organismo           | MVA | MEP |
| Eubacterias         | +   | +   |
| Arqueobacterias     | +   | -   |
| Protozoarios        | +   | +   |
| Algas               | +   | +   |
| Plantas superiores  |     |     |
| Cloroplasto         | -   | +   |
| Citoplasma          | +   | -   |
| Hongos              | +   | -   |
| Animales            | +   | -   |

Figura 4. Ruta de biosíntesis en diferentes organismos. MVA: vía mevalónica, MEP: vía del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato. (+) indica presencia de la vía y (-) indica ausencia. Aunque la mayoría de las eubacterias contienen la vía MEP, se han reportado algunas que contienen la vía MVA. También en el caso de las algas existen algunos grupos que parecen contener una sólo una de las vías. Tomado de León y Guevara, (2007).

### 1.3.1. Vía del Mevalonato (MVA)

En 1958 Bloch y Lynen establecieron por primera vez la presencia de la vía mevalónica en los animales y las levaduras (Lynen *et al.*, 1958; Chaykinet *et al.*, 1958). A partir de entonces se han realizado estudios muy detallados de varios aspectos de esta vía por lo que actualmente se conocen los diferentes pasos para su biosíntesis.

Los genes involucrados en esta ruta biosintética se han identificado en el genoma de arqueobacterias, levaduras, animales y plantas (Lange *et al.*, 2000). La mayoría de estos genes forman familias multigénicas.

En la vía mevalónica (Figura 5), el precursor inicial es el acetil coenzima A (acetil CoA), el cual se convierte a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMGCoA) por la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMGS). Posteriormente, el compuesto 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMGCoA) es reducido a mevalonato por la enzima, 3-hidroxi-3-

metilglutaril-CoA reductasa (HMGR), siendo éste un paso limitante por lo que a esta ruta se le denominó "vía del mevalonato" (Glodstein y Brown, 1990). Consecutivamente el mevalonato se fosforila a 5-fosfomevalonato por la enzima mevalonato cinasa (MVK). Una segunda fosforilación ocurre en el compuesto 5-fosfomevalonato para formar 5-difosfomevalonato por la enzima 5-fosfomevalonato cinasa (PMK), a partir de este último compuesto la enzima 5-difosfomevalonato descarboxilasa (PMD) forma IPP (Bach *et al.*, 1999; Schulte *et al.*, 2000). Finalmente, la enzima isopentenil difosfato isomerasa (IPPI) cataliza la transformación reversible de isopentenil difosfato a dimetilalil difosfato (Cunningham y Grantt, 2000).

#### **1.4. Descubrimiento de una vía alternativa de biosíntesis de isoprenoides: la vía MEP**

Trabajos pioneros de la síntesis de los isoprenoides llevaron a concluir que la vía MVA era responsable de la biosíntesis de los isoprenoides en todos los organismos vivos (Eisenreich *et al.*, 2004; Rohmer, 1999). Sin embargo, estudios posteriores sobre la síntesis de algunos isoprenoides específicos produjeron resultados contradictorios que sugerían la existencia de una ruta de biosíntesis diferente a la MVA. Entre dichos resultados destacan los de las síntesis de hoponoides (derivados triterpenoides que modulan la fluidez y permeabilidad de la membrana plasmática) y ubiquinonas en bacterias, en los que basados en la incorporación de acetato radioactivo ( $^{13}\text{C}$ ), se demostraba que el acetato no parecía ser el precursor de dichos compuestos (Flesch y Rohmer, 1988; Rohmer *et al.*, 1993). Por otra parte, estudios sobre la biosíntesis de los isoprenoides en el alga verde *Scenedesmus obliquus*, permitieron obtener evidencias concretas que demostraron el funcionamiento de la vía MEP en células vegetales (Schwender, 1996). En plantas superiores, los estudios de marcaje se hicieron en cultivos de células de cebada, zanahoria y lenteja, los cuales fueron crecidos heterotróficamente en presencia de  $[1-^{13}\text{C}]$ -glucosa. Los resultados mostraron que las unidades isopreno del  $\beta$ -caroteno, luteína, fitol, y plastoquinona-9 se marcaron de acuerdo a la vía MEP. En contraste, los esteroides (sitoesterol, estigmaesterol y campesterol) se marcaron según la vía mevalonato (Lichtenthaler, 1997).

Resultados como los descritos arriba, complementados con el uso de inhibidores específicos de la vía MVA, motivaron que a principios de los 90's grupos de investigación de manera simultánea reinvestigaran cuidadosamente la biosíntesis de

isoprenoides en plantas y en eubacterias. Los experimentos de varios grupos, como los realizados por Rohmer y cols., (1993; 1996) establecieron que el piruvato y el gliceraldehído 3-fosfato son los precursores iniciales de la vía MEP y culminaron con el descubrimiento de una vía nueva para la síntesis de isoprenoides. A esta se le ha denominado MEP, en base al primer intermediario comprometido de la vía, el 2-Cmetil-eritritol 4-fosfato (MEP), este paso se postula como el primer intermediario comprometido de la vía ya que el DXP en bacterias también se utiliza como precursor en la síntesis de las vitaminas B6 y B1. Sin embargo, estudios recientes en plantas sugieren que estas vitaminas son sintetizadas a través de una ruta biosintética no relacionada (Tambasco et al., 2005). También se le conoce con los nombres de vía no mevalónica y DOXP. Estos hallazgos se han apoyado en plantas con la caracterización genética y molecular de una mutante albina a través de la cual se identificó la primera enzima de esta vía (Mandel *et al.*, 1996; Estévez *et al.*, 2000).

La identificación de las enzimas y genes para cada uno de los pasos de la vía MEP, así como la descripción de sus mecanismos de reacción, se obtuvieron en un lapso de aproximadamente diez años gracias al uso de estrategias multidisciplinarias que incluyeron genética, biología molecular y genómica comparativa. Esto representa un récord en la caracterización de cualquier vía de biosíntesis conocida hasta ahora. Así, se identificaron para la ruta MEP ocho genes y sus correspondientes enzimas como las responsables de la síntesis de IPP y DMAPP a partir de los precursores gliceraldehído 3-fosfato y piruvato (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002). Los genes correspondientes para cada una de las enzimas de la vía MEP se han aislado en diferentes especies vegetales y en bacterias (Lange *et al.*, 2001).

#### **1.4.1. Los pasos biosintéticos de la vía MEP**

En esta ruta, los precursores iniciales son el piruvato y el gliceraldehído-3-fosfato (G3P) (Rohmer *et al.*, 1996). (Figura 5). El primer compuesto intermediario que se forma es la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP). La enzima que cataliza la formación de DXP es un miembro de la superfamilia de las transcetolasas (enzimas que requieren tiamina pirofosfato (TPP) y  $Mg^{2+}$ ) llamada 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS). Genes que codifican para la enzima DXS se han aislado en bacterias (Sprenger *et al.*, 1997) y en plantas como *Mentha x piperita* (Lange *et al.*, 1998), *Capsicum annum* (Bouvier *et al.*, 1998), *Solanum lycopersicum* (Lois *et al.*, 2000) y *Arabidopsis thaliana*. En esta última DXS se codifica por el gen *CLA1/DXS1* (Mandel *et*

*al.*, 1996; Estévez *et al.*, 2000). En *Escherichia coli* (David *et al.*, 1981; Hill *et al.*, 1989) y en plantas (Arigoni *et al.*, 1997), el compuesto DXP también es precursor para la síntesis de las vitaminas tiamina (B1) y piridoxol (B6). Posteriormente, el DXP es convertido a 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) que es el primer compuesto comprometido con la vía, de ahí que se le haya denominado vía MEP. Esta conversión se cataliza por la enzima llamada 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (DXR) (Kuzuyama *et al.*, 1998). Genes que codifican para DXR se han clonado en *E. coli* (Takahashi *et al.*, 1998), *M. piperita* (Lange *et al.*, 1999), *A. thaliana* (Schwender *et al.*, 1999), entre otros. Posteriormente el MEP se transforma en 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol por la enzima 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintasa (MCT) (Rondich *et al.*, 1999; Rondich *et al.*, 2000). En el siguiente paso la enzima 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol cinasa (MCK) fosforila al compuesto 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol para formar 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol-2-fosfato (Lüttgen *et al.*, 2000). En seguida la enzima 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintasa (MDS) cataliza la formación de 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato a partir de 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol-2-fosfato (Herz *et al.*, 2000). En el año 2000 Wolf y colaboradores demostraron que el gen *HDS* en *E. coli* cataliza la formación del compuesto 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato en 1-hidroxi-2-metil-2-(*E*)-butenil 4-difosfato (HMB-PP) (Wolf *et al.*, 2002).

En *Arabidopsis*, se encontró un gen homólogo a *HDS* capaz de complementar la mutante de *E. coli* deficiente en *HDS*. Además, se demostró que la proteína se importa a plástidos (Querol *et al.*, 2002). Estos datos sugirieron la participación de *HDS* de *Arabidopsis* en la vía MEP. Finalmente, el gen *ispH* identificado en la cianobacteria *Synechocystis sp.* (Cunningham *et al.*, 2000), la planta *Adonis aestivalis* (Cunningham *et al.*, 2000) y *E. coli* (Adam *et al.*, 2002). Este gen codifica para la enzima 1-hidroxi-2-metil-2-(*E*)-butenil 4-difosfato reductasa (HDR) la cual convierte al compuesto 1-hidroxi-2-metil-2-(*E*)-butenil 4-difosfato en una mezcla de IPP y DMAPP en proporción 5:1, respectivamente. Finalmente, también la enzima IDI (isopentenil/dimetilalil difosfato isomerasa), cataliza la interconversión de IPP a DMAPP. La actividad de esta enzima no es esencial para la vía puesto que un nivel bajo de biosíntesis de isoprenoides mediante la vía MEP puede ocurrir sin la presencia de esta enzima; sin embargo, ésta se requiere para una función completa de la ruta (Page *et al.*, 2003).



Figura 5. Rutas de biosíntesis de isoprenoides. Se muestran los intermediarios y las enzimas que catalizan cada paso. A) Vía mevalónica (MVA): CoA (coenzima A), HMG-CoA (hidroxi metilglutaril CoA), MVA (ácido mevalónico), MVA 5-P (mevalonato 5 fosfato), MVA 5-PP (mevalonato 5 difosfato), IPP (isopentenil pirofosfato), DMAPP (dimetilalil pirofosfato), AACT (aceto acetil CoA tiolasa), HMGS (HMG-CoA sintasa), HMGR (HMG-CoA reductasa), MVK (mevalonato cinasa), PMK (fosfo mevalonato cinasa), PMD (fosfo mevalonato descarboxilasa), IDI (isopentenil pirofosfato isomerasa). B) Vía MEP: GA3P (gliceraldehído 3 fosfato), DXP (deoxi-D-xilulosa 5-fosfato), MEP (2-C-metil-eritritol 4-fosfato), CDP-ME (4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol), CDP-MEP (CDP-ME 2-fosfato), ME-cPP (metil eritritol-2,4-ciclodifosfato), HMBPP (hidroxi metil butenil difosfato), DXS (DXP sintasa), DXR (DXP reductoisomerasa), CMS (CDP-ME sintasa), CMK (CDP-ME cinasa), MCS (ME-cPP sintasa), HDS (HMBPP sintasa), HDR (HMBPP reductasa), IDI (isopentenil pirofosfato isomerasa). Modificado de Arigoni (1997).

### 1.5. Biosíntesis de isoprenoides en plantas

Para la síntesis de IPP y DMAPP las plantas utilizan tanto la vía del mevalonato (McGarvey y Croteau, 1995) como la vía MEP (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002) (Figura 6). En las células vegetales estas vías se encuentran diferencialmente compartamentalizadas: es decir, en el citoplasma se localiza la vía mevalónica, a través de la cual se sintetizan fitoesteroles, sesquiterpenos, las hormonas brasinosteroides, citocininas y fitoalexinas de origen isoprénico; mientras que en los plástidos se desarrolla la biosíntesis por la vía MEP. Isoprenoides como hormonas giberelinas y ácido abscísico, así como pigmentos como los carotenos y las clorofilas, acarreadores de electrones como el fitol o los  $\alpha$ -tocoferoles y muchos otros compuestos (Lichtenthaler *et al.*, 1997; Lichtenthaler., 1998). Por otra parte, los isoprenoides mitocondriales se sintetizan a partir del IPP derivado de la vía MVA, que es importado desde el citosol (Lichtenthaler, 1999).

En las plantas, los genes para ambas vías se encuentran codificados en el genoma nuclear, pero para el caso de las enzimas pertenecientes a la vía MEP, estas codifican para un péptido de tránsito necesario para su importe al plástido (Lichtenthaler 2000; Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002).

La compartimentalización de las vías hizo suponer que éstas operaban de manera independiente; sin embargo, experimentos de marcaje utilizando el compuesto 1-desoxi-D-xilulosa marcado, mostraron que aunque el mayor porcentaje de la marca era incorporado en la biosíntesis de pigmentos, fitol y carotenos (provenientes de la vía

MEP), un 6% del compuesto marcado se incorporó en la síntesis de fitoesteres provenientes de la vía mevalonato. Estos datos demostraron que algún intermediario de la vía MEP se transporta hacia el citoplasma y es usado para la síntesis de isoprenoides citosólicos (Arigoni *et al.*, 1997). También otras investigaciones usando precursores específicos de la vía mevalonato y MEP marcados, demostraron que ambas vías pueden contribuir para la biosíntesis de *ent*-kaureno (precursor de giberelinas) y campesterol (esterol citosólico). Siendo mayoritaria la contribución de la vía MEP en la síntesis de giberelinas, mientras que la síntesis de campesterol fue predominantemente la vía mevalonato (Kasahara *et al.*, 2002). 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. Este fenómeno se debe al transportador descrito prenyl difosfato, que genera una fuerza motriz de protones estimulado por la imposición tanto de los componentes de campo eléctrico ( $\Delta\psi$ ), así como los de la concentración de gradientes ( $\Delta\text{pH}$ ). Dentro de la célula de las plantas preferencialmente ocurre el intercambio del cloroplasto al citoplasma (Laule *et al.*, 2003); sin embargo, el intercambio es escaso y este evento no permite restaurar la falta de alguna de las vías cuando alguna de estas se encuentra arrestada. La vía MEP probablemente representa una de las rutas metabólicas más conservadas en la evolución.

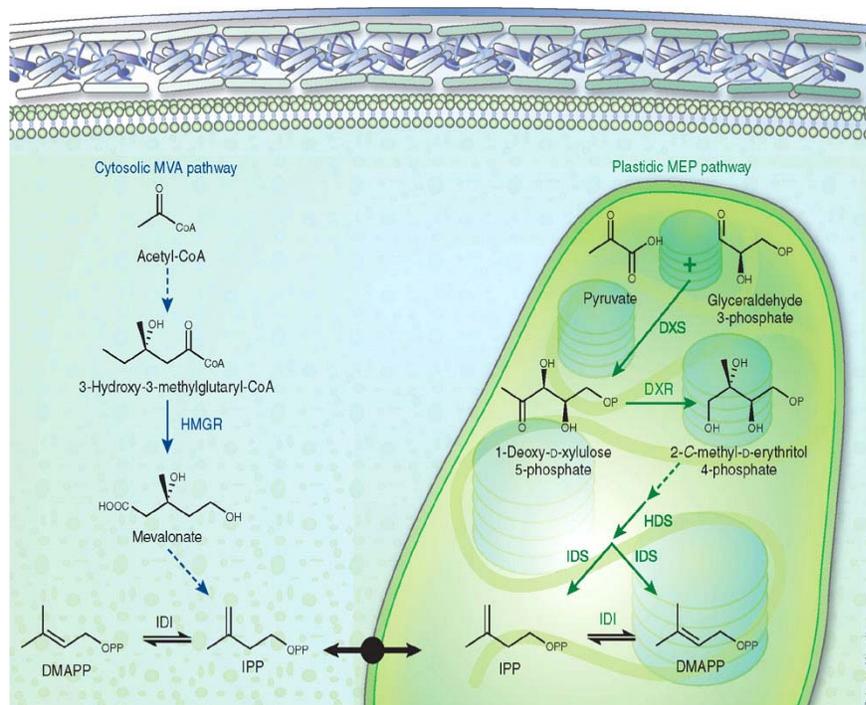


Figura 6. Compartimentalización de la biosíntesis de isoprenoides en plantas. Visualización resumida de ambas vías biosintéticas. (Izquierda) Vía del Mevalonato (MVA). HMGR, 3-hidroxi-3-metilglutaril- CoA reductasa; IDI, isopentenil difosfato isomerasa. (Derecha) Vía MEP. DXS, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa; DXR 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa; HDS, 1-hidroxi-2-metil-2-(*E*)-butenil 4-difosfato sintasa; IDI, isopentenil difosfato isomerasa. Tomado de Roberts, (2007).

### 1.6. El importe de proteínas al cloroplasto.

Una planta típica contiene miles de secuencias polipeptídicas diferentes; para que la célula realice sus funciones apropiadamente, requiere dirigir sus proteínas a los diferentes compartimentos metabólicos, al espacio citoplásmico o a sus sistemas membranales.

(Figura 7).

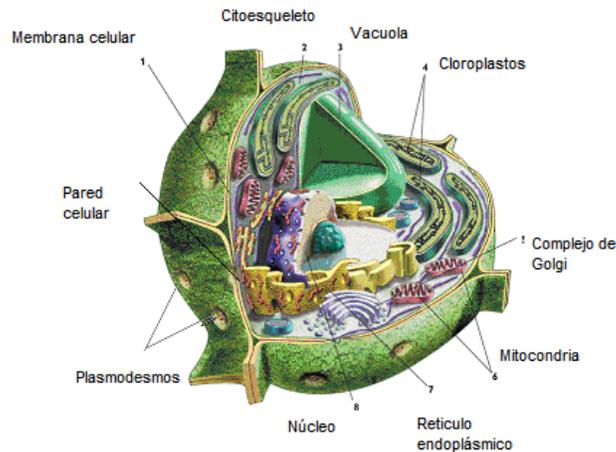


Figura 7. Esquema general de una célula vegetal. Se muestran los distintos compartimentos que la conforman.

## 1.7. Origen de los plástidos

Existen evidencias contundentes de que los cloroplastos de las plantas se originaron mediante un evento de endosimbiosis a través del cual una cianobacteria fotosintética ancestral fue engullida por una célula heterotrófica hospedera la cual ya poseía previamente una mitocondria (Cavalier-Smith, 2000; Rujan., *et al* 2002). Este proceso de endosimbiosis provocó una transferencia masiva de información genética del endosimbionte al núcleo del hospedero, es decir, a pesar de que los plástidos actuales aún retienen un genoma funcional endógeno, la transferencia de material genético del organelo al núcleo significó que (>90%) de los genes requeridos para la biogénesis del organelo se codificaran ahora en el núcleo. Un prerequisite para el importe exitoso de estas moléculas al organelo fue el desarrollo y el establecimiento de una maquinaria de importe, necesario para la transferencia de polipéptidos sintetizados en el citoplasma y localizados en el cloroplasto. Debido a que los cloroplastos son los organelos más recientemente adquiridos en la célula eucarionte, diversos sistemas post-traduccionales para dirigir proteínas dentro de organelos probablemente ya existían en la célula hospedera, por ejemplo, aquellos pertenecientes a mitocondria (Pfanner y Geissier, 2001), peroxisomas (Kunau, 2001) y/o membrana plasmática (Neuhaus y Rogers, 1998). Sin embargo, el surgimiento del sistema de importe de proteínas del cloroplasto tuvo que desarrollar características únicas que aseguraran especificidad de importe a dicho organelo, ya que la correcta clasificación de proteínas dentro de una célula eucarionte es esencial para su funcionalidad.

Los cloroplastos son organelos altamente estructurados formados por tres sistemas membranosos no contiguos: las membranas interna y externa que cubren al organelo y el sistema membranal tilacoide. Esto da lugar a tres compartimentos suborganelares solubles: el espacio entre las membranas interna y externa, el estroma, que es el medio interno de los plástidos y el lumen del tilacoide. En los cuales se realizan diferentes funciones metabólicas relacionadas con la fotosíntesis; cada uno de estos compartimentos requiere del importe de diferente proteínas, mediante sistemas de transporte intra-organelar específicos (Mori y Cline, 2001; Eichacker y Henry, 2001; Schünemann, 2007; Inaba y Schnell. 2008).

## 1.8. El importe de proteínas a los plástidos

El proteoma del cloroplasto contiene aproximadamente de 3500 a 4000 polipéptidos. En el genoma cloroplástico hay aproximadamente 200 genes (Duby *et al.*, 2001). A pesar de que el cloroplasto contiene un genoma propio, la mayoría de sus proteínas se codifican en el núcleo, se traducen en el citoplasma y se importan a los diferentes compartimentos cloroplásticos. Hasta ahora, al menos 4 sistemas de importe al cloroplasto se han descubierto para este fin (Figura 8).

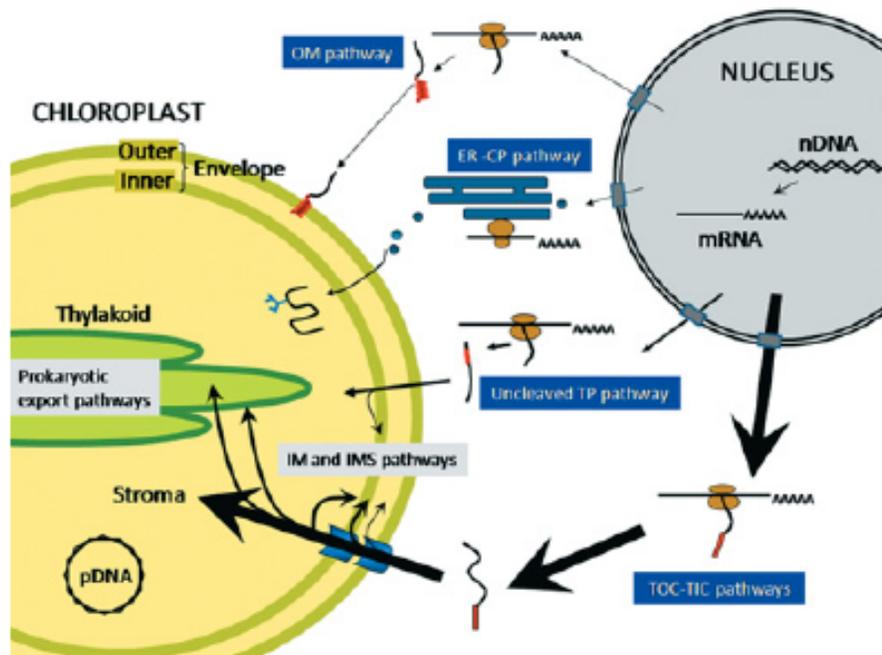


Figura 8. Panorama general de la biosíntesis de proteínas cloroplásticas y su importe al cloroplasto. Al menos 4 distintas vías de importe de proteínas a los plástidos se han descrito: la vía OM (por sus siglas en inglés, outer envelope membrane pathway) de importe de proteínas a la membrana externa del cloroplasto, la vía del retículo endoplásmico (ER)-CP (vía de importe de glicoproteínas al estroma mediante la vía de secreción, la vía TP (vía de importe de proteínas que carecen de un péptido de tránsito removible dirigidos al estroma y a la membrana interna y las vías TOC-TIC (las vías que requieren de un péptido de tránsito removible para dirigir las proteínas al estroma, al espacio intermembranal o a la membrana interna y sirve como paso inicial para el importe de proteínas con destino a tilacoide). El tamaño de las flechas aproximan la proporción de proteínas codificadas en el núcleo que se estima utilizan cada vía. Abreviaturas: nDNA, DNA nuclear; pDNA, DNA plásmido. Tomado de: Inaba y Shnell., (2008).

La vía mayor de importe es conocida como la vía TOC-TIC (en inglés, translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts-translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts) (Figura 9). Las proteínas que se importan al cloroplasto se sintetizan como un precursor de peso molecular mayor, el cual contiene en su amino-terminal una secuencia requerida para su importe al organelo y que se conoce como péptido de tránsito. Sin importar el destino final de las proteínas en el cloroplasto todas ellas se internalizan a través de la envoltura cloroplástica que comprende las membranas externa e interna. Las reacciones de importe se inician, por lo tanto, con el reconocimiento del precursor proteico mediante receptores situados en la membrana externa los cuales constituyen un complejo proteico de alto peso molecular al cual se le ha denominado como TOC (Young *et al.*, 1999). Durante este reconocimiento, el precursor se asocia con la membrana externa del cloroplasto a través del péptido de tránsito. Este reconocimiento requiere de GTP (en inglés, Guanosine triphosphate). El proceso involucra una unión específica con una proteína receptora y el precursor proteico. Existen evidencias experimentales en cuanto a la naturaleza del aparato de importe TOC; se sabe que éste está constituido por un complejo de por lo menos 7 proteínas de membrana externa que incluyen a dos proteínas que unen GTP (34 Y 86 kD), un canal (75 kD) y por lo menos dos diferentes chaperonas tal como Hsp70 (Keegstra y Cline, 2000).

El complejo TOC se asocia directamente con el complejo de importe de la membrana interna (TIC) para formar un pasaje ininterrumpido para transportar a las preproteínas del citoplasma al estroma. Este paso requiere de ATP y GTP (Jackson-Constan *et al.*, 2001). Del complejo TIC se conoce menos y, hasta el momento, ha sido un reto la identificación de componentes, porque a diferencia de TOC el ensamblaje del complejo TIC parece ser más dinámico. Después de la translocación el péptido de tránsito es removido a través de proteasas específicas estromales.

Un dato interesante es que los componentes del transporte de la envoltura externa del cloroplasto que se han caracterizado, no presentan semejanzas con el transporte mitocondrial, a pesar de que ambos organelos requieren de la introducción de proteínas por dos sistemas membranales, y que se sabe que el proceso de importe es semejante. Esto sugiere que ambas maquinarias evolucionaron independientemente (Shell, 1995).

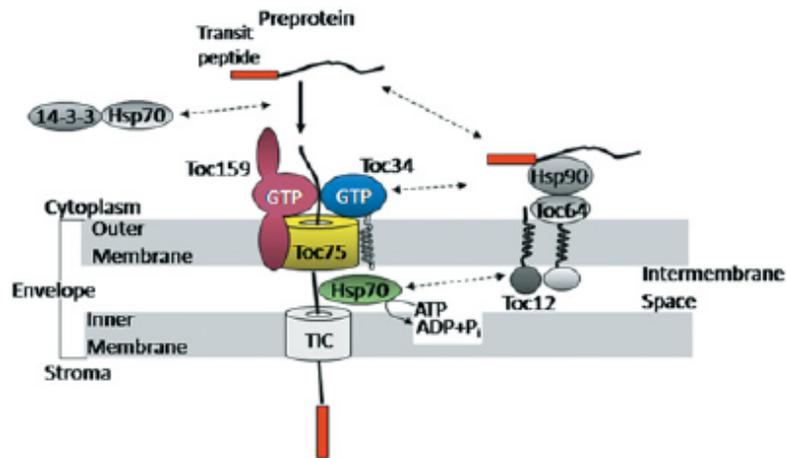


Figura 9. Componentes conocidos que constituyen al complejo TOC. El complejo consiste en dos GTPasas receptoras, Toc 34 y Toc 159, y el canal proteico de translocación, Toc75. Un complejo guía que consiste en las proteínas 14-3-3 y Hsp70, así como el complejo Hsp90-Toc64-Toc12 se propone que ayudan para dirigir la preproteína a través del complejo TOC. Hsp70 situada en el espacio intermembranal, se propone que se une a las preproteínas a medida que emergen de este complejo para ayudar en la translocación y para prevenir el plegamiento de la preproteína. Tomado de: Inaba y Shnell, (2008).

Una gran cantidad de proteínas deben relocalizarse en otros espacios del plástido, como son la membrana o el lumen del tilacoide, por ejemplo. Este proceso requiere de dos pasos de importe, inicialmente los péptidos deben ser transportados al estroma y posteriormente el intermediario proteico se internaliza en la membrana del tilacoide, donde sufre un segundo procesamiento por una peptidasa específica del tilacoide. Por tanto, este tipo de proteínas tienen dos señales consecutivas. La primera es el péptido de tránsito de envoltura de la membrana externa con las características que se describieron en el párrafo anterior, y la segunda, es un péptido de transferencia tilacoidea (péptido de tránsito con señal bipartita). Existe una clara homología entre la maquinaria proteica de importe para las membranas tilacoideas y la usada o utilizadas por células procariontes durante la secreción de proteínas (Smeekens *et al.*, 1990).

Actualmente se conocen cuatro distintas vías para el transporte de proteínas del tilacoide codificadas en el núcleo (Figura 10). Tanto la vía denominada cpSec la cual tiene homología con el sistema de secreción de *E. coli* (Mitra *et al.*, 2006; Robinson y Collinson, 2006) y la vía cpTat (en inglés twin arginine translocation) (Chaddock *et al.*, 1995) que es dependiente del gradiente de pH del tilacoide. Estas están involucradas generalmente en el transporte de proteínas del lumen. Por otra parte la vía denominada cpSRP la cual guarda homología con los sistemas de reconocimiento de

partícula (SRP) para el retículo endoplásmico, el cual es dependiente de GTP (Keegstra y Cline, 2000). Y la vía espontánea, en donde las evidencias indican que muchas proteínas de la membrana del tilacoide se insertan en este sitio del tilacoide de una forma espontánea e inasistida y en la cual no se requiere la presencia de otras proteínas o energía (Jarvis y Robinson, 2004; Di Cola *et al.*, 2005). Ambas se utilizan principalmente para la inserción de proteínas integrales en la membrana del tilacoide. El importe de las vías cpSec, cpTat y cpSRP pueden ser clasificados como mecanismos “asistidos” los cuales implican numerosos componentes, al contrario de la vía de importe espontánea la cual no requiere factores adicionales de importe.

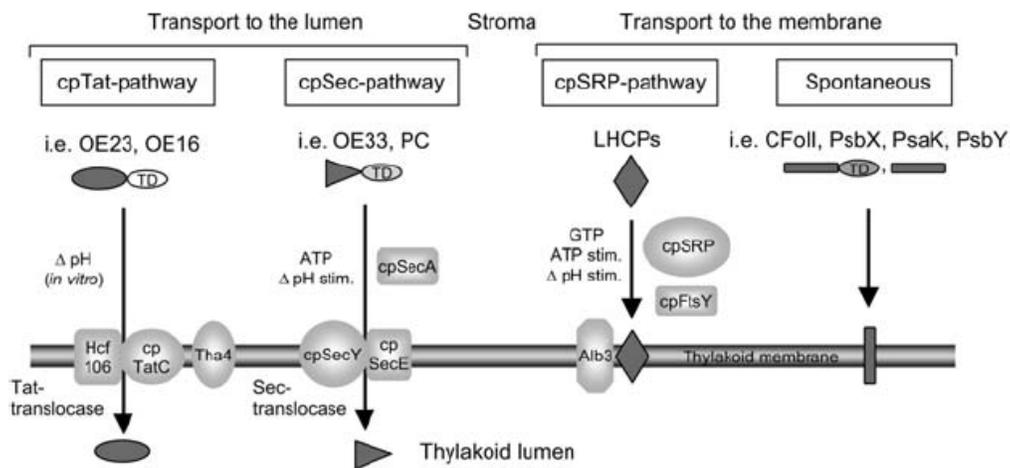


Figura 10. Vías de importe para proteínas del tilacoide codificadas en el núcleo . Cuatro distintas vías han sido descritas para la translocación traduccional de proteínas del estroma a la membrana del tilacoide o atravesando esta membrana hacia el lumen del tilacoide. El transporte hacia el lumen del tilacoide es mediado mediante la vías cpTat y la cpSec (cp, cloroplasto; Tat, en inglés twin arginine translocation; Sec, secreción). Sustratos proteicos para esta vías (ej., OE23, 23-kDA subunit of the oxygen- evolving complex; PC; plastocianina) requieren un dominio en el N-terminal (TD) que dirige a la proteína a la vía adecuada. Después de la translocación el péptido señal es removido por una peptidasa tilacoidal. La inserción de proteínas en la membrana del tilacoide es mediada por la vía cpSRP (en inglés, chloroplast signal recognition particle) y mediante procesos espontáneos de inserción. Como sustratos para la vía cpSRP solo miembros de las proteínas LHPs (light harvesting chlorophyll a/b binding proteins) se conocen. Tomado de Schünemann, (2007).

### 1.9. El péptido de tránsito

La mayoría de las proteínas plastídicas codificadas en el núcleo, contienen un péptido de tránsito en el extremo N-terminal, que contiene toda la información necesaria para su importe a los plástidos (von Heijne *et al.*, 1989; Bruce, 2000; Emanuelsson y von Heijne, 2001; Schein *et al.*, 2001; Zhang y Glaser, 2002; Kessler y Schnell, 2004; Schleiff y Soll, 2005). Proteínas que carecen un péptido de tránsito no pueden ser importados y si un péptido de tránsito es añadido en la N- terminal de una proteína foránea del cloroplasto, esta proteína precursora quimérica es importada. (Kadowaki, 1996; Dubi *et al.*, 2001). Las secuencias de los péptidos de tránsito a cloroplasto no muestran un consenso en secuencia y varían en extensión, en el rango de 13 a 146 aminoácidos aproximadamente (Bruce, 2001). Aún así desde un comienzo en su estudio se propuso que algún grado de reconocimiento debiera existir para el importe proteico

La adquisición de los péptidos de tránsito por parte de las proteínas plastídicas, es uno de los eventos críticos durante la evolución de los plástidos (McFadden, 1999). Diversos estudios han probado la forma en cómo estos se desarrollaron durante el proceso de endosimbiosis plastídico y se ha propuesto que las proteínas adquirieron estos péptidos mediante, splicing alternativo, duplicación génica y/o mediante intercambio de exones (en inglés, shuffling exon) (Gantt *et al.*, 1991; Arimura *et al.*, 1999; McFadden, 1999). A pesar de los muchos estudios en este tema, el origen evolutivo con péptido de tránsito de las proteínas codificadas en el núcleo, aún se investigan. Otra pregunta importante es la naturaleza de la información codificada por el péptido de tránsito. Esta cuestión se ha estudiado desde distintos enfoques (von Heijne *et al.*, 1989; Rensink *et al.*, 1998; Wienk *et al.*, 1999). Una forma es el tratar de determinar la información contenida en la secuencia del péptido y elucidar la forma en que ésta información afecta el importe de la proteína plastídica dentro de los cloroplastos. Esta información en la secuencia se puede determinar mediante la identificación de motivos o dominios implicados en la interacción con factores de importe, tales como receptores, proteínas heat shock y/o proteínas guía, que juegan funciones importantes en diferentes pasos del proceso de importe. Este tipo de análisis han mostrado que los péptidos de tránsito están compuestos de múltiples dominios (Rensink *et al.*, 1998; Gutensohn *et al.*, 2000; Rial *et al.*, 2000; Hinnah *et al.*, 2002; Jarvis y Soll, 2002; Becker *et al.*, 2004; Kessler y Schnell, 2004; Smith *et al.*, 2004).

También se han realizado estudios con otro enfoque para entender la información contenida en la secuencia, mediante análisis bioquímicos de la estructura de los péptidos de tránsito. En solución acuosa, estos no poseen estructura definida (Wienk *et al.*, 1999). Sin embargo, en soluciones acuosas que contienen detergentes o en soluciones que mimetizan a las membranas, como es el caso del trifluoroetano, los péptidos de tránsito forman estructuras  $\alpha$ -helicoidales (Wienk *et al.*, 1999, 2000). Estos resultados sugieren que los péptidos de tránsito forman estructuras helicoidales durante su asociación con los receptores de las membranas. Además, diversos estudios bioinformáticos han sido utilizados para analizar las secuencias de aminoácidos de todos los péptidos de tránsito hasta la fecha registrados (en inglés, transit peptidome), en donde se ha revelado que existe una gran preferencia por aminoácidos cargados positivamente (ej., Ser, Thr y Pro) y una carencia de aminoácidos ácidos en el peptidoma. Así como un alto grado de hidrofobicidad en el extremo 5' de estos péptidos (von Heijne *et al.*, 1989; Zhang y Glaser, 2002; Bhushan *et al.*, 2006) (Figura 11).

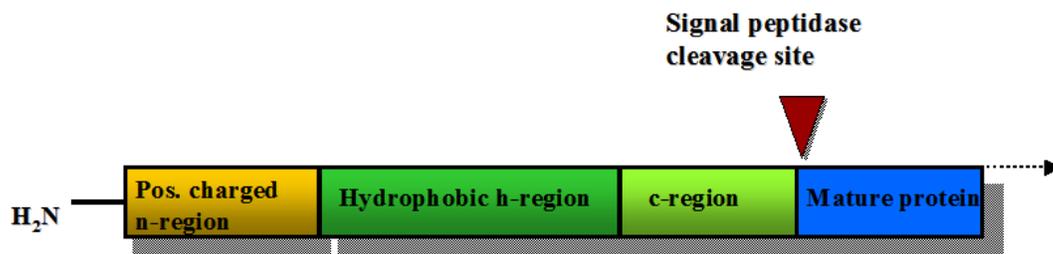


Figura 11. Estructura típica de un péptido de tránsito. Los péptidos de tránsito no consisten en una secuencia consenso estricta. Pero en estos se han identificado tres regiones importantes: una región N-terminal cargada positivamente (n- region), una región central hidrofóbica (h-region) y una región C-terminal neutral polar (c -region). Modificado de Molhoj y Dal Degan, (2004).

Recientemente, el análisis de péptidos de tránsito previamente demostrados experimentalmente de 208 proteínas, mostró que las secuencias de estos pueden agruparse en múltiples subgrupos. La selección de proteínas representativas de 7 subgrupos y su posterior análisis confirmó que los péptidos de tránsito de estas son muy distintos entre sí. Posteriormente, experimentos de importe de proteínas revelaron que cada una de estas proteínas contienen motivos críticos en la secuencia del péptido de tránsito para el importe hacia cloroplastos. Análisis bioinformáticos apoyaron estos resultados, por lo tanto, se propone que los péptidos de tránsito se

pueden agrupar en múltiples subgrupos de secuencia que contienen motivos particulares para el importe a cloroplastos (Lee *et al.*, 2008).

#### 1.10. **Compartimentalización del metabolismo vegetal**

Una de las características de las células eucariontes es la compartimentalización del metabolismo y otras funciones celulares en diferentes organelos; a pesar de esta división de labores, el metabolismo en cada compartimiento depende de otras partes de la célula para abastecerse de energía en forma de ATP, o de precursores metabólicos. Además, todos los compartimientos dependen en menor o mayor medida del núcleo y de los ribosomas citoplásmicos para proveerse de la mayoría, sino de todas sus enzimas y proteínas (Lunn, 2007).

Para entender cómo una célula eucarionte realmente funciona, es necesario identificar la localización de las enzimas y proteínas regulatorias dentro de la célula durante un tiempo particular del desarrollo y/o bajo condiciones ambientales particulares. Saber el lugar en donde una enzima particular realiza su función es una información esencial para entender su regulación y para empezar a comprender la compartimentalización celular del metabolismo en cuestión. El funcionamiento de las células vegetales en particular es todo un reto debido a la presencia de compartimientos subcelulares adicionales característicos como: plástidos, pared celular, vacuolas etc. que no están presentes en otras células eucariotes. El entendimiento sobre la forma en que se encuentran ligados los distintos compartimientos, los procesos entre estos y su regulación, por ejemplo, son puntos que aún están lejos de ser comprendidos.

### 1.10.1. La proteína verde fluorescente (GFP): una metodología y aplicación para estudiar la compartimentalización celular en plantas.

La pared celular de las células vegetales es la gran barrera para la visualización y entendimiento de los procesos subcelulares en las plantas vivas. Tradicionalmente, los científicos maceraban, seccionaban o degradaban mediante soluciones enzimáticas la pared celular, para tener acceso a los compartimentos internos de la célula vegetal. A pesar de que las observaciones detalladas de estas metodologías constituyen los fundamentos de la biología vegetal, la realidad es que muchas descripciones son extrapoladas de observaciones hechas con materiales fijados, es decir, tejido muerto. Con la ventaja del microscopio de fluorescencia y la viabilidad de marcadores fluorescentes, los biólogos vegetales han obtenido en un periodo relativamente corto una nueva forma de estudiar la célula *in vivo*.

La clonación de la proteína verde fluorescente (GFP), de la medusa *Aequorea victoria*, ha estimulado un gran interés entre los biólogos moleculares y aquellos que estudian células desde su publicación por Chalfie *et al.*, (1994). Esta proteína está constituida por 238 aminoácidos, que forman once cadenas beta, cuyo conjunto forma un cilindro, en el centro del cual se encuentra una hélice alfa. (Figura 12). La GFP original de la medusa posee dos picos de excitación: uno menor, a 475 nm, y uno mayor, a 395nm. Su pico de emisión está a 509 nm, en la zona verde del espectro de luz.

La expresión de los genes que codifican a la GFP dentro de las células hizo posible la realización de experimentos inimaginados 10 años atrás; la proteína GFP sirve como un marcador molecular que puede ser observada dinámicamente en células vivas, tanto en su forma nativa así como de manera fusionada con otras proteínas. Las secuencias codificantes de esta proteína se fusionan tanto en el extremo terminal 5' como 3' de la región codificante de una secuencia de DNA de interés, dando como resultado la producción de fusiones de GFP N-terminal y C-terminal, estos genes quiméricos se han incorporado en plantas transgénicas estables, o introducidas dentro de células vegetales para su expresión transitoria. La producción de plantas transgénicas estables tienen la ventaja de que muchos tipos celulares pueden ser examinados en donde la fusión GFP/proteína es expresada; mientras que no todos los tipos celulares son técnicamente viables a través de la expresión transitoria.

Actualmente, la imagen con GFP ha revelado mucho más sobre las células animales y de levaduras que de las células vegetales, debido a problemas que se tenían con el uso del gen GFP de la medusa en las plantas; el gen animal original contiene secuencias que son reconocidas erróneamente como intrones en plantas, llevando a

niveles pobres de expresión (Haseloff *et al.*, 1997; Rouwendal *et al.*, 1997). Sin embargo la producción y distribución de diversas variantes de GFPs: modificadas, termoestables y con mayor fluorescencia, han permitido muchos experimentos con sistemas vegetales (Reichel *et al.*, 1996; Chiu *et al.*, 1996; Pang *et al.*, 1996; Davis y Viestra, 1998; Haseloff *et al.*, 1997; Haseloff, 1999). Obviamente la selección de la variante apropiada es una decisión crítica durante el diseño experimental. Hoy en día existen versiones modificadas de la GFP, que fluorescen en otros colores tales como: el rojo (RFP), el amarillo (YFP) o el azul (CFP). Además, estas proteínas originales han sido modificadas para mejorar su funcionamiento. Uno de los resultados de estas mejoras es la proteína verde fluorescente mejorada (o EGFP, por sus siglas en inglés, "enhanced green fluorescent protein"). Todas estas han ayudado más al entendimiento de la célula vegetal mediante su uso en diversas técnicas (Kohler *et al.*, 1997; Logan, 2007; Mathur *et al.*, 2002, 2003; Dhonukshe y Gadella, 2003).

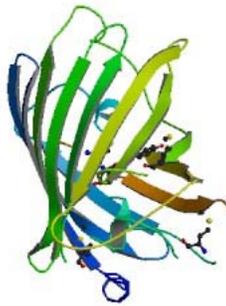


Figura 12. Estructura tridimensional de la proteína verde fluorescente (GFP). Proteína de 238 aminoácidos producida por la medusa *Aequorea victoria*, que emite bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible. El gen que codifica esta proteína está aislado y se utiliza habitualmente en biología molecular como marcador.

Una de las grandes ventajas de la GFP como un marcador fluorescente, es que no se necesita de un cofactor exógeno (Chalfie *et al.*, 1994), además de que la GFP puede ser expresada dentro de tejidos intactos y monitorear procesos sin el disturbio causado por la introducción de agentes químicos.

Debido a su pequeño tamaño de 238 aminoácidos (26.9 kDa), la GFP puede entrar a los poros nucleares, por lo que la GFP que no se fusiona a otros polipéptidos se localiza en el citoplasma como en el núcleo de plantas, animales y levaduras (Grebek *et al.*, 1997; Köhler *et al.*, 1997; Haseloff y Siemering, 1998). La fusión de diversas secuencias resulta en la fluorescencia de la GFP solamente en el núcleo,

llevando a la conclusión que la secuencia fusionada codifica para una proteína localizada en este sitio.

La fusión de otras proteínas de destino incierto han revelado la compartimentalización en plástidos, mitocondria, citosol, retículo endoplásmico, aparato de Golgi. Por ejemplo, fusiones de genes homólogos a las RNA polimerasas revelaron que uno de estos se localiza en la mitocondria y el otro es transportado hacia el cloroplasto (Hedtke *et al.*, 1999). El éxito de las fusiones con GFP para determinar la localización subcelular de proteínas codificadas por cDNA's desconocidos, ha permitido el desarrollo de un método conocido como "Motif Trap" en donde fragmentos aleatorios de DNA se fusionan a la GFP, mientras que células que expresan esta proteína en varios compartimentos celulares son aisladas, y posteriormente los fragmentos que expresan se clonan por RT-PCR (Bejarno y González, 1999).

Además de permitir determinar la localización para proteínas particulares, las fusiones con GFP con péptidos de tránsito con proteínas enteras pueden ser usadas para el marcaje de compartimentos particulares (Köhler, 1998). De esta forma el propósito de estudiar la forma, tamaño, número, movilidad, interacción entre diversos organelos, permite la observación de cambios dinámicos durante el desarrollo y/o respuestas ambientales de los diferentes compartimentos celulares. Algunos ejemplos (Figura 13) de este tipo de marcaje con GFP se publicaron para la vacuola (Di Sansebastiano *et al.*, 1998), peroxisomas (Mano *et al.*, 1999), Golgi (Boevink *et al.*, 1998; Essl *et al.*, 1999), mitocondria (Köhler *et al.*, 1997; Yasuo *et al.*, 1999; Logan y Leaver, 2000), plástidos (Köhler *et al.*, 1997; Hedtke *et al.*, 1999; Jang *et al.*, 1999; Tirlapur *et al.*, 1999; Köhler y Hanson, 2000), citoesqueleto (Kost *et al.*, 1999; Ueda *et al.*, 1999; Hasezawa *et al.*, 2000), membrana plasmática (Bischoff *et al.*, 2000), pared celular (Scott *et al.*, 1999) y retículo endoplasmático (Haseloff y Siemering, 1998). Una de las aplicaciones en el marcaje de compartimentos que aún no ha sido explotado en los sistemas vegetales es el marcaje en sí con la proteína GFP, para facilitar el aislamiento de éstos. Galbraith y colaboradores (1999) demostraron que el núcleo marcado con GFP puede ser separado de la célula de manera sencilla.

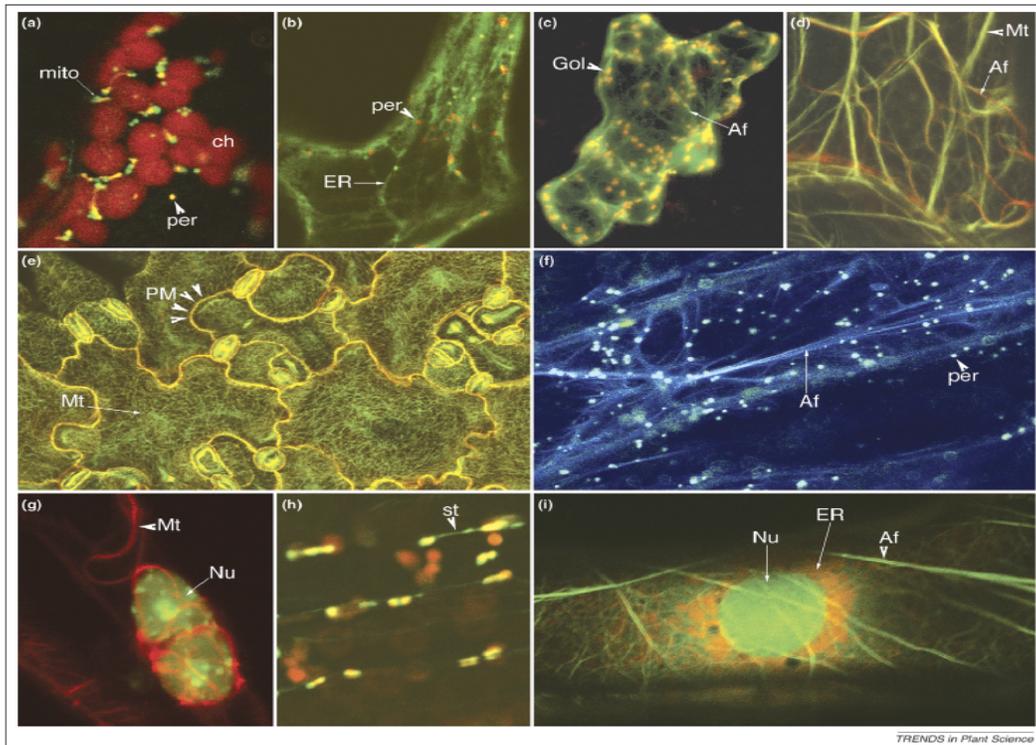


Figura 13. Líneas transgénicas en *Arabidopsis thaliana* con combinaciones de distintos marcadores dirigidos hacia diferentes organelos y compartimentos, con la finalidad de visualizar *in vivo* la célula vegetal. (a) cloroplastos (ch; autofluorescencia roja), mitocondria (mito; fluorescencia verde) y peroxisomas (per; fluorescencia amarilla). (b) per; peroxisomas y ER; retículo endoplásmico. (c) Gol; cuerpos de Golgi, af; microfilamentos de actina. (d) citoesqueleto (af; microfilamentos de actina), (mt; microtúbulos) (e) MP; membrana plasmática y Mt; microtúbulos. (f) per; peroxisomas, Af; filamentos F actina. (g) Un; núcleo, Mt; mitocondria. (h) st; estrómulos conectando a cloroplastos. (i) Nu; núcleo af; filamentos F actina, ER; retículo endoplásmico. Tomado de Mathur, (2007).

## 2. ANTECEDENTES

Mediante el método de selección y caracterización de mutantes incapaces de acumular pigmentos, en el laboratorio se aisló a partir de una colección de plantas mutantes de *A. thaliana*, generada por la inserción del T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens*, la mutante albina denominada *cla1-1* (por cloroplastos alterados) (Mandel *et al.*, 1996) (Figura 14A). La caracterización inicial de *cla1-1*, mostró que la mutación provoca alteraciones en la morfología de los cloroplastos. Estos organelos en la planta mutante se encuentran no diferenciados y se asemejan a proplástidos. En esta mutante los cloroplastos se caracterizan por la ausencia de membranas tilacoideas y por la formación de espacios en forma de vesículas (Figura 14B). También se observó que la producción de pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides) vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) y hormonas (ABA) estaban fuertemente disminuidas (Figura 14C), lo cual explicaba el fenotipo albino (Mandel *et al.*, 1996; Estévez *et al.*, 2000).

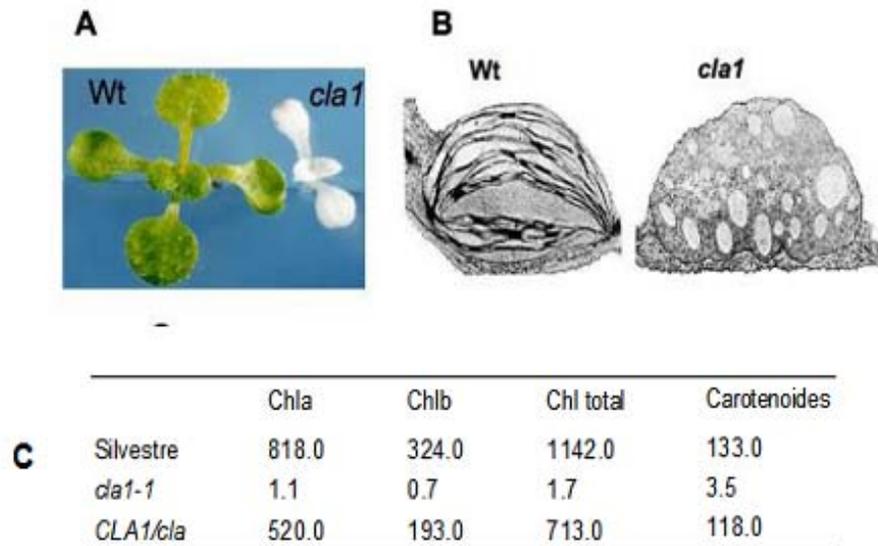


Figura 14 A) Fenotipo de la planta mutante *cla1-1* comparada con una planta de tipo silvestre (wt). B) Microscopía electrónica de los cloroplastos de la planta mutante *cla1*, comparados con los de una planta de tipo silvestre (Wt) en la que se aprecia un desarrollo normal de las membranas. C) contenido de clorofilas y carotenoides totales en plantas silvestres, mutante *cla1-1* y heterocigota *CLA1/cla1*. Los pigmentos fueron extraídos de plantas de 15 días de edad crecidas en MG. La concentración de pigmentos esta expresada como  $\mu\text{g}$  de pigmento por gramo de tejido fresco. Modificado de León y Guevara (2007).

Asimismo, su caracterización molecular mostró que el T-DNA interrumpió en la secuencia codificante del gen *CLA1*, por cloroplastos alterados (Mandel et al., 1996). Inicialmente se encontró que la proteína CLA1 tenía homología con enzimas del tipo transcetolasas cuya función es la transmisión de grupos cetoles (Strayer et al., 2002). Además, se observó que la proteína CLA1 conservaba las secuencias características de este tipo de proteínas, tales como los sitios de unión al cofactor tiamina difosfato (TPP) que sirve como cofactor en su reacción catalítica y el motivo transcetolasa.

Análisis posteriores revelaron que la proteína CLA1 presentaba similitud con un nuevo tipo de transcetolasa, la 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa (DXS). El alineamiento entre la proteína CLA1 y la DXS de *E. coli* mostró un 63% de identidad. Además, se observó que en ambas proteínas el sitio de unión a TPP y el motivo transcetolasa estaban conservados. Las características fenotípicas de la mutante *cla1-1*, así como la alta similitud entre la enzima DXS y el producto del gen *CLA1*, sugirieron que éste último podría codificar la 1-desoxi-D-xilulosa 5 fosfato sintasa de *A. thaliana*. La complementación *in vivo* de la mutante *cla1-1* 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).

Estudios de cristalografía de la DXS de *E. coli* confirmaron que la estructura de esta proteína contiene tres dominios (I, II y III), los cuales presentan similitud a los dominios equivalentes en las transcetolasas. Sin embargo, DXS posee un arreglo distinto de estos dominios, ya que el sitio activo de DXS es localizado en la interfase de los dominios I y II en el mismo monómero. En cambio, para otras transcetolasas éste se encuentra en la interface del dímero (Xiang et al., 2007).

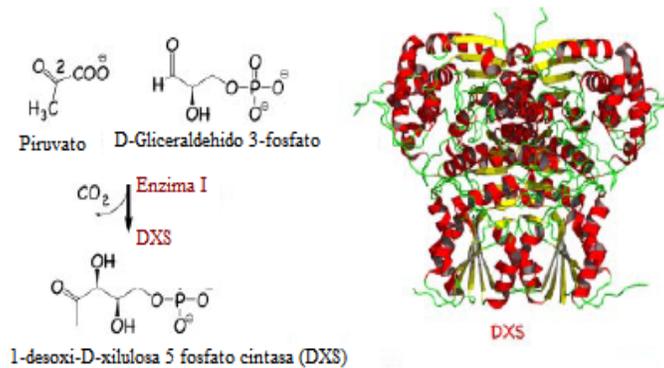


Figura 15. Reacción catalizada por la enzima DXS y su estructura. El diagrama muestra los elementos de estructura secundaria presentes en la enzima DXS de *E. coli*. Modificada de Hunter, (2007).

Por otro lado, se demostró que CLA1/DXS1 posee en el extremo amino terminal un péptido de importe a plástidos (PTP). Mediante ensayos de expresión transitoria usando el péptido de tránsito fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP) se demostró que CLA1/DXS1 es transportada a cloroplastos (Estévez, 2002). Estos estudios también apoyaron que el gen *CLA/DXS* codifica para la enzima DXS de *Arabidopsis*. También se demostró la funcionalidad del péptido de tránsito y la eventual localización subcelular en los plástidos para la DXS de tomate (Lois *et al.*, 2000) y soya (Zhang *et al.*, 2008), por citar algunos ejemplos.

### 1.1. DXS es codificada por una familia génica en plantas.

Hoy en día se sabe que los genes *dxs* son parte de una familia multigénica pequeña en plantas, tanto mono como dicotiledóneas (Walter *et al.*, 2000, 2002; Rodríguez-Concepción *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 2007; Phillips *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009). En *A. thaliana* se vió mediante secuencias genómicas de EST's que existían tres proteínas homólogas a DXS en el genoma de esta planta. Pero hasta el momento sólo se ha demostrado la función bioquímica para CLA1/DXS1 (Estevez *et al.*, 2000; Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002). En arroz existen tres grupos independientes de DXS y en situación similar están las plantas *Medicago truncatula* y *Picea abies* (Chahed, *et al.*, 2000; Walter *et al.*, 2000, 2002; Kim, *et al.*, 2005). La

presencia de diversas isoformas de DXS sugirió que la biosíntesis de ciertos isoprenoides dependen de la actividad particular de alguna de las isoformas de DXS. (Lichtenthaler, 1999; Walter *et al.*, 2002) (Figura 16). Esto es parecido a lo que se reportó para las terpeno sintasas (Trapp y Croteau, 2001).

El análisis de expresión de distintos genes *dxs* en plantas efectivamente sugieren, que los genes *DXS1* (*CLA1*) de *Arabidopsis* y *OsDXS1* de arroz tienen una función primaria, por ejemplo en la fotosíntesis (Kim *et al.*, 2005). En contraste, para otros genes *DXS* como *MtDXS2* de *Medicago*, *OsDXS3* de arroz o *PaDSX2A* y *PaDXS2B* de *Picea*, se propone que están involucrados en mecanismos de defensa y/o la producción de metabólicos secundarios. Su expresión es únicamente en sitios restringidos (Okada *et al.*, 2007; Phillips *et al.*, 2007; Floss *et al.*, 2008).

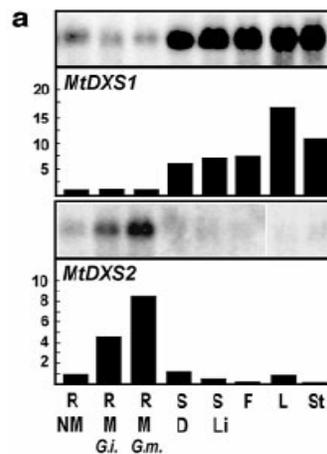


Figura 16. Expresión diferencial de las dos clases de *DXS* en *Medicago truncatula*. Niveles de transcrito (mRNA) de los genes *dxs1* y *dxs2* en varios órganos y tejidos de la planta. Detectada con la sonda de *MtDXS1* (panel superior) y subsecuentemente con la marca de *MtDXS2* (panel inferior). Las raíces fueron de plantas de 12 semanas de edad, hojas y tallos fueron de plantas verdes de 6 semanas y las plántulas de 10 días, todas las flores utilizadas estaban en antesis o inmediatamente después de este evento, Abreviaturas: R, raíces; S, plántulas; F, flores; L, hojas; St, tallos; K, granos; NM, no micorriza (control); M, micorriza; D, en obscuridad; Li, luz normal; G.i., *Glomus intraradices*; G.m., *Glomus mosseae*. Tomado de Walter *et al.*, (2002).

### 1.1.1. La vía MEP en plantas está sujeta a regulaciones múltiples.

En nuestro grupo, estudios iniciales del patrón de expresión espacial y temporal de CLA/DXS1 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. Además, los requerimientos de la enzima DXS son mayores en estadios tempranos del desarrollo y en tejidos jóvenes de la planta (Estévez, 2000). Por otro lado, análisis comparativos de expresión de los genes de la vía MEP bajo diferentes condiciones de crecimiento indican que la acumulación de los niveles del transcrito de estos genes esta modulada por múltiples señales en *A. thaliana*, tales como la luz, el ritmo circadiano y/o por azúcares (Guevara-García *et al.*, 2005). Un aspecto interesante de estos estudios es que varias de estas respuestas analizadas a nivel transcripcional siguen una regulación coordinada entre todos los genes de la vía. Resultados similares también se han obtenido también por otros grupos (Hsieh y Goodman, 2005).

Además de la mutante *cla1-1*, la caracterización en el laboratorio de otras mutantes albinas de la colección (denominada *clb*, *chloroplast biogenesis*), como es el caso de las mutantes *clb4* y *clb6* que están afectadas en los genes *DHS* y *DHR*, respectivamente, permitió mostrar que los genes de la vía MEP actúan de forma no autónoma, es decir, que su función puede ser parcialmente compensada en el embrión por productos provenientes del tejido materno (Gutiérrez-Nava *et al.*, 2004).

El transcrito de DXS se acumula en tejidos vegetales con alta demanda de isoprenoides, incluso durante la maduración del fruto como en el caso del tomate o pimiento (Bouvier *et al.*, 1998; Lois *et al.*, 2000; Enfissi *et al.*, 2005), en los tricomas de *Mentha piperita* (Lange *et al.*, 1998) o en las plántulas de *A. thaliana* (Estévez *et al.*, 2000). Evidencia directa de la función limitante del gen *DXS1* en la vía se demostró en el laboratorio, a través de la manipulación de sus niveles en plantas transgénicas. Esto permitió establecer a la enzima DXS como un paso limitante para la síntesis de IPP y DMAPP en plantas (Estévez *et al.*, 2001). Dentro de cualquier ruta biosintética algunas de sus enzimas limitan el flujo de la vía. De ellas dependen en gran medida los niveles de actividad y eficiencia con que trabaja la vía. En consecuencia, muchas de las enzimas “limitantes” de una vía biosintética están sujetas a diversos mecanismos de regulación que modulan sus niveles o su actividad, estas regulaciones por ende tienen un efecto directo sobre los niveles de los productos finales generados en dicha vía.

Resultados similares han sido observados en otras plantas como tomate (Lois *et al.*, 2000) o *Ginkgo biloba* (Gong *et al.*, 2006) por citar algunos ejemplos.

En nuestro grupo, a través de la caracterización de la mutante *clb6*, afectada en el gen *HDR*, se ha evidenciado una regulación postranscripcional que modula la acumulación de la proteína limitante DXS. Se propone que esta regulación se debe a un mecanismo de retroalimentación que aparentemente puede modular el flujo de la vía en respuesta a la demanda de los productos finales IPP y DMAPP (Guevara *et al.*, 2005). Se sugiere que este mecanismo de regulación está conservado en varias especies vegetales. Sin embargo, aún no es claro si otros miembros de la familia DXS en otras plantas se regulan de la misma forma.

Recientemente, mediante el análisis de la mutante *clpr1-2*, afectada en el complejo plastídico Clp con función de peptidasa, presenta el fenómeno de acumulación de la proteína DXS, lo que sugiere que este complejo se encuentra involucrado en la regulación post-transcripcional de esta enzima (Flores-Pérez *et al.*, 2008).

## 2.2 ANTECEDENTES DIRECTOS

En nuestro grupo, se decidió ampliar los estudios para el caso de la DXS en la planta de maíz (*Zea mays*). Debido a que estudios detallados sobre la expresión de genes DXS y su regulación, aún no habían sido reportados hasta la fecha para una planta monocotiledónea. Para aislar genes *dxs* de maíz y empezar su caracterización, oligonucleótidos fueron diseñados a partir de una región conservada entre el gen *DXS/CLA1* de *A. thaliana* (*At4g15560*) y los genes *dxs* de bacterias (*E. coli*, número de acceso Gene Bank BAB33897.1, y *Rhodobacter capsulatus*, número de acceso Gene Bank CAA77557) (Mandel *et al.*, 1996; Sprenger *et al.*, 1997; Hahn *et al.*, 2001). Estos oligonucleótidos fueron utilizados para amplificar DNA genómico de maíz mediante PCR, de donde un fragmento de 911 pb fue aislado. Posteriores análisis de este fragmento confirmaron su homología con el gen *DXS/CLA1* de *A. thaliana*, mostrando incluso similitud en secuencia con varias anotaciones registradas en la base de datos de maíz (Maize genomic database, en inglés) (<http://www.maizegdb.org/>). La similitud de las secuencias de maíz fluctuaban entre el 99.9% (AW424625) a 70% (AW267504); ésto sugería que los registros posiblemente correspondían a diferentes genes *dxs* de maíz. Un análisis más detallado de los fragmentos derivados de la base de datos de maíz, permitieron diferenciar tres genes potenciales de *dxs*, basados en identidad de nucleótidos. Estos resultados apoyaban reportes previos sobre la existencia de diferentes genes *dxs* en el genoma de maíz (Walter *et al.*, 2000; 2002).

Para obtener la secuencia completa de los diferentes *dxs* de maíz, varias estrategias se llevaron a cabo. Una biblioteca genómica de maíz (Stratagene) fue analizada, utilizando como sonda al fragmento de DNA de 911 pb amplificado por PCR. De este se seleccionó una clona positiva (421) y su identidad se confirmó mediante su secuenciación (desde ahora se le referirá como *dxs1*). Sin embargo, esta clona (número de acceso GenBank. AY951981) estaba incompleta porque solo contenía una parte del marco abierto de lectura. Incluyendo el codón de inicio, además de tres intrones, pero faltándole la parte que codifica para el extremo C-terminal. La secuencia completa del gen *dxs1* fue finalmente obtenida mediante la secuenciación de un EST (por sus siglas en inglés Expressed Sequence Tag) obtenida de la base de datos de maíz (número de acceso GenBank CF649815). Este EST contiene el marco abierto de lectura (en inglés, ORF) de DXS, además de las secuencias 5' y 3' de UTR (por sus siglas en inglés Untranslated Transcript Region). Posee además 100% de identidad con la clona genómica 421. La secuencia del gen *dxs2* fue obtenida mediante la amplificación directa por PCR de un fragmento de DNA genómico de maíz. Oligonucleótidos

específicos para el PCR fueron diseñados en base a un contig hipotético (reconstrucción de un fragmento de DNA a partir de un juego de fragmentos de DNA que se superponen entre sí) reconstruido a partir del fragmento de 911 pb (núm. acceso GenBank AY944061) y tres clonas adicionales (CG162236, CG319422 y AW424625) depositadas en la base de datos de maíz. Estos oligonucleótidos amplificaron un producto de PCR de 2.1 Kb. La secuenciación del producto de PCR mostró que se tenía el ORF completo de *dxs2*. Asimismo, este mostró la presencia de un supuesto intrón (116 pb) en la posición 1875.

Los análisis iniciales en la base de datos de maíz mostraron una clona adicional que presentaba homología con DXS y que posiblemente codificaba para un gen adicional *DXS*. Finalmente, el tercer gen fue obtenido mediante RT-PCR (Reverse transcriptase PCR) utilizando oligonucleótidos específicos basados también en un contig hipotético de la base de datos de maíz. Con estos cebadores, un fragmento específico de cDNA fue amplificado. La secuenciación de este cDNA demostró que contiene el ORF completo y el 3' UTR de un tercer gen *dxs*, designado *dxs3*.

Los ORFs deducidos para los genes *dxs1*, *dxs2* y *dxs3* de maíz consisten en 718, 674 y 722 residuos aminoácidos, respectivamente.

La similitud existente entre las tres proteínas DXS es del 77.3%, en donde DXS3 es la más lejana de las tres. También hay similitud entre estas proteínas DXS de maíz y la DXS de *A. thaliana* (76% tanto para DXS1 y DXS2) y con la bacteria *Deinococcus radiodurans* (53% para DXS1 y 54% para DXS2). Estas proteínas conservan los tres dominios característicos de la DXS bacteriana (Xiang et al., 2007). También se encuentran conservados los aminoácidos característicos del sitio activo como His (110/104; *dxs1* / *dxs2*), Tyr (467/461) y Asp (502/500), aparentemente involucrados en la unión a la molécula gliceraldehído 3-fosfato (Xiang et al., 2007). Los residuos Glu (445/439), Arg (495/496) y Arg (553/547) que son cruciales para la catálisis, así como el dominio transcetolasa de unión tiamina disfosfato (TPP) (localizados en las posiciones 227-246 para DXS1 y 223-242 para DXS2) también se encuentran conservados.

Para obtener una mejor panorámica acerca de las relaciones filogenéticas de las proteínas DXS de maíz con aquellas de otros organismos se construyó un árbol parsimonioso, en donde se incluyen proteínas representantes *DXS* de diferentes plantas, así como de los procariontes *Synechococcus elongatus* y *Deinococcus radiodurans* como referencia. El análisis únicamente incluyó secuencias que contenían un ORF completo. El árbol filogenético mostró tres grupos independientes de proteínas

DXS conservadas entre las plantas. Uno de los grupos, previamente referido como DXS1 (Walter *et al.*, 2002), incluye proteínas de *Arabidopsis* (DXS1), *M. truncatula*, *Oryza sativa*, *Capsicum annuum* (pimiento) y *S. lycopersicum*. Este grupo incluso agrupa también a la DXS2 de *Arabidopsis* (At4g15560), cuya función aún no está demostrada. La familia Poaceae, representada por la DXS1 de maíz y una DXS de arroz (DXS1), se agrupan en un clado común. Un segundo grupo en este árbol incluye la DXS2 aislada de maíz, la DXS2 de *M. truncatula* y proteínas DXS de *Narcissus pseudonarcissus*, *C. roseus*, *Morinda citrifolia*, *Tagetes* y *M. piperita*. Se sabe que los miembros de este grupo son esenciales particularmente para la síntesis de carotenoides en raíz (Floss *et al.*, 2008). Finalmente, este análisis mostró un tercer grupo filogenético que incluye al gen *dxs3* de maíz. Otras proteínas parecidas a DXS3 de diferentes especies también se sitúan en este grupo, por ejemplo la DXS3 de *Arabidopsis* (Kim *et al.*, 2005). Este grupo está conservado en diferentes especies de plantas, además es el grupo filogenéticamente más distante de DXS. Las proteínas DXS de *Synechococcus elongatus* y *Deinococcus radiodurans*, se agruparon en un clado distinto.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El maíz es uno de los cultivos agrícolas más importantes del mundo (FAO, 1986), y en consecuencia, esta planta es de gran interés para su eventual manipulación genética. En México este cultivo es el más importante, alrededor de 3.2 millones de agricultores producen anualmente más de 18 millones de toneladas de maíz sobre una superficie aproximada de 8,5 millones de hectáreas. Que equivalen al 60 % de la producción de granos en el país (SAGARPA, 2000).

El estudio de la vía MEP es sumamente importante para contribuir al conocimiento de la síntesis de isoprenoides, los cuales son indispensables para el desarrollo y crecimiento de las plantas, así como por la producción de compuestos de gran interés comercial con alto potencial biotecnológico. Sin embargo, por tratarse de una ruta metabólica recientemente descubierta, aún se desconocen muchos aspectos de ésta, en particular de su regulación. Por esto, en años recientes se ha empezado a extender el análisis de los genes de la vía MEP al grupo de las gramíneas, específicamente en *Zea mays*.

Para apoyar en la caracterización de la enzima DXS (1-deoxi-D-xilulosa 5 fosfato sintasa) en *Zea mays*, establecer la localización subcelular para cada uno de las DXS dentro de la célula vegetal es necesario. Resulta interesante mencionar que a diferencia de *A. thaliana*, en donde al parecer un sólo gen es responsable de la expresión mayoritaria de la enzima DXS, en maíz se han identificado por lo menos tres DXS con patrones de expresión diferentes. Estos estudios muestran la complejidad a la que está sujeta la expresión de esta enzima limitante en diferentes plantas y también abre una posibilidad para su eventual manipulación.

#### 4. HIPÓTESIS

Dado que los genes *dxs1*, *dxs2* y *dxs3* poseen una alta identidad con DXS, y debido a que todos sus ortólogos en varias especies poseen un péptido de tránsito para su importe al cloroplasto, es muy probable que los homólogos de DXS en maíz también incluyen en su secuencia un péptido de tránsito funcional.

#### 5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la localización subcelular de los productos génicos de los tres genes con homología con DXS en *Zea mays*.

##### 4.1. Objetivos particulares

- a) Predecir *in silico* los péptidos de tránsito de importe a plástidos (PTP) de la secuencia codificante de *dxs1*, *dxs2* y *dxs3*.
- b) Realizar fusiones traduccionales de la secuencia codificante para los supuestos péptidos de tránsito de cada DXS de *Zea mays*, con la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP).
- c) Expresar transitoriamente las fusiones traduccionales en protoplastos de *A. thaliana*.
- d) Establecer el sistema de expresión transitoria en *Zea mays*.
- e) Localizar subcelularmente las fusiones traduccionales generadas en *Zea mays* mediante microscopía confocal.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1. Material biológico**

El ecotipo de *A. thaliana* utilizado fue Columbia (Col-0), para la transformación transitoria de protoplastos. Para el caso de la transformación de protoplastos de maíz, se utilizaron semillas de la compañía Monsanto.

### **6.2. Obtención de acidos nucleicos**

#### **5.2.1. Extracción de DNA genómico de maíz**

Semillas de maíz fueron sembradas en macetas con sustrato vermiculita / Metro-Mix 200 y se colocaron en el cuarto de iluminación (Temp. 18°C ) durante 2 semanas. Al cumplir la edad, de 3 a 6 hojas fueron cortadas y se congelaron con nitrógeno líquido (-70°C). Posteriormente, el tejido se molió hasta que se obtuvo un polvo fino el cual se colocó dentro de tubos eppendorff. Se adicionó .5ml de CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide) nuclear (ver anexo) mezclandose con el extracto vegetal y se incubó esta durante 30 minutos a 60°C. Transcurrido el tiempo, la muestra se dejó a temperatura ambiente por un momento y se adicionó la mitad del volumen de cloroformo / isoamílico (100ml. = 96ml + 4ml. Alcohol isoamílico), aprox. 250µl, y se mezcló por inversión cuidadosamente durante 10 min. Después se centrifugó a (14000 rpm.) por 5 min. a temperatura ambiente y al concluir, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se adicionó 1/10 del volumen de CTAB 10% (ver anexo), aprox. 50µl y se repitió la extracción con cloroformo / isoamílico. En un nuevo tubo se transfirió el sobrenadante y se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto, mezclando cuidadosamente por inversión. El DNA se recobró por centrifugado (5min. a 14000 rpm.), se lavó con etanol al 70% y se volvió a recobrar. Estos pasos se realizaron en varias ocasiones de manera repetitiva hasta limpiar el DNA completamente. La pastilla de DNA obtenido se secó en el Savant y se resuspendió en 50 µl de H<sub>2</sub>O miliQ.

Finalmente se checó la concentración de DNA obtenido en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con Bromuro de Etidio.

### **6.2.2 Extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina (Miniprep)**

Cultivos bacterianos de interés fueron incubados en tubos con 5ml. de medio líquido (LB + antibiótico km<sup>50</sup>) durante 12 hrs a 37°C.

Se centrifugó 1.5 ml del cultivo a (1000 rpm., durante 4 minutos) para sedimentar las células. Se decantó el sobrenadante, dejando un pequeño volumen (50-100 µl.) de este con el resuspendido, después se agitó en el vórtex. Se agregaron 300 µl. de TENS (ver Anexo) y se agitó durante algunos segundos mas hasta que la solución se volvió viscosa. Posteriormente, se añadieron 150 µl. de acetato de sodio (3M, pH 5.2), y se volvió a agitar hasta mezclar completamente. Se centrifugó durante 10 minutos para sedimentar los restos celulares y el DNA cromosomal. Inmediatamente, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se mezcló con 0.9 ml. de etanol absoluto frío, se mezcló por inversión y se incubó 1 hora a -20°C; en este paso se precipita el DNA. Nuevamente se volvió a centrifugar para sedimentar el DNA plasmídico y el RNA. Se descartó el sobrenadante y se realizaron lavados del precipitado de DNA con 1ml. de etanol al 70%, centrifugándose por 3 min a 10000 rpm para después secar al vacío por otros 3 minutos. El precipitado se secó al vacío por 5-8 min. Finalmente se resuspendió en 50 µl. de TE o agua destilada y se agregaron 3 microlitros de la enzima RNAsa<sup>(10mg/ml)</sup>. Se tomaron 3 µl. de la muestra y se corrió en un gel de agarosa al 1.5% , teñido con Bromuro de Etidio para comprobar que el plásmido se encontrase purificado.

### **6.2.3 Extracción de DNA por gradiente de Cloruro de Cesio , CsCl (Maxiprep)**

Se puso a crecer la(s) cepa(s) de interés en 3 ml. de medio LB con el antibiótico de selección por 6 hrs. Se Inóculo la cepa en 1L de medio LB selectivo y se incubó con agitación continua a 37°C. durante 12 horas. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 7000 rpm (7K) por 10 min y a una temperatura de 4° C. Obtenida la pastilla celular se le añadió 40 ml. de la solución 1 (ver Anexo) y se resuspendieron las células. Se adicionó 80 ml. del amortiguador para lisar (solución II). Posteriormente la solución III fue añadida mezclando homogéneamente invirtiendo la botella en repetidas ocasiones. Realizado esto, se centrifugó a 7K por 10 minutos, el sobrenadante se transfirió a un bote nuevo y se le adiciono un volumen igual de isopropanol frío para precipitar.

Nuevamente se centrifugó a 7K por 10 minutos, posteriormente se descartó el sobrenadante y se adicionó 10ml de etanol al 95%, para lavar y permitir que se seque la pastilla.

La pastilla de DNA se resuspendió con 3.5 ml de sol. 1 y se transfirió esto a un nuevo tubo de 15ml, ajustando a un volumen final de 4.7 ml. Se adicionó 5.5g de CsCl y se mezcló de forma suave hasta que se resuspendió para después agregar 0.3ml de Bromuro de Etidio (EtBr 10mg/ml). Posteriormente se centrifugó a 6000 rpm. durante 5 min.

Se midió la densidad de la solución, la cual debe quedar ajustada aproximadamente entre 1.47g/ml y 1.55g/ml. La muestra se transfirió a una ampolla para ultracentrífuga, la cual se selló con el mismo peso que su equilibrio. Para el gradiente de CsCl se ultra-centrifugó (rotor Vti90) a una velocidad de 80Krpm por 3h o 60 Krpm por 12h, a temperatura ambiente (18°C). Esto es necesario para formar el gradiente.

Una vez que se obtuvo el gradiente, la banda de DNA se retira con una aguja y se transfiere a un tubo de 15 ml. A esta se le agregan 2 volúmenes de agua ultrapura y 7 ml de N-butanol saturado y se agita, para posteriormente descartar todo el exceso de EtBr, el procedimiento se realiza 3 veces. Una vez que no se detecta el Bromuro, se agregan 3 volúmenes de etanol al 100% con la finalidad de precipitar el DNA y se incubó a -20 °C durante una hora. Transcurrido el tiempo se centrifuga a 10000 rpm. por 10 minutos. La pastilla de DNA obtenida se deja secar y posteriormente se resuspende en un volumen aprox. entre 0.3 a 0.5ml de agua ultrapura, dependiendo del tamaño de la pastilla. El DNA se pasa a un tubo Eppendorf en el cual se añaden 2 volúmenes de etanol al 100% y 1/10 del volumen de la muestra con acetato de sodio 3M con la finalidad de precipitar el DNA. Se centrifuga a 13000 rpm por 10 minutos en una microcentrífuga previamente enfriada a 4°C. Se descarta el sobrenadante y se realizan lavados con 1ml de etanol al 70% por lo menos 2 veces, para quitar el exceso de CsCl que pueda tener la muestra. Se repite el procedimiento 3 veces más. En el paso final, después de haber resuspendido el DNA con etanol al 100% y acetato de sodio, se lava con etanol al 70% , se deja secar el DNA y se resuspende en agua ultrapura en un volumen aproximado de 0.6 ml. Se cuantifica la concentración de DNA utilizando el Nano Drop y se almacena la muestra a -20°C para su futura manipulación.

#### **6.2.4 Purificación de DNA a partir de gel de agarosa**

La extracción de DNA a partir de gel de agarosa se realizó como se describe a continuación. Se extrajo el fragmento de DNA visualizado por tinción con bromuro de etidio del gel con una navaja limpia y se colocó en un tubo eppendorff. Posteriormente los fragmentos se cortaron en fragmentos menores para ser colocados dentro de una columna de purificación insertada en otro tubo eppendorff, utilizado para la recolección. Se centrifugo a 7000 rpm durante 7 min. y después una segunda ocasión a 12000 rpm durante 5 min. Se comprobó la concentración del DNA con la ayuda del Nanodrop.

#### **6.2.5 Electroforesis en gel de agarosa**

Se funde la agarosa al 1.5 % (peso / volumen) en buffer TAE (1X) (Ver apéndice). Posteriormente se calentó la mezcla (en un vaso de precipitados) y se dejó enfriar un poco. Se añadió bromuro de etidio (100 µg / ml) y se mezcló de manera homogénea. Después se vertió la muestra en el portageles y se colocó un peine adecuado al volumen de carga. Una vez polimerizado el gel, se retira el peine y se añade TAE (1X) hasta que sobrepase el gel un poco. En ese momento se cargan las muestras en los pozos del peine con el buffer de carga (apéndice), acompañados de un colorante (azul de tinción). Posteriormente se aplicó corriente entre 70-100 V durante el tiempo necesario para la separación de las bandas de ADN.

#### **6.3 Procedimiento para obtención de células electrocompetentes**

Se inoculó en un tubo con 5 ml de LB una alícuota de células competentes DH5α, durante toda la noche. Transcurrido el tiempo se inoculó con éste, un matraz con 1L de medio LB estéril bajo en sales, pH 7 (Ver Apéndice). Se crecieron las bacterias durante aprox. de 4 a 5 horas o hasta alcanzar 0.6-0.8 O.D. Después se colocó durante 30 min en hielo y en el cuarto frío.

Posteriormente las células se vaciaron en las botellas para la centrifuga, estériles y frías (250 ml. en cada botella). Y se centrifugo a 4000 rpm a 4°C, durante 15 min en el rotor JA-10. El sobrenadante se eliminó rápidamente y se agregó ½ volumen de glicerol 10% (125 ml a cada botella) frío y estéril. Las células se resuspendieron

suavemente con una pipeta de vidrio estéril. Y nuevamente se centrifugo a 4000 rpm a 4°C durante 15 min en el rotor JA-10. Se eliminó el sobrenadante rápidamente y se agregó ¼ volumen de glicerol 10% (62.5 ml a cada botella) frío y estéril. Nuevamente se resuspenden las células y se centrifuga, como en el paso anterior. Se vuelve a eliminar el sobrenadante y se agrega 1/5 volumen de glicerol 10% (50 ml a cada botella) frío y estéril. Se procede a resuspender y centrifugar como los pasos anteriores.

Finalmente, se elimina el sobrenadante rápidamente y se agregaron de 2 a 3 ml de glicerol 10%. Se hicieron alícuotas en tubos eppendorf estériles de 0.5 ml, y se congelaron a -20°C.

#### **6.4 Amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: Polymerase Chain Reaction)**

La PCR consiste en la amplificación de fragmentos de DNA mediante el uso de 2 oligonucleótidos (o cebadores) que hibridan de forma complementaria con los extremos de la zona que quiere ser amplificada. La enzima Taq polimerasa incorpora los nucleótidos necesarios hasta llegar al final de la hebra de ADN y de esta manera amplificar la zona de interés. Este proceso repetido de 30 – 35 ciclos (los ciclos pueden variar dependiendo del objetivo que se desee lograr) amplifica de forma específica un fragmento de ADN.

Las distintas reacciones de PCR se realizaron de la siguiente manera:

Se agregó:

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| DNA                            | X µl   |
| Oligonucleótido Forward (10mM) | .5 µl  |
| Oligonucleótido Reverse (10mM) | .5 µl  |
| Buffer 10X                     | 5 µl   |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)      | 2.5 µl |
| dNTPs (10 mM)                  | 1 µl   |
| Enzima Taq Pol (5U/µl)         | 1 µl   |
| H <sub>2</sub> O ultrapura     | X' µl  |

X= templado variable.

X' = cantidad variable.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes.

| A: pre-desnaturalización           | 2. B: Amplificación por PCR   | 3. C: Extensión final          |
|------------------------------------|---|--------------------------------|
| 1 ciclo de :<br>94°C por 2 minutos | 39 ciclos de :<br>Desnaturalización, 94°C 30 seg<br>Alineamiento, 55°C 1 min.<br>Extensión, 72°C 1 min. | 1 ciclo de:<br>72°C por 5 min. |

### 6.5. Alineamiento de secuencias

Los alineamientos de las secuencias fueron hechos con el programa ClustalW program (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Por otra parte, la secuenciación de DNA en este trabajo fue realizado en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología (UNAM). Las secuencias fueron procesadas usando la paquetería del software BioEdit.

### 6.6. Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos utilizando el programa Oligo (Primer Analysis Software), considerando las recomendaciones del proveedor (Invitrogen) para su clonación en el sistema Topo Gateway®. A continuación se muestra la tabla de los oligonucleótidos diseñados en este trabajo.

| Nombre     | Secuencia                                     |
|------------|---|
| ZDXS1F-GTW | 5'- CAC CAT GGC TCT GTC GAC GTT CTC – 3'      |
| ZDXS1R-GTW | 5'- CTT GGA GAC GTG GAA GAT GAC – 3'          |
| ZDXS2M-GW  | 5'- CAC CAT GAT GGT TTC CAA GGA GCC GGC G– 3' |
| ZDXS2R-GTW | 5'- CTT GGA CAC GGT GTG CAC GAC – 3'          |
| ZDXS3F-GTW | 5'- CAC CAT GGA CAC GGC GTT TCT GAG – 3'      |
| ZDXS3R-GTW | 5'- ACA CGG TTG GCA TTT TCT GGA C – 3'        |

Tabla1 Oligonucleótidos diseñados. Se muestra la secuencia nucleotídica correspondiente de cada uno de éstos. En sombreado se señalan los nucleótidos CACC añadidos a los oligonucleótidos Forward, necesarios para la clonación direccional en el sistema Topo Gateway®.

## 6.7. CLONACIÓN DE DNA

### 6.7.1 Clonación del extremo N-terminal de los genes *dxs* de *Zea mays* en el vector de entrada pENTR/D-TOPO

La tecnología Gateway® es un método de clonación que aprovecha las propiedades de recombinación sitio-específica del bacteriófago Lambda (Landy, 1989); y este sistema se utiliza para insertar productos de PCR de manera direccional en un vector de entrada y así pasarlo a un vector de expresión de interés (Early *et al.*, 2006). En la figura 17 se muestra la estrategia a seguir para la clonación en el sistema Topo Gateway®.

## Sistema TOPO Gateway

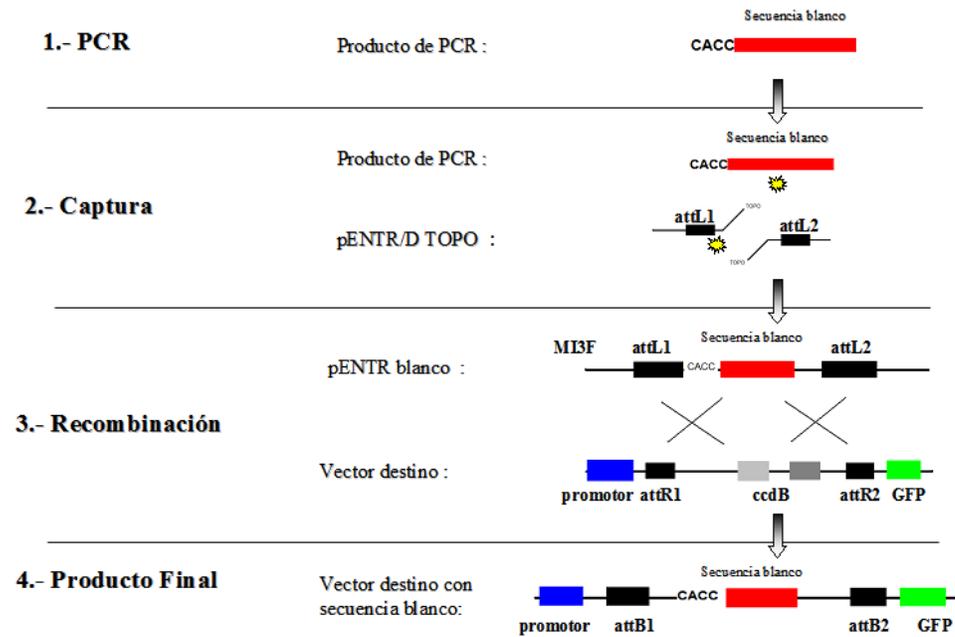


Figura 17. Estrategia de clonación en el sistema Topo Gateway® (Invitrogen) para la generación de una fusión proteica. En esta tecnología se utiliza 1) la reacción por PCR para amplificar la secuencia blanco utilizando un oligonucleótido forward que incluye la secuencia CACC en el extremo 5' de este. 2) Esta secuencia facilita la incorporación direccional dentro del vector de entrada pENTR/D-TOPO; el plásmido recombinante resultante, posee la secuencia de DNA de interés, flanqueado por las secuencias de recombinación attL 3) posteriormente, la secuencia puede ser recombinada con sitios attR usando la enzima LR clonasa. Esta reacción transfiere la secuencia blanco a un vector de expresión de interés ( pEarlyGate 103 para este trabajo), el vector destino contiene un gen (ccdB) que es letal para la mayoría de las cepas de *E.coli*. mientras que los vectores destino vacíos son seleccionados en contra de la transformación de las células de *E.coli* con la reacción de recombinación. 5) esta selección negativa, combinada con una selección positiva mediante el uso de un marcador de resistencia a un antibiótico, asegura que las colonias resultantes contengan el plásmido recombinante. attL1 y attL2; sitios de recombinación del vector de entrada, attR1 y attR2; sitios de recombinación del vector destino, attB1 y attB2; sitios de recombinación de la BP clonasa (Invitrogen), GFP; proteína verde fluorescente . Modificado de Early *et al.*, (2006).

Una vez que los fragmentos del extremo N-terminal de los genes *dxs* de maíz fueron amplificados por PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados para este trabajo, y purificados a partir de un gel de agarosa a través de columnas (Promega). Se procedió

a realizar la ligación recomendada para el sistema Topo Gateway® con el vector pENTR /D-TOPO de Invitrogen® (Figura 18), mediante la siguiente reacción:

|                               | <b>Reacción de ligación</b> |
|-------------------------------|-----------------------------|
| Vector entrada (pENTR/D-TOPO) | 1 µl                        |
| Producto de PCR               | 4 µl                        |
| Solución salina (1:4)         | 1 µl                        |
| Volumen final                 | 6 µl                        |

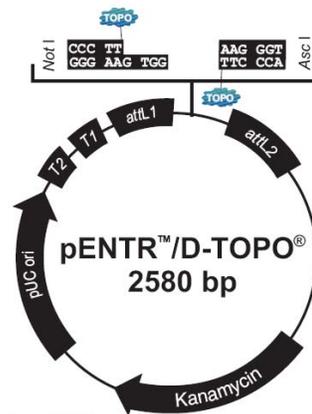


Figura 18. Vector pENTR / D-TOPO (Invitrogen). Se muestra el mapa del vector. PUC ori; origen de replicación, kanamicin; gen de resistencia a kanamicina, attL1 y attL2; sitios de recombinación, T1 y T2; secuencias rrnB de término de la transcripción.

Se mezclaron los componentes de reacción y se incubó 12 horas a temperatura ambiente. Con la reacción se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* (cepa DH5  $\alpha$ ) de la siguiente manera. Una alícuota de células DH5 $\alpha$  fue depositada en hielo durante 7 min. aprox. y una vez descongeladas, se les adicionó 1.5 µl del producto de ligación (previamente descrito). Se mezcló de manera suave y se tomó todo el volumen para depositarlo en una celda de electroporación (BioRad). Inmediatamente, se electroporaron las células en una máquina de electroporación (BioRad), utilizando las siguientes especificaciones: (200ohms, 25m farads , 2.5 kvolts por 3 a 5 milisegundos). Se pasaron las células a un tubo con 1 ml de medio LB y se dejó incubar a 37°C en agitación por 1 hora, para que estas se recuperaran.

Finalmente se sembró 250 µl en una caja y 500 µl en otra, con medio LB/kanamicina<sup>50</sup> y se dejó incubar. Las colonias que crecieron fueron las transformadas. Por PCR se comprobaron células positivas y se aisló y purificó el DNA plasmídico mediante el método TENS miniprep.

### **6.7.2 Subclonación del extremo N-terminal de los genes *dxs* de maíz en el vector de expresión (pEarly Gate-103)**

Mediante una nueva reacción de PCR se amplificaron los fragmentos N-terminal de los genes *dxs* de maíz clonados previamente en el vector pENTR / D-TOPO®, junto con los bordes externos de este (*attl1* y *attl2*) que son los sitios de recombinación del vector de entrada. Los fragmentos aislados se subclonaron de manera independiente en el vector de expresión pEarlyGate 103 (Early *et al.*, 2006) con un tamaño de 12410 pb. Figura 19. Este vector posee un promotor de expresión fuerte del virus mosaico de la coliflor (35S) y la proteína (GFP).

Esto se realizó mediante la siguiente reacción de recombinación recomendada para el sistema Topo Gateway®:

|                                   | <b><i>Reacción de recombinación</i></b> |
|-----------------------------------|---|
| Vector destino (p Early Gate 103) | 1 µl                                    |
| Producto de PCR                   | 7 µl                                    |
| Enzima LR clonasa II              | 1 µl                                    |
| H <sub>2</sub> O miliQ            | 1 µl                                    |
| Volumen final                     | 10 µl                                   |

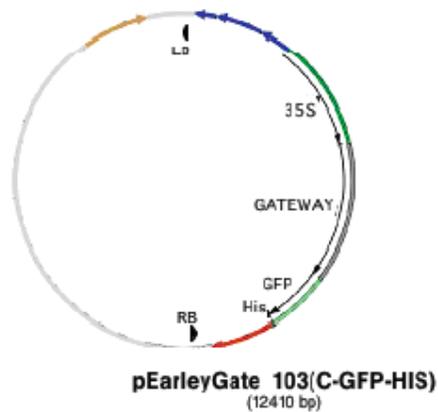


Figura 19. Vector de expresión pEarleyGate 103. (LB) borde izquierdo y (RB) borde derecho; secuencias para transferencia del T-DNA (*Agrobacterium*). 35S; promotor fuerte del virus mosaico de la coliflor. GFP; proteína verde fluorescente.

Con la reacción se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* de igual forma que para el vector de entrada pENTR / D-TOPO®. Mediante PCR se comprobaron células positivas y se aisló y purificó el DNA plasmídico mediante el método TENS miniprep. Posteriormente se obtuvo el DNA a gran escala mediante el método por Cloruro de Cesio (CsCl).

### 6.7.3 Transformación de protoplastos (sistema de expresión transitoria)

Los protoplastos son células aisladas que no poseen pared celular, puesto que se les ha removido esta herramienta fundamental para la transformación genética debido a que se ha probado su utilidad como sistemas celulares ideales para infinidad de estudios (Sheen, 2001). Hoy en día los protoplastos se utilizan para diversas aplicaciones tales como el estudio del tráfico e importe de proteínas (Chang *et al.*, 1999; Kleiner *et al.*, 1999; Nimchuk *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2001; Ueda *et al.*, 2001), entre otros.

Para este trabajo, se aislaron y transformaron protoplastos del mesófilo de hojas tanto de *A. thaliana* como de *Zea mays* (maíz). A continuación se presenta un esquema general del método para transformar protoplastos (Figura 20).

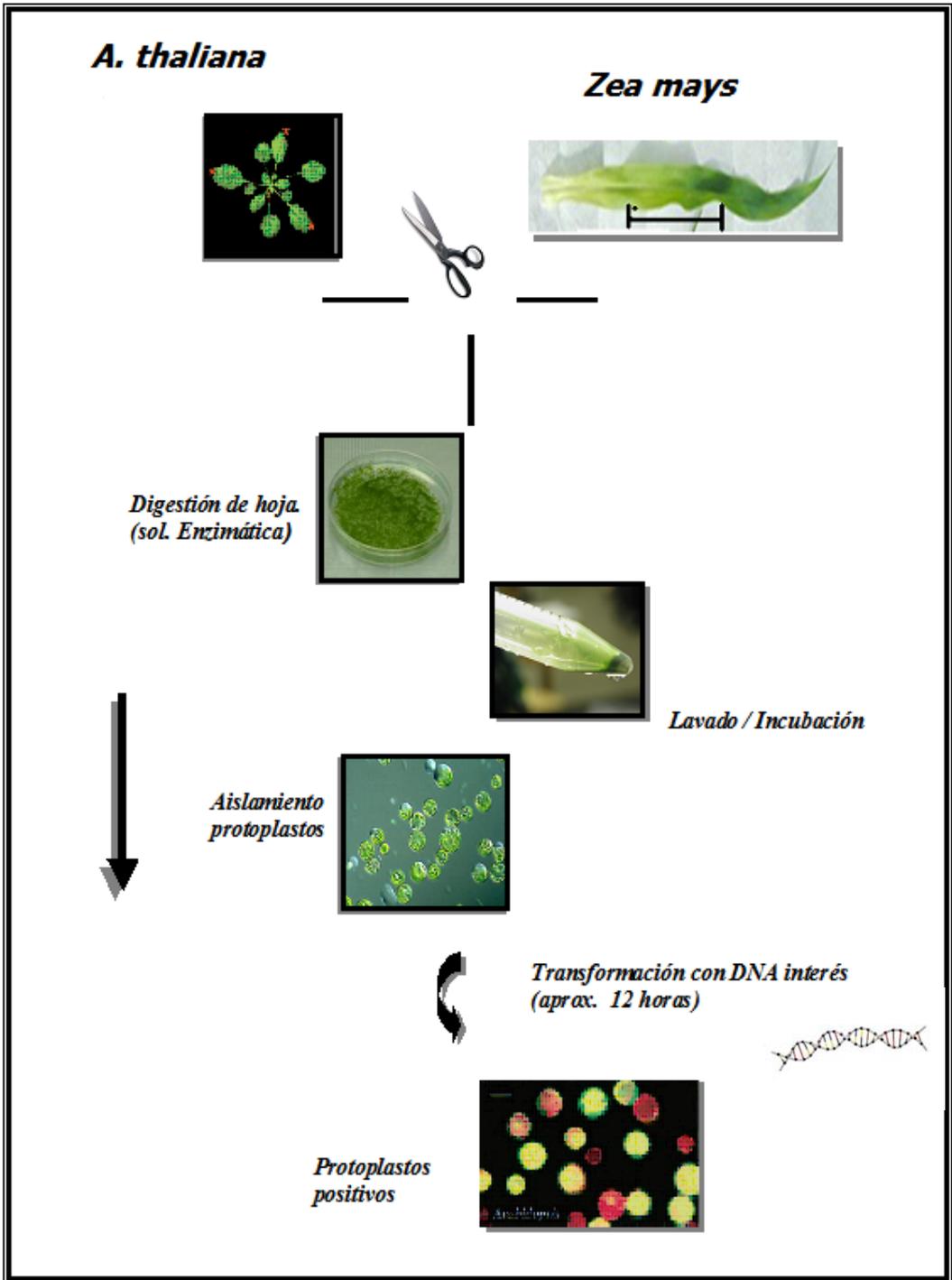


Figura 20. Esquema general del método para la transformación de protoplastos por PEG (polietilenglicol) de *A. thaliana* y *Zea mays*. Para aislar células del mesófilo, hojas de plantas de 15 días de crecimiento, se seccionaron en rebanadas finas tanto de *A. thaliana* como *Zea mays*. Posteriormente estas se incubaron con enzimas para degradar su pared. A través de una serie de lavados con soluciones isotónicas, que permitieron mantener íntegros a los protoplastos, se sometieron estos a la transformación por medio de la sustancia PEG

(polietilenglicol) la cual permeabiliza la membrana plasmática, facilitando la incorporación del DNA a la célula.

#### **6.7.4. Aislamiento y transformación de protoplastos del mesófilo de hoja de *A. thaliana***

Se siguió el protocolo del grupo de la Dra. Jen Sheen (<http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/>) para llevar a cabo la transformación transitoria de protoplastos de *A. thaliana*. Plantas de *A. thaliana* fueron crecidas en el sustrato Metromix® y colocadas en un cuarto de crecimiento hasta las 3-4 semanas de edad. Se seleccionaron entre 60 a 80 hojas con características tales como: hojas lustrosas, número reducido de tricomas y sin daño aparente (presencia de antocianinas etc.), para después cortarse en finas tiras de manera transversal y se colocaron en una caja Petri con la solución enzimática para digerir la pared celular (ver Apéndice). Posteriormente se aplicó vacío para que las enzimas se infiltrasen en las hojas, y la caja se colocó en una placa de agitación continua (1 hora a 40 rpms). Finalizado el tiempo, se agitó una vez más durante 1 min a 80 rpms, para liberar la mayor cantidad de protoplastos posibles.

Se filtra la solución enzimática que contenía a los protoplastos utilizando una membrana de nylon humedecida previamente con la solución isotónica WI (Apéndice). Los protoplastos se diluyeron con la solución enzimática que contenía a los protoplastos en un tubo Falcon, hasta llegar a un volumen de 20 ml. con la ayuda de la misma solución WI. Para sedimentar los protoplastos se centrifuga a 30 rpms por 3 minutos en la balanza clínica y luego una siguiente vez 1 min. a 40 rpms, y se decanta eliminando la solución enzimática. Los protoplastos se resuspendieron con la solución de lavado W5 (ver Apéndice), hasta llegar a un volumen de 15 ml en el tubo Falcon con movimientos suaves. Se centrifuga a 30 rpms por 3 min para sedimentar los protoplastos y se decantó. Se añadió otro volumen de 5 ml de la solución W5 y durante 30 minutos se incubaron los protoplastos en hielo para su recuperación. Se vuelve a centrifugar y se resuspenden los protoplastos en la solución MMg, aprox. 200 µl por cada muestra. Los protoplastos fueron observados con la ayuda de una cámara de Neubaer y el microscopio óptico y son cuantificados.

Posteriormente, para la transformación de los protoplastos, se depositó 20 µg/ µl de DNA en un tubo de 15 ml, y se adicionaron 200 µl de los protoplastos resuspendidos en el MMg, aproximadamente  $5 \times 10^5$  protoplastos. Después se añadieron de manera

homogénea 220 µl de la solución PEG (polietilenglicol) la cual permeabiliza la membrana plasmática. Esto se incubó en un tubo por 20 min aprox. a temperatura ambiente, tiempo necesario para que la transformación se llevara a cabo. Una vez concluido el tiempo, la solución de transformación fue retirada mediante diluciones hechas con la solución de lavado. Al tubo de 15 ml se le añadieron .8 ml de la solución de lavado W5, para eliminar el PEG, se resuspendió de manera suave y se centrifuga a 3000 rpm por 3 min para sedimentar los protoplastos y decantar. Se añaden otros .4 ml de solución W5 a los protoplastos y se llevó a cabo el mismo procedimiento anterior.

Finalmente se incubaron los protoplastos de cada muestra con 1 ml. de la solución de incubación W1, en una caja Petri de 6 pozos, la cual se le añadió suero fetal bovino para evitar que los protoplastos se adhiriesen a la superficie. La caja Petri con los protoplastos se cubrió con aluminio y se dejó en un cuarto de crecimiento, durante 12 horas aprox. a una temperatura estable de 18°C .

#### **6.7.5 Aislamiento y transformación de protoplastos del mesófilo de hoja de maíz (*Zea mays*)**

Se utilizó como referencia el protocolo del grupo de la Dra. Jen Sheen, para transformar por electroporación protoplastos del mesófilo de maíz (<http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/>). Con el propósito de establecer las condiciones de crecimiento de las plantas de maíz y para saber la cantidad de DNA necesaria para transformar los protoplastos. Para transformar protoplastos de maíz, en este trabajo se usó el mismo protocolo del grupo de la Dra. Jen Sheen para transformar protoplastos de *A. thaliana*.

Las semillas de maíz fueron embebidas en agua durante 12 horas. Posteriormente estas fueron plantadas en macetas con sustrato MetroMix® y las macetas fueron colocadas en el cuarto de crecimiento por un periodo de 6-8 días aproximadamente hasta que la raíz fuese visible y la primera hoja estuviese presente. Transcurrido ese tiempo, las plantas se re-colocaron en una cámara oscura bajo condiciones de temperatura estables (18°C), durante 10 días aprox. hasta que la segunda hoja tenga una longitud de 10 a 15 cms y estas se tornasen etioladas por la falta de luz. Lo cual es necesario para prevenir la acumulación de almidón, debido a que los protoplastos con la presencia de almidón, se vuelven más susceptibles a romperse dificultando su manipulación.

Las segundas hojas (18 a 20 aprox.) fueron cortadas a lo largo (6-8 cms. aprox.) y éstas nuevamente se cortaron en finas tiras de forma transversal. En un matraz (250 ml) se depositó de 10 a 20 ml. de solución enzimática (Apéndice) junto con las hojas cortadas para la eventual degradación de la pared celular. Se aplicaron 25 min. de vacío para la infiltración de las enzimas en las hojas. La digestión continuó por otros 120 minutos en una placa de agitación continua a 40 rpms. Se agitó nuevamente por 5 min más a 80 rpm, para liberar los protoplastos.

Se filtra la solución enzimática que contenía a los protoplastos utilizando una membrana de nylon humedecida previamente con la solución isotónica WI (Apéndice). Los protoplastos se diluyeron con la solución enzimática que contenía a los protoplastos en un tubo Falcon, hasta llegar a un volumen de 20 ml. con la ayuda de la misma solución WI. Para sedimentar los protoplastos se centrifuga a 30 rpms por 3 minutos en la balanza clínica y luego una siguiente vez 1 min. a 40 rpms, y se decanta eliminando la solución enzimática. Los protoplastos se resuspendieron con la solución de lavado W5 (ver Apéndice), hasta llegar a un volumen de 15 ml en el tubo Falcon con movimientos suaves. Se centrifuga a 30 rpms por 3 min para sedimentar los protoplastos y se decantó. Se añadió otro volumen de 5 ml de la solución W5 y durante 30 minutos se incubaron los protoplastos en hielo para su recuperación. Se vuelve a centrifugar y se resuspenden los protoplastos en la solución MMg, aprox. 200  $\mu$ l por cada muestra. Los protoplastos fueron observados con la ayuda de una cámara de Neubaer y el microscopio óptico y son cuantificados.

Posteriormente, para la transformación de los protoplastos, se depositó 35  $\mu$ g/  $\mu$ l de DNA en un tubo de 15 ml, y se adicionaron 200  $\mu$ l de los protoplastos resuspendidos en el MMg, aproximadamente  $5 \times 10^5$  protoplastos. Después se añadieron de manera homogénea 220  $\mu$ l de la solución PEG (polietilenglicol) la cual permeabiliza la membrana plasmática. Esto se incubó en un tubo por 20 min aprox. a temperatura ambiente, tiempo necesario para que la transformación se llevara a cabo. Una vez concluido el tiempo, la solución de transformación fue retirada mediante diluciones hechas con la solución de lavado. Al tubo de 15 ml se le añadieron .8 ml de la solución de lavado W5, para eliminar el PEG, se resuspendió de manera suave y se centrifuga a 3000 rpm por 3 min para sedimentar los protoplastos y decantar. Se añaden otros .4 ml de solución W5 a los protoplastos y se llevó a cabo el mismo procedimiento anterior.

Finalmente se incubaron los protoplastos de cada muestra con 1 ml. de la solución de incubación W1, en una caja Petri de 6 pozos, la cual se le añadió suero fetal bovino para evitar que los protoplastos se adhiriesen a la superficie. La caja Petri con los protoplastos se cubrió con aluminio y se dejó en un cuarto de crecimiento, durante 12 horas aprox. a una temperatura estable de 18°C .

#### **6.7.6 Microscopía Confocal**

Posterior a las 12 horas de incubación, se pasaron los protoplastos a un tubo de 15 ml. Se centrifugaron estos en una balanza clínica (3000 rpm por 3 min) para sedimentarlos. Se decantó, dejando únicamente una 1/4 parte del volumen original de la solución de incubación W1 en el tubo, y se resuspendieron los protoplastos de manera suave con el fin de concentrarlos.

Se tomaron 4 µl de los protoplastos y se colocaron en el centro de un portaobjetos distribuyéndolos lo más uniformemente posible. Se colocó encima un cubreobjetos. Las muestras se vieron primeramente en el microscopio de epifluorescencia (Nikkon Eclipse E 600) del laboratorio. Posteriormente se utilizó el microscopio confocal láser de barrido (Zeiss LSM 510) de la unidad de Microscopía Confocal del Instituto de Biotecnología (UNAM). Para la detección de la proteína verde fluorescente (GFP), la fuente de excitación fue un láser a 488 nm. y la emisión fue observada entre 510 y 530 nm. La autofluorescencia de los cloroplastos se detectó entre 660 y 700 nm. Para el análisis de las imágenes obtenidas en el microscopio confocal se utilizó el software LSM 510 de Zeiss®.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Alineamiento de las secuencias de las DXS de maíz (análisis *in silico*).

Con el objetivo de profundizar en la caracterización de las DXS en maíz y, teniendo como antecedente que todas las enzimas DXS de plantas hasta ahora reportadas contienen un péptido de tránsito a plástidos (PTP) en el extremo N-terminal (Zhang *et al.*, 2008). Se quiso demostrar experimentalmente la localización subcelular de las DXS de *Zea mays*. Mediante fusiones traduccionales de la región codificante del PTP de las DXS con la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP). Primeramente se hizo un análisis *in silico* mediante el alineamiento de secuencias de aminoácidos de los tres proteínas ortólogas de DXS de maíz, utilizando el programa ClustalW program ([http://www.ebi.ac.uk/clu\\_stalw/](http://www.ebi.ac.uk/clu_stalw/)), con otras DXS de las bases de datos como: DXS1-Cla1 (At4g15560); AtDXS2 (At3g21500); AtDXS3 (At5g11380.1) de *A. thaliana*, así como dos proteínas DXS de procariontes pertenecientes a la cianobacteria *Stevia rebaudiana* (# acceso CAD22155) y a la bacteria *Rhodobacter capsulatus*, (# de acceso CAA77557) (Figura 21). Con el objetivo de tener una referencia de los posibles péptido de tránsito de las tres DXS de *Zea mays*, al ser comparados éstos con otras DXS reportadas.

El alineamiento múltiple reveló que las DXS de maíz poseen al igual que las otras plantas, una extensión en el extremo N-terminal que es sumamente variable tanto en extensión como en secuencia y el cual no existe en las proteínas DXS de procariontes (McCaskill y Croteau, 1998). Con respecto al extremo C-terminal, es notable una alta similitud en la secuencia de todas las muestras alineadas. Hecho congruente puesto que la vía MEP y por ende la enzima DXS, se encuentra altamente conservada entre las especies que la poseen. Por tanto, se sugirió que éstas regiones N-terminal pudiesen ser tentativamente el péptido de tránsito necesario para dirigir a la proteína hacia el cloroplasto.



## 7.2 Clonación del extremo N-terminal de las DXS de maíz.

Utilizando como referencia el alineamiento de secuencias realizado y debido a que se tenían los genes completos, se propuso clonar la secuencia codificante correspondiente a los extremos N-terminal para cada uno de los genes *dxs* de maíz para fusionarlos a la secuencia de la proteína (GFP). Para diseñar los oligonucleótidos específicos para cada gen *dxs* de maíz, se considero el aminoácido Metionina más próximo al extremo 5' de cada secuencia DXS, el cual debería ser el inicio de la traducción del gen, ésto para diseñar el oligonucleótido sentido (Figura 22). Por otra parte, teniendo la referencia de que las secuencias DXS de procariontes carecen de un péptido de tránsito, el alineamiento múltiple dió una idea acerca del lugar donde podrían terminar los péptidos de tránsito de las DXS de plantas y comenzaría la región de la proteína madura, debido a que no se sabía el sitio exacto de corte peptídico del péptido de tránsito (en inglés signal peptidase cleavage site) en la secuencia de las *DXS* de maíz. Se diseñaron los oligonucleótidos anti-sentido a partir una región situada 20-30 aminoácidos río arriba del sitio donde empiezan las secuencias DXS de procariontes en el alineamiento, en donde esta región tentativamente ya forma parte de la proteína madura y aseguraba una mayor probabilidad de la amplificación de todo el péptido de tránsito de las DXS en estudio. Asimismo, esta región tenía poca similitud entre las secuencias con el fin de que los oligonucleótidos anti-sentido pudiesen ser específicos para cada DXS.

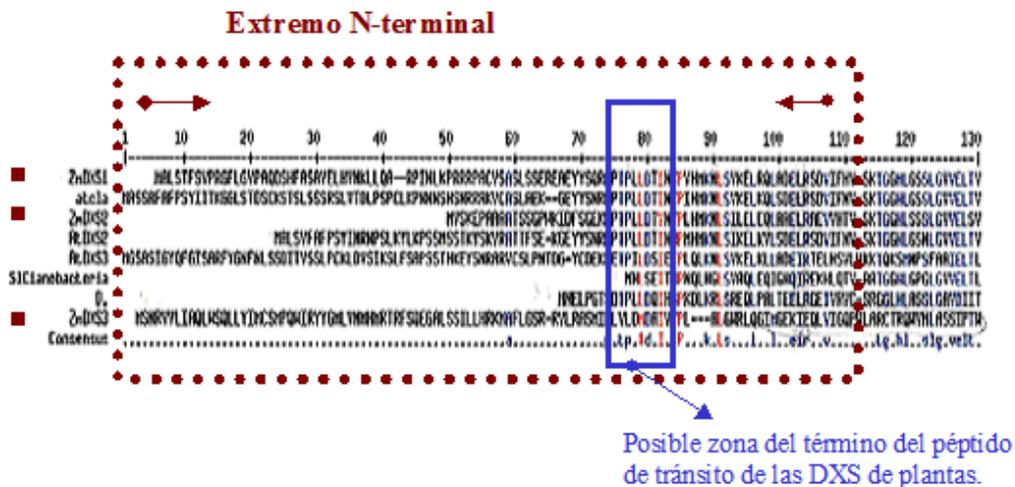


Figura 22. Región seleccionada del alineamiento múltiple de secuencias DXS para diseñar los oligonucleótidos necesarios para amplificar los péptidos de tránsito de los genes *dxs* de maíz. Las flechas rojas indican la zona y el sentido de los oligonucleótidos diseñados. El cuadro azul indica la posible zona del término de los péptidos de tránsito de las DXS de plantas.

Por PCR se amplificaron los extremos N-terminal utilizando DNA genómico de maíz como templado (ver Método). Para *zmdxs2* se utilizaron los oligonucleótidos diseñados (ZDXS2M-GW, ZDXS2R-GTW) y para *zmdxs3* (ZDXS3F-GTW, ZDXS3R-GTW). Para el caso de *zmdxs1* se utilizaron los oligonucleótidos (ZDXS1F-GTW, ZDXS1R-GTW) y como templado se utilizó una clona geonómica que contenía el cDNA completo del gen. En la Figura 23 se muestran los productos de PCR esperados para *zmdxs1* (318 pb), *zmdxs2* (192 pb) y *zmdxs3* (372 pb) en geles de agarosa al 1,5%. En el caso de *zmdxs3*, su posterior secuenciación reveló la presencia de un intrón de aprox. 180 pb el cual le confirió el tamaño final de 552 pb.

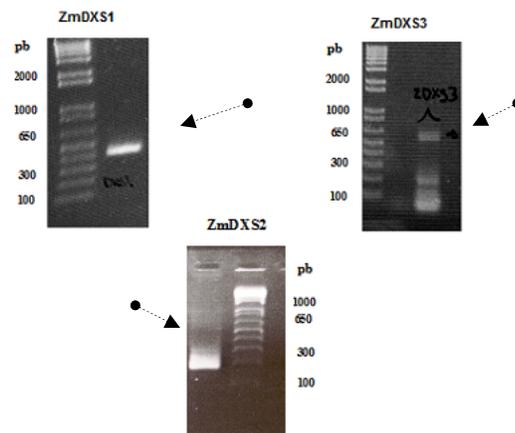


Figura 23. Productos amplificados por PCR del extremo N-terminal del gen *zmdxs1* (318 pb) usando como templado una clona genómica que contenía el cDNA completo del gen. Para *zmdxs2* (192 pb) y *zmdxs3* (552 pb) se utilizó DNA genómico de maíz como templado.

Posteriormente, los fragmentos aislados se introdujeron de manera independiente al vector pENTR/ D- TOPO® de 2580 pb. con marcador de resistencia a kanamicina del sistema Topo Gateway® (Invitrogen), mediante una reacción de ligación. Por PCR se comprobó que el inserto estuviese presente utilizando el oligonucleótido sentido MI3Fw (5'- GTA AAA CGA CGG CCA G -3') del borde externo izquierdo (sitio att11) del vector de entrada y el oligonucleótido anti-sentido ZDXS1R-GTW (*zmdxs1*), ZDXS2R-GTW (*zmdxs2*), ZDXS3R-GTW (*zmdxs3*) correspondiente de cada gen. Los productos amplificados fueron de: 486 pb (*zmdxs1*), 360 pb (*zmdxs2*) y 720 pb (*zmdxs3*) (Figura 24).

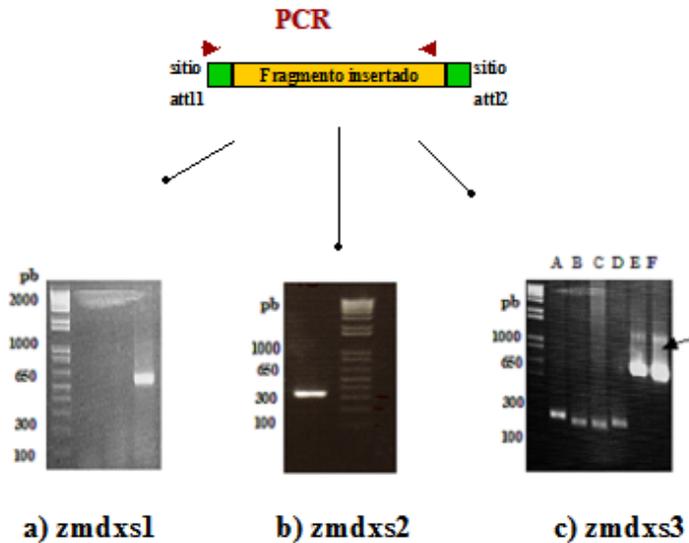


Figura 24. Clonación de los extremos N' terminal de los genes *zmdxs1*, *zmdxs2* y *zmdxs3* en el vector pENTR D-TOPO® (Invitrogen). Productos amplificados por PCR para comprobación positiva del inserto en el vector de entrada (pENTR D-TOPO) utilizando el oligonucleótido sentido MI3Fw del borde izquierdo del vector de entrada y los oligonucleótidos antisentido diseñados para cada gen: tamaños esperados a) 486 pb (*zmdxs1*), b) 360 pb (*zmdxs2*) y c) 720 pb (*zmdxs3*). De este último se muestran 6 colonias (A-F) de las cuales únicamente E y F tenían el fragmento de interés.

Un problema que se presentó en el presente trabajo era que tanto el vector de entrada (pENTR /D -TOPO) así como el vector destino pEarlyGate 103 (Early et al., 2006) ambos poseen el mismo marcador de selección que consiste en la resistencia a kanamicina. Lo cual impedía la selección de clonas positivas después de la recombinación de los vectores. Por tanto se decidió amplificar mediante una nueva reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos sentido MI3Fw (5' GTAAAACGACGGCC 3') y anti-sentido MI3Rv (5' AGCTGTTTCCTG 3') los extremos N-terminal de los genes *dxs* de maíz de manera independiente, junto con los bordes externos attl1 y attl2 que son los sitios de recombinación del vector de entrada. Los fragmentos amplificados fueron de 658 pb (*zmdxs1*), 532 pb (*zmdxs2*) y 892 pb (*zmdxs3*) Figura 25.

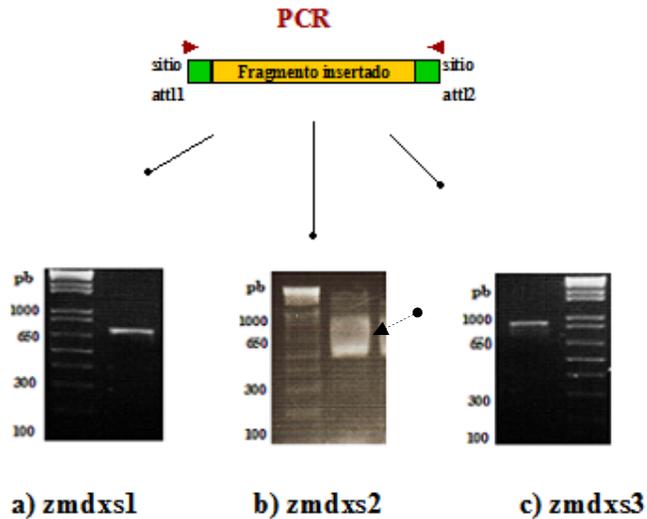


Figura 25. PCR de los sitios de recombinación attI1 y attI2 del vector de entrada + el inserto de interés. Utilizando los oligonucleótidos M13Fw y M13Rv. Productos esperados a) 658 pb (*zmdxs1*), b) 532 pb (*zmdxs2*) y c) 892 pb (*zmdxs3*).

Los productos de PCR aislados se subclonaron en el vector de expresión pEarlyGate 103 (Early *et al.*, 2006) este vector posee un promotor fuerte (CAMV35S) y la proteína (GFP), así como el gen de la neomicina fosfotransferasa II (*NPTII*) con resistencia a Kanamicina (Karimi *et al.*, 2007) mediante una reacción de recombinación con la enzima LR clonasa. Finalmente, se comprobó nuevamente por PCR que los fragmentos de interés estuviesen presentes en el vector de expresión utilizándose para este caso los oligonucleótidos sentido ZDXS1F-GTW y ZDXS3F-GTW junto con el anti-sentido NYFP-3 (5' - TGT AGT TGT ATT CCA ACT TGT G - 3') situado en la secuencia de la GFP, para los genes *zmdxs1* y *zmdxs3* respectivamente. Para el caso de *zmdxs2* se utilizaron los oligonucleótidos sentido ZDXS2M-GW y el anti-sentido 35SminF (5' - GAT GTG ATA TCT CCA CTG AC - 3') del promotor CaMV35S del vector de expresión. Los fragmentos amplificados fueron de: 753 pb (*zmdxs1*), 280 pb (*zmdxs2*) y 987 pb para (*zmdxs3*) (Figura 26). Todas las reacciones de clonación se presentan en el Método.

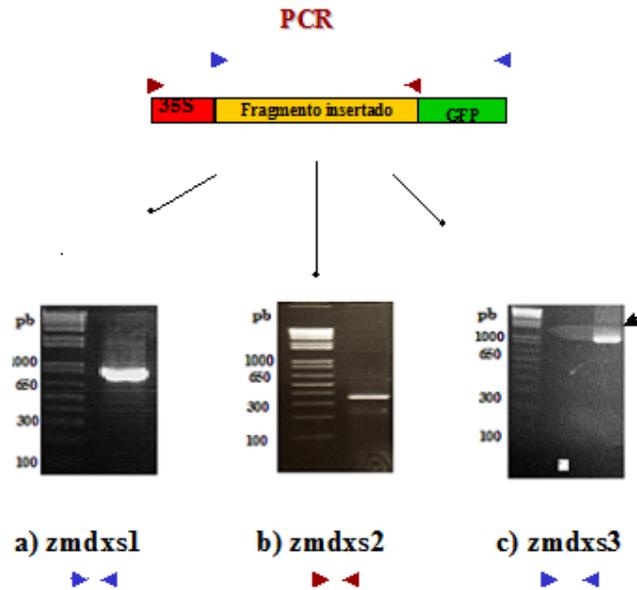


Figura 26. Productos amplificados por PCR para comprobación positiva del inserto de interés en el vector de expresión p EG-103, utilizando los oligonucleótidos sentido ZDXS1F-GTW y ZDXS3F-GTW junto con el anti-sentido NYFP-3' para : a) *zmdxs1* (753 pb) , c) *zmdxs3* (987 pb) . Para el caso del gen *zmdxs2* se utilizó el sentido ZDXS2M-GW y el anti-sentido 35SminF : b) *zmdxs2* (280 pb).

Posteriormente los plásmidos fueron purificados por TENS Miniprep y se secuenciaron con la finalidad de saber si entre los fragmentos de interés y la proteína (GFP) no existía codón de paro y si ésta estaba en el marco de lectura correcto.

### 7.3 Localización subcelular de las fusiones en protoplastos tanto de *A. thaliana* y *Zea mays*.

Para proporcionar evidencia experimental de la funcionalidad del péptido de tránsito de los genes *dxs* y de la localización de cada uno de estos en protoplastos. Los péptidos de tránsito de cada uno de los genes se fusionaron en fase y de manera independiente al extremo N-terminal de la proteína (GFP) y expresados bajo el control del promotor CaMV35S. Las construcciones generadas se denominaron: pEGZmDXS1-5'-GFP, pEGZmDXS2-5'-GFPy pEGZmDXS3-5'-GFP (Figura 27).

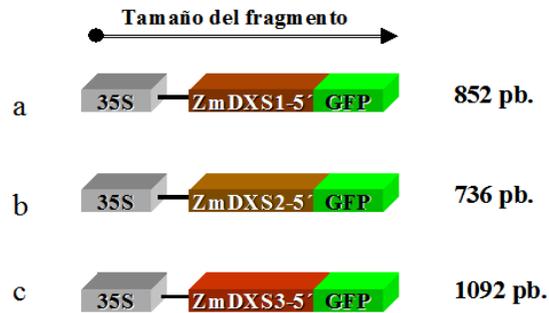


Figura 27. Fusiones traduccionales generadas. A) pEGZmDXS1-5'GFP B) pEGZmDXS2-5'GFP C) pEGZmDXS3-5'GFP. 35S; promotor fuerte del virus del mosaico de la coliflor, GFP; proteína verde fluorescente.

Existen antecedentes sobre casos de distinta localización subcelular entre fusiones proteína/GFP y la proteína silvestre (Kimura *et al.*, 1993). Por tanto, para descartar este tipo de fenómeno, en nuestro grupo se realizó la construcción de otra fusión traduccional que comprende al gen completo de *zmdxs1* con la GFP (Córdoba, *datos no publicados*). Para esta construcción, se utilizó el oligonucleótido ZDXS1F-GTW y el reverso ZmDXS1Rc: 5'- CGC GTT TGG CAC TGC CAT GAT GGC – 3' diseñado por el laboratorio para amplificar todo el gen con tamaño de 2287 pb, el cual comprende desde el inicio de la traducción (ATG) hasta nucleótidos antes del codón de paro. La nueva construcción generada se llamó pEGZmDXS1complt.-GFP (Figura 28).



Figura 28. Fusión traduccional pEGZmDXS1complt.-GFP generada. 35S; promotor fuerte del virus del mosaico de la coliflor, GFP; proteína verde fluorescente.

Las cuatro fusiones, así como la construcción inicial que se usó como control, 35S-GFP (únicamente contiene la GFP), fueron expresadas transitoriamente en protoplastos de *A. thaliana*. Los análisis de los protoplastos transformados utilizando el microscopio confocal, mostraron que la señal de la proteína (GFP) de las construcciones pEGZmDXS1-GFP y pEGZmDXS3-GFP se localizó con la autofluorescencia de la clorofila emitida por los cloroplastos (Figuras 29 A y B). Además de manera particular la señal de la GFP en ambas construcciones se localizó

en sitios específicos dentro de los cloroplastos, mostrando un patrón definido en cada caso los cuales se asemejan a figuras en forma de bastones alargados, lo cual indicaba una posible localización suborganelar. La construcción pEGZmDXS1compl.-GFP la cuál comprende a la fusión del gen completo *zmdxs1* con la GFP muestra una localización subcelular también en los cloroplastos. Por lo que se descartó algún posible fenómeno artificial de localización por parte de las fusiones hechas únicamente con el extremo 5' de los genes con GFP. De igual forma la señal de la GFP se localiza en sitios específicos dentro de los cloroplastos. El patrón observado en esta construcción es distinto a las otras dos, debido a que se observan formaciones redondas (Figura 29 C).

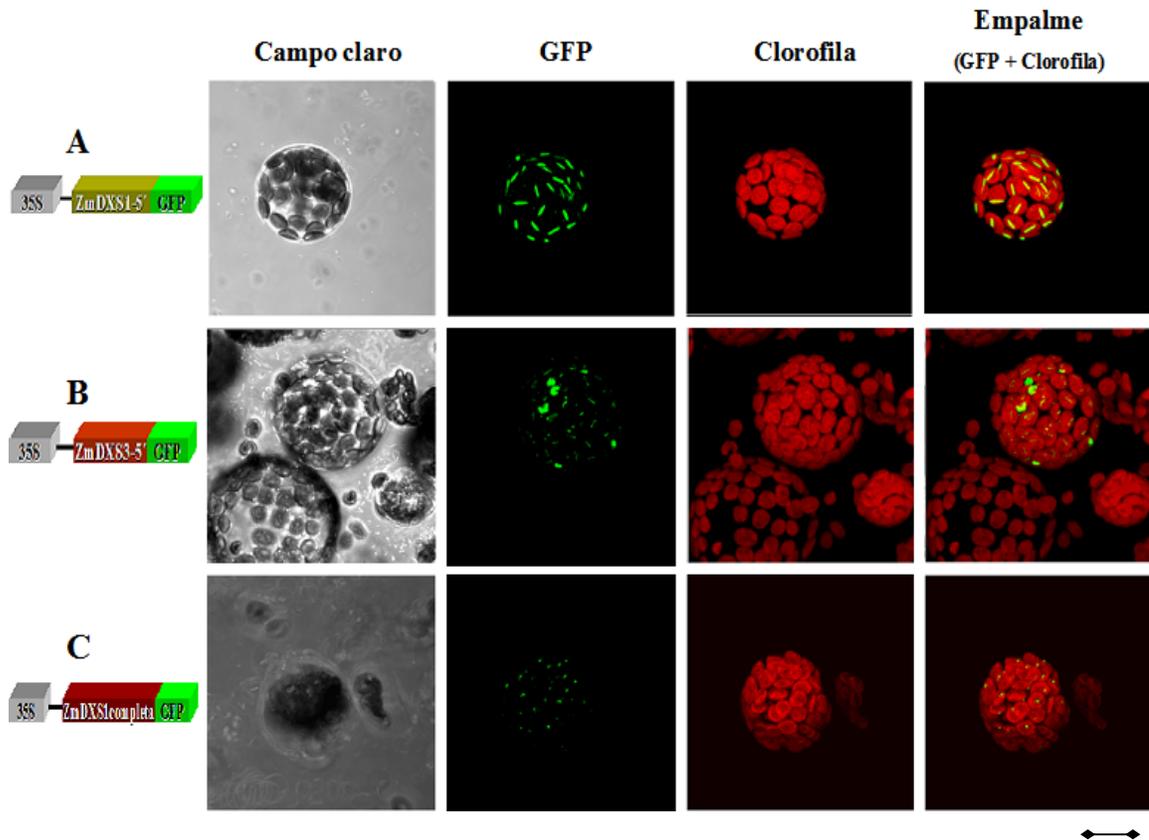


Figura 29. Localización subcelular de la proteína verde (GFP) en protoplastos de *A. thaliana*. A) protoplasto transformado con la construcción pEGZmDXS1-GFP, la GFP está localizada en los cloroplastos. B) protoplasto que expresa pEGZmDXS3-GFP, la GFP se observa en los cloroplastos. C) protoplasto transformado con pEGZmDXS1comptl.-GFP, también la GFP se localiza en los cloroplastos. Los protoplastos fueron observados en campo claro y posteriormente la señal de la GFP fue detectada con epifluorescencia en el microscopio confocal. 35S: promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor. Barra = 20  $\mu$ m.

La señal de la GFP de la construcción inicial que se usó como control (35S-GFP) se localizó en el citoplasma de la célula vegetal (Figuras 29B y D). Por otra parte, en protoplastos transformados con pEGZmDXS2-GFP la señal de la GFP fue ubicada también en el citoplasma (Figuras 29B y E).

Estos datos confirman que la DXS1 y DXS3 de maíz se importan a plástidos, hecho congruente con la ubicación de la vía MEP. Además, el péptido de tránsito supuesto clonado del gen *zmdxs2* no es funcional, debido a la imposibilidad de su importe hacia los plástidos y su localización en el citoplasma celular.

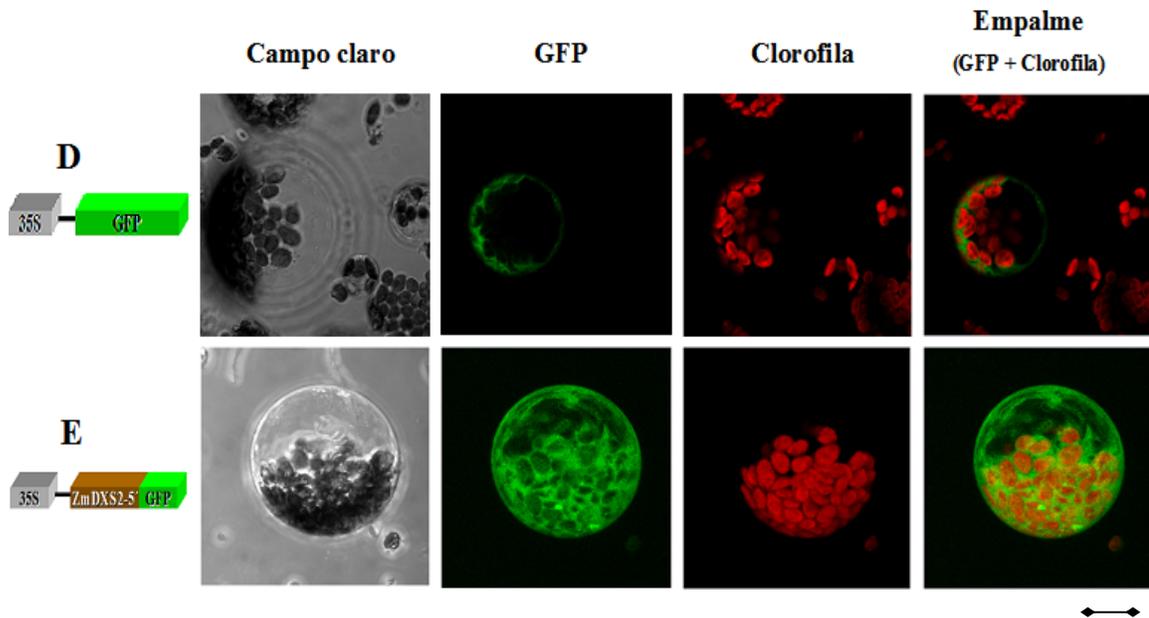


Figura 29'. Localización subcelular de la proteína (GFP) en protoplastos de *A. thaliana*. D) protoplasto transformado con la construcción inicial que se usó como control 35S-GFP, la GFP está localizada en el citoplasma. E) protoplasto que expresa pEGZmDXS2-GFP, la GFP se observa en el citoplasma. Los protoplastos fueron observados en campo claro y posteriormente la señal de la GFP fue detectada con epifluorescencia en el microscopio confocal. 35S: promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor Barra = 20  $\mu$ m.

Posteriormente se transformaron protoplastos de maíz, el cual es el sistema de expresión homólogo. Los análisis de los protoplastos transformados utilizando el microscopio confocal mostraron que la señal de la proteína (GFP) de las construcciones pEGZmDXS1-GFP y pEGZmDXS3-GFP co localizó con la autofluorescencia de la clorofila emitida por los cloroplastos al igual que en *A. thaliana* (Figuras, 30 A y B). Además, también se detectó la señal de la GFP en sitios específicos dentro de los cloroplastos mostrando un patrón definido.

La construcción pEGZmDXS1complt.-GFP la cuál comprende a la fusión del gen completo *zmdxs1* con la GFP muestra una localización también en los cloroplastos. Descartándose algún posible fenómeno artificial de localización y de igual forma la señal de la GFP se localiza en sitios específicos dentro de los cloroplastos, proponiéndose una localización suborganelar (Figura 30 C). La señal de la GFP de la construcción inicial que se usó como control (35S-GFP) se localizó en el citoplasma de

la célula vegetal (Figura 30 D). La construcción pEGZmDXS2-GFP no se transformó en protoplastos de maíz.

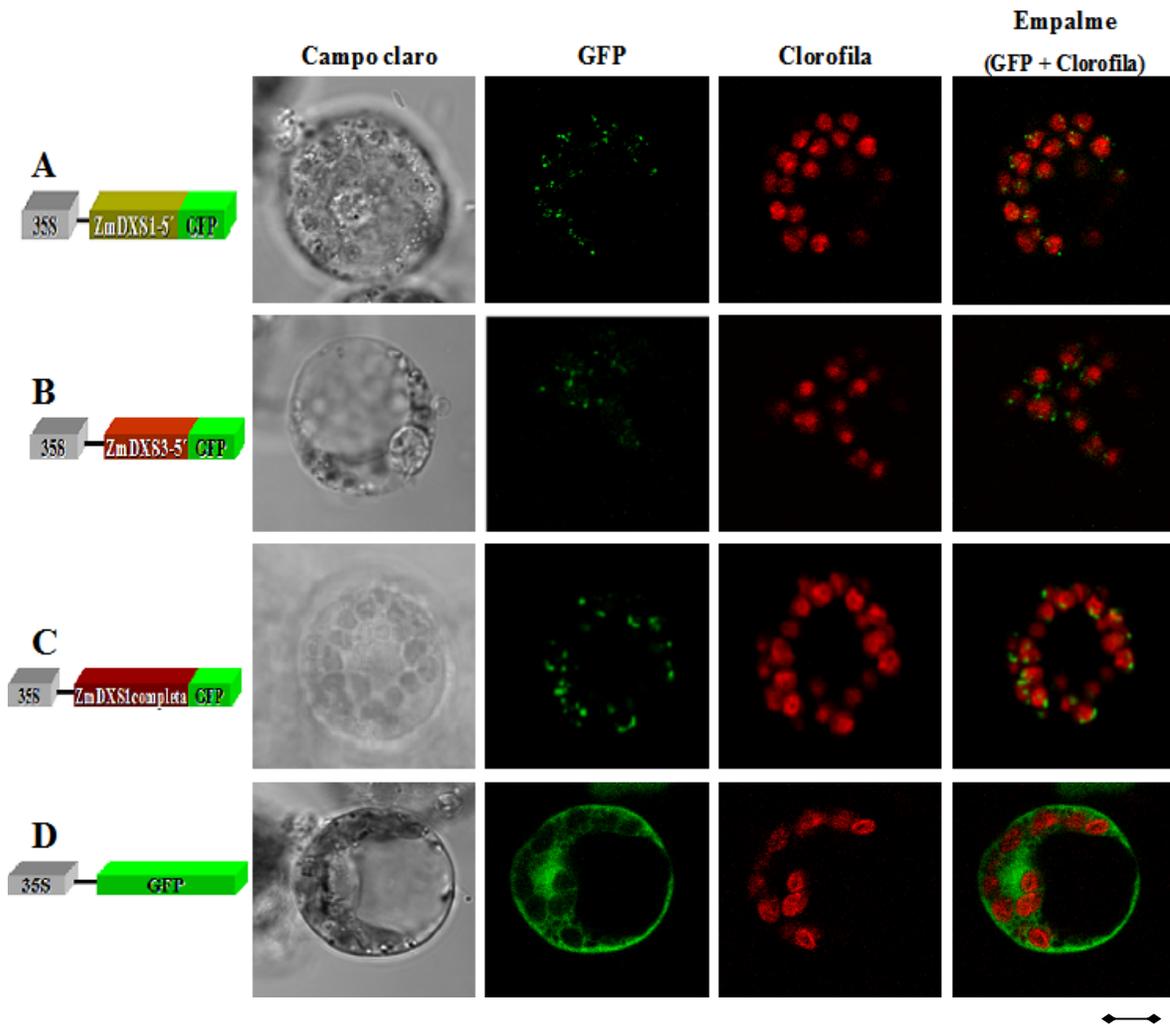


Figura 30. Localización subcelular de la proteína (GFP) en protoplastos de *Zea mays*. A, protoplasto transformado con la construcción pEGZmDXS1-GFP, la GFP está localizada en los cloroplastos. B, protoplasto que expresa pEGZmDXS3-GFP, la GFP se observa en los cloroplastos. C, protoplasto transformado con pEGZmDXS1complt.-GFP, también la GFP se localiza en los cloroplastos. D, protoplasto que expresa la construcción inicial que se usó como control 35S-GFP, la señal se observa en el citoplasma. Los protoplastos fueron observados en campo claro y posteriormente la señal de la GFP fue detectada con epifluorescencia en el microscopio confocal. 35S, promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor. Barra = 15  $\mu\text{m}$

## 7.4 Construcción CaS-YFP.

Los resultados de expresión transitoria realizadas tanto en protoplastos de *A. thaliana* como de *Zea mays*, mostraron que en las fusiones: pEGZmDXS1-GFP, pEGZmDXS3-GFP y pEGZmDXS1complt.-GFP, la señal de la GFP se detecta en sitios específicos y la cual presenta patrones definidos y consistentes dentro de los cloroplastos, lo cuál dio indicio a una probable localización suborganelar de las fusiones con GFP ya que fueron importadas éstas hacia los cloroplastos.

Los cloroplastos son organelos altamente complejos compuestos por sistemas de membranas, compartimentos y con cuerpos lipídicos conocidos como plastoglobulos. Se propuso utilizar un marcador específico para tilacoide que estuviese fusionado a una proteína fluorescente para ser transformada en protoplastos y así observar si ésta presentase un patrón semejante a algunas de las fusiones que mostraron patrones específicos al ser expresadas de manera transitoria en protoplastos. Se halló a la proteína CaS (por sus siglas en inglés, calcium-sensing receptor), la cual es una fosfoproteína de las membranas tilacoideas de *A. thaliana* (Vainonen *et al.*, 2008); la Dra. Yumiko Sakuragi de la Universidad de Copenhague (Dinamarca) nos proporcionó una construcción denominada Cas-YFP, la cual comprende a la región codificante de CaS de 1.4 Kb (núm acceso. AY341888) fusionada en la región C-terminal a la proteína amarillo fluorescente (YFP) y expresada con el promotor de expresión fuerte 35S. Los análisis de los protoplastos transformados de *A. thaliana* utilizando el microscopio confocal, mostraron que la señal de la YFP se localiza en los cloroplastos, pero a diferencia de las construcciones generadas las cuales se propone que presentan una localización suborganelar. La construcción CaS-YFP no presentó un patrón definido, la señal se detectó de manera general en todo el cloroplasto (Figura 31).

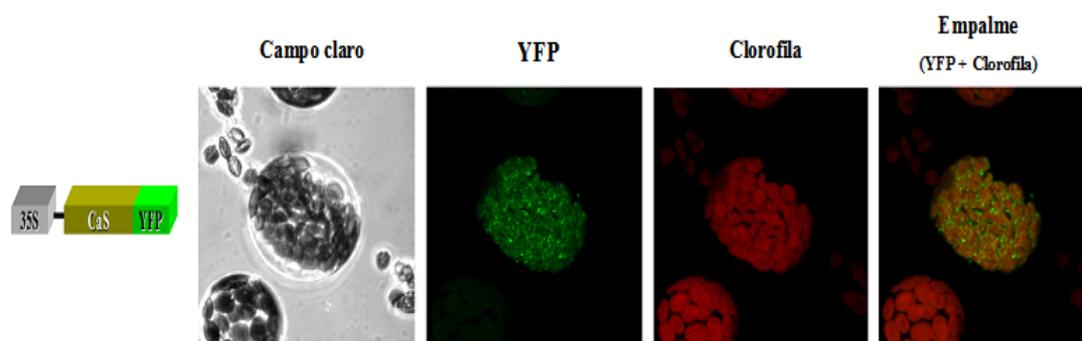


Figura 31 Localización subcelular de la fusión CaS-YFP en protoplastos de *A. thaliana*. protoplasto transformado con la construcción Cas- YFP (Vainonen *et al.*, 2008), la señal de la GFP se localiza dentro de los cloroplastos. 35S: promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor. YFP: por sus siglas en inglés "Yellow Fluorescent Protein" . Barra = 20  $\mu$ .

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 La planta de maíz (*Zea mays*) posee una familia génica que codifica para la enzima DXS perteneciente a la vía MEP.

La presencia de familias génicas con la misma actividad enzimática es común en el metabolismo secundario (Pichersky y Gang, 2000).

La DXS (1-deoxi-D-xilulosa 5 fosfato sintasa) es la primera enzima en la vía MEP, y cataliza una reacción de tipo transcetolasa convirtiendo al piruvato y al gliceraldehido 3-fosfato en 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (Lichtenthaler, 1999). Hoy en día se sabe que esta enzima es codificada por una pequeña familia multigénica en la mayoría de las plantas, tal como se ha reportado en especies como *Medicago truncatula* (Walter *et al.*, 2002), *Oriza sativa* (Bo-Ra Kim *et al.*, 2005), entre otras.

En nuestro grupo se aislaron tres genes de maíz con alta homología a DXS. Los ORFs deducidos para los genes *zmdxs1*, *zmdxs2* y *zmdxs3* de maíz consisten en 718, 674 y 722 residuos aminoácidos, respectivamente. El análisis filogenético mostró que estos genes se agrupan en tres clados independientes.

Un apoyo para caracterizar la funcionalidad de una enzima en la vía MEP es su importe a plástidos (Walter *et al.*, 2002). Recientemente, se demostró la localización subcelular de todas las enzimas pertenecientes a la vía MEP de *A. thaliana* las cuales se localizan en el cloroplasto utilizando fusiones con GFP (Hsieh *et al.*, 2008). También se ha demostrado la localización en los plástidos de la DXS de tomate (Lois *et al.*, 2000), así como de las enzimas MCT y MDS en *Ginkgo biloba* (Kim *et al.*, 2006), por citar algunos casos.

El resultado de expresar transitoriamente en protoplastos de *A. thaliana* y de *Zea mays* fusiones de los extremos N-terminal de los genes: *zmdxs1*, *zmdxs2* y *zmdxs3* a la proteína verde fluorescente (GFP); mostraron que los péptidos de tránsito putativos de importe a plástido (PTP) predichos *in silico* son funcionales para el caso de los genes *dxs1* y *dxs3*. Al detectarse la señal de la GFP de éstas dos en los cloroplastos mediante el uso del microscopio confocal. El análisis *in silico* de las secuencias de los genes de maíz de interés utilizando el programa bioinformático ChloroP program (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) el cual predice si existe la presencia de un péptido de tránsito en las secuencias, sugirió que tanto los genes *zmdxs1* como *zmdxs3* poseen un péptido de tránsito. Mediante el resultado de la transformación de protoplastos de la construcción pEGZmDXS1compl.-GFP que comprende al gen

completo de *zmdxs1* fusionado a la GFP, descartó un posible fenómeno artificial de localización por parte de alguna de las construcciones fusionadas únicamente en el extremo N-terminal.

Por otro parte, y de manera contraria a lo esperado para las enzimas DXS, la fusión del gen *zmdxs2* con GFP se localizó en el citoplasma. Esto es motivo de discusión más adelante en el escrito.

Hasta la fecha aún no existía ninguna evidencia experimental localización subcelular en los plástidos para una enzima DXS codificada por un isogene del tipo III como lo es *zmdxs3*. Sin embargo, es necesario realizar otro tipo de experimentos (ver perspectivas del trabajo) para demostrar de manera categórica la actividad de las enzimas DXS de maíz.

## **8.2 La fusión traducional pEGZmDXS2-GFP no es importada hacia el cloroplasto.**

Los resultados de la expresión transitoria de protoplastos de *A. thaliana* utilizando la construcción pEGZmDXS2-GFP, mostró que la señal de la GFP se localizó en el citoplasma celular. Mismo resultado observado que en una construcción control (35S-GFP) que únicamente contiene a la GFP y contrario a lo esperado. Esto nos indicó que el extremo N-terminal clonado del gen *zmdxs2* el cual se fusionó a la GFP no era funcional. La secuencia del DNA plasmídico corroboró la integridad del fragmento de interés dentro del vector, por lo que esto descartó la idea de la imposibilidad de importe de la GFP hacia los plástidos debido a este fenómeno.

Para explicar la imposibilidad de importe hacia los plástidos por parte de la construcción pEGZmDXS2-GFP existen dos posibilidades: la primera es que el producto del gen *zmdxs2* no sea importado hacia los plástidos, lo cual es poco probable debido a que todas las enzimas pertenecientes a la vía MEP de plantas que se han comprobado hasta la fecha, tienen una localización subcelular en los plástidos. La otra posibilidad es que el extremo 5' del gen *zmdxs2* de maíz no estuviese completo. La carencia en la base de datos de maíz de registros de clonas genómicas para el gen *zmdxs2* con secuencias en el extremo N-terminal adicionales al que se tenían, sugirieron la posibilidad de que la región N-terminal del producto del gen

zmdxs2 aún no estuviese totalmente identificada. Y por tanto, el codón de inicio de la traducción (ATG) determinado en un principio, debería ser otro.

En nuestro grupo, se utilizó una técnica conocida como RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) por sus siglas en inglés, para obtener secuencia hacia el extremo 5'. Ésta técnica es utilizada para obtener la secuencia completa de un transcrito de RNA correspondiente a un gen de interés, al determinar ya sea el extremo 5' o en menor ocasión el 3' del mensajero. Para esto, el RACE resulta básicamente en la producción de copias de cDNA del RNA de interés, producido mediante transcripción reversa y seguido por una amplificación de PCR de las copias de cDNA. Finalmente, estas copias de cDNA se secuencian para obtener la secuencia completa del RNA original (Sambrook *et al.*, 2001). El resultado de la secuenciación del extremo 5' de cinco clonas independientes que contenían el producto de cDNA 5' RACE del gen zmdxs2 y el eventual alineamiento múltiple de éstos, arrojó la siguiente secuencia genómica:

5'

TCGCGGATCCAGACGCTGCGTTTGCTGGCTTTGATGAAA,TGT,GGT,GCC,GGT,G  
CT,CAT,GCA,TGT,ACG,GGG,CAT,GGT,TTT,GGA,CTC,STG,TGT,CTG,CAG,TTT,CA  
G,STG,CGC,GCT,CAG,GTA,GCC,GGC,GGC,AGC,AGC,AGT,AGC,AGC,ATC,GGA,G  
CC,GAT,GGT,GGG,AAGATGATGGTTTCCAAGGAGCCGGCGGCGGCCACGTC  
GTCGGGACCGTGGAAGATCGA.....

3'

ATG: inicio de la traducción (Met) utilizado.

Rojó: secuencia que corresponde a la clona de genómica del gen zmdxs2.

Verde: secuencia del adaptador utilizado para el (5' RACE).

Azul: posibles codones alternos de inicio de la traducción.

En primera instancia lo primero que hay que destacar es que el resultado del 5' RACE determinó una secuencia extra en el extremo 5' a partir del codón que se había usado como el inicio de la traducción propuesto en un principio para el gen zmdxs2. Creemos que esta es la región 5' que contiene a la región no traducida del mRNA o (5' UTR) por sus siglas en inglés. La cual es la zona del RNA entre la estructura cap y el codón de inicio de la síntesis proteica. Además de ser el sitio donde el codón de inicio funcional debiera estar presente.

Lo segundo que hay que destacar y que es interesante, es el hecho que en esta secuencia no se hallaron codones adicionales ATG en fase hacia el extremo 5'

tomando como referencia el ATG propuesto en un principio como el inicio de la traducción y que es parte de la clona genómica. Observado estos resultados es posible que la traducción del gen *zmdxs2* pueda comenzar con un codón de inicio alternativo diferente al ATG en el genoma de maíz. Si bien el AUG (en el RNAm) es el codón de inicio más empleado en eucariontes (Griffiths *et al.*, 1999), en ciertas ocasiones la traducción puede ser iniciada a partir de codones distintos. Existen otros codones que también son válidos para el inicio de la traducción tales como: GUG y UUG. Existen casos bien documentados sobre éste fenómeno, por ejemplo: presencia de un codón alternativo en la proteína P ribosomal de *Candida albicans* (Abramczyk *et al.*, 2003) o de la proteína NAT1 en mamíferos (Takahashi *et al.*, 2005). Excepciones a la regla en plantas han sido descritas predominantemente para RNAs derivados de virus de plantas (Fütterer y Hohn, 1996; Rohde *et al.*, 1994). La información acerca de este tema es limitada: únicamente para dos RNAs derivados de los virus (RTBV) (Fütterer *et al.*, 1996) y SBWMV (Shirako, 1998) demostraron el uso de codones de iniciación no eran canónicos. De éstos, sólo la traducción del RNA del virus RTBV (Rice Tungro Bacilliform Virus) mediado por un codón alternativo, mostró importancia fisiológica. En este caso aparentemente es necesario para facilitar la traducción mediante el escaneo de ORFs (Open Reading Frame) adicionales río abajo. Otro ejemplo es el trabajo de Riechamann y colaboradores (Riechmann *et al.*, 1999) con el gen AGAMOUS (AG) el cuál controla diversas etapas durante el desarrollo floral en *A. thaliana*. En éste se demuestra que la traducción de AG es iniciada exclusivamente mediante un codón ACG y prueban que los tripletes alternos de AUG, pueden ser usados eficientemente como el único sitio de traducción de algunos RNA mensajeros en las plantas. Estos mismos autores sugieren que la búsqueda de sitios de iniciación génica alterna a AUG para algunas proteínas de plantas, debe ser parte del análisis de secuencia post-genómico en *Arabidopsis thaliana*. Para genes pertenecientes a la vía MEP de cualquier especie, no se ha demostrado éste fenómeno de codones alternos.

En la secuencia genómica obtenida del 5' RACE se identificaron posibles codones alternos de inicio de la traducción. Algo notable es que el análisis *in silico* del fragmento genómico obtenido a partir del 5' RACE de *zmdxs2* mediante la utilización del programa bioinformático ChloroP program (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) de predicción de péptidos de tránsito de importe a plástidos (PTP), este programa sugiere que ésta secuencia posee características de un péptido de tránsito. La comprobación de ésta hipótesis para el gen *zmdxs2* no fué considerado para éste proyecto y queda asentado más adelante en el escrito como perspectiva del trabajo.

### **8.3. DXS1 y DXS3 de *Zea mays* tienen una localización suborganelar dentro del cloroplasto. Posiblemente debido a que presentan un péptido de tránsito con señal bipartita.**

Los análisis de los protoplastos transformados tanto de *A. thaliana* como *Zea mays* utilizando el microscopio confocal, mostraron que la señal de la proteína (GFP) de las construcciones pEGZmDXS1-GFP y pEGZmDXS3-GFP se localizó con la autofluorescencia de la clorofila emitida por los cloroplastos. Interesantemente, la señal de la GFP se localizó en sitios específicos dentro de los cloroplastos mostrando patrones definidos dentro de éstos. Los datos sugieren que DXS1 y DXS3 podrían tener una localización suborganelar dentro del organelo.

Lichtenthaler (Lichtenthaler, 2007) publicó que en los cloroplastos existen tres sitios en donde se localizan isoprenoides. Estos sitios son: las membranas plastídicas, los tilacoides y los plastoglobulos situados en el estroma plastídico. Las membranas tanto internas como externas, contienen predominantemente los carotenoides: luteína y violaxantinas. Por su parte las membranas del tilacoide contienen clorofilas, carotenoides y diversos prenilquinonas, como la plastoquinona-9, así como bajas cantidades de  $\alpha$ -tocoferoles. Por otra parte, para el caso de los plastoglobulos que son cuerpos lipoproteicos asociados a las membranas tilacoideas, que tienen un tamaño aproximado entre 30 nm a 5  $\mu$ m y que se creían en un principio como solamente sitios de almacenaje de compuestos, se han detectado isoprenoides tales como: carotenoides, prenilquinonas (tocoferoles, plastoquinona y menaquinonas) e incluso clorofilas (Tevini *et al.*, 1985). Todas estas moléculas son productos finales de la biosíntesis de isoprenoides, iniciados por la vía MEP.

Recientemente, se demostró experimentalmente la localización subcelular de la enzima CCD de la planta *Crocus sativus* (en inglés, carotenoid cleavage dioxygenase) que corta sustratos carotenoides, en plastoglobulos de cloroplastos pertenecientes a plantas transgénicas de 5 semanas de edad. Esto mediante el uso de una fusión traduccional con la proteína GFP (CsCCD4a-GFP) (Rubio *et al.*, 2008). Este trabajo proporciona una referencia del patrón mostrado de una proteína plastoglobular fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) dentro de los cloroplastos.

El desarrollo reciente en proteómica y espectrometría de masas ayudó a la identificación del proteoma plastoglobular, mediante la purificación de plastoglobulos aislados de cloroplastos de *A. thaliana*. (Vidi *et al.*, 2006; Ytterberg *et al.*, 2006). En este análisis se identificaron proteínas (plastoglobulinas) pertenecientes a la familia PAP fibrilinas, que son los péptidos estructurales más abundantes en los

plastoglobulos, entre otras. Pero sorprendentemente también se identificaron enzimas metabólicas como: isoformas de la fructosa bifosfato aldolasa (FBA) y/o la aleno oxido sintasa (AOS) entre otras. Por años se consideraron a los plastoglobulos como únicamente cuerpos pasivos de almacenaje lipídico (Lichtenthaler, 1968; Tevini *et al.*, 1985). Es decir, estas estructuras podrían ser sitios de biosíntesis para enzimas plastídicas, aunque es interesante el hecho de que no se identificó a la enzima DXS u otras enzimas pertenecientes a la vía MEP en el proteoma del plastoglobulo. Entre las enzimas relacionadas a vías biosintéticas fueron identificadas la tocoferol ciclasa (VTE1), una enzima clave en la síntesis de vitamina E, la cual es una enzima que se encuentra pasos enzimáticos arriba de la vía MEP (Vidi *et al.*, 2006) El isopentenil difosfato (IPP) derivado de la vía MEP es usado como un precursor para la biosíntesis de los tocoferoles.

Por otra parte, una gran cantidad de proteínas deben relocalizarse en otros espacios del plástido, como son la membrana o el lumen del tilacoide, por ejemplo. Este proceso requiere de dos pasos de importe, por tanto, para este tipo de proteínas, se cuenta con la existencia de dos señales consecutivas (péptido de tránsito con señal bipartita).

Es interesante mencionar que Krushkal y colaboradores (2003), realizaron un análisis bioinformático de los péptidos de tránsito de distintas proteínas DXS de plantas, en donde observaron que a pesar de no existir una secuencia consenso, una serie de características existen en común entre los péptidos de tránsito analizados en el estudio. Estas características comprenden: residuos básicos en la parte C-terminal del péptido de tránsito que se sugiere son necesarios para permitir la importación de las proteínas a través de las membranas tilacoideas. Y con respecto a la estructura secundaria del péptido de tránsito una región hidrofóbica entre los residuos aminoácidos 35 a 45 y en ocho de doce secuencias analizadas, una secuencia Pro-Pro-Thr en la C-terminal se encuentra presente en los péptidos. Estas son algunas características que se propone son requeridas por las maquinarias de importe a tilacoide pertenecientes a las vías cpSec (en inglés secretory) y/o cpTat (twin arginine translocation). Estos datos son los primeros que sugieren que las proteínas DXS posiblemente se localizan en algún compartimento del tilacoide.

Estudios adicionales (ver perspectivas del trabajo) se requieren para demostrar experimentalmente la hipótesis de que *DXS1* y *DXS3* poseen una segunda secuencia señal bipartita que las dirige a un lugar específico en el cloroplasto.

Por lo tanto, sería totalmente novedoso comprobar de manera experimental la presencia de péptidos de tránsito (PTP) con señal bipartita en las proteínas DXS de maíz. El cual les conferiría una probable localización suborganelar dentro del cloroplasto. Algo aún no demostrado hasta la fecha para enzimas pertenecientes a la vía MEP.



## 9. CO NCLUSIONES

- En maíz la enzima DXS perteneciente a la vía MEP está codificada por una pequeña familia isogénica.
- Las proteínas DX S1 y DXS 3 poseen un péptido de tránsito de importe a plástidos (PTP).
- DXS1 y DXS3 tienen una localización suborganelar.
- DXS2 no es importado a cloroplasto. El extremo 5' del gen zmdxs2 utilizado en este estudio no permite una localización al cloroplasto.

## 10. PERSPECTIVAS

La información generada en este trabajo da pauta para continuar investigando en los siguientes puntos:

- **Caracterización funcional de DXS1 y DXS3.**

Un criterio que apoya la aprobación de la funcionalidad de las enzimas DXS de maíz en la vía MEP, es demostrar la presencia y funcionalidad de un péptido de tránsito (PTP), lo cual ha sido demostrado experimentalmente en este trabajo para DXS1 y DXS3. Para determinar de manera categórica que las enzimas aparentes DXS son funcionales, es decir, demostrar que tienen actividad bioquímica con actividad de DX sintasa. Se propone primero, realizar complementaciones con mutantes de DXS, por ejemplo en la bacteria *E. coli*. También se propone generar proteínas recombinantes para DXS1 y DXS3 y así analizar si poseen la capacidad de convertir el piruvato y GA-3P en DXP.

- **Determinación de péptidos de tránsito que tienen señal bipartita en las DXS de *Zea mays*.**

Con el antecedente de que las proteínas del tilacoide presentan péptidos de tránsito que tienen señal bipartita. Y debido a que las fusiones traduccionales con GFP hechas con el extremo 5' de la secuencia codificante de los genes *zmdxs1* y *zmdxs3*, presentan una localización suborganelar. Sería novedoso la realización de deleciones secuenciales del extremo 5' de los genes *dxs* de maíz para analizar la existencia de probables regiones (motivos o dominios) que señalan el importe.

- **Determinación específica de la localización suborganelar de DXS1 y DXS3.**

Se ha reportado la localización de los prorenoides en plastoglobulos, tilacoide y membranas plasmáticas dentro del cloroplasto. Con el objetivo de identificar con más precisión la localización suborganelar de las proteínas DXS1 y DXS3 de maíz dentro del cloroplasto, observadas en el presente trabajo. La cotransformación de

las construcciones generadas con marcadores proteicos para los sitios anteriormente mencionados utilizando protoplastos fusionados a un reportero, como una proteína fluorescente con distinta longitud de onda que la GFP, sería un experimento inicial aunado a un inmunoensayo utilizando anticuerpos.

- **Comprobación del uso de un codón alternativo de inicio de la traducción en el gen *zmdxs2* de *Zea mays*.**

El 5' RACE demostró que la secuencia del gen *zmdxs2* se extiende varios pares de bases hacia el extremo 5' del codón de inicio inicialmente propuesto, por tanto la secuencia estaba incompleta. El hallazgo de la no existencia de un codón ATG de inicio de la traducción en fase con la secuencia genómica, sugirió la posibilidad de codones alternativos para éste fin. Para demostrar esta posibilidad es necesario de manera inicial realizar una serie de fusiones traduccionales con GFP considerando el nuevo extremo 5', para comprobar si de esta forma la fusión puede localizarse en los cloroplastos.

- **Generación de plantas transgénicas doble sobreexpresoras.**

Estudios previos han mostrado que la sobreexpresión de la enzima DXS al ser una enzima limitante de la vía MEP produce un aumento en los niveles de productos finales. Se propone la generación de plantas transgénicas de *A. thaliana* que sean doble sobreexpresoras, utilizando las enzimas DXS de maíz junto con otras enzimas pertenecientes a la vía MEP. Para la eventual cuantificación del posible efecto en los productos finales isoprenoides.



## 11. APENDICE DE SOLUCIONES

### CTAB NUCLEAR

|                  |              |
|------------------|--------------|
| EDTA             | 50mM,        |
| Trizima Base     | 0.2 M pH 8.0 |
| NaCl             | 2.0 M        |
| CTAB, PVP        |              |
| H <sub>2</sub> O |              |

### CTAB 10%

|                  |     |
|------------------|-----|
| NaCl             | .7M |
| CTAB             |     |
| H <sub>2</sub> O |     |

### MEDIO LB (1L):

|                      |     |
|----------------------|-----|
| Peptona              | 10g |
| Extracto de levadura | 5g  |
| Cloruro de sodio     | 10g |

### TENS:

|          |          |
|----------|----------|
| Tris-HCl | pH8 10mM |
| EDTA     | 1mM      |
| NaOH     | 1N       |
| SDS      | 0.5%     |

### BUFFER DE CARGA:

|   |         |
|---|---------|
| Formamida   | 150 µl  |
| Formaldehido  | 56.8 µl |
| MOPS 10x  | 30 µl   |
| Colorante de azul de bromofenol y azul de xilencianol |         |
| Bromuro de etidio                                     |         |

**TAE (1X):**

|                     |        |
|---------------------|--------|
| 40 mM Tris- Acetato | pH 8.0 |
| EDTA 0,1            | mM     |

**SOLUCIONES DE LA PURIFICACIÓN POR CsCl:****Solución I:**

|      |           |
|------|-----------|
| EDTA | 10Mm pH:8 |
|------|-----------|

A temperatura de 4°C.

**Solución II** (preparada al momento de su utilización):

|      |      |
|------|------|
| NaOH | 0.1N |
|------|------|

SDS 1%

H2O destilada

**Solución III:**

|                  |                  |
|------------------|------------------|
| Acetato de Sodio | 3M pH= 5.2 o 4.8 |
|------------------|------------------|

**SOLUCIONES PARA LOS PROTOPLASTOS:****Solución enzimática:**

|          |    |
|----------|----|
| Celulosa | 1% |
|----------|----|

|            |      |
|------------|------|
| Macerozima | 0.4% |
|------------|------|

|          |       |
|----------|-------|
| Mannitol | 0.4 M |
|----------|-------|

|     |       |
|-----|-------|
| KCl | 20 mM |
|-----|-------|

|     |       |
|-----|-------|
| MES | 20 mM |
|-----|-------|

Se calienta a 55°C por 10 minutos para inactivar a las proteasas, posteriormente se le agrega:

|                   |       |
|-------------------|-------|
| CaCl <sub>2</sub> | 10 mM |
|-------------------|-------|

|                |      |
|----------------|------|
| Mercaptoetanol | 5 mM |
|----------------|------|

|     |      |
|-----|------|
| BSA | 0.1% |
|-----|------|

**SOLUCIÓN W1:**

|          |        |
|----------|--------|
| Mannitol | 0.5M   |
| MES      | 4 Mm   |
| KCl      | 0.02 M |

**SOLUCIÓN W5:**

|                   |         |
|-------------------|---------|
| NaCl              | 0.154 M |
| CaCl <sub>2</sub> | 0.125 M |
| KCl               | 0.005 M |
| MES               | 2 mM    |

**SOLUCIÓN MMg:**

|                   |         |
|-------------------|---------|
| Mannitol          | 0.4 M   |
| MgCl <sub>2</sub> | 0.015 M |
| MES               | 4 mM    |

## **ABREVIATURAS**

**ATP.** Adenosin trifosfato.

**CaMV35S.** Promotor del virus de mosaico coliflor.

**cDNA.** DNA complementario.

**Col.** Ecotipo Columbia.

**DMAPP.** Dimetilalil difosfato.

**DX.** 1-deoxi-D-xilulosa.

**DXP.** 1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato sintasa.

**DXR.** DXP reductoisomerasa.

**DXS.** 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato.

**EDTA.** Tetraacetato de etilendiamina.

**EST.** Expressed Sequence Tag.

**G3P.** Gliceraldehído 3-fosfato.

**GFP.** Proteína verde fluorescente.

**GTP.** Guanosin trifosfato.

**IPP.** Isopentenil difosfato.

**IPPI.** Isopentenil difosfato isomerasa

**KDa** Kilodaltones

**KM.** Kanamicina.

**MEP.** 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato.

**MES.** Ácido 4-morfolinetanesulfónico.

**NPTII.** Gen de la neomicina fototransferasa II.

**ORF.** Marco abierto de lectura.

**pb.** Pares de bases.

**PCR.** Reacción en cadena de la polimerasa.

**PTP.** Péptido de transporte a plástidos.

**TPP.** Tiamin difosfato.

**Wt.** Versión silvestre.



## 12. REFERENCIAS

**Abramczyk, D., Tchorzewski, M., G rankowski, N. ,** (2003). No n-AUG translation initiation of mRNA encoding acidic ribosomal P2A protein in *Candida albicans*. *Yeast* 20, pp. 1045–1052.

**Adam, P., Hetch, S., Eisenreich, W., Kaiser, J., Grawert, T., Arigoni, D., Bacher, Rohdich, F.** (2002) Biosynthesis of terpenes: Studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1-6

**Aharoni A, Giri AP, De uerlein S, Griepink F, de Kogel W, Verstappen F, Verhoeven HA, Jongsma MA, Schwab W, Bouwmeester HJ** (2003). Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell.* 15: 2866-2884.

**Araki N, Kusumi K, Masamoto K, Niwa Y, 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

Bach, T. J, Boronat, A., Campos, N., Ferrer, A. y Vollack, K-U. (1999) Mevalonate biosynthesis in plants. *Critical Rev. Biochem. Mol. Biol.* 34:107-122

**Arigoni, D., Sagner, S., Latzel, C., Eisenreich, W., Bacher, A. y Zenk, M. H** (1997). Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:10600-10605

**Arimura, S., Takusagawa, S., Hatano, S., Nakazono, M., Hirai, A., y Tsutsumi, N.** (1999). A novel plant nuclear gene encoding chloroplast ribosomal protein S9 has a transit peptide related to that of rice chloroplast ribosomal protein L12. *FEBS Lett.* 450: 231–234.

**Bejarno LA, Gonzalez C.** (1999). Motif trap: a rapid method to clone motifs that can target proteins to defined subcellular localizations. *Journal of Cell Science* 112, 4207–4211.

**Bhushan, S., Kuhn, C., Berglund, A.K., Roth, C., and Glaser, E.** (2006). The role of the N-terminal domain of chloroplast targeting peptides in organellar protein import and mis-sorting. *FEBS Lett.* 580: 3966–3972.

**Bick, J.A., Lange, B.M.** (2003). Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: Unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. *Arch. Biochem. Biophys.* 415:, 146–154.

**Bischoff F, Vahlkamp L, Molendijk A, Palme K.** (2000). Localization of AtRop4 and AtROP6 and interaction with the guanine nucleotide dissociation inhibitor AtRhoGD11 from *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 42, 515–530.

**Bishop, G. J. and Koncz, C.** (2002) Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling. *Plant cell* 14:97-110

**Boevink P, Oparka K, Santa Cruz S, Martin B, Betteridge AI, Hawes C.** (1998). Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *The Plant Journal* 15, 441–447.

**Bouvier, F., d'Harlingue, A., Suire, C., Backhaus, R. A. and Camara, B.** (1998) dedicated roles plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits. *Plant Physiol.* 117:1423-1431

**Bruce, B.D.** (2000). Chloroplast transit peptides: Structure, function and evolution. *Trends Cell Biol.* 10: 440–447.

**Buckingham, J.** (2004) Dictionary of Natural Products, Web Version 2004. London: Chapman and Hall

**Cavalier-Smith, T.** (2000). Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci.* 5, 174–182 .

**Clayton RB, Bloch K.** (1956). The biological conversion of lanosterol to cholesterol. *J Biol Chem.* Jan; 218 (1):319-25.

**Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. and Prasher, D. C.** (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.

**Chiu WL, Niwa Y, Zeng W, Hirano T, Kobayashi H, Sheen J.** (1996). Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology* 6, 325–330.

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

**Croteau R, Kutchan, TM, Lewis NG,** (2000). Natural products (secondary metabolites). In Buchanan B, Gruissem W, Jones R (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists. pp. 1250-1318.

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

**Cunningham, F. X. y Grantt, E.** (2000) Identification of mu lti-gene familie s en coding isopentenyl diphosphate isomerase in plants by heterologous complementation in *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol.* 41:119-123

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

**David, S., Estramareix, B., Fischer, J. C. y Th  risod, 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

**Delwiche C** (1999) Tracing the thread of plas tid diversity through the tapestry of life . *Am Nat* 154:S164–S177.

**Dhonukshe, P. y Gadella, T.W., Jr** (2003) Alteration of microtubule dynamic instability during preprophase band formation revealed by yellow fluorescent protein-CLIP170 microtubule plus-end labeling. *Plant Cell* 15, 597–611

**Di Sansebasiano G-P, Paris N, Marc-Martin S, Neuhaus J-M.** (1998). Specific accumulation of GFP in a non- acidic v acuolar c ompartment v ia a C-terminal pro peptide-mediated s orting pathway. *The Plant Journal* 15, 449–457.

**Doolman R, Dinbar A, Sela BA** (1995). Improved measurement of transketolase activity in the assessment of "TPP effect". *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 33 (7): 445–6.

**Duby, G. et al.** (2001) Hydrophobic residues within the predicted N-terminal amphiphilic alpha-helix of a plant mitochondrial targeting presequence play a major role in in vivo import. *Plant J.* 27, 539–549

**Earley, K.W., Haag, J.R., Pontes, O., Opper, K., Jue hne, T., Song, K.M. y Pikaard, C.S.** (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J.* 45, 616–629.

**Eichacker, L. A. & Henry. R.** (2001) Function of a chloroplast SRP in thylakoid protein export. *Biochim. Biophys. Acta* 1541, 120–134.

**Eisenreich, W., Rohd ich, F. and Bacher, A.** (2001) Deoxyxylulose phosphate pat hway t o terpenoids. *Trends Plant Sci.* 6:78-84

**Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., and Rohdich, F.** (2004) *Cell Mol. Life Sci.* 61, 1401–1426

**Emanuelsson, O., and von Heijne, G.** (2001). Prediction of organellar targeting signals. *Biochim. Biophys. Acta* 1541: 114–119.

**Eriksson, M. E., Israelson, M., Olsson, O. y Moritz, T.** (2000) Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. *Nat. Biotechnol.* 18:784-788

**Erkel, G. & Anke, T.** (1994) Hyphodontal, a new antifungal inhibitor of reverse transcriptases from *Hyphodontia* sp.(Corticaceae, Basidiomycetes). *Z. Naturforsch. [C]* 49, 561–570.

**Essl D, Dirnberger D, Gomord V, Strasser R, Faye L, Gloessl J, Steinkellner H.** (1999). The N-terminal 77 amino acids from tobacco *N*-acetylglucosaminyltransferase I are sufficient to retain a reporter protein in the Golgi apparatus of *Nicotiana benthamiana* cells. *FEBS Letters* 453, 169–173.

**Estevez, J.M. et al.** (2000) Analysis of the expression of CL A1, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-Cmethyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124, 95–103.

**Estévez JM, Cantero A, Reindl A, Reichler S, Leon P** (2001) 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J Biol Chem.* 276:22901–22909

**Flores-Pérez, U. et al.** (2008) A mutant impaired in the production of plastome-encoded proteins uncovers a mechanism for the homeostasis of isoprenoid biosynthetic enzymes in *Arabidopsis* plastids. *Plant Cell* 20, 1303–1315

**Frederich, M., Dogneacute, J. M., Angenot, L. y De Moluc, P.** (2002) New trends in anti-malarial agents. *Curr. Med. Chem.* 9:1435-1456.

**Fütterer, J., y T. Hohn.** (1996.) Translation in plants: rules and exceptions. *Plant Mol. Biol.* 32:159-189

**Fütterer, J., I. Potrykus, Y. Bao, L. Li, T. M. Burns, R. Hull, y T. Hohn.** (1996). Position-dependent ATT initiation during plant pararetrovirus rice tungro bacilliform virus translation. *J. Virol.* 70:2999-3010

**Gantt, J.S., Baldauf, S.L., Calie, P.J., Weeden, N.F., y Palmer, J.D.** (1991). Transfer of rpl22 to the nucleus greatly preceded its loss from the chloroplast and involved the gain of an intron. *EMBO J.* 10: 3073–3078.

**Galbraith DW, Herzenberg LA, Anderson MT.** (1999). Flow cytometric analysis of transgene expression in higher plant: green fluorescent protein. *Methods in Enzymology* 302, 296–315.

**Giovannucci, E.** (1999) Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J. Natl. Cancer Inst.* 91:1225-1230

**Goldstein, J. L. y Brown, M. S** (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Science* 343:425-430

**Grebenok RJ, Pierson E A, Lambert GM, Gong F-C, Afonso CL, Haldemann-Cahill R, Carrington JC, Galbraith DW.** (1997) Green-fluorescent protein fusions for efficient characterization of nuclear localization signals. *The Plant Journal* 11, 573–586.

**Griffiths, Anthony J.F.; Miller, Jeffrey H.; Suzuki, David T.; Lewontin, Richard C.; Gelbart, William M.** (1999). *Introduction to Genetic Analysis* (7th ed.). New York: W. H. Freeman & Co.

**Groot, S. P. C., Bruinsma, J., and Karssen, C. M.** (1987) The role of endogenous gibberellins in seed and fruit development of tomato: Studies with a gibberellin-deficient mutant. *Physiol. Plant.* 71:184-190.

Gong Y F, Liao Z H, Guo B H, Sun X F and Tang K X (2006) Molecular cloning and expression profile analysis of *Ginkgo biloba* DXS gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Planta Med* 72: 329-335.

**Guevara-Garcia A, San Roman C, Arroyo A, Cortes ME, de la Luz Gutierrez-Nava M, Leon P** (2005) Characterization of the *Arabidopsis* clb6 mutant illustrates the importance of posttranscriptional regulation of the methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Cell* 17:628–643

**Gutensohn, M., Schulz, B., Nicolay, P., y Flugge, U.I.** (2000). Functional analysis of the two *Arabidopsis* homologues of Toc34, a component of the chloroplast protein import apparatus. *Plant J.* 23: 771–783.

**Haseloff J, Siemerling KR, Prasher DC, Hodge S.** (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 94, 2122–2127.

**Haseloff J, Siemerling KR.** (1998). The uses of GFP in plants. In: Chalfie M, Kain S, eds. *Green fluorescent protein: strategies, applications, and protocols*, Wiley, 191–220.

**Haseloff J.** (1999). GFP variants for multispectral imaging of living cells. In: Kay S, Sullivan K, eds. *Methods in cell biology*, Vol. 58. Academic Press, 139–151.

**Hasezawa S, Ueda K, Kumagai F.** (2000). Time-sequence observations of microtubule dynamics throughout mitosis in living cell suspensions of stable transgenic *Arabidopsis*— direct evidence for the origin of cortical microtubules at M/G(1) interface. *Plant and Cell Physiology* 41, 244–250.

**Hedtke B, Meixner M, Gillandt S, Richter E, Borner T, Weihe A.** (1999). Green fluorescent protein as a marker to investigate targeting of organellar RNA polymerases of higher plants *in vivo*. *The Plant Journal* 17, 557–561.

**Herz S, Wongsintaweekul J, Schuhr C A, Hecht S, Lüttgen H, Sagner S, Fellermeier M, Eisenreich W, Zenk M H, Bacher A, Rohdich F.** (2000). Biosynthesis of terpenoids: YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol-2-phosphate to 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate. *PNAS*. 97(6):2486-2490.

**Hill R E, Sayer B G, Spenser I D.** (1989) Biosynthesis of vitamin B6: incorporation of D-1-deoxyxylulose. *J. Am. Chem. Soc.* 111:1916-1917

**Hirschberg J.** (1999) Production of high-value compounds: carotenoids and vitamin E. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10:186-191

**Hirschberg J.** (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:210-218

**Hsieh M.H., Chang C.Y., Hsu S.-J., Chen J.-J.** (2008) Chloroplast localization of methylerythritol 4-phosphate pathway enzymes and regulation of mitochondrial genes in *ispD* and *ispE* albino mutants in *Arabidopsis*, *Plant Mol Biol* 66 . pp. 663–673..

**Jackson-Constan, D., Aikita, M. & Keegstra, K.** (2001) Molecular chaperones involved in chloroplast protein import. *Biochim. Biophys. Acta* 1541, 102–113 .

**Jarvis, P., and Soll, J.** (2002). Toc, tic, and chloroplast protein import. *Biochim. Biophys. Acta* 1590: 177–189.

**Jarvis P, Robinson C.** (2004). Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. *Current Biology* 14, R1064–R1077.

**Jürgens U. J., Simonin P. y Rohmer M.** (1992) Localization and distribution of hopanoids in membrane systems of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. FEMS Microbiol. Lett. 92:285-288.

**Kadowaki K-I, Kubo N, Ozawa K, Hirai A** (1996) Targeting presequence acquisition after mitochondrial gene transfer to the nucleus occurs by duplication of existing target signals. EMBO J 15: 6652-6661

**Kasahara, H., Hanada, A., Kuzuyama, T., Takagi, M., Kamiya, Y. y Yamaguchi, S.** (2002) Roles of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways in the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis*. J. Biol. Chem. 277(47):45188-94

**Kessler, F., and Schnell, D.J.** (2004). Chloroplast protein import: Solve the GTPase riddle for entry. Trends Cell Biol. 14: 334–338.

**Kim B. R, Kim S. U, Chang Y. J** (2005) .Differential expression of three 1-deoxy-D: -xylulose-5-phosphate synthase genes in rice. Biotechnol Lett 27: 997-1001

**Kim SM, Kuzuyama T, Chang YJ, Kim SU** (2006) Cloning and characterization of 2-C-methyl-D: -erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (MECS) gene from *Ginkgo biloba*. Plant Cell Rep 25:829–885

**Khosla, C. & Keasling, J.D.** (2003) Metabolic engineering for drug discovery and development. Nat. Rev. Drug Discov. 2, 1019–1025.

**Köhler, R.H. et al.** (1997) Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids. Science 276, 2039–2042

**Köhler RH, Zipfel WR, Webb WW, Hanson MR.** (1997). The green fluorescent protein as a marker to visualize plant mitochondria *in vivo*. The Plant Journal 11, 613–621.

**Köhler RH.** (1998). GFP for *in vivo* imaging of subcellular structures in plant cells. Trends in Plant Science 3, 317–320.

**Köhler RH, Hanson MR.** (2000). Chloroplast-tubules of vascular plants are tissue-specific and developmentally regulated. Journal of Cell Science 113, 81–89.

**Kost B, Spielhofer P, Chua N-H.** (1999). A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments *in vivo* and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. The Plant Journal 16, 392–401.

**Krushkal J, Pistilli M, Ferrell KM, Souret FF, Weathers PJ.** (2003). Computational analysis of the evolution of the structure and function of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a key regulator of the mevalonate-independent pathway in plants. *Gene*. 14; 313:127-38.

**Kunau, W. H.** (2001) Peroxisomes: the extended shuttle to the peroxisome matrix. *Curr. Biol.* 11, R659–R662 .

**Kuzuyama, T., Takahashi, S., Watanabe, H. and Seto, H.** (1998). Direct formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate from 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate by 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, a new enzyme in the non-mevalonate pathway to isopentenyl diphosphate. *Tetrahedron Letters*. 39:4509-4512.

**Landy, A.** (1989). Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda Site-specific Recombination. *Ann. Rev. Biochem.* 58, 913-949.

**Lange, B. M., Ruja n, T., Ma rtin, W. and Croteau , R.** (2000) Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 24:13172-13177

**Lange, B. M., Wildung, M. R., McCaskill, D. and Croteau, T.** (1998) A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:2100-2104

**Lange, B. M., Ruja n, T., Ma rtin, W. and Croteau , R.** (2000) Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 24:13172-13177

**Lange BM, Ketchum REB, Croteau R** (2001) Isoprenoid biosynthesis: metabolite profiling of peppermint oil gland secretory cells and application to herbicide target analysis. *Plant Physiol* 127: 305-314

**Lee DW, Kim JK, Lee S, Choi S, Kim S & Hwang I** (2008) Arabidopsis nuclear-encoded plastid transit peptides contain multiple sequence subgroups with distinctive chloroplast-targeting sequence motifs. *Plant Cell* 20, 1603–1622.

**Laule, O., Fürholz, A., Chang, H., Zhu, T., Wang, X., Heifetz, P.B., Grisse, W., and Lange, M.** (2003). Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 6866–6871

**Lichtenthaler, H.K.** (1968) Plastoglobuli and the structure of plastids. *Endeavour*, 27, 144.

**Lichtenthaler, H.K., Schewander, J., Disch, A. y Rohmer, M.** (1997). Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Letters*. 400:271-274.

**Lichtenthaler H.K.** (1999) The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:47–65

**Lichtenthaler H.K.**, (2000) Non-mevalonate isoprenoid biosynthesis: enzymes, genes and inhibitors, *Biochem. Soc. Trans.* 28, pp. 785–789.

**Lichtenthaler HK** (2007) Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids, alpha-tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthetic irradiance. *Photosynth Res* 92: 163–179

**León P y Guevara García, AA.** (2007) El cloroplasto: Un organelo clave en la vida y el aprovechamiento de las plantas en una ventana al quehacer científico. Instituto de Biotecnología de la UNAM 25 Aniversario. Ed. Rebolledo, F. & López Munguía, A. Universidad Nacional Autónoma de México 215-230 pp.

**León P y Guevara García, AA.** (2007) La síntesis de isoprenoides a través de la vía MEP; Un nuevo blanco de manipulación para la salud y el beneficio humano. Universidad Nacional Autónoma de México 77-90 pp

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

**Logan DC, Leaver CJ.** (2000). Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cell. *Journal of Experimental Botany* 51, 865–871.

**Logan B. A., Monson R.K. and Potosnak M. J.** (2000) Biochemistry and physiology of foliar isoprene production. *Trends Plant Sci.* 5 (11):477-481.

**Logan, D.C.** (2007) The mitochondrial compartment. *J. Exp. Bot.* 58, 1225–1243

**Lunn, J. E.** (2007). Compartmentation in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 58, 543–547.

**Lüttgen, H., Rondich, F., Herz, S., Wongsintaweekul, J., Hecht, S., Schuhr, C. A., Fellermeier, M., Sagner, S., Zenk, M. H., Bacher, A. and Eisenreich, W.** (2000). Biosynthesis of terpenoids: YcbB protein of *Escherichia coli* phosphorylates the 2-hydroxy group of 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol. *PNAS*. 97(3):1062-1067.

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

**Mandel MA, Feldmann KA, Herrera-Estrella L, Rocha-Sosa M, León P** (1996) *CLA1*, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant J* 9: 649–658

**Mano S, Hayashi M, Nishimura M.** (1999). Light regulates alternative splicing of hydroxypyruvate reductase in pumpkin. *The Plant Journal* 17, 309–320

Marques, J.P., Schattat, M.H., Hause, G., Dudeck, I. and Klösgen, R.B. (2004) In vivo transport of folded GFP by the pH/TAT-dependent pathway in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 55, 1697–1706.

**Mathur, J. et al.** (2002) Simultaneous visualization of peroxisomes and cytoskeletal elements reveals actin and not microtubule-based peroxisome motility in plants. *Plant Physiol.* 128, 1031–1045

**Mathur, J. et al.** (2003) A novel localization pattern for an EB1-like protein links microtubule dynamics to endo-membrane organization. *Curr. Biol.* 13, 1991–1998

**Mathur J.** (2007) The Illuminated Plant Cell. *Trends Plant Sci.* 12(11):506-13

**McFadden, G.I.** (1999). Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 513–519.

**McGarvey D, Croteau R** (1995) Terpenoid metabolism. *Plant cell* 7:1015–1026

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

**Mori, H. & Cline, K.** (2001) Post-translational protein translocation into thylakoids by the Sec and  $\tau$ pH-dependent pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1541, 80–90.

**Neuhaus, J. & Rogers, J. C.** (1998) Sorting of proteins to vacuoles in plant cells. *Plant Mol. Biol.* 38, 127–144.

**Okada K, Kawaide H, Kuzuyama T, Setao H, Curtis IS, Kamiya Y** (2002) Antisense and chemical suppression of the non-mevalonate pathway affects *ent*-kaurene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Planta* 215: 339-344

**Page JE, Hause G, Raschke M, Gao W, Schmidt J, Zenk MH, Kutchan TM** (2004) Functional analysis of the final steps of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) pathway to isoprenoids in plants using virus-induced gene silencing. *Plant Physiol* 134: 1401–1413

**Pang SZ, Deboer DL, Wan Y, Ye G, Layton JG, Neher MK, Armstrong CL, Fry JE, Hinchey MAW, Fromm ME.** (1996). An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants. *Plant Physiology* 112, 893–900.

**Pfanner, N. & Geissler, A.** (2001) Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 2, 339–349.

**Pichersky E, Gang DR** (2000) Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci* 5: 439–445

**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.

**Raskin, I. et al.** (2002). Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol.* 20, 522–531.

**Reichel C, Mathur J, Eckes P, Langenkemper K, Koncz C, Schell J, Reiss B, Maas C.** (1996). Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 93, 5888–5893.

**Rensink, W.A., Pilon, M., and Weisbeek, P.** (1998). Domains of a transit sequence required for in vivo import in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Physiol.* 118: 691–699.

**Riechmann, J. L., T. Ito, and E. M. Meyerowitz.** (1999). Non-AUG initiation of AGAMOUS mRNA translation in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell. Biol.* 19:8505-8512

**Roberts SC.** (2007) Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nat Chem Biol.* 3 (7):387-95.

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

**Rodríguez-Concepción M, Boronat A** (2002) Elucidation of the methyl erythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids: a metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol* 130: 1079–1089

**Rohde, W., A. Gramstat, J. Schmitz, E. Tacke, and D. Prüfer.** (1994). Plant viruses as model systems for the study of non-canonical translation mechanisms in higher plants. *J. Gen. Virol.* 75:2141-2149

**Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Fellermeier, M., Sagner, S., Herz, S. Kis, K., Bacher, A. and Zenk, M.** (1999). Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96(21):11758-11763.

**Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Richter, G., Schuhr. C. A., Hecht, S., Zenk, M. H. and Bacher, A.** (2000). Biosynthesis of terpenoids: 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol synthase of *Arabidopsis thaliana*. *PNAS.* 97(12):6451-6456.

**Rohmer M, Knaani M, Simonin P, Sutter B, Sahm 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.* 16 565–574

**Rouwendal GJA, Mendes O, Wolbert EJH, DeBoer AD.** (1997). Enhanced expression in tobacco of the gene encoding green fluorescent protein by modification of its codon usage. *Plant Molecular Biology* 33, 989–999.

**Rubio A, Rambla JL, Santaella M, Gómez MD, Orzaez D, Granell A, Gómez-Gómez L** (2008) Cytosolic and plastoglobule targeted carotenoid dioxygenases from *Crocus sativus* are both involved in  $\beta$ -ionone-release. *J Biol Chem* 283: 24816–24825

**Rujan, T. et al.** (2002) Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 429–441.

**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.

**Sambrook J, Fritsch E F , Maniatis T** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY).

**Schein, A.I., Kissinger, J.C., and Ungar, L.H.** (2001). Chloroplast transit peptide prediction: a peek inside the black box. *Nucleic Acids Res.* 29: E82

**Schleiff, E., and R.B. Klösgen.** (2001). Without a little help of "my" friends—direct insertion of proteins into chloroplast membranes? *Biochim. Biophys. Acta.* 1541:22–33.

**Schleiff, E., and Soll, J.** (2005). Membrane protein insertion: Mixing eukaryotic and prokaryotic concepts. *EMBO Rep.* 6: 1023–1027.

**Schuenemann D, Amin P, Hartmann E, Hoffman NE.** (1999). Chloroplast SecY is complexed to SecE and involved in the translocation of the 33 kDa but not the 23 kDa subunit of the oxygen-evolving complex. *Journal of Biological Chemistry* 274, 12177–12182.

**Schulte, A. E, Llamas-Durán, E, M., van del Heijden, R. And Verpoorte, R.** (2000). Mevalonate kinase activity in *Chatarantus roseus* plants and suspension cultured cells. *Plant Sci.* 150:59-69

**Schwender, J., Müller, C., Zeidler, J. y Lichtenthaler, H. K.** (1999). Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters.* 455:140-144.

**Scott A, Wyatt S, Tsou P-L, Robertson D, Allen NS.** (1999). Model system for plant cell biology: GFP imaging in living onion epidermal cells. *Biotechniques* 26, 1125–1132.

**Sheen J.** (2001) Signal transduction in maize and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. *Plant Physiol* 127: 1466–1475

**Shintani, D., DellaPenna, D.** (1998) Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science.* 282:2098-2100.

**Shirako, Y.** (1998). Non-AUG translation initiation in a plant RNA virus: a forty-amino-acid extension is added to the N terminus of the soil-borne wheat mosaic virus capsid protein. *J. Virol.* 72:1677-1682

**Smith, M.D., Rounds, C.M., Wang, F., Chen, K., Afitlhile, M., Schnell, D.J.** (2004). atToc159 is a selective transit peptide receptor for the import of nucleus-encoded chloroplast proteins. *J. Cell Biol.* 165: 323–334.

**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 of isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:12857-62.

**Suzuki, J. Y., Bollivar, D. W. and Bauer, C. E.** (1997) Genetic analysis of chlorophyll biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* 31:61-89.

**Svesnikova, N., Soll, J. & Schleiff, E.** (2000) Toc34 is a preprotein receptor regulated by GTP and phosphorylation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 4973–4978.

**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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:9879-9884

**Takahashi, K., Maruyama, M., Tokuzawa, Y., Murakami, M., Oda, Y., Yoshikane, N., Makabe, K. W., Ichisaka, T., and Yamanaka, S.** (2005). Evolutionarily conserved non-AUG translation initiation in NAT1/p97/DAP5 (EIF4G2). *Genomics* 85: 360–371.

**Tan, R. X. et al.** (1999) Mono- and sesquiterpenes and antifungal constituents from *Artemisia* species. *Planta Med.* 65, 64–67.

**Tevini, M., and Steinmuller, D.** (1985). Composition and function of plastoglobuli. II. Lipid composition of leaves and plastoglobuli during beech leaf senescence. *Planta* 163: 91–96.

**Vainonen, J.P., Sakuragi, Y., Stael, S. et al.** (2008) Light regulation of CaS, a novel phosphoprotein in the thylakoid membrane of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J.* 275, 1767–1777.

**Vidi, P.-A., Kanwischer, M., Baginsky, S., Austin, J.R., Csucs, G., Dormann, P., Kessler, F., and Brehelin, C.** (2006). Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. *J. Biol. Chem.* 281: 11225–11234.

**von Heijne, G., Steppuhn, J., and Herrmann, R.G.** (1989). Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.* 180: 535–545.

**Walter MH, Fester T, Strack D** (2000) Arbuscular mycorrhizal fungi induce the non-mevalonate methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis correlated with the accumulation of the "yellow pigment" and other apocarotenoids. *Plant J* 21: 571–578

**Walter MH, Hans J, Strack D** (2002) Two distantly related genes encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in roots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. *Plant J* 31: 243–254

**Wienk, H.L., Czisch, M., and de Kruijff, B.** (1999). The structural flexibility of the preferredoxin transit peptide. *FEBS Lett.* 453: 318–326.

**Wienk, H.L., Wechsberger, R.W., Czisch, M., and de Kruijff, B.** (2000). Structure, dynamics, and insertion of a chloroplast targeting peptide in mixed micelles. *Biochemistry* 39: 8219–8282.

**Whitehead I. M. Threlfall D. R. and Ewing D. F.** (1989) *5-epi-Aristolochene* is a common precursor of the sesquiterpenoid phytoalexins capsidiol and debneyol. *Phytochemistry.* 28:775-779.

**Wolf, M., Seeman, M., Grosdemange-Billiard, C., Tritsch, D., Campos, N., Rodríguez-Concepción, M., Boronat, A. and Rohmer, M.** (2002) Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway. (*E*)-4-hydroxy-3-methylbutenyl-2-diphosphate: chemical synthesis and formation from methylerythritol cyclo diphosphate by cell-free system from *Escherichia coli*. *Tetrahedron Lett.* 43:2555-2559

**Xiang, S., Usunow, G., Lange, G., Busch, M., and Tong, L.** (2007) *J. Biol. Chem.* 282, 2676–2682

**Yamaguchi, S. and Kamiya, Y.** (2000) Gibberellin biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant Cell Physiol.* 41:251-257

**Yamaguchi, S. and Kamiya, Y.** (2001) Gibberellins and light-stimulated seed germination. *J Plant Growth Regul.* 20:369-376

**Young, M. E., Keegstra, K. & Froehlich, J. E.** (1999) GTP promotes the formation of early-import intermediates but is not required during the translocation step of protein import into chloroplasts. *Plant Physiol.* 121, 237–243.

**Ytterberg, A.J., Peltier, J.B., and van Wijk, K.J.** (2006). Protein profiling of plastoglobules in chloroplasts and chromoplasts. A surprising site for differential accumulation of metabolic enzymes. *Plant Physiol.* 140: 984–997.

**Zhang, X.P., and Glaser, E.** (2002). Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone. *Trends Plant Sci.* 7: 14–21.

**Zhang M, Li K, Zhang C, Gai J, Yu D.** (2008) Identification and characterization of class 1 DXS gene encoding 1-deoxy-D: -xylulose-5-phosphate synthase, the first committed enzyme of the MEP pathway from soybean. *Mol Biol Reph.*